

# Účinky acylglycerolů na růst bakterií rodu *Clostridium* v tavených sýrech

Bc. Kristýna Janečková

---

Diplomová práce  
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky  
akademický rok: 2010/2011

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kristýna JANEČKOVÁ**  
Osobní číslo: **T09711**  
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie a ekonomika výroby tuků, detergentů a kosmetiky**

Téma práce: **Účinky acylglycerolů na růst bakterií rodu Clostridium v tavených sýrech**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Zpracujte literární rešerši týkající se charakteristiky a složení tavených sýrů.
2. Zabývejte se vlivy působícími na jakost tavených sýrů a jejich mikrobiální kontaminaci.

### II. Praktická část

1. Sledujte dynamiku růstu bakterií rodu Clostridium v modelových vzorcích tavených sýrů v závislosti na typu a množství přidaných látek
2. Provedte senzorkou analýzu tavených sýrů s přídavkem acylglycerolů.
3. Na základě teoretické části a výsledků praktické části zhodnoťte využitelnost aplikovaných látek pro zlepšení údržnosti tavených sýrů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] ICMSF– International Commission on Microbiological Specification for Foods, 2005: **Microorganisms in foods 6**. 2nd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- [2] Buňka, F., Buňková, L. & Kráčmar, S., 2009: **Základní principy výroby tavených sýrů**. Monografie, 69 s., Brno: MZLU.
- [3] Glass, K. A., Kaufman, K. M. & Johnson, E. A., 1998: Survival of bacterial pathogens in pasteurized process cheese slices stored at 30 °C. *Journal of Food Protection*, 61, 290–294.
- [4] Linton, R. H. & Harper, N., 2008: Survival and growth of foodborne microorganisms in processed and individually wrapped cheese slices. *Journal of Environmental Health*, 70, 31–37.
- [5] Lycken, L. & Borch, E., 2006: Characterization of *Clostridium* spp. isolated from spoiled processed cheese products. *Journal of Food Protection*, 69, 1887–1891.

Vedoucí diplomové práce:

**doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

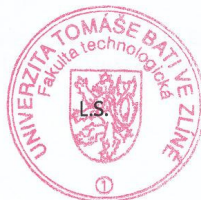
**25. února 2011**

Termín odevzdání diplomové práce:

**20. května 2011**

Ve Zlíně dne 25. února 2011

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.  
*děkan*



doc. Ing. Rahula Janiš, CSc.  
*ředitel ústavu*

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou 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 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou 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);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské 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.

Ve Zlíně .....

.....

---

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> 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, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> 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, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k vyšší výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## ABSTRAKT

Cílem diplomové práce bylo určit růst nebo inaktivaci bakterií rodu *Clostridium* působením acylglycerolů aplikovaných do tavených sýrů. Testované monoacylglyceroly (monoacylglycerol kyseliny undekanové, undecenové a 1-adamantankarboxylové) byly aplikovány do tavených sýrů v koncentračním rozmezí 0,01 – 0,15 % (w/w). Dále byla pozorována dynamika růstu *Clostridium butyricum* a *Clostridium sporogenes* ve vzorcích tavených sýrů s různým obsahem tuku v sušině a v přítomnosti  $\iota$ -karagenanu. Vzorky tavených sýrů byly skladovány při teplotě  $6 \pm 2$  °C po dobu 140 dnů. Přítomností MAG o nejnižší testované koncentraci nebyl ovlivněn růst bakterií rodu *Clostridium* v tavených sýrech. Monoacylglycerol kyseliny undecenové o koncentraci 0,15 % inhiboval růst *Clostridium butyricum* ve vzorcích tavených sýrů o více jak dva řády.

Klíčová slova: monoacylglycerol kyseliny undekanové, undecenové, 1- adamantankarboxylové, karagenan, tavený sýr

## ABSTRACT

The aim of this study was to determine the growth or inactivation of *Clostridium* acylglycerol effect applied to the processed cheese. The inhibitory effect of three MAGs (monoundecanoylglyceride, monoundecenoylglyceride and monoacylglycerol of adamantane-1-carboxylic acid) at a concentration of 0.01 – 0.15 % (w/w) was observed. Further, the observed dynamic growth of *Clostridium butyricum* and *Clostridium sporogenes* in samples of processed cheese with different fat content and in the presence of  $\iota$ -carrageenan. Model processed cheese were stored at temperature  $6 \pm 2$  °C for 140 days. Monoglycerides in lowest tested concentration was not sufficient to inhibit growth of the *Clostridium* in processed cheese. The addition of 0.15 % (w/w) monoundecenoylglyceride to caused inhibition of *Clostridium butyricum* about over most two order.

Keywords: monoundecanoylglyceride, monoundecenoylglyceride, 1-monoacylglycerol of adamantane-1-carboxylic acid, carrageenan, processed cheese

Ráda bych poděkovala vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady a poskytnutý čas pro konzultace teoretické i praktické části diplomové práce.

Mé poděkování patří i doc. Ing. Františkovi Buňkovi, Ph.D. za odbornou pomoc při realizaci experimentální části a při statistickém vyhodnocení naměřených dat.

Dále děkuji laborantkám mikrobiologické laboratoře Ústavu technologie a mikrobiologie potravin za vzájemnou spolupráci při provádění některých experimentů. Děkuji laboratoři MVDr. Šotoly za umožnění měření vodní aktivity.

Velké poděkování za podporu po celou dobu studia patří mé rodině a příteli.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 TAVENÉ SÝRY</b> .....	<b>12</b>
1.1 CHARAKTERISTIKA TAVENÝCH SÝRŮ.....	12
1.2 TECHNOLOGICKÝ POSTUP VÝROBY TAVENÝCH SÝRŮ .....	14
1.2.1 Suroviny pro výrobu tavených sýrů.....	14
1.2.2 Princip výroby tavených sýrů .....	14
1.2.3 Technologie výroby tavených sýrů.....	15
1.3 VLIVY PŮSOBÍCÍ NA JAKOST TAVENÝCH SÝRŮ .....	17
1.3.1 Aktivní kyselost.....	17
1.3.2 Vodní aktivita.....	18
1.3.3 Obsah tuku .....	19
<b>2 PŘÍDATNÉ LÁTKY POUŽÍVANÉ V POTRAVINÁŘSTVÍ</b> .....	<b>21</b>
2.1 KARAGENANY .....	21
2.1.1 Vlastnosti karagenanů .....	22
2.1.2 Aplikace karagenanů .....	23
2.2 MONOACYLGLYCEROLY .....	24
2.2.1 Výroba monoacylglycerolů .....	25
2.2.2 Vlastnosti monoacylglycerolů .....	25
2.2.3 Aplikace monoacylglycerolů .....	26
2.2.4 Antimikrobiální aktivita mastných kyselin a monoacylglycerolů .....	28
<b>3 ROD CLOSTRIDIUM</b> .....	<b>33</b>
3.1 <i>CLOSTRIDIUM BUTYRICUM</i> .....	34
3.2 <i>CLOSTRIDIUM SPOROGENES</i> .....	35
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>36</b>
<b>4 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>37</b>
<b>5 METODIKA PRÁCE</b> .....	<b>38</b>
5.1 VÝROBA TAVENÝCH SÝRŮ.....	38
5.2 MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA .....	39
5.2.1 Použité pomůcky a zařízení.....	39
5.2.2 Testované kultury mikroorganismů .....	40
5.2.3 Příprava živné půdy.....	40
5.2.4 Příprava fyziologického roztoku .....	40
5.2.5 Příprava suspenze bakterií.....	40
5.2.6 Dekontaminace použitého materiálu .....	41
5.2.7 Stanovení celkového počtu mikroorganismů plotnovou metodou.....	41
5.3 CHEMICKÁ ANALÝZA.....	43
5.3.1 Stanovení aktivní kyselosti (pH) .....	43
5.3.2 Stanovení vodní aktivity ( $a_w$ ) .....	43



5.4	SENZORICKÁ ANALÝZA .....	43
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>45</b>
6.1	VLIV TUKU NA RŮST BAKTERIÍ RODU <i>CLOSTRIDIUM</i> .....	45
6.1.1	Účinek obsahu tuku v sušině na růst <i>Clostridium butyricum</i> CAPM 6342 .....	45
6.1.2	Účinek obsahu tuku v sušině na růst <i>Clostridium sporogenes</i> CAPM 6329 .....	46
6.2	VLIV MONOACYLGLYCEROLŮ NA RŮST BAKTERIÍ RODU <i>CLOSTRIDIUM</i> .....	48
6.2.1	Účinek monoacylglycerolu kyseliny undekanové na růst <i>Clostridium butyricum</i> CAPM 6342 .....	48
6.2.2	Účinek monoacylglycerolu kyseliny undekanové na růst <i>Clostridium sporogenes</i> CAPM 6329 .....	49
6.2.3	Účinek monoacylglycerolu kyseliny undecenové na růst <i>Clostridium butyricum</i> CAPM 6342 .....	50
6.2.4	Účinek monoacylglycerolu kyseliny undecenové na růst <i>Clostridium sporogenes</i> CAPM 6329 .....	51
6.2.5	Účinek monoacylglycerolu kyseliny 1-adamantankarboxylové na růst <i>Clostridium butyricum</i> CAPM 6342 .....	52
6.2.6	Účinek monoacylglycerolu kyseliny 1-adamantankarboxylové na růst <i>Clostridium sporogenes</i> CAPM 6329 .....	53
6.3	VLIV KARAGENANŮ NA RŮST BAKTERIÍ RODU <i>CLOSTRIDIUM</i> .....	54
6.3.1	Účinek ι-karagenanu na růst <i>Clostridium butyricum</i> CAPM 6342 .....	54
6.3.2	Účinek ι-karagenanu na růst <i>Clostridium sporogenes</i> CAPM 6329 .....	55
6.4	HODNOTY pH TAVENÝCH SÝRŮ O RŮZNÉM OBSAHU TUKU V SUŠINĚ.....	56
6.5	HODNOTY pH TAVENÝCH SÝRŮ V PŘÍTOMNOSTI MONOACYLGLYCEROLŮ.....	57
6.6	HODNOTY pH TAVENÝCH SÝRŮ V PŘÍTOMNOSTI KARAGENANŮ.....	58
6.7	VODNÍ AKTIVITA MODELOVÝCH TAVENÝCH SÝRŮ .....	58
6.8	VÝSLEDKY SENZORICKÉ ANALÝZY MODELOVÝCH TAVENÝCH SÝRŮ .....	59
<b>7</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>63</b>
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>67</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>68</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>77</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>78</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>79</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>80</b>

