

Průběžné monitorování fermentace rybího masa pomocí experimentálního elektronického zařízení

Bc. Petr Starostka

Diplomová práce
2022



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	Bc. Petr Starostka
Osobní číslo:	T20061
Studijní program:	N0721A210004 Technologie potravin
Forma studia:	Kombinovaná
Téma práce:	Průběžné monitorování fermentace rybiho masa pomocí experimentálního elektronického zařízení

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na zadané téma.
2. Zhodnoťte dosavadní stav vývoje v oblasti fermentace masa na základě vyhledaných literárních a patentových zdrojů.
3. Průběh fermentace u rybiho masa zaznamenejte pomocí experimentálního elektronického zařízení a získaná data porovnejte s výsledky amoniaku měřeného analytickou metodou a současně posudte s mikrobiálními změnami.
4. Vyhodnoťte naměřená data, popište provedená měření, všechny výsledky interpretujte pomocí grafů, případně i tabulek a textového popisu.
5. Vzniklé závěry dostatečně popište a diskutujte.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] HUI, Y. H. and J. L. AALHUS, ed. *Handbook of meat and meat processing*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, c2012, 957 p. ISBN 9781439836842
- [2] JENSEN, Werner Klinth, Carrick DEVINE a Michael DIKEMAN, ed. *Encyclopedia of Meat Sciences*. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2004, 1500 s. ISBN 9780080924441
- [3] VELÍSEK, Jan. *Chemie potravin*. Vyd. 2. upr. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-86659-01-1
- [4] KATZ, Sandor Ellix. *The art of fermentation: An in-depth exploration of essential concepts and processes from around the world*. White River Junction, VT, USA: Chelsea Green Pub., 2012. 498 p. ISBN 978-1-60358-286-5
- [5] YIN, L. J., C. L. PAN and S. T. JIANG. New Technology for Producing Paste-like Fish Products using Lactic Acid Bacteria Fermentation. *Journal of Food Science* [online]. 2002, 67(8), 3114textendash3118. ISSN 1750-3841 [viewed 30 January 2022]. Available from: doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb08867
- [6] CRUZ, Rui M. S., Igor KHMELINSKII a Maria Margarida Cortez VIEIRA. *Methods in food analysis*. Boca Raton: CRC Press, [2014], 1 online zdroj. ISBN 9781482231960
- [7] KUSWANDI, Bambang. Freshness Sensors for Food Packaging. *Reference Module in Food Science*. Elsevier, 2017, 2017 [cit. 2020-07-20]. DOI: 10.1016/B978-0-08-100596-5.21876-3

Vedoucí diplomové práce: **Ing. et Ing. Anna Adámková, Ph.D.**
Ústav analýzy a chemie potravin

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

Termín odevzdání diplomové práce: **13. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Robert Gál, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 18. února 2022

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

•
Prohlašuji,

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

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá problematikou fermentace rybího masa. Maso bylo fermentováno za pomoci mikroskopické vláknité houby *Aspergillus oryzae*. Teoretická část popisuje obecnou rovinu rybího masa z hlediska jeho složení, skladování, zrání, mikrobiologie a údržnosti. Práce se také věnuje staření a fermentaci masa a s popisem obecných příkladů využití fermentace. Poslední teoretická část je zaměřena na stanovení amoniaku v mase pomocí elektronického nosu, tak i běžných analytických metod. V praktické části byla provedena studie monitorování fermentace rybího masa pomocí experimentálního elektronického nosu a její výsledky byly porovnány s profesionálním indikátorem čerstvosti masa PERES a s výsledky stanovení amoniaku spektrofotometricky. Dále v praktické části byly provedeno mikrobiální stanovení celkového počtu mikroorganismů a koliformních bakterií. Práce svými výsledky přispívá k rozšiřování použití elektronických nosů v potravinářství.

Klíčová slova: *Aspergillus oryzae*, fermentace, rybí maso, elektronický nos

ABSTRACT

The diploma thesis deals with the issue of fish meat fermentation. The meat was fermented using a microscopic fibrous fungus *Aspergillus oryzae*. The theoretical part describes the general level of fish meat in terms of its composition, storage, maturation, microbiology, and sustainability. The work also deals with the aging and fermentation of meat and with a description of general examples of the use of fermentation. The last theoretical part is focused on the determination of ammonia in meat using an electronic nose, as well as common analytical methods. In the practical part, a study of fish meat fermentation using an experimental electronic nose was performed and its results were compared with the professional meat freshness indicator PERES and with the results of ammonia determination spectrophotometrically. Furthermore, in the practical part, microbial determination of the total number of microorganisms and coliform bacteria was performed. With its results, the work contributes to the expansion of the use of electronic noses in the food industry.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, fermentation, fish meat, electronic nose

Rád bych tímto poděkoval Ing. et. Ing. Anně Adámkové, Ph.D. za cenné rady při zpracování diplomové práce. Dále chci poděkovat Ing. Martinu Adámkovi, Ph.D. za pomoc při měření.

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

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 MASO	11
1.1 DEFINICE MASA.....	11
1.2 CHARAKTERISTIKA A ČLENĚNÍ RYB.....	11
2 PORÁŽENÍ RYB	14
2.1 KUCHÁNÍ RYB	14
2.2 HODNOCENÍ JAKOSTI RYB	15
2.3 POSTMORTÁLNÍ ZMĚNY RYBÍHO MASA	15
2.4 KONTAMINACE RYBÍHO MASA.....	16
2.5 MIKROBIÁLNÍ NEBEZPEČÍ	17
2.6 MOŽNOSTI CHLAZENÍ	19
2.7 CHLAZENÍ LEDEM.....	19
2.8 HACCP	19
3 STAŘENÍ A FERMENTACE MASA	21
3.1 FERMENTACE.....	21
3.1.1 Technologie fermentace masných tepelně neopracovaných výrobků	21
4 ASPERGILLUS ORYZAE	23
4.1 ENZYMY	23
4.2 KOMEKOJI.....	24
4.3 UŠLECHTILÁ PLÍSEŇ	24
4.4 BEZPEČNOST <i>ASPERGILLUS ORYZAE</i>	24
4.5 DALŠÍ VYUŽITÍ FERMENTACE	25
4.5.1 Sójová omáčka	25
4.5.2 Miso pasta	25
4.5.3 Sake.....	25
4.5.4 Mirin	25
4.5.5 Tempeh	25
5 METODY STANOVENÍ AMONIAKU	26
5.1 STANOVENÍ AMONIAKU PODLE CONWAYE.....	26
5.2 STANOVENÍ AMONIAKU POMOCÍ ISE	26
5.3 STANOVENÍ AMONIAKU POMOCÍ NESSLEROVA ČINIDLA	26
5.4 ELEKTRONICKÝ NOS.....	27
II PRAKTICKÁ ČÁST.....	28
6.1 ÚVOD DO MĚŘENÍ.....	29

6.2	MATERIÁL	29
6.3	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ VYUŽITÉ PŘI MĚŘENÍ PACHŮ.....	30
7	METODIKA.....	31
7.1	METODIKA PRO STANOVENÍ AMONIAKU ANALYTICKOU METODOU	32
7.1.1	Zhotovení kalibrační křivky.....	33
7.2	METODIKA PRO STANOVENÍ MIKROBIÁLNÍHO ROZBORU	33
7.2.1	Složení jednotlivých živných půd a příprava ředícího roztoku.....	33
7.2.2	Zpracování vzorků.....	34
8	VÝSLEDKY A DISKUZE	35
8.1	VÝSLEDKY STANOVENÍ AMONIAKU POMOCÍ ANALYTICKÉ METODY	42
8.2	VÝSLEDKY MIKROBIOLOGICKÉ ANALÝZY	42
	ZÁVĚR	44
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	45
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	50
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	51
	SEZNAM TABULEK	52

ÚVOD

Maso vždy bylo, je a bude nedílnou součástí potravního řetězce nejen lidských jedinců. Příjem živočišných bílkovin a tuků napomohl evoluci včetně vývinu mozku a vyšší inteligence. Z hlediska kvality bílkovin a tuků je rybí maso srovnatelné s masem jatečných zvířat. Z nutričního hlediska se jedná o vysoce hodnotnou potravinu, zejména pro vysoký obsah plnohodnotných proteinů a nenasycených mastných kyselin. Maso je také významným zdrojem železa, zinku, selenu a vitaminů skupiny B. Nicméně však bývá také často kritizováno kvůli jeho obsahu cholesterolu a obsahu živočišného tuku, kdy převažují nasycené mastné kyseliny.

Z mikrobiologického hlediska se maso řadí mezi neúdržné potraviny. Z tohoto důvodu se už od pradávna lidé snažili o možnost konzervace a prodloužení údržnosti. Jednou z možností je fermentace, což je rozkladný proces pomocí mikroorganismů a jejich enzymů. V praktické části této diplomové práce byla použita plíseň *Aspergillus oryzae*. Je to jeden z nejdéle používaných mikroorganismů, zejména v asijských zemích, hlavně ve východní části Asie a v Japonsku.

Tato diplomová práce sledovala hypotézu pojednávající o možnosti monitorovat změny vlastností analyzovaného vzorku v průběhu fermentace pomocí experimentálního elektronického zařízení s kombinovaným senzorickým systémem a využití mikrobiologického stanovení pro určení bezpečnosti konzumace.

Hlavním cílem diplomové práce bylo otestovat možnost sledování průběhu fermentace rybího masa pomocí experimentálního elektronického zařízení s kombinovaným senzorickým systémem. Jedním ze senzorů byl plynový senzor pro stanovení obsahu uvolněného amoniaku v prostoru nad vzorkem. Součástí tohoto cíle bylo porovnání získaných výsledků s klasickou analytickou metodou stanovení amoniaku ve vzorku. Dalším cílem bylo provedení mikrobiologické analýzy vzorku při fermentačním procesu z důvodu určení bezpečnosti konzumace.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MASO

Maso hrálo velmi důležitou roli v lidské výživě od nepaměti. Již v pravěku byl člověk lovcem a ulovená zvěř dostačovala k pokrytí nutričních potřeb člověka.

Maso bylo a je oblíbenou složkou lidské stravy. Konzumuje se především pro jeho sensorické a nutriční vlastnosti. Vzbuzuje pocit sytosti a je velmi cenným zdrojem plnohodnotných bílkovin, vitamínů (zejména skupiny B), minerálních látek (železo, vápník, zinek) a nenasycených mastných kyselin. Právem je maso považováno za nenahraditelnou složku lidské výživy, i když je možné zajistit plnohodnotný jídelníček i bez masa. (Kadlec, et al., 2012)

1.1 Definice masa

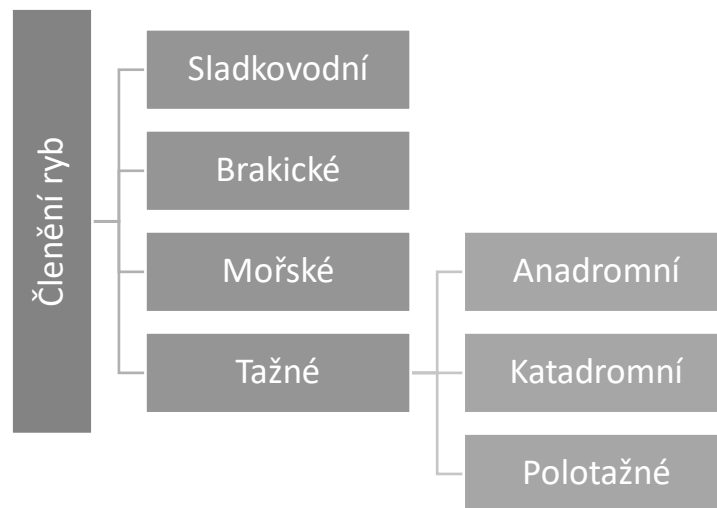
Obecně je maso definováno jako všechny části těl živočichů, včetně ryb a bezobratlých, v čerstvém nebo upraveném stavu, které se hodí k lidské výživě. Mezi maso patří také živočišné tuky, krev, droby, kůže a kosti (pokud se konzumují), ale i masné výrobky. V pravém slova smyslu se masem rozumí pouze příčně pruhovaná kosterní svalovina včetně vmezeřeného tuku, nervů, cév, vazivových a jiných částí, které jsou obsaženy ve svalovině. (Kadlec, et al., 2012)

Maso se také dělí na červené a bílé. Pojmy se využívají na základě barvy masa, obsahu tuku ve svalovině a druhu zvířat. Červené maso je spojováno s hovězím, vepřovým, jehněčím, kachním, husím či zvěřinou. Za bílé maso je považováno maso kuřecí, králíčí, krůtí a také ryby a mořské plody. (Seman, et al., 2018)

1.2 Charakteristika a členění ryb

Ryby jsou studenokrevní z 99% obratlovci, dýchají žábry. V mořích světa žije cca 20 000 druhů, u nás asi 50 druhů. Rybí maso obsahuje hodně vody (60 – 80%), proto podléhá rychleji zkáze. Je bohaté na plnohodnotné bílkoviny, minerální látky (fosfor, fluór, sodík, mořské obsahují i jód). Rybí tuk je rozložen rovnoměrně, má vysokou biologickou hodnotu. Červené rybí maso obsahuje více minerálních látek než bílé. Tučné rybí maso je bohaté na vitamíny A, D, ve svalovině a vnitřnostech jsou vitamíny A, B1, B2, B12. (Hanel a Andreska, 2013)

Následující obrázek znázorňuje schéma členění ryb podle vodního prostředí ve kterém žijí.



