Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality zemědělských produktů

Možnosti náhrady dusitanu v masných výrobcích

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Alena Štíbrová

Vedoucí práce: Ing. Ludmila Prokůpková, Ph.D.

© 2013 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Možnosti náhrady dusitanu v masných výrobcích" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucí diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 12.4.2013 _____

Štíbrová Alena

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Ludmile Prokůpkové, Ph.D. za odborné vedení práce, podnětné rady a zapůjčenou literaturu. Dále bych chtěla poděkovat vedení firmy Natura Food Additives a.s., za jejíž podpory byla tato práce vypracována, a v neposlední řadě bych ráda poděkovala všem respondentům, bez jejichž trpělivosti a shovívavosti by nemohla praktická část mé diplomové práce vzniknout.

Možnosti náhrady dusitanu v masných výrobcích

Possible substitutes nitrite in meat products

Souhrn

K zajištění bezpečnosti a zdravotní nezávadnosti masných výrobků mimo jiné přispívá aplikace dusitanu, který se dále podílí na úpravě organoleptických vlastností (např. barvy). Vzhledem k některým nepříznivým vlastnostem dusitanu se objevují tendence dusitany z potravin odstranit. Ale jejich významné konzervační účinky vedou k hledání náhrady. Jako alternativa dusitanů se nabízí rostlinné zdroje - zeleniny, přirozeně obsahující dusičnany, které lze redukovat na dusitany.

v souboru sušených zelenin (cibule, brambory, zelí, pastinák, červená řepa, celer) byly proměřeny přítomné koncentrace dusičnanů a následně vybrány právě 3 druhy zeleniny. v případě červené řepy je přítomno barvivo, které může výrobek ovlivnit při senzorickém hodnocení z hlediska barvy, dále zelí jako zástupce listové zeleniny, které může mít vliv na chutnost výrobku a celer. Z uvedených druhů zelenin byly připraveny extrakty, jako zdroj dusičnanů, které byly smíchány spolu s dalšími ingrediencemi, včetně přídavku nitrtátredukující mikroflory, podle navržené receptury. Následně byly vyrobeny šunky. v takto vyrobených šunkách byly hodnoceny organoleptické vlastnosti, stupeň vybarvení a zbytkové množství dusitanů a dusičnanů. Na základě výsledků byly zvýšeny koncentrace dusičnanů v zeleninových extraktech a znovu vyrobeny šunky, které byly ponechány 24 a 48 hodin před tepelným opracováním v chladu.

Z výsledků vyplývá, že dusitan lze nahradit zeleninovým extraktem obsahující dusičnany, avšak je potřeba stanovit vhodnou koncentraci dusičnanů, dobu a teplotu působení nitrátredukující mikroflóry.

Výsledky senzorického hodnocení byly zpracovány programem STATISTICA, kde byly porovnány statisticky průkazné rozdíly mezi šunkami se zeleninovým extraktem a šunkami s dusitanovou solící směsí.

Klíčová slova: masné výrobky, konzervační látky, barva, dusitany

Summary

In the production of a wide range of meat products, application of nitrites is used to ensure the safety and wholesomeness of the food. Nitrites also affect organoleptic properties of the products (e.g. colour). Lately, conclusively unfavourable properties of nitrates led to tendencies to remove them from food. However, due to their significant preservative effects, simply omitting them is not possible. One of the potential substitutes for industrially produced nitrites is the usage of nitrates that are naturally contained in plants and can be further reduced to nitrites.

Among suitable types of vegetables (onion, potatoes, cabbage, parsnip, beetroot and celery), based on nitrate concentration measurements, three were chosen for the purposes of this thesis. Beetroot for its colouring that favourably affects sensory evaluation, cabbage as a representative of leaf vegetables and celery. Extracts from the vegetables were mixed together with other ingredients including nitrate-reducing microflora by a designed formula. These mixtures were used to make hams. Organoleptic properties of the hams, the degree of coloration and residual levels of nitrites and nitrates were then evaluated. Based on the results nitrate concentrations in the extracts were increased and two additional batches of hams were made. One was left in the cold for 24 hours before cooking, the other for 48 hours.

The results show that nitrite can be replaced with vegetable extract containing nitrates, but it is required to determine the appropriate concentration of nitrates and the temperature and duration of the nitrate-reducing microflora activity.

The results of sensory evaluation were processed in STATISTICA software to compare statistically significant differences between conventionally made ham and the hams with vegetable extracts.

Keywords: meat products, preservatives, colour, nitrites

Obsah

1. Úvod **8**

2. Vědecká hypotéza a cíl práce **9**

3. Literární rešerše **10**

3.1. Nakládání masa **10**

3.2. Dusičnany **10**

3.3. Dusitany **10**

3.2.1. Účinnost dusitanů 11

3.2.2. Barva masných výrobků 12

3.2.3. Antioxidační účinky 13

3.2.4. *Clostridium botulinum* 14

3.2.5. Hygienické hledisko 15

3.2.6. Limity 17

3.2.7. Stanovení dusitanů 18

3.2. Barviva **19**

3.2.1. Annato 19

3.2.2. Košenila 21

3.2.3. Betanin 23

3.3. Masné výrobky bez použití dusitanů **24**

4. Materiál a metody **26**

4.1. Přehled vzorků **26**

4.2. Příprava vzorků **26**

4.2.1. Příprava extraktu 26

4.3. Použité chemikálie a roztoky **26**

4.4. Přístroje a pomůcky **27**

4.5. Pracovní postupy 27

4.5.1. Zeleninové extrakty 27

4.5.2. Šunky 29

4.5.3. Příprava extraktu 31

4.5.4. Stanovení dusičnanů 32

4.5.5. Stanovení dusitanů 32

4.5.6. Stupeň vybarvení 33

4.5.7. Senzorická analýza 33

4.5.8. Statistické vyhodnocení 33

5. Výsledky 35

6. Diskuze 59

7. Závěr 62

8. Seznam literatury 63

9. Přílohy 70

1. Úvod

K zajištění bezpečnosti v masných výrobcích se využívá několik metod, mezi které patří přídavek dusitanu. Ten je také důležitým faktorem při tvorbě růžového vybarvení, zpomalení rozvoji nežádoucích pachů a zpomalení oxidace lipidů. Dusitany se však mohou projevit i negativními účinky, jako za určitých okolností vznik methemoglobinémie nebo mohou přispět ke vzniku karcinogenních N-nitrosaminů. Proto se v posledních letech zvyšují tendence dusitany z masných výrobků odstranit a nahradit je jinými, stejně účinnými látkami.

Jako možná alternativa náhrady dusitanů v masných výrobcích lze využít rostlinné zdroje dusičnanů, jež je nutno následně redukovat na dusitany. Vhodnými zástupci rostlinných zdrojů dusičnanů je zelenina, která kumuluje dusičnany, například kořenová zelenina. Dalšími zdroji s vyšším obsahem dusičnanů mouhou býtnapř. řepa, špenát, salát, zelí a další.

V souvislosti s použitím zeleniny jako alternativy aplikace dusitanové solicí směsi, je třeba se zaměřit na organoleptické vlastnosti masného výrobku, jež mohou být přidanou zeleninou ovlivněny. A dále je nutné se věnovat podmínkám účinnosti nitrátredukující mikroflóry, aby byl dodržen povolený limit obsah reziduálních dusičnanů a dusitanů.

2. Vědecká hypotéza a cíl práce

Cílem diplomové práce je testovat možnosti náhrady dusitanové solící směsi v díle tepelně opracovaných masných výrobků typu šunka jinou přídatnou látkou.

Hypotéza diplomové práce zní: Dusitan lze nahradit s ohledem na všechny aspekty jeho působení v díle masného výrobku. Je třeba tuto hypotézu potvrdit, či vyvrátit.

3. Literární rešerše

3.1. Nakládání masa

Nakládání masa je termín, který označuje použití dusitanové nebo dusičnanové solící směsi, za účelem stabilizace barvy a prodloužení údržnosti masného výrobku (Kameník a Král, 2012). Nakládání masa je jednou z nejpoužívanějších technologií v masném průmyslu, která se provádí několika způsoby: nakládání mokrou, nebo suchou cestou a injektáží, kdy je aplikován chlorid sodný a dusitan, nebo dusičnan k čerstvému masu. I přes skutečnost, že tato metoda skýtá mnohé nevýhody, je ve své podstatě díky svým výhodám takřka nenahraditelná (Velasco-Arjona et al., 1998). Maso se nakládá již po celá staletí, avšak v prvopočátcích tohoto technologického postupu byla používána pouze kuchyňská sůl, díky které se maso kazilo pomaleji. Teprve později se do masa začal přidávat dusičnan draselný nebo sodný, který vytvořil žádoucí růžové zbarvení a příjemnou chuť, neboť se v důsledku přirozeně se vyskytujících bakterií v průběhu času redukoval na důležitý dusitan. Dnes je zvykem přidávat do masných výrobků již zredukovaný dusitan, který zastává mnohé funkce (Krause et al., 2011).

3.2. Dusičnany

Dusičnany jsou přirozenou součástí některých rostlin, zejména listové zeleniny, jako je například čínské zelí, špenát a salát. Jejich koncentrace závisí na mnoha faktorech, na teplotě a intenzitě světla během růstu, na genotypu, typu půdy, zavlažování a dalších (Parks et al., 2012). Dusičnany dříve plnily důležitou funkci v masném průmyslu, dnes už méně, kdy se ve formě ledku, neboli dusičnanu draselného se přidával do masa při výrobě masných výrobků kvůli konzervaci a tvorbě růžového zabarvení. Působením některých mikroorganismů (Honikel, 2008) lze dusičnany v láku redukovat na dusitany. Dusičnany jsou ve své podstatě téměř netoxické, potíž nastává v případě, kdy se dusičnany redukují na o mnoho toxičtější dusitany. Letální dávka dusičnanů pro člověka činí 80 – 800 mg na kilo tělesné hmotnosti (Honikel, 2008).

3.3. Dusitany

Maso je nezbytnou součástí lidské výživy, poskytující potřebné bílkoviny, vitaminy a minerální látky. Pro zajištění trvanlivosti a bezpečnosti potravin masný průmysl využívá různá konzervační činidla. Velmi dobré konzervační účinky poskytují dusitany a dusičnany

(Drabik-Markiewicz et al., 2010), které se do masných výrobků, například do šunek přidávají při jejich výrobě jako aditiva zlepšující barvu, chuť a obranu proti *Clostridium botulinum* (Ferreira and Silva, 2008). Dusičnany jako takové jsou sami o sobě relativně netoxické, problém nastává v případě redukce na toxické dusitany, což může nastat například za pomocí bakterií během enzymatické reakce (Ozel et al., 2010). Dusitany jsou klíčovou složkou při tvorbě typického růžového zabarvení v masných výrobcích, dále také zpomalují žluknutí, rozvoj nežádoucích pachů, zabraňují růstu mikroorganismů (Bazan-Lugo et al., 2012) a ovlivňují chuť výrobku, typickou pro masné výrobky s přidaným dusitanem sodným. Jsou to přídatné látky, které svým působením pozitivně ovlivňují vlastnosti potravin. Avšak mohou potravinu také negativně ovlivnit. Jejich přítomnost v masných výrobcích může přispět ke vzniku karcinogenních N-nitrosaminů (Pegg et al., 2000) a ke vzniku onemocnění zvané methemoglobinémie (Matteucci et al., 2003). Negativní účinky dusitanů a zvyšující se nároky na zdravou výživu vedou k potřebě snížit přídavek dusitanů v masných výrobcích (Bazan-Lugo et al., 2012). S ohledem na negativní důsledky, které dusitany zapříčiňují je snahou najít jejich alternativu. Avšak je potřeba sledovat některé aspekty, jako je vybarvení masného výrobku, chuť a mikrobiální ochrana (Drabik-Markiewicz et al., 2009). Z technologického a mikrobiálního hlediska je snížení dusitanů v mase omezeno (Thiemig et al., 2000). Výrazné snížení dusitanů v masných výrobcích by mohlo vést ke zvýšenému růstu bakterie *Clostridium botulinum* a produkci jejích toxinů, neboť dusitan sodný je jedinou doposud známou účinnou ochranou před touto bakterií, který je možno přidat do masného výrobku (Cui et al., 2010). Avšak sušené uzené parmské šunky se již 10 let vyrábějí bez přidaného dusitanu s přijatelnou barvou výrobku, přičemž nebyl zaznamenán žádný výskyt alimentárního onemocnění v důsledku nepřítomnosti dusitanů (Parolari et al., 2003). Příjem dusitanů z potravin je oproti příjmu dusičnanů malý. Největší příjem dusičnanů z potravin je z brambor, zeleniny a z nápojů. Největším zdrojem dusitanů je přeměna z dusičnanů pomocí mikroflóry v ústní dutině a v trávicím traktu, z masných výrobků člověk přijímá méně než 10 % z veškerých přijatých dusitanů (Grever and Ruiter, 2001).

3.2.1. Účinnost dusitanů

Dusitany jsou silně afinitní k proteinům, na něž se během tepelného zpracování váže asi čtvrtina z přidaného množství, 5 – 15 % se váže na sulfhydrylovou skupina a stejné množství reaguje s myoglobinem (Grever and Ruiter, 2001). 1 – 5 % se váže na lipidy, méně

než 10 % se může měnit na dusičnany a 10 – 15 % zůstává nezreagovaných, jako dusitan, proto je nutné v masných výrobcích stanovovat obsah reziduálního dusitanu, neboť může být pro člověka nebezpečným (Ferreira et Silva, 2008).

3.2.2. Barva masných výrobků

Barva masného výrobku je velmi sledovaným znakem při hodnocení a má značný vliv na zákazníka při rozhodování o nákupu, neboť právě podle vzhledu je daný výrobek spotřebitelem vybírán (Dineen et al., 2000). Proto jsem kladen velký důraz na vzhled a barvu již při výrobě potravin v masném průmyslu (Gotterup et al., 2007). Protože vzhled je spotřebitelem jednou z nejsledovanějších hodnot, stává se prostředkem marketingu. Výrobek je vystavován tak, aby byl pro spotřebitele co nejatraktivnější, a tak může docházet k situacím, kdy je v důsledku atraktivity vzhledu opomíjen dopad na barvu výrobku působením například světla, a může docházet k nežádoucím oxidacím (Gotterup et al., 2008).

Pigment odpovědný za charakteristické růžové vybarvení nasoleného masa je nitroxymyoglobin - železný komplex myoglobinu obsahující oxid dusnatý (Zhang et al., 2007), který se váže na 6. koordinační pozici skupiny hemu v myoglobinu (Grever, Ruiter, 2001). Přidání dusitanů do syrového masa vzniká nitroxymyoglobin, který je v přítomnosti kyslíku a světla nestabilní (Nioche et al., 2004) a může docházet k odštěpení oxidu dusnatého od nitroxymyoglobinu, což zapříčiňuje vyblednutí barvy (Dineen et al., 2000). V případě následného tepelného opracování se od nestabilního nitroxymyoglobinu odštěpuje zdenaturovaná forma globinu a vzniká nitroxymyochrom (Zhang et al., 2007), který je stabilní vůči světlu a kyslíku, vzniká tak stabilní růžové zabarvení, typické pro masné výrobky obsahující dusitany (Grever and Ruiter, 2001). Stupeň vybarvení masného výrobku závisí na koncentraci hemových barviv a množství přítomného dusitanu, respektive oxidu dusnatého (Gotterup et al., 2007).

V souvislosti s náhradou dusitanů v masných výrobcích je potřeba se zaměřit na vybarvení výrobku, neboť právě dusitan vytváří žádoucí růžové vybarvení. V nepřítomnosti dusitanů nevzniká růžové vybarvení a je potřeba vytvořit náhradní způsob, jak obarvit masný výrobek tak, aby se co nejvíce podobal výrobku s dusitanem, neboť právě na ten je spotřebitel nejvíce zvyklý. V této souvislosti byl vytvořen a zkoumán nitrosylovaný hem z červených krvinek (Grever and Ruiter, 2001), který byl poté přidán do nasoleného masa, avšak bez přídavku dusitanu. Čerstvé maso s přidaným předem nasyntetizovaným nitroxymyoglobinem

společně s antioxidantem a antimikrobiálním činidlem se údajně podobalo nasolenému masu s přídavkem dusitanů (Zhang et al., 2007).

Přírodní barviva jsou pro spotřebitele z hlediska jejich původu, antioxidační aktivity, senzorických vlastností vhodnou alternativou dusitanů v masných výrobcích (Bazan-Lugo et al., 2012). Vzhledem k jejich rostlinnému, nebo živočišnému původu jsou považována za bezpečná a jsou biologicky dobře odbouratelná. Přírodní barviva byla využívána již dávnými civilizacemi, například ve starověké Číně a Egyptě. Do konce 19. století byly téměř všechny barvy, se kterými se obchodovalo, extrahovány z rostlin, hmyzu a měkkýšů. Většina dnes používaných barviv je rostlinného původu, získávají se z kořenů, kůry, listů, květů, plodů a semen (Sinha et al., 2013). Ke snaze o zvyšování množství přírodních barviv oproti syntetickým při výrobě potravin také přispívají omezení vydaná Úřadem pro kontrolu potravin a barviv (FDA) a Světová zdravotnická organizace (WHO) (Aldama-Aguilera et Llanderal-Cazares, 2003). V posledních letech obecně roste zájem o přírodní barviva jako možná náhrada za syntetická (Lopez et al., 2009).

Jako alternativu dusitanů pro tvorbu růžového vybarvení lze použít betanin, rajčatový protlak, nebo čínskou červenou rýži, obsahující *Monascus purpureus*, avšak toto barvivo není v České republice dle vyhlášky č. 4/2008 Sb. povoleno (Bazan-Lugo et al., 2012).

Nicméně nelze opomenout synteticky vyrobená barviva a jejich výhody. Když v roce 1856 anglický chemik Sir William Henry Perkin zcela náhodně objevil první syntetická barviva, zřejmě ani netušil, jakou bránu možností barevného využití tím v potravinářském průmyslu otevřel. Syntetická barviva nabízejí mnoho výhod. Snadnou manipulaci, vyšší lesk, větší rozsah barev, delší trvanlivost a nižší náklady. Protože je používání syntetických barviv daleko pohodlnější, rozšířilo se jejich používání na začátku 20. století natolik, že jednoznačně převýšilo využití přírodních barviv. V současné době je k dispozici více než 100 tisíc synteticky vyrobených barviv a ročně se vyrobí 1 milion tun barviv. Uplatnění syntetických barviv je široké. Využití nacházejí v celé řadě průmyslových odvětví, v textilním, papírenském, potravinářském, gumárenském a dřevařském průmyslu, při výrobě kosmetiky, barev, rozpouštědel a jiných (Sinha et al., 2013).