## ÚVOD

Jedním ze základních cílů potravinového práva je vysoký stupeň ochrany veřejného zdraví. Hlavní zdroj onemocnění z potravin u lidí představují mikrobiologická nebezpečí. Mikrobiologická bezpečnost surovin i potravin se stala hlavním zájmem nejen potravinářského průmyslu, ale i samotných konzumentů. Prvotním krokem, který slouží k zajištění bezpečnosti potravin, je preventivní přístup spočívající v provádění správné výrobní a hygienické praxe. Další postupy inhibující mikroorganismy v potravinách jsou založeny na fyzikálních, chemických nebo biologických metodách. Nejpoužívanější metodou v potravinářském průmyslu je tepelná sterilace, případně pasterace. Potlačení rozvoje kontaminující mikroflóry ovlivňuje i způsob skladování.

Při výrobě tavených sýrů se k zajištění zdravotní nezávadnosti často používá tepelné ošetření na úrovni pasterace. Aplikací tepla dochází k usmrcení vegetativních forem bakterií, méně termorezistentních spor kvasinek a mikromycet. Potenciálními kontaminanty tavených sýrů jsou bakterie tvořící spory, ale mohou jimi být i ostatní zástupci bakterií s buněčnou stěnou gramnegativního i grampozitivního typu, které se dostávají do výrobků sekundární kontaminací. Jako nejčastější kontaminanty tavených sýrů jsou popisováni zástupci rodu *Clostridium*. Na kažení tavených sýrů se podílí nepatogenní *Clostridium sporogenes* a podmíněně patogenní *Clostridium butyricum*, který způsobuje nepříjemné zhoršení organoleptických vlastností.

Pravděpodobnost vzniku kažení tavených sýrů a s tím související nižší doba trvanlivosti může být redukována aplikací efektivní antimikrobiální látky přímo do matrice potraviny. Vhodnými látkami, u kterých byly v laboratorních podmínkách popsány inhibiční účinky proti široké škále bakterií s buněčnou stěnou grampozitivního typu, jsou právě monoacylglyceroly. Další výhodou acylglycerolů je jejich emulgační účinek, který je založen na schopnosti snižovat mezipovrchové napětí na rozhraní dvou nemísitelných fází.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 TAVENÉ SÝRY

## 1.1 Charakteristika tavených sýrů

V odborné literatuře se můžeme setkat s různými definicemi tavených sýrů. Carić a Kaláb [1] definovali tavené sýry jako sýry, které jsou vyráběny zahříváním směsi různých druhů přírodních sýrů, které mohou být v různém stupni zralosti, s tavicími solemi za částečného podtlaku a stálého míchání. Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 77/2003 Sb. (v platném znění) uvádí tavené sýry jako sýry, které byly tepelně upraveny za přídavku tavicích solí [2].

Tavené sýry tvoří různorodý sortiment, proto komplexní rozdělení a třídění je velmi obtížné. K dělení tavených sýrů se používá několik kritérií. Často jeden tavený sýr spadá do několika tříd. Tradiční dělení tavených sýrů na základě tuku v sušině (TVS) uvádí již zmíněná vyhláška Ministerstva zemědělství č. 77/2003 Sb. Jedná se o dělení do dvou kategorií, konkrétně na vysokotučné tavené sýry s obsahem nejméně 60 % (w/w) TVS a nízkotučné tavené sýry s obsahem nejvýše 30 % (w/w) TVS [2]. Z jiného pohledu lze tavené sýry rozdělit na přírodní, druhové a směsné. Pokud není použito ochucujících přísad, jedná se o tavené sýry přírodní. Převažuje-li v použité surovině jeden deklarovaný druh sýra, jde o tavené sýry druhové. Naopak při použití jako základní suroviny směsi různých sýrů se označí tavený sýr směsný [3]. Dále mohou být tavené sýry ochucovány různými přísadami, zejména kořením, zeleninou, bylinami nebo uzeným masem. Tavené sýry je možno vyrobit o různé konzistenci. Konzistence musí být stejnorodá, kompaktní a hladká, nesmí být krupičkovitá nebo písčitá [4].

Guinee et al. [5] uvedli členění tavených sýrů podle použitých surovin do pěti skupin. Možný český překlad jednotlivých skupin navrhli Buňka et. al [6]. Jedná se tedy o tepelně opracované sýry, tavené sýry, výrobky z tavených sýrů, tavené sýrové pomazánky a tepelně opracované sýrové pomazánky. Kromě základního rozdílu, kterým jsou použité suroviny, se jednotlivé skupiny liší obsahem sušiny, tuku, tuku v sušině a aktivní kyselostí. Zajímavé je, že do výše uvedeného členění tavených sýrů spadají skupiny tepelně opracované tavené sýry a tepelně opracované sýrové pomazánky, při jejichž výrobě se nepoužívají tavicí soli.

Tavené sýry vznikají další technologickou úpravou přírodních sýrů [7]. Dle vyhlášky musí nejméně 51 % (w/w) hmotnosti sušiny taveného sýra pocházet z přírodního sýra [2]. Vel-

kou výhodou je možnost sekundárního zpracování přírodních sýrů s různými mechanickými vadami (může k nim dojít při vlastní výrobě nebo manipulaci) a v různém stádiu prozráání. Zcela vyloučené je však použití sýrů s vadami mikrobiálními, obzvlášt' jedná-li se o kontaminaci sporulujícími bakteriemi nebo plísněmi [7]. Rovněž se k výrobě nedoporučuje použití přírodních sýrů se změněnou chutí a vůní [8].

Vzhledem k tomu, že tavené sýry patří mezi neúdržné potraviny, jejich trvanlivost je omezena řádově na 4 až 12 měsíců při skladování za podmínek pokojové teploty. Během skladování dochází k chemickým a fyzikálním procesům, které pomalu mění strukturu, barvu a chuť tavených sýrů. Změny produktu jsou často ovlivněny čtyřmi hlavními faktory, kterými jsou složení a zpracování výrobku, použitý obalový materiál a podmínky skladování (teplota a doba). Trvanlivost souvisí především s obsahem vody a laktózy, s množstvím a druhem tavicích solí. Dostupná literatura uvádí, že výrobky skladované v plastových kelímcích a vaničkách mají o něco kratší trvanlivost než výrobky uložené v kovových plechovkách či tubách. V závislosti na použitém obalovém materiálu může docházet i k odparu vody [9]. Předepsaná teplota pro skladování je 4 až 8 °C. Delší trvanlivosti lze dosáhnout při výrobě sterilovaných tavených sýrů, jejichž údržnost při pokojové teplotě je nejméně 24 měsíců. Technologický postup výroby deklaruje minimální dobu trvanlivosti 28 až 30 měsíců, ovšem skutečná trvanlivost je ještě delší. Běžně jsou však vyráběny pasterované (nesterilované) tavené sýry [10].

Další, v poslední době hojně diskutovanou skupinou, jsou analogy nebo-li imitace tavených sýrů. V obchodní síti se analogy tavených sýrů často uvádí pod názvem tavený výrobek [10]. Jejich podstatou je náhrada mléčné bílkoviny a mléčného tuku rostlinnými zdroji, čímž také dochází ke snížení nákladů na výrobu. Výhodou je vyšší podíl nenasycených mastných kyselin a nižší podíl nasycených mastných kyselin a cholesterolu [11]. Dle způsobu výroby lze analogy tavených sýrů dělit na mléčné, částečně mléčné a nemléčné. U mléčných analogů je při výrobě přírodní sýr nahrazen kaseiny nebo kaseináty. Částečně mléčné analogy obsahují tuk rostlinného původu (palmový, sójový olej) a bílkovinu mléčného původu. Poslední skupinou jsou nemléčné analogy, kde jsou mléčná bílkovina i tuk nahrazeny rostlinnými zdroji [5].

## 1.2 Technologický postup výroby tavených sýrů

### 1.2.1 Suroviny pro výrobu tavených sýrů

Hlavní podíl suroviny na výrobě tavených sýrů tvoří přírodní sýry, nejčastěji se v České republice používají tvrdé sýry s nízkodohřívanou sýřeninou (Eidamská cihla a Eidamský blok), méně jsou pak používané sýry s vysokodohřívanou sýřeninou (Primátor, Moravský blok). Právě přírodní sýry jsou základními nositeli plnosti chuti, výrazného a vyrovnaného aroma finálního výrobku. Pro zvýšení obsahu tukuprosté sušiny se používá tvaroh. Další rozšířenou surovinou je máslo nebo smetana, které se přidávají při výrobě tavených sýrů z důvodu úpravy množství tuku. Součástí surovinové skladby může být i krém, tj. již utavený sýr. Z důvodu úpravy sušiny se přidává pitná voda. Nepostradatelnou součástí jsou emulgující činidla (tavicí soli), obvykle se používají sodné soli fosforečnanů, polyfosforečnanů případně citronanů. Při výrobě ochucených tavených sýrů se přidávají různé ochucující látky. V poslední době se část základní suroviny nahrazuje sušenou syrovátkou, sušeným odstředěným mlékem nebo sušeným podmáslem [10]. V neposlední řadě mohou být použity různé stabilizátory (např. hydrokoloidy) a konzervační látky [1].