Obrázek 1: Členění ryb

Podle vodního prostředí, ve kterém žijí, dělíme ryby na sladkovodní, které žijí ve sladké vodě. Brakické, žijící v brakické vodě, což je směs sladké a mořské vody (například v ústí řek). Mořské žijí ve slané vodě (moře a oceány), Tažné, které se dále dělí na anadromní, které žijí ve slané vodě, ale rozmnožují se ve sladké vodě (např. losos), katadromní žijící naopak ve sladké vodě, ale rozmnožují se ve slané vodě (např. úhoř) a polotažné jež během života mění místa svého pobytu. (Hanel a Andreska, 2013)

Rybí maso má málo purinů, které podporují v lidském organismu vznik kyseliny močové (podílí se na vzniku dny, revmatismu apod.). Svalovina je lehce stravitelná a proto je vhodná na různé druhy diet. Rybí maso se rychleji uvaří, neboť obsahuje méně kolagenu a pojivového vaziva. Nejlépe stravitelnými vařenými rybami jsou pstruh a štika.

Kvalita rybího masa je ovlivněna prostředím, ve kterém ryby žijí, dále pak ročním obdobím, pohlavím, věkem, druhem a výživou. (Naše výživa, 2020)

Dělení rybího masa:

Podle původu – sladkovodní (kapr, štika, ...), mořské (treska, makrela, ...), z vod smíšených (ústí řek do moře, kde se mísí slaná voda se sladkou), tažné (losos).

Podle obsahu tuku – netučné (do 2 % tuku – treska, žralok, ...), tučné, hodně nenasycených mastných kyselin (nad 2 % tuku – tuňák, sledř, losos, sardinky, atd).

Podle zoologického hlediska – kostra chrupavčitá pouze 1 % ryb (jeseter) a kostra s obratli.

Ryby a další vodní živočichové mají v těle tuk zcela jiného složení, než mají suchozemští živočichové. Významné jsou zejména nenasycené mastné kyseliny (PUFA) To však zcela neplatí pro ryby rybníční, přikrmované. Složení jejich tuku není tak zdravě prospěšné, jako složení tuku ryb mořských. (Scientific Opinion on Fish Oil for Human Consumption. Food Hygiene including Rancidity,, 2010)

Pozitiva konzumace rybího masa

Krom již výše zmíněných:

- působí preventivně proti rozvoji diabetu,
- pomáhá při srdečním a cévním onemocnění,
- snižuje riziko srdečních arytmií,
- snižuje rozvoj aterosklerotických plátů v cévách – rozšiřuje krevní cévy,
- snižuje hladinu cholesterolu a LDL proteinů,
- snižuje vysoký krevní tlak,
- je prevencí vzniku rakoviny střev (obsahuje i vitamíny D a A),
- udržuje zdravou štítnou žlázu (obsahuje jód),
- podílí se na zdravém vývoji mozku a očí – důležité zvláště pro těhotné a kojící ženy,
- má nízkou energetickou hodnotu – vhodné při redukční dietě,
- vysoký obsah ω 3 a ω 6 mastných kyselin.

Velkou roli hraje také dodržení správné porážky, aby ryby nebyly vystaveny stresu, což by následně mohlo ovlivnit chuť masa.(Výukový materiál, 2019)

2 PORÁŽENÍ RYB

Narizení Rady (ES) č. 1099/2009 o ochraně zvířat při usmrcování:

„Během usmrcování a souvisejících úkonů musí být ryby ušetřeny veškeré zbytečné bolesti, úzkosti a utrpení“ Za týrání se považuje: při manipulaci s živými rybami zbavovat ryby šupin nebo ploutví, vsouvat rybám prsty pod skřele do žáber nebo, jim vtlačovat prsty do očnic anebo násilně vytlačovat jikry nebo mlíčí pokud se nejedná o výzkum a umělý chov ryb a nejde-li o postup stanovený zákonem o rybářství a zákonem o ochraně přírody.

Zákon č 359/2012 Sb., kterým se mění zákon č 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů: § 5:

Usmrcení ryb vykrvením se smí provádět pouze po jejich omrácení zajišťujícím ztrátu citlivosti a vnímání po celou dobu jejich vykrvování.

Jatečné zpracování ryb před jejich vykrvením je zakázáno. Vykrvování ryb při prodeji se provádí po omrácení silným úderem tupým předmětem do hlavy a přetnutím žaberních oblouků nebo míchy a cév bezprostředně za hlavou.

Zákon č 359/2012 Sb., kterým se mění zákon č 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů: § 5:

Ryby při průmyslovém zpracování lze omračovat zařízením využívající střídavý elektrický proud o napětí 230 V, plyn CO₂ nebo jiný plyn nebo směs plynů, schválených dle zvláštního právního předpisu. (Česko, 2012)

2.1 Kuchání ryb

Následující odrážky znázorňují postup při kuchání ryb:

- odstranění hlavy,
- odstranění ploutví,
- půlení,
- krájení podkov,
- praní,
- filetování.

U ryb, kde není hlava tržním artiklem nejdříve dojde k odstranění hlavy. Poté se zbavíme šupin pomocí vysokotlakých vodních trysek nebo mechanicky. Následně dojde k naříznutí tělní stěny ryb v mediální rovině na ventrální části těla od močopohlavního otvoru směrem k hlavě tak, aby došlo k otevření tělní dutiny. Lze provádět ručně nožem nebo strojově pomocí okružní pily. Následuje vyjmutí vnitřních orgánů, tak aby nedošlo k poškození žlučového vaku neb protržení střevního traktu tím i k možné kontaminaci masa.

Ruční kuchání by mělo být prováděno na stolech z materiálu, který je snadno umyvateľný, čistiteľný a dezinfikovatelný

V případě velkokapacitních linek je kuchání prováděno ve speciálních zařízeních automaticky. Požitelné části jsou omyty čistou vodou a rychle zchlazeny. Strojně oddělené maso je neprodleně po oddělení zpracováno nebo zmrazeno na teplotu -18°C. (Vácha a Vejsada, 2013)

2.2 Hodnocení jakosti ryb

Vzhledem ke krátké údržnosti rybího masa se posuzuje zejména čerstvost. Používají se zejména:

- metody senzorické analýzy,
- metody chemické,
- metody fyzikální,
- metody mikrobiologické (Vácha a Vejsada, 2013)

2.3 Postmortální změny rybího masa

Postmortální změny rybího masa rozdělujeme na dvě části: autolýzu a proteolýzu.

Autolýza rybího masa neboli také zrání masa probíhá podobně jako u masa jatečných zvířat, ale mnohem rychleji a s poněkud rozdílnou intenzitou i důsledky. Celý zrací proces můžeme rozdělit do tří fází:

- posmrtné ztuhnutí,
- zrání,
- hluboká autolýza.

Rigor mortis, neboli posmrtné ztuhnutí, se projevuje nejdříve v ocasní partii. Dále probíhá celým tělem až k hlavě. Posmrtné ztuhnutí je u ryb různě dlouhé (1 hodina až 3 dny). Záleží na druhu a kondici ryb, ale i na době vylovení a usmrcení. Dále pak na velikosti ryby a následné teplotě uchovávání. U posmrtného tuhnutí rybího masa dochází k postupnému odbourávání glykogenu a adenosintrifosfátu (ATP) na kyselinu mléčnou a inosinmonofosfát. (IMP). Celá fáze *rigoru mortis* je ukončena až rozložením veškerého ATP na kyselinu mléčnou a IMP.

Zrání rybího masa probíhá také velmi rychle. Napomáhá tomu rozklad kyseliny mléčné pomocí enzymu laktátdehydrogenáza. Laktátdehydrogenáza rozloží kyselinu mléčnou na vodu a oxid uhličitý. Dojde k disociaci aktinomyosinového komplexu a tím uvolnění rigoru. Odbourávání molekul bílkovin zajišťují proteázy. Lipázy rozštěpí část lipidů. Štěpné produkty nám vytváří typickou chuť a vůni rybího masa.

Při hluboké autolýze by došlo k rozkladu rybího masa nativními enzymy až na oxid uhličitý, vodu, amoniak, aminy, sirovodík a merkaptany. Z praktických důvodů však u ryb k hluboké autolýze nedochází. Je to tím, že mikrobiální proteolýza nastává dříve a rybí maso se rychle kazí nebo hnije.

Proteolýza, neboli mikrobiální kažení a hnití, probíhá většinou současně s hlubokou autolýzou. Jde o působení mikroorganismů, zejména *Pseudomonas* a *Achromobacter*, které produkují enzymy rozkládající bílkoviny a tuky. (Ingr, 2003)

Při tepelné úpravě dochází pouze k částečnému vyluhování a rozkladu biogenních aminů. K vyšším úbytkům biogenních aminů dochází při pečení a smažení než při vaření či dušení. Odstranění již jednou vzniklých biogenních aminů z potraviny je velmi obtížné. Nejvhodnějším způsobem zabránění vzniku biogenních aminů je dodržování správných technologických postupů a hygienických podmínek při výrobě. (Matouš, 2010)

2.4 Kontaminace rybího masa

Jedním z nejpoužívanějších způsobů prodloužení skladovatelnosti rybího masa, kterým dojde ke zpomalení mikrobiálních, fermentativních a chemických pochodů, je zchlazení.

Teplota nejvíce ovlivňuje jak enzymatickou, tak mikrobiologickou aktivitu. Při teplotním rozmezí od 0 °C do 25 °C je považována mikrobiologická aktivita za důležitější než enzymatická aktivita. Mnoho druhů bakterií utlumuje své životní pochody při teplotách pod 10 °C. U psychrotrofních bakterií byl prokázán zpomalený růst při teplotách blízkých

se bodu mrazu. Odpovídající teplota pro chlazení ryb je od $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$ až po $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, tj. rozmezí, kdy dojde k inhibici nárůstu mikroorganismů. Pro mrazení rybího masa se doporučuje teplotní rozmezí od $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, která zaručí kompletní zastavení růstu bakterií. Vliv teploty má vliv i na mykózy, u kterých dochází při poklesu k nízkým teplotám okolního prostředí ke znatelné inhibici. (Buchtová, 2001)

Je fakt, že zchlazení těla ryb na teploty blízké $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ napomáhá udržovat čerstvost, avšak úplně nezabrání mikrobiální kontaminaci či aktivitě trávicích enzymů. Ryby a další akvakulturní produkty, které se nacházejí ve studených vodách, jsou často nositelem bakterií typu *Schewanella putrefaciens*. Její růst je při běžných chladírenských podmínkách omezen na jednu desetinu, přesto může dojít ke znehodnocení svaloviny rychleji, než u ryb původem z teplých vod. (Šilhánková, 2002)

Jako nevýhodu je nutno zmínit ovlivnění sensorické hodnoty, které je výraznější spíše u mořských ryb. Mezi další negativní efekty způsobené super rychlým zchlazením lze zařadit ztrátu vody a ovlivnění vzhledu a textury masa, kvůli tvorbě velkých krystalů ledu. Mimo jiné je zde i možnost vzniku denaturace proteinů. (VÁCHA a VEJSADA, 2013)

Tyto negativa se ještě rozšíří o možnost oxidace lipidů po částečném zmrznutí rybí svaloviny. I přes fakt, že metoda nízkoteplotního zchlazování má některé negativní vlivy na sensorické parametry, bude patrně vhodnější než jiné technologie. (Šilhánková, 2002)

2.5 Mikrobiální nebezpečí

Mezi nejnebezpečnější mikrobiální kontaminace patří *Shigella*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Clostridium botulinum*, *Aeromonas* a *Pseudomonas*. Mikrobiologická nákaza je nejsnáze přenositelná při konzumaci syrové ryby. Syrové se konzumují pouze mořské ryby, protože maso ze sladkovodních ryb obsahuje větší množství škodlivých mikroorganismů. Jedná se zejména o psychrofilní mikroorganismy, které jsou schopny přežít i chladírenské teploty. Při přenosu nákazy na člověka dochází zejména k průjmovým komplikacím. (Beneš, 2009)

Shigella jsou gramnegativní nepohyblivé tyčinky, způsobující vysoce nakažlivé průjmové onemocnění. K jejich pomnožení dochází v tenkém střevě, ale k poškození střevní stěny dochází až ve střevě tlustém. Je to typické onemocnění špinavých rukou. K alimentárnímu nakažení dochází zejména z mléka nebo vody. Typická je produkce toxinů. (Beneš, 2009)

Salmonella je gramnegativní tyčinka poměrně odolná proti vyschnutí či mrazu. Běžně ji ničí teploty nad 60°C. Přenašečem onemocnění je výhradně člověk. Nákaza vzniká požitím nedostatečně tepelně upravených potravin nebo fekálně kontaminovanou vodou. Příznakem nákazy jsou průjmy doprovázené vysokými teplotami, při velmi silné infekci může dojít dokonce i k perforaci střev. (Horáček, 2000)

Listeria monocytogenes jsou grampozitivní tyčinky pohyblivé při teplotách do 25°C, schopné snášet i vyšší koncentrace NaCl a žlučových solí. Častý původce infekcí stádových zvířat, často také přítomna ve střevním traktu. K nákaze dochází nejčastěji konzumací nedostatečně tepelně opracovaných potravin, syrového mléka a zrajících sýrů. Nakazit se mohou také lidé přicházející do styku s infikovanými zvířaty. Příznaky onemocnění jsou nevolnost, zvracení a průjem. Může způsobit také potrat či porod mrtvého nebo nakaženého dítěte, které umírá krátce po porodu. (Vařejka, Mráz a Smola, 1989)

