

Mikrostruktura a viskoelastické vlastnosti tavených sýrů s náhradami tavicích solí

Bc. Jolana Dostálová

Diplomová práce
2020



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Jolana Dostálová**
Osobní číslo: **T18259**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Mikrostruktura a viskoelastické vlastnosti tavených sýrů s náhradami tavicích solí**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

1. Zpracujte literární rešerši na téma tavených sýrů s možnými částečnými nebo úplnými náhradami tavicích solí
2. Stručně popište princip skenovací elektronové mikroskopie a způsoby přípravy vzorků pro skenovací elektronovou mikroskopii

II. Praktická část

1. Vytvořte vzorky tavených sýrů s extrakty z mořských řas, které použijete jako náhradu tavicích solí
2. Připravte vzorky pro skenovací elektronovou mikroskopii, vzorky prohlédněte a popište jejich mikrostrukturu
3. Proveďte dynamickou oscilační reometrii, získaná data vyhodnotte
4. Zpracujte diskuzi a závěr práce

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] AWAD, R. A., ABDEL-HAMID, L. B., EL-SHABRAWY, S. A., SINGH, R. K. Texture and microtexture of block type processed cheese with formulated emulsifying salt mixtures. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 2002, 35, 1, 54-61. ISSN: 0023-6438.
- [2] ČERNÍKOVÁ, M., BUŇKA, F., POSPIECH, M., TREMLOVÁ, B., HLADKÁ, K., PAVLÍNEK, V., BŘEZINA, P. Replacement of traditional emulsifying salts by selected hydrocolloids in processed cheese production. *International Dairy Journal*. 2010, 20, 336-343. ISSN: 0958-6946.
- [3] ČERNÍKOVÁ, M., NEBESÁŘOVÁ, J., SALEK, R. S., ŘIHÁČKOVÁ, L., BUŇKA, F. Microstructure, textural and viscoelastic properties of model processed cheese with different dry matter and fat in dry matter content. *Journal of Dairy Science*. 2017, 100, 4300-4307. ISSN: 0022-0302.
- [4] PHILLIPS, G. O., WILLIAMS, P. A. *Handbook of hydrocolloids*. 2nd rev. ed. Eds. Phillips, G. O. a P. A. Williams, Cambridge: Woodhead Pub, 2009. 982 pp. ISBN 978-1-84569-587-3 (e-book).

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Richardos Nikolaos Salek, Ph.D.**
Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce: **17. února 2020**
Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. RNDr. Iva Burešová, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 17. února 2020

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 užít 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 na 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

Cílem této diplomové práce bylo prohlédnout mikrostrukturu tavených sýrů bez tavicích solí a ověřit, zda je jejich struktura stejnorodá a obdobná nebo zcela odlišná z hlediska působení jednotlivých hydrokoloidů. Byly vyrobeny vzorky tavených sýrů s přídavkem 1 % (w/w) hydrokoloidů (agar, κ -karagenan, želatina) a kontrolní vzorky s obsahem 2,5 % (w/w) tavicích solí. U modelových vzorků byla provedena základní chemická a senzorická analýza a dynamická oscilační reometrie. Dále byly vzorky připraveny chemickou cestou pro skenovací elektronovou mikroskopii. Získané snímky vzorků byly popsány a vyhodnoceny. Vzorky byly skladovány při teplotě 6 ± 2 °C. Měření byla prováděna 1., 14., 30. a 60. den od data výroby vzorků. Bylo zjištěno, že v průběhu skladování se tuhost vzorků u jednotlivých hydrokoloidů snižovala. Jako nejtuzší tavený sýr byl vyhodnocen vzorek s přídavkem κ -karagenanu. Z hlediska mikroskopie byly největší tukové kuličky pozorovány u vzorku bez tavicích solí s přídavkem agaru. Z použitých hydrokoloidů byly zjištěny nejmenší tukové kuličky u vzorku bez tavicích solí s přídavkem želatiny. Z vybraných hydrokoloidů se želatina jevila jako nejlepší emulgační činidlo.

Klíčová slova: tavený sýr, skenovací elektronová mikroskopie, chemická fixace, karagenan, agar, želatina

ABSTRACT

The aim of this work was to inspect the microstructure of processed cheeses without emulsifying salts in order to verify whether their structure is homogeneous and similar or completely different in terms of individual hydrocolloids action. Processed cheese samples were produced with the addition of 1 % (w/w) hydrocolloids (agar, κ -carrageenan, gelatin) and control samples containing 2.5 % (w/w) emulsifying salts. In the tested samples, basic chemical and sensory analyses and dynamic oscillatory rheology tests were performed. The samples were prepared for scanning electronic microscopy (SEM) analysis. The obtained images of the samples were described and evaluated. Samples were stored at 6 ± 2 °C. The measurements were performed after 1, 14, 30 and 60 days after the manufacture day. During storage, the firmness of samples decreased. The most firm processed cheese was the sample with the addition of 1 % (w/w) κ -carrageenan. From the SEM analysis, the largest fat globules were observed in the sample without emulsifying salts and with the addition of agar. From the tested hydrocolloids, the smallest fat globules were found in the sample without emulsifying salts and with the addition of gelatin. Gelatin appeared to be the best emulsifier among the evaluated hydrocolloids.

Keywords: processed cheese, scanning electron microscopy, chemical fixation, carrageenan, agar, gelatin

Touto cestou bych ráda poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Ing. Richardosovi Nikolaosovi Salekovi, PhD., za odborné vedení, cenné rady a podnětné připomínky při psaní diplomové práce.

Dále bych chtěla srdečně poděkovat doc. MVDr. Michaele Černíkové, PhD., za odborné a cenné rady při konzultacích, pomoc při vyhodnocování praktické části a čas, který mi věnovala během zpracovávání této práce.

Mé velké poděkování patří především rodině, která mne podporovala při studiu a psaní této práce.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 TAVENÉ SÝRY	13
1.1 TECHNOLOGIE VÝROBY TAVENÝCH SÝRŮ.....	13
1.2 NÁHRADY TAVICÍCH SOLÍ.....	17
1.2.1 Částečné náhrady tavicích solí	18
1.2.2 Úplné náhrady tavicích solí.....	18
1.2.3 Odstranění vápenatých iontů ze surovinové směsi.....	19
2 SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE	21
2.1 HISTORIE	22
2.2 SKENOVACÍ ELEKTRONOVÝ MIKROSKOP.....	23
2.3 KONSTRUKCE SKENOVACÍHO ELEKTRONOVÉHO MIKROSKOPU.....	24
2.4 METODY PŘÍPRAVY VZORKŮ PRO SKENOVACÍ ELEKTRONOVOU MIKROSKOPII	31
2.5 PŘÍPRAVA VZORKŮ CHEMICKOU CESTOU	31
2.5.1 Čištění povrchu vzorku.....	32
2.5.2 Fixace a postfixace	32
2.5.3 Promývání a odvodnění	35
2.5.4 Sušení.....	36
2.5.5 Lepení a pokovování vzorku.....	37
2.6 PŘÍPRAVA VZORKŮ FYZIKÁLNÍMI METODAMI.....	37
II PRAKTICKÁ ČÁST	39
3 CÍL PRÁCE	40
4 METODIKA PRÁCE	41
4.1 VÝROBA VZORKŮ	41
4.2 CHEMICKÁ ANALÝZA.....	42
4.3 SENZORICKÁ ANALÝZA.....	42
4.4 DYNAMICKÁ OSCILAČNÍ REOMETRIE	42
4.5 PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO SEM CHEMICKOU CESTOU.....	43
4.6 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ NAMĚŘENÝCH DAT.....	44
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	45
5.1 VÝSLEDKY CHEMICKÉ ANALÝZY.....	45
5.2 VÝSLEDKY SENZORICKÉ ANALÝZY.....	46
5.3 VÝSLEDKY DYNAMICKÉ OSCILAČNÍ REOMETRIE	47
5.4 VÝSLEDKY SKENOVACÍ ELEKTRONOVÉ MIKROSKOPIE.....	52
ZÁVĚR	68
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	69

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	79
SEZNAM OBRÁZKŮ	81
SEZNAM TABULEK	83
SEZNAM PŘÍLOH	84

ÚVOD

Historie tavených sýrů sahá do konce 19. století, kde bylo původní myšlenkou výrobců prodloužit trvanlivost přírodních sýrů a zajistit transport těchto výrobků na delší vzdálenost bez nutnosti chlazení. Tavený sýr patří k atraktivním a spotřebitelsky vyhledávaným mléčným výrobkům na českém trhu. Je zdrojem mléčných bílkovin, tuků, minerálních látek a vitamínů. Tento mléčný výrobek lze zakoupit v různých variantách od produktů s roztíratelnou až tuhou, krájitelnou konzistencí a také v různých velikostech balení a příchutích. Tavené sýry nachází své uplatnění v teplé i studené kuchyni, ale nejčastěji jako pomazánka na pečivo. Tavené sýry jsou vyráběny zahřátím různých druhů přírodního sýra, tavicích solí a dalších složek za částečného podtlaku a stálého míchání do homogenní hmoty.

Mikroskopie je základní pozorovací metoda, která slouží k detailnějšímu pozorování vlastností a struktury potravin během technologických procesů výroby. V současné době jsou mikrofotografie potravin v odborných publikacích velmi žádané. Poskytují informace o struktuře matrice zkoumaného vzorku, které lze podpořit výsledky dalších analytických metod. V poslední době jsou velmi často do potravin přidávány hydrokoloidy (karagenan, agar, želatina, xantanová guma, pektiny, atd.), a to především kvůli ovlivnění konečné podoby výrobku a také z ekonomických důvodů. Jsou využívány jako stabilizátory, emulgátory a zahušňovadla.

Smyslem diplomové práce bylo prozkoumat mikrostrukturu tavených sýrů bez tavicích solí s přídavkem 1 % (w/w) hydrokoloidu (agar, κ -karagenan, želatina) a na základě tohoto poznatku ověřit, zda je jejich struktura v rámci pozorování jednotlivých hydrokoloidů stejnorodá nebo naopak zcela odlišná.

Diplomová práce je rozdělena do pěti kapitol. Teoretická část zahrnuje dvě kapitoly, které pojednávají o tavených sýrech a náhradách tavicích solí. Druhá kapitola se zabývá skenovací elektronovou mikroskopií, konkrétně historií, popisem mikroskopu a přípravou vzorků pro skenovací elektronovou mikroskopii. Praktická část se skládá ze tří kapitol. V první kapitole jsou vytyčeny cíle práce. V další kapitole je popsána výroba vzorků a jejich příprava pro skenovací elektronovou mikroskopii a také metody použitých analýz. Poslední kapitola je věnována výsledkům základní chemické, senzorické a reologické analýzy a mikroskopii vzorků a z toho vyplývajících závěrů.

Uvědomuji si, že mnou vyrobené modelové vzorky bez použití tavicích solí není dle platné legislativy možné označit za tavené sýry. Zároveň však ani v české ani evropské legislativě

neexistuje relevantní označení pro tyto typy výrobků. Mohlo by pro ně být označení sýrový výrobek, což je poměrně široký pojem, a proto jsem se po konzultaci se školitelem rozhodla ponechat název tavený sýr.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 TAVENÉ SÝRY

V České republice je sýr podle vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 397/2016 Sb. definován jako mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, oddělením podílu syrovátky a následným prokysáním nebo zráním. Sýry se legislativně dělí na přírodní sýry, tavené sýry, tavené sýrové výrobky a syrovátkové sýry. Jako tavený sýr lze pojmenovat sýr, který byl tepelně upraven za přídavku tavicích solí. Tavený sýr smí obsahovat maximálně 5 % laktózy, pokud je její obsah vyšší, pak se jedná o tavený sýrový výrobek. Obsah sušiny taveného sýra musí být tvořen nejméně z 51 % přírodním sýrem (Česko, 2016).

Podle *Code of Federal Regulations* definují ve Spojených státech amerických tavený sýr jako potravinu, která vznikla rozmělněním, smícháním a zahřátím jednoho či více sýrů stejného nebo různého typu. Dále uvádí, že tavený sýr smí mít obsah vlhkosti nejvýše 43 % a obsah tuku v sušině nejméně 47 %. Mohou existovat tavené sýry neochucené i ochucené (Spojené státy americké, 2019).

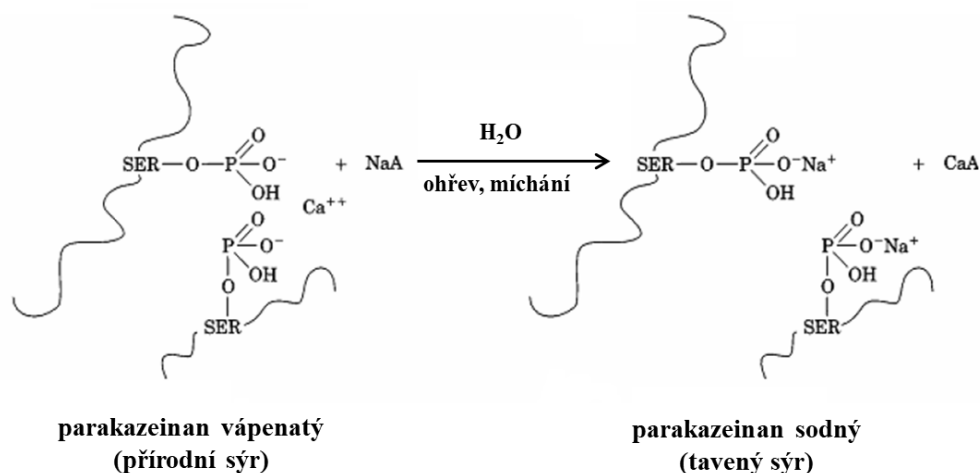
Výše zmíněným legislativním požadavkem je přítomnost tavicích solí v tavených sýrech, které definuje Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 jako látky, které převádějí bílkoviny obsažené v sýru do disperzní formy za účelem homogenního rozložení tuků a ostatních složek (Evropa, 2008).

1.1 Technologie výroby tavených sýrů

Hlavní složkou pro výrobu tavených sýrů jsou přírodní sýry. Při výběru by měly být vzaty v úvahu 2 hlavní faktory pro výběr sýra, a to jeho druh a stupeň zralosti, které mají vliv na konečnou konzistenci produktu. Dle druhu dělíme sýry na měkké, polotvrdé a tvrdé, přičemž lze všechny typy použít na výrobu taveného sýra. Nejběžněji je však používán polotvrký a tvrdý sýr, měkké sýry jsou využívány spíše k aromatizaci. U sýrů rozlišujeme 3 stupně zralosti: mladý sýr (1 až 2 týdny starý), středně zrající sýr (2 až 4 měsíce starý) a zralý sýr (přes 4 měsíce starý). Staří přírodního sýra významně ovlivňuje finální produkt, pro blokové tavené sýry s dobrou krájitelností a elasticitou jsou vhodné převážně mladé sýry, naopak pro sýrové pomazánky se používají středně zralé sýry. Pro výrobu tavených sýrů lze také aplikovat přírodní sýry s mechanickými vadami, nelze však použít sýr s vadami mikrobiologickými, jelikož by to mohlo ohrozit zdravotní nezávadnost výrobku. V zahraničí je oblíbené používat na výrobu tavených sýrů jen 1 typ sýru, např. z čedaru

vyrábí ve Velké Británii a Austrálii a z ementálu ve Francii a Německu. Směs různých druhů přírodních sýrů s rozdílným stupněm zralosti umožňuje získat tavené sýry s požadovanou strukturou, fyzikálními vlastnostmi a chutí (Gouda a Abou El-Nour, 2003, s. 1110; Guinee a kol., 2004, s. 353; Buňka a kol., 2009, s. 69).

Další důležitou surovinou jsou tavicí soli, jsou to iontové sloučeniny tvořené jednomocnými kationty a polyvalentními anionty. Podle *Code of Federal Regulations* existuje 13 tavicích solí, které jsou schváleny pro výrobu tavených sýrů. Patří mezi ně např. mono-, di- a trisodné fosforečnany, fosforečnan draselný, fosforečnan hlinitosodný, citrát sodný, citrát vápenatý, vlnan sodný atd. Nejběžnějšími tavicími solemi používanými ve Spojených státech amerických jsou citrát trisodný a fosforečnan disodný. Obsah těchto solí není vyšší než 3 % hmotnosti taveného sýra. Citrát trisodný je vhodnou tavicí solí pro plátkové tavené sýry, naopak fosforečnan disodný se používá do blokových tavených sýrů a sýrových pomazánek (Kapoor a Metzger, 2008, s. 203–204; Spojené státy americké, 2019). Tavicí soli mají zásadní význam při výrobě taveného sýra, ve kterém vytváří jednotnou strukturu během procesu tavení. Základní úlohou těchto solí je upravit prostředí surovinové směsi tak, aby přítomné proteiny uplatnily své přirozené emulgační schopnosti. V tavených sýrech mají tavicí soli 2 primární funkce, a to sekvestrace vápníku a úprava pH. Obě funkce napomáhají hydrataci kazeinů přítomných v přírodním sýru, tudíž mohou snadno interagovat s vodní a tukovou fází, čímž se vytvoří homogenní emulze taveného sýra s požadovanou konzistencí. Stupně sekvestrace vápníku a hydratace kazeinu jsou závislé na podmínkách zpracování, typu a množství tavicích solí a obsahu vápníku v použitém přírodním sýru. Skutečný účinek tavicích solí spočívá ve výměně kationtů vápníku nerozpustného parakazeinanu vápenatého za ionty sodíku, což vede k tvorbě rozpustnějšího parakazeinanu sodného (viz Obr. 1). Aplikace tavicích solí má za následek řetězovou peptizaci, disperzi, hydrataci a bobtnání proteinů a emulgaci a stabilizaci tuku. K nejčastěji používaným tavicím solím patří sodné soli citrátů, monofosforečnanů, difosforečnanů a polyfosforačnanů. Častěji než jedna sůl jsou využívány jejich směsi pro získání produktu požadovaných vlastností. Množství použitých tavicích solí v tavených sýrech se pohybuje mezi 2–3 % v závislosti na typu, stupni zralosti a množství přírodního sýra ve směsi (Awad a kol., 2002, s. 54; Gouda a Abou El-Nour, 2003, s. 1111; Kapoor a Metzger, 2008, s. 203–204; Černíková a kol., 2010, s. 336; Hladká a kol., 2014, s. 650; Lenze a kol., 2019, s. 575).



Obr. 1 Výměna vápenatých iontů za sodné ionty v přítomnosti tavících solí při výrobě tavených sýrů (A – anion tavící soli) (upraveno podle Buňka a kol., 2009, s.

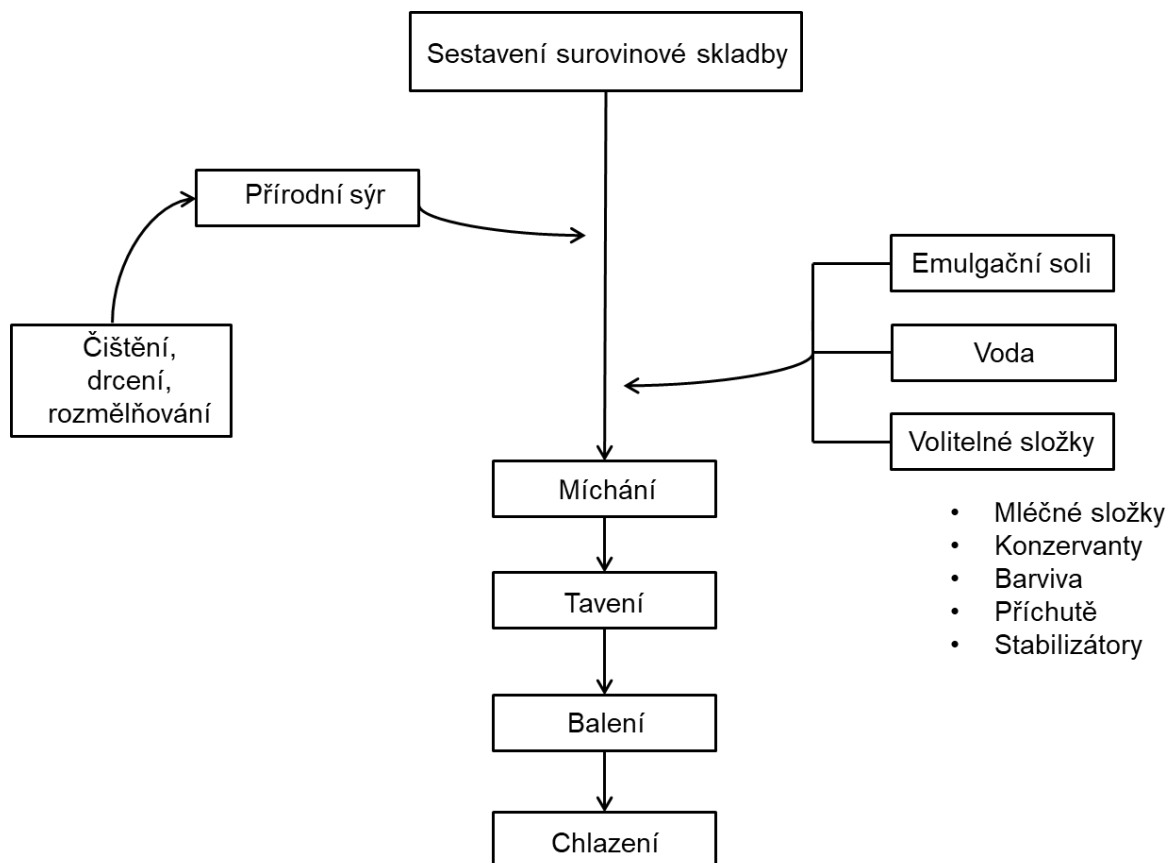
13)

Dalšími přísadami jsou mléčné bílkovinné složky (tvaroh, podmáslí, sušené odstředěné mléko, sušená syrovátka, kazein, kazeinany, hydrolyzáty mléčných bílkovin), mléčný tuk (máslo, bezvodé máslo, smetana), rework (tj. sýr již utavený) a voda, která je důležitá pro výrobu stabilní emulze. Emulgační soli potřebují vodu k rozpuštění a správnému působení na kazeiny. Do tavených sýrů se dále přidávají příchutě (šunka, zelenina, houby, česnek, bylinky a plísňové sýry), ochucovadla (konzervované maso, ryby, ořechy a ovoce), barviva (extrakty annatto, β -karoten, paprika, kurkuma a chlorofylové přípravky), konzervační látky (bakteriocin nisin, sodné nebo draselné soli kyseliny sorbové a propionové), aromatičující látky (extrakty koření). Do tavených sýrů jsou také často přidávány hydrokoloidy (alginát sodný, κ -karagenan, agar, želatina, škrob, xantanová a guarová guma), a to z důvodu stabilizace konzistence a zlepšení vazby vody (Gouda a Abou El-Nour, 2003, s. 1111; Kapoor a Metzger, 2008, s. 205; Buňka a kol., 2009, s. 69–70; Černíková a kol., 2010, s. 337; Guinee, 2011, s. 805–806; Kadlec a kol., 2012, s. 297; Guinee, 2017, s. 1135; Černíková a kol., 2017a, s. 4300).

Zařazení sušených materiálů, extraktů a esenciálních olejů do tavených sýrů by mohlo vést ke zlepšení nutriční hodnoty a smyslových vlastností a snížení jakostních parametrů v různých sýrech. Za zmínění stojí také polyfenoly, které jsou z rostlinných materiálů a jsou hlavními antioxidanty v lidské stravě, nebo kvercetin a rutin, což jsou rostlinné flavo-

noidy známé svými pozitivními terapeutickými účinky na lidské zdraví. Přídavek bioaktivních sloučenin může mít vliv nejen na chuť, ale i konzistenci tavených sýrů (Příkryl a kol., 2018, s. 266–267). Využití ovoce nebo zeleniny do tavených sýrových výrobků by mohlo být jedním ze způsobů rozvoje funkčních potravin. Rajče je velmi důležitou zeleninou obsahující antioxidanty, karotenoidy a lykopen, které hrají důležitou roli v pozitivních účincích na lidské zdraví. Rajčatové výrobky snižují riziko vzniku některých typů rakoviny. Dále stojí za zmínění mrkev, která je jednou z nejvýživnější kořenové zeleniny. Je bohatým zdrojem β -karotenu (prekurzoru vitamínu A). Dalším ze způsobů, jak zvýšit funkčnost taveného sýra, je fortifikovat ho probiotiky nebo prebiotiky, avšak nejběžnější metodou pro zvýšení funkčnosti je začlenění vitamínů do surovinové směsi. Zejména vitamíny rozpustné v tucích A, D a E vykazují dobrou tepelnou stabilitu a v průběhu času nedegradují, což způsobuje udržení jejich vysokého obsahu v produktech (Mohamed a kol., 2016, s. 92; Mehanna a kol., 2017, s. 156; Talbot-Walsh a kol., 2018, s. 197–199).

Tavené sýry se vyrábějí rozmělněním, mícháním a tavením jednoho či více druhů přírodních sýrů a vhodných ingrediencí do homogenní směsi. Technologický proces výroby tavených sýrů lze rozdělit do několika základních kroků, které jsou znázorněny na Obr. 2. Směs připravených surovin je nadávkována do tavicího kotle, kde je následně vytvořen částečný podtlak. Tavicí zařízení je opatřeno vyhřívaným pláštěm, přímým vstřikem páry a nožem. Směs se za stálého míchání zahřívá na tavicí teplotu 80–95 °C po dobu 4–15 min. Hladká a kol. (2014, s. 650) uvádí tavicí teplotu v rozmezí 90–100 °C. Horká roztavená směs se rozlije do forem vyložených hliníkovou fólií. Pak následuje ochlazení obvykle pod 8 °C a skladování, které by mělo probíhat v rozmezí 5–10 °C. Tavené sýry je vhodné udržovat nad teplotou 0 °C, aby nedošlo ke zmrznutí výrobku, a naopak pod 20 °C, aby se zabránilo růstu mikroorganismů. Tavené sýry jsou nejčastěji baleny do hliníkových fólií potažených z vnitřní strany ochranným lakem a opatřených odtrhovací páskou. Tyto fólie mohou mít výslednou podobu trojúhelníků nebo bločků. Dále lze sýry balit do plastových vaniček a kelímků, střívek uzavřených sponou. Trvanlivost tavených sýrů je asi 3–5 měsíců (Gouda a Abou El-Nour, 2003, s. 1112–1113; Černíková a kol., 2010, s. 336; Guinee, 2011, s. 805; Kadlec a kol., 2012, s. 297; Hladká a kol., 2014, s. 650; Dostálová a Kadlec, 2014, s. 141; Anonym, 2017). Vyhláška č. 397/2016 Sb., v platném znění, udává, že se tavené sýry skladují, přepravují a uvádějí na trh při teplotě stanovené výrobcem (Česko, 2016).