3.2.3. Antioxidační účinky

Dusitany fungují jako silné inhibitory oxidace lipidů (Dineen et al., 2000). Princip jejich antioxidační aktivity spočívá v tvorbě silného komplexu s myoglobinem, za tvorby

nitroxymyoglobinu, čímž lze zabránit uvolnění železa, které může katalyzovat oxidaci lipidů (Grever and Ruiter, 2001). Díky antioxidačním účinkům dusitany omezují vznik varné pachuti v masném výrobku, která vzniká za přítomnosti hexanalu a pentanalu, produktů oxidace lipidů (Grever and Ruiter, 2001).

3.2.4. *Clostridium botulinum*

Clostridium botulinum je anaerobní sporulující Gram-pozitivní bakterie způsobující botulismus, jejíž spory mají silný tepelně odolný povrch (Cui et al., 2010). Nicméně i přes tuto skutečnost jsou schopny se množit a produkovat neurotoxiny, konkrétně botulotoxiny typu B, E a F již při teplotě 3 °C (Lovenklev et al., 2004), a to v mořských rybách, zvláště pak botulotoxin E, který se v rybách vyskytuje nejčastěji (Hyytia et al., 1997).

Nebezpečnou bakterii *Clostridium botulinum* lze přijmout alimentární cestou, nejčastěji v masném výrobku. Proto je nutné v tomto ohledu dodržet nutná bezpečnostní opatření při výrobě potravin. Jako účinný prostředek proti této bakterii se v masných výrobcích používá dusitan sodný, například v kombinaci s chloridem sodným, a to již několik desetiletí (Hyytia et al., 1997). Princip mikrobiální ochrany, kterou dusitany poskytují, spočívá v přeměně na oxid dusnatý, který inhibuje proces buněčného dýchání za poklesu intracelulárního ATP (Cui et al., 2010). Oxid dusnatý jako ligand vytváří koordinačně komplexní sloučeniny s ferredoxinem a pyruvátem, kde se navazuje na přítomné železo. Navázaný oxid dusnatý zabraňuje oxidaci pyruvátu, který se za normálních podmínek přeměňuje na acetát a dochází ke vzniku ATP. Na druhou stranu existuje názor, že dusitany by mohly být nositeli základním stopových prvků pro metabolismus spor klostridií. Oxid dusnatý, by mohl navazovat železo a dovádět do sloučenin, jako jsou ferredoxin a pyruvát, kde je jeho přítomnost důležitá zvláště při vzniku ATP (Grever and Ruiter, 2001).

Dusitany mají inhibiční účinky proti různým typům bakterií (Grever et Ruiter, 2001), ale nejvíce proti Clostridium botulinum v masných výrobcích, které jsou anaerobně balené nebo konzervovaných (Bazan-Lugo et al., 2012). Předpokládá se, že k inhibici růstu patogenních organismů je potřeba 80-150 mg $NaNO_2$ na 1 kg masa, avšak tuto koncentraci ovlivňuje mnoho faktorů (Grever et Ruiter, 2001), jako je například pH, obsah solí a tepelné opracování. Všechny tyto faktory zvyšují inhibiční účinnost dusitanů (Cui et al., 2010). Inhibiční účinek dusitanů lze také zvýšit přísadou některých sekvestrantů, například sloučeniny isoaskorbát a EDTA. Avšak nelze jimi dusitany, sami o sobě nejsou schopny

zabránit růstu klostridií (Grever et Ruiter, 2001). Jako antimikrobiální látky lze využít některé sloučeniny, které se přirozeně vyskytují v rostlinách (Cui et al., 2010).

3.2.5. Hygienické hledisko

3.2.5.1. Nitrosaminy

Nežádoucím efektem pro lidské zdraví při použití dusitanů v masných výrobcích je tvorba karcinogenních nitrosaminů, které vznikají za určitých podmínek, jako je například nízké pH a vysoká teplota (Bazan-Lug et al., 2012) během technologického procesu výroby. Nitrosaminy i nitrosamidy, patřící mezi nitrososloučeniny, pravděpodobně zahajují kancerogenezi. Obecně způsobují u člověka rakovinná onemocnění ústní dutiny, nosní dutiny, jícnu, plic, slinivky, jater, ledvin, močového měchýře a mnoha dalších. Dineen et al. (2000) tvrdí, že existuje pozitivní vztah mezi nádory na mozku a dětskou spotřebou šunky, slaniny a hot dogů a poukazují na zvýšené riziko výskytu nádorů u dětí, jejichž matky konzumovaly nasolované maso. Nitrosamidy jsou odpovědné za rakovinu žaludku, tenkého střeva, mozku, kostí, kůže a akutní leukémii. Nitrosaminy jsou kromě karcinogenních účinků také silně toxické a mutagenní (Rywotycki, 2003).

Nitrosaminy vznikají působením nitrosačního činidla, jako jsou dusitany a dusičnany (Campillo et al., 2011), respektive oxid dusnatý a jiné oxidy dusíku (Yurchenko et Molder, 2007) na sloučeniny, obsahující amino skupinu (Drabik-Markiewicz et al., 2010), například proteiny, peptidy, aminokyseliny a aminy, také nazývané jako prekurzory nitrosaminů (Rywotycki, 2003), avšak nejčastěji vznikají působením na sekundární aminy (Cenci-Goga et al., 2012). Nitrosaminy vznikají také při nitrosaci primárních, terciárních a kvartérních aminů jako mezi produkty (Rywotycki, 2007). Na vzniku nitrosaminů se také podílejí některé bakterie, kupříkladu bakterie rodu *Enterococcus* a *Clostridium*, které jsou schopné syntetizovat nitrosdimethylamin a bakterie Proteus, které produkují nitrosdimethylamin. Funkce, které bakterie v tomto směru uskutečňují, jsou následující: redukce dusičnanu na dusitan, degradace proteinů na sekundární aminy, tvorba enzymů, katalyzující nitrosační reakci a tvorba vhodného prostředí pro nitrosační reakci, například kyselé prostředí. Nezanedbatelnou úlohu zde také hrají některé plísně, které katalyzují syntézu nitrosaminů. Patří mezi ně *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camamberti*, *Rhizopus* a *Aspergillus* (Rywotycki, 2007).

Nejčastěji se vyskytujícími N-nitrosaminy jsou N-nitrosodimethylamin (NDMA), N-nitrosodiethylamin (NDEA), N-nitrosodibutylamin (NDBA), N-nitrosopiperidin (NPIP)

a N-nitrosopyrrolidin (NPYR) (Drabik-Markiewicz et al., 2010). Prekurzorem NDMA je aminokyselina glycin, který může vznikat z cholinu, acetylcholinu a betainu, které jsou běžně obsaženy v mase. NDEA vznikající z alaninu se ve větším množství vyskytuje v opečené slanině a uzeném mase. NDMA a NDEA mohou pocházet také z mono, di a tri-methylaminů a příslušných methylaminů (Rywotycki, 2003). NPYR může vznikat například při smažení slaniny (Rywotycki, 2007), přičemž více nitrosaminů vzniká v tukové tkáni oproti libové svalovině, neboť tuk dosahuje při smažení vyšších teplot (Drabik-Markiewicz et al., 2009). V roce 1978 Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny klasifikovala NDMA a NDEA mezi pravděpodobné karcinogeny a NDBA, NPIP a NPYR mezi možné karcinogeny. N-nitrosaminy se rozdělují na těkavé a netěkavé. Těkavým nitrosaminům je věnována větší pozornost, neboť jsou snadněji izolovatelné a identifikovatelné, ale také proto, že netěkavé nitrosaminy se chovají jako biologicky neaktivní (Drabik-Markiewicz et al., 2010). Nitrosační reakce však může být inhibována některými inhibitory, jako je například kyselina askorbová a α-tokoferol. Účinným opatřením v tomto směru se také osvědčilo ozařování potravin příslušnou dávkou bezpečného záření, čímž došlo ke snížení obsahu N-nitrosaminů (Campillo et al., 2011), ale také snížení biogenních aminů a zbytkového dusitanu (Wei et al., 2009). Ke snížení tvorby nitrosaminů došlo také při pečení v dusíkaté atmosféře (Rywotycki, 2002). Tvorba nitrosaminů v potravinách závisí na spoustě faktorů, kupříkladu způsob, teplota a doba tepelné úpravy, koncentrace přidaného a reziduálního dusitanu, přítomnost prekurzorů nitrosaminů, katalyzátory a inhibitory nitrosaminů, postupy předcházející tepelnému zpracování, uzení a skladování. Avšak největší podíl na obsahu nitrosaminů mají dusitany, respektive jejich množství. Také proto je přidávané množství dusitanů do potravin při jejich výrobě omezené (Drabik-Markiewicz et al., 2009). Tolerovatelná dávka těkavých nitrosaminů, které může být člověk jednorázově vystaven je 5-10 μg na kilo lidské váhy (Ozel et al., 2010).

Nitrosaminy se vyskytují v potravinách, kde vznikají neúmyslně jako vedlejší produkty působením nitrosačního činidla na sekundární aminy, například v masných výrobcích (Campillo et al., 2011). K této reakci však může docházet i v lidském těle, v žaludku. Příčinou je silně kyselé prostředí (Cenci-Goga et al., 2012). Intragastrická tvorba nitrososloučenin u člověka je však ve značné míře inhibována kyselinou askorbovou (Grever, Ruiter, 2001). Nitrosaminy se vyskytují také v rostlinném oleji, sýrech, pitné vodě, v rybích výrobcích a v pivu (Yurchenko et Molder, 2007), a také v půdě (Ozel et al., 2010). Nitrosační činidlo dusičnan se vyskytuje zcela přirozeně v zelenině, a to v podstatně větším množství, než v mase. Ale právě zelenina je doporučována při konzumaci potravin, kde hrozí

vznik nitrosaminů, neboť obsahuje velké množství antioxidantů, například kyselinu askorobovou a α-tokoferol, které jsou schopny reagovat s nitrosačními činidly a zamezit tak vzniku nitrosaminů (Drabik-Markiewicz et al., 2009). V posledním desetiletí se do masných výrobků přidává kyselina askorbová, nebo askorbát, respektive isoaskorbát, který vstupuje do reakce s kyslíkem za vzniku dehydroaskorbátu, čímž dojde ke snížení obsahu dusitanů, který se oxiduje na dusičnan. Avšak askorbát může snadno reagovat s dusitany za vzniku oxidu dusnatého. Některé studie dokazují, že askorbát může přispívat ke snížení tvorby nitrosaminů, což je pravděpodobně zapříčiněno snížením obsahu dusitanů (Honikel, 2008).

Pro stanovení těkavých N-nitroaminů se používají chromatografické metody v kombinaci se separačními detektory. Těkavé N-nitrosaminy v konzervovaném mase, opečené slanině a salámech stanovují plynovou chromatografií s vysoce separačním detektorem. Avšak mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) doporučuje hmotnostní spektrometrii (MS) jako nejspolehlivější metodu (Drabik-Markiewicz et a., 2010).

3.2.5.2. Methemoglobinémie

Další negativní vlastností, kterou dusitany můžou nepříznivě ovlivňovat lidské zdraví je schopnost oxidace dvojmocného železa Fe^{2+} na trojmocné železo Fe^{3+}. Dvojmocné železo obsažené v hemoglobinu je nezbytné pro dopravu kyslíku na potřebná místa tkání. Působením dusitanů se oxiduje dvojmocné železo přítomné v hemu na trojmocné, čímž vzniká sloučenina zvaná methemoglobin, která není schopná vázat a roznášet kyslík. Schopnost okysličovat se, se touto situací značně zhoršuje (Wei et al., 2009). Přirozený obsah methemoglobinu v lidské krvi je přibližně 1%. v případě, že se obsah methemoglobinu zvýší nad 1%, vzniká stav zvaný methemoglobinémie (Matteucci et al., 2003), který by potenciálně mohl ohrozit život člověka (Tanen et al., 2000). V tomto momentně se u zdravého dospělého člověka zapojuje obranný enzymový systém, kdy methemoglobinreduktáza redukuje trojmocné železo v hemoglobinu zpět na dvojmocné, které je opět schopné poutat kyslík, u kojenců není tento obranný systém redukce trojmocného železa na dvojmocné dokonale vyvinut, proto je tato situace pro děti zvláště nebezpečná (Kohn et al., 2002).

3.2.6. Limity

Dusitany se do masných výrobků přidávají ve formě dusitanových solících směsí spolu s kuchyňskou solí. Obvyklé množství, které se používá, je 0,5 % z celkového množství přidané soli, nesmí však přesáhnout 0,6 %. Množství soli, které do masných výrobků přidává je okolo 2 % (Honikel, 2008). Dle vyhlášky 4/2008 Sb. platné v České republice je povolené

dávkování dusitanu sodného do masných výrobků 150 mg/kg, do sterilovaných masných výrobků 100 mg/kg. Do masných výrobků, jako jsou Vysočina, Selský salám, Turistický trvanlivý salám, Poličan, Herkules, Lovecký salám, Dunajská klobása, Paprikáš a podobné výrobky je povolené množství přidávaných dusitanů 180 mg/kg. Do tepelně neopracovaných masných výrobků je povoleno přidávat 150 mg/kg. 300 mg/kg je povolené množství přidávaných dusitanů do výrobků Kylmäsavustettu poronliha a Kallrökt renkött, 300 mg/kg je povolené dávkování dusitanů bez přidání E 249 nebo E 250 do Rohwürste (Salami a Kantwurst, 300 mg/kg do Rohnchiken, trocken/nassgepökelt, a 250 mg/kg bez přidání E 249 nebo E 250 do výrobků Salchichón y chorizo tradicionales de larga curación, Saucissons secs a podobných výrobků.

Obsah povolených reziduí dusitanu sodného dle vyhlášky 4/2008 Sb. je 175 mg/kg v tradičních nakládaných masných výrobcích, Wiltshire bacon, Entremeada, entrecosto, chispe, orelheira e cabeca (salgados), toucinho fumado a podobných výrobcích, 100 mg/kg ve Wiltshire ham a podobných výrobcích, 50 mg/kg v Rohschinken, nassgepörkelt a podobných výrobcích a také v cured tongue, 175 mg/kg v dry cured bacon a podobných výrobcích, 100 mg/kg v Dry cured ham, Jamón curado, paleta curada, lomo embuchado y cecina, Presunto, presunto da pá a paio do lombo a podobných výrobcích, 50 mg/kg v Rohschinken, trockengepökelt a podobných výrobcích a také v Jellied veal and brisket, 250 mg/kg ve Wiltshire bacon a Wiltshire ham, Entremeada, entrecosto, chicpe, orelheira e cabeça (salgados), toucinho fumado, Rohschinken, nassgepökelt a podobných výrobcích, 250 mg/kg bez přidání E 249 nebo E 250 v Bacon, Filet de bacon a podobných výrobcích, 10 mg/kg v cured tongue, 250 mg/kg v tradičních sušených masných výrobcích, Dry cured bacon a Dry cured ham, Jamón curado, paleta curada, lomo embuchado y cecina, Presunto, presunto da pá, a paio do lombo, Rohschinken, trockengepökelt a podobných výrobcích, 250 mg/kg bez přidání E 249 nebo E 250 v jambon sec, jambon sel ces et autres pièces maturées séchées similaires, 250 mg/kg v Rohnschiken, trocken/nassgepökelt a 10 mg/kg v Jellied veal and brisket. V každé zemi se množství povoleného přidávaného nebo reziduálního dusitanu liší, což souvisí s bezpečností potravin, stravovacími návyky atd. (Cui et al., 2010).

3.2.7. Stanovení dusitanů

Ke stanovení dusitanů a dusičnanů se používají kolorimetrické metody, které jsou pracné, narušující matrici a invazivní, navíc pro většinu je nutné použití toxického kadmia.

Chromatografické stanovení je rychlejší, citlivější a selektivní, poskytuje spolehlivé a přesné výsledky (Ferreira, Silva, 2008).

3.2. Barviva

3.2.1. Annato

Annato je jedním z nejstarších přírodních barviv (Cardenosa, et al., 2011) které je známé pro svou charakteristickou červenooranžovožlutou barvu (Zarringhalami et al., 2009). Získává se z oplodí semen tropického, relativně malého a silně rozvětveného stromu *Bixa orellana*, pocházejícího z Jižní Ameriky, které lze použít při výrobě léčiv, kosmetiky, ale také potravin (Zarringhalami et al., 2009), jako jsou barvené mléčné výrobky – máslo, margaríny a sýry, dále také uzené ryby, snack výrobky, klobásy, zmrzlina, koření, nápoje a cereálie. v souvislosti s léčivými účinky se semena, listy a kořeny tohoto stromu používají v brazilské lidové medicíně k léčbě horeček, zánětů a parazitárních nemocí. Nicméně v souvislosti s použitím annata byly prokázány i nežádoucí účinky, například kopřivka, angioedém a atopické ekzém (Auttachoat et al., 2011). V současné době činí roční celosvětová produkce annata 10 tisíc tun, přičemž z 60% se podílí latinská Amerika, 27% vyprodukuje Afrika a 12% Asie (Sinha et al., 2013). Protože se jedná o cizosprašnou rostlinu, liší se výnosy barviva dle polohy. (Mahendranath, et al., 2011).

Obrázek č. 3-1 a 3-2: keř *Bixa orellana* a plod se semeny
(http://taxondiversity.fieldofscience.com/2011/07/malvales.html
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Urucum_%28bixa_orellana%29_seeds.jpg)

Hlavními vybarvujícími složkami jsou xantofylová barviva 9´-cis bixin $C_{25}H_{30}O_4$ a 9´-cis norbixin $C_{24}H_{28}O_4$ (Auttachoat et al., 2011), které lze získat dle závislosti na extrakčním činidle výluhem. Jak bixin, rozpustný v organických rozpouštědlech a rostlinných olejích, tak norbixin, rozpustný ve vodné alkálii, jsou oba označovány jako E 160b a nabízejí barevné odstíny v rozmezí červené, žluté a oranžové barvy (Cardenosa et al., 2011). Avšak nejnovější studie poukazují na fakt, že vybarvujícími složkami v annatu jsou kromě bixinu a norbixinu také β-karoten, kryptoxanthin, lutein, zeaxanthin a methylbixin (Sinha et al., 2013).