Escherichia coli je gramnegativní bakterie běžně se vyskytující u většiny teplokrevných živočichů. Přenáší se alimentární cestou. Její detekce ve vodě znamená fekální znečištění vody. Způsobuje prudká průjmová onemocnění a infekci močových a žlučových cest. Původcem jsou toxiny, které fungují podobně jako u *Shigelly*. (Havlík, 1990)

Clostridium botulinum je grampozitivní tyčinka, za určitých podmínek sporulující. Je saprofytem trávicího traktu domácích zvířat, u člověka se nevyskytuje. (Bednář, 1996)

Bakterie produkuje neurotoxický botulotoxin, (tzv. klobásový jed) který je silně jedovatý. K nákaze dochází většinou alimentární cestou nebo při infekci otevřené rány, méně častěji respirací. U kojenců možná infekce včelím medem. Mezi příznaky otravy patří rozšíření zornic, pocení, zvracení, průjem. Při postižení centra dechu a srdeční činnosti je člověk přímo ohrožen na životě. (Seidl a Obenberger, 2004)

Aeromonas je gramnegativní pohyblivá tyčinka. Vyskytuje se ve vodě, rybách, mléce nebo zelenině. Způsobuje mírné průjmy, extraintestinální infekce nebo onemocnění podobné choleře. (Bednář, 1996)

Pseudomonas jsou gramnegativní, nesporeující pohyblivé tyčinky, často tvořící biofilm. Jsou schopny růstu i za nízkých teplot a nestandardních podmínek, takže mohou být všudypřítomné. K hojnému výskytu dochází při kažení vajec, mléka nebo masa, včetně rybího. Vyvolávají záněty průdušek, plic, kožní infekce a záněty urogenitálního traktu. (Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases 4th Edition)

2.6 Možnosti chlazení

K základním činitelům v chladírenských procesech je relativní vlhkost vzduchu v chladírenských zařízeních. V momentě, kdy napětí vodních par ve vzduchu je vyšší než napětí vodních par ve skladovaných produktech, dochází k přechodu vzdušné vlhkosti do potravin a naopak. (Steinhauser, 1995)

Dalším důležitým jevem je proudění vzduchu. Jeho primárním úkolem je výměna teplého vzduchu za studený a úprava relativní vzdušné vlhkosti. (Vácha a Buchtová, 2005)

2.7 Chlazení ledem

Proces uchování ryb na ledu se praktikuje již několik tisíc let. Jeho použitím a následným odtáváním nedochází k osychání povrchu rybího masa a ztrátě na hmotnosti. K nevýhodám tohoto způsobu patří možnost vyplavení pigmentu z žaber a kůže ryb a také odplavení minerálních látek a vitamínů. (Vácha a Vejsada, 2013)

Výhoda chlazení ledem spočívá v dostupnosti suroviny na jeho výrobu, snadnosti výroby a jedná se také o snadno přenosnou metodu. Navíc při výrobě ze zdravotně nezávadné vody jde o bezpečnou potravní složku. (Kvalita a kvalitativní změny u čerstvých ryb, 1995)

Led musí být vyroben z vody, která splňuje požadavky pitné vody. Vyrábí se v výrobních v různých formách. Pro uchování rybího masa se nejčastěji používají šupinky, vločky, plátky kostky, duté válečky a drcený led. Navíc mezi ledem vyrobeným ze sladké vody a ledem z destilované vody není žádný vliv na kvalitu skladovaných ryb. (Vácha, 2000)

Kromě nejčastěji využívaného šupinkového ledu, který zabraňuje mechanickému poškození pokožky ryb se využívá zejména při mořském rybolovu technologie RSW (chlazené mořské vody). Je to hojně využívaný způsob chlazení, který spoří čas a prostor a je proto ekonomicky výhodný. Podobný způsob využití má také tzv. ledová kaše, neboli tekutý led. (Šilhánková, 2002)

2.8 HACCP

Zkratka HACCP neboli analýza rizika a stanovení kritických kontrolních bodů (Hazard Analysis and Critical Control Point) je označení systému, jehož kvalifikované používání vede k minimalizaci, případně až k vyloučení možných onemocnění či zdravotních poškození konzumentů potravin. HACCP uděluje povinnost provozovateli zajistit

bezpečnost potravin v průběhu celého řetězce, tzn. ve výrobě, přípravě, skladování, přepravě a uvádění do oběhu. Provozovatel potravinářské podniku musí mít vytvořený a zavedený jeden nebo více stálých postupů vycházející ze zásad systému analýzy rizika. (Ministerstvo zemědělství, 2009)

Analýza rizika je proces skládající se ze tří vzájemně propojených částí:

- hodnocení rizika,
- řízení rizika,
- sdělování o riziku.

Kdy se rizikem rozumí: „míra pravděpodobnosti nepříznivého účinku na zdraví a závažnosti tohoto účinku, vyplývající z existence určitého nebezpečí“. PPP (provozovatel potravinářského podniku) dále stanovuje kritické body (technologické úseky), kde se nachází největší pravděpodobnost kontaminace potravního řetězce, ať již mikrobiologická, chemická či fyzikální. Kritické body se identifikují, vyhodnocují, kontrolují a evidují. Systém se řídí zásadami správné výrobní a hygienické praxe, také podléhá verifikaci a validaci s následnou aktualizací. Osvědčeným nástrojem efektivity systému HACCP jsou interní a externí audity.

Z nařízení č. 852/2004 vyplývá 7 zásad systému HACCP:

1. Identifikace všech rizik
2. Identifikace kritických kontrolních bodů
3. Stanovení kritických limitů
4. Stanovení a použití účinných monitorovacích postupů
5. Stanovení nápravných opatření
6. Stanovení pravidelně prováděných postupů k ověřování účinného fungování předchozích opatření
7. Vytvoření dokladů a záznamů. (Ministerstvo zemědělství, 2009)

3 STAŘENÍ A FERMENTACE MASA

Staření masa je přirozený proces zrání masa ke kterému dochází chemicko-biologickými procesy, díky látkám obsaženým v samotném mase. Snahou staření je zabránit napadení masa cizími látkami, zejména pak plísněmi.

Staření probíhá dvěma způsoby, a to mokrou a suchou cestou. Suchá cesta zahrnuje zrání v chladicí skříni s řízenou teplotou a vlhkostí vzduchu. Díky úbytku vody dochází k úbytku na váze a tím dochází k nárůstu ceny produktu. Naproti tomu mokrý způsob spočívá v uložení masa do vakuově uzavřených obalů a uchování v chladu. Díky tomu nedochází k úbytku vody a tím ke ztrátě hmotnosti. Výsledná chuť a vůně je mírně nakyslá, i přesto však výrazně rozdílná oproti čerstvému masu. (Sitz, et al., 2006)

3.1 Fermentace

Fermentace je řízený proces, kdy díky ušlechtilé plísni dochází k přeměně složitých bílkovin na jednodušší formy a mění se také organoleptické vlastnosti potraviny. Fermentují se zejména sacharidy, ale také dochází ke štěpení bílkovin a tuků. (Sandor, 2012)

Fermentované rybí produkty mají mimo Asii malý význam. Považují se však za analogy evropských fermentovaných produktů, např. masných výrobků, za použití bakterií produkujících kyselinu mléčnou.

Nicméně zejména v severských zemích se můžeme setkat s fermentovanými výrobky podobnými s těmi asijskými, např. rakørret, nebo surstrømming. Jsou sice s menším obsahem soli, ale v jejich popisech výroby se můžeme často setkat s přidavkem syrovátky, cukru nebo mouky. (Riddervold, 1990)

3.1.1 Technologie fermentace masných tepelně neopracovaných výrobků

Fermentace popisuje děje, které probíhají v díle pomocí enzymů především mikrobiálních. Výsledkem těchto biochemických reakcí je tvorba látek, které ovlivňují proces postupné přeměny díla ve finální produkt. Sušení je proces, při kterém dochází k odstranění vody z díla. Zrání jsou hromadné procesy probíhající při umístění díla do zracích klimatizovaných komor. Probíhají zde současně jak sušení tak fermentační a oxidační reakce, jež dávají finálnímu produktu jeho specifické vlastnosti. (Kameník, 2012)

Dnes se tyto výrobky rozlišují na dvě skupiny a sice na fermentované výrobky s vysokou hodnotou pH a výrobky s nízkou hodnotou pH.

Výrobky s vysokou hodnotou, pod pH 5, jsou konzervovány především sušením. Doba jejich výroby je dlouhá, často i několik měsíců. Jejich chuť je však plnější a aromatictější. K tomu dochází díky odbourávání nejen sacharidů, ale také tuků a bílkovin. (Pipek, 1998)

Výrobky s nižší hodnotou pH potřebují přídavek sacharidů a startovacích mikrobiálních kultur do díla. V České republice se vyrábějí nejčastěji produkty o pH 5,1-5,3. (Kameník, 2012)

4 ASPERGILLUS ORYZAE

Aspergillus oryzae, česky *Kropidlák rýžový* je kulturní plíseň, která v teplém a vlhkém prostředí roste tradičně na rýži a dalších obilovinách nebo luštěninách. Řadí se mezi nejdéle používané mikroorganismy vůbec. Zejména v Japonsku východních částech Asie. *Aspergillus oryzae* produkuje enzymy, které rozkládají škroby na jednoduché cukry, tuky na mastné kyseliny a bílkoviny na jednotlivé aminokyseliny. Tím dochází k výrazné změně organoleptických vlastností a ke zlepšení stravitelnosti. Vhodnější je fermentace za sníženého přístupu zejména bílého světla, které potlačuje konidiaci. (Hatakeyama et al., 2014)

4.1 Enzymy

Enzymy jsou užitečné biokatalyzátory pro různé průmyslové procesy a chemické reakce za mírných podmínek s vysokou selektivitou. Kromě toho bývají enzymy aplikovány také v oblasti životního prostředí a biotechnologiích na komerční úrovni. V těchto oborech mají lipázy významný okruh využití. Různé mikroorganismy, včetně *Aspergillus oryzae* produkují různé druhy lipáz. (Priji et al., 2016)

Pokrok v biotechnologii poskytuje více příležitostí pro vývoj enzymů, které splňují požadavky na odbourávání nežádoucích látek. Z hydrolytických lipáz se triacylglyceroacylhydroxylázy, vyznačují jedinečnou schopností emulgovat substrát a hydrolyzovat glyceridy na volné mastné kyseliny a glyceroly. Díky těmto schopnostem má tento enzym široké uplatnění v řadě postupů pro syntézu.

Enzym alfa-amyláza je zodpovědný za štěpení škrobu na jednodušší cukry. Stejný enzym také produkuje také slinivka břišní nebo slinné žlázy.

β -N- acetylhexosaminidáza je enzym stabilní v širokém spektru teplot a hodnot pH. Mají schopnost některé cukry syntetizovat.

Celulázy a proteázy významné při zpracování škrobu, používané hojně v pekárenském průmyslu.

Mimoto je *Aspergillus oryzae* schopen produkce kombinantních lipáz, které se využívají jako detergenty. (Malíř a Ostrý, 2003)

Extracelulární hydrolázy jsou zodpovědné za proces fermentace. Jsou specifické pro *Aspergillus oryzae*, nikoli pro ostatní rody *Aspergillus*. (Fujino, Kawahara a Shirasawa, 2022)

4.2 Komekoji

Komekoji, což je výraz pro rýži naočkovanou spórami *Aspergillus oryzae* se vyrábí ve sterilním prostředí. *Aspergillus oryzae* není totiž agresivní a tak se snadno může infikovat jinými mikroorganismy, které by mohly mít inhibiční účinek. Proto se výchozí substrát před naočkováním praží za vysokých teplot. Rýže se poté uvaří a nechá vychladit při pokojové teplotě. Následně dojde k naočkování spórami. Ideální kultivace probíhá při teplotách kolem 30° C a relativní vlhkosti 75 %. Minimální doba kultivace je 48 hodin. Poté dojde k vysušení rýže a zastavení fermentace. Takto připravená rýže se pak používá jako nosič inokula. (Sandor, 2012)

4.3 Ušlechtilá plíseň

Maso, které bude fermentováno, se obalí v nosiči ušlechtilé plísně a poté se nechá fermentovat. V našem případě bude maso inokulováno spórami plísně *Aspergillus oryzae*. Jako nosič *Aspergillus oryzae* se používá kulatozrná rýže. Rýže je nejprve nasladována a poté je proces zastaven vysušením.

Po přidání masa, které bude fermentováno, dojde ke zvýšení aktivity vody v rýži a proces fermentace se znovu rozběhne. V nasladované rýži jsou obsaženy identické enzymy jako v mase, ale v mnohonásobném množství. (Ústav molekulární genetiky, 2020)

4.4 Bezpečnost *Aspergillus oryzae*

Invazivní růst nebo systémové infekce *Aspergillus oryzae* u zdravých lidí nebyly nikdy hlášeny. V několika případech však byly izoláty identifikované jako *Aspergillus oryzae* získány od oslabených pacientů. *Aspergillus oryzae* má proto nízký patogenní potenciál, ale stejně jako mnoho jiných neškodných mikroorganismů může za výjimečných okolností růst v lidské tkáni. Alergická onemocnění primárně způsobená *Aspergillus oryzae* byla hlášena v několika případech, ale pravděpodobně předpokládají jak citlivost k alergickým reakcím, tak masivní expozici konidiím inhalací. *Aspergillus oryzae* neprodukuje aflatoxiny ani jiné rakovinotvorné metabolity.