### 1.2.2 Princip výroby tavených sýrů

Princip výroby tavených sýrů má fyzikálně-chemický charakter. Pro vznik taveného sýra je nutná přítomnost tavicích solí, které zamezí destrukci membrán pokrývajících tukové kuličky a jejich následnému shlukování, což by vlivem zvýšené teploty vedlo k agregaci a kontrakci kaseinových frakcí. Následkem těchto procesů by došlo k oddělení hydrofilní a hydrofobní fáze [6]. Tavicí soli jsou tvořeny vícesytnými anionty a monovalentními kationty. Působením tavicích solí dochází k přeměně nerozpustného parakaseinátu vápenatého na rozpustný parakaseinát sodný. Vlivem této reakce kaseiny fungují jako emulgující látky (látky s amfifilní strukturou) a tím dochází k tvorbě emulze olej ve vodě. Dále se tavicí soli podílí na krémování roztavené hmoty, které nastává v důsledku zvyšování vaznosti vody v přítomnosti bílkovin. Vlivem teploty a mechanického míchání se fosforečnany začínají navazovat na kaseinové frakce, čímž se zvyšuje jejich hydrofilní charakter. Hydratované bílkoviny pak obalují povrch tukových kuliček, čímž dochází k emulgaci tuku [1], [6].

Fosforečnanům, které se hojně využívají jako tavicí soli, je přisuzován antimikrobiální účinek. V dostupné literatuře je popisován inhibiční účinek na růst bakterií s buněčnou

stěnou gram pozitivního typu, některých druhů kvasinek a mikromycet [12]. Inhibiční účinek u gram pozitivních bakterií ovlivňuje především délka řetězce (kondenzační stupeň). Fosforečnany s delším řetězcem mají vyšší inhibiční účinek než fosforečnany s krátkým řetězcem [13].

### 1.2.3 Technologie výroby tavených sýrů

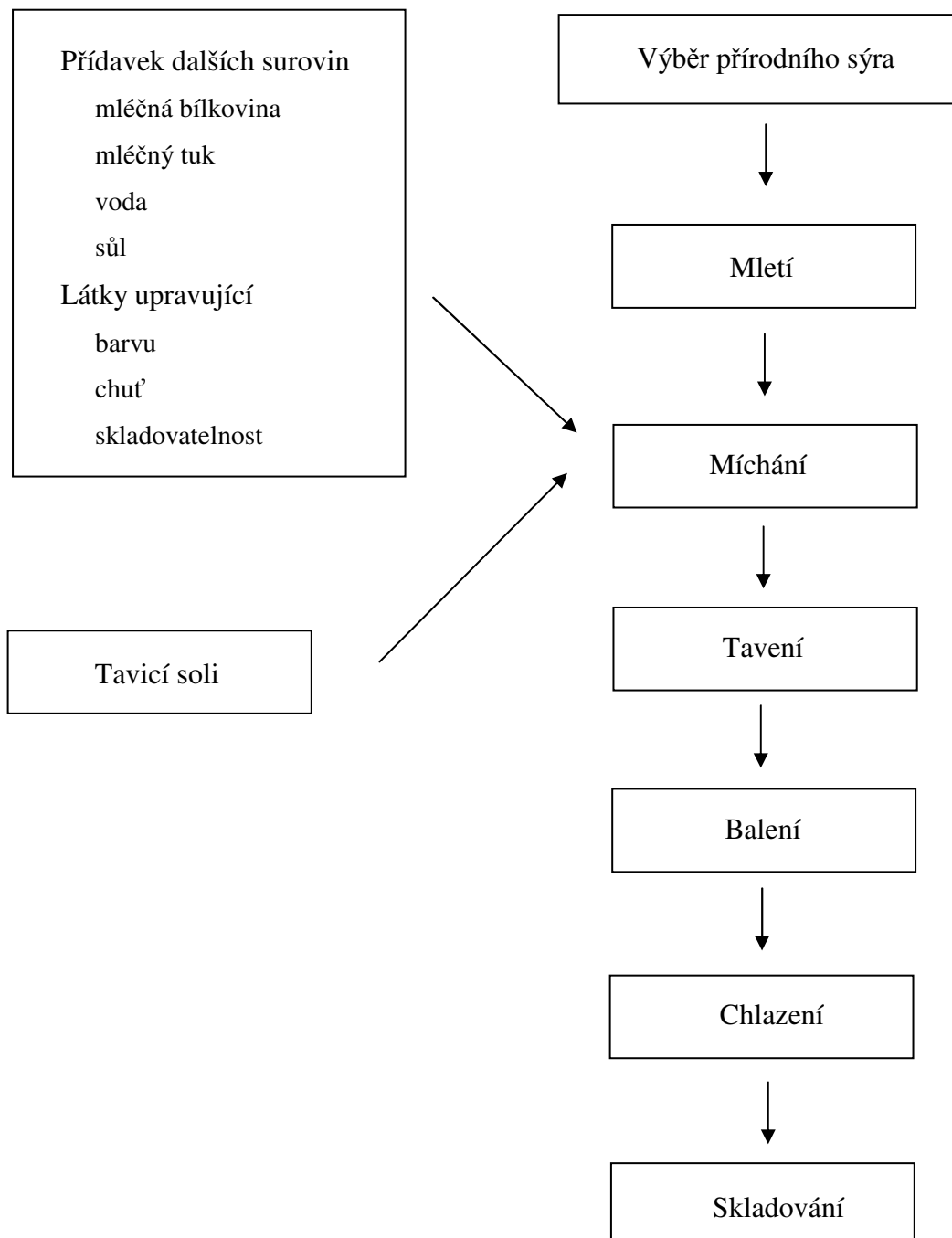
Schéma výrobního postupu tavených sýrů znázorňuje Obr. 1. Jako většinu jiných potravin, lze tavené sýry vyrobit dvěma základními postupy. Jedná se o kontinuální nebo diskontinuální výrobu, přičemž tuzemští výrobci tavených sýrů se spíše přiklánějí k diskontinuálnímu procesu [6]. Samotnou produkci tavených sýrů lze shrnout do následujících kroků:

1. Výběr a úprava surovin,
2. Vlastní tavicí proces a skladování [20].

První fáze výroby tavených sýrů zahrnuje výběr a úpravu základních surovin a přísad. Kromě přírodních sýrů a tavicích solí se používají další mlékárenské (máslo, smetana) i nemlékárenské suroviny (koření, látky upravující barvu). Přírodní sýry se vytřídí podle výrobních partií, kvality a stupně zralosti. Pečlivě se očistí, případná poškozená místa se odstraní. Sýry se důkladně krájí, drtí, melou, pro snadnější úpravu se používají speciální mlýnky. Zvětšení specifického povrchu přírodního sýra je velmi důležité pro snadnější prostup tepla během tavicího procesu [5]. Poté následuje přesné odvážení jednotlivých komponent dle používané receptury. V následující fázi výroby dochází i k přidání tavicích solí v množství 2 až 3 % hmotnosti surovinové skladby. Množství se odvíjí od použitého přírodního sýra a požadovaných fyzikálně-chemických vlastností konečného výrobku. Komerčně dodávané tavicí soli jsou směsí několika chemických látek, jejichž složení je předmětem obchodního tajemství. Takto připravené suroviny se dopravují do tavicího zařízení [6], [20].

Do druhé fáze výroby tavených sýrů jsou zahrnuty následující technologické operace: tavení, balení, chlazení a skladování. Při vlastním průběhu tavení se rozemletá směs postupně zahřívá parou v plášti zařízení nebo i přímým vstříkem páry do tavicího kotle, přičemž tavenina se soustavně míchá. Ohřev probíhá za sníženého tlaku po dobu řádově několika minut, kdy dochází k zahřátí taveniny na tavicí teplotu. Výše tavicí teploty se v odborné literatuře liší. Obecně se používají teploty 90 až 100 °C, jedná-li se o diskontinuální způsob

výroby. Uvedený postup zajistí pasterační efekt, kdy dochází k usmrcení vegetativních forem bakterií, kvasinek a plísní. Pro usmrcení mikroorganismů tvořících spory je nutno působit vyššími teplotami a tlakem [5], [20].



Obr. 1 Schéma výroby tavených sýrů. Upraveno podle Kapoor a Metzger [20].



Sterilační zařízení, která pracují kontinuálně, používají teploty v rozmezí 135 až 140 °C po dobu 2 až 3 s. Vlastní tavení se provádí v nerezových trubkách v tenké vrstvě. Výsledkem je homogenní, jemná a lesklá tavenina požadované viskozity, která nesmí uvolňovat kapénky tuku [6].

Horká tavenina je vedena do plnicího zařízení, kde probíhá balení. Teplota před balením by neměla poklesnout pod 65 až 70 °C, aby se zamezilo sekundární mikrobiální kontaminaci a porušení konzistence finálního výrobku. Pro balení se může použít nepřeberné množství různých obalů lišících se tvarem a použitým materiálem. Nejpoužívanějším obalem je impregnovaná hliníková folie. Bývá používán tvar různých hranolů nebo trojúhelníků (kruhových výsečí). Zabalené sýry se ukládají do kartónových krabiček. Pro měkké a snadno roz-tíratelné sýry mohou být použity různé druhy plastových kelímků a vaniček. Méně časté je použití plechových obalů, kovových a plastových tub nebo plastových střev. Jako obalový materiál může sloužit i plastová fólie, která se používá při balení ve formě plátků. Následně jsou sýry zchlazeny a skladovány za předepsaných podmínek [4].