Obr. 2 Diagram výrobního procesu tavených sýrů (upraveno podle Guinee, 2017, s. 1137)

1.2 Náhrady tavicích solí

Z výživového hlediska je ideální poměr absorbovaného vápníku a fosforu 1:1 nebo vyšší. U tavených sýrů se však tento poměr díky přidavku fosforečnanových tavicích solí obvykle snižuje na 1:1,5–3,0. Fosfor je sice základním biogenním prvkem, ale na druhé straně by jeho nadměrné množství mohlo být škodlivé pro strukturu kostí a mohlo by přispět k osteoporóze, zejména v kombinaci s nízkou spotřebou vápníku. Snížením množství fosforu v tavených sýrech by mohla být pravděpodobně zvýšena využitelnost vápníku v tavených sýrech, což by mohlo přispět ke zlepšení nutričního hodnocení těchto oblíbených mléčných výrobků. Tradiční tavicí soli obsahují také vysokou koncentraci sodíku (až 30 % w/w). V dnešní době je vysoké množství sodíku v lidské výživě považováno za rizikový faktor mnoha chorob. S cílem zvýšit poměr Ca: P a snížit spotřebu sodíku byly zkoušeny pokusy vyrobit tavený sýr nebo jeho analogy bez použití tradičních tavicích solí na bázi fosforečnanů a polyfosforečnanů. Hydrokoloidy se přidávají do potravinářských vý-

robků ve velmi malém množství, obvykle méně než 1,0 %. Úspěšná náhrada tavicích solí hydrokoloidy by mohla umožnit v tavených sýrech:

- snížení množství fosforu a zvýšení poměru Ca:P
- snížení koncentrace sodíku
- zavádění nových produktů se zdravotními benefity.

Způsoby náhrad tavicích solí lze rozdělit do 3 podkapitol. První přístup se zabývá snížením množství tavicích solí jejich částečnou náhradou jinými látkami. Druhé stanovisko se týká úplného nahrazení tavicích solí jinou potravinářskou přídatnou látkou nebo jejich směsmi. Poslední způsob spočívá v částečném odstranění vápenatých iontů ze surovinové směsi pomocí fyzikálních nebo fyzikálně-chemických metod (Černíková a kol., 2010, s. 336–337; Hladká a kol., 2011, s. 1–3; Hladká a kol., 2014, s. 650; Černíková, 2017, s. 26).

1.2.1 Částečné náhrady tavicích solí

Carić a Kaláb (1997, s. 481) jako první ve své práci uvedli, že lze nahradit až 50 % tradičních tavicích solí použitím cca 1 % (w/w) monoacylglycerolů a vyrobit tak stabilní a senzorycky akceptovatelný tavený sýrový výrobek. Také Kwak a kol. (2002, s. 821) dosáhli náhrady polovičního množství tavicích solí použitím částečně hydrolyzovaného kazeinu. Pluta a kol. (2000, s. 42) aplikovali rostlinné hydrokoloidy (modifikovaný škrob, lokustovou a xantanovou gumu a nízkometylovaný pektin) jako částečnou náhradu tavicích solí. Nejlepších výsledků bylo dosaženo zejména s modifikovaným škrobem a lokustovou gumou. Ve studii Van Dender a kol. (2010, s. 217) byl zkoumán brazilský tavený sýr *Requeijão cremoso*. V tomto výrobku se jednalo o nahrazení části tradičních tavicích solí na bázi fosforečnanu sodného tavicí solí na bázi sodíku a draslíku.

1.2.2 Úplné náhrady tavicích solí

Další možností je úplná náhrada tavicích solí fosforečnanového nebo citrátového typu. Schäffer a kol. (1999, s. 1213–1216; 2001, s. 672–673) použili jako náhradu tradičních tavicích solí hydrokoloidy. Autoři však blíže nspecifikovali druh hydrokoloidu, píší pouze, že se jedná o směsi hydrokoloidů rostlinného původu. Směs hydrokoloidů byla přidána v koncentraci 2 % (w/w) a tyto výrobky byly porovnány s kontrolními vzorky tavených sýrů s tradičními tavicími solemi (směs mono- a polyfosforečnanů) v koncentraci 2 % (w/w). Avšak konstatují, že u výrobků s hydrokoloidy bez použití tavicích solí nedošlo

k dostatečné peptizaci bílkovin, a tudíž nevznikla homogenní hmota taveného sýra. V práci Černíková a kol. (2010, s. 342) byly jako náhrady tavicích solí použity hydrokoloidy: lokustová guma, nízkometylovaný pektin v kombinaci s lecitinem, κ -karagenan a ι -karagenan. Jako potenciální náhrada tavicích solí byly doporučeny jen κ -karagenan a ι -karagenan, ale konečné výrobky byly velmi tuhé. Také byla zkoumána náhrada tavicích solí za použití kyseliny adipové a její soli (adipanu sodného) v koncentraci 1–3 % (w/w) v práci Hladká a kol. (2010, s. 153–154). Vzorky se zdály být homogenní z makroskopického pohledu. Dále Hladká a kol. (2011, s. 1–3) zkoumala modelové tavené sýry bez tradičních tavicích solí s přídavkem karagenanu v koncentraci 1 % (w/w). Bylo zjištěno, že vzorky tavených sýrů bez tavicích solí byly s použitím optické mikroskopie mikroskopicky homogenní. Další možnou náhradou tavicích solí je amarantová mouka v množství 1,5–8 % (w/w) a kukuřičný škrob v koncentraci 1–4 % (w/w) (Neudek, 2013, 2014). Avšak je třeba podotknout, že i amarant obsahuje fosfor a část ho je také vázána ve formě kyseliny fytové. Tato kyselina je silně negativně nabitá, a tudíž má schopnost vyvažovat multivalentní kationty jako je např. vápník, hořčík, měď a železo (Sanz-Penella a kol., 2013, s. 680; Mirinda-Ramos a kol., 2019).

1.2.3 Odstranění vápenatých iontů ze surovinové směsi

Třetí z možností náhrad tavicích solí je způsob, který spočívá ve snížení nebo úplném odstranění vápenatých iontů ze vstupní suroviny, která se pak stane lépe tavitelnou. Jedná se tedy o výrobu tavených sýrů s minimálním množstvím nebo žádným obsahem fosforečnanových tavicích solí. Tohoto poznatku využili ve svém patentu pro přípravu produktu tavený sýr bez tavicích solí Smith a Rivera (2016, 2017). Použili surovinu se sníženým obsahem vápníku, kterou je možné získávat pomocí ultrafiltrace, diafiltrace, iontovou výměnou, acidifikací, dialýzou, chelatací anebo podobnými technikami či jejich kombinací. V pracích Smith a Rivera (2016, 2017) jsou popsány různé druhy výrobků s odlišným zastoupením přírodního sýra, zdroje kazeinu se sníženým obsahem vápníku, syrovátkové bílkoviny a voda. Jednotlivé surovinové skladby se liší obsahem vápenatých iontů a dalšími funkčními vlastnostmi (např. pro roztíratelné sýry anebo pro sýry na plátkování). Dále se mohou přidávat další volitelné složky, které mohou zlepšit strukturu, chuť anebo výživovou hodnotu. Mohou to být mléčné složky (syrovátkový proteinový koncentrát, odtučněné sušené mléko, mléčný proteinový koncentrát, bezvodý mléčný tuk), škroby, želatina,

rostlinné gummy, ale také chlorid sodný, barviva, aromata, antimikrobiální látky (kyselina sorbová).

Výroba vzorků tavených sýrů probíhala podle Smith a Rivera (2016, 2017) smísením a pomletím jednotlivých surovin, následným zahřátím surovinové směsi na tavicí teplotu 70–90 °C s výdrží cca 3–5 min. Některé vzorky byly následně homogenizovány pro vytvoření hladšího a stabilnějšího produktu. Podle autorů bylo dosaženo homogenních výrobků. Tavené sýry vyrobené dle tohoto vynálezu se více přibližují aromatickému profilu přírodních sýrů, ze kterých pocházejí, jsou zdravější, jelikož obsahují méně sodíku než tradičně vyrobený tavený sýr a skladovatelností se rovnají výrobkům s použitím tavicích solí.

2 SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE

Mikroskopie je vědecká disciplína, jejímž cílem je zvětšit nepatrné částice a struktury za účelem jejich studia. Existuje celá řada nástrojů a technik, kterými je možno zkoumat objekty různých charakterů. Elektronové mikroskopy mají výrazně vyšší rozlišovací schopnost než optické mikroskopy. Rozdíl je v tom, že ke zvětšení obrazu vzorku jsou používány paprsky elektronů, nikoli fotony. Výsledné mikrofotografie jsou pouze černobílé. Existují 2 základní typy elektronových mikroskopů, a to skenovací (rastrovací) elektronový mikroskop (SEM) a transmisní elektronový mikroskop (TEM). Oba typy přístrojů byly vynalezeny přibližně ve stejnou dobu, ale mají zásadně odlišné použití. Jedním z hlavních rozdílů mezi TEM a SEM je tloušťka vzorku. V TEM musí mít vzorky tloušťku jen několik desítek až stovek nanometrů, zatímco vzorky v SEM mohou být silné několik centimetrů, což je výhodou při přípravě vzorků. SEM pozoruje a analyzuje povrch vzorku, naopak TEM zkoumá vnitřní strukturu vzorku, a umožňuje tak získat detaily, které jsou okem neviditelné. U TEM je tedy důležité znát princip fungování mikroskopu a umět interpretovat získané obrazy. Obraz vytvořený SEM je snadněji interpretován, protože poskytuje obraz, který lze vidět pouhým okem, pouze je zvětšený. SEM využívá proud elektronů, které skenují po povrchu vzorku, a vytváří tak sekundární a zpětně rozptýlené elektrony, které jsou poté detekovány a slouží k získání zvětšeného obrazu povrchu pomocí katodové trubice. SEM poskytuje trojrozměrný (3D) pohled na vzorek. Obraz je vytvářen v průběhu času při skenování celého vzorku. V TEM prochází generovaný paprsek elektronů přes ultra tenký řez pozorovaného vzorku a výsledkem je dvourozměrný (2D) obraz. Jas určité oblasti obrazu je úměrný počtu elektronů, které projdou přes vzorek. Vzhledem k povaze elektronového paprsku jsou vzorky nebo jejich repliky zkoumány ve vysokém vakuu. Oba typy mikroskopií se vzájemně doplňují a poskytují alternativní aspekty informací o mikrostruktuře. Třetí, méně využívaný typ elektronového mikroskopu, je skenovací transmisní elektronový mikroskop (STEM), který má vlastnosti obou již zmiňovaných mikroskopů. STEM používá skenovací paprsek elektronů k průniku do tenkého vzorku a ke stanovení přítomnosti a distribuce prvků ve vzorku. Využití tohoto mikroskopu je zejména analytické (Carić a Kaláb, 1997, s. 484; Bozzola a Russell, 1999, s. 9; Stokes, 2008, s. 17–19; Morris a Groves, 2013, s. 388–391; Kaláb, 2014).

2.1 Historie

Elektronový mikroskop lze považovat za jeden z nejdůležitějších vynálezů 20. století, avšak k jeho sestrojení bylo třeba objevů mnoha badatelů. Jako první přispěl svým poznatkem J. J. Thompson, který roku 1897 popsal záporně nabitě částice později nazývané elektrony. Zásadním krokem, který dále přispěl k využití elektronů k zobrazení mikrosvěta, bylo prokázání, že rychle letící částice mají nejen korpuskulární, ale i vlnový charakter jako např. viditelné světlo. Tento poznatek zveřejnil v roce 1925 Luis de Broglie. Další součástí k sestavení elektronového mikroskopu byly práce H. Buscha, publikované roku 1926, které prokázaly, že dráha elektronů může být odkloněna čočkami, stejně jako světlo čočkami optickými. Za vývoj prvního transmisního elektronového mikroskopu se zasloužil začátkem 30. let 20. století tým v Německu na Vysoké technické univerzitě v Berlíně vedený M. Knollem a E. Ruskou. Roku 1939 byla zahájena komerční výroba transmisních elektronových mikroskopů společností Siemens a Halske, která u těchto přístrojů zajišťovala rozlišovací schopnost 10 nm. Díky své práci na konstrukci prvního elektronového mikroskopu získal E. Ruska roku 1986 Nobelovu cenu za fyziku. K. Porter a jeho kolegové v roce 1945 dokázali při použití klasického papíru, že lze elektronový mikroskop využít k podrobnému zkoumání buněk. Objevení skenovacího elektronového mikroskopu (SEM) bylo však poněkud složitější. Koncept SEMu představil v roce 1935 německý fyzik M. Knoll. Následně roku 1938 vytvořil německý fyzik M. von Ardenne skenovací transmisní elektronový mikroskop (STEM), a to přidáním skenovacích cívek do transmisního elektronového mikroskopu (TEM). První SEM s rozlišením 50 nm byl postaven roku 1942 americkými vědci v čele se Zworykinem, který vynalezl fotonásobič a použil jej k detekci sekundárních elektronů. Ve stejné době se v Anglii zabývala konstrukcí SEMu skupina vědců vedená profesorem C. W. Oatleyem. I mnohé další objevy vedly ke zdokonalování skenovacího elektronového mikroskopu. V roce 1963 byl vyvinut systém nazývaný SEM V se třemi magnetickými čočkami, který se později stal prototypem prvního komerčního přístroje (1965). V následujících letech se prodalo více než 50 000 SEM do různých zemí světa (Bozzola a Russell, 1999, s. 7–11; Nebesářová a kol., 2001; Goldstein, 2003, s. 3–6; Ul-Hamid, 2018, s. 11–13).

Asi patnáct let po vývoji elektronového mikroskopu M. Knollem a E. Ruskou bylo vynaloženo úsilí o uplatnění této technologie do biologických odvětví. Následovaly významné historické pokroky v přípravě tkání. V roce 1934 publikoval L. Marton první elektronový snímek biologické tkáně. Obraz byl však kvalitně horší než obrazy ze světelného mikro-

skopu. Koncem 40. let 20. století A. Claude popularizoval fixaci osmiem. V roce 1952 použil Palade pufrovací systém pro fixaci tkáně v oxidu osmičelém. V 50. letech 20. století došlo k pokroku v pozorování biologických materiálů. V roce 1953 Porter a Blum představili první široce používaný mikrotom. Mezi lety 1957–63 bylo vyvinuto lámání vzorků mrazem a v roce 1958 Watson zavedl pokovování vodivými kovy (olovem a uranem). V roce 1963 Sabatini a jeho spolupracovníci zavedli primární fixaci glutaraldehydem (Bozzola a Russell, 1999, s. 11–12).

2.2 Skenovací elektronový mikroskop

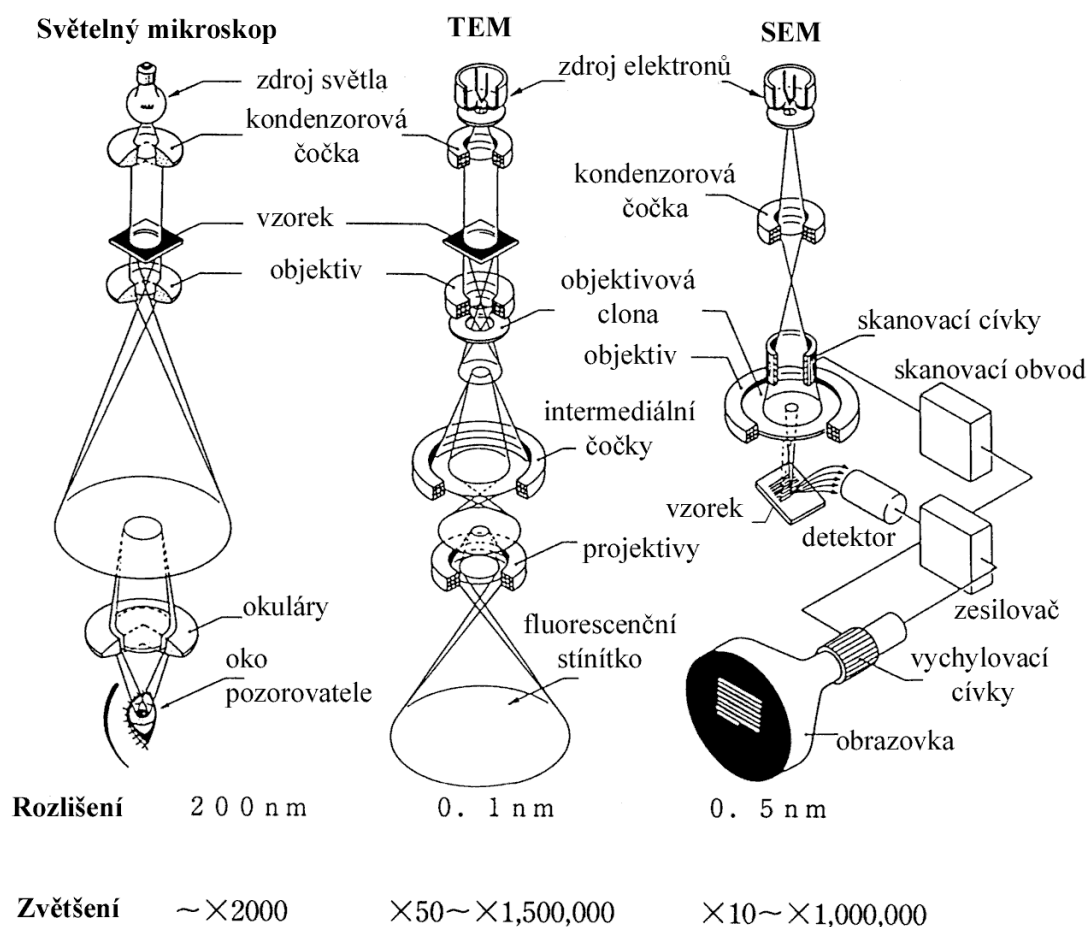
Skenovací elektronový mikroskop (SEM) umožňuje pozorovat a určovat heterogenní organické a anorganické materiály ve velikosti od nanometrů (nm) do mikrometrů (μm). Popularita tohoto mikroskopu pramení ve schopnosti získat 3D obrazy povrchů široké škály materiálů. Snímky SEMu nachází uplatnění v médiích od vědeckých časopisů až po filmy. Ačkoli je SEM univerzální, jejím hlavním využitím je získání topografických obrazů ve zvětšení 10–10 000 krát (Goldstein, 2003, s. 1).

Skenovací elektronový mikroskop je využíván k pozorování povrchů různých objektů. Výsledný obraz je tvořen pomocí sekundárních signálů – odražených a sekundárních elektronů, kvůli kterým je zobrazení pomocí SEM považováno za nepřímou metodu. V porovnání se světelným mikroskopem je velkou předností značná hloubka ostrosti, která je částečně odpovědná za 3D vzhled obrazu vzorku. Jelikož SEM doplňuje informace dostupné ze světelného mikroskopu, je tato technika užitečná i ve forezních studiích i jiných oborech. V literatuře se kromě názvu skenovací používá i označení rastrovací nebo český název řádkovací elektronový mikroskop. V SEM je zkoumaná oblast vzorku ozářena jemně zaostřeným elektronovým paprskem, který může probíhat v rastru po povrchu vzorku za účelem vytvoření obrazů, nebo může být statický pro získání obrazu v jedné poloze. Signály produkované po interakci elektronového paprsku se vzorkem zahrnují sekundární elektrony, odražené elektrony, rentgenové záření a další elektrony s různou energií. Tyto signály jsou získávány ze specifických objemů a mohou být použity ke zkoumání mnoha charakteristik daného vzorku (např. povrchová topografie, krystalografie, složení atd.). Nejvhodnějšími typy vzorků pro SEM jsou kovy, především proto, že tyto materiály jsou méně náchylné k účinkům nabíjení a poškození při elektronovém ozařování ve vysokém vakuu (Nebesářová a kol., 2001; Goldstein, 2003, s. 1–3; Webb a Holgate, 2003, s. 3922; Morris a Groves, 2013, s. 4).

2.3 Konstrukce skenovacího elektronového mikroskopu

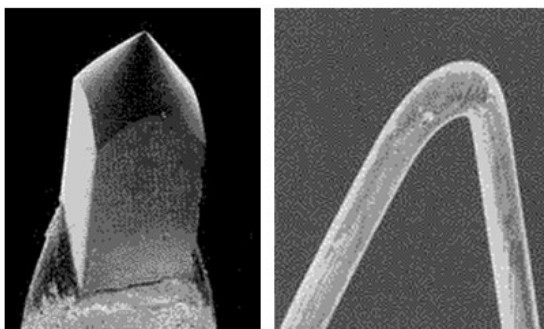
Zpravidla se SEM skládá ze zdroje elektronů, který slouží ke generování paprsku primárních elektronů, kolony s elektromagnetickými čočkami pro zaostření a zvětšování primárních elektronů, dále z cívek pro skenování elektronů na povrchu vzorku, komory se stolem pro přichycení vzorku, vakuové pumpy pro udržení systému ve vakuu (obvykle v řádech 10^{-5} – 10^{-7} Pa) a jednoho nebo více detektorů, které shromažďují signály vytvořené ozářením vzorku elektrony. Nakonec je zvětšený obraz zobrazen na monitoru, protože paprsek je napříč zorným polem snímám pixel po pixelu (Stokes, 2008, s. 19; Morris a Groves, 2013, s. 4).

Už na první pohled je zřejmé, že se skenovací elektronový mikroskop (SEM) značně odlišuje od transmisního elektronového mikroskopu (TEM). Jedná se zejména o různou délku tubusu, která je u SEMu poloviční. Tento rozdíl, je dán tím, že se v SEMu detekují signály, které uvolnil primární svazek elektronů nad povrch preparátu, a tudíž není potřeba soustava čoček, která právě u TEMu tvoří zobrazovací systém ve spodní části tubusu. Zdrojem elektronů ve špičce tubusu je u SEMu nejčastěji přímo žhavené wolframové vlákno, stejně tak je tomu i u TEMu. Rozlišovací schopnost přístrojů s wolframovou přímo žhavenou katodou se pohybuje mezi 10–15 nm. Primární elektrony jsou urychlovány potenciálem mezi katodou a anodou, která má ve svém středu kruhový otvor, kterým prolétají primární elektrony do soustavy elektromagnetických čoček. Soustava elektromagnetických čoček má za úkol co nejvíce zmenšit průměr svazku elektronů, které dopadají na povrch prohlíženého preparátu. Soustava čoček se skládá z jedné nebo dvou kondenzovaných čoček a z objektivové čočky s proměnou zmenšovací výkonností. Významnou součástí systému je stigmátor, který koriguje astigmatismus elektromagnetických čoček. Tato vada čoček má při práci se SEM podstatnou roli a ovlivňuje konečnou kvalitu obrazu. V dolní části tubusu se nachází komora preparátů, ve které je umístěn goniometrický stůl pro přichycení vzorků umístěných v držáku preparátů. Stůl umožňuje s preparátem pohybovat a otáčet. V blízkosti preparátu jsou umístěny detektory jednotlivých signálů, např. sekundárních a odražených elektronů, rentgenového záření a dalších dle vybavení mikroskopu (Nebesářová a kol., 2001). Srovnání jednotlivých typů mikroskopů je zobrazeno na Obr. 3.



Obr. 3 Porovnání konstrukce jednotlivých typů mikroskopů (Nebesářová a kol., 2001)

V SEMu se místo světla ke zvětšení obrazu vzorku používá elektronový paprsek. Elektronové jsou záporně nabitě částice, které se chovají jako záření s velmi krátkou vlnovou délkou. Jako zdroje elektronů jsou využívány kovy, u nichž je výstupní práce elektronů co možná nejnižší a hustota proudu co největší. Elektron je z kovu uvolněn do prostoru pouze v případě, že elektron získá v kovu dostatečnou energii. Existuje několik způsobů, jak dosáhnout možné emise elektronů z kovu, např. termoemisí, fotoemisí nebo působením elektrického pole. Nejrozšířenějším elektronovým zdrojem je termoemisní tryska. Jako emitore elektronů se nejčastěji používá žhavené wolframové vlákno, wolframový monokrystal nebo hexaborid lanthanu LaB_6 (viz Obr. 4) (Foret, 2010; Kaláb, 2014).