Nepřítomnost významného množství mykotoxinů v průmyslových výrobcích je pravidelně kontrolována. *Aspergillus oryzae* proto považujeme za vynikajícího hostitele pro bezpečnou produkci neškodných produktů rekombinantními kmeny. (Barbesgaard, Heldt-Hansen a Diderichsen, 1992)

4.5 Další využití fermentace

4.5.1 Sójová omáčka

Výroba sójové omáčky má dva možné způsoby výroby. První způsob je pomocí chemické hydrolýzy. Doba její výroby je krátká a obsahuje přídatné látky. Druhým způsobem je fermentační proces. Tento postup trvá několik měsíců, což se projeví na jeho ceně. Výrobek neobsahuje přídatné látky.

4.5.2 Miso pasta

Miso pasta je fermentovaný výrobek ze sójových bobů, ke kterým se může přidat část ječmene, pšenice, luštěnin nebo rýže. Je možné přidat i jiné složky obsahující sacharidy. Miso pasta má široké využití nejen v asijské kuchyni.

4.5.3 Sake

Sake, nápoj vyrobený několikanásobnou fermentací z obroušených rýžových zrn, která se následně infikují plísní koji a nechá se kvasit, podobně jako pivo. (Kindersley, 2007)

4.5.4 Mirin

Mirin, je sladký druh vína s vyšším obsahem cukru, používající se také jako koření nebo k výrobě Teriyaki omáčky. Rýžový ocet, fermentovaný výrobek, vyznačuje se vyšší sladkostí a jemnější kyselou chutí. Široké použití zejména při výrobě sushi, ale také ochucení salátů nebo nakládání zázvoru. (Shimbo, Hiroko; Shimbo Beitchman, Ming Tsai.)

4.5.5 Tempeh

Tempeh, uvařené sójové boby, naočkované plísní *Aspergillus oryzae*, která jimi prorůstá za současného spojení a ztvrdnutí jednotlivých bobů. (Liem, Steinkraus a Cronk, 1977)

5 METODY STANOVENÍ AMONIAKU

Amoniak je základním ukazatelem čerstvosti masa. Jeho zvyšující se obsah je nežádoucí z hlediska jakosti a nezávadnosti masa.

5.1 Stanovení amoniaku podle Conwaye

Tato metoda se využívá nejčastěji pro stanovení amoniaku v mase nebo masovém výluhu. Amoniak je pomocí nasyceného roztoku uhličitanu draselného vytěsněn z masového výluhu a je jímán do kyseliny borité ve které je po třech hodinách titrován roztokem kyseliny sírové. K přednostem této kvantitativní analytické metody patří snadná příprava vzorků formou masových výluhů, snadné provedení s využitím kvantitativní analýzy titrační metodou a snadný výpočet k získání výsledků obsahu amoniaku. (Velíšek a Hajšlová, 2009)

5.2 Stanovení amoniaku pomocí ISE

Stanovení pomocí ISE (iontová selektivní elektroda) se zakládá na vytěsnění amoniaku z masového výluhu pomocí silné zásady. V závislosti na koncentraci vytěsněného amoniaku dojde ke změně potenciálu skleněné elektrody. Poté se metodou kalibrační přímky vyhodnotí potenciály vzorků a vypočítá koncentrace amoniaku.

(Velíšek a Hajšlová, 2009)

5.3 Stanovení amoniaku pomocí Nesslerova činidla

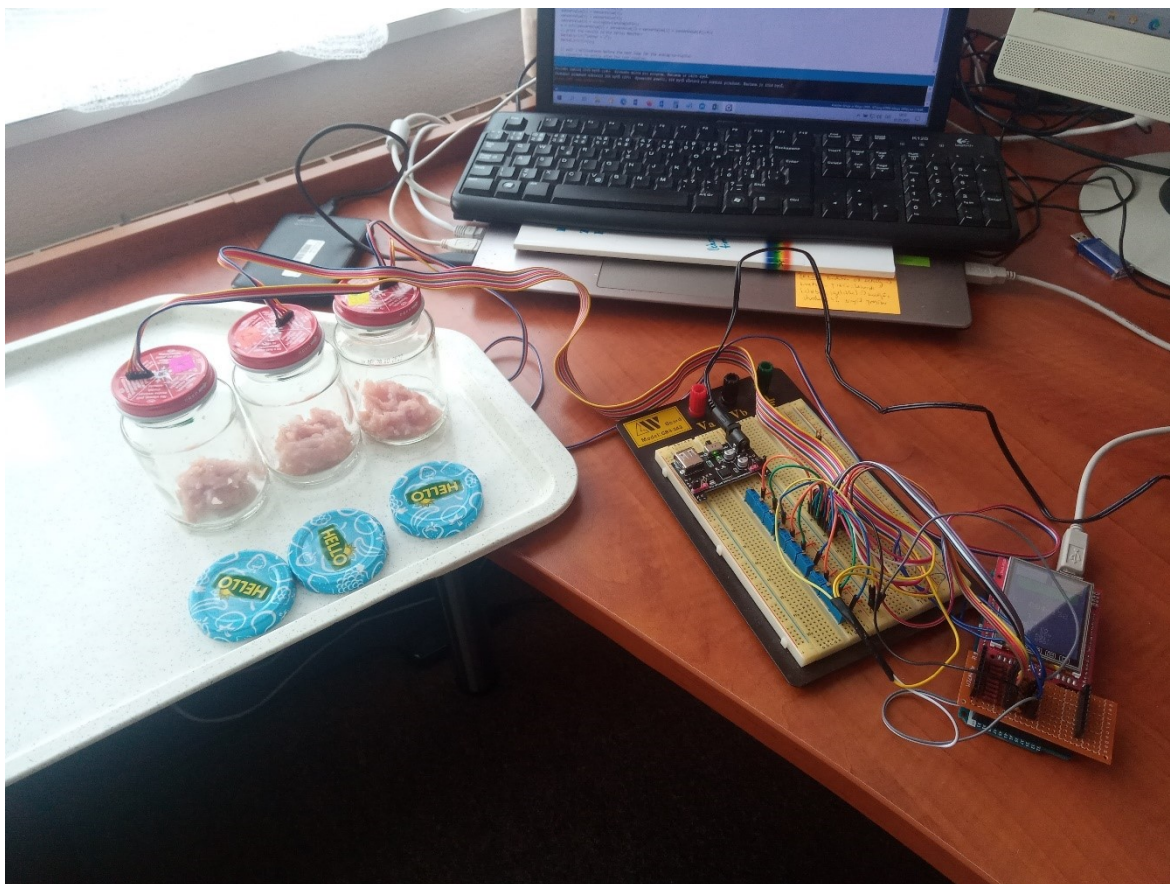
S využitím Nesslerova činidla je možné kvalitativně stanovit obsah amoniaku ve vzorku. Nesslerovo činidlo je roztok tetrajodortuřnatanu draselného v hydroxidu draselném. Je-li v analyzovaném vzorku přítomen amoniak, dojde při reakci s Nesslerovým činidlem ke změně barvy a k tvorbě zákalu či sraženiny. Produktem chemické reakce je tetrajodortuřnatan amonný. Podle výsledného množství použitého Nesslerova činidla a množství a hustotě sraženiny lze zařadit maso dle čerstvosti (čerstvé, počínající rozklad a zkažené). (Velíšek a Hajšlová, 2009)

fyziky, který se zabývá procesy a vlastnostmi látek a polí spojených s teplem a tepelnými jevy. Termodynamika zkoumá vzájemné vztahy mezi veličinami a změny těchto veličin při fyzikálních dějích obvykle spojených s výměnou tepla s okolím soustavy.

(Leitner a Voňka, 1997)

5.4 Elektronický nos

Detekce čichových vjemů funguje na schopnosti čichových epitelů rozeznat různé pachy a mozek je pak schopen určit typ pachu. V elektronickém nosu jsou epitely nahrazeny citlivými senzory, které reagují na kontakt s těkavými látkami elektrickou změnou. (Senzory, 2007), (Veda a technika, 2016)



Obrázek 2: Elektronický nos

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL PRÁCE

Tato diplomová práce sledovala hypotézu pojednávající o možnosti monitoringu změn vlastností analyzovaného vzorku v průběhu fermentačního procesu pomocí experimentálního elektronického zařízení s kombinovaným senzorickým systémem a využití mikrobiologického stanovení pro určení bezpečnosti konzumace.

Hlavním cílem práce bylo otestovat možnost sledování průběhu fermentace rybího masa pomocí experimentálního elektronického zařízení s kombinovaným senzorickým systémem. Jedním ze senzorů byl plynový senzor pro stanovení obsahu uvolněného amoniaku v prostoru nad vzorkem. Součástí tohoto cíle bylo porovnání získaných výsledků s klasickou analytickou metodou stanovení amoniaku ve vzorku. Dalším cílem bylo provedení mikrobiologické analýzy vzorku při fermentačním procesu, z důvodu určení bezpečnosti konzumace.

6.1 Úvod do měření

Hlavním cílem měření bylo získat první informace o možnosti sledování změn rybího masa při jeho fermentaci pomocí experimentálního elektronického zařízení s kombinovaným senzorickým systémem. Hlavním sledovaným parametrem byla koncentrace amoniaku. Součástí tohoto měření bylo porovnání získaných výsledků s klasickou analytickou metodou stanovení amoniaku ve vzorku. Dalším cílem bylo provedení mikrobiologické analýzy vzorku při fermentačním procesu z důvodu určení bezpečnosti při konzumaci.

6.2 Materiál

Losos atlantský a pstruh lososovitý byly použity jako základní materiál (rybí maso) pro měření. Obě rybí masa byla zakoupena v běžném supermarketu jako čerstvé a vakuově balené. Základní údaje a úpravy obou materiálů jsou uvedeny níže:

- Losos atlantský
 - o Chlazený filet s kůží
 - o Datum spotřeby: 15.4.2022
 - o Výrobce: Blue Bay
 - o Úprava: Filet z lososa atlantského s kůží byl nakrájen na menší kostky, smíchan s Komekovi sušenou (Kojibakers, Otročiněves, ČR) a uložen v mrazícím boxu (-18 °C) do

doby provedení měření. Před prvním měřením byl vzorek ponechán krátce při pokojové teplotě a následně bylo do dvou měřicích skleniček s uzávěrem naváženo na kuchyňské váze 10 g vzorku s přesností 1 g.

- Pstruh lososovitý růžovomasý (*Oncorhynchus mykiss*)
 - o Chlazený filet s kůží
 - o Chov: Dánsko FR027.
 - o Kategorie lovného zařízení: Kruhové zátahové sítě a čeřeny
 - o Šarže: L022122
 - o Datum spotřeby: 20.04.2022
 - o Výrobce: Bidfood Kralupy, s.r.o., Kralupy nad Vltavou, Česká republika, CZ 9826 ES
 - o Úprava: Filet z pstruha lososovitého byl zbaven kůže, maso bylo natrháno na malé kousky, smícháno se sušenou Komekoi (Kojibakers, Otročiněves, ČR) a naváženo na kuchyňské váze do šesti měřicích skleniček s uzávěrem 10 g vzorku s přesností 1 g.

6.3 Použité přístroje a zařízení využitě při měření pachů

Pro měření pachů byl použit experimentální elektronický nos s jednočipovým mikrokontrolérem (MICROCHIP ATMEL, ATmega2560) využívající kombinované senzory MiCS-6814 (SGX Sensortech), jehož základní popis je uveden v práci Hrabová (2021). Programové vybavení zařízení však bylo modernizováno a rozšířeno o základní nastavení počáteční hodnoty rozsahu.

V rámci této práce byly dále použity pro měření pachů následující přístroje a zařízení:

- detektor čerstvosti masa PERES, V2.0 (FOODSniffer, Redwood City, CA),
- kuchyňská váha (President, Tescoma, 5kg/1g);
- chladnička (Whirpool);

7 METODIKA

Analýza fermentačního procesu rybího masa pomocí experimentálního elektronického nosu proběhla ve dvou krocích. V první etapě měření byla otestována nová metodika měření fermentovaného rybího masa pomocí experimentálního elektronického nosu. V této části bylo použito rybí maso lososa atlantského. Vzorky byly umístěny do skleněných nádobek o objemu 150 ml s uzavíratelným víčkem a umístěny v lednici (2-6 °C) a při pokojové teplotě na temném místě (skříňka na potraviny). Měření probíhalo ráno do úrovně zkažení vzorku, které se projevovalo silným zápachem.

Měření na experimentálním elektronickém nosu probíhalo v následujících krocích:

- 1) kalibrace senzorů na vzduchu po dobu 15 minut
- 2) otevření nádobek a vložení měřících čidel
- 3) vlastní měření po dobu 10 minut
- 4) vytažení čidel z nádobek a jejich vyvětrání na čerstvém vzduchu minimálně po dobu 10 minut, uzavření nádobek víčkem
- 5) 2x opakování bodů 2 až 4
- 6) záznam dat z paměťové karty, kde byl uložen pod specifickým kódem do MS Excel, nebo přímé kopírování dat ze specializovaného programu (sériový monitor) přímo do MS Excel
- 7) zpracování dat pomocí software MS Excel

Postupně byly vyřazeny vzorky se silným zápachem nebo vzorky s velkou změnou odezvy senzoru na uvolněný amoniak v prostoru nad vloženým vzorkem rybího masa (zabránění poškození čidla vysokou koncentrací amoniaku).

V druhé části měření bylo připraveno 6 vzorků ze pstruha lososovitého. Vzorky byly měřeny dopoledne po dobu pěti dní při pokojové teplotě po dobu cca 2 hodiny. Mimo měření byly všechny vzorky uchovávány v lednici. Jednotlivé kroky postupu byly stejné jako v první části.

Obdobný postup byl použit i pro měření s detektorem čerstvosti masa PERES.