### 1.3 Vlivy působící na jakost tavených sýrů

Ke změnám jakosti potravin dochází nejčastěji působením mikroorganismů. Povaha a rozsah změn závisí především na vnitřních faktorech potravin, které jsou dány fyzikálně-chemickými vlastnostmi (složením potravin, vodní aktivitou, aktivní kyselostí, texturou). Druh mikrobiálních změn, a tím i trvanlivost potravin, určují kromě vnitřních faktorů i faktory vnější, kterými jsou podmínky uchování a skladování (teplota prostředí, relativní vlhkost vzduchu, okolní atmosféra a čas) [26].

#### 1.3.1 Aktivní kyselost

Optimální aktivní kyselost (pH) tavených sýrů se pohybuje kolem hodnot 5,7 až 6,0, některé dostupné zdroje uvádí spodní hranici pH o něco nižší [6]. Významně nižší nebo naopak vyšší pH je nežádoucí z důvodu vzniku jakostních odchylek v chuti a konzistenci. Aktivní kyselost prokazatelně ovlivňuje texturu tavených sýrů. Nízké hodnoty pH způsobují suchost a drobnost tavených sýrů, což je důsledkem vysoké interakce mezi proteiny, která vede k jejich agregaci. Naopak vysoké hodnoty pH mají za následek měkkou a pružnou konzistenci tavených sýrů. S vysokými hodnotami pH roste nebezpečí mikrobiální konta-

minace [14]. Finální hodnoty pH tavených sýrů závisí na výběru a vhodných kombinacích tavicích solí [15]. Dále souvisí s druhem přírodního sýra a stupněm jeho zralosti [20].

Koncentrace vodíkových iontů v prostředí významným způsobem ovlivňuje aktivitu mikroorganismů. Mikroorganismy jsou schopny růstu v širokém rozmezí pH. Optimální hodnota pH pro růst je dána hodnotou nejvhodnější pro činnost životně důležitých enzymů. Většina mikroorganismů roste nejlépe při pH kolem neutrálního bodu (pH 6,6 až 7,5). Aktivní kyselost tavených sýrů tak umožňuje růst široké škále mikroorganismů. Minimální hodnota pro růst sporotvorných bakterií *Bacillus subtilis* je při pH 4,5, optimální při pH 6,0 až 7,5 [16], [17]. Proteolytické kmeny *Clostridium botulinum* jsou schopny růst v prostředí s minimální hodnotou pH 4,6 až 4,8. Neprroteolytické kmeny *Clostridium botulinum* rostou při pH vyšším než 5 [18]. Minimální hodnota pH, při které roste *Clostridium butyricum* je 4,2 [19].

### 1.3.2 Vodní aktivita

Pro potravinářský průmysl je hodnota vodní aktivity ( $a_w$ ) velmi důležitý ukazatel, neboť se jedná o klíčový parametr pro růst mikrobiální populace a rychlost mnohých fyzikálních reakcí [23]. Jinými slovy lze vodní aktivitu vyjádřit jako množství vody využitelné mikroorganismy [25]. Hodnota vodní aktivity závisí nejen na obsahu vody v potravine, ale i na jejím složení, dále na teplotě a relativní vlhkosti vzduchu [23].

Vodní aktivita určitého roztoku se rovná poměru tlaku vodních par nad tímto roztokem k tlaku vodních par nad destilovanou vodou za stejných podmínek. Je tedy zřejmé, že vodní aktivita vody je rovna jedné, se stoupající koncentrací rozpuštěných látek vodní aktivita klesá. Mezi látky snižující vodní aktivitu patří bílkoviny, sacharóza, škrob nebo chlorid sodný [16]. Se zvyšujícím se množstvím těchto látek klesá parciální tlak vodní páry nad potravinou. Parciální tlak vodní páry nad potravinou je přímo úměrný koncentraci vody v potravine a nepřímo úměrný osmotickému tlaku v roztoku [26].

Jednotlivé skupiny mikroorganismů jsou různě citlivé na vodní aktivitu. Citlivost vůči vodní aktivitě klesá v pořadí bakterie, kvasinky, plísně. Nejvyšší hodnoty vodní aktivity vyžadují pro svůj růst bakterie s buněčnou stěnou gramnegativního typu. Optimální hodnoty pro růst většiny bakterií podílejících se na kažení potravin jsou v intervalu 0,99 až 0,93. Mnohé bakterie se však rozmnožují pouze za nízkých hodnot vodních aktivit, označují se jako xerotolerantní, osmotolerantní nebo halotolerantní (např. zástupci rodů *Micrococcus* a

*Staphylococcus*). Minimální hodnota vodní aktivity kvasinek se pohybuje kolem hodnot 0,91 až 0,88. Opět se vyskytují kvasinky, které jsou schopny se rozmnožovat v prostředí s nižší vodní aktivitou (*Zygosaccharomyces*). Plísně odolávají daleko nižším hodnotám ve srovnání s bakteriemi a kvasinkami, jsou schopny růstu i při  $a_w = 0,80$  [16]. Při technologických operacích, kterými mohou být sušení, uzení, zahušťování nebo mrazení, dochází ke snižování množství vody využitelné pro mikroorganismy a jejich růst je částečně nebo úplně inhibován [26]. Nízké hodnoty  $a_w$  prostředí prodlužují lag fázi a snižují růstovou rychlost a hustotu bakteriální suspenze [6].

Vodní aktivita je také prezentována jako kritický ukazatel stability potravin [24]. Vzhledem k mikrobiálnímu kažení se potraviny rozdělují dle hodnot  $a_w$  na lehce, středně a málo se kazící. Pokud vodní aktivita dosahuje hodnot vyšších než 0,95, trvanlivost potravin je omezena na několik dnů. Hodnota rovna nebo nižší než 0,65 deklaruje dvouletou trvanlivost, neomezená trvanlivost je spojována s hodnotou vodní aktivity menší než 0,6 [26].

U tavených sýrů se hodnota vodní aktivity pohybuje v rozmezí 0,96 až 0,91. Klasický tavený sýr nabývá hodnot 0,94 až 0,96, kdežto tavené plátky mají vodní aktivitu nižší (0,91 až 0,93). Tyto hodnoty se podílí na prevenci proti růstu a tvorbě toxinů některých kmenů anaerobní bakterie *Clostridium botulinum*. Růst proteolytického kmene *C. botulinum* je inhibován vodní aktivitou nižší než 0,935 a neproteolytických kmenů nižší než 0,970. Produkci botulotoxinu inhibuje prostředí s vodní aktivitou nižší než 0,944 [18].

### 1.3.3 Obsah tuku

Množství tuku patří mezi základní ukazatele ovlivňující konzistenci tavených sýrů. S nižším obsahem tuku se zvyšují viskoelastické vlastnosti. Obsah tuku vede k výrobě měkkého a méně pružného taveného sýra. Naopak s vyšším obsahem bílkovin je tavený sýr tvrdší a elastičtější [21], [22]. Kromě množství použitého tuku ovlivňuje tuhost výrobku velikost tukových kuliček. Čím menší jsou tukové kuličky, tím tužší a stabilnější je konečný produkt [5].

Množství tuku ovlivňuje růst i metabolické pochody mikroorganismů. Bylo dokázáno, že produkce botulotoxinu je značně nižší v prostředí s nižším obsahem tuku oproti tučným taveným sýrům při jinak stejných podmínkách. Růst anaerobních bakterií je v tavených sýrech s nižším obsahem tuku nižší [18].

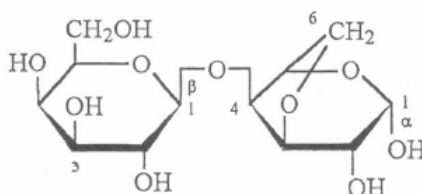
Produkcí botulotoxinu v tavených sýrech s různým obsahem tuku se zabývali Glass et al. [27]. Z jejich studie vyplývá, že tavené sýry se sníženým obsahem tuku jsou více bezpečné než produkty s vyšším obsahem tuku. Produkce botulotoxinu je v tavených sýrech s nižším obsahem tuku pouze zpožděna. Autoři upozorňují na značnou nevýhodu při výrobě tavených sýrů se sníženým obsahem tuku, která plyne z nutnosti přidavku látek zlepšujících chuť.

## 2 PŘÍDATNÉ LÁTKY POUŽÍVANÉ V POTRAVINÁŘSTVÍ

### 2.1 Karagenany

Karagenany patří do skupiny hydrokoloidů, což jsou biopolymery obvykle sacharidické nebo bílkovinné povahy [6]. Potravinářský průmysl zaznamenal v nedávné době zvýšenou spotřebu těchto materiálů. Látky na bázi hydrokoloidů jsou často aplikovány v množství menším jak 1 %, avšak i takto malé množství má podstatný vliv na texturní a organoleptické vlastnosti potravinářských výrobků [28].

Karagenany jsou aniontaktivní lineární polysacharidy extrahovány z červených mořských řas třídy *Rhodophyceae*, zvláště řas rodů *Euchema*, *Chondrus* a *Gigantina* [29]. Jejich základní jednotku tvoří disacharid karabióza (Obr.2), který se skládá ze střídajících sekvencí  $\beta$ -D-galaktopyranózy a 3,6-anhydro- $\alpha$ -D-galaktopyranózy spojených vazbou  $\beta$ -(1-4). Jednotlivé karabiózy jsou v lineárním řetězci spojeny vazbou  $\alpha$ -(1-3) [7], [29].