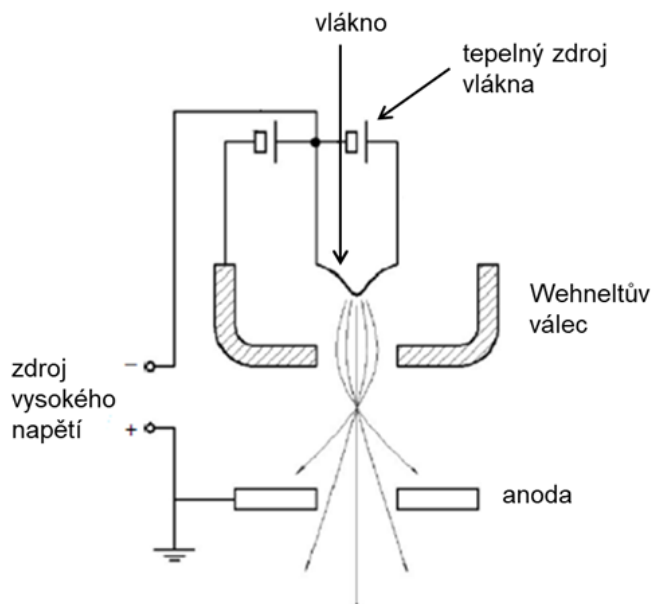


Obr. 4 Ukázka LaB₆ krystalu (vlevo) a wolframového vlákna (vpravo)

(Nebesářová a kol., 2001)

Termoemísí zdroj elektronů je uložený ve špičce tubusu a má zpravidla 3 části: wolframové vlákno, které emituje elektrony; Wehneltův válec, jenž reguluje počet elektronů opouštějících zdroj a anodu, která dodává elektronům urychlovací napětí 0,1–30 keV. Je zde nutná přítomnost vakua, protože elektrony jsou schopny se ve vzduchu pohybovat jen na velmi krátkou vzdálenost. Jakmile projde vláknem elektrický proud, dojde k zahřátí a následné termoemisi. Wolframové vlákno vytvarované do písmene „V“ zvyšuje pravděpodobnost úniku elektronů. Výborným termoemísíním zdrojem elektronů jsou katody z monokrystalu LaB₆, u kterých je zapotřebí mnohem vyšší vakuum (10^{-5} Pa), ve srovnání s wolframovým vláknem (10^{-3} Pa). LaB₆ zdroj poskytuje lepší kvalitu obrazu a jeho životnost je podstatně delší než u wolframového vlákna (zhruba 1000 hod vs. 100 hod). Wolframový hrot bývá zahříván nepřímou, stejně tak i katoda LaB₆, která je vložena mezi dvěma uhlíkovými elektrodami. Elektronový zdroj by měl poskytovat soudržný svazek elektronů, z toho vyplývá, že by elektrony měly vycházet z bodového zdroje, měly by mít stejnou energii a jejich vlna by měla být ve stejné fázi. Většina SEM dokáže produkovat svazek elektronů o průměru menším než 10 nm. Jelikož je u SEMu požadován vyšší emisíní proud, dochází k přehřívání katody, která se tím rychleji opotřebovává a snižuje se její životnost. Výběr urychlovacího napětí závisí zejména na druhu preparátu, požadovaném zvětšení a do jaké míry se nabíjí povrch pozorovaného vzorku. Nepříznivé efekty nabíjení je možné z části eliminovat snižováním urychlovacího napětí, ale zvyšují se tím vady čoček, které vedou ke snížení rozlišovací schopnosti (Lyman, 1990, s. 3; Reimer, 1998, s. 13–14; Nebesářová a kol., 2001; Goldstein, 2003, s. 22–30; Pechak a Smith, 2007, s. 24;

Stokes, 2008, s. 21–22; Foret, 2010). Schéma a složení zdroje elektronů je zobrazeno na Obr. 5.

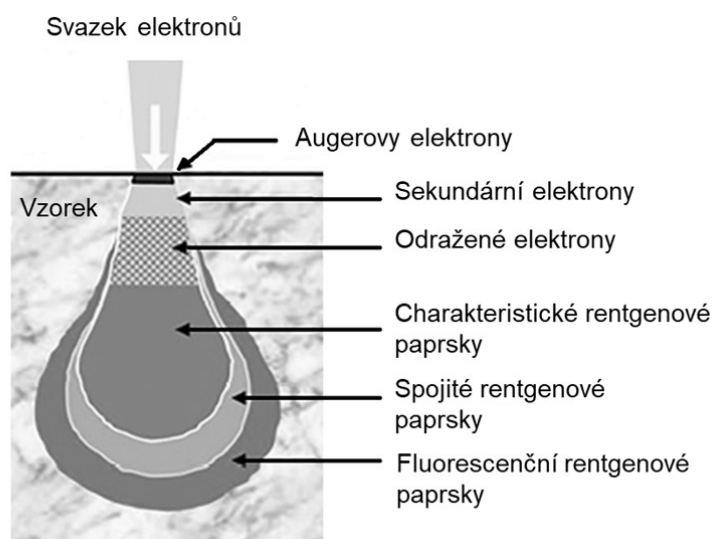


Obr. 5 Schéma zdroje elektronů (upraveno podle Zhou a kol., 2006, s. 11)

Elektronický optický systém v rastrovacím elektronovém mikroskopu se skládá z elektromagnetických čoček (kondenzátor a objektiv), clony, stigmátoru a skenovacích cívek. Hlavní funkcí těchto komponent je vytvořit jemnou elektronovou sondu, která skenuje danou oblast na vzorku ve formě rastru. Čočky v SEM se používají ke zmenšení průměru nebo zaostření elektronového paprsku generovaného zdrojem elektronů, který dopadá na povrch zkoumaného vzorku. Elektromagnetické čočky jsou analogické s tenkými konvexními čočkami používanými pro zaostření viditelného světla v optické mikroskopii. Elektromagnetické čočky jsou vyrobeny z měděné cívky uzavřené v železném plášti mající válcové pólové nástavce. Soustava čoček je obvykle tvořena jednou nebo dvěma kondenzátorovými čočkami a objektivovou čočkou s proměnnou zmenšovací výkonností. Čočka, která je umístěna blíže ke zdroji se nazývá kondenzátorová čočka, naopak objektivová čočka je blíže pozorovanému vzorku. Funkcí objektivové čočky je pohybovat nejmenším průřezem paprsku nahoru a dolů, dokud není dosaženo povrchu vzorku, což odpovídá zaostřenému obrazu vzorku. Elektromagnetickými čočkami zkoncentrovaný paprsek primárních elektronů je před dopadem na povrch preparátů rozpoříván vychylovacími cívkami tak, že pokryje řádky – rastruje – malou plošku daného preparátu. Synchronně s primárním

svazkem elektronů rastruje i paprsek tvořící obraz na obrazovkách mikroskopu. Počet řádků je možné měnit od desítek do několika tisíc a zároveň lze měnit i rychlost přeběhu paprsku v jednom řádku (Lyman, 1990, s. 4; Nebesářová a kol., 2001; Ul-Hamid, 2018, s. 37).

Při dopadu elektronového paprsku na vzorek se generuje mnoho typů signálů (např. sekundární elektrony, zpětně odražené elektrony, absorbované elektrony, rentgenové záření, Augerovy elektrony) a kterýkoli z nich lze zobrazit jako obraz. Popis signálů, které vznikají v různých hloubkách vzorku, je znázorněn na Obr. 6. Nejčastěji používané signály k vytváření SEM obrazů jsou sekundární elektrony (SE) a zpětně odražené elektrony (BSE). Standardní detektor Everhart–Thornley (E–T) pracuje zároveň se sekundárními i zpětně rozptýlenými elektrony. Detektor E–T patří mezi nejčastěji používané detektory sekundárních elektronů. Je tvořen scintilátorem, který po dopadu elektronu uvolní záblesk světla z viditelné oblasti (550–650 nm). Intenzita záblesku je přímo úměrná energii elektronů, které ho vyvolaly. Světlo je dále vedeno světlovodem a komoru SEM opustí průchodem křemenným okénkem. Mimo vakuum je umístěn fotonásobič, který zachytí světelný signál a převede jej na elektrický, přičemž dojde k zesílení signálu zhruba 1000 až 1000 000 krát. Existuje několik typů detektorů zpětně odražených elektronů, za zmínění stojí např. již uvedený detektor Everhart–Thornley, polovodičový detektor využívající p–n přechodu nebo Schottkyho dioda (Nebesářová a kol., 2001; Goldstein, 2003, s. 24; Stokes, 2008, s. 18).



Obr. 6 Signály vznikající v různých hloubkách vzorku (upraveno dle Hilal, 2016)

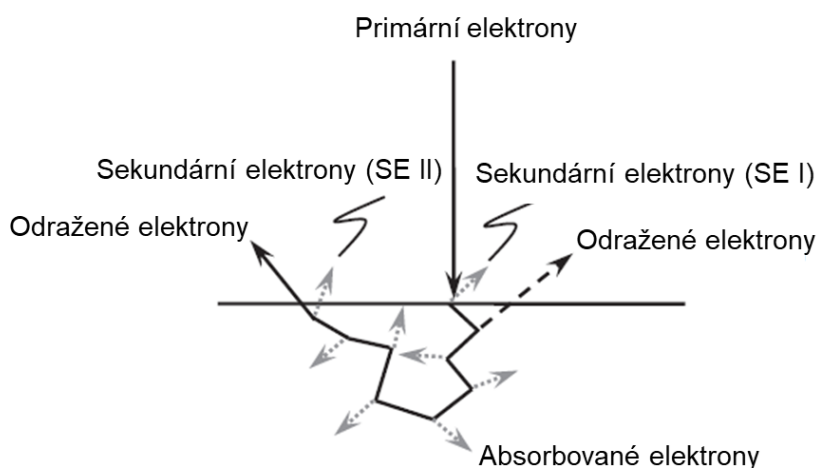
Získávání obrazu ve skenovacím elektronovém mikroskopu (SEM) je založeno na interakci primárního svazku elektronů s povrchem prohlíženého vzorku. Interakce mezi primárními elektrony a atomy preparátu lze rozdělit do 2 kategorií: elastické a neelastické. Elastický rozptyl je výsledkem výchylky dopadajícího elektronu atomovým jádrem vzorku nebo elektrony vnějšího pláště podobné energie. Elastická interakce je charakterizována zanedbatelnou ztrátou energie během kolize a změnou rozptýleného elektronu. Tyto interakce mají na svědomí vznik zpětně odražených elektronů. K neelastickému rozptylu dochází prostřednictvím různých interakcí mezi dopadajícími elektrony a elektrony a atomy vzorku. Primární elektrony předávají energii atomům vzorku a následně dochází k uvolnění sekundárních elektronů, rentgenovému záření, Augerových elektronů a katodoluminiscenci (Nebesářová a kol., 2001; Zhou a kol., 2006, 2–3).

Nejrozšířenějším signálem vytvářeným interakcí primárního elektronového paprsku se vzorkem je sekundární elektronový emisní signál. Jakmile zasáhne primární paprsek povrch vzorku a způsobí ionizaci atomů vzorku, mohou být emitovány volně vázané elektrony, označovány jako sekundární elektrony (SE). Existují 2 typy sekundárních elektronů: SE typu I generované primárním elektronovým paprskem a SE typu II, které jsou způsobeny zpětně rozptýlenými elektrony (viz Obr. 7). Jejich energie je nižší než 50 eV, avšak energie většiny z nich se nachází obvykle v průměru 3–5 eV. Sekundární elektrony se využívají k získávání informací o struktuře na povrchu vzorku (Zhou a kol., 2006, s. 4–6; Stokes, 2008, s. 32; Morris a Groves, 2013, s. 6).

Zpětně odražené elektrony (BSE) jsou generovány elastickým rozptylem primárních elektronů ve vzorku a jsou konvenčně definovány jako zdroje energie od 50 eV až po velikost energie primárních elektronů. Vznikají v hlubších vrstvách vzorku (cca 10^2 – 10^3 nm). BSE jsou náhodné elektrony odrážející se zpět od skenované oblasti. BSE poskytují informace o distribuci atomového čísla ve vzorku s oblastmi s vyšším atomovým číslem, které se jeví jako jasnější než ty s nižším atomovým číslem. Tyto elektrony přinášejí informace o prvcích, které jsou hluboko pod povrchem vzorku. Výsledné mikrografy poskytují údaje o složení pozorovaných vzorků (Zhou a kol., 2006, s. 6–7; Lewis, 2007, s. 10; Morris a Groves, 2013, s. 5–6; Pedergnana a kol., 2020, s. 3).

Augerovy elektrony jsou energeticky specifické a lze je použít pro určování složek ve vzorcích. Vznikají po ionizaci atomu dopadajícím elektronovým paprskem a pádem z vnějšího elektronového obalu, aby se vyplnil vnitřní prostor pláště. Přebytečná energie, která se uvolnila tímto procesem, může být odváděna Augerovým elektronem. Tento elek-

tron má charakteristickou energii, a proto může být použit k poskytnutí chemických informací o vzorku. Díky jejich nízké energii jsou Augerovy elektrony emitovány pouze v blízkosti povrchu. Rentgenové záření (RTG) je často používáno pro mikroanalýzu v SEM. RTG souvisí s chemickými prvky ve vzorku, a tak toto záření poskytuje kvantitativní nebo kvalitativní informace o chemickém složení, a to buď prostřednictvím spektra anebo mapováním přítomných prvků (Zhou a kol., 2006, s. 6–7; Lewis, 2007, s. 10; Morris a Groves, 2013, s. 6).



Obr. 7 Schéma znázorňující cestu primárních elektronů a emise odražených a sekundárních elektronů (upraveno podle Stokes, 2008, s. 32)

Rozlišení znamená schopnost rozlišit nejmenší vzdálenost dvou bodů v obraze vhodného objektu, které můžeme rozeznat jako oddělené. Prostorové rozlišení SEM je řízeno manipulací se čtyřmi důležitými parametry elektronového paprsku, konkrétně se jedná o velikost sondy, proud paprsku, konvergenční úhel a urychlující napětí. Hloubka ostrosti je jednou z nejdůležitějších charakteristik SEM. Je to schopnost mikroskopu zaostřit na různé hloubky současně tak, aby povrchy vzorků v různých vzdálenostech od čočky zůstaly zaostřeny. SEM má schopnost zaměřovat se na velké hloubky ostrosti, což z ní činí jeden z nejučinnějších nástrojů pro 3D zobrazování na mikro a nano úrovni. Je toho využíváno pro zobrazení hrubých vzorků, jako jsou např. lomové povrchy, korozní usazeniny, pevné látky ve formě prášku apod. Vnitřní prostor tubusu a preparátové komory je v SEM vyplněn vakuem určité hodnoty v závislosti na typu použitého elektronového zdroje. U přímo žhavené wolframové katody to je 10^{-2} až 10^{-3} Pa. Pro získání a udržení hodnoty vakua obvykle stačí dvoustupňový čerpací systém, který tvoří rotační a difúzní pumpa. Obvyklým

výstupem ze SEM je fotografie. Mimo pozorovací obrazovky mají tyto mikroskopy i fotomonitor s jemnějším zrnem, ke kterému je připojen fotoaparát. K vytvoření obrazu na fotografickém filmu se používají fotony, tím pádem lze použít normální černobílý fotografický materiál (Lyman, 1990, s. 13; Nebesářová a kol., 2001; Ul-Hamid, 2018, s. 130, 141).

2.4 Metody přípravy vzorků pro skenovací elektronovou mikroskopii

Většinu materiálů (zejména biologických) nelze ve skenovacím elektronovém mikroskopu prohlížet bez jejich úpravy. Aby byl preparát vhodný pro prohlížení v mikroskopu, musí splňovat následující kritéria, která je při přípravě vzorku potřeba brát v potaz. Vzorek musí mít čistý povrch, neměly by se tam vyskytovat cizorodé částice, např. prach. Musí být stabilní ve vakuu i při ozáření elektronovým paprskem. Dále by měl preparát produkovat dostatek požadovaného signálu (např. sekundárních elektronů) a při expozici primárních elektronů by nemělo docházet k jeho nabíjení. Vzorky obsahující vodu musí být před pozorováním fixovány, dehydratovány a sušeny. Hlavní způsoby přípravy vzorku pro SEM spolu souvisejí a lze je uvést jako:

- fixace, dehydratace, sušení
- zmrazení v kapalném dusíku a následné prohlížení vzorku při zmrazení v kryoskenovacím elektronovém mikroskopu
- bez přípravy (lze jen u suchých vzorků s nízkým obsahem tuku, ale vždy to stojí za zvážení).

Přípravu vzorku pro SEM lze rozdělit podle druhu fixace na metody chemické a fyzikální, příp. kombinace metody chemické a fyzikální. Výběr metody však závisí na typu preparátu a informacích, které chceme pozorováním získat. Přípravě vzorku je potřeba věnovat dostatek času, jelikož špatná příprava bývá často zdrojem artefaktů (Nebesářová a kol., 2001; Morris a Groves, 2013, s. 394–395).

2.5 Příprava vzorků chemickou cestou

Příprava biologického materiálu pro SEM obvykle zahrnuje tyto kroky: odebrání a čištění povrchu vzorku, fixace ponořením do fixačního činidla, vymytí fixačních roztoků, dehydratace, vysušení preparátu a jeho nalepení na nosný terčik a pokovení. Postup přípravy vzorku trvá asi 2–3 dny. Se vzorkem je nutné pracovat opatrně, aby během přípravy nedo-

šlo k jeho poškození. Velikost vzorku závisí na velikosti posuvu stolku preparátů a na způsobu jeho přípravy. Obecným přístupem je, aby byl vzorek co nejmenší, aniž by to ohrozilo vzhled jeho požadovaných rysů a schopnost mikroskopu tyto rysy zobrazit a analyzovat. Pokud chceme zkoumat pouze vnější povrch lze fixovat i velké preparáty v rozměru několika centimetrů. Výhodou chemické fixace je to, že tyto chemikálie jsou poměrně stabilní, techniky manipulace se vzorky jsou jednoduché, materiály mohou být v roztoku skladovány po určitou dobu, není potřeba žádné významné vybavení a fixační prostředky jsou relativně levné (Nebesářová a kol., 2001; Dykstra a Reuss, 2003, s. 3; Echlin, 2009, s. 17).

2.5.1 Čištění povrchu vzorku

Předmětem zájmu v SEM je povrch vzorku, proto je důležité nejprve vyčistit povrch materiálu, který by jinak mohly zkoumané struktury zakrýt. Před fixací je třeba odstranit nečistoty, jako je hlen, sekret, bakterie, zbytky buněk, prach apod. Rozsah, v jakém je povrch vzorku čištěn, závisí na povaze vzorku, chemickém složení povrchu a prostředí, ze kterého je vzorek odebrán. Větší částice lze odstranit pomocí jemné jehly a pracovat pod stereomikroskopem. Také lze vzorek opláchnout isotonickým roztokem např. s NaCl nebo HCl. Po fixaci lze vzorek omývat kakodylanovým nebo fosfátovým pufrům. U suspenzí je možné použít opatrnou centrifugaci (Bozzolla a Russell, 1999, s. 50; Nebesářová a kol., 2001). Echlin (2009, s. 236) ve své práci uvádí, že kontaminované vzorky mohou mít negativní dopad na SEM třemi způsoby:

- 1) Znečištění kapalinami, pevnými látkami a parami ohrožuje optimální provoz SEM
- 2) Kontaminace mění a zhoršuje fyzický vzhled vzorku
- 3) Kontaminace mění a ohrožuje přírodní chemické vlastnosti vzorku.

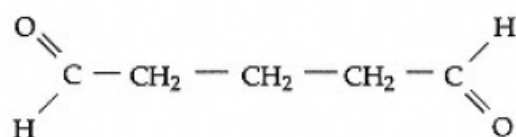
Existují 2 obecné typy čištění, a to bezkontaktní čištění, ve kterém nedochází k fyzickému kontaktu mezi vzorkem a čistícím prostředkem, a kontaktní čištění, kde dochází k fyzikálnímu a chemickému kontaktu vzorku a čistícího prostředku (Echlin, 2009, s. 236).

2.5.2 Fixace a postfixace

Hlavním účelem fixace a postfixace je stabilizovat strukturu živé tkáně beze změny od živého stavu a zamezit autodegradačním procesům. Totéž platí i v případě potravin, kde se již zpravidla nejedná o živé tkáně, ale i tak je potřeba, aby byly změny při fixaci a postfixaci minimální. Fixace by navíc měla vzorky chránit před narušením během jejich vkládá-

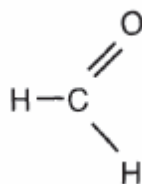
ní do mikroskopu a vystavením elektronovému paprsku. Od fixace se také očekává zpevnění povrchových struktur preparátu určených k pozorování. Běžnými fixačními činidly jsou glutaraldehyd, formaldehyd a oxid osmičelý (OsO_4). Historicky prvním fixačním činidlem používaným pro elektronovou mikroskopii byl oxid osmičelý (OsO_4). Preparáty byly v činidle buď ponořeny anebo byly vystaveny parám OsO_4 . Později byl OsO_4 použit ve fyziologickém pufrovacím systému. Roku 1963 byl vyvinut glutaraldehyd (GA), používaný dnes ve většině laboratoří. Při chemické fixaci se jako primární činidlo používá glutaraldehyd (GA) k fixaci proteinů a jako sekundární, postfixační činidlo k fixaci lipidů oxid osmičelý (OsO_4). Zatím nebylo nalezeno fixační činidlo, které by bylo vhodné pro všechny typy vzorků. Fixaci může ovlivňovat samotné fixační činidlo, složení pufru, ve kterém je činidlo rozpuštěno, ale také koncentrace činidla, doba a teplota jeho působení. Fixační roztoky se připravují v kombinaci s tlumivým roztokem. Je důležité, aby výsledný roztok měl vhodnou osmolalitu a pH. Čas fixace je přímo úměrný velikosti preparátu. Rychlost fixace je možné ovlivnit teplotou, obvykle se fixuje při pokojové teplotě, výhodné je urychlit fixaci mikrovlnným ohřevem (Bozzolla a Russell, 1999. s. 19–20, 50; Nebesářová a kol., 2001; Kaláb, 2014).

Nejlepším fixačním činidlem je glutaraldehyd (GA), který obsahuje 2 aldehydické skupiny a jeho strukturní vzorec je na Obr. 8. Komerčně je prodáván jako vodný čirý roztok se štiplavým zápachem. Během fixace reaguje GA převážně s peptidy a bílkovinami, rychle reaguje s aminoskupinou lysinu. Toto silné zesítnění proteinů je prakticky nevratné, na rozdíl od reverzibilního zesítnění formaldehydu. I když tento fixační prostředek ovlivňuje sekundární strukturu proteinů, jejich terciární struktura není ovlivněna. Nereaguje však s lipidy, některými polysacharidy a proteoglykany. Avšak pravděpodobně reaguje pouze s fosfolipidy obsahujícími volné aminoskupiny. Oproti formaldehydu má GA nižší penetrační schopnost, a proto je třeba prodlužovat časy fixace. Penetrační schopnost GA je ovlivňována teplotou fixačního roztoku, jeho složením a osmolalitou, strukturou a charakterem fixovaného vzorku, způsobem fixace, promícháváním roztoku apod. (Bozzolla a Russell, 1999. s. 20; Nebesářová a kol., 2001; Dykstra a Reuss, 2003, s. 16–17).



Obr. 8 Strukturní vzorec glutaraldehydu (Bozzolla a Russell, 1999, s. 20)

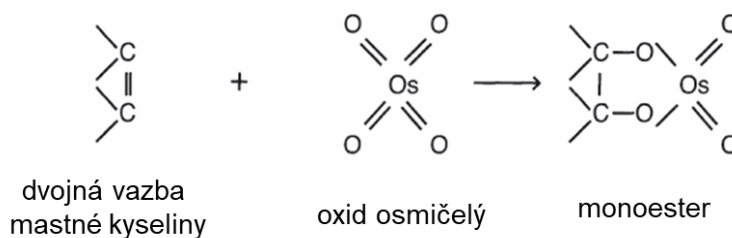
Formaldehyd (FA) se používal jako standardní histologické fixační činidlo ještě před objevením elektronové mikroskopie. Jedná se o nejmenší a nejjednodušší aldehyd se sumárním vzorcem CH_2O (viz Obr. 9), tím pádem rychleji proniká do vzorků. FA je za pokojové teploty plynem se štiplavým zápachem, dobře rozpustným ve vodě. Komerčně je prodáván jako vodný roztok. FA zesítuje slaběji než jiné aldehydy a může být z tkání vyplachován vodným roztokem. Jelikož se nejedná o silné zesítující činidlo, má tendenci ponechat většinu struktur proteinů nezměněnou, a je tedy vhodným fixačním prostředkem pro různé enzymové cytochemické postupy. FA penetruje do vzorku rychleji, a proto je vhodný na fixaci větších objektů, kde není důležité zachovat buněčnou ultrastrukturu. FA může reagovat s dvojnými vazbami nenasycených lipidů, také reaguje s nukleovými kyselinami a proteiny, aniž by narušil jejich lineární strukturu. Zachování nukleových kyselin je pravděpodobně způsobeno interakcí formaldehydu s proteinovou složkou nukleoproteinů. Stejně jako u čistých bílkovin reakce formaldehydu s nukleoproteiny je reverzibilní ve vodných roztocích (Nebesářová a kol., 2001; Dykstra a Reuss, 2003, s. 12–13).



Obr. 9 Strukturální vzorec formaldehydu (Dykstra a Reuss, 2003, s. 12)

Oxid osmičelý (OsO_4) se vyskytuje za pokojové teploty ve formě průsvitných krystalků nažloutlé barvy. Je velmi těkavý, jeho páry dráždí a leptají sliznice dýchacích cest, oči a kůži. Má silné oxidační účinky, když reaguje s organickými sloučeninami, vzniká tzv. osmiová čern ($\text{OsO}_2 \cdot n \text{H}_2\text{O}$), která způsobuje zčernání preparátů po fixaci OsO_4 . Na fixaci se nejčastěji používají 1–4% vodné roztoky OsO_4 , které jsou dostatečně stabilní. OsO_4 je jedním z nejpomaleji pronikajících fixačních prostředků, které používáme, a nemá žádné schopnosti zesílení buněčných komponent. Během fixace neproniká do velké hloubky preparátu, ale zůstává na povrchu, díky tomu jej zpevňuje a snižuje tím nábojové artefakty. Jedná se o silné oxidační činidlo, které hluboce inaktivuje prakticky všechny enzymy. Je rozpustný v polárních i nepolárních médiích, a tak může proniknout a fixovat jak hydrofobní, tak i hydrofilní oblasti v buňkách. Při fixaci reaguje s α -aminokyselinami za vzniku α -ketokyselin a karboxylových kyselin. OsO_4 reaguje přímo s nenasycenými lipidy oxidací

dvojných vazeb (viz Obr. 10), což vede k tvorbě monoesterů, diesterů a dimerních monoesterů. Všechny třídy lipidů jsou tedy potenciálně konzervovány fixací osmiem, buď přímou chemickou reakcí, nebo nepřímo v případě nasyčených lipidů. Nereaguje s většinou pentóz a hexóz (Bozzolla a Russell, 1999. s. 21; Nebesářová a kol., 2001; Dykstra a Reuss, 2003, s. 9–10).