7.1 Metodika pro stanovení amoniaku analytickou metodou

STANOVENÍ AMONIAKU V MASE SPEKTROFOTOMETRICKY

Princip:

Amoniak tvoří s Nesslerovým činidlem intenzivně zbarvený komplex, který se stanoví spektrofotometricky.

Chemikálie a roztoky:

- kyselina trichloroctová, CCl_3COOH 20%
- Nesslerovo činidlo (alkalický roztok $[\text{HgI}_4]^{2-}$)
- standardní roztok chloridu amonného, NH_4Cl $c = 3,1411 \text{ g/l}$

Přístroje a pomůcky:

- mlýnek na maso
- mixér
- váhy
- spektrofotometr
- sklo; filtrační papír

Postup:

Maso pomeleme a navážíme 10,0 g. Zhomogenizujeme v mixeru s 80 ml destilované vody. Přelejeme do kádinky, mixer vypláchneme 20 ml destilované vody a přidáme k ostatnímu. Potom homogenát vyčeříme 60 ml 20% kyseliny trichloroctové. Zamícháme a necháme 10 min stát. Poté roztok zfiltrujeme nejprve přes vatku a podle potřeby přes střední filtrační papír do 200 ml odměrné baňky. Za promývání filtru destilovanou vodou doplníme baňku po rysku. Ke stanovení napipetujeme 2 ml filtrátu do 50ml odměrné baňky, přidáme 10 ml destilované vody, 5 ml Nesslerova činidla, promícháme a doplním destilovanou vodou po rysku.

Měření se provede na Spekolu při vlnové délce 400 nm, proti kompenzačnímu roztoku, připravenému z 5 ml Nesslerova činidla a 45 ml destilované vody.

7.1.1 Zhotovení kalibrační křivky

Zásobní standardní roztok NH_4Cl se naředí 100 krát, tzn., že v 1 ml tohoto naředěného standardu je obsažen 0,01 mg NH_3 . Kalibrační křivku zhotovíme z 5 roztoků získaných ředěním od 0,5 – 7 ml tohoto pracovního standardu do 50 ml odměrných baněk. Po přidání 10 ml destilované vody vybarvíme roztoky stejným množstvím Nesslerova činidla jako u vzorku. Doplníme destilovanou vodou opět po rysku.

Výpočet:

Vyhodnocení se provede pomocí kalibrační křivky a přepočítá se na (mg/kg) amoniaku v mase.

7.2 Metodika pro stanovení mikrobiálního rozboru

Metody stanovení:

Celkový počet mikroorganismů – ISO 4833:2013

Stanovení celkového počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů Celkový počet mikroorganismů (CPM) byl stanoven podle normy ČSN EN ISO 4833. Kultivační půda PCA je neselektivní médium a slouží ke stanovení celkového počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů. Podle této normy bylo naváženo 5 g vzorku rybího masa, který byl zředěn devítinásobkem sterilního fyziologického roztoku. Takto připravená směs, byla zhomogenizována a tím bylo získáno 0.ředění. Poté se připravilo příslušné desítkové ředění (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}) do předem připravených sterilních zkumavek se 4,5 ml fyziologického roztoku. Očkování se provádělo roztěrem 0,1 ml vzorku na sterilní Petriho misku s připravenou půdou PCA. Vždy bylo provedeno osmi desítkové vhodné ředění a očkováno na čtyři Petriho misky. Kultivace byla provedena při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin

7.2.1 Složení jednotlivých živných půd a příprava ředícího roztoku

Koliformní bakterie – ISO 4832:2006

Ke stanovení jednotlivých mikrobiologických parametrů byly využity různé typy živných půd. Pro stanovení celkového počtu mezofilních mikroorganismů byla v práci využita živná půda PCA (Plate Count Agar) firmy Hi Media Laboratories Pvt. Ltd., Indie. Dehydratovaná půda o hmotnosti 20,5 g byla rozpuštěna v 1000 ml destilované vody. Připravená živná půda byla následně promíchána a sterilizována postupem uvedeným níže.

Stanovení počtu koliformních bakterií bylo provedeno pomocí živné půdy VRBA (Violet Red Bile Agar) vyrobené firmou Hi Media Laboratories Pvt. Ltd., Indie. 38,5 g dehydratované půdy bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Půda byla následně promíchána a sterilizována.

Ke stanovení počtu mléčných bakterií (především rodu *Lactobacillus*) byla použita živná půda MRS Agar (De Man Rogosa Sharpe Agar) společnosti Oxoid Ltd., Velká Británie. Podle návodu bylo rozpuštěno 55,15 g dehydratované půdy a 15 g agaru v 1000 ml destilované vody. Připravená živná půda byla následně promíchána a sterilizována.

Poslední živnou půdou byla půda CHYGA (Chloramfenicol Yeast Glucose Agar) společnosti Oxoid Ltd., Velká Británie, která byla využita ke stanovení kvasinek a plísní. 40 g této dehydratované půdy bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Půda byla následně promíchána a sterilizována.

Sterilizace všech živných půd proběhla v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut. Po ochlazení byly sterilní živné půdy rozlity do sterilních Petriho misek a po ztuhnutí uchovány v lednici dnem vzhůru.

Pro přípravu 1000 ml ředícího roztoku PPS (Physiological Peptone Solution) byl použit 1 g peptonu (Hi Media Laboratories Pvt. Ltd., Indie) a 8,5 g NaCl (PENTA, Ing. Petr Švarc, Česká republika). Navážené složky se rozpustily v 1000 ml destilované vody a roztok se nechal sterilizovat v autoklávu při 121 °C po dobu 20 minut.

7.2.2 Zpracování vzorků

U jednotlivých vzorků byla provedena navážka, která byla různá podle velikosti a váhy jednotlivých kusů rybího masa. Následně byla provedena homogenizace, kdy do homogenizačního sáčku byl vložen vzorek rybího masa a 50 ml roztoku PPS. Dále proběhla vlastní homogenizace po dobu 2 minut na homogenizátoru Stomacher (Seward, Velká Británie) a desítkové ředění roztokem PPS, kde homogenizovaný sáček představoval ředění 100 a rozsah ředění byl proveden do ředění 10^{-5} . Z každého ředění se provedlo očkování roztěrem, ve kterém se na příslušnou půdu odpipetovalo 0,1 ml inokula.

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

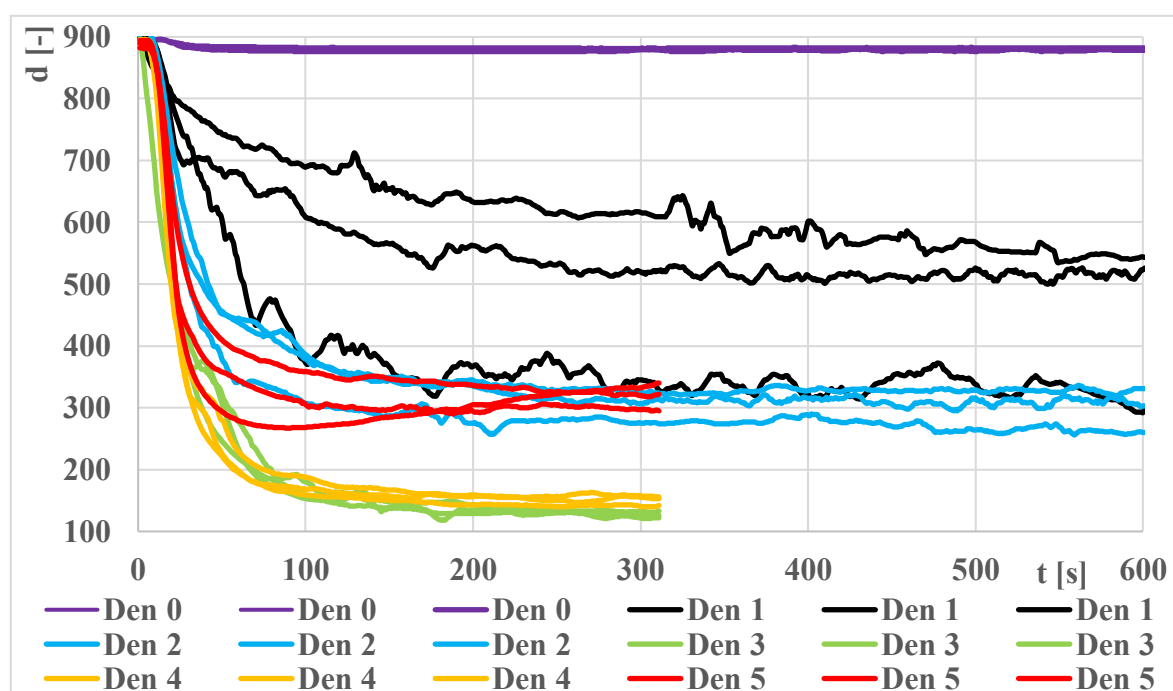
K základnímu měření průběhu fermentace rybího masa byl použit experimentální elektronický nos s kombinovaným senzorem MiCS6814. V první části bylo použito maso z lososa atlantického, které bylo rozděleno na 2 části podle podmínek uchování – lednice a ve skřínce na potraviny. Přestože je senzor MiCS6814 kombinovaný, soustředilo se zaměření v této práci hlavně na měření množství amoniaku v prostoru fermentovaného vzorku rybího masa. Změřené elektrické napětí na citlivé vrstvě senzoru je reprezentováno jednotlivými napěťovými úrovněmi d [-] měřenými a zaznamenávanými pomocí analogově-digitálního převodníku (napětí $U = 0-5$ V odpovídá napěťová úroveň ($d = 0-1023$)). Získaná surová data jsou dále odesílána ze zařízení do počítače pomocí sériového portu, nebo ukládány na paměťovou kartu. Přestože je možné další počítačové zpracování (přepočítání na elektrický odpor citlivé vrstvy RS [Ω]), byla pro vyhodnocení koncentrace amoniaku c_{am} [ppm] použita v první fázi pouze surová data a na rozdíl mezi vzorky bylo usuzováno pouze z těchto surových dat.

Každý den bylo měření provedeno 3x. Příklady získaných charakteristik za všechna měření pro fermentované rybí maso uložené při pokojové teplotě ve skřínce na potraviny jsou uvedené na obrázku 3. U charakteristik byl proveden posun počátku jednotlivých charakteristik přibližně do stejného času pro všechna měření. Protože měření v této etapě bylo pouze orientační s cílem otestovat metodiku měření a byly sledovány pouze relativní změny v koncentracích analytu od počátku vložení z čistého vzduchu do prostředí s fermentovaným vzorkem, bylo možné provést posun počátků také ve vertikální ose Y. V grafu je pak vidět relativní změny (poklesy) výstupního signálu, které odpovídají rozdílu koncentrací amoniaku ve vzduchu a amoniaku nad fermentovaným masem v jednotlivých dnech měření (čím větší pokles, tím větší koncentrace amoniaku).

Nepříjemným jevem bylo přesycení citlivé vrstvy čidla a její ničení vysokou koncentrací analytu, která se začala projevovat přibližně od třetího dne měření opětovným zvyšováním měřeného signálu. V grafu je tento jev zaznamenán např. jako opětovný nárůst v pátý den od začátku měření (označeno červeně). Navíc tento signál nepoklesne ani na odpovídající úroveň (měl by poklesnout nejnižší).

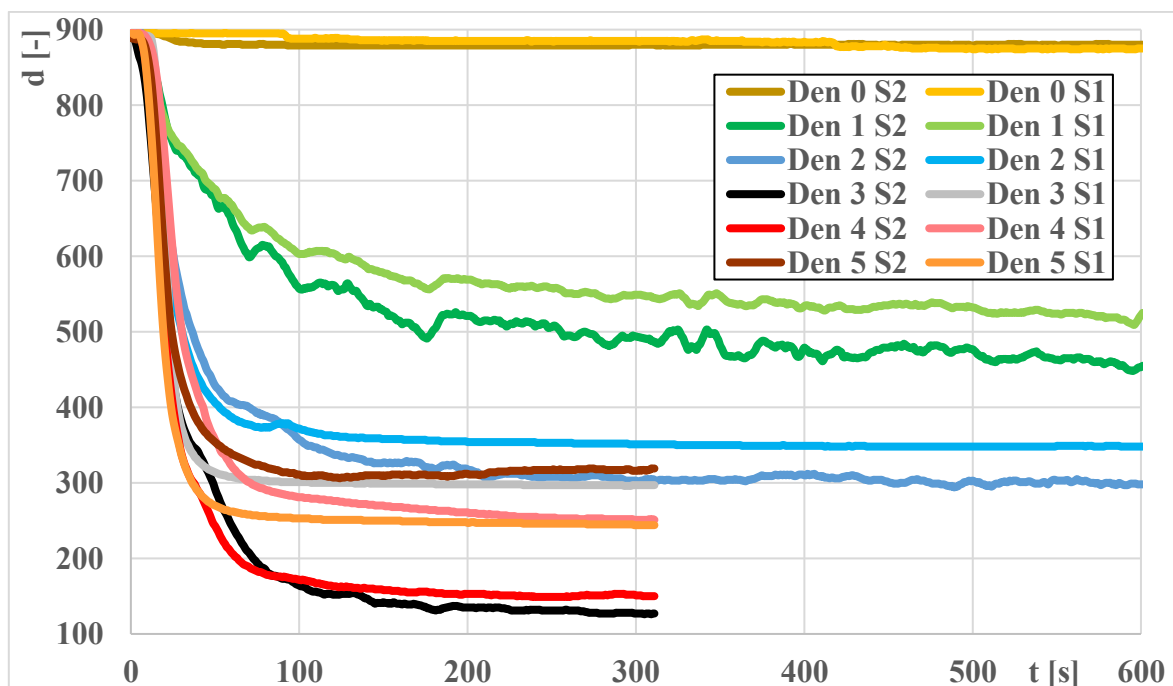
Protože docházelo k přesycení citlivé vrstvy čidla a její ničení vysokou koncentrací analytu, byl čas měření od 3 dne zkrácen na 300 s.