Stabilita vůči světlu, teplu a kyslíku je důležitým kvalitativním znakem v potravinách obsahující bílkoviny a sacharidy (Zarringhalami et al., 2009). Vývoj barvy patří mezi vysoce sledované charakteristiky při technologické výrobě, zvláště při tepelném zpracování. Při teplotách, blížící se bodu varu i výše, dochází ke změně barev. Intenzita žluté barvy se zvyšuje a naopak intenzita červeného vybarvení se snižuje (Rao et al., 2005). Mnoho studií dokazuje, že annato nemá žádné mutagenní, karcinogenní nebo genotoxické účinky, a je proto co se karcinogenity týče bezpečné pro lidskou spotřebu (Hagiwara et al., 2003). Dokonce by mohlo být využíváno jako chemopreventivní prostředek proti mutacím souvisejících s rakovinou (Agner et al., 2005). V souvislosti použití annata jako náhrady dusitanů lze konstatovat, že jeho extrakt vykazuje antimikrobiální aktivitu vůči kmenům *Clostridium perferinges* a *Clostridium botulinum* (Zarringhalami et al., 2009). Mnohé studie poukazují na fakt, že norbixin, obsažený v obalových vrstvách semen annata, funguje jako ochrana před genotoxickými účinky bakterie Escherichie coli útočící na buněčnou DNA (Rivera-Madrid et al., 2006).

Pro zjištění množství annata v matrici se obvykle používá kapalinová chromatografie. Nejprve je nutno annato z potraviny extrahovat, což je vzhledem k různorodosti jednotlivých složek potraviny velice náročný proces. Například stanovení annata ve výrobcích obsahující tuk, jako jsou sýry, máslo, margaríny a další, vyžaduje postupnou extrakci vzorku s použitím několika chemikálií, konkrétně ethanolový vodný roztok amoniaku, petrolether, hexan a chloroform, nebo je možné annato extrahovat pomocí acetonu a dále zpracovat pomocí SPE kvůli odstranění tuku a β-karotenu. Na druhou stranu příprava vzorku pro analýzu z matrice snack výrobku vyžaduje hydrolýzu škrobu, nutnou pro uvolnění annata z matraci a následně 8 opakovaných extrakcí barviv bixin a norbixin pomocí ethylacetátu a extrakci tuku alkalickým zmýdelněním. Načež byla vytvořena obecná příručka po úpravu vzorků obsahující annato v závislosti na typu potravin a rozdělení podle následujících komodit:

- sýry, sýrové výrobky a sýry obsahující více potravinových složek
- puding v prášku a sušené nízkotučné směsi pro výrobu dezertů
- zákusky, dortové ozdoby, jemné pečivo, extrudované snack výrobky a snídaňové cereálie
- margaríny, emulgované tuky, pomazánky, máslo a potraviny založené na tuku
- solené nebo uzené white fish a oily fish, zmrzlina, zmrzlinové cukrovinky, jogurt a jiné mléčné výrobky (Cardenosa, et al., 2011)

Podle vyhlášky 4/2008 Sb. kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin, která platí do června 2013, lze barvivo E 160b, neboli annato použít v masném průmyslu pouze při zpracování uzených ryb a to pouze do 10 mg/kg. Od června 2013 vychází v platnost nařízení (EU) č. 1129/2011, jež dovoluje použít annato při výrobě klihovkových střívek, obalů a dekorací pro masné výrobky a to pouze do 20 mg/kg a ponechává stejný limit na použití při výrobě uzených ryb.

3.2.2. Košenila

Obrázek č. 3-3: samičky červce nopálového (http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dactylopius_coccus_%28Barlovento%29_03_ies.jpg)

Košenila je přírodní červené barvivo získané ze sušených těl samiček *Dactylopius coccus*, neboli červce nopálového, který v sušeném stavu obsahuje 19 – 24 % tohoto barviva (Aldama-Aguilera et al., 2005). Červec nopálový se živý divoce rostoucím kaktusem rodu *Opuntia* spp., rostoucím v Peru, Mexiku, Bolívii, Chile a na Kanárských ostrovech (Borges et al., 2012). Košenila byla používána již v 16. Století ve Střední Americe, kdy byla dovezena do Evropy a nahradila tehdejší karmazínovou barvu (Maier et al., 2004). S rostoucí poptávkou po syntetických barvivech okolo roku 1875 po košenile poptávka klesla. Nicméně v 70. letech opět začala stoupat v důsledku větší informovanosti spotřebitelů o možném nebezpečí syntetických barviv, například karcinogenní účinky (Aldama-Aguilera et al., 2005). Základem červeného zbarvení je kyselina karmínová, systemickým názvem hydroxyantrachinon vzorcem $C_{22}H_{20}O_{12}$, jež je vázána na glukózovou jednotku. Kyselina karmínová je rozpustná ve vodě, alkoholu, kyselých a zásaditých roztocích, ale nerozpustná v petroletheru, benzenu a chloroformu. Teplota tání je 135 °C (Borges et al., 2012). Kyselina karmínová je z technologického hlediska jedním z nejlepších barviv. Je stabilní vůči oxidaci, světlu a vysokým teplotám a poskytuje barevné variace od žluté po červenou, podle pH prostředí, ve kterém je barvivo rozpuštěno (Gonzalez et al., 2010).

Extrakce tohoto barviva je velice náročná. Vyžaduje spoustu času a dobrou zručnost, metoda má nízkou selektivitu a nízkou extrakční účinnost, navíc je nutné použití velkého množství toxických rozpouštědel (Borges et al., 2012). Košenila se kvantitativně stanovuje na vysokoúčinném kapalinovém chromatografu (Maier et al., 2004).

Používá se při výrobě potravin, jako jsou nápoje, masné výrobky, mléčné výrobky a cukrovinky, dále také při výrobě léků a kosmetiky. Bylo popsáno několik případů, kdy došlo při styku s košenilou k astmatům, cheilitidě, nebo alergiím. Výrobky obsahující košenilu musí mít na svém obalu označení o obsahu tohoto barviva. Například pacient, který extrahoval barvivo z těl samiček červce nopálového, toto barvivo vdechoval, nebo další pacient, který byl přítomen výrobě kosmetiky. U obou těchto případů se objevilo astma. Zajímavostí ovšem je, že ve většině případů to byli právě muži, u kterých se objevily příznaky astmatu, jehož původem byla právě košenila. Nebezpečí astmatu však hrozí i v případě požití alkoholického nápoje Campari, i tam je toto barvivo přidáváno. Popsáno již bylo několik případů výskytu astmatu po požití tohoto nápoje. Zvláštní na celé situaci je, že všichni pacienti byly ženy, až na jednu výjimku, muž, u kterého se objevilo astma, potvrdil skutečnosti, že pravděpodobnou příčinou jeho nemoci je povolání. Toto barvivo se také přidává do rtěnek. Při styku rtěnky s pokožkou hrozí alergická reakce, která byla již

několikrát popsána, poprvé již však v roce 1961. Existuje domněnka, že za vznik alergickou reakci způsobují proteinové kontaminanty obsažené v košenilovém extraktu (Ohgiya et a., 2009).

Barvivo košenily je dle legislativních předpisů označeno pod kódem E 120 a podle vyhlášky 4/2008 Sb. je povoleno přidávat do masných výrobků z nasoleného (homogenizovaného) masa naraženého v přírodním střevě, umělém střevě nebo v jiném obalu bez stanoveného stupně tepelného opracování, paštiky, terrines v nejvyšším povoleném množství 100 mg/kg. A dále do masných výrobků s minimálním obsahem obilné složky 6 % (breakfast sausages) Hamburgerové maso, v nejvyšším povoleném množství 100 mg/kg.

3.2.3. Betanin

Betalainy jsou přírodní barviva, rozpustná ve vodě, která se rozdělují na 2 skupiny, lišící se v barvě. Betakyaniny nabízejí fialové zabarvení a betaxanthiny jsou zabarveny do žluta. Betalainy jsou obsaženy v květech, ale i v jedlých částech rostlin, jako je například bulva řepy a plod opuncie (Guesmi et al., 2013). Betalainy jsou přírodní antioxidanty, avšak v potravinářském průmyslu jsou výhradně používána jako barviva (Goncalves, et al., 2012). Betanin je betakyaninové přírodní barvivo, obsažené v různých druzích ovoce a zeleniny. Používá se ke zlepšení červeného odstínu různých potravinových výrobků, jako jsou rajčatové pasty, jahodové zmrzliny, jogurty, klobásy, dušené šunky, omáčky, džemy, krémy v sušenkách a sladké dezerty. Největším zdrojem tohoto barviva je červená řepa. Extrahované barvivo je schváleno pod kódem E162 dle vyhlášky 4/2008 Sb.

Barvivo se získává vymačkáním z nařezaného kořene, nebo odstředěním, nebo vodnou extrakcí z nastrouhaných bulev. Extrakcí toho barviva z bulvy lze získat až 70% betaninu. Pro úplnou extrakci barviva se používá methanol a ethanol. Betaninové barvivo se dále zpracuje do dehydratovaného prášku s 60 – 65% sušiny. Extraktivnost látek závisí na stupni rozpadu buňky a tak je difúze barviva obvykle doplněna mechanickým namáháním, záhřevem, lisování, nebo použitím rozpouštědel. Stabilita betaninu je ovlivňována pH, teplotou, světlem a přítomností kyslíku. Vodná extrakce bariviva při 70 – 74 °C vede k degradaci nejen buněk, ale i samotného betaninu. Vzhledem k této skutečnosti se jako vhodná metoda extrakce barviva nabízí metoda PEF (pulsní elektrické pole), která spočívá v působení krátkých impulsů silného elektrického pole (0,1 – 50 kV/cm) mezi dvěma elektrodami při pokojové teplotě, což vede ke zvýšení propustnosti buněčných

stěn. Tato metoda je také vhodná při mikrobiální inaktivaci, zvýšení účinnosti extrakce šťáv z rostlin a intenzity dehydratace. Použití je vhodné například při zvýšení extrakce škrobu, sacharózy, polyfenolů a jiných barviv, včetně betaninu z jablek, kokosů, či mrkve. V případě extrakce betaninu z červené řepy se metoda prokázala jako vhodná součást při působení elektrického pole menší než 1 kV/cm (Lopez et al., 2009).

Betaninové barvivo, označované pod kódem E 162 je povoleno dle vyhlášky 4/2008 Sb. přidávat do masných výrobků z nasoleného (homogenizovaného) masa naraženého v přírodním střevě, umělém střevě nebo v jiném obalu bez stanoveného stupně tepelného opracování, paštiky, terrines a dále do uzených masných výrobků Chorizo Salchichon.

3.3. Masné výrobky bez použití dusitanů

Protože jsou dusitany potenciálně nebezpečné pro lidský organismus, zvláště v souvislosti s možnou tvorbou karcinogenních nitrosaminů, je čím dál větší snahou tyto látky nahradit jinými, které by zastaly všechny pozitivní vlastnosti dusitanů, které nabízejí, jako je například tvorba typického růžového vybarvení, mikrobiální ochrana, typická chuť a antioxidační účinky. Existují dva způsoby, jak lze tuto problematiku vyřešit. Ve své podstatě dusitany v masných výrobcích nahradit nelze, ale nabízí se varianta výroby masných výrobků zcela bez přidaných dusitanů, nebo dusičnanů s tím, že je nutno tuto skutečnost zaznamenat na etiketě výrobku (Krause et al., 2011). Avšak při senzorickém hodnocení šunek bez přidaných dusitanů, nebo dusitanů vzorky dopadly mnohem hůře, než vzorky nasolené (Sindelar et al., 2007).

Druhou možností je varianta, při které lze do masného výrobku přidat dusitan z přírodních zdrojů, respektive dusičnan a vytvořit tak výrobek podobný masnému výrobku s přidanými dusitany. Je obecně známo, že některé druhy zeleniny, jako jsou například listová a kořenová zelenina obsahují zcela přirozeně větší množství dusičnanů (Sindelar et al, 2007). Právě tyto dusičnany lze přidat do masného výrobku, pomocí startovací kultury redukovat na dusitany a zajistit tak výrobku podobnou masnému výrobku s přidaným dusitanem. K těmto účelům lze použít rostlinné extrakty zelenin s vyšším obsahem dusičnanů, jako je například celer. Avšak je potřeba zjistit množství dusičnanů, které je s rostlinným extraktem přidáváno, neboť v případě nízké koncentrace redukovaných dusitanů může dojít k nežádoucímu mikrobiálnímu rozvoji, nebo naopak v případě přebytku dusitanů hrozí nebezpečí zvýšené tvorby nebezpečných nitrosaminů. Zdroje dusičnanů, v podobě zeleninových extraktů lze koupit jako prášek, který poskytuje vysoké koncentrace dusičnanů, 10 000 – 15 000 mg/kg. Do masného výrobku se přidává v omezeném množství, 0,2 – 0,4 % hmotnosti, neboť může

negativně ovlivnit výslednou chuť výrobku. Je tedy možnost, že k masu nebude přidáno dostatečné množství zredukovaných dusitanů, a tudíž nedojde k důkladnému nasolení masa, s čímž souvisí i možnost nedostatečné mikrobiální ochrany, ovlivnění barvy a dalších (Krause et al., 2011).

4. Materiál a metody

4.1. Přehled vzorků

Bylo zakoupeno 13,5 kg vepřové kýty v Řeznictví u Rysů s. r. o.

Firmou Natura Food Additives, a.s. byla dodána sušená zelenina: brambory, řepa, cibule, celer, pastinák, petržel a zelí.

4.2. Příprava vzorků

Pro výrobu šunek byly připraveny zeleninové extrakty.

4.2.1. Příprava extraktu

Extrakt pro měření dusičnanů: 10 g vzorku + 400 ml demi vody.

Pro výrobu šunek byly připraveny zeleninové extrakty. 15 – 20 g sušené zeleniny smícháno s 200 ml demi vody do 250ml baňky

Příprava šunky dle receptury uvedené v tab. 4-1 a 4-2.

4.3. Použité chemikálie a roztoky

Kyselina sulfanilová
Koncentrovaná kyselina octová
1 – naftylamin
Hexakyanoželeznatan draselný
Octan zinečnatý
Kyselina chlorovodíková
Aceton
Dusičnan sodný
Dusitan sodný
Destilovaná voda
Demi voda

Griessovo-Illosvayovo činidlo I: 0,6 g kyseliny sulfanilové a 25 ml koncentrované kyseliny octové doplněno 75 ml destilované vody

Griessovo-Illosvayovo činidlo II: 0,03 g 1-naftylaminu povařeno v 70 ml destilované vody, po filtraci doplněno 30 ml kyseliny octové

Carrezovo činidlo I: 106 g hexakyanoželeznatanu draselného v 1000 ml roztoku

Carrezovo činidlo II: 233 g octanu zinečnatého a 30 ml ledové kyseliny octové v 1000 ml

25% roztok kyseliny chlorovodíkové

Okyselený aceton: 200 ml acetonu smícháno s 1,125 kyseliny chlorovodíkové

4.4. Přístroje a pomůcky

Běžné vybavení laboratoře

Váhy Vibra AJ – max 2200 g, min 0,5 g, e = 0,1, d = 0,01 (SHINKO DENSHI Co)

Váhy sartorius MC1 Laboratoy LC 620S

Spectrophotometer UV – 2900 PC

Voltmetr pH 112, Snail Insstruments + Iontově selektivní elektroda, dusičnanová kombinovaná Theta 90

Kuchyňský robot Zelner Fenomen s hnětačem

Tyčový mixér Moulinex Click and Mix

Pasterační hrnec ABC automatic

4.5. Pracovní postupy

4.5.1. Zeleninové extrakty

Dle normy ČSN EN 12014-2 byla zjištěna koncentrace v extraktu 2 metodami (ISE a spektrofotometrickou). Na základě tohoto měření byl vypočítán obsah dusičnanů v zelenině. Na základě tohoto měření byly vybrány zeleniny – zdroje dusičnanů.

Pro přípravu extraktů do šunky byla zvolena vyšší navážka zeleniny.

4.5.1.1. Zeleninové extrakty pro stanovení dusičnanů

Pro přípravu zeleninového extraktu pro stanovení dusičnanů byly připraveny dle ČSN EN 12014-2 extrakty, kdy bylo naváženo 10 g od každé sušené zeleniny do kónické baňky na 500 ml a přidáno 400 ml horké demi vody. Baňky byly ponechány ve vroucí lázni po dobu 15 minut a poté byly ochlazeny na laboratorní teplotu. Obsah byl přelit přes mul do odměrné baňky na 500 ml a doplněn po rysku. Poté byl důkladně promíchán a přefiltrován přes skládaný papír viz obrázky č. 4-1 a 4-2

Obrázek č. 4-1: zeleninové extrakty pro měření dusičnanů (petržel, pastinák, řepa, celer)

Obrázek č. 4-2: zeleninové extrakty pro měření dusičnanů (celer, brambory, cibule, zelí)

4.5.1.2. Zeleninové extrakty pro výrobu šunek

s ohledem na zjištěný obsah dusičnanů v zelenině byly zeleninové extrakty pro 1. sérii šunek připraveny dle ČSN EN 12014-2 pro stanovení dusičnanů v zeleninových výrobcích s rozdílem, že do kónické baňky bylo přidáno 15 g vybrané zeleniny (zelí, řepa, celer) a přidáno 200 ml horké demi vody. Poté se baňka nechala stát ve vroucí lázni po dobu 15 minut, zchladila se na laboratorní teplotu, obsah se přelil do odměrné baňky na 250 ml, doplnil demi vodou po rysku, důkladně promíchal a přefiltrován byl přes skládaný filtrační papír. Pro efektivní výrobu šunky byl extrakt zchlazen v chladírně na teplotu 4 °C.

Zeleninové extrakty pro 2. sérii šunek byly připravovány taktéž podle ČSN EN 12014-2 pro stanovení dusičnanů v zeleninových výrobcích s rozdílem navážky 20 g sušené zeleniny (zelí, řepa, celer) do kónické baňky a přidáno 200 ml horké vody. Baňka se nechala stát ve vroucí lázni po dobu 15 minut, poté se zchladila na laboratorní teplotu, obsah se přelil přes mul do 250ml odměrné baňky a byl maximálně vymačkán. Extrakt byl doplněn demi vodou po rysku a poté byl přefiltrován přes skládaný filtrační papír. Pro efektivní výrobu šunky byl extrakt zchlazen v chladírně na teplotu 4 °C.

4.5.2. Šunky

Byly připravovány 2 série šunek. Dle předložené receptury byly připraveny jednotlivé ingredience.