Obr. 10 Interakce OsO_4 s dvojnou vazbou v mastné kyselině lipidu za vzniku monoesteru (Dykstra a Reuss, 2003, s. 10)

2.5.3 Promývání a odvodnění

Po fixaci glutaraldehydem a postfixaci oxidem osmičelým je vzorek vymýván vypíracími roztoky, které se skládají z pufru a přídatku sacharózy nebo glukózy. Promývání je potřeba provádět důkladně, aby povrch, který bude zkoumán, byl zbaven zbytků fixačního činidla a nečistot. Na pufrů využíváné v elektronové mikroskopii jsou kladeny vysoké nároky. Je potřeba, aby měl pufr dostatečnou tlumící kapacitu, byl chemicky stabilní a odolný vůči degradaci enzymy a jinými biologicky aktivními látkami, nebyl cytotoxický a nedisocioval. Prozatím neexistuje ani jeden, který by splňoval všechna uvedená kritéria. Mezi nejpoužívanější patří kakodylanový a fosforečnanový pufr. Fosforečnanový pufr je levný, netoxický, dobře zachovává membrány a buněčné organely. Spolehlivě pufruje do pH 7,4. Zásobní roztok fosforečnanu draselného nebo sodného se skladuje v lednici, ale jeho nevýhodou je krátká trvanlivost a tvorba zákalů. Fosforečnanový pufr je pravděpodobně nejpoužívanější v biologii. Kakodylanový pufr je často používán při aldehydové fixaci. Jeho zásobní roztoky mají dlouhou trvanlivost, nevýhodou je však vysoká pořizovací cena a toxicita způsobená přítomností arsenu. Jedná se o druhý nejčastěji používaný pufrovací materiál v elektronové mikroskopii (Bozzolla a Russell, 1999. s. 22; Nebesářová a kol., 2001; Dykstra a Reuss, 2003, s. 27–28).

Odvodnění neboli dehydratace spočívá v postupném nahrazení vody ve vzorku organickým rozpouštědlem. Tento krok následuje po postfixaci oxidem osmičelým a jeho vymýváním ze vzorku puřem. Běžná dehydratační činidla jsou etanol a aceton. Při odvodnění projde vzorek řadou roztoků se zvyšující se koncentrací organického rozpouštědla, např. 30, 50, 70, 80, 90, 95 a 100% roztok etanolu resp. acetonu. Důležité je, aby byl vzorek během odvodňování stále ponořený pod hladinou roztoků a nevyschnul. Čas jednotlivých kroků dehydratace závisí na velikosti preparátu a pohybuje se v rozmezí 10–30 min (Nebesářová a kol., 2001). Káláb (2014) uvádí několik postupů, jak u vzorku zabránit tvorbě vodní páry. Jedním ze způsobů je již zmiňovaná dehydratace vzorku, dále pak zmrazení nebo replikace buď dehydratovaných, nebo zmrazených a lyofilizovaných vzorků. Zmrazené vzorky jsou pak obvykle frakturovány (lámány) za účelem zkoumání vnitřní struktury pomocí SEM. Zlomení vzorků může být provedeno kryofakturací (mrazové lámání) anebo suchým lomem (Bozzolla a Russell, 1999. s. 58; Kaláb, 2014).

2.5.4 Sušení

Po úplném nahrazení vody je nutné ze vzorku odstranit dehydratační činidlo, k čemuž slouží krok sušení. Sušení lze provádět několika způsoby. Sušení na vzduchu je nejjednodušší metodou, ale může zde docházet k různým deformacím vzorku, které uvádí ve své práci Řiháčková (2015), proto není tento způsob sušení vhodný pro většinu preparátů. Nejpoužívanější a nejrozšířenější postup sušení je metoda sušení ke kritickému bodu (CPD), která umožňuje vyhnout se škodlivému působení povrchového napětí dehydratační kapaliny na vzorek. Jedná se o rychlou metodu, která ve většině případů poskytuje spolehlivé výsledky. Tato metoda je založena na skutečnosti, že při zahřívání kapaliny v omezeném prostoru se dosáhne stavu, který je označován jako kritický a je charakterizován kritickou teplotou a tlakem. Sušení při kritickém bodu je založeno na teorii, že při určité teplotě (31 °C) a tlaku (7,29 MPa) v omezeném prostoru přechází kapalný oxid uhličitý (CO₂) na plyný. V kritickém stavu nejsou rozdíly mezi fázemi obou látek, mají stejnou hustotu a měrný objem, nejsou odděleny rozhraním a povrchové napětí klesá na nulu. V této chvíli je vhodné převést kapalinu na plyn, který se vypustí z uzavřené komory, a tímto způsobem vysušit vzorek bez poškození povrchovým napětím kapaliny, ve které se nachází. V laboratořích je nejčastěji využíván kapalný CO₂, který je běžně dostupný a levný. Proces je prováděn ve speciálních aparaturách, dodávaných různými firmami. Do chlazené a pod tlakem udržované komory je vložen vzorek, do které je následně přiveden ka-

palný CO₂. Po nahrazení veškerého etanolu či acetonu je dosaženo kritického stavu tzn., že se zvýší teplota a tlak. Teplota je udržována při kritickém bodě, dokud se neodpaří z komory plynný CO₂. Jakmile se dosáhne atmosférického tlaku, je sušení u konce, komora se otevře a jsou vyjmuty vysušené vzorky. I když tato metoda dává vynikající výsledky, tak i zde se mohou vzniknout artefakty (Savello a kol., 1989, s. 4; Bozzolla a Russell, 1999, s. 54; Nebesářová a kol., 2001; Castejón, 2003, s. 9–10; Zhou a kol., 2006, s. 34–35; James, 2009, s. 115).

2.5.5 Lepení a pokovování vzorku

Vysušený vzorek je přichycen na kovový nosič („držák“) vzorků pomocí lepidla anebo oboustranně lepící uhlíkové nebo adhesivní pásky, některé vzorky však mohou být nejprve připevněny k řadě různých substrátů (např. sklíčko mikroskopu, krycí sklo, nerezová ocel, mikroporézní filtr atd.). Nosiče jsou nejčastěji vyrobeny z hliníku a mají tvar kruhové podložky, která se liší průměrem u různých typů SEM. Použité lepidlo nesmí obsahovat vodu, nemělo by být hygroskopické, mělo by být nevzlínavé, elektricky vodivé a stabilní ve vakuu a mělo by udržet vzorek na nosiči při náklonu a nemělo by emitovat stejně jako nosič zpětně odražené elektrony. Lepení je kontrolováno binokulární lupou, aby vzorky byly ve vhodné poloze při prohlížení. Biologické vzorky, které byly podrobeny sušení, jsou většinou křehké a náchylné k poškození, proto je potřeba s nimi manipulovat velmi opatrně. Na připevnění vzorků na substráty či držáky lze použít řadu nástrojů, např. špičaté klenotnické kleště, pitevní a vakuové jehly. Následně mohou být vzorky na spodní straně označeny permanentním fixem, uloženy v bezprašném exsikatoru nebo jsou navíc potaženy vodivými kovy nebo uhlíkem, aby se zabránilo hromadění vysokonapěťových statických nábojů, které snižují kvalitu obrazu SEM. U biologických materiálů je vzorek většinou potažen tenkou vrstvou kovu (cca 20–30 nm) např. zlatem, platinou nebo slitinou platiny a paládia. Kovové povlaky navíc slouží jako vynikající zdroje sekundárních elektronů a pomáhají odvádět potenciálně škodlivé teplo. Nejběžnější metodou pokovování je nanášení rozprašováním (Bozzolla a Russell, 1999, s. 63–65; Nebesářová a kol., 2001).

2.6 Příprava vzorků fyzikálními metodami

Z fyzikálních postupů přípravy vzorků pro SEM se uplatňují zejména mrazové metody. Mikrovlnné ozáření je využíváno většinou jen k urychlení jednotlivých kroků přípravy při přípravě chemickou cestou. Výhodou mrazových metod je rychlost přípravy, zachování

povrchové struktury a dle potřeby je zde i možnost podívat se do struktury vnitřních tkání nebo buněk za pomoci mrazového lámání. Mikrovlnného ohřevu se využívá k urychlení a zkvalitnění všech kroků přípravy vzorku. Při ozáření vzorku mikrovlnami dojde ke vzrůstu teploty a ke zlepšení penetrace roztoku, ve kterém je vzorek ponořen, do jeho vnitřku. Nejčastěji se mikrovlny používají v prvním kroku přípravy, kterou je fixace. Avšak tento způsob může být pro přípravu některých vzorků nevhodný (Nebesářová a kol., 2001).

Mrazová fixace neboli kryofixace by měla být provedena co nejrychleji, aby při ní nevznikaly krystalky ledu, které by poškodily preparát. Zmrazovat lze jak předem chemicky fixovaný materiál ošetřený kryoprotektantem, tak materiál čerstvý. Kryoprotektant je látka, která snižuje teplotu homogenní nukleace, zvyšuje rekrystalizační teplotu a snižuje množství volné vody v systému. Nejvíce využívané kryoprotektanty jsou glycerol, etylenglykol, sacharóza, dextran a dimetylsulfoxid. U kryofixace je nutné dosáhnout vysoké chladicí rychlosti. Jejím účelem je dosáhnout vitrifikovaného (skelného) stavu vzorku, kdy je vzorek zchlazen pod rekrystalizační teplotu bez vzniku krystalů. Kryofixace má oproti chemické fixaci několik výhod: buňky lze pozorovat v mikroskopu v jejich přirozeném extracelulárním a intracelulárním prostředí, nedochází při ní k denaturaci enzymů a antigenů, buňky jsou při kryofixaci znehybněny ve zlomku vteřiny což umožňuje sledovat i časově závislé a dynamické děje. Vhodné chladicí médium by mělo splňovat tyto předpoklady: dobrá tepelná vodivost a vysoká tepelná kapacita, vysoká tekutost při nízkých teplotách, vysoká hustota, nízká cena a bezpečné použití. Tyto požadavky však nesplňuje žádná látka využívaná k mrazení. Většinou požadavků vyhovuje propan a etan, které jsou však vysoce explozivní. Kapalný dusík, který je nejběžněji používán, má nevýhodu, že má velmi blízko bod tání a bod varu. Při použití kapalného dusíku je nezbytné ošetřit vzorek kryoprotektantem. Mezi způsoby jakým lze mrazit patří imerzní kryofixace (vysokorychlostní ponoření), tryskové a sprejové a mrazení při vysokém tlaku. Mrazové lámání dokáže odhalit vnitřní povrchy buněčných organel. Provádí se buď ve specializované aparatuře, anebo improvizovaně pomocí pinzety pod hladinou kapalného dusíku nebo na vychlazeném kovovém bloku. Mrazové leptání je využíváno ke studiu povrchů odhalených při odkrojení zmrazeného preparátu. Kryo-skenovací elektronová mikroskopie má široké využití, je vhodná pro tučné potraviny (majonéza, čokoláda) a pro tučné mražené potraviny (zmrzlina) (Nebesářová a kol., 2001; Dykstra a Reuss, 2003, s. 129; James, 2009, s. 115; Laue, 2010, s. 16; Morris a Groves, 2013, s. 399–402).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této práce bylo prohlédnout mikrostrukturu tavených sýrů bez tavicích solí a ověřit, zda je jejich struktura stejnorodá a obdobná nebo zcela odlišná z hlediska působení jednotlivých hydrokoloidů.

Cílem teoretické části diplomové práce bylo:

- zpracovat literární rešerši o tavených sýrech s možnými částečnými nebo úplnými náhradami tavicích solí
- popsat princip skenovací elektronové mikroskopie a způsoby přípravy vzorků pro skenovací elektronovou mikroskopii

Cílem praktické části diplomové práce bylo:

- vyrobit modelové vzorky tavených sýrů s extrakty z mořských řas, které budou sloužit jako náhrada tavicích solí a kromě těchto extraktů použít jako další hydrokoloid želatinu
- připravit vzorky pro skenovací elektronovou mikroskopii, prohlédnout je a popsat jejich mikrostrukturu
- u vyrobených vzorků provést dynamickou oscilační reometrii
- vyhodnotit získaná data a diskutovat je s odbornou literaturou
- formulovat závěry práce

4 METODIKA PRÁCE

4.1 Výroba vzorků

Byly vyrobeny modelové vzorky tavených sýrů s obsahem sušiny 40 % (w/w) a obsahem tuku v sušině (TVS) 55 % (w/w). Tavicí směs se skládala z eidamské cihly ve stáří 8 týdnů (50 % (w/w) sušiny, 30 % TVS (w/w); Kromilk, a. s., Kroměříž, Česká republika), másla (84 % (w/w) sušiny, 82 % (w/w) tuku), pitné vody a vybraných hydrokoloidů: κ -karagenan, agar a želatina (Sigma-Aldrich, s. r. o., Saint Louis, USA), které byly přidány v koncentraci 1 % (w/w). Jako kontrolní vzorky byly vyrobeny tavené sýry s 2,5 % (w/w) tavicích solí (Fosfa a.s., Břeclav, Česká republika). Vzorky tavených sýrů byly vyrobeny ve 2 sériích (1. a 2. výroba), používané označení vyrobených vzorků je shrnuto v Tabulce 1, pro mikrostrukturu jsou používány zvlášť vzorky z obou výrob, pro chemickou a reologickou analýzu jsou vzorky z 1. a 2. výroby zprůměrované a tvoří 1 soubor dat. K výrobě tavených sýrů bylo použito zařízení Stephan UMC-5 (Stephan Machinery GmbH, Hameln, Německo) s nepřímým ohřevem. Následující postup výroby byl upraven dle prací Černíková a kol. (2017a, s. 4301–4302; 2017b, s. 15). Po nadávkování eidamské cihly nakrájené na kousky o hraně cca 2 cm do tavicího kotle, došlo k její dezintegraci po dobu 30 sekund při 3000 ot./min. Následně byly přidány ostatní suroviny, v tavicím zařízení byl vyvinut vývěvou mírný podtlak, aby se předešlo vzniku vzduchových bublin a oxidaci vzorků. Při otáčkách 3000 ot./min byl obsah tavicího kotle pomocí nožů míchán po dobu 12 min na výslednou tavicí teplotu 90 °C. Po utavení byla horká tavenina nalévána do plastových vaniček, které byly poté zažehleny příslušnými hliníkovými víčky. Výrobky byly zchlazeny a uchovávány při teplotě 6 ± 2 °C do okamžiku analýz tavených sýrů. Měření probíhala v 1., 14., 30. a 60. dnu od data výroby vzorků.

Tabulka 1 Označení vzorků tavených sýrů

vzorky tavených sýrů s <u>hydrokoloidem</u>	1. výroba	2. výroba	chemická a reologická analýza
agar	AI	AII	A
κ -karagenan	KARI	KARII	KAR
želatina	PGI	PGII	PG
kontrola	KI	KII	K

4.2 Chemická analýza

U jednotlivých modelových vzorků byla prováděna základní chemická analýza, při které byl sledován obsah celkové sušiny, tuku a pH během doby skladování.

U všech vzorků byl stanoven obsah sušiny podle ISO 5534:2004 (Anonym, 2004a). Obsah tuku byl určen dle ISO 1735:2004 (Anonym, 2004b). Hodnoty pH byly měřeny vpichovým pH metrem s kombinovanou skleněnou elektrodou při laboratorní teplotě 22 ± 1 °C (pH Spear, Eutech Instruments Europe B. V., Landsmeer, Nizozemí). Obsah sušiny a tuku byl pro každý vzorek stanoven třikrát a hodnota pH byla měřena šestkrát u každého vzorku (Černíková a kol., 2017a, s. 4302; Černíková a kol., 2017b, s. 15).

4.3 Senzorická analýza

Senzorická analýza modelových vzorků probíhala po 14 dnech skladování (6 ± 2 °C) v panelu pěti expertů (zaměstnanci Ústavu technologie potravin, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně), kteří byli proškoleni k popisu tavených sýrů podle ČSN ISO 8586 (Anonym, 2015). Hodnocení vzorků probíhalo podle sedmibodové stupnice pro kritérium: homogenita (1–naprosto homogenní vzorek; 4–mírná nehomogenita, akceptovatelná; 7–naprosto nehomogenní vzorek) (Černíková a kol., 2010, s. 338; Hladká a kol., 2014, s. 652). Hodnocení výrobků probíhalo v senzorické laboratoři se senzorickými kabinami (za normálních světelných podmínek) v souladu s normou ČSN EN ISO 8589 (Anonym, 2008). Vzorky o hmotnosti 100 g byly prezentovány v randomizovaném pořadí (čtyřmístné kódy) na bílých talířích (každý vzorek na samostatném talíři). Vzorky byly posuzovatelům předkládány při pokojové teplotě 22 ± 2 °C. Stupnice pro hodnocení tavených sýrů je uvedena v příloze 1 (Černíková a kol., 2010, s. 338; Hladká a kol., 2014, s. 652).

4.4 Dynamická oscilační reometrie

Viskoelastické vlastnosti modelových vzorků sýrů byly analyzovány pomocí dynamické oscilační reometrie (rotační viskozimetr Thermo Scientific™ HAAKE RheoStress 1, Brémy, Německo). Použita byla geometrie deska-deska (průměr = 35 mm, štěrbina = 1 mm) a měření probíhalo v oblasti lineární viskoelasticity při teplotě $20,0 \pm 0,1$ °C. Po nanesení vzorku na dolní desku, byla spuštěna horní deska, přebytečný tavený sýr byl opatrně odstraněn a okraje vzorku byly potřeny tenkou vrstvou silikonového oleje (Lukosiol M15, Lučební závody Kolín, Kolín, Česká republika), aby se zabránilo vysychání vzorku. Po

pěti minutové relaxaci byl měřen elastický a ztrátový modul pružnosti v rozsahu frekvencí 0,05–100,00 Hz. Amplituda smykového napětí byla nastavena na 10 Pa.

Dynamická oscilační geometrie je založena na řízené deformaci vzorku, při které se zkoumá chování při toku látek. Metoda slouží také pro zjišťování elastického (G') a ztrátového (G'') modulu pružnosti v závislosti na zvoleném rozsahu frekvencí. Komplexní modul pružnosti se vypočítá podle vzorce (1) (Gabriele a kol., 2001, s. 121–122; Černíková a kol., 2017a, s. 4302; Černíková a kol., 2017b, s. 15):

$$G^* = \sqrt{(G')^2 + (G'')^2} \quad (1)$$

4.5 Příprava vzorků pro SEM chemickou cestou

Pro studium mikrostruktury byly modelové vzorky tavených sýrů připraveny chemickou cestou. Následující postup byl upraven dle prací Kaláb a Modler (1985, s. 194), Awad a kol. (2002, s. 55), Černíková a kol. (2016, s. 17), Černíková a kol. (2017a, s. 4303). Pomocí skalpelu nebo jiného laboratorního náčiní byl z tavených sýrů odebrán vzorek velikosti cca 5 x 2 x 2 mm. Důležité bylo odebrat vzorek z vnitřní části hmoty sýra, nikoliv z povrchu, kde by mohla být struktura sýra narušena působením vzduchu apod. Všechny vzorky byly fixovány v 3% (v/v) roztoku glutaraldehydu ve vodě (Sigma-Aldrich, USA) po dobu 12 hod při laboratorní teplotě 20 ± 2 °C. Vzorky byly promývány v 0,2 mol/l kakodylanovém pufru o pH 5,6 (Sigma-Aldrich, USA) třikrát po 15 min. Postfixace byla prováděna v 2% (w/v) roztoku oxidu osmičelého ve vodě (Sigma-Aldrich, USA) po dobu 4 hod při laboratorní teplotě 20 ± 2 °C. Po postfixaci tuku oxidem osmičelým byly vzorky znovu promyty v kakodylanovém pufru třikrát po 15 min. Promyté fixované vzorky byly odvodněny pomocí roztoku etanolu (BC-Chemservis, Česká republika) se zvyšující se koncentrací 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% (v/v). Vzorek byl v každém roztoku ponechán 15 min. Následně byly vzorky zmrazeny a zlomeny v tekutém dusíku. Pak byly vzorky zbaveny tuku 100% chloroformem (v/v) (BC-Chemservis, Česká republika) dvakrát po dobu 15 min. Vzorky byly navraceny do 100% roztoku etanolu (v/v). Poté byly vzorky sušeny metodou ke kritickému bodu (Leica EM CPD 300, Leica Microsystems, Vídeň, Rakousko). Vzorky byly přichyceny na držák vzorků pod stereomikroskopem, následovalo jejich pokovení zlatem v naprašovačce (Sputter Coater SCD 050, Bal-tec, Balzers, Lichtenštejnsko). Doba pokovení byla 98 s, což odpovídá tloušťce vrstvy zlata cca 20 nm. Vzorky byly prohlíženy pomocí skenovacího elektronového mikroskopu Jeol JSM-7401F

(Jeol, Tokio, Japonsko). Každý obraz byl analyzován pomocí softwaru ImageJ (Národní institut zdraví, Bethesda, MD). Fotografie každého modelového vzorku byla analyzována pro stanovení průměru tukových kuliček (μm). Každý vzorek byl připravován dvakrát, z každého vzorku bylo připraveno několik kusů vzorků pro SEM a byly počítány minimálně 4 fotografie od každého vzorku. Výsledky byly vyjádřeny jako střední hodnota \pm směrodatná odchylka.

4.6 Statistické vyhodnocení naměřených dat

Naměřená a zjištěná data byla vyhodnocována pomocí neparametrických metod, především Kruskal-Wallisova a Wilcoxonova testu. Statistická hodnocení byla provedena na hladině významnosti 5 %. Pro výpočty byl použit software Unistat verze 6.5 (Londýn, Velká Británie) (Černíková a kol., 2017a, s. 4303).

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Výsledky chemické analýzy

U jednotlivých vzorků tavených sýrů s danými přísadami hydrokoloidů a kontrolních vzorků byl stanoven obsah sušiny, tuku a pH. Analýza byla provedena u vzorků s tučností 55 % (w/w) tuku v sušině a obsahem sušiny 40 % (w/w). Měření probíhala 1., 14., 30. a 60. den od data výroby. U každé šarže proběhlo šest měření.

Při stanovení obsahu sušiny bylo cílem zjistit, zda byl dosažen navrhovaný obsah sušiny 40 % (w/w). Z analýzy modelových vzorků plyne, že obsah sušiny v jednotlivých vzorcích se navzájem statisticky významně neliší. Obsah sušiny se pohyboval u vzorků s danými hydrokoloidy a u kontrolních vzorků (s obsahem tavicích solí) v rozmezí 42–44 % (w/w). Podrobnější hodnoty pro jednotlivé vzorky jsou zobrazeny v Tabulce 2. Hodnoty v Tabulce 2 jsou uvedeny jako průměr \pm směrodatná odchylka, jedná se o vzorky tavených sýrů, kde byly jako náhrady tavicích solí použity jednotlivé hydrokoloidy, a kontrolní vzorky s tavicími solemi. Pro každý vzorek taveného sýra se jedná o průměrné hodnoty z 1. a 2. výroby.

Tabulka 2 Hodnoty obsahu sušiny vzorků tavených sýrů v průběhu skladování

den měření	sušina (aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka) [%]			
	A	KAR	PG	K
1. den	42,98 \pm 0,28	43,80 \pm 0,37	42,89 \pm 0,48	43,56 \pm 0,11
14. den	42,84 \pm 0,37	43,79 \pm 0,39	42,61 \pm 0,48	44,82 \pm 0,16
30. den	42,70 \pm 0,88	42,54 \pm 0,38	43,57 \pm 0,77	42,87 \pm 0,11
60. den	42,43 \pm 0,12	42,48 \pm 0,27	42,98 \pm 0,64	42,99 \pm 0,19

Obsah tuku byl u vzorků s jednotlivými hydrokoloidy stanoven v rozmezí 22,5–23,0 % (w/w). Hodnota tuku u kontrolních vzorků se pohybovala mezi 22,0–22,5 % (w/w).

Hodnoty pH u vzorků sýrů vyrobených bez použití tavicích solí za pomoci hydrokoloidů (κ -karagenan, agar a želatina) se pohybovaly v průběhu skladování mezi 5,33–5,59. U kontrolních vzorků byly hodnoty pH v rozmezí 5,57–5,77. Přičemž optimální pH tavených sýrů se pohybuje v rozmezí 5,6–6,1 (Guinee, 2011, s. 809). Hodnoty pH pro jednotlivé dny skladování jsou uvedeny v Tabulce 3. Hodnoty v Tabulce 3 jsou uvedeny jako průměr \pm směrodatná odchylka, jsou to vzorky tavených sýrů, kde byly jako náhrady tavicích solí použity jednotlivé hydrokoloidy, a kontrolní vzorky s tavicími solemi. Pro každý vzorek

taveného sýra se jedná o průměrné hodnoty z 1. a 2. výroby. Hodnoty pH u jednotlivých hydrokoloidů byly poměrně nižší než hodnoty pH kontrolních vzorků s tavicími solemi, které ovlivňují hodnotu pH. V průběhu šedesátidenního skladování došlo k poklesu pH zhruba o 0,1. Černíková a kol. (2017d, s. 86) uvádí, že pokles pH během šedesátidenního skladování o 0,1–0,2 lze vysvětlit buď možnou hydrolyzou difosfátů a polyfosfátů během doby skladování, anebo možnými změnami v disociaci přítomných solí nebo jiných sloučenin. U jednotlivých modelových vzorků s použitím hydrokoloidů nedošlo k výraznému snížení pH mezi 1. a 14. dnem skladování. U kontrolních vzorků došlo k mírnému poklesu pH při skladování. Vyšší stabilitu hodnot pH v kontrolních vzorcích lze připsat schopnosti některých fosfátů (zejména monofosfátů) stabilizovat pH (Hladká a kol., 2014, s. 654). Výsledky pH vzorků s obsahem agaru jako náhradou tavicích solí se přibližovaly hodnotě pH 5,6 pouze v 1. a 14. den analýzy vzorků, poté pH kleslo k hodnotě 5,3. U vzorků s přídavkem κ -karagenanu jako náhradou tavicích solí se hodnoty pH pohybovaly kolem 5,4 a v průběhu skladování hodnoty pH neklesaly. Hodnota pH vzorků s obsahem želatiny jako náhradou tavicích solí byla na počátku skladování 5,4 a po šedesátidenním skladování klesla hodnota pH na 5,3.