Ze získaných časových charakteristik byly vypočítány průměrné charakteristiky pro daný den a prostředí, ve kterém bylo fermentované maso uchováváno, viz. obr. 4. Na obrázku označuje senzor S1 uchovávání masa v lednici a senzor S2 ve skřínce na potraviny. Z tohoto grafu je vidět rozdíly v koncentracích mezi jednotlivými místy, kdy zpočátku byla vždy stanovena vyšší koncentrace amoniaku ve skřínce na potraviny než v lednici. To je v souladu s teoretickými předpoklady. Pátý den je však již zaznamenán vyšší koncentrace amoniaku v lednici než ve skřínce. To ukazuje na výše zmiňované přesycení senzoru a případně jeho zničení (následné druhé etapě bylo prokázáno, že senzory stanovovaly při tomto měření až několikanásobně vyšší hodnotu, než doporučuje výrobce).

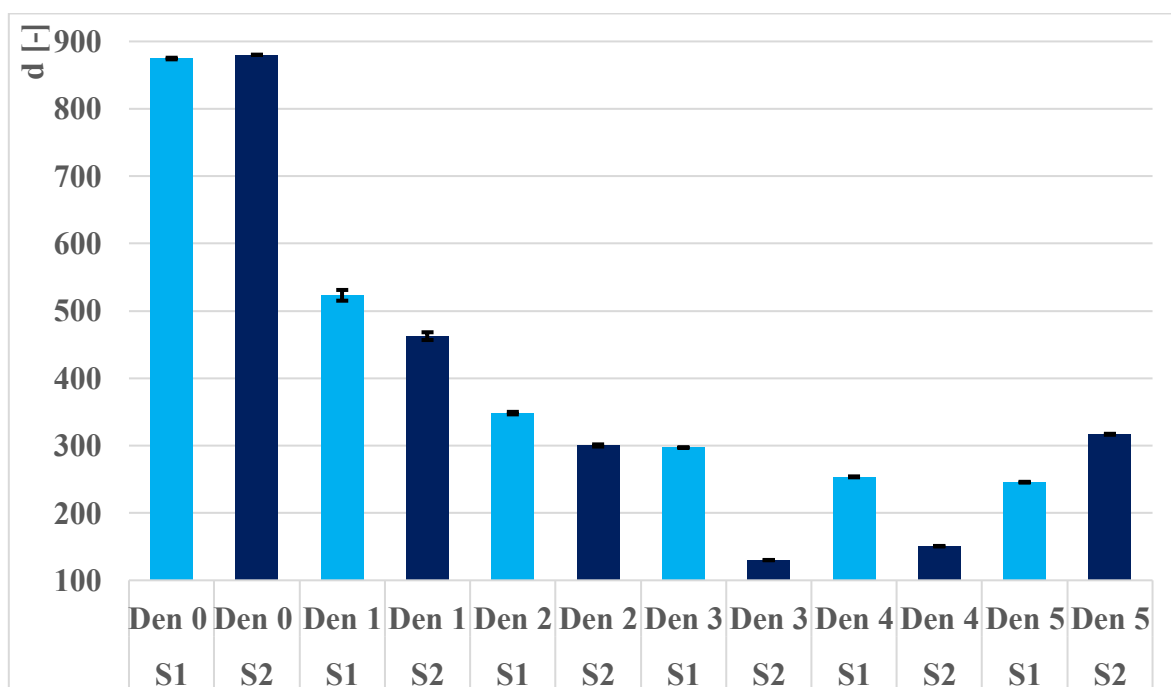


Obrázek 3: Příklad zaznamenaných datových úrovní $d [-]$ u senzoru 2 a vzorku fermentovaného rybího masa uchovávaného při pokojové teplotě ve skřínce na potraviny v jednotlivých dnech měření

Pro lepší názornost byly vždy pro posledních 100 hodnot z každého měření a daného dne spočítána průměrná hodnota, směrodatná odchylka souboru a směrodatná odchylka průměru. Průměrné hodnoty byly vyneseny v grafu na obrázku 5. Z grafu je zřejmý nárůst koncentrace amoniaku v prostoru nad fermentovaným rybím masem (snižuje se úroveň signálu) a rozdíly mezi jednotlivými prostory pro fermentaci masa.



Obrázek 4: Zaznamenané datové úrovně $d [-]$ u senzoru 1 (vzorek v lednici) a senzoru 2 (vzorek ve skřínce) v jednotlivých dnech měření

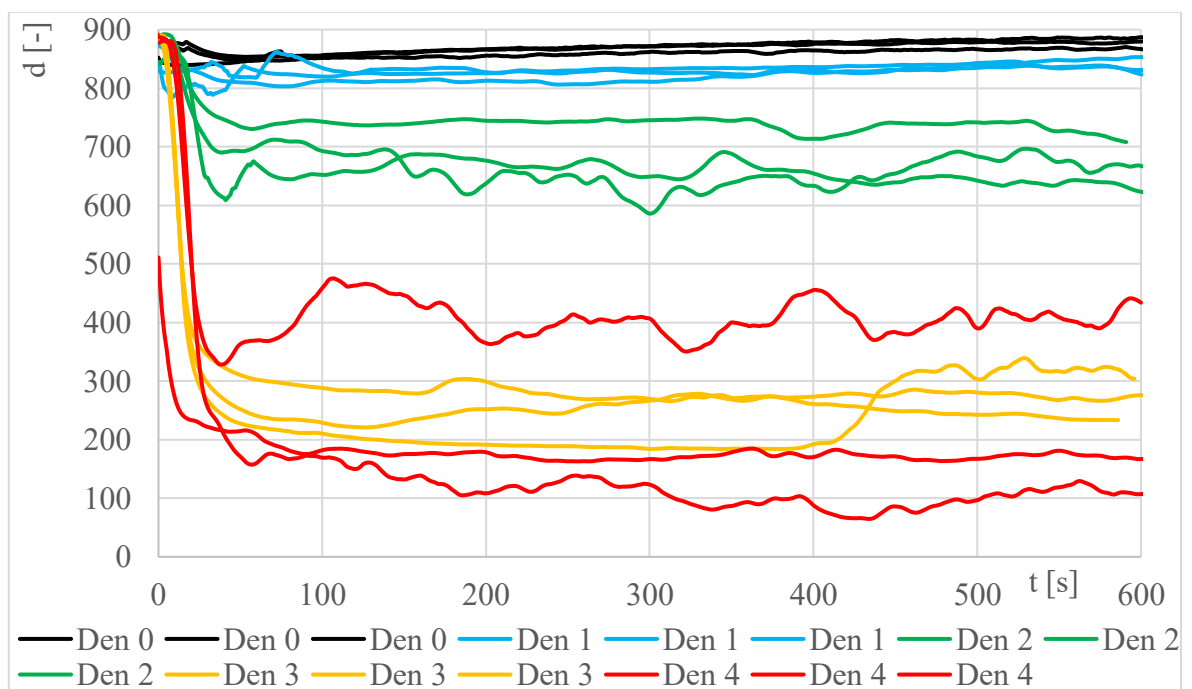


Obrázek 5: Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky průměru datových úrovní pro jednotlivé prostory a jednotlivé dny fermentace. Senzor S1 - vzorek v lednici; Senzoru S2 - vzorek ve skřínce

Pro druhou etapu prací bylo využito šest připravených vzorků, které byly uchovávány v lednici. Z důvodu technické závady na jednom ze senzorů, jejíž příčina byla odhalena až po skončení sledování fermentace masa, nebylo možné výsledky ze vzorků č. 2 a 5 použít

a musely být odstraněny z dalšího zpracování. Protože však bylo možné sledovat fermentaci rybiho masa u dalších 4 vzorků a každý vzorek byl měřen 3x je počet získaných dat pro zpracování dostatečný.

Při měření pomocí experimentálního elektronického nosu se pozornost opět soustředila hlavně na měření množství amoniaku v prostoru nad fermentovaným vzorkem rybiho masa. Po změření elektrického napětí na citlivé vrstvě senzoru byl z napěťových úrovní $d [-]$ vypočítán elektrický odpor $R_s [\Omega]$ citlivé vrstvy. Příklad zaznamenaných datových úrovní $d [-]$ u senzoru 1 a vzorku 1 je ukázán na obrázku 6. Z obrázku je již patrný posuv naměřených hodnot v jednotlivých dnech.

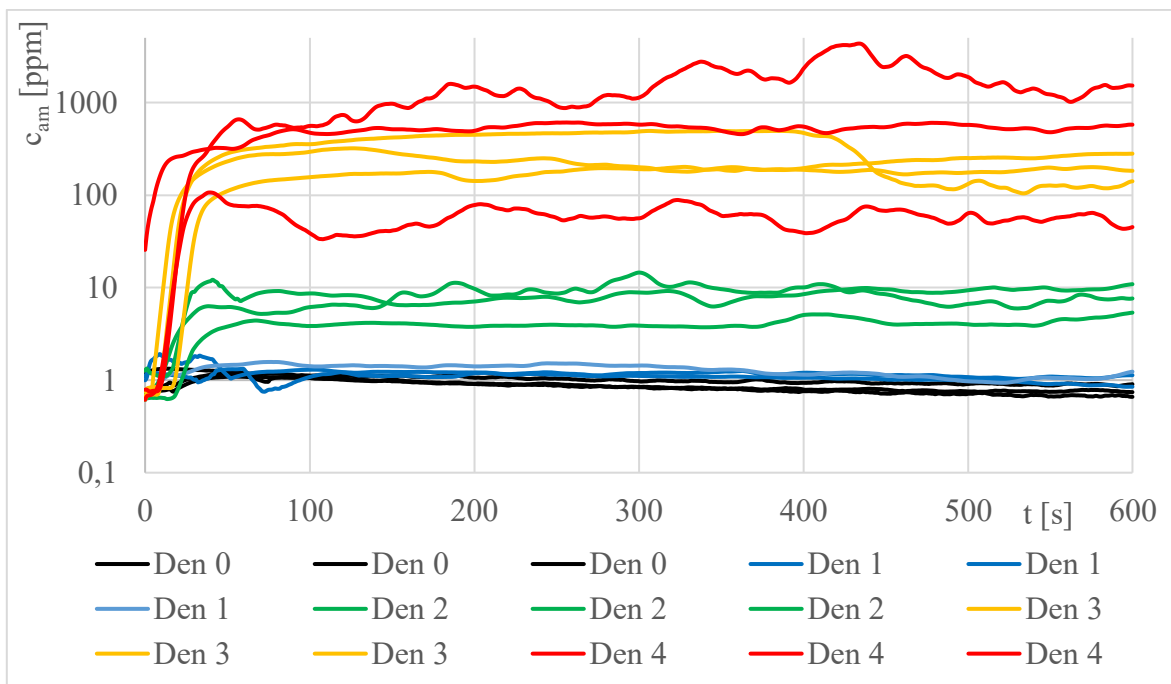


Obrázek 6: Příklad zaznamenaných dat napěťových úrovní $d [-]$ u senzoru 1 a vzorku 1 v jednotlivých dnech měření

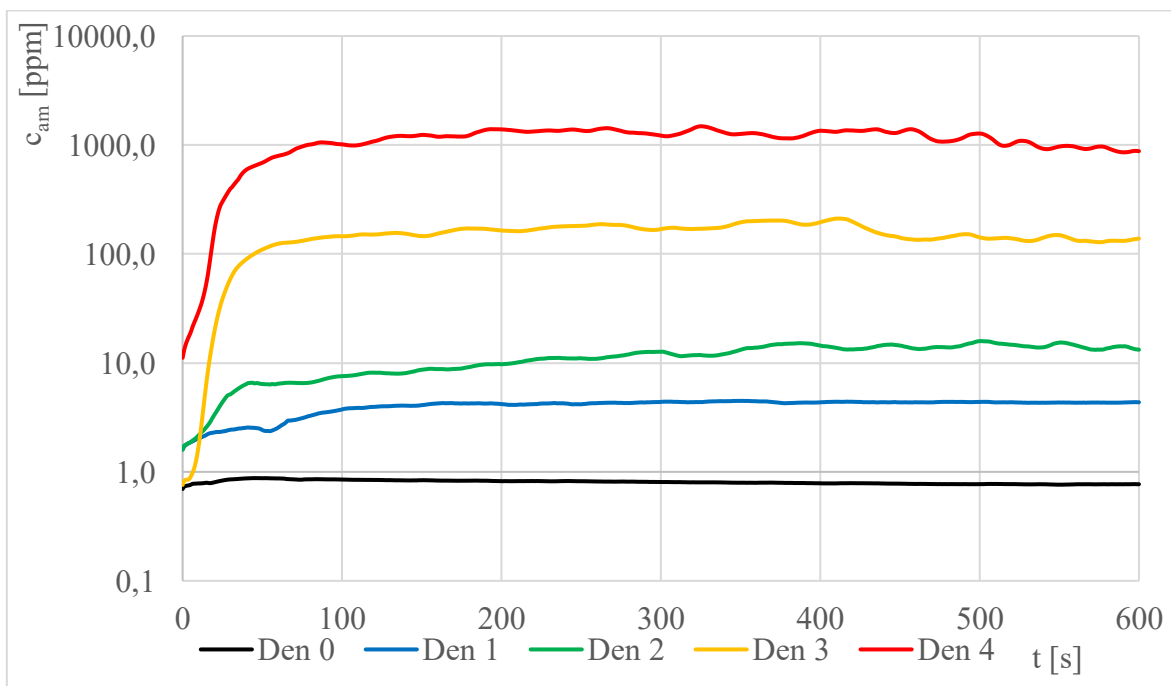
Vypočítaný elektrický odpor $R_s [\Omega]$ byl dán do poměru s odporem citlivé vrstvy v běžném vzduchu $R_0 [\Omega]$. Z tohoto poměru R_s/R_0 byla následně vyčíslena zjišťovaná koncentrace amoniaku $c_{am} [ppm]$, obrázek 7. Rovnice pro vyčíslení koncentrace amoniaku byla použita rovnice podle Nis Wechselberga uvedeného na serveru GitHub, Inc.:

$$c_{am} [ppm] = 0,6151 \cdot (R_s/R_0)^{-1,903}$$

Ze všech vzorků byla pro daný den vypočtena křivka představující průměrné hodnoty, která byla vykreslena do grafu na obrázku 8. Obrázek ukazuje nárůst koncentrace amoniaku v jednotlivých dnech fermentace.