Obr. 2 Karabióza [29]

Vyskytuje se minimálně osm sekvencí karagenanů, které se liší počtem a polohou sulfátové skupiny. Jejich výčet je následující [29]

- $\beta$ -karagenan ( $\beta$ -D-galaktóza a 3,6-anhydro-  $\alpha$ -D-galaktóza),
- $\kappa$ -karagenan ( $\beta$ -D-galaktóza-4-sulfát a 3,6-anhydro-  $\alpha$ -D-galaktóza),
- $\iota$ -karagenan ( $\beta$ -D-galaktóza-4-sulfát a 3,6-anhydro-  $\alpha$ -D-galaktóza-2-sulfát),
- $\mu$ -karagenan ( $\beta$ -D-galaktóza-4-sulfát a  $\alpha$ -D-galaktóza-6-sulfát),
- $\theta$ -karagenan ( $\beta$ -D-galaktóza-2-sulfát a 3,6-anhydro-  $\alpha$ -D-galaktóza-2-sulfát),
- $\xi$ -karagenan ( $\beta$ -D-galaktóza-2-sulfát a  $\alpha$ -D-galaktóza-2-disulfát),

- $\nu$ -karagenan ( $\beta$ -D-galaktóza-4-sulfát a  $\alpha$ -D-galaktóza-2,6-disulfát),
- $\lambda$ -karagenan ( $\beta$ -D-galaktóza-2-sulfát a  $\alpha$ -D-galaktóza-2,6-disulfát).

### 2.1.1 Vlastnosti karagenanů

V potravinářství se využívají pouze  $\kappa$ -karagenan,  $\iota$ -karagenan a  $\lambda$ -karagenan lišící se svými vlastnostmi. Kappa-karagenan a iota-karagenan mají schopnost za určitých podmínek tvořit gely. Gely, které jsou vytvořeny přítomností kappa-karagenanu, jsou tuhé a křehké, zatímco v přítomnosti iota-karagenanu se tvoří gely měkké a elastické. Lambda-karagenan je silně sulfátován a není schopen tvorby stabilních gelů [32]. Základní podmínkou tvorby gelu je vhodná teplota, v závislosti na teplotě se karagenany vyskytují v uspořádané helikální struktuře nebo v neuspořádaném stavu. Teplota přechodu z uspořádaného do neuspořádaného stavu se liší v závislosti na typu karagenanu a iontové síle, pohybuje se v rozmezí 35 až 55 °C. Právě tvorba helixů je spjata s gelotvornými vlastnostmi karagenanů. Vzniklé šroubovice se shlukují a dochází k vytvoření trojrozměrné matrice gelu. Lambda-karagenan se vyskytuje v tzv cik-cak uspořádání, které není schopno tvorby gelu [7], [31].

Karagenany jsou látky hydrofilní, jejich rozpustnost ve vodě nezávisí pouze na typu karagenanu, ale i na teplotě a aktivní kyselosti prostředí. Rozpustnost karagenanů je podmíněna jejich strukturou, konkrétně poměrem hydrofilních hydroxylových a sulfátových skupin a hydrofobních 3,6-anhydro-D-galaktózových zbytků. Lambda-karagenan je velmi dobře rozpustný, naopak nejméně rozpustný je kappa-karagenan [29]. Všechny tři typy karagenanů jsou rozpustné v 80 °C teplé vodě, kdežto pokud má voda nižší teplotu (20 °C) lze rozpustit lambda- a kappa-karagenan, v případě iota-karagenanu lze rozpustit pouze jeho sodnou sůl. Karagenany jsou stabilní v prostředí o pH 5 až 10. V kyselějších prostředí dochází k jejich hydrolýze [29].

Polysacharidy jsou často přidávány do mléčných výrobků a dalších produktů obsahujících mléčné bílkoviny z důvodu zvýšení viskozity a úpravy texturních vlastností. Velkou předností karagenanů je jejich schopnost tvorby komplexů s mléčnými proteiny. Reakce probíhá na základě elektrostatické interakce, ke které dochází mezi záporně nabitou sulfátovou skupinou  $\kappa$ -karagenanu a kladně nabitou oblastí mezi 97. a 112. aminokyselinou  $\kappa$ -kaseinu, který se nachází na povrchu kaseinové micely. Ostatní hydrokoloidy využívané v potravinářství (např. xantanová, guarová nebo lokustová guma) nejsou schopny tvořit komplexy

s mléčnými proteiny, jejich přidavkem by docházelo ke ztrátám požadované kvality mléčných produktů [30], [33]. Kappa-karagenan a iota-karagenan se absorbují na kaseinové bílkoviny v rozmezí teplot, které umožňují výskyt karagenanů v helikální konformaci. Pro kappa-karagenan je absorpce teplotně reverzibilní, pro iota-karagenan ireverzibilní [31].

### 2.1.2 Aplikace karagenanů

Karagenany nacházejí své uplatnění v potravinářském i jiném odvětví. V mlékárenském průmyslu se karagenany využívají pro své schopnosti stabilizovat texturu finálního výrobku. Používají se v koncentracích 0,01 až 0,30 % [6]. Již velmi nízká koncentrace zamezí oddělování syrovátky u mléčných výrobků jako jsou zmrzliny nebo smetanové sýry [33]. Z důvodu nízkého pH výrobku je však nevhodné jejich použití při výrobě fermentovaných mléčných výrobků [34] a měkkých sýrů [28]. Nízké pH zvyšuje elektrostatické interakce mezi proteiny a karagenanem, což může vést až k destabilizaci systému [28]. Uplatňují se při výrobě pudinků, šlehaných mléčných produktů a mléčných nápojů [6], [29].

Vlivu přidavku karagenanů do tavených sýrů se věnovali Černíková et al. [31]. Srovnávali konzistenci tavených sýrů s přidavky 0,25 %  $\kappa$ - a  $\iota$ -karagenanu. V obou případech byl pozorován nárůst elastického modulu pružnosti i ztrátového modulu pružnosti. Z výsledků vyplývá, že tavené sýry se v přítomnosti karagenanu staly tužšími. Dále uvedli, že přídavek  $\iota$ -karagenanu je ve zvyšování tuhosti účinnější.

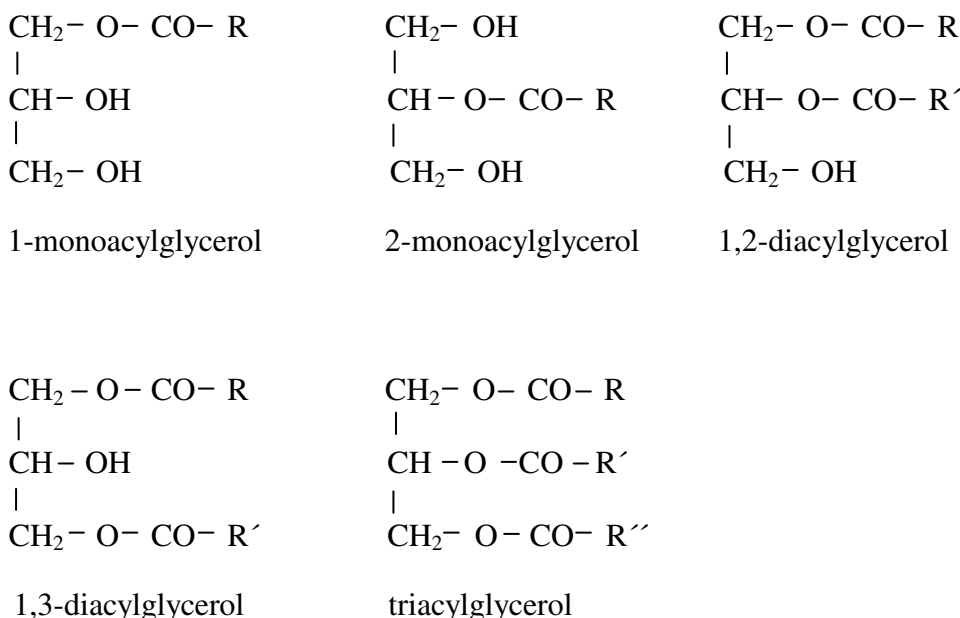
V nedávné době se objevily práce zabývající se výrobou tavených sýrů bez použití tavicích solí na bázi fosforečnanů nebo citrátů. Potenciálními látkami nahrazující tavicí soli by mohly být právě karagenany. Černíková et al. [31] se zabývali náhradou tavicích solí  $\kappa$ - a  $\iota$ -karagenany. Z práce vyplývá, že při aplikaci karagenanů lze získat makroskopicky i mikroskopicky homogenní produkt. V případě použití pektinu k podobným závěrům však nedospěli.

Díky svým vlastnostem (schopnost vázat vodu, tvorba gelu a s tím spojená modifikace viskozity) nachází karagenany široké uplatnění i v masném průmyslu. Výhodou je rozsáhlé spektrum použitelnosti v masných výrobcích a pozitivní vliv na organoleptické vlastnosti. Aplikace karagenanů je často doplňována některými dalšími hydrokoloidy (želatinou, škrobem, xantanem, lokustovou gumou) [28].

Dalším odvětvím, kde se můžeme setkat s aplikací karagenanu je kosmetický a farmaceutický průmysl. Karagenan našel uplatnění ve funkční kosmetice. Jako příklady je možné jmenovat čistící krémy, deodoranty, barviva [29].