Tabulka č. 4-1: 1. série šunek

	šunka č. 1	**šunka č. 2**	**šunka č. 3**	**šunka č. 4**	**šunka č. 5**	**šunka č. 6**
vepřová kýty (g)	985	972	978	982	977	994
naturham (g) **	19,2	18,94	19,05	19,1	19	19,4
sůl (g)	23	22,72	22,86	22,96	22,8	22,5
dusitan sodný (g)	0,115					
dusičnan sodný (g)						0,696
nitrátredukující kultura (mg)*		145,8	146,7		146,55	149
zelen. extrakt z řepy (ml)					50	
zelen. extrakt ze zelí (ml)			241			
zelen. extrakt z celeru (ml)		239,84				
ledová voda (ml)	252			251	191	254,3
celkem (g)	1279,32	1253,65	1261,06	1275,06	1259,95	1291,05

Tabulka č. 4-2: 2. série šunek

	šunka č. 1	**šunka č. 2**	**šunka č. 3**	**šunka č. 4**	**šunka č. 5**
vepřová kýty (g)	1084,14	1085,2	1070,33	1082,7	1083,83
naturham (g)	21,12	21,14	20,85	21,1	21,1
sůl (g)	25,34	25,36	25,02	24,541	25,34
dusitan sodný (g)	0,1267				
dusičnan sodný (g)				0,759	
nitrátredukující kultura (mg)		162,75	160,5	162,3	162,5
zelen. extrakt z řepy (ml)		239			
zelen. extrakt ze zelí (ml)					238
zelen. extrakt z celeru (ml)			240,5		
ledová voda (ml)	277	38	32,5	277	39,3
celkem (g)	1407,73	1408,87	1380,36	1406,26	1407,73

***Starter cultures** (Micrococcus, Lactobacillus) Cax 28/100, Ferments de maturation pour produits carnés, Cargill.

****naturham** dodala firma Natura Food Additives a.s.

Složení: stabilizátory E 450, E 451, cukr, želírující látky E 407, šunkové aroma, zahušťovadlo E 415, antioxidanty E 301, E 331.

Výrobek neobsahuje žádné alergeny, alergologické informace jsou uvedeny v tabulce č. 4-3.

Tabulka č. 4-3: alergologické informace výrobku naturham

ALERGENY	ANO	NE
Obiloviny obsahující lepek a výrobky z nich		-
Korýši a výrobky z nich		-
Vejce a výrobky z nich		-
Ryby a výrobky z nich		-
Jádra podzemnice olejné a výrobky z nich		-
Sójové boby (sója) a výrobky z nich		-
Mléko a výrobky z něj, včetně laktózy		-
Suché skořápkové plody a výrobky z nich		-
Celer a výrobky z něj		-
Hořčice a výrobky z ní		-
Sezamové semena (sezam) a výrobky z nich		-
Oxid siřičitý a siřičitany v koncentracích vyšších než		-
Vlčí bob (lupina) a výrobky z něj		-
Měkkýši a výrobky z nich		-

Připravovány byly 2 série šunek. v první sérii byly připraveny šunky s dusičnanovou a dusitanovou solicí směsí, 1 šunka bez dusičnanové, nebo dusitanové solicí směsí a 3 šunky se zeleninovým extraktem. Dle naměřených hodnot dusičnanů v zeleninách byly zeleninové extrakty připravovány z řepy, celeru a zelí. Maso s ostatními komponenty bylo naloženo po dobu 24 hodin a poté pasterováno.

V druhé sérii byla připravována šunka s dusitanovou a dusičnanovou solicí směsí a 3 šunky se stejnými zeleninovými extrakty jako v předešlé sérii, avšak byla zvýšena koncentrace dusičnanů. Maso s ostatními komponenty bylo před naplněním střev rozděleno na 2 zhruba stejné části, naplněno do střev a 1. část od každé šunky byla naložena po dobu 24 hodin a 2. část od každé šunky byla naložena po dobu 48 hodin, poté byly šunky pasterovány.

Maso bylo zbaveno přebytečného tuku, vazivových částí, zbytků kostí a chrupavek a hematomů. Libová svalovina byla nakrájena na kostky velikosti přibližně 20 x 20 x 20 mm, které byly vloženy do kuchyňského robotu s hnětačem, přilita byla část vody, nebo extraktu ve kterém byly rozmíchány příslušné ingredience, viz tabulky, a maso s ingrediencemi bylo mícháno pulzním režimem, kdy se hnětač v pravidelných intervalech se zastavením otáčel o 180 °. Takto bylo maso mícháno po dobu 2 minut a poté 8 minut odpočívalo, tento proces se opakoval ještě 3x. Celý proces míchání trval 40 minut. Po této době bylo maso naplněno do PE střev se snahou o minimální množství vzduchových bublin a důkladně uzavřeno. Maso 1. série výroby šunek viselo ve střevě při teplotě 4 - 5 °C po dobu 24 hodin a poté bylo vloženo do pasteračního hrnce se studenou vodou a zahříváno až na pasterační teplotu 80 °C, při které bylo pasterováno po dobu 70 minut. Maso 2. série výroby šunek viselo ve střevě z poloviny 24 hodiny a z poloviny 48 hodin při teplotě 4 – 5 °C, poté bylo vloženo do pasteračního hrnce se studenou vodou a zahříváno na pasterační teplotu 80 °C, při které bylo pasterováno po dobu 55 minut. Po uplynulé době pasterace byly šunky rychle a intenzivně chlazeny na chladírenskou teplotu.

4.5.3. Příprava extraktu

Bylo odváženo asi 10 g vzorku s přesností na 0,1 g a v mixéru dokonale zhomogenizováno s 90 ml destilované vody po dobu 1 minuty při maximálních otáčkách tyčovým mixérem. v alikvótním podílu 80 ml byly vysráženy bílkoviny přídavkem 10 ml Carrezova činidla I a 10 ml Carrezova činidla II, obsah byl promíchán a ponechán 15 minut v klidu. Poté byla směs přefiltrována přes nejřidší filtrační papír.

4.5.4. Stanovení dusičnanů

4.5.4.1. Spektrofotometricky

Pro měření dusičnanů v šunce na spektrofotometru byla připravena kalibrační přímka s roztoky o koncentracích. Připravené extrakty viz 4.5.3. byly změřeny dle kalibrační přímky při vlnové délce 220 nm na spektrofotometru.

Stanovení dusičnanů v sušené zelenině probíhalo obdobně. Pro měření dusičnanů v zeleninových extraktech viz 4.5.1.1. byla taktéž vytvořena kalibrační přímka s použitím roztoků o koncentracích 5, 10, 15, 25 a 50 mg/l dusičnanů. Zeleninové extrakty byly ředěny ve vhodném poměru tak, aby absorbance nepřesahovala hodnotu 1,0, neboť v případě hodnoty vyšší může docházet ke zkreslení výsledku. Každý vhodně naředěný vzorek byl změřen na spektrofotometru při vlnové délce 220 nm pomocí kalibrační přímky.

4.5.4.1. Dusičnanová iontově selektivní elektroda

Pro měření dusičnanů v extraktu ze šunek viz 4.5.3. byla vytvořena kalibrační přímka s roztoky o koncentracích 5, 10, 15, 25 a 50 mg/l dusičnanů. Koncentrace dusičnanů byla stanovena pomocí Iontově selektivní dusičnanové kombinované elektrody ponořením přímo ve vzorcích. Bylo potřeba ověřit, zda přítomnost NaCl neovlivňuje výsledky měření.

Měření koncentrace dusičnanů v zeleninových extraktech viz 4.5.1.1. probíhalo obdobně. Bylo potřeba připravit kalibrační přímku s použitím roztoků o koncentracích 5, 10, 15, 25 a 50 mg/l dusičnanů. Výsledné hodnoty byly odečteny z kalibrační přímky.

4.5.5. Stanovení dusitanů

Bylo odpipetováno 25 – 50 ml alikvótního podílu filtrátu viz 4.5.3. dle očekávaného obsahu dusitanů do odměrné baňky na 100 ml, dále bylo přidáno 1 ml kyseliny chlorovodíkové – 25%, 10 ml Griessova-Illosvayova činidla I a Griessova-Illosvayova činidla II a doplněno destilovanou vodou po značku. Směs byla ponechána 15 minut stát za občasného promíchání. Stanovení dusitanů probíhalo na spektrofotometru při vlnové délce 525 nm, kde bylo nutno připravit kalibrační přímku s roztoky o koncentracích 1,25, 2,5, 3,75 a 6,25 mg/l dusitanů. Naměřené hodnoty dle kalibrační přímky bylo třeba přepočítat dle příslušného ředění.

4.5.6. Stupeň vybarvení

2,5 g vzorku bylo dokonale zhomogenizováno pomocí lisu na česnek a poté smícháno s 10 ml acetonu a 1 ml destilované vody v zatmavené zkumavce. Poté bylo ponecháno v klidu 20 minut s občasným protřepáním. Po uplynulé době byl roztok zfiltrován přes červený filtrační papír a filtrát byl změřen na Spektrofotometru při vlnové délce 540 nm. Odečtená hodnota absorbance byla zaznamenána.

2,5 g téhož materiálu bylo opět zhomogenizováno pomocí lisu na česnek a poté smícháno s 10 ml okyseleného acetonu a 1 ml destilované vody ve zkumavce. Poté byla směs ponechána 60 minut na světle v klidu s občasným protřepáním. Po uplynulé době byla směs zfiltrována přes červený filtrační papír a filtrát změřen na Spektrofotometru při vlnové délce 640 nm. Odečtená hodnota absorbance byla zaznamenána. Stupeň vybarvení se vypočte ze vztahu:

$$d = \frac{A540\ .\ 100}{A640\ .\ 2{,}5}$$

kde d…stupeň vybarvení (%)
A540….absorbance extraktu v neutrálním acetonu při 540 nm
A640….absorbance extraktu v okyseleném acetonu při 640 nm

4.5.7. Senzorická analýza

Na vyrobených šunkách byla provedena senzorická analýza proškolenými hodnotiteli, kteří hodnotili určité deskriptory u výrobků, a na základě těchto deskriptorů byl v závěru proveden preferenční test. Jednotlivé deskriptory byly posuzovány grafickou orientovanou nestrukturovanou metodou, viz protokol v příloze. Pro vyhodnocení senzorické analýzy byly odečteny hodnoty jednotlivých deskriptorů, které byly dále zpracovány pro statistické vyhodnocení. Dle řazení vzorků od nejlepšího k nejhoršímu byl vyhodnocen pořadový test dle Friedmana.

4.5.8. Statistické vyhodnocení

Hodnoty jednotlivých deskriptorů byly vyhodnoceny pomocí párového T-testu v programu STATISTICA, kde byly vzájemně posuzovány jednotlivé deskriptory vybraných šunek. Byla

stanovena průměrná hodnota jednotlivých deskriptorů, směrodatná odchylka, rozdíl a směrodatná odchylka rozdílu.

5. Výsledky

Hodnoty koncentrace dusičnanů ve všech sušených zeleninách pomocí spektrofotometru při vlnové délce 220 nm jsou uvedeny v tabulce č. 5-1. Metoda měření na spektrofotometru byla ověřena pomocí vnitřního vzorku o známé koncentraci dusičnanů.

Tabulka č. 5-1: naměřené hodnoty v jednotlivých zeleninách v syrovém stavu pomocí spektrofotometru

	řepa	**petržel**	**celer**	**pastinák**	**zelí**	**brambory**	**cibule**
mg/kg	2028,5	1673,5	1271,1	1807,4	843	542	1049,1

Obsah dusičnanů byl měřen také pomocí Iontově selektivní elektrody, výsledky měření jsou uvedeny v tabulce č. 5-2.

Tabulka č. 5-2: naměřené hodnoty v mV pomocí dusičnanové Iontově selektivní elektrody, přepočítané na množství dusičnanů v kilogramu surové zeleniny.

	řepa	**petržel**	**celer**	**pastinák**	**zelí**	**brambory**	**cibule**
mV	25	81	46	60	42	91	92
mg/kg	298,5	266,2	337,3	297	151,5	221,6	159,4

Naměřené hodnoty dusičnanů v syrové zelenině neodpovídají skutečným hodnotám.

Dle naměřených hodnot byly vybrány 3 zeleniny s vyšším obsahem dusičnanů, které byly přidány do šunek při jejich výrobě jako alternativy dusitanů, respektive jejich přírodní zdroje. Výsledky analytického rozboru 1. série šunek jsou uvedeny v tabulce č. 5-3 a 5-4.

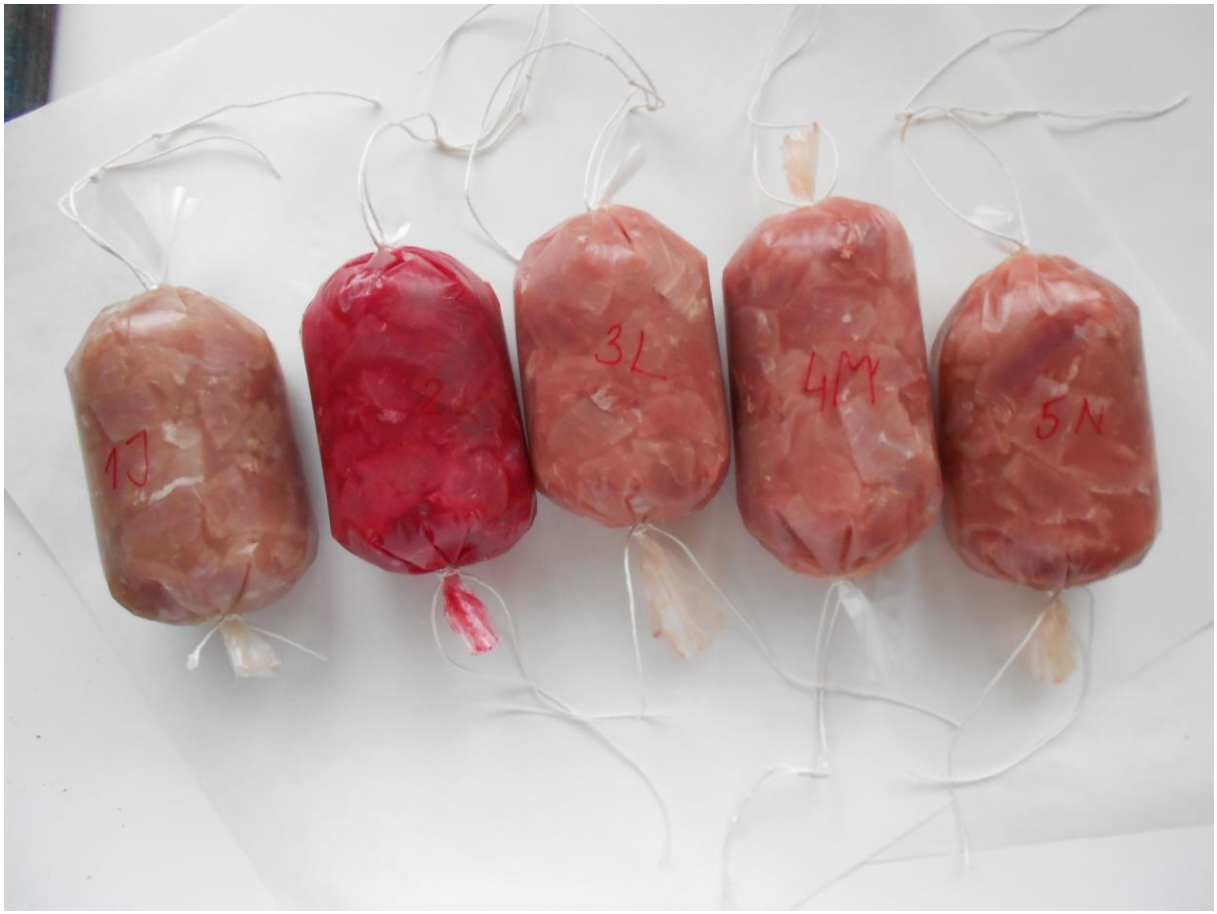
Obrázek č. 5-1: řez šunek 1. série

Tabulka č. 5-3: obsah reziduálního dusitanu a dusičnanu a stupeň vybarvení 1. série šunek

	obsah reziduálního dusitanu (mg/kg)	obsah reziduálního dusičnanu (mg/kg)	přidané množství dusičnanu (mg/kg)	stupeň vybarvení (%)
šunka č. 1	59,832	65,34		59,3
šunka č. 2	0	32,87	134,05	17,29
šunka č. 3	0	35,28	107,14	27,56
šunka č. 4	0	70,74		21,78
šunka č. 5	0	38,25	129,95	33
šunka č. 6	0	0		6,38

Analytický rozbor šunek 1. série probíhal 4. den po jejich uvaření.