Obrázek 7: Příklad nárůstu koncentrace amoniaku c_{am} [ppm] v jednotlivých dnech fermentace u senzoru 1 a vzorku 1 v jednotlivých dnech měření



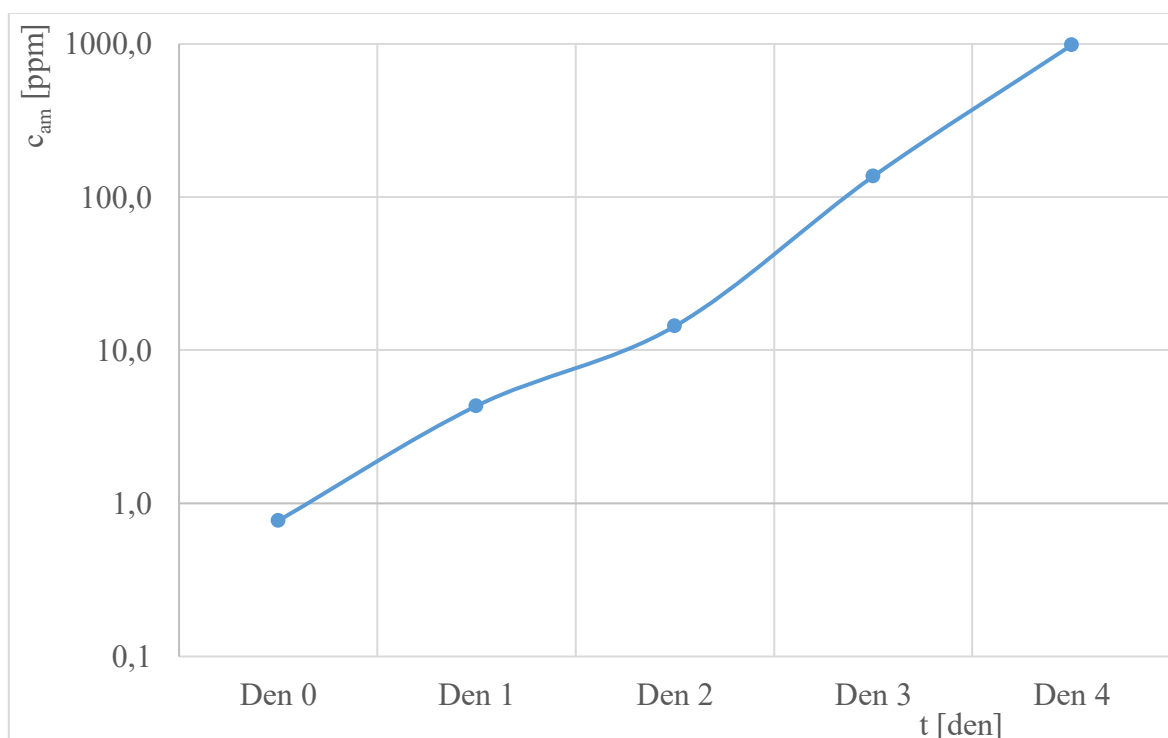
Obrázek 8: Nárůst koncentrace amoniaku c_{am} [ppm] v jednotlivých dnech fermentace. Doba měření 600 s

Pro větší názornost byla z posledních 100 hodnot z každého měření pro daný spočítána průměrná hodnota, směrodatná odchylka souboru a směrodatná odchylka průměru, tabulka 1. Průměrné hodnoty byly vyneseny v grafu na obrázku 8. Odchylku nebylo možné

v grafu dostatečně názorně vyjádřit. Z grafu je zřejmý logaritmický nárůst koncentrace amoniaku v prostoru nad fermentovaným rybím masem.

Tabulka 1: Základní statistické hodnoty koncentrace amoniaku c_{am} [ppm] pro posledních 100 naměřených hodnot a všechny senzory v daný den měření

Statistika	Den 0	Den 1	Den 2	Den 3	Den 4
Průměr	0,7699	4,333	14,35	136,4	980
Směrodatná odchylka souboru	0,0781	3,247	14,55	107,6	1026
Směrodatná odchylka průměru	0,0023	0,094	0,42	3,1	30



Obrázek 9: Graf zvyšování koncentrace amoniaku ve vzduchu nad masem v závislosti na čase

K měření průběhu fermentace rybího masa byl použit jak experimentální elektronický nos, tak i profesionální elektronický nos Peres V2.0. Pomocí profesionálního elektronického nosu Peres V2.0 bylo však možné určit jen tři úrovně stavu masa – Čerstvé, Nutná tepelná úprava (konzumace možná po tepelném zpracování) a Zkažené (nevhodné ke konzumaci). Tabulka ukazuje, že třetí den po začátku fermentace byly označeny jako zkažené všechny vzorky. Jako zkažený byl však označen vzorek 1 již následující den od začátku měření a vzorek 5 druhý den po začátku. Důvodem mohla být trochu delší manipulace se vzorkem při pokojové teplotě a na vzduchu z důvodu měření pomocí experimentálního elektronického nosu, které bylo prováděno se stejnými vzorky.



Obrázek 10: Měřené vzorky

Výzkum elektronického nosu jako zařízením pro kontrolu potravin neustále narůstá. Kontrolou čerstvosti masa pomocí e-nosu se zabývá např. Wojnowski a kol. (2019), který k vyhodnocování využívá neuronovou síť, nebo Raudienė a kol. (2018) a Benabdellah a kol. (2017) využívající sofistikovaných vyhodnocovacích programů.

Tabulka 2: Výsledky stanovené profesionálním elektronickým detektorem čerstvosti masa PERES, V2.0 (FOODSniffer, Redwood City, CA) pro fermentaci pstruha lososovitého růžovomasého v průběhu fermentace

Den	Vzorek					
	1	2	3	4	5	6
Den 0	Čerstvé	Čerstvé	Čerstvé	Čerstvé	Čerstvé	Čerstvé
Den 1	Zkažené	Úprava	Čerstvé	Čerstvé	Úprava	Úprava
Den 2	Zkažené	Úprava	Úprava	Úprava	Zkažené	Úprava
Den 3	Zkažené	Zkažené	Zkažené	Zkažené	Zkažené	Zkažené
Den 4	Zkažené	Zkažené	Zkažené	Zkažené	Zkažené	Zkažené

Mimo elektronického nosu může být použit pro okamžité zjištění čerstvosti rybího masa také např. přístroj Fish Freshness Meter (Distell), který je založen na elektrické vodivosti rybího masa. Stupnice může být kalibrována na rozsah od 16 (čerstvé maso) do 1 (zkažené maso). Klečáček (2018) zmiňuje, že během 10 dnů od poklesne hodnota v oblasti břicha u kapra obecného z hodnoty 13,9 na hodnotu 3,65 a u hlavy z hodnoty 12,63 na hodnotu 6,23.

8.1 Výsledky stanovení amoniaku pomocí analytické metody

Pro srovnání výsledků z experimentálního elektronického nosu s běžnou analytickou metodou bylo dále provedeno stanovení amoniaku spektrofotometrickou metodou pomocí Nesslerova činidla v první a třetí den po začátku měření u vzorků lososa atlantského uchovávaných v lednici.

V první den od začátku měření byla stanovena průměrná hodnota obsahu amoniaku ve vzorku $617,15 \text{ mg.kg}^{-1}$ a třetí den od začátku měření $648,25 \text{ mg.kg}^{-1}$. Z naměřených hodnot obsahu amoniaku ve vzorku je možné odhadnout nárůst koncentrace obsahu amoniaku. Změna však není tak veliká, jak by se dalo předpokládat v porovnání s naměřenými hodnotami pomocí experimentálního elektronického nosu, kde detekovaná změna je výrazně vyšší. Může to být způsobeno vyšší citlivostí elektronického nosu na amoniak.

Při obsah amoniaku v maso v do 170 mg.kg^{-1} , podle Kopřivy a kol. (2012), je maso považováno za maso čerstvé. Rozsah $170\text{-}250 \text{ mg.kg}^{-1}$ je u masa dosud nezávadného. Jako maso podezřelé je označováno maso s obsahem amoniaku od 250 do 300 mg.kg^{-1} . Počínající rozklad je při hodnotě v rozsahu $300\text{-}350 \text{ mg.kg}^{-1}$ amoniaku a nad 350 mg.kg^{-1} je maso považováno za zkažené.

8.2 Výsledky mikrobiologické analýzy

Výsledky mikrobiologické analýzy ukázané v tabulce 3. Z výsledků je viditelný nárůst mikrobiologické zátěže se vzrůstající dobou fermentace. Obecně je maso a orgány čerstvě ulovených ryb považovány za sterilní a to do okamžiku usmrcení. Výjimkou je kůže (10^2 do 10^7 na cm^2), žábry (10^3 až 10^9 na g^{-1}) a obsah střev (10^3 až 10^9 na g^{-1}), jak uvádí Matyáš (2002). Zvýšená hodnota celkového počtu mikroorganismů v první den po začátku měření může být způsobena fermentačním přípravkem Komekoji, který obsahuje mikroskopickou vláknitou houbu *Aspergillus oryzae* sloužící jako kultura pro fermentaci masa.

Tabulka 3: Výsledky mikrobiologické analýzy pro lososa atlantského v průběhu fermentace

	den 1	den 5	den 9
Celkový počet mikroorganismů (CFU/g)	$2,5 \cdot 10^3$	$8,2 \cdot 10^5$	$4,5 \cdot 10^7$
Koliformní bakterie (CFU/g)	<10	$1,4 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^5$

Bardaševská (2012) zmiňuje mimo elektronického nosu také hodnocení podle celkových těkavých dusíkatých látek (TVBN - total volatile basic nitrogen) a jeho porovnání s počtem aerobních mikroorganismů. Ryba byla považována za čerstvou, pokud byly výsledky TVBN ≤ 25 g a počet mikrobiálních kolonií $\leq 10^6$ KTJ/g ryby. Při hodnotě TVBN ≥ 25 g a počtu mikrobiálních kolonií $\geq 10^6$ KTJ/g byla ryba zkažená.

Fermentování rybího masa je populární zejména v asijských zemích, kde probíhá nejčastěji také výzkum jednotlivých startovacích kultur a mikrobiologické zátěže, např. výzkum bakterií rodu *Streptococcus*, *Lactococcus* a *Leuconostoc* a jejich využití při fermentaci indonéského jídla Rusip. Její výsledky ukázaly, že bakterie mléčného kvašení rodu *Streptococcus* byly nejvíce přítomny na začátku a bakterie *Lactococcus* uprostřed fermentace, zatímco *Leuconostoc* byl přítomen spolu s fermentací. (Yuliana et al., 2018)

ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na monitorování průběhu fermentace rybího masa se zaměřením na obsah amoniaku v mase. V teoretické části byly shrnuty poznatky o porážce, zpracování a skladování rybího masa se zaměřením na bezpečnost a kontaminaci rybího masa. Dále jsou v teoretické části shrnuty poznatky o staření a fermentaci masa. V posledních kapitolách teoretické části jsou popsány metody stanovení amoniaku v mase.

Praktická část práce byla zaměřena na průběh fermentace u masa zaznamenaný pomocí experimentálního elektronického e-nosu se zaměřením na stanovení obsahu amoniaku v prostoru s fermentovaným rybím masem z lososa a pstruha. Zjištěný obsah amoniaku byl porovnán s obsahem amoniaku stanoveným běžnou analytickou metodou – spektrofotometricky pomocí Nesslerova činidla. Analytická metoda vyhodnotila maso jako zkažené (nad 350 mg / kg). Předpokládá se ale, že hraniční hodnoty jsou stanoveny pro maso čerstvé a pro fermentované maso je nutné stanovit jiné hraniční hodnoty. Obdobně tomu je u výsledků získaných profesionálním elektronickým detektorem čerstvosti masa PERES (FOODSniffer), který již od druhého dne fermentace vykazovalo hodnoty vyšší, než které jsou stanové pro bezpečnou konzumaci masa (maso bylo označeno za zkažené).

Z důvodu bezpečnosti probíhala současně s experimentálním měřením mikrobiologická analýza ke stanovení množství koliformních bakterií a celkového počtu bakterií. Mikrobiologická analýza probíhala devět dní, přičemž již pátý den měření, byly měřené hodnoty vysoké, neslučitelné s bezpečnou konzumací.