Tabulka 3 Hodnoty pH modelových vzorků tavených sýrů v průběhu skladování

den měření	pH (aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka)			
	A	KAR	PG	K
1. den	5,59 \pm 0,03	5,43 \pm 0,01	5,45 \pm 0,01	5,75 \pm 0,02
14. den	5,58 \pm 0,03	5,44 \pm 0,03	5,45 \pm 0,01	5,77 \pm 0,01
30. den	5,34 \pm 0,01	5,42 \pm 0,01	5,46 \pm 0,01	5,72 \pm 0,02
60. den	5,33 \pm 0,01	5,42 \pm 0,01	5,34 \pm 0,00	5,57 \pm 0,01

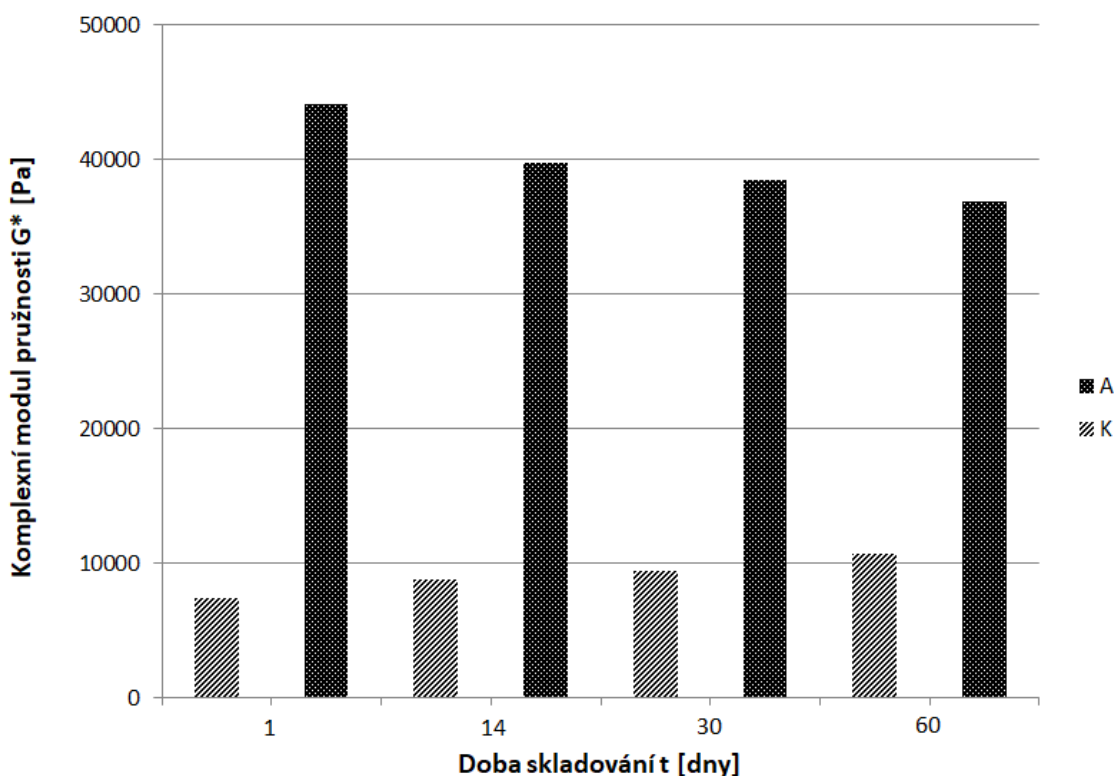
5.2 Výsledky senzorické analýzy

Po 14 dnech skladování (6 ± 2 °C) byla provedena senzorická analýza modelových i kontrolních vzorků tavených sýrů podle sedmibodové stupnice uvedené v příloze 1. Kritériem pro hodnocení byla homogenita. Vzorky s 1 % (w/w) použitých hydrokoloidů (agar, κ -karagenan, želatina) jako náhrad tavicích solí byly makroskopicky homogenní, a proto bylo přistoupeno u všech zmíněných vzorků k dynamické oscilační reometrii i skenovací elektronové mikroskopii.

5.3 Výsledky dynamické oscilační reometrie

Viskoelastické chování vzorků tavených sýrů s přidavkem 1 % (w/w) vybraných hydrokolidů (agar, κ -karagenan, želatina) a kontrolních vzorků s 2,5 % (w/w) tavicích solí bylo hodnoceno metodou dynamické oscilační reometrie při frekvenci 0,05–100,00 Hz.

Výsledky dynamické oscilační reometrie pro vzorky tavených sýrů s agarem jsou zobrazeny na Obr. 11. Ze závislosti komplexního modulu pružnosti G^* na době skladování u vzorků kontroly obsahující tavicí soli a u vzorků s obsahem 1 % (w/w) agaru jako náhrady tavicích solí bylo zjištěno, že v jednotlivých dnech skladování byla tuhost vzorku s přidavkem agaru vždy vyšší než tuhost kontrolního vzorku bez aplikace agaru. To dokazuje také fakt, že s rostoucí hodnotou komplexního modulu pružnosti G^* dochází ke zvyšování tuhosti tavených sýrů (Piska a Štětina, 2004, s. 553–554).



Obr. 11 Závislost komplexního modulu pružnosti na době skladování pro vzorky bez tavicích solí s 1 % (w/w) agaru a vzorky kontroly s tavicími solemi

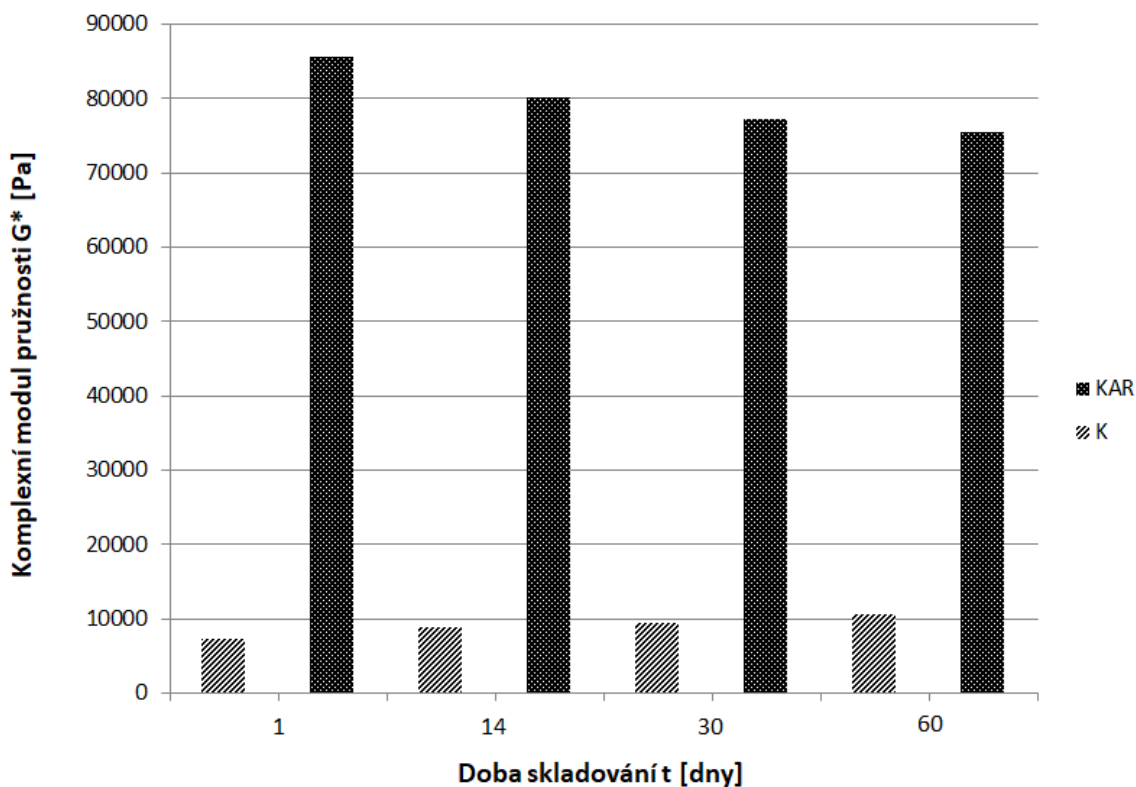
S prodlužující se dobou skladování tuhost vzorků s přidavkem agaru klesala, naopak u kontrolních vzorků v průběhu skladování jeho tuhost mírně rostla. Nicméně tuhost vzorků

s přidavkem agaru byla vždy vyšší než u kontrolních vzorků s obsahem tavicích solí. Studie uvádějí, že přidavek polysacharidů ke kyselému mléčnému gelu ovlivňuje synerezi a tuhost gelu. Změny v mikrostruktuře a synerezi v kyselých mléčných gelech by mohly souviset se silnou interakcí (elektrostatický odpor/přitažlivost) mezi přidaným polysacharidem a proteiny. V mnohých kyselých mléčných výrobcích vede přítomnost polysacharidů k vytvoření hustších proteinových sítí, a to jak mezi proteiny navzájem, tak i mezi proteiny a polysacharidy (Laneuville a Turgeon, 2014, s. 5, 13–14).

Výsledky dynamické oscilační reometrie pro vzorky tavených sýrů s κ -karagenanem jsou zobrazeny na Obr. 12. Hodnoty komplexního modulu pružnosti (G^*) u vzorků s přidavkem 1 % (w/w) κ -karagenanu jako náhrady tavicích solí vykazovaly mnohem vyšší hodnoty než vzorky s obsahem tavicích solí bez přidavku κ -karagenanu. Tuhost modelových vzorků tavených sýrů s obsahem κ -karagenanu byla po celou dobu skladování vyšší než tuhost kontrolních vzorků v jednotlivých dnech měření, a to i přes skutečnost, že s prodlužující se dobou skladování tuhost vzorků s přidavkem κ -karagenanu klesala.

Černíková a kol. (2008, s. 1058) popisuje, že s vyšší koncentrací κ -karagenanu dochází ke změnám vlastností gelu resp. k intenzivnějším interakcím mezi karagenanovými řetězci, čímž se vytváří „hustší“ síťová struktura a zvyšuje se tak tuhost taveného sýra. Gely tvořené κ -karagenanem vykazují synergické účinky tím, že vykazují vysoké hodnoty obsahu vody, elasticity a viskozity. Mucin sliznatky tvoří silné gely v kombinaci s negativně nabitým roztokem polymeru (např. κ -karagenan nebo škrob), tyto gely mají vysokou soudržnost a elasticitu, vysoký obsah vody a vyšší smykovou viskozitu (Böcker a kol., 2016, s. 90, 94–95).

Při porovnání vzorků tavených sýrů s obsahem agaru a κ -karagenanu vykazoval vzorek s přidavkem agaru asi o polovinu nižší tuhost než vzorky s κ -karagenanem. Rozdílná tuhost vzorků může být způsobena tím, že agar je velmi slabě až neutrálně nabitý, nereaguje s proteiny ani s jinými nabitými molekulami a vytváří slabé sekundární a rozvětvené sítě a vykazuje nižší synerezi oproti aniontovým polysacharidům, jako je např. pektin, κ -karagenan nebo xantan (Imeson, 2010, s. 40; Venugopal, 2011, s. 103; Laneuville a Turgeon, 2014, s. 5, 9).

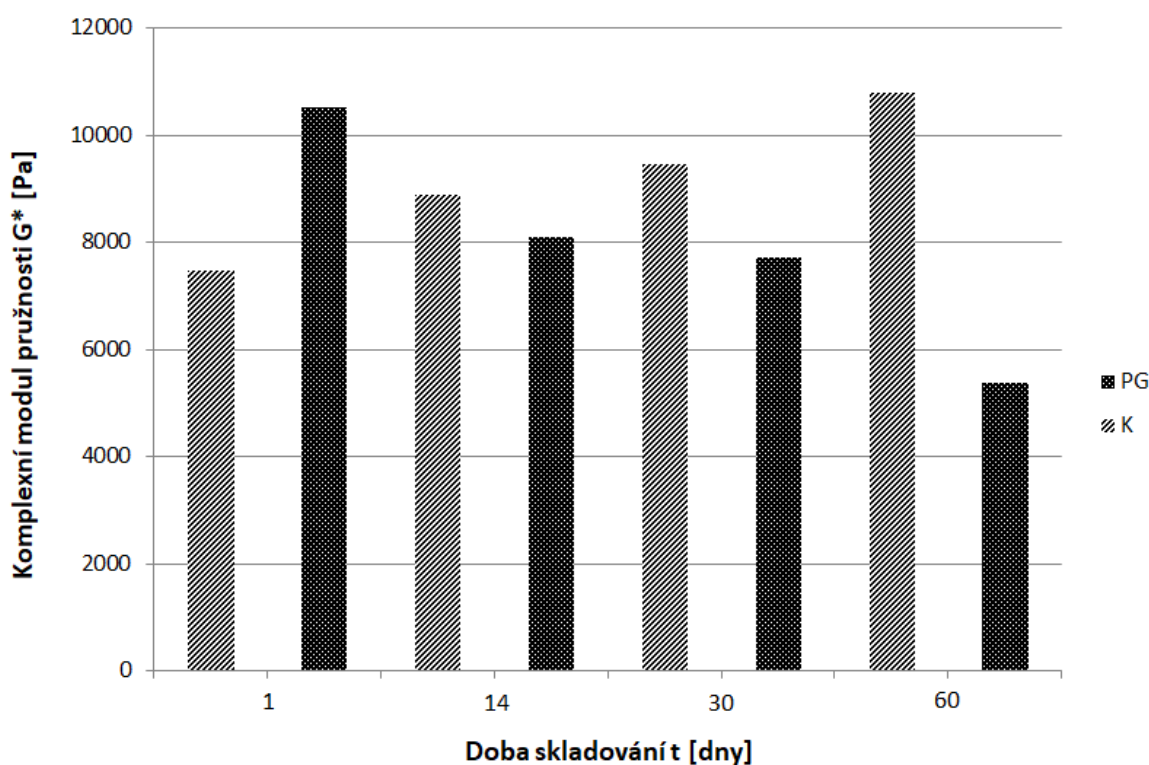


Obr. 12 Závislost komplexního modulu pružnosti na době skladování pro vzorky bez tavicích solí s 1 % (w/w) κ -karagenanu a vzorky kontroly s tavicími solemi

Výsledky dynamické oscilační reometrie pro modelové vzorky tavených sýrů s želatinou jsou zobrazeny na Obr. 13. Ze závislosti komplexního modulu pružnosti G^* na době skladování u vzorků s obsahem 1 % (w/w) želatiny jako náhrady tavicích solí bylo zjištěno, že v průběhu šedesátidenního skladování došlo k poklesu tuhosti modelových vzorků s přidavkem želatiny, neboť docházelo k poklesu hodnot komplexního modulu pružnosti. Při analýze po 1. dni skladování byl jako tužší vzorek vyhodnocen vzorek s obsahem želatiny jako náhrady tavicích solí, avšak v průběhu dalších analýz byl vyhodnocen jako tužší kontrolní vzorek s tavicími solemi, a to až do konce skladovacího procesu. Takto nízké hodnoty tuhosti vzorků s přidavkem želatiny, ze všech hydrokoloidů nejbližší kontrolnímu vzorku s obsahem tavicích solí, lze přisuzovat tomu, že želatina je proteinové povahy, má schopnost tvořit proteinovou síť a váže vodu, což zabraňuje synerezi (Stevens, 2010, s. 131).

Při srovnání vzorků s přidavkem želatiny a agaru bylo zjištěno, že vzorky s obsahem želatiny měly asi čtvrtinovou tuhost oproti vzorkům s agarem. Při porovnání vzorků tavených sýrů s přidavkem želatiny a κ -karagenanu, byl jako mnohem tužší vzorek vyhodnocen vzo-

rek s přidavkem κ -karagenanu. Možnost nahradit tavicí soli na bázi fosforečnanů nebo citronanů karagenanem může souviset s tvorbou vazeb mezi karagenanem a kazeinem (za přítomnosti vápenatých iontů). Nově vzniklé „komplexy“ karagenan-protein (především s kazeinovými frakcemi obsahující hydrofobní segmenty) mohou vykazovat emulgační vlastnosti a stabilizovat vodu a tuk v kazeinové matrici. To odhaluje schopnost karagenanových „komplexů“ stabilizovat tuk a vodu v kazeinové matrici, která nezávisí na stupni zralosti sýra (Černíková a kol., 2010, s. 341; Hladká a kol., 2014, s. 653–654).

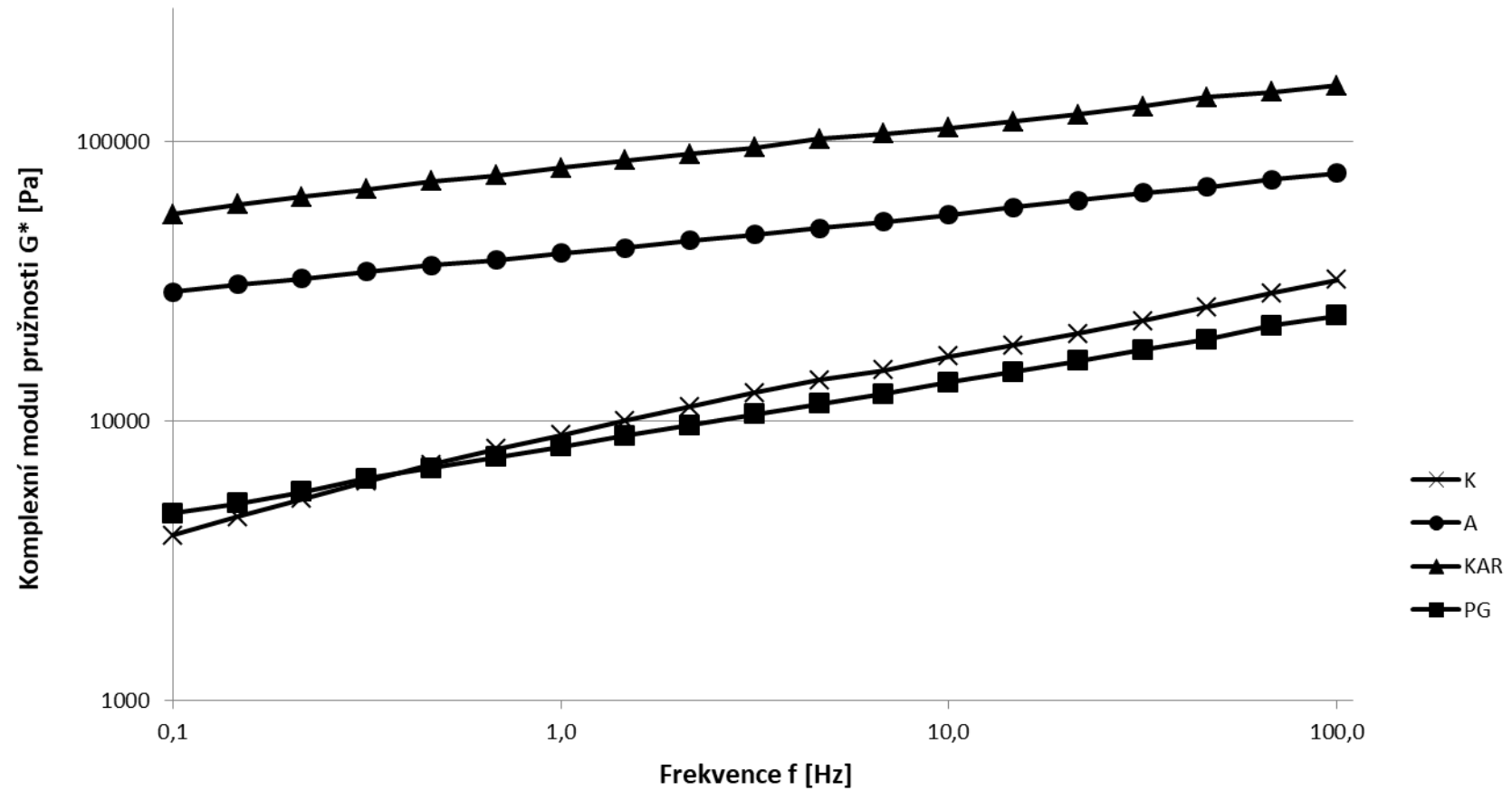


Obr. 13 Závislost komplexního modulu pružnosti na době skladování pro vzorky bez tavicích solí s 1 % (w/w) želatiny a vzorky kontroly s tavicími solemi

Vliv viskoelastických vlastností jednotlivých aplikovaných hydrokoloidů v koncentraci 1 % (w/w) po čtrnáctidenním skladování je uveden na Obr. 14, a to jako závislost komplexního modulu pružnosti G^* na frekvenci f v rozsahu 0,1–100,0 Hz. Z uvedeného obrázku vyplývá, že nejvyšší hodnoty komplexního modulu pružnosti a tedy nejvyšší tuhost, vykazoval vzorek s přidavkem 1 % (w/w) κ -karagenanu. Jako druhý nejtužší vzorek byl vyhodnocen vzorek s přidavkem agaru. Vzorek s přidavkem želatiny a kontrolní vzorek s obsahem tavicích solí vykazovaly obdobnou tuhost vzorků. Při nižších frekvencích byl

tužší vzorek s přidavkem želatiny, naopak při frekvencích vyšších byl tužší vzorek s obsahem tavicích solí. Při měření docházelo se zvyšující se frekvencí k postupnému nárůstu hodnot G^* u všech analyzovaných vzorků.

Komplexní modul G^* popisuje celkový odpor vůči deformaci materiálu, který je považován za elastickou pevnou látku. Podle Dimitreli a Thomareis (2008, s. 372) je křížení nebo-li protínání elastického (G') a ztrátového (G'') modulu pružnosti užitečným prostředkem pro vyhodnocení přechodu z chování podobného kapalinám do chování pevných látek a je charakteristické koncentrovaným roztokem. Ztrátový modul pružnosti je větší než elastický modul pružnosti při nižších frekvencích, ale naopak tomu je při frekvencích vyšších. Nicméně u všech našich analyzovaných vzorků byly hodnoty elastického (G') modulu pružnosti vždy vyšší než hodnoty ztrátového (G'') modulu pružnosti (data nejsou uvedena). Komplexní modul se zvyšuje v celém frekvenčním rozsahu. Snížený obsah vlhkosti hraje významnou roli při zvyšování elastických a ztrátových modulů pružnosti. Dále kromě obsahu vlhkosti mohou také bílkoviny a tuk přispět k viskoelastickému chování taveného sýra. Bylo zjištěno, že zvyšující se obsah vlhkosti vedl k tomu, že se reologické chování tavených sýrových pomazánek změnilo z tuhého na kapalné. Účinek obsahu vlhkosti na viskoelastické vlastnosti taveného sýra má působit jako změkčovadlo v proteinové matici, čímž se stane méně elastickou. Během chlazení vzorku jsou molekuly vody znehybněny v rámci trojrozměrné bílkovinné matrice a oslabují strukturu finální sítě. Po ochlazení mají tedy proteiny převahu ve struktuře ve finálním produktu nad vodou a tukem, což vede k produktům se zvýšenými viskoelastickými vlastnostmi a pevnějším chováním. Čím větší je množství přidané vody, tím větší je bobtnání proteinů a jejich větší expanze díky sníženým přitažlivým silám. Proteiny vedou k vytvoření hustší sítě se zvýšenou pevností. Posílení proteinové matrice je podporováno v důsledku skladování rostoucími hodnotami gelu. Vysvětlení tohoto jevu by mohlo spočívat v interakcích a procesech, jako je např. polymorfismus mléčného tuku a probíhající změny v jeho krystalické formě, mírné snížení pH hodnoty tavených sýrů, možná hydrolyza emulgačních solí a možné změny v disociaci přítomných solí nebo jiných sloučenin (Dimitreli a Thomareis, 2008, s. 371–373; Černíková a kol., 2017d, s. 88).



Obr. 14 Závislost komplexního modulu pružnosti na frekvenci pro jednotlivé vzorky s přidavkem 1 % (w/w) hydrokoloidů a 2,5 % (w/w) tavicích solí po 14 dnech skladování

5.4 Výsledky skenovací elektronové mikroskopie

Pro zkoumání mikrostruktury pomocí skenovací elektronové mikroskopie byly vzorky modelových tavených sýrů připraveny chemickou cestou. Z každé vyrobené série vzorků byl analyzován 1 vzorek s příslušným hydrokoloidem. U každého vzorku bylo vytvořeno několik fotografií, u kterých byla dále zjišťována velikost a distribuce tukových kuliček. Byly hodnoceny vzorky s koncentrací 1 % (w/w) hydrokoloidu (agar, κ -karagenan a želatina) a kontrolní vzorky s obsahem 2,5 % (w/w) tavicích solí. Výsledky velikostí tukových kuliček jsou zobrazeny v Tabulce 4. Medián neboli střední hodnota velikostí tukových kuliček ukazuje, jak dobře je emulgován tuk v matrici taveného sýru.

Nejprve je třeba uvést, že při porovnání paralelně vyrobených a analyzovaných vzorků, tedy AI s AII, KARI s KARI, PGI s PGII a KI s KII, nebyl stanoven statisticky významný rozdíl ($P \geq 0,05$). Z této skutečnosti a na základě výsledků chemické, sensorické i reologické analýzy je možné usoudit, že jednotlivé vzorky byly vyrobeny za stejných podmínek a je tedy možné je dále mezi sebou srovnávat.