Obrázek č. 5-2: šunky 2. série po 24 hodinách odvěšení

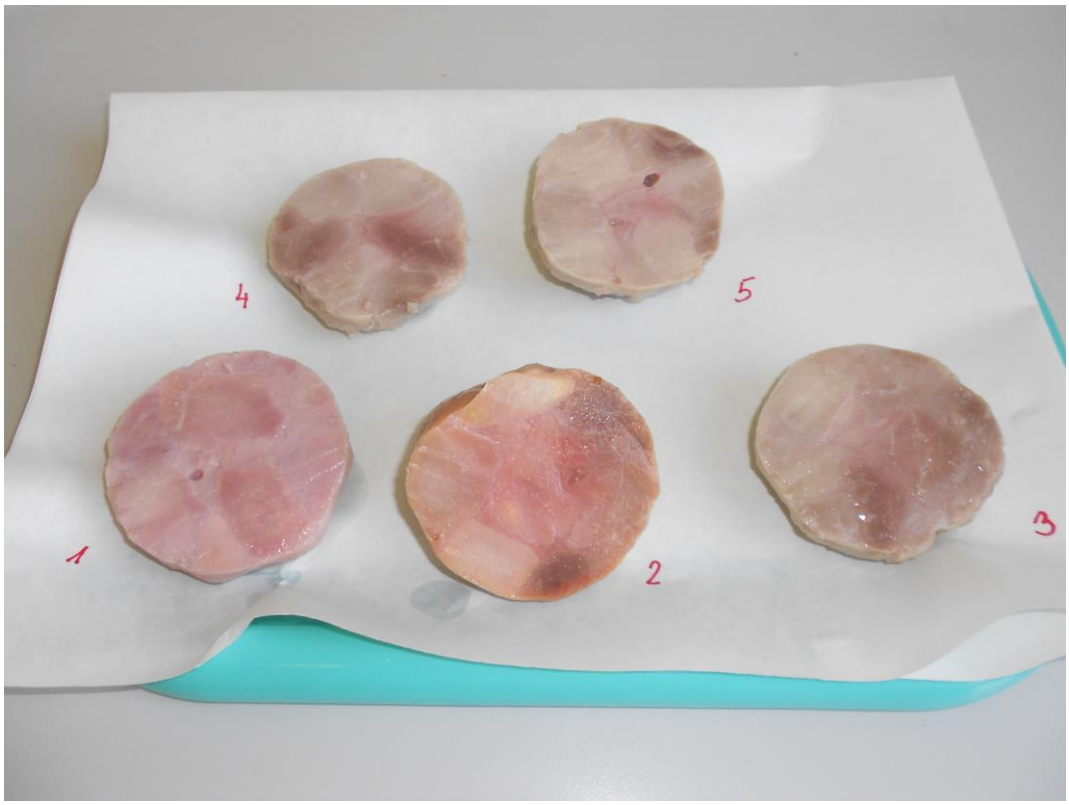


Obrázek č. 5-3: tepelně opracované šunky 2. série po 48 hodinách odvěšení

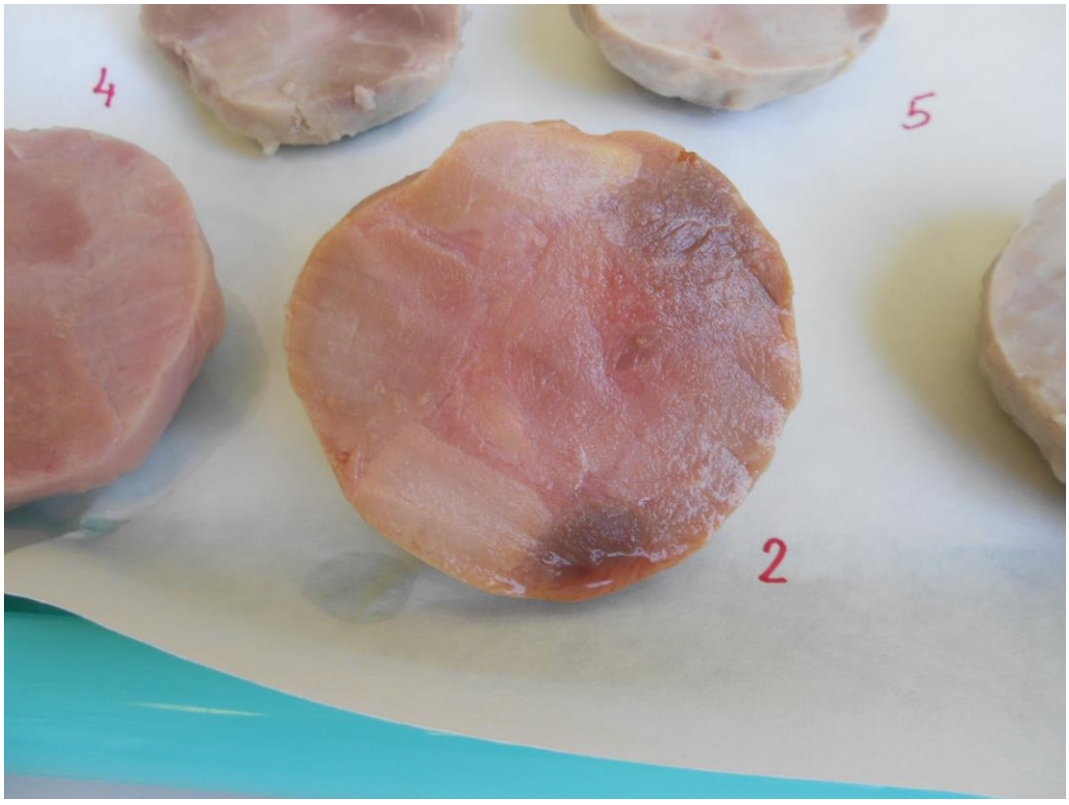
Tabulka č. 5-4: obsah reziduálního dusitanu a dusičnanu a stupeň vybarvení 2. série šunek po 24 hodinách odvěšení

	obsah reziduálního dusitanu (mg/kg)	**obsah reziduálního dusičnanu (mg/kg)**	**přidané množství dusičnanů (mg/kg)**	**stupeň vybarvení (%)**
šunka č. 1	86,77	43,4		58,45
šunka č. 2	11,26	30,54	134	11,38
šunka č. 3	1,84	30,27	107,1	6,61
šunka č. 4	1,37	54,83		12
šunka č. 5	3,93	31,14	129,95	7,66

Obrázek č. 5-4: řez šunek 2. série, 24 hodin odvěšené



Obrázek č. 5-5: řez šunkou č. 2 s řepným extraktem, 24 hodin odvěšená

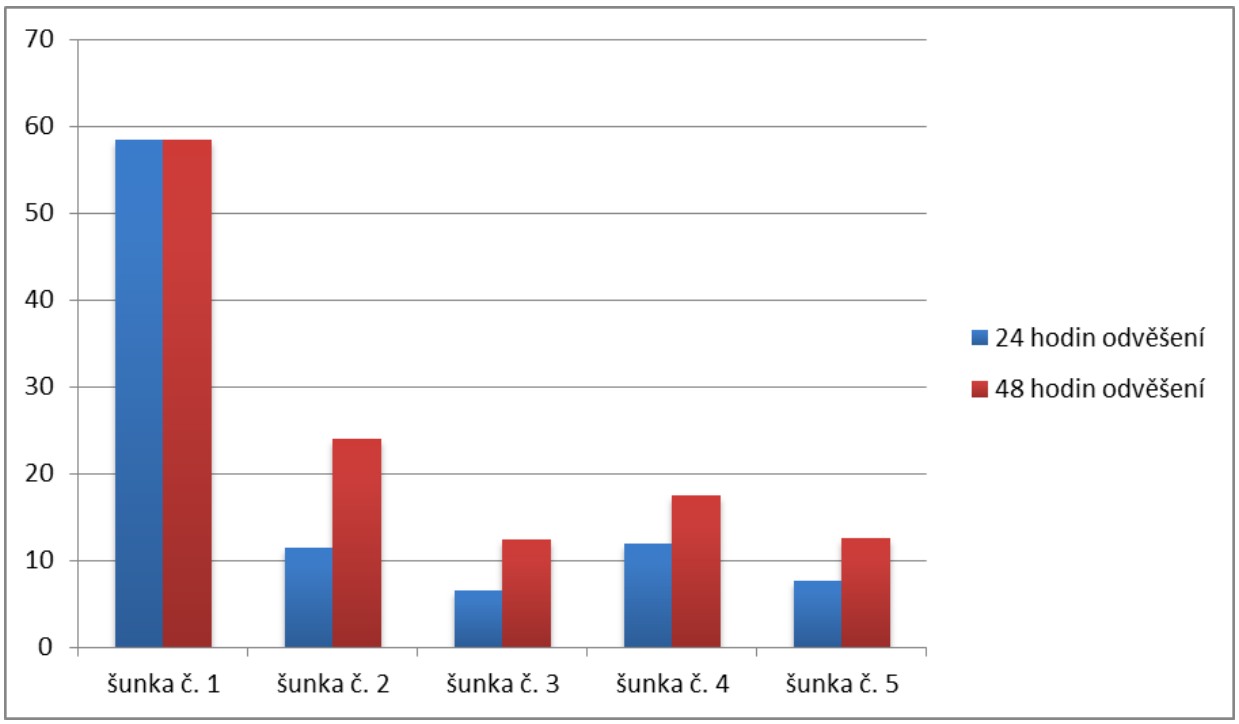


Tabulka č. 5-5: obsah reziduálního dusitanu a dusičnanu a stupeň vybarvení 2. série šunek po 48 hodinách odvěšení

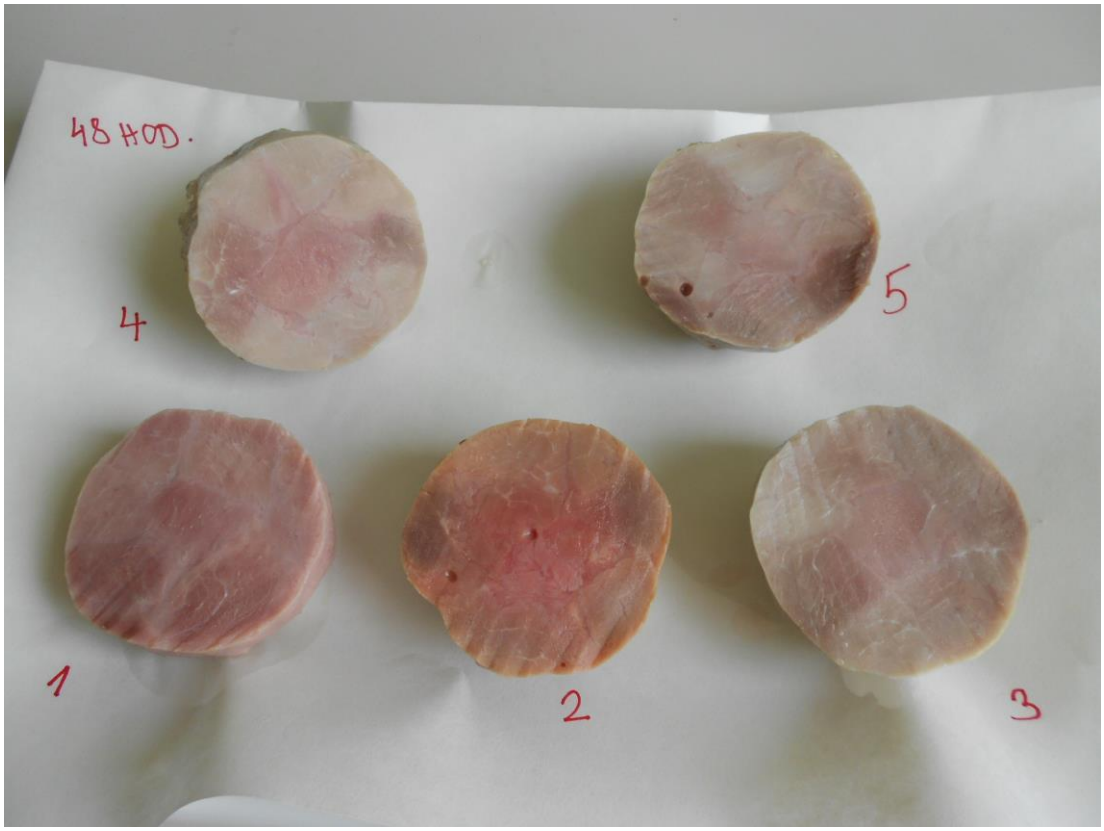
	obsah reziduálního dusitanu (mg/kg)	obsah reziduálního dusičnanu (mg/kg)	přidané množství dusičnanů (mg/kg)	stupeň vybarvení (%)
šunka č. 1	77,64	29,65		58,45
šunka č. 2	2,28	29,82	424,78	24
šunka č. 3	0	25,72	170,75	12,33
šunka č. 4	0	40,14		17,47
šunka č. 5	0	26,88	273,21	12,59

Analytický rozbor šunek 2. série probíhal 1. den po jejich uvaření.

Graf č. 5-1: stupeň vybarvení v závislosti na době odvěšení, šunky č. 1-5



Obrázek 5-6: řez šunek 2. série, 48 hodin odvěšená



Obrázek č. 5-7: řez šunkou č. 2 s řepným extraktem, 48 hodin odvěšená

Obrázek č. 5-8: řez šunkou č. 3 s celerovým extraktem, 48 hodin odvěšená

Obrázek č. 5-9: řez šunkou č. 5 se zelným extraktem, 48 hodin odvěšená

Výsledky byly zpracovány v programu STATISTICA, kde byly srovnány šunky se zeleninovými extrakty s dusitanovou šunkou pomocí párového T-testu. Posouzeny byly jednotlivé deskriptory. Byla stanovena H_0, která tvrdí, že mezi dusitanovou šunkou a šunkou se zeleninovým extraktem v jednotlivých parametrech neexistuje statisticky průkazný rozdíl. Pomocí párového T-testu v programu STATISTICA byla H_0 potvrzena, nebo vyvrácena. V případě vyvrácení H_0 přijímáme H_A, která říká, že mezi vzorky existují statisticky průkazné rozdíly, vzorky se statisticky průkazně liší. Vyvrácení H_0 lze odvodit z hodnoty „p“, je-li menší než 0,05, H_0 se zamítá. Výsledky párového T-testu šunek 1. série jsou uvedeny v tabulkách č. 5-6, 5-7, 5-8. Výsledky párového T-testu šunek 2. série jsou uvedeny v tabulkách č. 5-9 až 5-17 a v grafech č. 5-1, 5-2, 5-3. Na základě řazení vzorků od nejlepšího k nejhoršímu hodnotiteli byl sestaven celkový pořadový test, jehož výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 5-18, 5-19, 5-20.

Tabulka č. 5-6: výsledky párového T-testu při porovnání dusitanové šunky a šunky s celerovým extraktem, (1. série)

		průměr	směr. odch.	rozdíl	sm. odch. rozdílu	p	
celkový vzhled	šunka 1	81,6	10,0	40,6	18,3	0,00	Liší se
	šunka 2	41	19,2				
intenzita barvy	šunka 1	78,4	11,9	38,7	19,5	0,00	Liší se
	šunka 2	39,5	21,1				
rovnoměrnost zbarvení	šunka 1	72,2	17,4	24,3	24	0,00	Liší se
	šunka 2	47,8	19,9				
příjemnost vůně	šunka 1	65,2	13,7	10,0	14,7	0,00	Liší se
	šunka 2	55,1	17,6				
intenzita šunkové vůně	šunka 1	63	20,9	14,8	21,5	0,00	Liší se
	šunka 2	48,1	23,3				
intenzita jiné masové vůně	šunka 1	25,7	27,8	-5,4	20	0,2	Neliší se
	šunka 2	31,2	24,8				
intenzita jiné vůně	šunka 1	9,4	9,3	-1,4	6,6	0,33	Neliší se
	šunka 2	10,8	9,9				
celková intenzita chuti	šunka 1	59,7	20,9	0,3	17,8	0,92	Neliší se
	šunka 2	59,3	17,9				
intenzita šunkové chuti	šunka 1	66	16,0	9,7	13,4	0,00	Liší se
	šunka 2	56,3	22,4				
intenzita jiné chuti	šunka 1	17	21,2	-10,7	28,7	0,081	Neliší se
	šunka 2	27,7	27,7				
intenzita slané chuti	šunka 1	54,4	22,7	8	22,1	0,08	Neliší se
	šunka 2	46,4	22,9				
intenzita pachutí	šunka 1	8,5	8,8	-5,6	9,5	0,007	Liší se
	šunka 2	14,2	12,9				
celková příjemnost chuti	šunka 1	67,6	18,3	7,7	14,9	0,01	Liší se
	šunka 2	59,9	19,8				

Tabulka č. 5-7: výsledky párového T-testu při porovnání dusitanové šunky a šunky se zelným extraktem (1. série)

		průměr	směr. odch.	rozdíl	sm. odch. rozdílu	p	
celkový vzhled	šunka 1	81,6	10,0	39,0	22,9	0,00	Liší se
	šunka 3	42,5	23,2				
intenzita barvy	šunka 1	78,4	11,9	36,3	20,3	0,00	Liší se
	šunka 3	42,1	22,2				
rovnoměrnost zbarvení	šunka 1	72,3	17,4	25,8	21,9	0,00	Liší se
	šunka 3	46,3	22,2				
příjemnost vůně	šunka 1	65,2	13,7	19	25,5	0,00	Liší se
	šunka 3	46,2	18,9				
intenzita šunkové vůně	šunka 1	63	20,9	22	22,5	0,00	Liší se
	šunka 3	40,9	19,2				
intenzita jiné masové vůně	šunka 1	25,7	27,8	-6,3	30	0,33	Neliší se
	šunka 3	32	25,1				
intenzita jiné vůně	šunka 1	9,4	9,3	-9,1	16,6	0,01	Liší se
	šunka 3	18,6	18,9				
celková intenzita chuti	šunka 1	59,7	20,9	9,2	18,4	0,02	Liší se
	šunka 3	50,4	22,8				
intenzita šunkové chuti	šunka 1	66,0	16,0	18,6	21	0,02	Liší se
	šunka 3	47,4	22,5				
intenzita jiné chuti	šunka 1	17,0	21,2	-22,8	35	0,00	Liší se
	šunka 3	39,9	28,3				
intenzita slané chuti	šunka 1	52,9	23,2	10,4	21,5	0,03	Liší se
	šunka 3	42,5	25				
intenzita pachutí	šunka 1	8,5	8,8	-14,0	19,7	0,00	Liší se
	šunka 3	22,5	19,9				
celková příjemnost chuti	šunka 1	67,6	18,3	17,5	26,4	0,00	Liší se
	šunka 3	50,0	21,1				

Tabulka č. 5-8: výsledky párového T-testu při porovnání dusitanové šunky a šunky s řepným extraktem (1. série)

		průměr	směr. odchylka	rozdíl	sm. odch. rozdílu	p	
celkový vzhled	šunka 1	81,6	10	38,8	18,8	0,00	Liší se
	šunka 5	42,7	17,4				
intenzita barvy	šunka 1	78,4	11,9	33,1	22,1	0,00	Liší se
	šunka 5	45,3	22,2				
rovnoměrnost zbarvení	šunka 1	72,2	17,4	34,4	21	0,00	Liší se
	šunka 5	37,7	17,3				
příjemnost vůně	šunka 1	65,2	13,7	5,6	15	0,08	Neliší se
	šunka 5	59,6	14,2				
intenzita šunkové vůně	šunka 1	63	20,9	7,3	19	0,080	Neliší se
	šunka 5	55,6	19,2				
intenzita jiné masové vůně	šunka 1	25,7	27,8	2,4	23,9	0,62	Neliší se
	šunka 5	23,2	19,8				
intenzita jiné vůně	šunka 1	9,4	9,3	-0,1	6,7	0,925	Neliší se
	šunka 5	9,5	11,3				
celková intenzita chuti	šunka 1	59,7	20,9	3,3	11	0,14	Neliší se
	šunka 5	56,3	19,6				
intenzita šunkové chuti	šunka 1	66	16	9,2	11,8	0,00	Liší se
	šunka 5	56,7	20,3				
intenzita jiné chuti	šunka 1	17	21,2	-9,3	26,8	0,102	Neliší se
	šunka 5	26,4	20,5				
intenzita slané chuti	šunka 1	54,4	22,7	8,1	22,4	0,08	Neliší se
	šunka 5	46,2	19,4				
intenzita pachutí	šunka 1	8,5	8,8	-5,5	9,1	0,007	Liší se
	šunka 5	14	11,8				
celková příjemnost chuti	šunka 1	67,6	18,3	4,2	15,5	0,18	Neliší se
	šunka 5	63,3	15,7				