Ryby mají krátkou dobu trvanlivosti, při teplotách nad 0 °C se rychle kazí a tím se omezuje doba skladovatelnosti. Z těchto důvodů se na stanovení bezpečnosti masa může použít rychlá neinvazivní metoda měření pomocí elektronického nosu, která byla využita v této diplomové práci.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- BARBESGAARD, Peder, HansPeter HELDT-HANSEN a Berge DIDERICHSEN, 1992. O bezpečnosti *Aspergillus oryzae*: přehled. Aplikovaná mikrobiologie a biotechnologie [online]. [cit. 2022-05-03]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/BF00183230
- BEDNÁŘ, Marek, 1996. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. Praha: Marvil. ISBN 80-238-0297-6.
- BENEŠ, Jiří, 2009. Infekční lékařství. Praha: Galén. ISBN978-80-7262-644-1.
- BUCHTOVÁ, Hana, 2001. Hygiena a technologie zpracování ryb a ostatních vodních živočichů: Alimentární onemocnění z ryb; Mrazírenství. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita. ISBN 80-730-5401-9.
- ČESKO, 2012. Nařízení vlády č. 3/2012 Sb. In: Sbírka zákonů české republiky. Dostupné také z: www.zakonyprolidi.cz/59/cs/2012-3
- DIPLOMOVÁ PRÁCE Možnosti prodloužení kvality („čerstvosti“) rybího masa a analýza změn při jeho skladování Vedoucí diplomové práce: Ing. Jitka Rutkayová, Ph.D. Autor diplomové práce: Bc. David Klečacký České Budějovice, 2018
- FUJINO, Kenji, Yoshihiro KAWAHARA a Kenta SHIRASAWA, 2022. Genetic diversity among the varieties exhibiting early heading date in rice. *Euphytica* [online]. 218(2) [cit. 2022-05-03]. ISSN 0014-2336. Dostupné z: doi:10.1007/s10681-021-02965-y
- HALLIDAY, David, Jearl WALKER a Robert RESNICK, 2000. Fyzika: vysokoškolská učebnice obecné fyziky. Brno: VUTIUM. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 80-214-1868-0.
- HANEL, Lubomír a Jan ANDRESKA, 2013. Ryby evropských vod v ilustracích Květoslava Hiska. Praha: Aventinum. Artia (Aventinum). ISBN 978-807-4420-382.
- HATAKEYAMA, Riko et al., 2014. Light Represses Conidiation in Koji Mold *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. 71(8), 1844-1849 [cit. 2022-05-02]. ISSN 0916-8451. Dostupné z: doi:10.1271/bbb.60713
- HAVLÍK, Jiří, 1990. Infektologie: celostátní vysokoškolská učebnice pro lékařské fakulty. 2. vyd. Praha: Avicenum. Učebnice pro lékařské fakulty. ISBN 80-201-0062-8.
- HORÁČEK, Jiří, 2000. Základy lékařské mikrobiologie. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0006-4.

INGR, Ivo, 2003. Produkce a zpracování masa. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 80-7157-719-7.

KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH, 2012. Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin. Ostrava: Key Publishing. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-145-0.

KAMENÍK, Josef, 2012. Hygiena a technologie masa: trvanlivé masné výrobky. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN 978-80-7305-602-5.

KINDERSLEY, dorling, 2007. Japonsko: průvodce cestovatele. ISBN 0 7513 6874 1.

Kopřiva, Vladimír, a další. 2012. Vybrané instrumentální metody v biochemických cvičeních – inovované úlohy. Brno : Veterinární a farmaceutická univerzita, 2012. str. 47. ISBN: 978-80-7305-627-8.

Kvalita a kvalitativní změny u čerstvých ryb [1995]. ISSN : 0429-9345.

LEITNER, Jindřich a Petr VOŇKA, 1997. Termodynamika materiálů: příklady. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 80-708-0283-9.

LIEM, I T, K H STEINKRAUS a T C CRONK, 1977. Production of vitamin B-12 in tempeh, a fermented soybean food. Applied and Environmental Microbiology [online]. 34(6), 773-776 [cit. 2022-05-03]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/aem.34.6.773-776.1977

MALÍŘ, František a Vladimír OSTRÝ, 2003. Vlákenné mikromycety (plísňe), mykotoxiny a zdraví člověka. Brno: Národní centrum ošetřovatelství a nelékařských zdravotnických oborů. ISBN 80-701-3395-3.

MATOUŠ, Bohuslav, 2010. Základy lékařské chemie a biochemie. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-702-8.

MATYÁŠ, Z., PAVLÍČEK, J., SOVJAK, R., KOPŘIVA, V., PAŽOUT, V., HEJLOVÁ, Š., VOJTĚCH, J., HORKÝ J., HLAVÁČEK, J.: Podklady pro zavedení HACCP do oboru zpracování surovin a potravin živočišného původu: ryby, měkkýši, koryši, zvěřina, drůbež, vejce, med, lahůdky. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, 2002. ISBN 80-7305-428-0, 141 s.

Ministerstvo zemědělství, 2009; Státní Zdravotní Ústav. [online]. [cit. 2022-05-02].

Naše výživa: Ryby - charakteristika, členění, 2020. Naše výživa [online]. [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: (nasevyziva.cz/sek e-ryby/cclanek-ryby-charakteristika)

Nihad Benabdellah, Khalid Hachami, Mohammed Bourhaleb, and Naima Benazzi, IDENTIFICATION OF TWO TYPES OF ROTTEN MEAT USING AN ELECTRONIC NOSE FOR FOOD QUALITY CONTROL, INTERNATIONAL JOURNAL ON SMART SENSING AND INTELLIGENT SYSTEMS VOL.10, NO. 3, SEPTEMBER 2017

PIPEK, Petr, 1998. Technologie masa II. 2. vyd. Praha: VŠCHT. ISBN 80-719-2283-8.

PRIJI Prakasan, et al., 2016. MIKROBIÁLNÍ LIPÁZY - VLASTNOSTI A APLIKACE. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences [online]. 6 (2), 799-807 [cit. 2022-05-02]. ISSN 13385178. Dostupné z: doi:10.15414/jmbfs.2016.6.2.799-807

Raudienė E., Darius G., Vinauskienė R., Eisinaitė V., Balčiūnas G., Dobilienė J., Tamkutė L. (2018): Rapid evaluation of fresh chicken meat quality by electronic nose. Czech J. Food Sci., 36: 420-426.

RIDDERVOLD, Astri, 1990. Lutefisk, Rakefisk and Herring in Norwegian Tradition. Novus Press. ISBN 978-8270991648.

Řezníček et al., 2007. Termodynamická sensorika -Souhrn dosažených výsledků projektu FT-TA4_0100: TANDEM-BASEMO, Vysoké učení technické v Brně

SANDOR, 2012. Art of fermentation. ISBN 978-1603582865.

Scientific Opinion on Fish Oil for Human Consumption. Food Hygiene, including Rancidity, 2010. EFSA Journal [online]. 8(10), 1-38 [cit. 2022-05-01]. ISSN 18314732. Dostupné z: doi:10.2903/j.efsa.2010.1874

SEMAN, Dennis L. et al., 2018. Meat Science Lexicon. Meat and Muscle Biology [online]. 2(3),1-15 [cit. 2022-05-01]. ISSN 2575-985X. Dostupné z: doi:10.22175/mmb2017.12.0059

Senzory, 2007. Praha: VŠCHT. ISBN978-80-86238-20-3.

Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases 4th Edition . ISBN 978-0838585290.

SHIMBO, HIROKO; SHIMBO BEITCHMAN, MING TSAI. . The Japanese Kitchen. ISBN 978-1-55832-177-9.

SITZ, et al., 2006. Spotřebitelská senzoričká akceptace a hodnota mokřých a suchých bifteků, J ANIM SCI. ISBN 84:1221-1226.

STEINHAUSER, Ladislav, 1995. Hygiena a technologie masa. Brno: LAST. ISBN 80-900-2604-4.

ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila, 2002. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia. ISBN 80-200-1024-6.

Univerzita Pardubice Fakulta chemicko-technologická ČERSTVOST RYBÍHO MASA A RYBÍCH VÝROBKŮ Pavla Bardaševská Bakalářská práce 2012

Ústav molekulární genetiky, Kojibakers, Fine Dining Lovers, Genussakademie Bayern, SILO London [online], 2020. [cit. 2022-05-03]. Dostupné z: <https://www.jidloaradost.ambi.cz/clanky/koji-plisen-ktera-prorusta-gastronomii/>

VÁCHA, František a Hana BUCHTOVÁ, 2005. Komodity akvakultury. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. ISBN 80-704-0758-1.

VÁCHA, František a Pavel VEJSADA, 2013. Zpracování ryb: aktualizované vydání 2015. Vodňany: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod. ISBN 978-80-87437-52-0.

VAŘEJKA, František, Oldřich MRÁZ a Jiří SMOLA, 1989. Speciální veterinární mikrobiologie: celost. vysokošk. učebnice pro vys. školy veterinární. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. Živočišná výroba (Státní zemědělské nakladatelství). ISBN 80-209-0042-X.

Veda a technika: Prenosný „elektronický nos“ zjišťuje, či jsou potraviny skazené, aj když ich nezacítíte. [online], 2016. In: . [cit. 2022-05-04]. Dostupné z: <http://www.treehugger.com/gadgets/portable-electronic-nose-smells-your-meat-identifying-food-poisoning-risk.html>

VELÍŠEK, Jan a Jana HAJŠLOVÁ, 2009. Chemie potravin. Rozš. a přeprac. 3. vyd. Tábor: OSSIS. ISBN 978-80-86659-15-2.

VÝUKOVÝ MATERIÁL: Mikrobiologie potravin III [online], 2019. [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: <http://www.vovcr.cz>

Wojnowski W, Kalinowska K, Majchrzak T, Płotka-Wasyłka J, Namieśnik J. Prediction of the Biogenic Amines Index of Poultry Meat Using an Electronic Nose. *Sensors (Basel)*. 2019 Apr 1;19(7):1580. doi: 10.3390/s19071580. PMID: 30939836; PMCID: PMC6480166.

YULIANA, Neti et al., 2018. Lactic acid bacteria during fish fermentation (rusip) [online]. In:6(2) [cit. 2022-05-12]. ISSN 2381182X.Dostupné z:doi:10.15406/mojfpt.2018.06.00167

ZACHAŘ, P. a D. SÝKORA, 2019. Plynová chromatografie [online]. In: . [cit. 2022-05-08]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ATP adenosintrifosfát

IMP inosinmonofosfát

PUFA poly nenasycené mastné kyseliny

LDL low denzity lipoprotein

ω_3 polynenasycené mastné kyseliny

ω_6 polynenasycené mastné kyseliny

pH vodíkový exponent vyjadřující kyselou nebo alkalickou reakci

ISE iontová selektivní elektroda

$[\text{HgI}^4]^{2-}$ Nesslerovo činidlo

CCl_3COOH kyselina trichloroctová

NH_4Cl chlorid amonný

PCA (Plate Count Agar) živná půda

VRBA (Violet Red Bile Agar) živná půda

MRS Agar (De Man Rogosa Sharpe Agar) živná půda

CHYGA (Chloramfenicol Yeast Glucose Agar) živná půda

R_s rezistivita, měrný elektrický odpor

Ω jednotka elektrického odporu

ppm parts per milion, výraz pro miliontinu celku

PPS (Physiological Peptone Solution) fyziologický roztok

NaCl chlorid sodný, kuchyňská sůl

U značka pro elektrické napětí

d [-]- zaznamenaná datová úroveň

Rusip, sambal rusip fermentovaný indonéský pokrm z rybího masa, pomerančů, cibule a chilli

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Členění ryb.....	12
Obrázek 2: Elektronický nos.....	27
Obrázek 3: Příklad zaznamenaných datových úrovní $d [-]$ u senzoru 2 a vzorku fermentovaného rybího masa uchovávaného při pokojové teplotě ve skřínce na potraviny v jednotlivých dnech měření.....	36
Obrázek 4: Zaznamenané datové úrovně $d [-]$ u senzoru 1 (vzorek v lednici) a senzoru 2 (vzorek ve skřínce) v jednotlivých dnech měření	37
Obrázek 5: Průměrné hodnoty a směrodatné odchylky průměru datových úrovní pro jednotlivé prostory a jednotlivé dny fermentace. Senzor S1 - vzorek v lednici; Senzoru S2 - vzorek ve skřínce.....	37
Obrázek 6: Příklad zaznamenaných dat napěťových úrovní $d [-]$ u senzoru 1 a vzorku 1 v jednotlivých dnech měření.....	38
Obrázek 7: Příklad nárůstu koncentrace amoniaku $c_{am} [ppm]$ v jednotlivých dnech fermentace u senzoru 1 a vzorku 1 v jednotlivých dnech měření.....	39
Obrázek 8: Nárůst koncentrace amoniaku $c_{am} [ppm]$ v jednotlivých dnech fermentace. Doba měření 600 s.....	39
Obrázek 9: Graf zvyšování koncentrace amoniaku ve vzduchu nad masem v závislosti na čase	40
Obrázek 10: Měřené vzorky	41

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Základní statistické hodnoty koncentrace amoniaku c_{am} [ppm] pro posledních 100 naměřených hodnot a všechny senzory v daný den měření.....	40
Tabulka 2: Výsledky stanovené profesionálním elektronickým detektorem čerstvosti masa PERES, V2.0 (FOODSniffer, Redwood City, CA) pro fermentaci pstruha lososovitého růžovomasého v průběhu fermentace.....	41
Tabulka 3: Výsledky mikrobiologické analýzy pro lososa atlantského v průběhu fermentace.....	42