Tabulka 4 Velikosti tukových kuliček [μm] u jednotlivých hydrokoloidů

	AI	AII	KARI	KARI	PGI	PGII	KI	KII
medián	0,759	0,752	0,701	0,820	0,439	0,541	0,188	0,210
± směrodatná chyba	± 0,091	± 0,078	± 0,063	± 0,047	± 0,044	± 0,070	± 0,014	± 0,016
minimální velikost	0,104	0,165	0,089	0,200	0,044	0,060	0,022	0,035
maximální velikost	4,630	4,535	2,760	2,254	2,136	5,644	0,819	0,760
diference	4,526	4,370	2,671	2,054	2,092	5,584	0,797	0,725

Medián pro kontrolní vzorky (KI a KII) byl ze všech vzorků nejnižší, což znamená, že ve vzorcích s přidavkem tavicích solí byl mnohem lépe zaemulgován tuk než tomu bylo u vzorků s vybranými hydrokoloidy. Tavicí soli upravují prostředí surovinové směsi, a tak se přítomné proteiny v matrici taveného sýra mohou chovat jako přirozené emulgátory (Awad a kol., 2002, s. 54). Jako druhé nejmenší tukové kuličky měly vzorky s přidavkem želatiny (PGI a PGII), tudíž lze říci, že z hydrokoloidů vybraných pro tuto práci se jako nejlepší emulgační činidlo jevila želatina. Naopak nejméně zaemulgovaný tuk byl pozorován u vzorků s přidavkem agaru (AI a AII), které vykazovaly nejvyšší hodnotu mediánu. Při porovnání minimální a maximální velikosti tukových kuliček je z Tabulky 4 vidět, že vzorky

s přidavkem agaru měly odlišné resp. větší hodnoty tukových kuliček, než tomu bylo u ostatních vzorků, což také nasvědčuje tomu, že agar nejméně emulgoval tuk v modelových vzorcích tavených sýrů. Zatímco nejmenší hodnoty tukových kuliček byly zaznamenány u kontrolních vzorků. Hodnota diference popisuje rozdíl mezi nejmenší a největší tukovou kuličkou pozorovanou na mikrofotografiích daných vzorků. Při porovnání velikostí tukových kuliček u vzorků kontroly s velikostí tukových kuliček modelových vzorků s použitím jednotlivých hydrokoloidů bylo zjištěno, že se velikosti tukových kuliček statisticky významně liší ($P < 0,05$). Dále byl nalezen statisticky významný rozdíl ($P < 0,05$) mezi vzorky želatiny a zbývajícími použitými hydrokoloidy (agar a κ -karagenan). Naproti tomu se statisticky významně nelišily ($P \geq 0,05$) vzorky agaru a κ -karagenanu, až na vzorky AI a KARII, kde vyšel rozdíl statisticky významný ($P < 0,05$). Toto je možné vysvětlit distribucí velikostí jednotlivých tukových kuliček. Neboť z hlediska distribuce tukových kuliček (viz Tabulka 5) lze konstatovat, že agar a κ -karagenan mají podobné zastoupení hodnot tukových kuliček. Pro vzorky AII a KARII je asi 10 % hodnot tukových kuliček zastoupeno v intervalu 0,2–0,3 μm a zhruba 12 % hodnot se nachází v intervalu 0,5–0,6 μm . Pro vzorky AI a KARII nejsou hodnoty tukových kuliček zastoupeny úplně stejně, pro vzorek AI je asi 11 % hodnot tukových kuliček zastoupeno v intervalu 0,3–0,4 μm , zatímco pro vzorek KARII je asi 11 % hodnot zastoupeno v intervalu 0,6–0,7 μm . Pro oba kontrolní vzorky je největší četnost tukových kuliček, přesněji 37 % hodnot mezi 0,1–0,2 μm . Želatina (PGII) má největší zastoupení tukových kuliček v rozmezí 0,2–0,3 μm , kde se nachází 16 % hodnot. Lze tedy říci, že agar a κ -karagenan mají podobnou strukturu, a to jak v distribuci, tak i ve velikosti tukových kuliček, zřejmě díky tomu, že oba dva hydrokoloidy se získávají z mořských řas. Karagenan i agar jsou lineární polysacharidy. U karagenanu jsou základem struktury opakující se jednotky β -D-galaktopyranózy a 3,6-anhydro- α -D-galaktopyranózy, které jsou spojené střídavými glykozidickými vazbami (1,3) a (1,4). U agaru je to obdobné, ten se skládá z agarózy a agaropektinu, přičemž agaróza je tvořena β -D-galaktopyranózou a 3,6-anhydro- α -L-galaktopyranózou střídavě vázaná glykozidickými vazbami (1,3) a (1,4). Kappa-karagenan existuje jako pravotočivá trojšroubovice neboli helix, která reverzibilně vytváří dvojšroubovice. Segmenty šroubovice pak mohou interagovat za vytvoření trojrozměrné sítě. Agar má strukturu dvojité šroubovice, která se shlukuje do trojrozměrné sítě, zadržuje molekuly vody a vytváří termoreverzibilní gely (Imeson, 2009, s. 169; Imeson, 2010, s. 37; Venugopal, 2011, s. 98, 113–114). Dále také, že

jsou hodnoty želatiny z hlediska distribuce tukových kuliček blízké hodnotám kontrolních vzorků, což je nejspíše dáno proteinovou povahou želatiny (Stevens, 2010, s. 131).

Tabulka 5 Hodnoty relativních četností velikostí tukových kuliček pro jednotlivé vzorky

intervaly [μm]	relativní četnosti							
	AI	AII	KARI	KARII	PGI	PGII	KI	KII
0,000	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
0,100	0%	0%	1%	0%	5%	1%	21%	9%
0,200	7%	3%	3%	1%	11%	6%	37%	37%
0,300	12%	10%	9%	4%	13%	16%	26%	22%
0,400	11%	6%	7%	6%	12%	10%	7%	11%
0,500	5%	5%	12%	10%	14%	11%	6%	13%
0,600	1%	12%	8%	11%	8%	11%	1%	3%
0,700	7%	7%	8%	11%	6%	9%	1%	3%
0,800	11%	9%	7%	3%	5%	8%	0%	1%
0,900	3%	3%	4%	7%	3%	4%	1%	0%
1,000	4%	4%	5%	6%	7%	5%	0%	0%
1,100	5%	6%	2%	6%	4%	2%	0%	0%
1,200	5%	6%	4%	5%	2%	6%	0%	0%
1,300	1%	4%	2%	4%	0%	0%	0%	0%
1,400	2%	1%	6%	9%	2%	0%	0%	0%
1,500	4%	5%	6%	5%	1%	1%	0%	0%
1,600	2%	2%	3%	1%	0%	0%	0%	0%
1,700	1%	1%	1%	3%	0%	1%	0%	0%
1,800	2%	1%	1%	1%	0%	0%	0%	0%
1,900	0%	2%	0%	1%	2%	1%	0%	0%
2,000	1%	1%	1%	1%	0%	1%	0%	0%
4,200	12%	8%	7%	2%	2%	3%	0%	0%
4,400	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
4,600	0%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
4,800	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
5,000	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

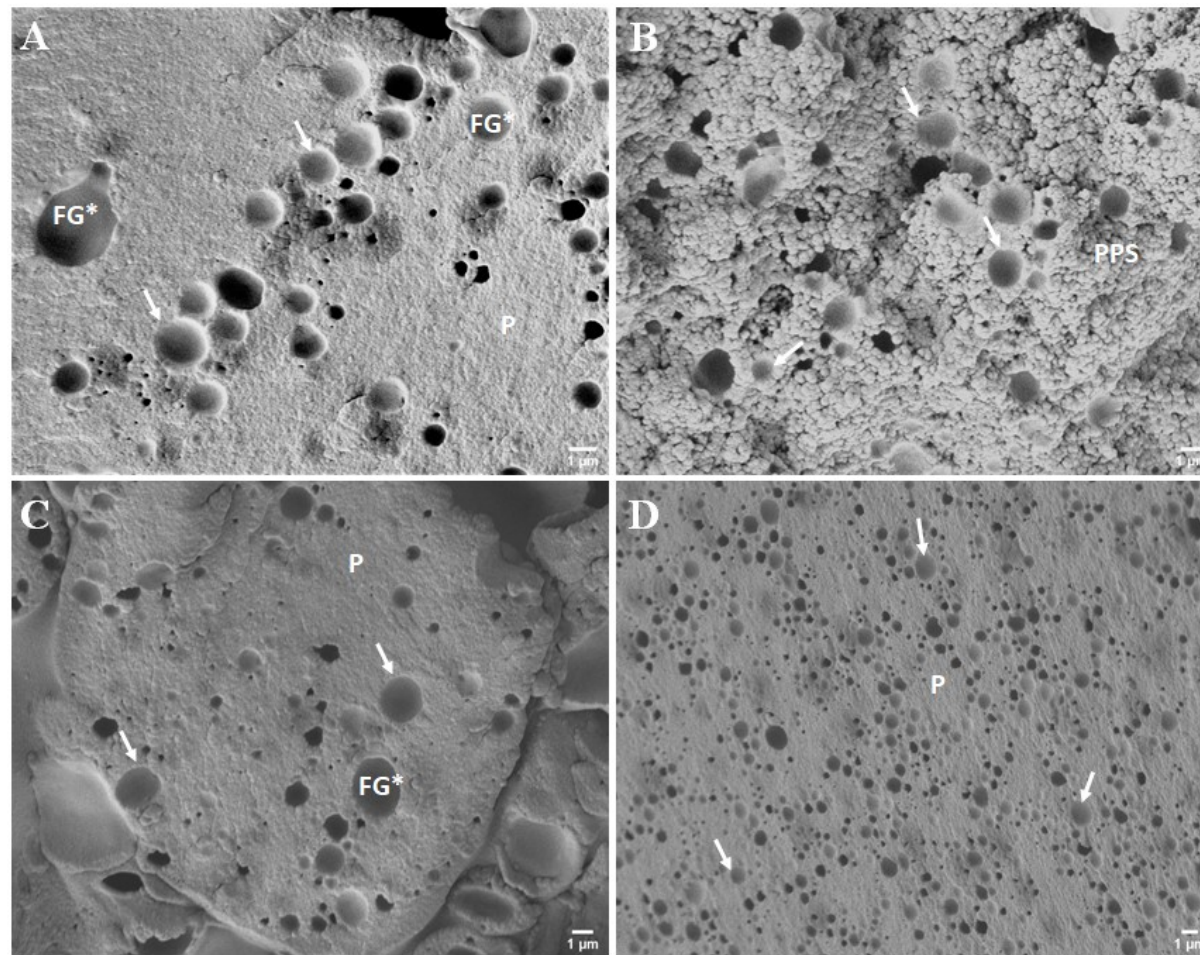
V přírodním sýru, který slouží jako surovina pro výrobu taveného sýra, neexistuje kazein v podobě micel. Lynch a Mulvihill (1996, s. 152) zjistili, že schopnost α_s - a β -kazeinů interagovat s karagenany vyžaduje přítomnost vápenatých iontů a esterově vázaný fosfor na serylových zbytcích kazeinových frakcí. Bez přítomnosti iontů vápníku nebyly zjištěny žádné interakce mezi α_s - nebo β -kazeinem a karagenany, protože α_s - a β -kazeiny neintera-

gují elektrostaticky s karagenany kvůli rovnoměrnější distribuci pozitivně a negativně nabitých zbytků podél jejich polypeptidových řetězců a nedostatku pozitivně nabitých oblastí (Lynch a Mulvihill, 1996, s. 152; Černíková a kol., 2007, s. 52).

Kappa-karagenan interaguje synergicky s mléčnými proteiny, zejména s kazeinovými micelami (κ -kazein), a tím zvyšuje viskozitu a gelovatění. Jedná se o specifickou interakci mezi κ -karagenanem a κ -kazeinem, která poskytuje stabilizační síť v mléčných výrobcích, aby se zabránilo synerezi a suspendování částic. Existují 2 teorie vysvětlující interakci mezi κ -karagenanem a kazeinovými micelami. První teorie říká, že negativně nabitý κ -karagenan interaguje s pozitivně nabitou oblastí mezi 97. a 112. aminokyselinou κ -kazeinu, a tak dojde k adsorpci na povrch kazeinové micely. Druhá teorie navrhuje, že separaci je bráněno prostřednictvím tvorby slabého gelu κ -karagenanu, který potlačuje funkci kazeinových micel (Spagnuolo a kol., 2005, s. 371–372; Černíková a kol., 2008, s. 1055; Imeson, 2009, s. 183; Blakemore a Harpell, 2010, s. 87–88).

Agar obsahuje neutrální polymerní řetězec, který omezeně reaguje s jinými materiály. Nevykazuje žádné interakce s proteiny kvůli nižšímu obsahu esterově vázaných síranových skupin na polymerním řetězci, které znesnadňují možnost vazby s proteiny (Imeson, 2010, s. 40; Venugopal, 2011, s. 102).

Tavicí soli hrají důležitou roli při výrobě taveného sýra, ve kterém vytváří jednotnou strukturu během procesu tavení. Jejich hlavní úlohou je upravit prostředí surovinové směsi tak, aby mohly přítomné proteiny uplatnit své přirozené emulgační vlastnosti. Účinek tavicích solí spočívá ve výměně kationtů vápníku nerozpustného parakazeinanu vápenatého za ionty sodíku, což vede k tvorbě rozpustnějšího parakazeinanu sodného. Tavicí soli mají 2 hlavní funkce: sekvestrace vápníku a úprava pH. Obojí napomáhá hydrataci kazeinů přítomných v přírodním sýru, tudíž mohou snadno interagovat s vodní a tukovou fází, čímž vznikne homogenní emulze taveného sýra s požadovanou konzistencí (Kapoor a Metzger, 2008, s. 203–204; Černíková a kol., 2010, s. 336; Hladká a kol., 2014, s. 650; Lenze a kol., 2019, s. 575). Tavicí soli pomáhají zlepšovat emulgační vlastnosti kazeinů vytlačováním komplexů fosforečnanu vápenatého v nerozpustné síti fosforečnanu vápenatého a parakazeinanu přítomného v přírodním sýru. Tento přesun komplexu narušuje molekulární sílu, která zesítuje různé monomery kazeinu v síť. Po výrobě taveného sýra a během chlazení vytváří částečně dispergovaná kazeinanová matrice tzv. „vločky“, které následně interagují a vytváří jednotnou proteinovou gelovou síť (Kapoor a Metzger, 2008, s. 198).

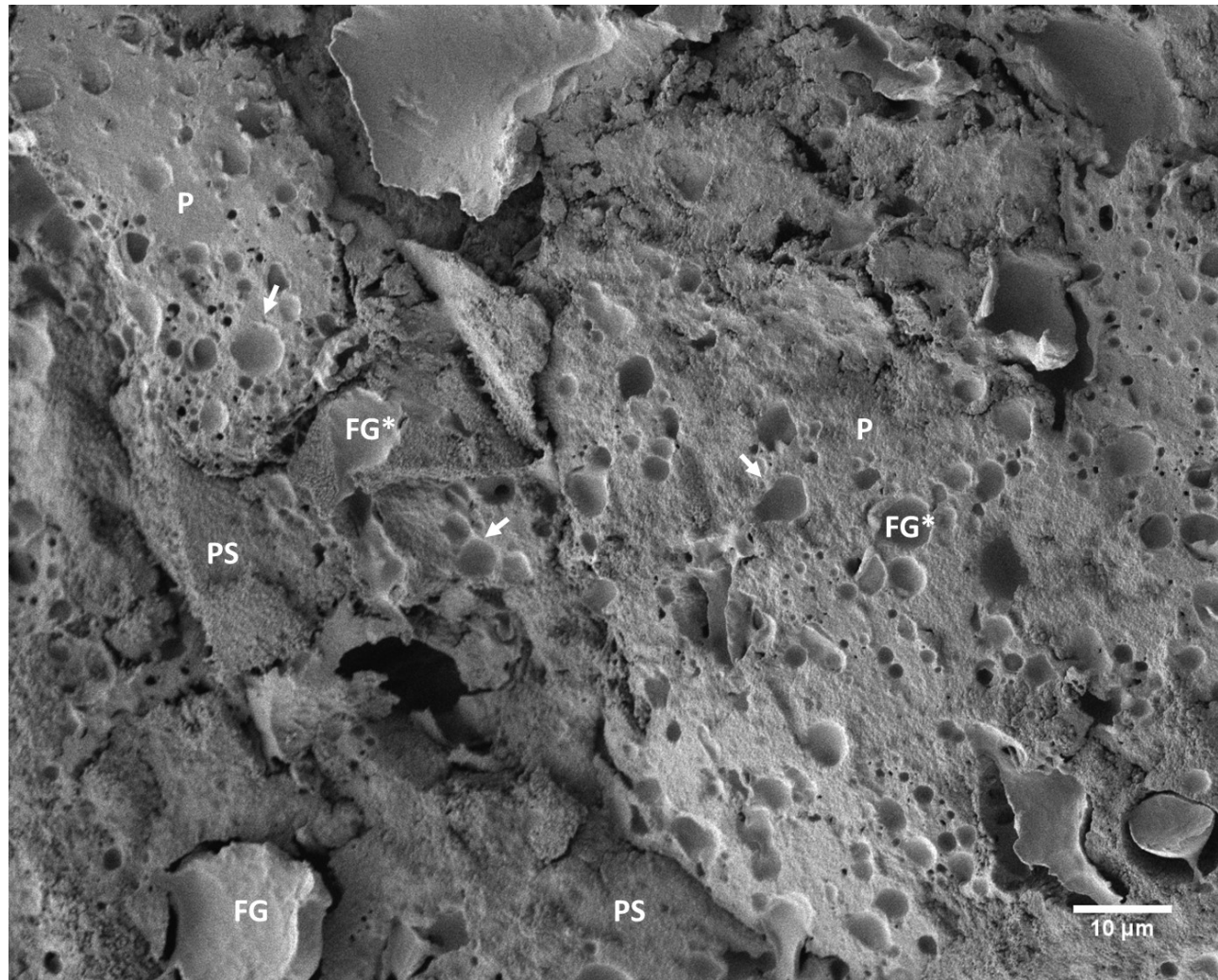


Obr. 15 Mikrostruktura modelových tavených sýrů, zvětšení 5000 krát; část A vzorek s 1 % (w/w) agaru; část B vzorek s 1 % (w/w) κ -karagenanu; část C vzorek s 1 % (w/w) želatiny; část D kontrolní vzorek s 2,5 % (w/w) tavicích solí; FG* – prázdný prostor po tukové kuličce (bílé šipky), P – proteinová struktura, PPS – proteinpolysacharidová struktura

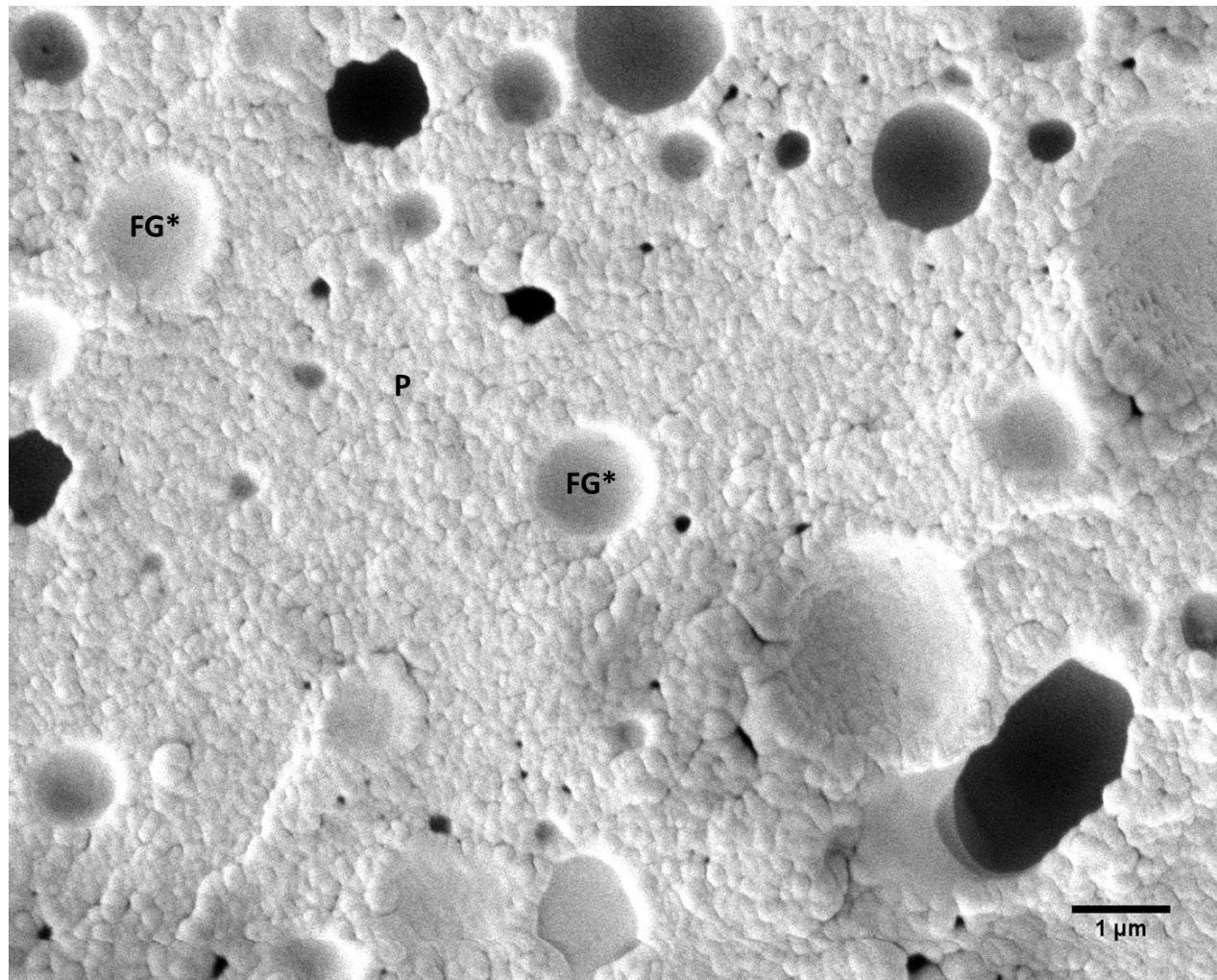
Na Obr. 15 jsou zobrazeny mikrofotografie vzorků tavených sýrů s 1 % (w/w) přídavkem hydrokoloidu (agar, κ -karagenan, želatina) a kontrolní vzorky s 2,5 % (w/w) tavicích solí při zvětšení 5000 krát. Na základě velikosti tukových kuliček je na této mikrofotografii patrné, že největší tukové kuličky resp. prázdná místa po tukových kuličkách jsou na modelových vzorcích s obsahem agaru (Obr. 15 A), což lze také vidět na Obr. 16, kde i při zvětšení 1000 krát jsou dobře pozorovatelné tukové kuličky i prázdná místa po tukových kuličkách, anebo na Obr. 17 při zvětšení 10 000 krát. Na Obr. 16 se lze domnívat, že agar přidaný v taveném sýru zde vytváří svoji vlastní polysacharidovou síť a také tu lze vidět proteinovou síť, což by mohlo také podporovat fakt, že agar vytvořil nejméně homogenní matici taveného sýra tedy nestejnorodou strukturu v porovnání s mikrostrukturou vzorku kontroly s tavicími solemi. Jelikož agar vytváří dvoušroubovici, která se seskupuje do trojrozměrné sítě (Venugopal, 2011, s. 98). Naopak u kontrolních vzorků s obsahem tavicích solí na Obr. 22 při zvětšení 1000 krát už nejsou tukové kuličky moc dobře znatelné, ale lze si povšimnout, že struktura kontrolního vzorku je stejnorodá a homogenní. Na Obr. 23, který zobrazuje matici taveného sýra s tavicími solemi při zvětšení 10 000 krát, si lze lépe prohlédnout prázdná místa po tukových kuličkách a homogenitu matrice. Na Obr. 20 je zobrazena struktura vzorku bez tavicích solí s přídavkem želatiny, na kterém lze postřehnout menší tukové kuličky oproti vzorkům s přídavkem agaru nebo κ -karagenanu, a to na základě zjištění, že vzorky bez tavicích solí s přídavkem želatiny měly nejlépe zaemulgovaný tuk. Obr. 18 zobrazuje vzorek bez tavicích solí s přídavkem κ -karagenanu ve zvětšení 1000 krát, na kterém lze pozorovat větší tukové kuličky v porovnání se vzorkem s přídavkem želatiny anebo s kontrolním vzorkem. Na této mikrofotografii lze také pravděpodobně sledovat spojení κ -karagenanu a kazeinových frakcí za vytvoření kompaktní proteinopolysacharidové matrice. Podrobněji zachycená struktura vzorku s přídavkem κ -karagenanu je na Obr. 19 a s přídavkem želatiny je na Obr. 21.

Mikrostruktura sýra úzce souvisí s vývojem struktury a chuti. Lze očekávat, že struktura a reologické vlastnosti sýrů obecně a zejména tavených sýrů mohou souviset s jejich mikrostrukturou. V přírodním sýru se proteinová matrice skládá z velkých micel, aglomerovaných micel a silných vláken spojených do micel. V tomto sýru jsou nativní kuličky mléčného tuku tlačeny dohromady do agregátů v proteinové matici, a přestože jsou zdeformované, mohou si stále udržovat svou globulární celistvost. U taveného sýra existuje jiná situace. Lze očekávat, že během přípravy taveného sýra se původně přítomné ionty vápníku odstraní z kazeinových micel vlivem působení komplexu vápníku na tavicí soli.