Tabulka č. 5-9: výsledky párového T-testu při porovnání dusitanové šunky a šunky s řepným extraktem, 24 hodin odvěšenými

		průměr	směr. odchylka	rozdíl	sm. odchylka rozdílu	P	
celkový vzhled	šunka 1	73,8	14,1	33,3	27,1	0,00	Liší se
	šunka 2	40,5	21,4				
intenzita barvy	šunka 1	68,3	14,5	-7,7	18,7	0,22	Neliší se
	šunka 2	76,0	20,8				
rovnoměrnost zbarvení	šunka 1	70,7	11,4	20,1	19,3	0,00	Liší se
	šunka 2	50,6	26,1				
příjemnost vůně	šunka 1	62,2	17,7	-2,5	12,0	0,529	Neliší se
	šunka 2	64,7	20,1				
intenzita šunkové vůně	šunka 1	63,3	19,1	-5,3	23,6	0,49	Neliší se
	šunka 2	68,6	16,4				
intenzita jiné masové vůně	šunka 1	36,4	22,6	0,8	12,3	0,84	Neliší se
	šunka 2	35,6	24,4				
intenzita jiné vůně	šunka 1	11,3	5,9	-2,0	11,2	0,43	Neliší se
	šunka 2	14,2	12,2				
celková intenzita chuti	šunka 1	55,0	21,5	-5,4	19,3	0,4	Neliší se
	šunka 2	60,4	18,1				
intenzita šunkové chuti	šunka 1	58,3	22,9	-1,9	17,7	0,74	Neliší se
	šunka 2	60,20	21,6				
intenzita jiné chuti	šunka 1	31,4	23,9	-2,3	26,1	0,75	Neliší se
	šunka 2	33,7	16,6				
intenzita slané chuti	šunka 1	46,0	14,9	3,8	16,6	0,48	Neliší se
	šunka 2	42,3	24,7				
intenzita pchutí	šunka 1	20,7	22,2	-1,7	24,9	0,83	Neliší se
	šunka 2	22,4	14,8				
celková příjemnost chuti	šunka 1	62,1	12,2	0,6	17	0,91	Neliší se
	šunka 2	61,5	18,4				

Tabulka č. 5-10: výsledky párového T-testu při porovnání dusitanové šunky a šunky s celerovým extraktem, 24 hodin odvěšenými

		průměr	směr. odchylka	rozdíl	sm. odchylka rozdílu	p	
celkový vzhled	šunka 1	73,8	14,1	39,8	20	0,00	Liší se
	šunka 3	34,0	17,6				
intenzita barvy	šunka 1	68,3	14,5	24	12,5	0,00	Liší se
	šunka 3	44,3	21,8				
rovnoměrnost zbarvení	šunka 1	70,7	11,4	25,7	16,8	0,00	Liší se
	šunka 3	45,0	20,9				
příjemnost vůně	šunka 1	62,2	17,7	7,1	14,7	0,16	Neliší se
	šunka 3	55,1	22,8				
intenzita šunkové vůně	šunka 1	63,3	19,1	11,0	27,4	0,22	Neliší se
	šunka 3	52,0	26,8				
intenzita jiné masové vůně	šunka 1	36,4	22,6	5,8	16,9	0,30	Neliší se
	šunka 3	30,6	23,1				
intenzita jiné vůně	šunka 1	11,3	5,9	-11,6	16,8	0,05	Neliší se
	šunka 3	22,9	20,9				
celková intenzita chuti	šunka 1	55,0	21,5	-4,0	23,2	0,59	Neliší se
	šunka 3	59,0	16,8				
intenzita šunkové chuti	šunka 1	58,3	22,9	9,0	13,2	0,06	Neliší se
	šunka 3	49,3	26,2				
intenzita jiné chuti	šunka 1	31,4	23,9	-17,4	16,1	0,00	Liší se
	šunka 3	48,8	23,9				
intenzita slané chuti	šunka 1	46,1	14,9	0,4	12,7	0,92	Neliší se
	šunka 3	45,7	19,6				
intenzita pchutí	šunka 1	20,7	22,2	-14,4	12,1	0,00	Liší se
	šunka 3	35,1	29,4				
celková příjemnost chuti	šunka 1	62,1	12,2	16,2	14,1	0,00	Liší se
	šunka 3	45,9	21,3				

Tabulka č. 5-11: výsledky párového T-testu při porovnání dusitanové šunky a šunky se zelným extraktem, 24 hodin odvšenými

		průměr	směr. odchylka	rozdíl	sm. odchylka rozdílu	p	
celkový vzhled	šunka 1	73,8	14,1	29,1	14,8	0,00	Liší se
	šunka 5	44,7	20,3				
intenzita barvy	šunka 1	68,3	14,5	32,6	12,8	0,00	Liší se
	šunka 5	35,7	20,8				
rovnoměrnost zbarvení	šunka 1	70,7	11,4	20,2	15,0	0,00	Liší se
	šunka 5	50,5	18,7				
příjemnost vůně	šunka 1	62,2	17,7	29,0	27,5	0,00	Liší se
	šunka 5	33,1	22,5				
intenzita šunkové vůně	šunka 1	63,3	19,1	25,0	28,9	0,02	Liší se
	šunka 5	38,3	25,5				
intenzita jiné masové vůně	šunka 1	36,4	22,6	-3,6	38,1	0,77	Neliší se
	šunka 5	40	31,2				
intenzita jiné vůně	šunka 1	11,3	5,9	-46,1	24,6	0,00	Liší se
	šunka 5	57,4	22,7				
celková intenzita chuti	šunka 1	55	21,5	-0,7	19,5	0,91	Neliší se
	šunka 5	55,7	15,8				
intenzita šunkové chuti	šunka 1	58,3	22,9	11,8000	23,4	0,14	Neliší se
	šunka 5	46,5	25,8				
intenzita jiné chuti	šunka 1	31,4	23,9	-24,2000	24,7	0,01	Liší se
	šunka 5	55,6	24,2				
intenzita slané chuti	šunka 1	46,1	14,9	3,1000	16,4	0,56	Neliší se
	šunka 5	43,0	15,7				
intenzita chutí	šunka 1	20,7	22,2	-22,6000	22,4	0,01	Liší se
	šunka 5	43,3	28,3				
celková příjemnost chuti	šunka 1	62,1	12,2	21,2000	27,9	0,04	Liší se
	šunka 5	40,9	25,5				

Tabulka č. 5-12: výsledky párového T-testu při porovnání dusitanové šunky a šunky s řepným extraktem, 48 hodin odvěšenými

		průměr	směr. odchylka	rozdíl	sm. odchylka rozdílu	p	
celkový vzhled	šunka 1	70,8	20,9	20,6	22,7	0,01	Liší se
	šunka 2	50,2	18,8				
intenzita barvy	šunka 1	62,1	23,6	-12,3	27,6	0,19	Neliší se
	šunka 2	74,4	22,7				
rovnoměrnost zbarvení	šunka 1	67,2	16,7	22,6	31,6	0,05	Neliší se
	šunka 2	44,6	25,4				
příjemnost vůně	šunka 1	67,6	21,4	2,0	14,9	0,68	Neliší se
	šunka 2	65,6	15,9				
intenzita šunkové vůně	šunka 1	64,3	24,2	6,6	18,1	0,28	Neliší se
	šunka 2	57,7	16,3				
intenzita jiné masové vůně	šunka 1	24,0	23,3	-5,6	16,4	0,30	Neliší se
	šunka 2	29,6	17,9				
intenzita jiné vůně	šunka 1	10,2	9,3	-3,7	10,2	0,28	Neliší se
	šunka 2	13,9	9,5				
celková intenzita chuti	šunka 1	61	16,2	-3,2	10,6	0,36	Neliší se
	šunka 2	64,2	19,1				
intenzita šunkové chuti	šunka 1	59,5	20,1	1,1	18,2	0,85	Neliší se
	šunka 2	58,4	19,7				
intenzita jiné chuti	šunka 1	34,1	30,7	4,0	21,2	0,56	Neliší se
	šunka 2	30,1	29,6				
intenzita slané chuti	šunka 1	51,2	18,7	2,4	19,0	0,69	Neliší se
	šunka 2	48,8	19,1				
intenzita pchutí	šunka 1	25,9	27,9	5,3	23,6	0,49	Neliší se
	šunka 2	20,6	22,2				
celková příjemnost chuti	šunka 1	51,3	19,9	-3,1	18,1	0,62	Neliší se
	šunka 2	54,4	17,4				

Tabulka č. 5-13: výsledky párového T-testu při porovnání dusitanové šunky a šunky s celerovým extraktem, 48 hodin odvěšenými

		průměr	směr. odchylka	rozdíl	směr. odchylka	p	
celkový vzhled	šunka 1	70,8	20,9	13,8	23,9	0,10	Neliší se
	šunka 3	57	16,14				
intenzita barvy	šunka 1	62,1	23,6	16,4	29,7	0,11	Neliší se
	šunka 3	45,7	19,3				
rovnoměrnost zbarvení	šunka 1	67,2	16,7	10,0	15,1	0,06	Neliší se
	šunka 3	57,2	14,3				
příjemnost vůně	šunka 1	67,6	21,4	6,6	12,9	0,14	Neliší se
	šunka 3	61,0	17,3				
intenzita šunkové vůně	šunka 1	64,3	24,2	8,4	23,4	0,28	Neliší se
	šunka 3	55,9	22,4				
intenzita jiné masové vůně	šunka 1	24,0	23,3	-2,1	16,1	0,69	Neliší se
	šunka 3	26,1	24,0				
intenzita jiné vůně	šunka 1	10,2	9,3	-7,3	14,2	0,13	Neliší se
	šunka 3	17,5	12,8				
celková intenzita chuti	šunka 1	61,0	16,2	-1,4	13,28	0,74	Neliší se
	šunka 3	62,4	18,4				
intenzita šunkové chuti	šunka 1	59,5	20,1	1,5	17,5	0,79	Neliší se
	šunka 3	58,0	22,0				
intenzita jiné chuti	šunka 1	34,1	30,7	-6,7	29,9	0,49	Neliší se
	šunka 3	40,8	29,3				
intenzita slané chuti	šunka 1	51,2	18,7	4,1	14,8	0,40	Neliší se
	šunka 3	47,1	11,6				
intenzita pchutí	šunka 1	25,9	27,9	1,8	27,5	0,84	Neliší se
	šunka 3	24,1	17,7				
celková příjemnost chuti	šunka 1	51,3	19,9	-5,2	23,78	0,52	Neliší se
	šunka 3	56,5	25,3				

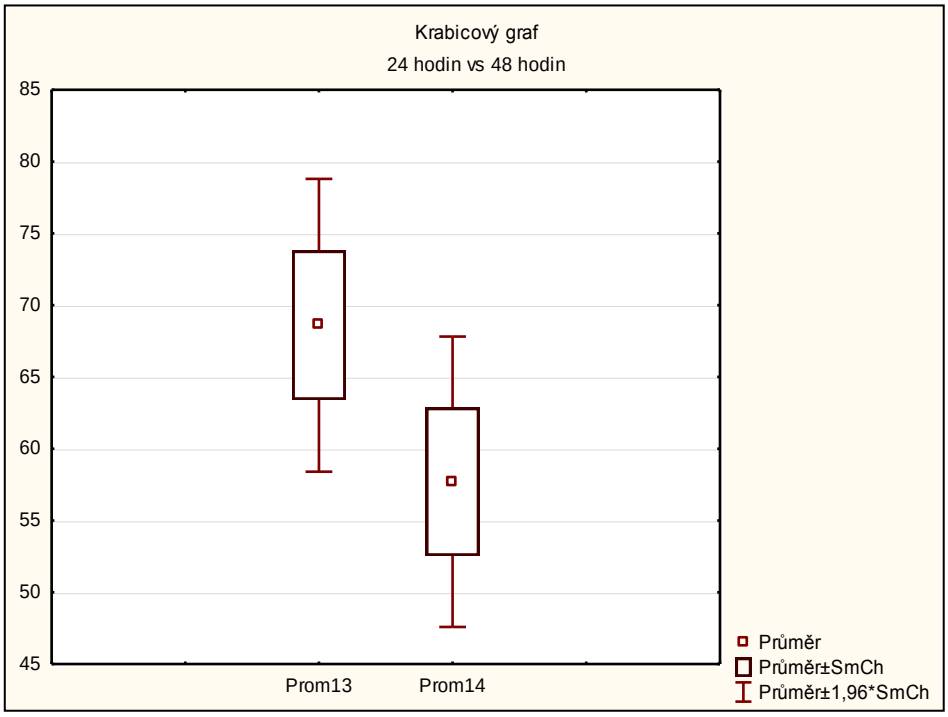
Tabulka č. 5-14: výsledky párového T-testu při porovnání dusitanové šunky a šunky se zelným extraktem, 48 hodin odvěšenými

		průměr	směr. odchylka	rozdíl	směr. odchylka	p	
celkový vzhled	šunka 1	70,8	20,9	12,1	15,8	0,03	Liší se
	šunka 5	58,7	19,3				
intenzita barvy	šunka 1	62,1	23,6	19,4	15,8	0,00	Liší se
	šunka 5	42,7	16,7				
rovnoměrnost zbarvení	šunka 1	67,2	16,7	18,1	21,2	0,02	Liší se
	šunka 5	49,1	21,8				
příjemnost vůně	šunka 1	67,6	21,4	15,7	28,9	0,12	Neliší se
	šunka 5	51,9	28,2				
intenzita šunkové vůně	šunka 1	64,3	24,2	14,3	21,3	0,06	Neliší se
	šunka 5	50,0	27,8				
intenzita jiné masové vůně	šunka 1	24,0	23,3	0,6	16,4	0,91	Neliší se
	šunka 5	23,4	19,8				
intenzita jiné vůně	šunka 1	10,2	9,3	-21,0	23,8	0,02	Liší se
	šunka 5	31,2	20,2				
celková intenzita chuti	šunka 1	61,0	16,2	0,7	11,7	0,85	Neliší se
	šunka 5	60,3	18,5				
intenzita šunkové chuti	šunka 1	59,5	20,1	4,3	23,9	0,58	Neliší se
	šunka 5	55,2	25,5				
intenzita jiné chuti	šunka 1	34,1	30,7	-16,8	25,7	0,06	Neliší se
	šunka 5	50,9	19,3				
intenzita slané chuti	šunka 1	51,2	18,7	0,9	12,2	0,82	Neliší se
	šunka 5	50,3	19,2				
intenzita pchutí	šunka 1	25,9	27,9	-14,1	27,8	0,14	Neliší se
	šunka 5	40,0	29,8				
celková příjemnost chuti	šunka 1	51,3	19,9	9,5	20,1	0,19	Neliší se
	šunka 5	41,7	24,4				

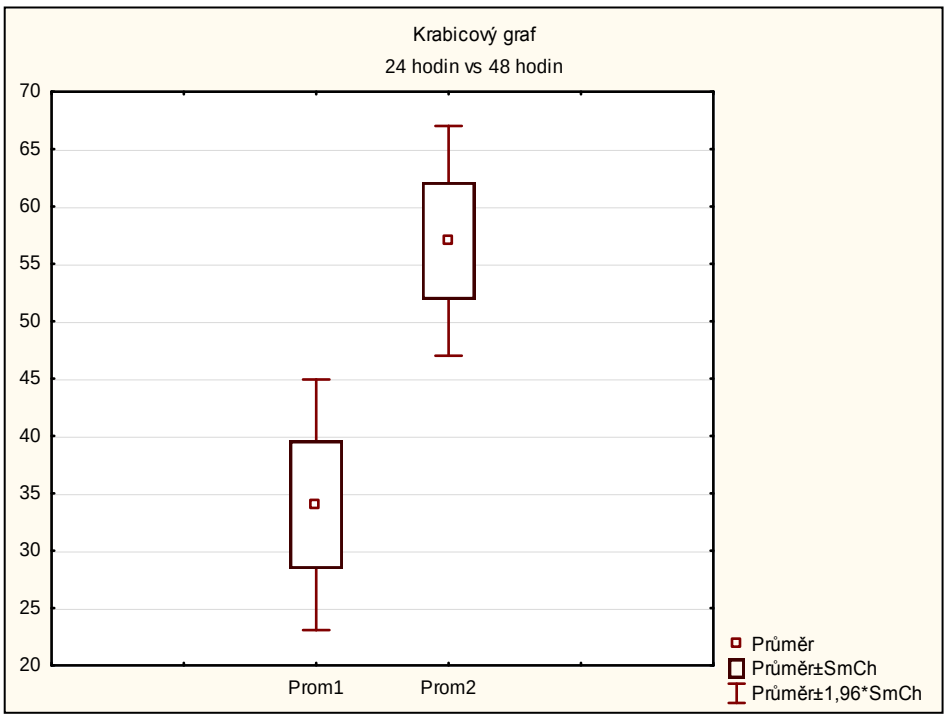
Tabulka č. 5-15: výsledky párového T-testu při porovnání šunek s řepným extraktem, odvěšenými 24 hodin a 48 hodin

		průměr	směr. odchylka	rozdíl	sm. odchylka rozdílu	p	
celkový vzhled	24 hod.	40,5	21,4	-9,7	28,3	0,30	Neliší se
	48 hod.	50	18,8				
intenzita barvy	24 hod.	76,0	20,8	1,6	28,2	0,86	Neliší se
	48 hod.	74,4	22,7				
rovnoměrnost zbarvení	24 hod.	50,6	26,1	6,0	25,8	0,48	Neliší se
	48 hod.	44,6	25,4				
příjemnost vůně	24 hod.	64,7	20,1	-0,9	13,4	0,83	Neliší se
	48 hod.	65,6	15,9				
intenzita šunkové vůně	24 hod.	68,6	16,4	10,9	13,3	0,02	Liší se
	48 hod.	57,7	16,3				
intenzita jiné masové vůně	24 hod.	35,6	24,4	6,0	28,1	0,51	Neliší se
	48 hod.	29,6	17,9				
intenzita jiné vůně	24 hod.	14,2	12,2	0,3	13,8	0,94	Neliší se
	48 hod.	13,9	9,5				
celková intenzita chuti	24 hod.	60,4	18,1	-3,8	21,3	0,58	Neliší se
	48 hod.	64,2	19,1				
intenzita šunkové chuti	24 hod.	60,2	21,6	1,8	27,2	0,83	Neliší se
	48 hod.	58,4	19,7				
intenzita jiné chuti	24 hod.	33,7	16,6	3,6	29,3	0,70	Neliší se
	48 hod.	30,1	29,6				
intenzita slané chuti	24 hod.	42,3	24,7	-6,5	25,4	0,43	Neliší se
	48 hod.	48,8	19,1				
intenzita pchutí	24 hod.	22,4	14,8	1,8	18,9	0,77	Neliší se
	48 hod.	20,6	22,2				
celková příjemnost chuti	24 hod.	62,8	19,0	8,4	14,2	0,11	Neliší se
	48 hod.	54,44	17,4				