## 2.2 Monoacylglyceroly

Vzhledem k tomu, že glycerol je trojsytný alkohol, mohou se vyskytovat plně nebo částečně esterifikované acylglyceroly (Obr. 3). Substitucí jednoho vodíku hydroxylové skupiny acylem vznikají dva izomerní monoacylglyceroly (1-monoacylglycerol nebo 2-monoacylglycerol). V potravinách převažuje stabilnější forma 1-monoacylglycerolu. Kromě monoacylglycerolů mohou vznikat i další parciální estery, které ve své molekule mají dvě acylové skupiny (1,2-diacylglyceroly nebo 1,3-diacylglyceroly). Poslední skupinou jsou triacylglyceroly, které mají ze všech forem v živých systémech nejpočetnější zastoupení. Estery mastných kyselin s glycerolem se označují jako nejdůležitější technické lipidy, neboť tvoří podstatnou část tuků a olejů [29], [35].



Obr. 3 Estery glycerolů [35]



### 2.2.1 Výroba monoacylglycerolů

Monoacylglycerol byl poprvé vyroben v roce 1960 pomocí glycerolýzy z triacylglycerolu. V dnešní době jsou monoacylglyceroly připravovány chemickou syntézou několika způsoby [37]. Monoacylglyceroly se nejčastěji vyrábí glycerolýzou nebo-li reesterifikací tuku glycerolem. Důležitá je přítomnost katalyzátorů a vysoká teplota. Výsledkem je směs monoacylglycerolů, diacylglycerolů, triacylglycerolů, volných mastných kyselin a glycerolu. Uvedenou cestou se získá pouze 50 až 55 % monoacylglycerolu, pro získání až 95 % monoacylglycerolů se provádí molekulární destilace [35].

Další možností výroby je esterifikace karboxylových kyselin s alkoholy, kdy nejdříve vznikají monoacylglyceroly, poté diacylglyceroly a následně triacylglyceroly [36]. Přítomnost kyselých nebo zásaditých katalyzátorů vede k několikanásobnému urychlení reakce [47].

Opakem esterifikace je hydrolýza. Při reakci molekuly triacylglycerolu přijímají molekulu vody, tím dochází k odštěpení mastné kyseliny a vzniku diacylglycerolu, následnou hydrolýzou vzniká monoacylglycerol. V současné době jsou takto vyrobené monoacylglyceroly spíše vedlejšími surovinami při výrobě mastných kyselin. Hydrolýza může probíhat i enzymově při pokojové teplotě [35].

Nejnovějším postupem syntézy monoacylglycerolů je adice mastných kyselin na glycidol ((oxiran-2-yl) metanol) otevřením epoxidového kruhu. Jako katalyzátory se používají terciární aminy, amoniové soli a komplexy tranzitních kovů (chrom, titan, kobalt). Metoda se vyznačuje několika výhodami: vysoká výtěžnost, snadná příprava, malé množství katalyzátoru, nižší reakční teplota. Značnou nevýhodou je obsah příměsí finálního produktu, proto se provádí jeho přečištění [46].

### 2.2.2 Vlastnosti monoacylglycerolů

Monoacylglyceroly, které mají ve své molekule nasycenou mastnou kyselinu, jsou většinou tuhé, polymorfní krystalické látky [29]. Vyskytují se ve formě vloček, prášku nebo malých perel bílé až světle šedého zbarvení. Nenasycené mastné kyseliny udávají monoacylglycerolům kapalný charakter, jejich konzistence bývá olejovitá, barva světle hnědá až slámová [36]. Bod tání monoacylglycerolu je podobný bodu tání příslušné mastné kyseliny, přičemž bod tání vzrůstá s rostoucím počtem uhlíků v molekule, s rostoucím stupněm nenasycenosti klesá. Monoacylglyceroly jsou rozpustné v alkoholu a dalších organických rozpouštědlech

(chloroformu, dietyleteru). Ve vodě jsou pouze částečně rozpustné mastné kyseliny [35], [37]. Při zahřívání monoacylglycerolu ve vodném prostředí dochází k jejich roztavení za tvorby gelu. Struktura gelu je lamelární a podobá se lipidovým dvojvrstvám [38]. Ve vodném roztoku se seskupují tak, že tvoří hydrofilní obal, uvnitř kterého jsou hydrofobní části [37].

Monoacylglyceroly krystalizují v několika modifikacích v závislosti na bodu tání. Modifikace  $\gamma$  má nejnižší bod tání a sklovitou strukturu, získá se rychlým ochlazením taveniny. Další nestabilní modifikací je  $\alpha$ , která naopak vzniká pomalým ochlazením taveniny. Nestabilní modifikace přechází v metastabilní  $\beta'$  modifikaci, která za zvýšené teploty přechází ve stabilní  $\beta$  formu [35]. Moulongui et al. [37] uvádějí, že existují i intermediární struktury, které mohou být lamelární, kubické a hexagonální.

Molekula monoacylglycerolu je tvořena hydrofilní a hydrofobní částí. Uvedená struktura, která se označuje jako amfipatická, zařazuje monoacylglyceroly mezi povrchově aktivní látky. Pro jejich klasifikaci se nejčastěji používá hodnota HLB (hydrofilně-lipofilní rovnováha), která závisí na poměru velikosti hydrofilní a lipofilní části [45]. Monoacylglyceroly mají větší zastoupení ve své lipofilní části a proto se jejich velikost HLB pohybuje v rozmezí hodnot 3 až 6, což jim umožňuje vytvářet stálé emulze typu voda v oleji (V/O) [37]. Hodnoty HLB jednak umožní předvídat chování povrchově aktivních látek v roztocích, ale také vypovídají o jejich použití v praxi [38].

Přestože monoacylglyceroly patří mezi syntetické emulgátory, které se vyrábějí chemickou cestou za použití přírodních složek, přirozeně se nachází v mléčném tuku [35], [39].

Emulgátory lze definovat jako látky, které snižují mezipovrchové napětí na rozhraní dvou nemísitelných kapalin, tím podstatně umožňují dispergaci jedné kapaliny ve druhé ve formě jemných kapiček [35].

Monoacylglyceroly, které obsahují nenasycené mastné kyseliny, musí být chráněny proti oxidačnímu žluknutí [36].

### 2.2.3 Aplikace monoacylglycerolů

Monoacylglyceroly jsou považovány za neionogenní surfaktanty se širokým uplatněním jako emulgátory v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu [37]. Za historicky první emulgátor je považován včelí vosk, který byl součástí pleťového mléka. Na

počátku devatenáctého století byl poprvé v potravinářském průmyslu při výrobě majonézy použit vaječný žloutek, který dispergoval kapičky oleje ve vodné fázi. V roce 1920 se začal jako emulgátor používat fosfatidylcholin (lecitin) vyráběný ze sójových bobů. První mono- a diacylglycerol byl syntetizován v roce 1853 [36].

Z potravinářských technologií jsou monoacylglyceroly nejhojněji využívány v pekařském průmyslu při výrobě chleba. Vlastnosti monoacylglycerolů a dalších emulgátorů závisí na vlastnostech jejich dispergace při zpracování těsta. Při aplikaci monoacylglycerolů dochází ke zvýšení fermentační stability těsta, což má za následek odolnost finálních výrobků vůči mechanickým otřesům během transportu. Důležitou vlastností je tvorba ve vodě nerozpustného komplexu s amylozou, jehož příčinou je zvýšená čerstvost pečiva a zamezení retrogradace. Během pečení škrobová zrna absorbují vodu, amyulóza přechází z amorfního stavu do roztoku a amylopektin přechází z krystalického stavu do formy gelu. Během chlazení čerstvě upečeného chleba se amyulóza shlukuje s dalšími molekulami amylozy nebo s polárními lipidy za vzniku měkké střídy. Během skladování opět přechází amylopektin do krystalického stavu, střída postupně tvrdne. Uvedený mechanismus prodlužuje čerstvost pečiva o 2 až 3 dny [36], [38]. Z podobných důvodů jsou monoacylglyceroly jednou ze surovin při výrobě jemného pečiva. Interakce monoacylglycerolu s amylozou se uplatňuje i při výrobě těstovin, kdy dochází ke snižování jejich lepivosti po uvaření [36].

Další velká oblast použití monoacylglycerolu spadá pod tukařský průmysl, kde se používání monoacylglycerolů datuje od roku 1930 [36]. Uplatnění nachází při výrobě margarínů a roztíratelných tuků, kde zajistí jemnou distribuci kapiček vody v olejové fázi, stabilní krystalickou strukturu a dobrou roztíratelnost [38]. Jako emulgační činidla se využívají monoacylglyceroly kyseliny stearové, palmitové, olejové a linolové [37]. Při výrobě margarínů se používají nasycené monoacylglyceroly, kdežto výroba roztíratelných tuků vyžaduje použití nenasyčených monoacylglycerolů [38].

V roce 1936 byly monoacylglyceroly patentovány při výrobě mražených smetanových krémů [36]. Usnadňují zašlehávání vzduchu, výrobku dávají větší pevnost a tvarovou stálost, zjemňují strukturu [35]. Mezi další výrobky s uplatněním MAG patří fermentované mléčné výrobky nebo chlazené dezerty [36].

Nověji jsou monoacylglyceroly využívány při výrobě nízkotučných a instantních pokrmů [40]. Někteří autoři uvádí použití monoacylglycerolů jako ochranných látek na povrchu ovoce a zeleniny, drůbežního a rybího masa [37].

Mezi poslední aplikaci MAG, které patří do potravinářského průmyslu, lze zařadit výrobu cukrovinek. Využívají se při výrobě šlehaných hmot, kde napomáhají vytvořit pěnu o požadovaném objemu, pevnosti a stabilitě. Monoacylglyceroly kyseliny palmitové a stearové se přidávají do čokolád pro zabránění tukovým výkvětům [35].