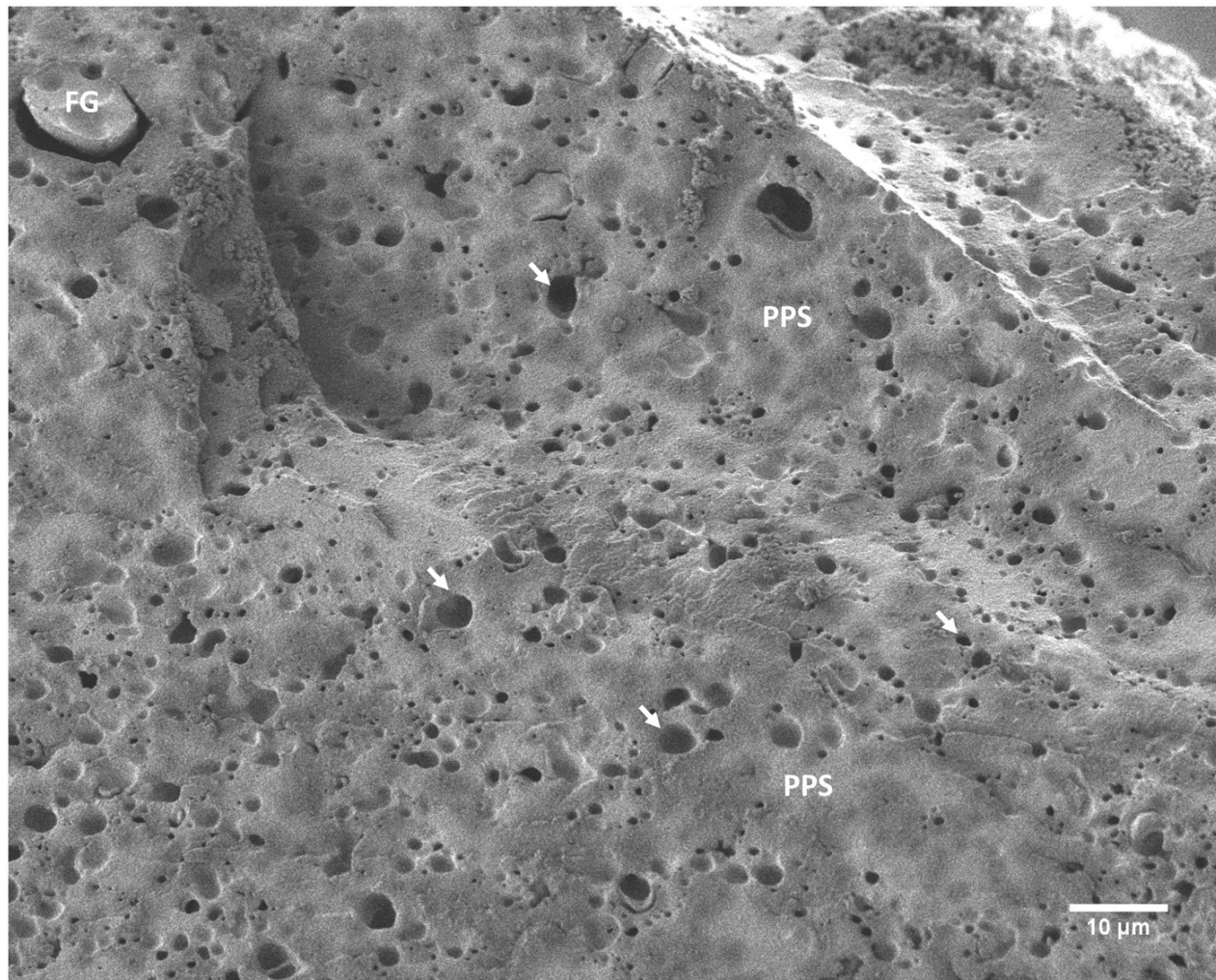
Tento vápník hraje rozhodující roli v integritě kazeinových micel. Když je vápník odstraněn z micel, dochází k dezintegraci na submicely nebo možná menší jednotky. Při zpracování taveného sýra se volný tuk oddělí během počátečního zahřívání sýra a potom se znovu emulguje. Klíč k reemulgaci je v tavící soli, která pod vlivem tepla zvyšuje emulgační vlastnosti sýrových proteinů. Emulgační vlastnosti sýrových proteinů, které by se při zahřívání zhoršily, jsou tak obnoveny v důsledku reakcí s emulgačními solemi a v důsledku toho se tuk emulguje na malé kuličky. Na povrchu tukových částic mohou být patrné nové membrány. Emulgační účinek soli se liší od jednoho proteinu k druhému. Špatná emulgace měla za následek nejměkčí a nejtavnější sýr, zatímco dobře emulgované sýry byly nejpevnější a nejkrájetelnější. Tavící soli s velmi silnou schopností vázat vápník vedou k produkci pevných tavených sýrů, které obsahují tuk ve formě velmi malých kuliček. Rozsáhlá emulgace má za následek vznik tukových kuliček o průměru menším než 1 μm , zejména po homogenizaci taveného sýra. Rozměry a vzhled tukových částic se v komerčním taveném sýru mohou lišit v závislosti na rozsahu emulgace. Pokud jsou parametry, jako je obsah vlhkosti a tuku a pH, stejné, tavený sýr, ve kterém se tuk vyskytuje jako velké částice, je měkčí než tavený sýr obsahující malé tukové částice. Použití emulgačních solí s vysokou afinitou k vápníku vede k tvorbě menších tukových částic (Heertje a kol., 1981, s. 177–179; Carić a Kaláb, 1997, s. 484–489; Awad a kol., 2002, s. 54; Kaláb, 2011).



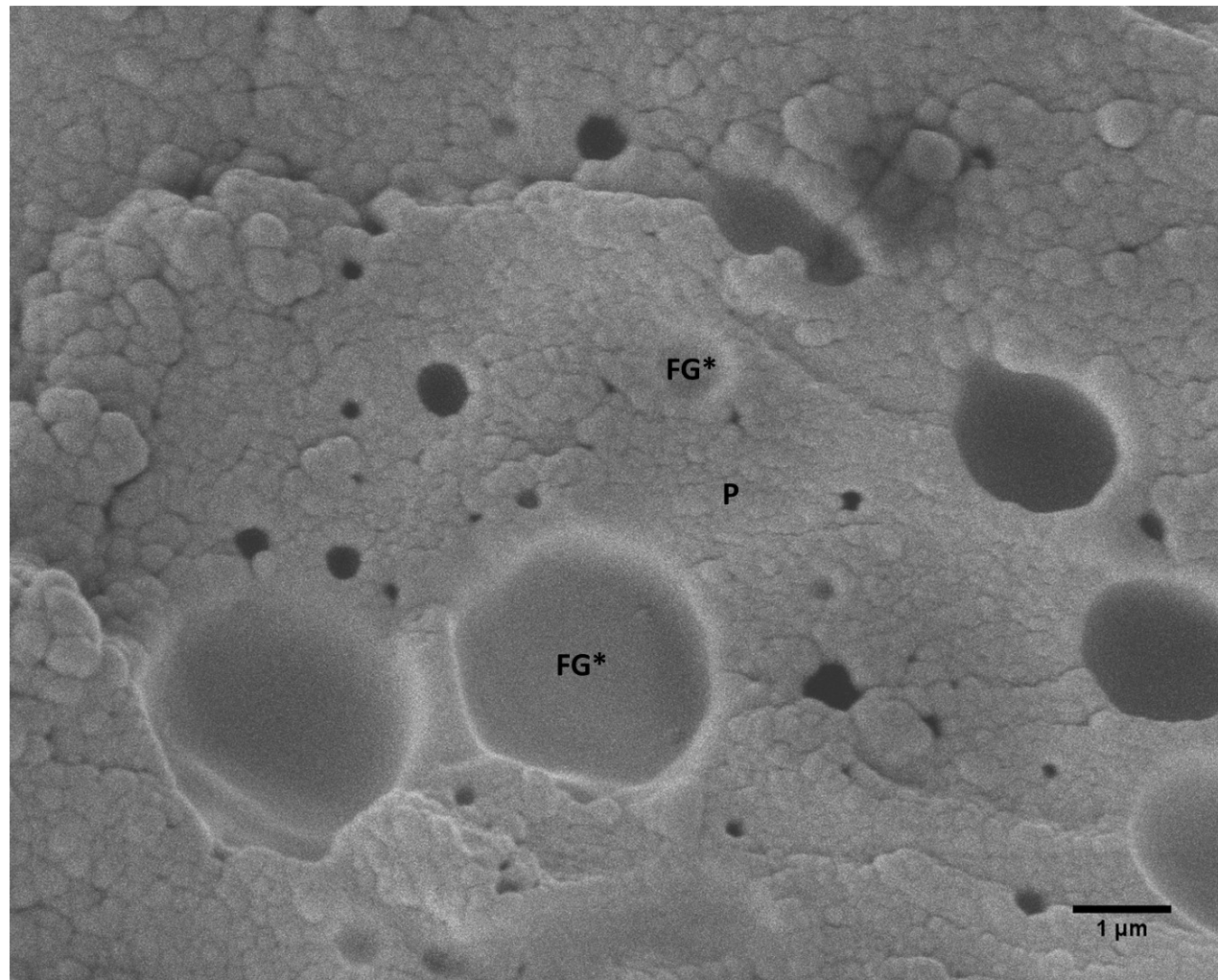
Obr. 16 Mikrostruktura taveného sýra bez tavicích solí s 1 % (w/w) agaru, zvětšení 1000 krát; FG – tuková kulička, FG* – prázdný prostor po tukové kuličce (bílé šipky), P – proteinová struktura, PS – polysacharidová struktura



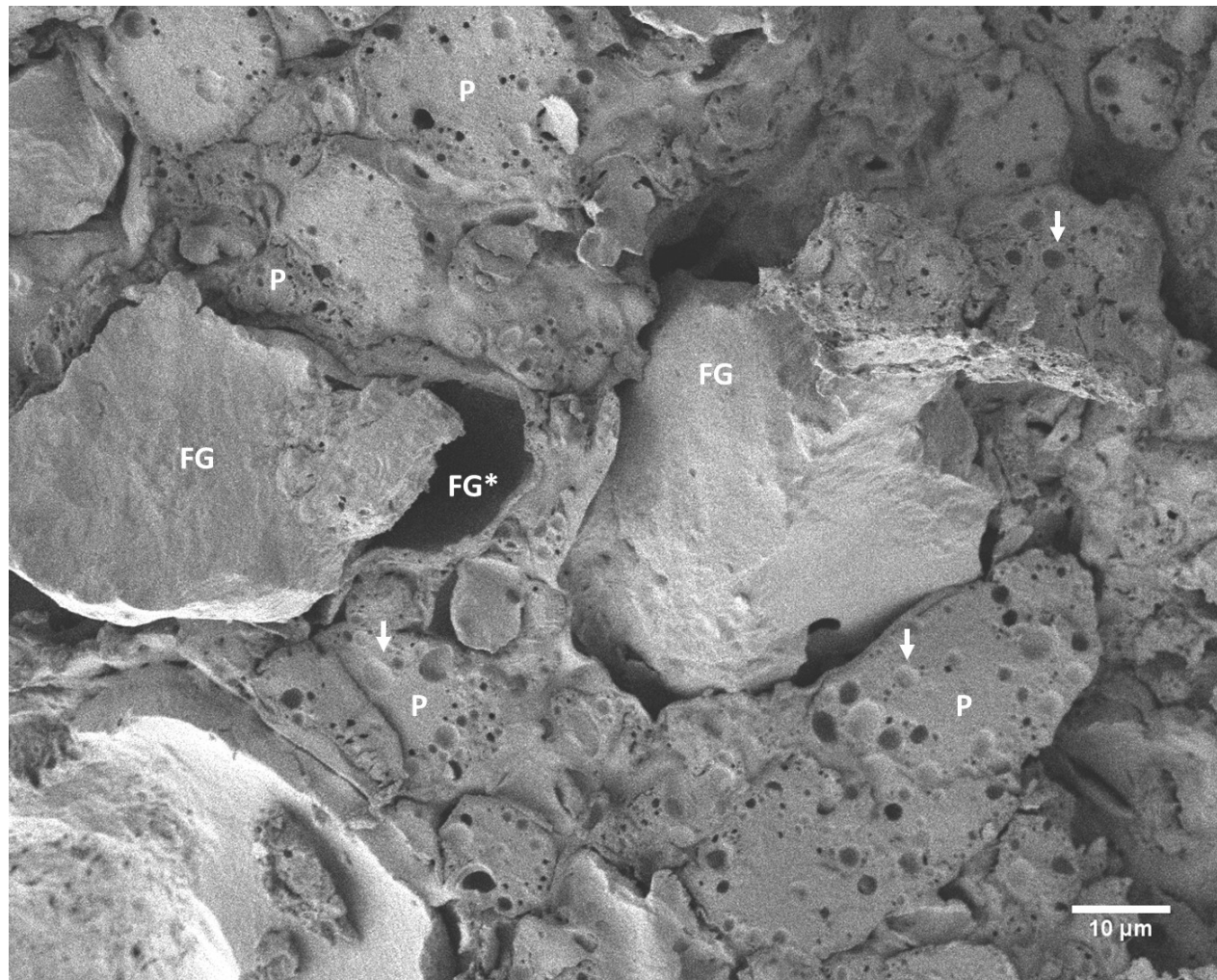
Obr. 17 Mikrostruktura taveného sýra bez tavicích solí s 1 % (w/w) agaru, zvětšení 10 000 krát; FG – prázdný prostor po tukové kuličce, P – proteinová struktura*



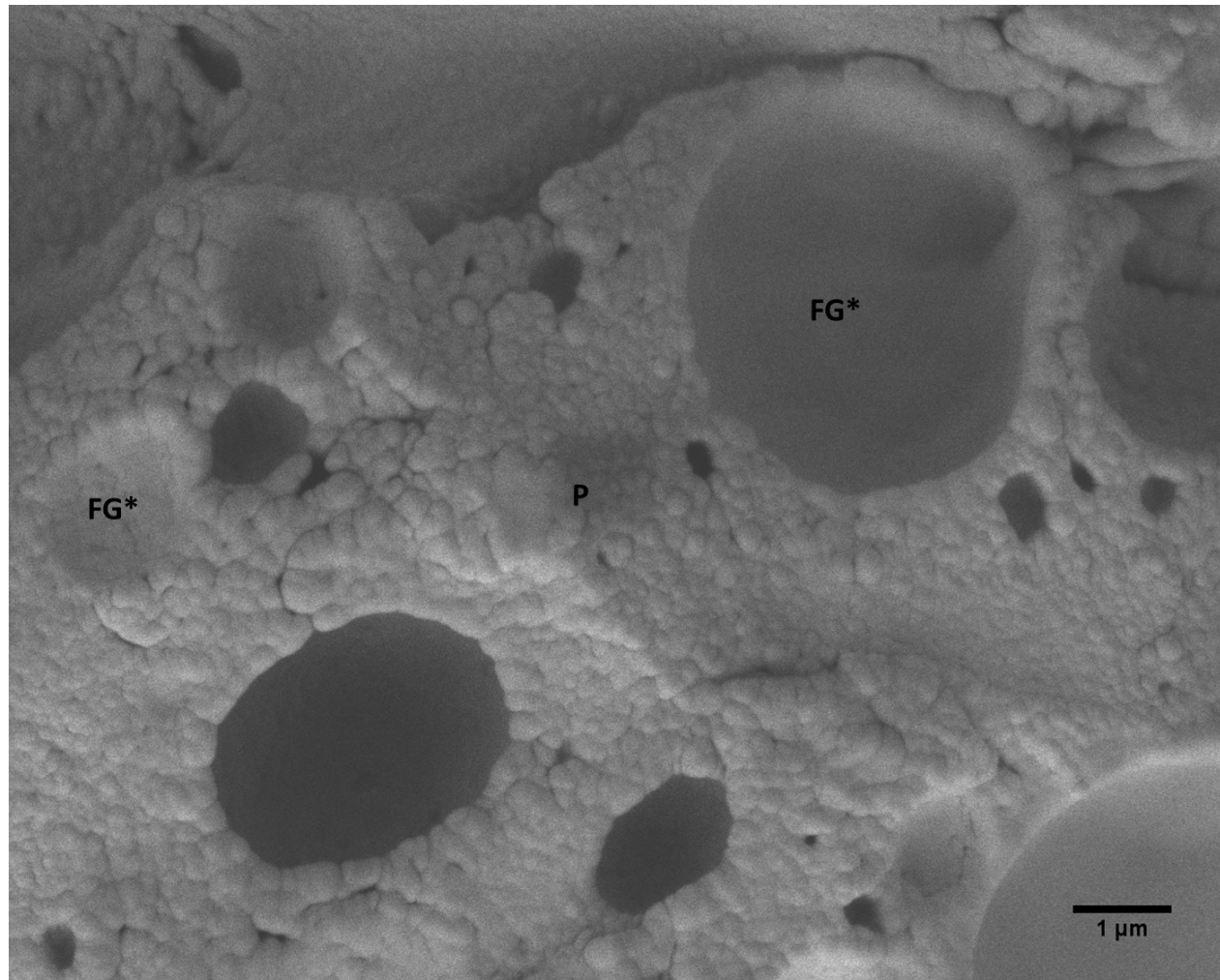
Obr. 18 Mikrostruktura taveného sýra bez tavicích solí s 1 % (w/w) κ -karagenanu, zvětšení 1000 krát; FG – tuková kulička, bílé šipky – prázdný prostor po tukové kuličce, PPS – proteinpolysacharidová struktura



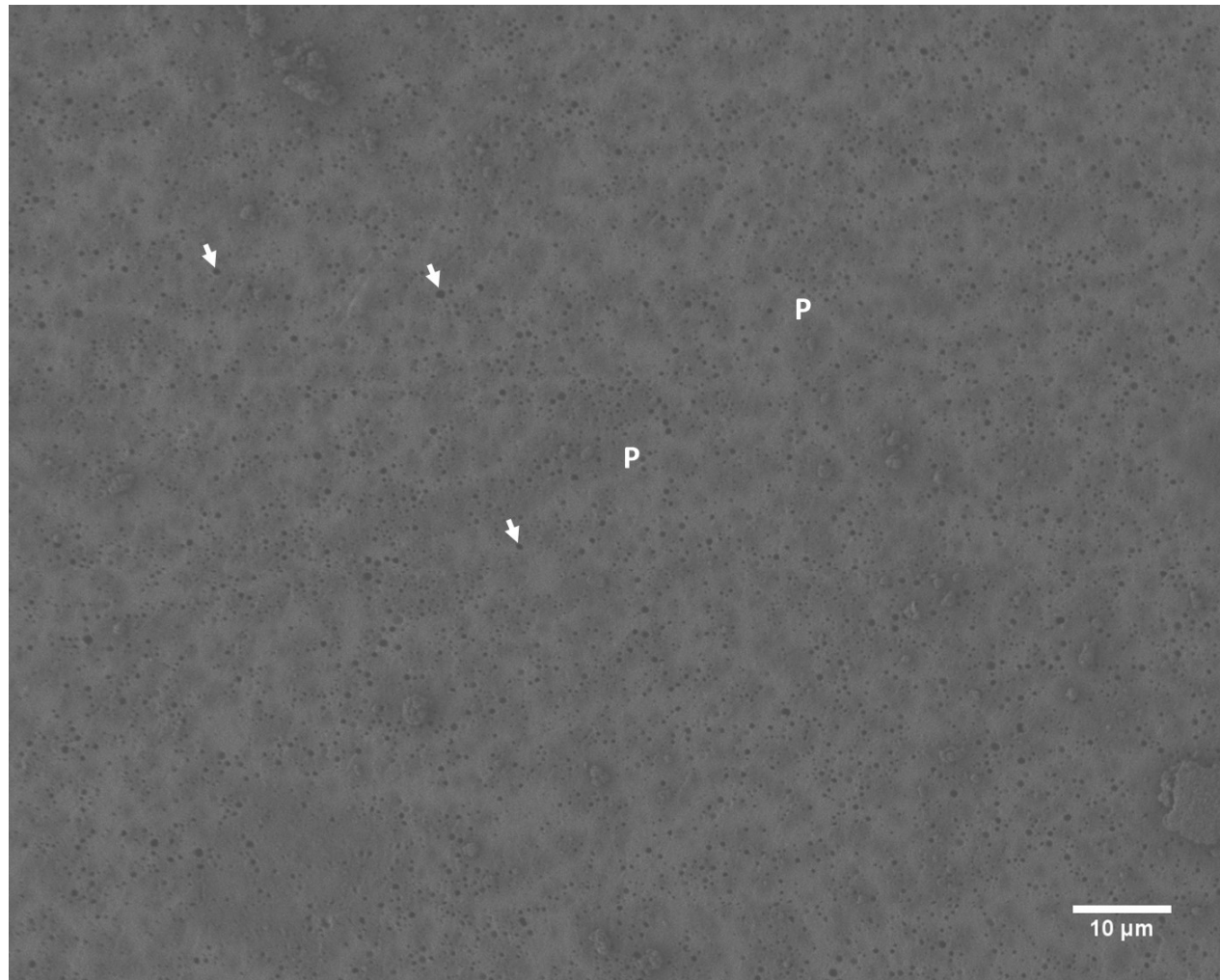
Obr. 19 Mikrostruktura taveného sýra bez tavicích solí s 1 % (w/w) κ -karagenanu, zvětšení 10 000 krát; FG – prázdný prostor po tukové kuličce, P – proteinová struktura*



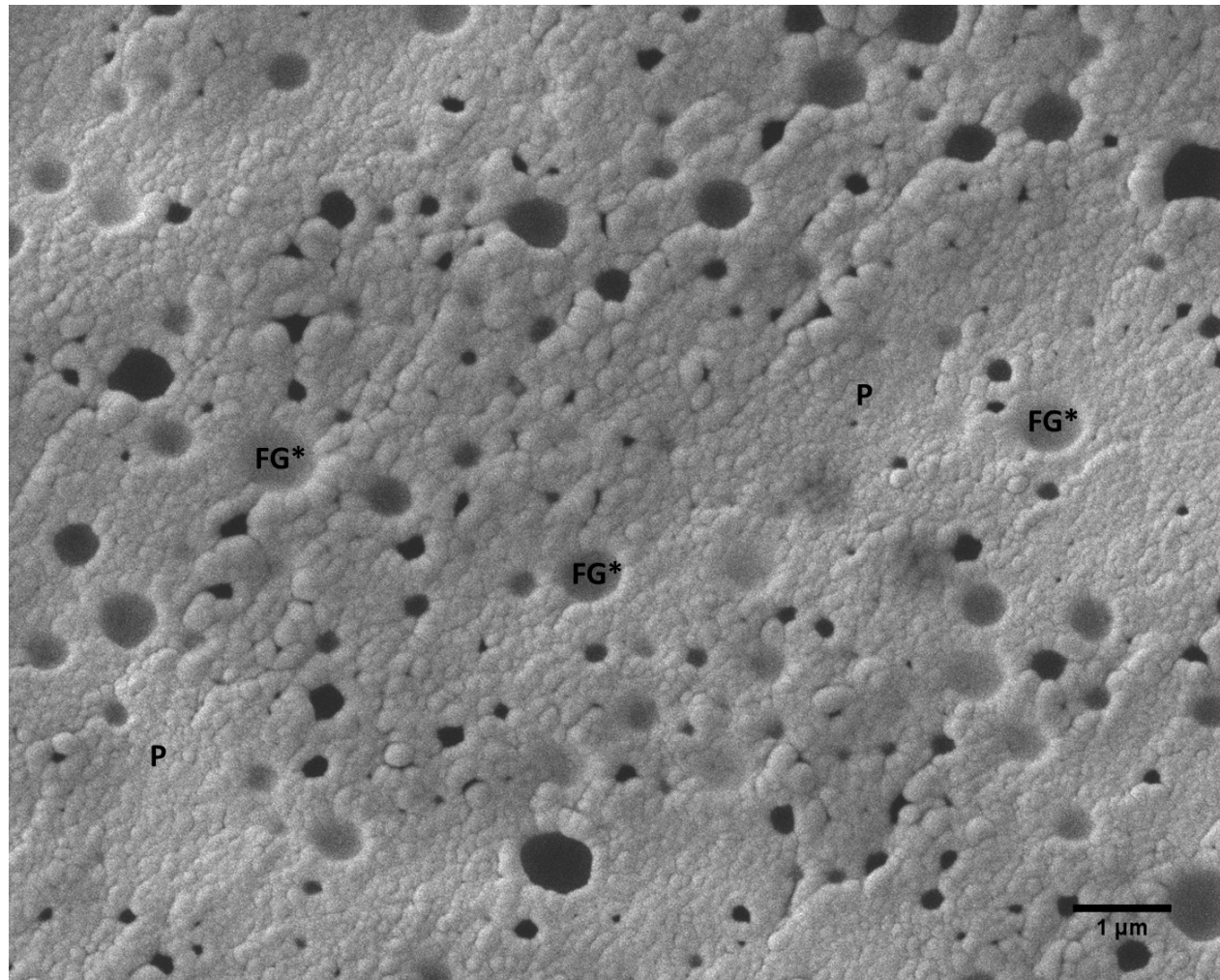
Obr. 20 Mikrostruktura taveného sýra bez tavicích solí s 1 % (w/w) želatiny, zvětšení 1000 krát; FG – tuková kulička, FG – prázdný prostor po tukové kuličce (bílé šipky), P – proteinová struktura*



Obr. 21 Mikrostruktura taveného sýra bez tavicích solí s 1 % (w/w) želatiny, zvětšení 10 000 krát; FG* – prázdný prostor po tukové kuličce, P – proteinová struktura



Obr. 22 Mikrostruktura taveného sýra se 2,5 % (w/w) tavicích solí, zvětšení 1000 krát; bílé šipky – prázdný prostor po tukové kuličce,
P – proteinová struktura



Obr. 23 Mikrostruktura taveného sýra se 2,5 % (w/w) tavicích solí, zvětšení 10 000 krát; FG* – prázdný prostor po tukové kuličce,
P – proteinová struktura

ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na mikrostrukturu tavených sýrů, do nichž byly jako náhrady tavicích solí fosforečnanového nebo citronanového typu aplikovány vybrané hydrokoloidy. Z analytických metod byla zvolena základní chemická, senzorická a reologická analýza. Účelem práce bylo vyrobit vzorky tavených sýrů a jako náhradu tavicích solí použít agar, κ -karagenan a želatinu. Byla provedena základní chemická analýza, při které byl stanoven obsah tuku, obsah sušiny a pH. Dále byla u vzorků provedena dynamická oscilační reometrie, kde byl zjišťován komplexní modul pružnosti G^* . Vzorky byly prohlédnuty ve skenovacím elektronovém mikroskopu a byla zkoumána jejich mikrostruktura, zda je stejná nebo zcela odlišná z hlediska působení jednotlivých hydrokoloidů.

Na základě výsledků získaných v experimentální části lze vyvodit následující závěry:

- aplikace hydrokoloidů má vliv na hodnoty pH tavených sýrů bez aplikace tavicích solí, protože docházelo k mírnému snížení pH, a to na hodnoty 5,3–5,6;
- vliv přídavku hydrokoloidů na viskoelastické vlastnosti závisí na druhu aplikovaného hydrokoloidu;
- tuhost vzorků s danými hydrokoloidy během dvouměsíčního skladování postupně klesala;
- nejtužší vzorky byly s přídavkem κ -karagenanu, nejnižší tuhost vykazovaly vzorky, do nichž byla aplikována želatina a kontrolní vzorky s obsahem tavicích solí;
- výsledky mikroskopie ukázaly, že největší tukové kuličky byly zjištěny v matrici taveného sýra s přídavkem agaru, u nějž tedy docházelo k nejnižší emulgační schopnosti;
- vzorky s přídavkem agaru neměly stejnorodou strukturu jako vzorky kontroly;
- z použitých hydrokoloidů byly zjištěny nejmenší tukové kuličky ve vzorku s přídavkem želatiny;
- z vybraných hydrokoloidů se želatina jevila jako nejlepší emulgační činidlo.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ANONYM, 2004a. ČSN EN ISO 5534:2004, Sýry a tavené sýry – Stanovení obsahu celkové sušiny (Referenční metoda). Praha: Český normalizační institut.