Graf č. 5-2: statisticky průkazný rozdíl v intenzitě šunkové vůně mezi šunkami s řepným extraktem, 24 hodin a 48 hodin odvěšenými



Graf č. 5-3: statisticky průkazný rozdíl v celkovém vzhledu mezi šunkami s celerovým extraktem, 24 hodin a 48 hodin odvěšenými



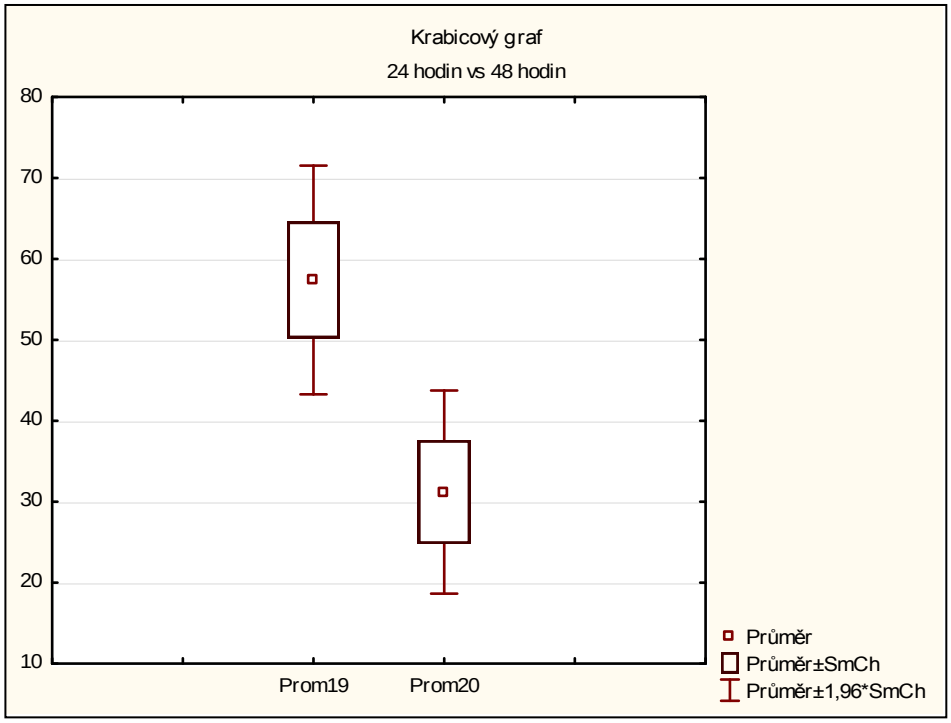
Tabulka č. 5-16: výsledky párového T-testu při porovnání šunek s celerovým extraktem, naloženými 24 hodin a 48 hodin

		průměr	směr. odchylka	rozdíl	sm. odchylka rozdílu	p	
celkový vzhled	24 hod.	34,0	17,6	-23,0	22,3	0,01	Liší se
	48 hod.	57,0	16,1				
intenzita barvy	24 hod.	44,3	21,8	-1,4	28,2	0,87	Neliší se
	48 hod.	45,7	19,3				
rovnoměrnost zbarvení	24 hod.	45,0	20,9	-12,2	25,27	0,16	Neliší se
	48 hod.	57,0	14,3				
příjemnost vůně	24 hod.	55,1	22,8	-5,9	18,2	0,33	Neliší se
	48 hod.	61,0	17,3				
intenzita šunkové vůně	24 hod.	52,0	26,8	-3,9	23,4	0,61	Neliší se
	48 hod.	55,9	22,4				
intenzita jiné masové vůně	24 hod.	30,6	23,1	4,5	25,5	0,59	Neliší se
	48 hod.	26,1	24,0				
intenzita jiné vůně	24 hod.	22,9	20,9	5,4	20,6	0,42	Neliší se
	48 hod.	17,5	12,8				
celková intenzita chuti	24 hod.	59,0	16,8	-3,4	17,6	0,55	Neliší se
	48 hod.	62,4	18,4				
intenzita šunkové chuti	24 hod.	49,3	26,2	-8,7	27,5	0,34	Neliší se
	48 hod.	58,0	22,0				
intenzita jiné chuti	24 hod.	48,8	23,9	8,0	37,1	0,51	Neliší se
	48 hod.	40,8	29,3				
intenzita slané chuti	24 hod.	45,7	19,6	-1,4	19,2	0,82	Neliší se
	48 hod.	47,1	11,6				
intenzita pchutí	24 hod.	35,1	29,4	11,0	36,2	0,36	Neliší se
	48 hod.	24,1	17,7				
celková příjemnost chuti	24 hod.	46,6	22,5	-9,8	32,6	0,39	Neliší se
	48 hod.	56,5	25,3				

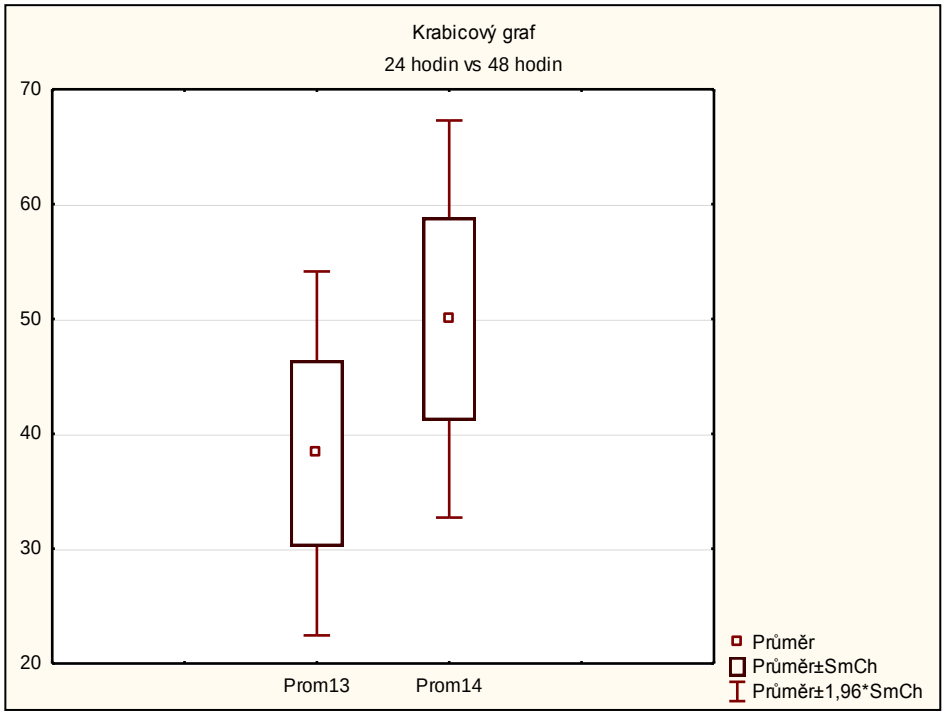
Tabulka č. 5-17: výsledky párového T-testu při porovnání šunek se zelným extraktem, odvěšenými 24 hodin a 48 hodin

		průměr	směr. odchylka	rozdíl	směr. odchylka rozdílu	p	
celkový vzhled	24 hod.	44,7	20,3	-14,0	22,2	0,07	Neliší se
	48 hod.	58,7	19,3				
intenzita barvy	24 hod.	35,7	20,8	-7,0	24,7	0,39	Neliší se
	48 hod.	42,7	16,7				
rovnoměrnost zbarvení	24 hod.	50,5	18,7	1,4	21,9	0,84	Neliší se
	48 hod.	49,1	21,8				
příjemnost vůně	24 hod.	33,1	22,5	-18,8	30,4	0,08	Neliší se
	48 hod.	51,9	28,2				
intenzita šunkové vůně	24 hod.	38,3	25,5	-11,7	14,0	0,02	Liší se
	48 hod.	50,0	27,8				
intenzita jiné masové vůně	24 hod.	40,0	31,2	16,6	27,5	0,08	Neliší se
	48 hod.	23,4	19,8				
intenzita jiné vůně	24 hod.	57,4	22,7	26,2	29,8	0,02	Liší se
	48 hod.	31,2	20,2				
celková intenzita chuti	24 hod.	55,7	15,8	-4,6	18,0	0,44	Neliší se
	48 hod.	60,3	18,5				
intenzita šunkové chuti	24 hod.	46,5	25,8	-8,7	26,8	0,33	Neliší se
	48 hod.	55,2	25,5				
intenzita jiné chuti	24 hod.	55,6	24,2	4,7	33,1	0,66	Neliší se
	48 hod.	50,9	19,3				
intenzita slané chuti	24 hod.	43,0	15,7	-7,3	19,0	0,25	Neliší se
	48 hod.	50,3	19,2				
intenzita pchutí	24 hod.	43,3	28,3	3,3	42,6	0,81	Neliší se
	48 hod.	40,0	29,8				
celková příjemnost chuti	24 hod.	39,0	26,3	-2,7	24,1	0,73	Neliší se
	48 hod.	41,7	24,4				

Graf č. 5-4: statisticky průkazný rozdíl v intenzitě šunkové vůně mezi šunkami se zelným extraktem, 24 hodin a 48 hodin odvěšenými



Graf č. 5-5: statisticky průkazný rozdíl v intenzitě jiné vůně mezi šunkami se zelným extraktem, 24 hodin a 48 hodin odvěšenými



Tabulka č. 5-18: výsledky pořadového testu šunek 1. série

1.	šunka č. 1
2.	šunka č. 6
3.	šunka č. 5
4.	šunka č. 4
5.	šunka č. 2
6.	šunka č. 3

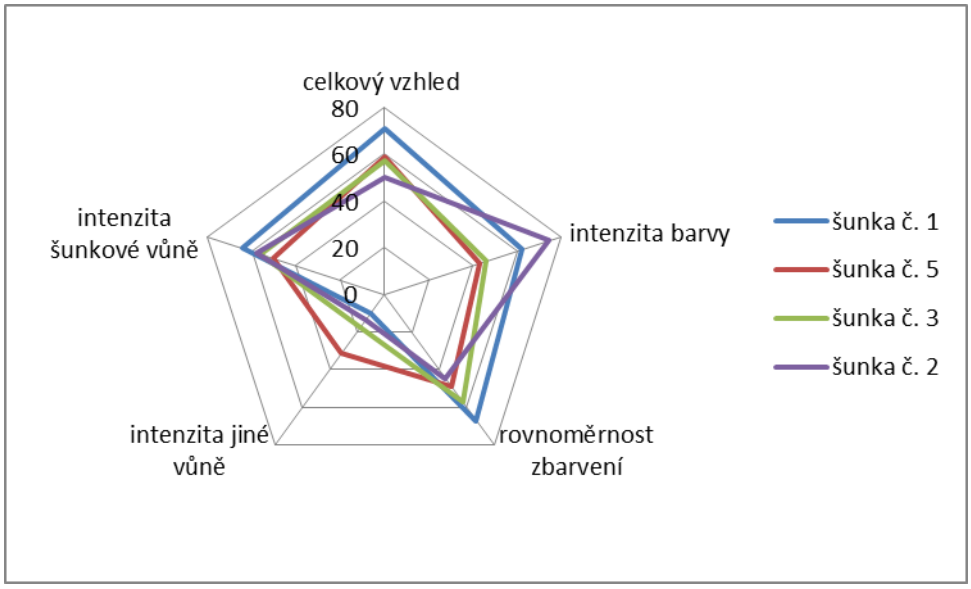
Tabulka č. 5-19: výsledky pořadového testu šunek 2. série, 24 hodin odvěšenými

1.	šunka č. 1
2.	šunka č. 2
3.	šunka č. 4
4.	šunka č. 3
5.	šunka č. 5

Tabulka č. 5-20: výsledky pořadového testu šunek 2. série, 48 hodin odvěšenými

1.	šunka č. 4
2.	šunka č. 3
3.	šunka č. 1
4.	šunka č. 2
5.	šunka č. 5

Graf č. 5-6: porovnání šunek se zeleninovými extrakty a dusitanovou šunkou po 48 hodinách odvěšení



6. Diskuze

V první části byla ověřena metodika stanovení dusičnanů pomocí spektrofotometrického měření při vlnové délce 220 nm, což je metoda doporučená pro hodnocení vody, a stanovení dusičnanovou kombinovanou iontově selektivní elektrodou. Správnost stanovení dusičnanů byla ověřena pomocí vnitřního standardu. Hodnoty naměřené pomocí ISE elektrody korelovaly s hodnotami naměřenými na spektrofotometru.

Dále bylo potřeba proměřit obsah dusičnanů, viz tabulka č. 5-1 v sušených zeleninách a vybrat ty, které budou použity při přípravě šunky. Na základě měření oběma metodami (ISE a absorbance) vodných extraktů byl vybrán celer jako známý rostlinný zdroj s vyšším obsahem dusičnanů, který je pro tyto účely již využíván (Krause et al., 2011). Celer ovšem patří mezi alergeny a je povinností zpracovatele tuto skutečnost při použití do masného výrobku uvést. Mimo to byl k dispozici pastinák a petržel, jako další zástupci kořenové zeleniny. Jako další možný zdroj dusičnanů byla vybrána červená řepa, jednak proto, že obsahovala vysoké koncentrace dusičnanů a také proto, že její vlastní červené barvivo by mohlo spolupůsobit na vytvoření barvy šunky. Jako 3. zelenina bylo vybráno zelí, neboť další hodnocené - brambory a cibule měly jen nízké koncentrace dusičnanů. Kromě toho bylo snahou zjistit, zda bude zástupce brukvovitých ovlivňovat organoleptické vlastnosti šunky.

Následně byly připraveny šunky s vybranými zeleninovými extrakty (aplikovaná koncentrace dusičnanu 170 mg/kg), dusitanovou a dusičnanovou směsí a s chloridem sodným. Vzhledem k rozdílným koncentracím dusičnanů v extraktech, bylo každému ze vzorků přidáno jiné množství extraktu a v případě potřeby doplněno vodou do požadovaného přídavku tekutiny. Měření proběhlo 4. den po výrobě, kdy byl stanoven obsah reziduálních dusitanů, dusičnanů a stupeň vybarvení. Reziduální dusitany byly nalezeny pouze u srovnávací šunky s dusitanovou solicí směsí, jelikož u ostatních vzorků došlo pravděpodobně k odbourání během skladování. Nejvyšší hodnota stupně vybarvení byla stanovena u šunky s dusitanovou solicí směsí a nejnižší naopak u šunky jen s chloridem sodným, viz tabulka č. 5-3. Nejvyšší stupeň vybarvení mezi šunkami se zeleninovým extraktem byl naměřen u šunky s řepným extraktem, pravděpodobně v důsledku přídavku nejkoncentrovanějšího zeleninového extraktu.

Stanovení reziduálního dusičnanu v extraktech ze šunek bylo realizováno oběma metodami (ISE a absorbance). Bohužel se potvrdilo, že dusičnanová ISE není vhodná pro měření za přítomnosti NaCl, který stanovení ruší. Proto byla jedinou použitelnou metodou měření absorbance v UV oblasti.

Všechny šunky této série měření byly hodnoceny senzoricky. Výsledky senzorického hodnocení, byly zpracovány v programu STATISTICA, kde byly porovnávány šunky se zeleninovým extraktem a šunkou s dusitanovou solicí směsí. Z výsledků vyhodnocených statistickým programem vyplývá, že nízký obsah dusitanu v šunkách se zeleninovým extraktem má pravděpodobně vliv na celkový vzhled, intenzitu barvy, rovnoměrnost zbarvení, intenzitu šunkové chuti, intenzitu pachutí a celkovou příjemnost chuti. V těchto deskriptorech se všechny šunky se zeleninovým extraktem od šunky dusitanové statisticky průkazně lišily.

Protože vybarvení u šunek s extrakty bylo nedostatečné, zvláště ukazatele barvy byly od šunky s dusitanovou solicí směsí výrazně odlišné, byly pro 2. sérii měření zvoleny zvýšené hodnoty koncentrace přidávaného dusičnanu a to na hodnotu shodnou s přídavkem dusičnanu prostřednictvím dusičnanové solicí směsi. K tomu účelu byly připraveny koncentrovanější extrakty.

Při plnění do obalu bylo dílo rozděleno na poloviny. Pro testování vlivu doby působení nitrátredukují mikroflóry na výsledné hodnoty veličin, byla jedna polovina šunek ponechána v chladírně 24 hodin před tepelným opracováním a druhá polovina 48 hodin.

Z výsledků vyplývá, že doba působení mikroflóry, prodloužená o 24 hodin pravděpodobně nepřispěla ke zvýšení obsahu reziduálního dusitanu, viz tabulka č. 5-4 a 5-5. Významnější rozdíly v obsahu reziduálních dusitanů v závislosti na čase odvěšení byly naměřeny pouze u šunky dusitanové a šunky s řepným extraktem. Avšak vyšší obsah reziduálního dusičnanu byl naměřen u všech šunek po delší době odvěšení. V žádné z šunek však nebyl překročen hygienický limit pro reziduální dusitany a dusitany dle vyhlášky 4/2008. Delší doba působení mikroflóry se pozitivně projevila na hodnotě stupně vybarvení, viz graf č. 5-1, což lze odvodit z výsledků, kdy byl naměřen vyšší stupeň vybarvení u všech šunek po 48 hodinách odvěšení. Rozdíly v parametrech senzorické analýzy při 48 hodinách odvěšení šunek lze vyčíst z například z grafu č. 5-6.