Kromě potravinářského průmyslu našly monoacylglyceroly uplatnění v kosmetickém, farmaceutickém, plastikářském a krmivářském průmyslu [37]. V kosmetice se využívají MAG s nasycenou mastnou kyselinou. Vlastnosti, které je předurčují pro aplikace v kosmetice, jsou odolnost vůči oxidaci vzduchem, chemická netečnost, bezbarvost. Mohou se uplatnit jako látky emulgující i emoliační. Navíc jsou dobře snášeny lidskou pokožkou a sliznicí, jejich penetrace je výborná. Monolaurin v kombinaci s jeho mono- a diacetátem je součástí antiperspirantů. MAG rovněž zlepšují odolnost mýdel proti popraskání. Dále se nachází ve výrobcích určených pro péči o pleť, barvách na vlasy, v depilačních prostředcích. Nejširší uplatnění nachází v krémech a pleťových vodách z důvodu stabilizace emulze V/O/V [37].

Ve farmaceutickém průmyslu se uplatňují monoacylglyceroly obsahující kyselinu olejovou a linolenovou. Využití nachází MAG s mastnými kyselinami, které obsahují ve svém řetězci 8 až 10 uhlíků. Jejich příznivý účinek spočívá ve zlepšování resorpce léčiv ve tkáních [41], [42]. Monoacylglyceroly mohou ovlivňovat imunitní systém [43].

V plastikářském průmyslu se MAG uplatňují pro své změkčující, lubrikační a antistatické vlastnosti [44].

V textilním průmyslu se MAG stávají součástí výroby polyolefinových vláken. U textilií zvyšují odolnost vůči vodě, upravují barevnou stálost a kontrast [37].

#### **2.2.4 Antimikrobiální aktivita mastných kyselin a monoacylglycerolů**

Na rozdíl od antibiotik, mastné kyseliny a jejich estery mohou působit několika nescifickými mechanismy, díky nimž dochází k vyloučení vzniku rezistence [48]. Mechanismus účinku není zcela definovaný, ale předpokládá se, že dochází k porušení propustnosti cytoplazmatické membrány a následné inhibici transportu aminokyselin [50]. Jiní autoři se do-

mnívají, že vlivem monoacylglycerolů nastává disociace mastných kyselin uvnitř buňky, následkem čehož se prostředí uvnitř buňky okyselí a důležité enzymy jsou inaktivovány [49].

Antimikrobiální účinek monoacylglycerolů je závislý na druhu navázané mastné kyseliny [51]. Souvisí s délkou uhlíkového řetězce mastné kyseliny, její nasycenosti či nenasyčenosti. Účinek neovlivňuje pouze přítomnost dvojná vazby, ale i její poloha [52], [54].

Účinek monoacylglycerolů může být podpořen přítomností mnohých látek. Mezi látky zvyšující účinek monoacylglycerolu patří etylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) [56], kyselina mléčná [57], nizin [58], [59] laktoperoxidázový systém tvořený laktoperoxidázou, thiokyanatanem a peroxidem vodíku [60]. Dalším faktorem, který ovlivňuje zda monoacylglycerol má či nemá inhibiční účinek, je teplota [51].

Antimikrobiální aktivita monoacylglycerolů byla zkoumána proti široké škále grampozitivních i gramnegativních bakterií, nejdříve v podmínkách *in vitro*, později i v modelových potravinových systémech.

Bakterie s buněčnou stěnou grampozitivního typu jsou citlivé na mastné kyseliny s krátkým a středně dlouhým řetězcem a jejich estery [69]. Jejich citlivost na látky lipidní povahy je vysvětlována nepřítomností lipopolysacharidů v buněčné stěně [53]. Bakterie s buněčnou stěnou gramnegativního typu jsou k účinkům monoacylglycerolů poněkud odolnější [52].

V reálných podmínkách může docházet k odlišnému chování inhibičních látek. Při aplikaci monoacylglycerolů do potravin může nastat problém s jejich sníženou rozpustností ve vodných roztocích [61]. Některé složky potravin, jako jsou škroby, sérový albumin, fosfolipidy nebo cholesterol, mohou s monoacylglyceroly reagovat a snižovat tak jejich inhibiční účinek proti růstu nežádoucích bakterií [50], [56]. Navíc monoacylglyceroly mohou ovlivnit organoleptické a funkční vlastnosti potravin [51]. V přítomnosti škrobu klesá antimikrobiální aktivita kyseliny stearové, olejové a linolové proti růstu grampozitivní bakterie *Bacillus cereus*. Dále přítomnost škrobu snižuje inhibiční účinek kyseliny palmitové, linolové a linolenové proti růstu *Clostridium botulinum* a *Clostridium sporogenes*. Podobný problém se vyskytuje i u jiných látek. Kukuřičný olej redukuje antimikrobiální aktivitu butylhydroxyanizolu (BHA) proti několika druhům plísní, kvasinek i bakterií. Další popisovanou složkou potravin, která ve vysokém množství snižuje antimikrobiální účinek některých látek, je tuk [66].

Z dostupné literatury vyplývá, že mezi velmi účinné a zároveň prostudované monoacylglyceroly patří monokaprin a monolaurin, jedná se o monoacylglyceroly s nasycenou mastnou kyselinou mající 10 a 12 atomů uhlíku ve svém řetězci. U monoacylglycerolu kyseliny laurové a kaprinové byla prokázána inhibice významných bakterií s buněčnou stěnou gramnegativního typu (*Salmonella Typhi*, *Vibrio cholerae*, *Shigella sonnei* a *Helicobacter pylori*) [62], [63], [65]. *Campylobacter jejuni* byl inhibován pouze monokaprinem [64].

Působením několika faktorů na růst grampozitivní bakterie *Listeria monocytogenes* se věnovali Wang et al. [51]. Poukázali na skutečnost, že teplota, pH a mléčný tuk mohou mít vliv na inhibiční účinek mastných kyselin a monoacylglycerolů. Monolaurin inaktivoval *L. monocytogenes* ve smetaně při 4 °C, zatímco při 23 °C byl jeho účinek méně inhibiční. Efektivita monolaurinu byla ovlivněna i přítomností tuku, kdy v plnotučném mléce inhibiční účinky pozorovány nebyly. V přítomnosti kyseliny linolové nastalo prodloužení lag fáze ve vzorcích plnotučného mléka a smetany při 4 °C. Ze sledovaných mastných kyselin (C<sub>14:0</sub>, C<sub>16:0</sub>, C<sub>18:0</sub>, C<sub>18:1</sub>, C<sub>18:2</sub>, C<sub>18:3</sub>, C<sub>12:0</sub>) byla neúčinnější kyselina laurová.

Vyšší účinek acylglycerolů při nižší kultivační teplotě publikovali i Bala et al. [56]. Minimální inhibiční koncentrace monoacylglycerolu kyseliny laurové proti *Listeria monocytogenes* v teplotním rozmezí 25 až 35 °C byla 16 µg/ml. Pokud bylo teplotní rozmezí sníženo na 15 °C, hodnoty minimální inhibiční koncentrace byly o polovinu nižší, 8 µg/ml.

Ke stabilizaci potravin s nízkým obsahem kyselin je nezbytné tepelné ošetření působením vysokých teplot. Teplotní záhřev může mít negativní účinky na živiny, případně smyslové vlastnosti potravin. Chaibi et al. [67] se zabývali možností přidavku monoacylglycerolů a inhibičním vlivem na růst *Bacillus cereus*. Monoacylglycerol kyseliny laurové a linolenové výrazně snížil odolnost spor vůči teplotě, kdežto monoacylglycerol kyseliny myristové a linolové odolnost spor vůči teplotě mírně zvýšily. Synergistický efekt antimikrobiální látky (monoacylglycerolu kyseliny laurové) a teploty nabízí možnost použití nižších teplot při sterilaci potravin.

Sprong et al. [55] sledovali antimikrobiální účinek široké škály mastných kyselin s nasyceným i nenasyceným uhlíkovým řetězcem na růst *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella* Enteritidis a *Listeria monocytogenes* v podmínkách *in vitro*. Kyselina máselná, kapronová, kaprylová, palmitová a stearová neměly inhibiční účinky na růst žádné testované bakterie. Dalšími testovanými mastnými kyselinami byly olejová, linolová

a linolenová, které působily inhibičně na *Listeria monocytogenes*. Všechny testované bakterie byly inhibovány kyselinou laurovou a kaprinovou. Autoři potvrdili, že inhibiční účinek mají mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem nebo ty, které obsahují dvojnou vazbu.

Inhibičním účinkem mastných kyselin, monoacylglycerolů a organických kyselin na růst dvou kmenů *Clostridium perfringens* (*C. perfringens* CCM 4435 a *C. perfringens* CNCTC 5459) se zabývali Skřivanová et al. [68]. Minimální inhibiční koncentrace byla vyjádřena jako nejnižší koncentrace, kdy nedocházelo k nárůstu bakteriálních buněk. Oba kmeny *C. perfringens* byly inhibovány kyselinou kaprylovou, kaprinovou, laurovou, myristovou a olejovou, přičemž nejvyšší inhibiční aktivitu měly kyselina laurová a myristová (0,1 až 0,2 mg/ml). Monoacylglycerol kyseliny laurové měl inhibiční účinky ve srovnání s mastnými kyselinami nižší (3 mg/ml), z organických kyselin měla inhibiční účinky pouze kyselina citrónová (4 mg/ml). Dalším faktorem, který může ovlivnit antimikrobiální účinek, je pH prostředí. Kyselina laurová a kaprinová v rozmezí pH 5,0 až 5,3 významně snížily počet životaschopných buněk obou kmenů. Kyselina laurová redukovala počet bakteriálních buněk *C. perfringens* i při pH vyšším jak 6 [70].