ANONYM, 2004b. ČSN EN ISO 1735:2004, Sýry a tavené sýrové výrobky – Stanovení obsahu tuku – Gravimetrická metoda (Referenční metoda). Praha: Český normalizační institut.

ANONYM, 2008. ČSN EN ISO 8589, Senzorická analýza – Obecné pokyny pro uspořádání senzorického pracoviště. Praha: Český normalizační institut.

ANONYM, 2015. ČSN ISO 8586, Senzorická analýza – Obecná směrnice pro výběr, výcvik a sledování činnosti posuzovatelů. Praha: Český normalizační institut.

ANONYM, 2017. Obaly pro tavené sýry. *ALINVEST* [online]. 2017 [cit. 2019-12-10]. Dostupné z: <https://www.alinvest.cz/cs/obaly-na-bazi-hliniku/mlekarensky-prumysl/obaly-pro-tavene-syry>

AWAD, R. A., L. B. ABDEL-HAMID, S. A. EL-SHABRAWY a R. K. SINGH. Texture and microstructure of block type processed cheese with formulated emulsifying salt mixtures. *LWT - Food Science and Technology*. 2002, vol. 35, s. 54-61. ISSN 0023-6438.

BLAKEMORE, W. R. a HARPELL A. R. Carrageenan. In *Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents*. Eds. Imeson, A. Wiley-Blackwell Pub., 2010. s. 73-94. ISBN 978-140-5132-671.

BÖCKER, L., P. A. RÜHS, L. BÖNI, P. FISCHER a S. KUSTER. Fiber-Enforced Hydrogels: Hagfish Slime Stabilized with Biopolymers including κ -Carrageenan. *ACS Biomaterials Science & Engineering*. 2016, vol. 2, s. 90-95.

BOZZOLA, J. J. a L. D. RUSSELL. *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*. 2nd ed. Sudbury, Mass.: Jones and Bartlett, 1999, 670 s. ISBN 0-7637-0192-0.

BUŇKA, F., L. BUŇKOVÁ a S. KRÁČMAR. Vybrané hydrokoloidy a emulgátory ve výrobě tavených sýrů. *Acta fytotechnica et zootechnica*. 2009, vol. 12, s. 69-78.

BUŇKA, F., L. BUŇKOVÁ a S. KRÁČMAR. *Základní principy výroby tavených sýrů: Basic principles of processed cheese production : monografie*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2009, 70 s. Folia Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis. ISBN 978-807-3753-368.

CARIĆ, M. a M. KALÁB. Processed cheese products. In P. F. Fox, P. L. H. McSweeney a T. P. Cogan (Eds.), *Cheese: Chemistry, physics and mikrobiology. Major Cheese Groups*, 2nd ed., London, UK: *Elsevier Applied Science*. 1997, vol. 2, s. 467-505.

CASTEJÓN, Orlando J. *Scanning Electron Microscopy of Cerebellar Cortex*. New York: Springer US, 2003, 135 s. ISBN 978-0-306-47711-9.

ČERNÍKOVÁ, M., 2017c. *Vybrané faktory působící na konzistenci tavených sýrů*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2017, 80 s. ISBN 978-80-7454-728-7.

ČERNÍKOVÁ, M., F. BUŇKA, V. PAVLÍNEK, P. BŘEZINA, J. HRABĚ a S. KRÁČMAR. The effect of addition of selected carrageenans on viscoelastic properties of model processed cheese spreads. *Acta universitatis agriculturae et silviculturae Mendelianae Brunensis*, 2007, vol. 5, s. 51-58.

ČERNÍKOVÁ, M., F. BUŇKA, V. PAVLÍNEK, P. BŘEZINA, J. HRABĚ a P. VALÁŠEK. Effect of carrageenan type on viscoelastic properties of processe cheese. *Food Hydrocolloids*. 2008, vol. 22, s. 1054-1061.

ČERNÍKOVÁ, M., F. BUŇKA, M. POSPIECH, B. TREMLOVÁ, K. HLADKÁ, V. PAVLÍNEK a P. BŘEZINA. Replacement of traditional emulsifying salts by selected hydrocolloids in processed cheese production. *International Dairy Journal*. 2010, vol. 20, s. 336-343.

ČERNÍKOVÁ, M., J. NEBESÁŘOVÁ, R. N. SALEK, L. ŘÍHÁČKOVÁ a F. BUŇKA, 2016. Srovnání různých metod přípravy vzorků tavených sýrů pro elektronovou mikroskopii. In Sborník přednášek a posterů Hygiena a technologie potravin XLVI. Lenfeldovy a Höklovy dny. Brno: VFU Brno, 19. a 20. října 2016, s. 16-21. ISBN 978-80-7305-781-7.

ČERNÍKOVÁ, M., J. NEBESÁŘOVÁ, R. N. SALEK, L. ŘÍHÁČKOVÁ a F. BUŇKA, 2017a. Microstructure and textural and viscoelastic properties of model processed cheese with different dry matter and fat in dry matter content. *Journal of Dairy Science*. 2017, vol. 100, s. 4300-4307.

ČERNÍKOVÁ, M., R. N. SALEK, D. KOZÁČKOVÁ, H. BĚHALOVÁ, L. LUŇÁKOVÁ a F. BUŇKA, 2017b. Vliv vybraných technologických parametrů na konzistenci tavených sýrů. In Sborník přednášek a posterů Hygiena a technologie potravin XLVII. Lenfeldovy a Höklovy dny. Brno: VFU Brno, 18. a 19. října 2017, s. 14-18. ISBN 978-80-7305-793-0.

ČERNÍKOVÁ, M., R. N. SALEK, D. KOZÁČKOVÁ, H. BĚHALOVÁ, L. LUŇÁKOVÁ a F. BUŇKA, 2017d. The effect of selected processing parameters on viscoelastic properties of model processed cheese spreads. *International Dairy Journal*. 2017, vol. 66, s. 84-90.

ČESKO. Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 397/2016 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje, v platném znění. In: *Sbírka zákonů České republiky*. 2016. Dostupné také z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2016-397>

DIMITRELI, G. a A. S. THOMAREIS. Effect of chemical composition on the linear viscoelastic properties of spreadable-type processed cheese. *Journal of Food Engineering*. 2008, vol. 84, s. 368-374.

DOSTÁLOVÁ, J. a P. KADLEC. *Potravinářské zbožíznalství: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2014, 425 s. Monografie. ISBN 978-80-7418-208-2.

DYKSTRA, M. J. a L. E. REUSS. *Biological Electron Microscopy: theory, techniques, and troubleshooting*. Boston, MA: Springer US, 2003, 534 s. ISBN 978-1-4613-4856-6.

ECHLIN, Patrick. *Handbook of sample preparation for scanning electron microscopy and x-Ray microanalysis*. New York: Springer, 2009, 330 s. ISBN 978-0-387-85730-5.

EVROPA. Nařízení Rady (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských přídatných látkách, v platném znění.

FORET, Z. *Návrh koncepce a vývoj jednoúčelového rastrovacího elektronového mikroskopu* [online]. Brno, 2010 [cit. 2020-03-22]. Doktorská práce. Vysoké učení technické v Brně. Fakulta strojního inženýrství. Ústav materiálových věd a inženýrství. Vedoucí práce J. Švejcar. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/11012/8259>.

GABRIELE, D., B. de CINDIO a P. D'ANTONA. A weak gel model for foods. *Rheologica Acta*. 2001, vol. 40, s. 120-127.

GOLDSTEIN, J. *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. 3rd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003, 690 s. ISBN 978-0-306-47292-3.

GOUDA, A. a A. ABOU EL-NOUR. Processed Cheese. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Elsevier Science, 2003, s. 1108-1115.

GUINEE, T. P. Pasteurized Processed Cheese Products. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. 2011, s. 805-813.

GUINEE, T. P. Pasteurized processed and imitation cheese products. Cheese: chemistry, physics and mikrobiology. *Elsevier*, 2017, s. 1133-1184. ISBN 978-0-12-417012-4.

GUINEE, T. P., M. CARIĆ a M. KALÁB. Pasteurized Processed Cheese and Substitute/Imitation Cheese Products. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 2004, vol. 2, s. 349-394.

HEERTJE, I., M. J. BOSKAMP, F. van KLEEF a F. H. GORTEMAKER. The microstructure of processed cheese. *Neth. Milk Dairy Journal*. 1981, vol. 35, s. 177-179.

HILAL, A. A. Microstructure of Concrete. *High Performance Concrete Technology and Applications* [online]. InTech, 2016, [cit. 2020-03-30]. ISBN 978-953-51-2650-8. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/high-performance-concrete-technology-and-applications/microstructure-of-concrete>

HLADKÁ, K., Z. RANDULOVÁ, B. TREMLOVÁ, P. MANČÍK, M. ČERNÍKOVÁ a F. BUŇKA. Pevnost tavených sýrů vyrobených bez tradičních tavicích solí. *Mlékařské listy* [online]. 2011, s. 1-3. [cit. 2020-02-09]. Dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2011/126_s_i-iii.pdf

HLADKÁ, K., Z. RANDULOVÁ, B. TREMLOVÁ, P. PONÍŽIL, P. MANČÍK, M. ČERNÍKOVÁ a F. BUŇKA. The effect of cheese maturity on selected properties of processed cheese without traditional emulsifying agents. *Food and Science Technology*. 2014, vol. 55, s. 650-656.

IMESON, A. Agar. In *Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents*. Eds. Imeson, A. Wiley-Blackwell Pub., 2010. s. 31-49. ISBN 978-140-5132-671.

IMESON, A. P. Carrageenan and furcellaran. In *Handbook of hydrocolloids*. 2nd rev. ed. Eds. Phillips, G. O. a P. A. Williams, Cambridge: Woodhead Pub, 2009. s. 164-185. ISBN 978-1-84569-587-3.

JAMES, B. Advances in “wet” electron microscopy techniques and their application to the study of food structure. *Trends in Food Science & Technology*. 2009, vol. 20, s. 114-124. ISSN 09242244.

KADLEC, P., K. MELZOCH a M. VOLDŘICH. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2012, 569 s. Monografie. ISBN 978-80-7418-145-0.

KALÁB, M. Cheese: Development of structure. *Foods under the microscope* [online]. Scimat, 2011 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <http://www.magma.ca/~scimat/Cheese.htm>

KALÁB, M. Food microscopy. Food microscopy: *Foods under the microscope* [online]. Scimat, 2014 [cit. 2020-02-28]. Dostupné z: <http://www.magma.ca/~scimat/foodmicr.htm>

KALÁB, M. a W. H. MODLER. Milk gel structure. XV. Electron microscopy of whey protein-based Cream cheese spread. *Milchwissenschaft*. 1985, s. 193-196. ISSN-0026-3788.

KAPOOR, R. a L. E. METZGER. Process Cheese: Scientific and Technological Aspects – A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2008, vol. 7, s. 194-214.

KWAK, H. S., S. S. CHOI, J. AHN a S. W. LEE. Casein hydrolysate fraction act as emulsifiers in proces cheese. *Journal of Food Science*. 2002, vol. 67, s. 821-825. ISSN 0022-1147.

LANEUVILLE, S. I. a S. L. TURGEON. Microstructure and stability of skim milk acid gels containing an anionic bacterial exopolysaccharide and commercial polysaccharides. *International Dairy Journal*. 2014, vol. 37, s. 5-15.

LAUE, M. Electron Microscopy of Viruses. *Electron Microscopy of Model Systems*. Elsevier, 2010, s. 1-20. Methods in Cell Biology. ISBN 978-0-12-381007-6.

LENZE, S., A. WOLFSCHOON-POMBO, K. SCHRADER a U. KULOZIK. Effect of the Compositional Factors and Processing Conditions on the Creaming Reaction During Process Cheese Manufacturing. *Food and Bioprocess Technology*. 2019, vol. 12, s. 575-586.

LEWIS, D. F. Overview of Microscopical Approaches. In *Structure of dairy products*. Oxford, UK: Blackwell Pub., 2007, s. 1-16. Society of Dairy Technology series. ISBN-13: 978-1-4051-2975-6.

LYMAN, C. E. *Scanning electron microscopy, X-ray microanalysis, and analytical electron microscopy: a laboratory workbook*. New York: Plenum Press, 1990, 407 s. ISBN 978-0-306-43591-1.

LYNCH, M. G. a D. M. MULVIHILL. Rheology of ι -carrageenan gels containing caseins. *Food hydrocolloids*, 1996, vol. 10, s. 151-157.

MEHANNA, N. S., F. A. M. HASSAN, T. M. EL-MESSERY a A. G. MOHAMED. Production of Functional Processed Cheese by Using Tomato Juice. *International Journal of Dairy Science*. 2017, vol. 12, s. 155-160.

MIRANDA-RAMOS, K. C., N. SANZ-PONCE a C. M. HAROS. Evaluation of technological and nutritional quality of bread enriched with amaranth flour. *LWT - Food Science and Technology*. 2019, vol. 114.

MOHAMED, A. G., S. M. SHALABY a W. A. GAFOUR. Quality Characteristics and Acceptability of an Analogue Processed Spreadable Cheese Made with Carrot Paste (*Daucus carota* L.). *International Journal of Dairy Science*. 2016, vol. 11, s. 91-99.

MORRIS, V. J. a K. GROVES. *Food microstructures: microscopy, measurement and modelling*. Philadelphia: Woodhead Publishing Limited, 2013, 438 s. ISBN 978-0-85709-525-1.

NEBESÁŘOVÁ, J., M. VANCOVÁ a M. NEBESÁŘ. Elektronová mikroskopie pro biologie. *Elektronová mikroskopie pro biology* [online]. 2001 [cit. 2020-03-03]. Dostupné z: <http://triton.paru.cas.cz/old-lem/book/Podkap/autori.html>

NEUDEK, P. *Tavený sýr s amarantovou moukou*. Česká republika. Užité vzor CZ 25124 U1. Zapsáno 25. 3. 2013.

NEUDEK, P. *Tavený sýr s amarantovou moukou*. Česká republika. Užité vzor CZ 26324 U1. Zapsáno 9. 1. 2014.

PEDERGNANA, A., A. OLLÉ a A. A. EVANS. A new combined approach using confocal and scanning electron microscopy to image surface modifications on quartzite. *Journal of Archaeological Science: Reports*. 2020, vol. 30, s. 1-14.

PECHAK, D. G. a A. K. SMITH. Instrumental Techniques for Sample Preparation. In *Structure of dairy products*. Oxford, UK: Blackwell Pub., 2007, s. 17-58. Society of Dairy Technology series. ISBN-13: 978-1-4051-2975-6.

PISKA, I. a J. ŠTĚTINA. Influence of cheese ripening and rate of cooling of the processed cheese mixture on rheological properties of processed cheese. *Journal of food engineering*, 2004, vol. 61, s. 551-555.

PLUTA, A., M. ZIARNO a A. SMOLIŃSKA. Możliwości zastosowania hydrokoloidów w produkcji serów topionych. *Przemysł Spożywczy* [online]. 2000, vol. 5, s. 42-44.

PŘIKRYL, J., T. HAJEK, B. ŠVECOVÁ, R. N. SALEK, M. ČERNÍKOVÁ, L. ČERVENKA a F. BUŇKA. Antioxidant properties and textural characteristics of processed cheese spreads enriched with rutin or quercetin: The effect of processing conditions. *Food and Science Technology*. 2018, vol. 87, s. 266-271.

REIMER, L. *Scanning electron microscopy: physics of image formation and microanalysis*. 2nd rev. ed. Berlin: Springer, 1998, 527 s. ISBN 978-3-642-08372-3.

ŘIHÁČKOVÁ, L. *Příprava tavených sýrů pro skenovací elektronovou mikroskopii*. Zlín, 2015. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí diplomové práce M. Černíková.

SANZ-PENELLA, J. M., M. WRONKOWSKA, M. SORAL-SMIETANA a M. HAROS. Effect of whole amaranth flour on bread properties and nutritive value. *LWT - Food Science and Technology*. 2013, vol. 50, s. 679-685.

SAVELLO, P. A., C. A. ERNSTROM a M. KALAB. Microstructure and meltability of model process cheese made with rennet and acid casein. *Journal of Dairy Science*. 1989, vol. 72, s. 1-11.

SCHÄFFER, B., D. LŐRINCZY a J. BELÁGYI. DSC and electronmicroscopic investigation of dispersion-type processed cheese made without peptization. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 1999, vol. 56, s. 1211-1216.

SCHÄFFER, B., S. SZAKÁLY, D. LŐRINCZY a B. SCHÄFFER. Processed cheeses made with and without peptization. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2001, vol. 64, s. 671-679.

SMITH, G. F. a E. RIVERA. *Processed cheese without emulsifying salts*. United States. Patent US 9232808. Publikováno 12. 1. 2016.

SMITH, G. F. a E. RIVERA. *Processed cheese without emulsifying salts*. United States. Patent US 9532584 B2. Publikováno 3. 1. 2017.

SPAGNUOLO, P. A., D. G. DALGLEISH, H. D. GOFF a E. R. MORRIS. Kappacarrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers. *Food Hydrocolloids*. 2005, vol. 19, s. 371-377.

SPOJENÉ STÁTY AMERICKÉ. *Food and Drug Administration. Code of Federal Regulations: Title 21, Part 133 Cheeses and Related Cheese Products* [online]. Washington: Department of Health and Human Services. 2019. [cit. 2019-10-08]. Dostupné z: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=133.169>

STEVENS, P. Gelatine. In *Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents*. Eds. Imeson, A. Wiley-Blackwell Pub., 2010. s. 116-144. ISBN 978-140-5132-671.

STOKES, D. *Principles and practice of variable pressure/environmental scanning electron microscopy (VP-ESEM)*. Chichester: Wiley, 2008, 221 s. ISBN 978-0-470-06540-2.

TALBOT-WALSH, G., D. KANNAR a C. SELOMULYA. A review on technological parameters and recent advances in the fortification of processed cheese. *Trends in Food Science & Technology*. 2018, vol. 81, s. 193-202.

UL-HAMID, A., *A Beginners' Guide to Scanning Electron Microscopy*. Cham: Springer International Publishing, 2018, 402 s. ISBN 978-3-319-98481-0.

VENUGOPAL, V. *Marine Polysaccharides: food applications*. Boca Raton: CRC Press, 2011, 377 s. ISBN 978-1-4398-1526-7.

WEBB, J. a J. H. HOLGATE. *Scanning Electron Microscopy*. Elsevier Science, 2003, s. 3922-3928.

ZHOU, W., R. P. APKARIAN, Z. L. WANG a D. JOY. Fundamentals of scanning electron microscopy. In *Scanning microscopy for nanotechnology: techniques and applications*. New York: Springer, 2006, s. 1-40. ISBN 978-0-387-33325-0.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

např.	například
tj.	to je
atd.	a tak dále
resp.	respektive
SEM	skenovací elektronový mikroskop, skenovací elektronová mikroskopie
TEM	transmisní elektronový mikroskop transmisní elektronová mikroskopie
STEM	skenovací transmisní elektronový mikroskop
cca	cirka, přibližně
apod.	a podobně
vs.	versus
2D	dvourozměrný
3D	trojrozměrný
LaB ₆	hexaborid lanthanu
SE	secondary electrons, sekundární elektrony
BSE	backscattered electrons, zpětně odražené elektrony
E–T	detektor Everhart–Thornley
eV	elektronvolt, jednotka práce a energie
RTG	rentgenové záření
NaCl	chlorid sodný, kuchyňská sůl
HCl	kyselina chlorovodíková
OsO ₄	oxid osmičelý
GA	glutaraldehyd
FA	formaldehyd
CPD	critical point drying, sušení ke kritickému bodu

CO₂ oxid uhličitý

TVS tuk v sušině

tzv. tak zvaný

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1</i>	<i>Výměna vápenatých iontů za sodné ionty v přítomnosti tavicích solí při výrobě tavených sýrů (A – anion tavicí soli) (upraveno podle Buňka a kol., 2009, s. 13)</i>	<i>15</i>
<i>Obr. 2</i>	<i>Diagram výrobního procesu tavených sýrů (upraveno podle Guinee, 2017, s. 1137).....</i>	<i>17</i>
<i>Obr. 3</i>	<i>Porovnání konstrukce jednotlivých typů mikroskopů (Nebesářová a kol., 2001).....</i>	<i>25</i>
<i>Obr. 4</i>	<i>Ukázka LaB6 krystalu (vlevo) a wolframového vlákna (vpravo).....</i>	<i>26</i>
<i>Obr. 5</i>	<i>Schéma zdroje elektronů (upraveno podle Zhou a kol., 2006, s. 11)</i>	<i>27</i>
<i>Obr. 6</i>	<i>Signály vznikající v různých hloubkách vzorku (upraveno dle Hilal, 2016)</i>	<i>28</i>
<i>Obr. 7</i>	<i>Schéma znázorňující cestu primárních elektronů a emise odražených a sekundárních elektronů (upraveno podle Stokes, 2008, s. 32)</i>	<i>30</i>
<i>Obr. 8</i>	<i>Strukturní vzorec glutaraldehydu (Bozzolla a Russell, 1999, s. 20)</i>	<i>33</i>
<i>Obr. 9</i>	<i>Strukturní vzorec formaldehydu (Dykstra a Reuss, 2003, s. 12).....</i>	<i>34</i>
<i>Obr. 10</i>	<i>Interakce OsO₄ s dvojnou vazbou v mastné kyselině lipidu za vzniku monoesteru (Dykstra a Reuss, 2003, s. 10)</i>	<i>35</i>
<i>Obr. 11</i>	<i>Závislost komplexního modulu pružnosti na době skladování pro vzorky bez tavicích solí s 1 % (w/w) agaru a vzorky kontroly s tavicími solemi</i>	<i>47</i>
<i>Obr. 12</i>	<i>Závislost komplexního modulu pružnosti na době skladování pro vzorky bez tavicích solí s 1 % (w/w) κ-karagenanu a vzorky kontroly s tavicími solemi</i>	<i>49</i>
<i>Obr. 13</i>	<i>Závislost komplexního modulu pružnosti na době skladování pro vzorky bez tavicích solí s 1 % (w/w) želatiny a vzorky kontroly s tavicími solemi</i>	<i>50</i>
<i>Obr. 14</i>	<i>Závislost komplexního modulu pružnosti na frekvenci pro jednotlivé vzorky s přidávkem 1 % (w/w) hydrokoloidů a 2,5 % (w/w) tavicích solí po 14 dnech skladování</i>	<i>52</i>
<i>Obr. 15</i>	<i>Mikrostruktura modelových tavených sýrů, zvětšení 5000 krát; část A vzorek s 1 % (w/w) agaru; část B vzorek s 1 % (w/w) κ-karagenanu; část C vzorek s 1 % (w/w) želatiny; část D kontrolní vzorek s 2,5 % (w/w) tavicích solí; FG* – prázdný prostor po tukové kuličce (bílé šipky), P – proteinová struktura, PPS – proteinpolysacharidová struktura</i>	<i>57</i>

- Obr. 16 Mikrostruktura taveného sýra bez tavicích solí s 1 % (w/w) agaru, zvětšení 1000 krát; FG – tuková kulička, FG* – prázdný prostor po tukové kuličce (bílé šipky), P – proteinová struktura, PS – polysacharidová struktura 60
- Obr. 17 Mikrostruktura taveného sýra bez tavicích solí s 1 % (w/w) agaru, zvětšení 10 000 krát; FG* – prázdný prostor po tukové kuličce, P – proteinová struktura..... 61
- Obr. 18 Mikrostruktura taveného sýra bez tavicích solí s 1 % (w/w) κ -karagenanu, zvětšení 1000 krát; FG – tuková kulička, bílé šipky – prázdný prostor po tukové kuličce, PPS – proteinopolysacharidová struktura..... 62
- Obr. 19 Mikrostruktura taveného sýra bez tavicích solí s 1 % (w/w) κ -karagenanu, zvětšení 10 000 krát; FG* – prázdný prostor po tukové kuličce, P – proteinová struktura..... 63
- Obr. 20 Mikrostruktura taveného sýra bez tavicích solí s 1 % (w/w) želatiny, zvětšení 1000 krát; FG – tuková kulička, FG* – prázdný prostor po tukové kuličce (bílé šipky), P – proteinová struktura..... 64
- Obr. 21 Mikrostruktura taveného sýra bez tavicích solí s 1 % (w/w) želatiny, zvětšení 10 000 krát; FG* – prázdný prostor po tukové kuličce, P – proteinová struktura..... 65
- Obr. 22 Mikrostruktura taveného sýra se 2,5 % (w/w) tavicích solí, zvětšení 1000 krát; bílé šipky – prázdný prostor po tukové kuličce, P – proteinová struktura..... 66
- Obr. 23 Mikrostruktura taveného sýra se 2,5 % (w/w) tavicích solí, zvětšení 10 000 krát; FG* – prázdný prostor po tukové kuličce, P – proteinová struktura 67

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Označení vzorků tavených sýrů.....	41
Tabulka 2 Hodnoty obsahu sušiny vzorků tavených sýrů v průběhu skladování.....	45
Tabulka 3 Hodnoty pH modelových vzorků tavených sýrů v průběhu skladování.....	46
Tabulka 4 Velikosti tukových kuliček [μm] u jednotlivých hydrokoloidů.....	53
Tabulka 5 Hodnoty relativních četností velikostí tukových kuliček pro jednotlivé vzorky.....	55

SEZNAM PŘÍLOH

P1: Stupnice pro sensorické hodnocení tavených sýrů	1
---	---

PŘÍLOHA P 1

STUPNICE PRO SENZORICKÉ HODNOCENÍ TAVENÝCH SÝRŮ

Homogennost

1. Vzorek naprosto homogenní
2. Vzorek téměř homogenní
3. Nepatrně znatelná nehomogenita
4. Mírná nehomogenita, akceptovatelná
5. Výraznější nehomogenita s oddělením fází
6. Výrazná nehomogenita, neakceptovatelná
7. Vzorek naprosto nehomogenní