Z nafocených materiálů lze rozpoznat, že šunky 2. série mají intenzivnější růžové vybarvení, hlavně ve středu výrobku. Zvláště intenzivní zabarvení lze pozorovat u šunky s řepným extraktem, u které se mimo vzniklého dusitanu na barvě podílelo i vlastní barvivo červené řepy. Bazan-Lugo et al., (2012) tvrdí, že pro vznik žádoucího zabarvení v masných výrobcích lze použít paprikový prášek a rajčatový protlak. Vzorky obsahující paprikový prášek vykazují intenzivnější červené zabarvení, kdežto výrobky s rajčatovým protlakem se více podobají kontrolním vzorkům.

Z vyhodnocení senzorické analýzy v programu STATISTICA lze odvodit, že největší podobnost by mohla být mezi šunkou dusitanovou a šunkou s řepným extraktem, neboť tyto 2

vzorky se po 48 hodinách odležení lišily pouze v 1 parametru, a to v celkovém vzhledu, což by mohlo být způsobeno barvivem, které řepa obsahuje a které může ovlivnit organoleptické vlastnosti. V programu STATISTICA byly porovnány také zeleninové šunky, zda se od sebe liší při rozdílné době působení nitrátredukující mikroflóry. Z výsledků je patrné, že při různé době odležení se šunky s řepným extraktem statisticky průkazně liší v intenzitě šunkové vůně, viz graf č. 5-2. Šunky s celerovým extraktem se statisticky průkazně liší v celkovém vzhledu, viz tabulky č. 5-19 a 5-20 a graf č. 5-3, šunky se zelným extraktem se statisticky průkazně liší v intenzitě šunkové vůně a v intenzitě jiné vůně, viz grafy č. 5-4 a 5-5, přičemž nikdo z hodnotitelů nedokázal tuto jinou vůni identifikovat.

7. Závěr

Na základě hodnocení dvou analytických metod k měření koncentrace dusičnanů bylo zjištěno, že dusičnanovou iontově selektivní elektrodu, je možné použít pro stanovení obsahu dusičnanů ve vodných roztocích, ovšem nelze ji použít při měření roztoků s rozpuštěným NaCl, tedy v šunce. Obsah dusičnanů v sušené zelenině i v šunce je možné stanovit spektrofotometrickou metodou stanovení dusičnanů při vlnové délce 220 nm. Přesto by bylo vhodné se analytickými metodami tohoto stanovení dále zabývat.

Z výsledků měření dusičnanů ve vodných extraktech ze sušené zeleniny vyplývá, že nejvyšší koncentrace dusičnanů je u kořenové zeleniny, červené řepy a zelí. Na základě výběru vhodné alternativy dusitanů v masných výrobcích byl vybrán celer (je již pro tyto účely používán), dále řepa, která kromě vysoké koncentrace dusičnanu obsahuje barvivo betanin, a zelí, které kromě zvýšeného obsahu dusičnanu může svým typickým pachem ovlivnit hodnocení chutě a vůně.

Závěrem lze konstatovat, že hypotéza byla částečně potvrzena, neboť extrakty vybraných druhů zeleniny mohou vnést do masného výrobku dusičnany. Je ovšem ještě řada faktorů, které bude nutné detailně testovat (např. teplota a doba působení nitrátredukující mikroflór). Na základě výběru vhodných zelenin byly připraveny zeleninové extrakty, s jejichž použitím byly vyrobeny šunky se zeleninovými extrakty a šunky s dusičnanovou a dusitanovou solící směsí, pro srovnání. Z výsledků měření vyplývá, že dusitan lze do jisté míry nahradit zeleninovým extraktem obsahující dusičnany, avšak je potřeba stanovit vhodnou koncentraci dusičnanů, dobu a teplotu působení nitrátredukující mikroflóry.

8. Seznam literatury

Aldama-Aguilera, C., Llanderal-Cazares, C. 2003. Cochineal: Comparison of production methods in cut cladodes. Agrociencia. 37 (1). 11-19.

Aldama-Aguilera, C., Llanderal-Cazares, C., Soto-Hernandez, M., Castillo-Marquez, L. E. 2005. Cochineal (*Dactylopius coccus* Cosa) production in prickly pear plants in the open and in microtunnel greenhouses. Agrociencia. 39 (2). 161-171.

Auttachoat, W., Germolec, D. R., Smith, M. J., White, K. L. 2011. Contact sensitizing potential of annatto extract and its two primary color components, cis-bixin and norbixin, in female BALB/c mice. Food and Chemical Toxikology. 49 (10). 2638-2644.

Bazan-Lugo, E., Garcia-Martinez, I., Alfaro-Rodriguez, R. H., Totosaus, A. 2012. Color compensation in nitrite-recuced meat batters incorporating paprika or tomato paste. Journal of the Science of Food and Agriculture. 92 (8). 1627-1632.

Borges, M. E., Tejera, R. L., Diaz, L., Esparza, P., Ibanez, E. 2012. Natural dyes extraction from cochineal (*Dactylopius coccus*). New extraction methods. Food Chemistry. 132 (4). 1855-1860.

Campillo, N., Vinas, P., Martinez-Castillo, N., Hernandez-Cordoba, M. 2011. Determination of volatile nitrosamines in meat products by microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-mass spektrometry. Journal of Chromatography A. 1218 (14). 1815-1821.

Cardenosa, V., Lunar, M. L., Rubio, S. 2011. Generalized and rapid supramolecular solvent-based sample treatment for the determination of annatto in food. Journal of Chromatography A. 1218 (50). 8996-9002.

Cenci-Goga, B. T., Rossitto, P. V., Sechi, P., Parmegiani, S., Cambiotti, V., Cullor, J. S. 2012. Effect of selected dairy starter cultures on microbiological, chemical and sensory characteristics of wine and venison (*Dama dama*) nitrite-free dry-cured sausages. Meat Science. 90 (3). 599-606.

Cui, H. Y., Gabriel, A. A., Nakano, H. 2010. Antimicrobial efficacies of plant extracts and sodium nitrite against *Clostridium botulinum*. Food Control. 21 (7). 1030-1036.

ČESKO. Vyhláška č. 4 ze dne 3. ledna 2008, kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin. In Sbírka zákonů České republiky. 2008. Částka 4. 291-296, 323-325. Dostupný také z WWW: http://aplikace.mvcr.cz/sbirka-zakonu/SearchResult.aspx?q=2008&typeLaw=zakon&What=Rok&stranka=16.

ČSN EN 12014-1. 1998. Potraviny - Stanovení obsahu dusičnanů a/nebo dusitanů - Část 2: Metoda HPLC/IC pro stanovení obsahu dusičnanů v zeleninových výrobcích a zelenině.

Dineen, N. M., Kerry, J. P., Lynch, P. B., Buckley, D. J., Morrissey, P. A., Arendt, E. K. 2000. Reduced nitrite levels and dietary α-tocopheryl acetate supplementation: effects on the colour and oxidative stability of cooked hams. Meat Science. 55 (4). 475-482.

Drabik-Markiewicz, G., Dejaegher, B., De Mey, E., Impens, S., Kowalska, T., Paelinck, H., Heyden, Y. V. 2010. Evaluation of the influence of proline, hydroxyproline or pyrrolidine in the presence of sodium nitrite on N-nitrosamine formation when heating cured meat. Analytica Chimica Acta. 657 (2). 123-130.

Drabik-Markiewicz, G., Van den Maagdenberg, K., De Mey, E., Deprez, S., Kowalska, T., Paelinck, H. 2009. Role of proline and hydroxyproline in N-nitrosamine formation furing heating in cured meat. Meat Science. 81 (3). 479-486.

EU. Nařízení komise (EU) č. 1129/2011 ze dne 11. Listopadu 2011, kterým se mění příloha II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 vytvořením seznamu potravinářských přídatných látek Unie. In Úřední věstník Evropské unie. 2011. L295/99-103. Dostupný také z WWW: http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1000105&docType=ART&nid=11324

Ferreira, I. M. P. L. V. O., Silva, S. 2008. Quantification of residual nitrite and nitrate in ham by reverse-phase high performance liquid chromatography/diode array detector. Talanta. 74 (5). 1598-1602.

Goncalves, L. C. P., Trassi, M. A. D., Lopes, N. B., Dorr, F. A., dos Santos, M. T., Baader, W. J., Oliveira, V. X., Bastos, E. L. 2012. Acomparative study of the purification of betanin. Food Chemistry. 131 (1). 231-238.

Gonzalez, E. A., Garcia, E. M., Nazareno, M. A. 2010. Free radical scavenging capacity and antioxidant aktivity of cochineal (*Dactylopius coccus* C.) extracts. Food Chemistry. 119 (1). 358-362.

Gotterup, J., Olsen, K., Knochel, S., Tjener, K., Stahnke, L. H., Moller J. K. S. 2008. Colour formation in fermented sausages by meat-associated staphylococci with different nitrite- and nitrate-reductase activities. Meat Science. 78 (4). 492-501.

Grever, A. B. G., Ruiter, A. 2001. Prevention of *Clostridium* outgrowth in heated and hermetically sealed meat products by nitrite – a review. European Food Research and Technology. 213 (3). 165-169.

Guesmi, A., Ladhari, N., Ben Hadami, N., Msaddek, M., Sakli, F. 2013. First application of chlorophyll-a as biomordant: sonicator dyeing of wool with betanin dye. Journal of Cleaner Production. 39. 97-104.

Hagiwara, A., Imai, N., Ichihara, T., Sano, M., Tamano, S., Aoki, H., Yasuhara, K., Koda, T., Nakamura, Shirai, T. 2003. A thirteen-week oral toxicity study of annatto extract (norbixin), a natural food color extracted from the seed coat of annatto (*Bixa orellana* L.), in Sprague-Dawley rats. Food and Chemical Toxikology. 41 (8). 1157-1164.

Hyytia, E., Eerola, S., Hielm, S., Korkeala, H. 1997. Sodium nitrite and potassium nitrate in control of nonproteolytic *Clostridium botulinum* outgrowth and toxigenesis in vakuum-packed cold-smoked rainbow trout. Internetional Journal of Food Mikrobiology. 37 (1). 63-72.

Honikel, K. O. 2008. The use control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. Meat Science. 78 (1-2). 68-76.

Kameník, J., Král, O. 2012. „S“ jako solení. Maso. 23 (5). 25-32.

Kohn, M. C., Melnick, R. L., Ye, F., Portier, C. J. 2002. Pharmacokinetics of sodium nitrite-induced methemoglobinemia in the rat. Drug Metabolism and Disposition. 30 (6). 676-683.

Krause, B. L., Sebranek, J. G., Rust, R. E., Mendonca, A. 2011. Incubation of curing brines for the production of ready-to-eat, uncured, no-nitrite-or-nitrate-added, ground, cooked and sliced ham. Meat Science. 89 (4). 507-513.

Lopez, N., Puertolas, E., Condon, S., Raso, J., Alvarez, I. 2009. Enhancement of the extraction of betanine from red beetroot by pulsed electric fields. Journal of Food Engineering. 90 (1). 60-66.

Lovenklev, M., Artin, I., Hagberg, O., Borch, E., Holst, E., Radstrom, P. 2004. Quantitative interaction effects of carbon dioxide, sodium chloride and sodium nitrite on neurotoxin gene expression in nonproteolytic *Clostridium botulinum* type B. Applied and Environmental Mikrobiology. 70 (5). 2928-2934.

Mahendranath, G., Venugopalan, A., Parimalan, R., Giridhar, P., ravishankar, G. A. 2011. Anatto pigment production in root cultures of Achiote (*Bixa orellana* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture. 106 (3). 517-522.

Maier, M. S., Parera, S. D., Seldes, A. M. 2004. Marix assisted laser desorption and electrospray ionization mass spektrometry of carminic acid isolated from cochineal. International Journal of Mass Spektrometry. 232 (3). 225-229.

Matteucci, M. J., Reed, W. J., Tanen, D. A. 2003. Sodium thiosulfate fails to reduce nitrite-induced methemoglibinemia in vitro. Academic Emergency Medicine. 10 (4). 299-302.

Nioche, P., Berka, V., Vipond, J., Minton, N., Tsai, A. L., Raman, C. S. 2004. Femtomolar sensitivity of a NO sensor from *Clostridium botulinum*. Science. 306 (5701). 1550-1553.

Ohgiya, Y., Arakawa, F., Akiyma, H., Yoshioka, Y., Hayashi, Y., Sakai, S., Ito, S., Yamakawa, Y., Ohgiya, S., Ikezawa, Z., Teshima, R. 2009. Molecular cloning, expression, and characterization of a major 38-kd cochineal allergen. Journal of Allergy and Clinical imunology. 123 (5). 1157-1162.

Ozel, M. Z., Gogus, F., Yagci, S., Hamilton, J. F., Lewis, A. C. 2010. Determination of volatile nitrosamines in various meat products using comprehensive gas chromatography-nitrogen chemiluminescence detection. Food and Chemical Toxicology. 48 (11). 3268-3273.

Parks, S. E., Irving, D. E., Milham, P. J. 2012. A critical evaluation of on-farm rapid tests for measuring nitrate in leafy vegetables. Scientia Horticulturae. 134. 1-6.

Parolari, G., Gabba, L., Saccani, G. 2003. Extraction properties and absorption spectra of dry cured hams made with and without nitrate. Meat Science. 64 (4). 483-490.

Pegg, R. B., Fish, K.m., Shahidi, F. 2000. The replacement of conventional meat curing nitrite-free curing systems. Fleischwirtscharf. 80 (5). 86-89.

Pokorný, J., Valentová, H., Pudil, F. 1997. Senzorická analýza potravin laboratorní cvičení., VŠCHT, Praha, 60 s.

Rao, P. G. P., Jyothirmayi, T., Balaswamy, K., Satyanarayana, A., Rao, D. G. 2005. Effect of processing conditions on the stability of annatto (*Bixa orellana* L.) dye incorporated into some foods. Lwt-Food Science and Technology. 38 (7). 779-784.

Rivera-Madrid, R., Escobedo, R. M., Balam-Galera, E., Vera-Ku, M., Harries, H. 2006. Preliminary studies toward genetic improvement of annatto (*Bixa orellana* L.). Scientia Horticulturae. 109 (2). 165-172.

Rywotycki, R. 2002. The effect of selected functional additives and heat treatment on nitrosamine content in pasteurized pork ham. MEAT SCIENCE. 60 (4). 335-339.

Rywotycki, R. 2003. Meat nitrosamine contamination level depending on animal breeding factors. Meat Science. 65 (1). 669-676.

Rywotycki, R. 2007. The effect of baking of various kinds of raw meat from different animal species and meat with functional additives on nitrosamine contamination level. Food Chemistry. 101 (2). 540-548.

Shahidi, F., Synowiecki, J., Sen, N. 1992. Color characteristics and absence of N-nitrosamines in nitrite-cured seal meat. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 40 (8). 1398-1402.

Sindelar, J. J., Cordray, J. C., Olson, D. G., Sebranek, J. G., Love, J. A. 2007. Investigating quality attributes and consumer acceptance of uncured, no-nitrate/nitrite-added commercial hams, bacons, and frankfurters. Journal of Food Science. 72 (8). 551-559.

Sindelar, J. J., Cordray, J. C., Sebranek, J. G., Love, J. A., Ahn, D. U. 2007. Effects of varying levels of vegetable juice powder and incubation time on color, residual nitrate and nitrite, pigment, pH, and trained sensory attributes of ready-to-eat uncured ham. Journal of Food Science. 72 (6). 388-395.

Sinha, K., Chowdhury, S., Das Saha, P., Datta, S. 2013. Modeling of microwave-assisted extraction of natural dye frm seeds of Bixa orellana (Annatto) using response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN). Industrial Crops and Products. 41. 165-171.

Tanen, D. A., LoVecchio, F., Curry S. C. 2000. Failure of intravenous N-acetylcysteine to reduce methemoglobin produced by sodium nitrite in human volunteers: A randomized controlled trial. Annals of Emergency Medicine. 35 (4). 369-373.

Thiemig, F., Buhr, H., Oelker, P. 2000. Curing with nitrite – are there alternatives? Fleischwirtscharf. 80 (1). 106–110.

Velasco-Arjona, A., Garcia-Garrido, J. A., Quiles-Zafra, R., de Castro M. D. L. 1998. Full automated robotic method for the determination of chloride, nitrite and nitrate in cured meat products. Talanta. 46 (5). 969-976.

Wei, F., Xu, X. L., Zhou, G. H., Zhao, G. M., Li, C. B., Zhang, Y. J., Chen, L. Z., Qi. J. 2009. Irradiated Chinese Ruago ham: Changes in volatile N-nitrosamine, biogenic amine and residual nitrite during ripening and post-ripening. Meat Science. 81 (3). 451-455.

Yurchenko, S., Molder, U. 2007. The occurrence of volatile N-nitrosamines in Estonian meat products. Food Chemistry. 100 (4). 1713-1721.

Zarringhalami, S., Sahari, M. A., Hamidi-Esfehani, Z. 2009. Partial replacement of nitrite by annatto as a colour additive in sausage. Meat Science. 81 (1). 281-284.)

Zhang, X., Kong, B. H., Xiong, Y. L. L. 2007. Production of cured meat color in nitrite-free Harbin red sausage by *Lactobacillus fermentum* fermentation. Meat Science. 77 (4). 593-598.

9. Přílohy

Protokol č. 1. Protokol senzorické analýzy pro hodnocení šunky

HODNOCENÍ ŠUNKY

Jméno: …… Příjmení: ……

Zdravotní stav: …… Datum: ……Hodina: ……

Číslo vzorku: ……

Celkový vzhled — velmi špatný / vynikající

Intenzita barvy — neznatelná / velmi silná

Rovnoměrnost zbarvení — nerovnoměrné / rovnoměrné

Příjemnost vůně — odporná / velmi příjemná

Intenzita šunkové vůně — neznatelná / velmi silná

Intenzita jiné masové vůně — neznatelná / velmi silná

Intenzita jiné vůně — neznatelná / velmi silná

Jaké: ……..

neznatelná velmi silná

Celková intenzita chuti _____

neznatelná velmi silná

Intenzita šunkové chuti _____

neznatelná velmi silná

Intenzita jiné chuti _____

Jaké: …….

neznatelná velmi silná

Intenzita slané chuti _____

neznatelná velmi silná

Intenzita pachutí _____

Jakých: …….

odporná velmi příjemná

Celková příjemnost chuti _____

Seřaďte, prosím, vzorky od nejlepšího k nejhoršímu:

1. ……
2. ……
3. ……
4. ……
5. ……
6. ……