Inhibice růstu *Clostridium botulinum* a *Clostridium sporogenes* řadou monoacylglycerolů byla předmětem dalších prací. Vegetativní buňky i spory *Clostridium botulinum* a *Clostridium sporogenes* byly inhibovány monoacylglyceroly kyselin laurové, myristové, linolové a linolenové [71].

Použitím monoacylglycerolů v reálných potravinách se zabývali Garcia et al. [72]. Navrhli použití monokaprylinu jako potenciální antimikrobiální látky aplikované na povrchu drobných masných výrobků. Modelové vzorky párků byly na povrchu naočkovány bakteriálními buňkami *Listeria monocytogenes*. Výrobky ošetřené antimikrobiálními látkami významně snížily počet *L. monocytogenes*. Po 70 dnech skladování u vzorků ošetřených roztokem s monokaprylinem a kyselinou octovou o teplotě 50 °C byla *L. monocytogenes* plně inhibovaná. Antimikrobiální ošetření neovlivnilo chuť ani barvu testovaných potravin.

Stecchini et al. [57] testovali účinek monolaurinu v kombinaci s kyselinou mléčnou na růst *L. monocytogenes* ve vzorcích italského sýra Stracchino. Vzorky byly naočkovány *L. monocytogenes*, ošetřeny inhibičními látkami, vakuově zabaleny a uskladněny po dobu 12 dnů

při teplotě 5 °C. Z výsledků je zřejmé, že monolaurin i kyselina mléčná snižují počet *L. monocytogenes*.

Další potravinou, kde byly zkoumány inhibiční účinky monoacylglycerolu a mastných kyselin, bylo mléko. Podstatou práce bylo najít látku, která má inhibiční účinky na růst bakterií způsobujících bovinní mastitidu. Nair et al. [49] zjistili, že monoacylglycerol kyseliny kaprylové má inhibiční účinky na růst *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* v testovaném mléce.



### 3 ROD *CLOSTRIDIUM*

Rod *Clostridium* patří mezi bakterie s buněčnou stěnou grampozitivního typu. Přítomnost bakterií rodu *Clostridium* v potravinách je považována za nežádoucí, neboť mohou vyvolat alimentární toxoinfekci. Obecně jsou zařazovány mezi technologicky škodlivé mikroorganismy způsobující mnohočetné vady, které potraviny částečně nebo i úplně znehodnocují. Původ těchto závad je nutno hledat již v surovině nebo v nesprávné technologii. Při mikrobiologickém posuzování potravin se využívají jako indikátorové mikroorganismy, konkrétně jako indikátory sanitace potravinářských provozů, správné výrobní praxe a dodržování některých technologických postupů. Z přítomnosti sporulujících bakterií je možno posuzovat hygienické podmínky při prvovýrobě, úchově a přepravě surovin nebo jakost a vhodnost surovin pro další zpracování [73].

Pro bakterie rodu *Clostridium* platí následující taxonomické zařazení:

Doména: *Bacteria* → Kmen: *Firmicutes* → Třída: *Clostridia* → Řád: *Clostridiales* →  
→ Čeleď: *Clostridiaceae* → Rod: *Clostridium* [74].

Rod *Clostridium* patří do velmi početné skupiny bakterií, kromě třídy *Clostridia* kmen *Firmicutes* obsahuje další dvě významné třídy: *Bacilli* a *Mollicutes*. Čeleď *Clostridiaceae* je svými vlastnosti velmi heterogenní, někteří zástupci mají buněčnou stěnu gramnegativního typu, jiní grampozitivního typu. Společným znakem všech bakterií čeledi *Clostridiaceae* je jejich růst za anaerobních podmínek a velmi častá patogenita [74].

Základním, a z potravinářského hlediska významným aspektem, je tvorba spor, které umožňují bakteriálním buňkám odolávat nepříznivým podmínkám [16]. Buňky mají tvar větvenovitě nebo paličkovitě rozšířených tyčinek [73], nejčastěji se vyskytují po dvou nebo tvoří krátké řetízky, není vyloučena ani tvorba spirál. Pohyblivost jim umožňují peritrichální bičíky [74]. Zástupci rodu *Clostridium* jsou rozšířeni v přírodě, běžně se vyskytují v půdě, bahně, mořských sedimentech, sekundárně v siláži, mléku, sýrech, v rozkládajících se rostlinných produktech [75]. Jednotliví zástupci byli izolováni z humánního i veterinárního materiálu [74]. Některé druhy způsobují anaerobní rozklad proteinů, jiné štěpí sacharidy (jednoduché cukry, škrob, celulózu). Při anaerobní oxidaci sacharidů dochází k tvorbě oxidu uhličitého a vodíku. Tvorba plynu má nepříjemný dopad při výrobě sýrů. Dalším negativním dopadem je tvorba kyseliny máselné, která dodává nepříjemnou chuť a vůni [16]

Rod *Clostridium* se podle specifických vlastností rozděluje do tří skupin [74]:

- a) Druhy tvořící kyseliny z glukózy a hydrolyzující želatinu

*Clostridium botulinum* (subtyp A až G), *Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium sporogenes*

- b) Druhy tvořící kyselinu z glukózy a nehydrolyzující želatinu

*Clostridium butyricum*, *Clostridium ramosum*, ostatní termofilní klostridia

- c) Druhy netvořící kyselinu z glukózy a hydrolyzující želatinu

*Clostridium botulinum* (subtyp G), *Clostridium tetani*

Z potravinářského hlediska je nejdůležitější *Clostridium botulinum*, které produkuje prudce jedovaté neurotoxiny, stejných fyziologických vlastností, ale různých antigenních typů A až G. Lidská onemocnění způsobují hlavně toxiny typu A, B, E a zřídka F a G. Typy C a D jsou nebezpečné pouze pro zvířata [19].

Činností sporulujících anaerobních mikroorganismů dochází k bombážím masových konzerv [26].

### 3.1 *Clostridium butyricum*

*Clostridium butyricum* bylo izolováno z půdy, mořských i sladkovodních sedimentů, humánních i klinických materiálů [74]. *Clostridium butyricum* produkuje neurotoxin typu E, při požití takto kontaminované potravině dochází k propuknutí nemoci zvané botulismus [75]. *Clostridium botulinum* bylo poprvé izolováno v roce 1897 a bylo označeno za původce botulismu [18]. *Clostridium butyricum* bylo považováno za nepatogenního zástupce rodu *Clostridium* až do roku 1986, kdy se v Itálii objevily první dva případy botulismu spojeného s tímto druhem. Další případ alimentárního onemocnění způsobené *C. butyricum* typ E byl v roce 1994 v Číně, poté v Indii [75], [77].

*C. butyricum* se vyznačuje vysokou odolností vůči fyzikálním vlivům. Je schopný růstu v kyselém prostředí (při pH 4), nejnižší produkce neurotoxinu byla zjištěna při teplotě 12 °C. Odolává tepelnému účinku 80 °C po dobu 30 minut, ani působením teploty 90 °C po dobu 10 minut nevzniká letální účinek [75]. Produkce toxinu byla detekována po 5 dnech při teplotě 25 °C [18]

Příčinou technologických vad způsobených kontaminací *C. butyricum* je sacharolytická aktivita. V přítomnosti sacharidů dochází k fermentaci za vzniku kyseliny máselné, octové, oxidu uhličitého, vodíku a menšího množství acetonu [78].

Přítomnost *C. butyricum* a *C. tyrobutyricum* může být příčinou pozdního duření sýrů ementálského typu doprovázené chutí po kyselině máselné. Pozdní duření sýrů se vyskytuje u sýrů, u kterých se sýřenina dohřívá na vyšší teploty (52 až 56 °C, po dobu 45 minut), které zajistí zničení koliformních mikroorganismů. Klostridia jsou přítomny ve formě spor, proto duření nastává až za několik týdnů, kdy spora opět vyklíčí na vegetativní buňky. Germinace spor je závislá na podmínkách prostředí (pH,  $a_w$ , NaCl) [78]. V mlékárenské výrobě se těmto vadám předchází výběrem syrového mléka, přidávkem kmenů *Lactobacillus lactis* tvořících nizin nebo přidávkem dusičnanu a dusitanu draselného [26]. V syrovém mléce se klostridia vyskytují v nepatrném množství, mléko obsahuje značné množství kyslíku, který znemožňuje jejich růst. Nebezpečí sekundární kontaminace syrového mléka často pochází z krmiva [78].

### 3.2 *Clostridium sporogenes*

*Clostridium sporogenes* bylo podobně jako *C. butyricum* izolováno z půdy, sladké i slané vody, potravin a humánního klinického materiálu [74]. Morfologicky je *C. sporogenes* popisováno jako bakterie ve tvaru tyčinek o velikosti 1,3 - 16,0 x 0,3 - 1,4  $\mu\text{m}$ , vyskytující se jednotlivě a tvořící subterminální spory [79]. Jejich nepříznivý účinek v kontaminovaném materiálu je spojován s proteolytickou aktivitou.

*C. sporogenes* spolu s *C. putrefaciens* způsobují bílou hnilobu tavených sýrů. Jde o intenzivní proteolýzu, která se projevuje tvorbou bílých, dobře ohraničených hnilobných ložisek s tmavším středem. Vedlejším produktem je kyselina mléčná, která se projevuje nepříjemným zápachem [78]. *C. sporogenes* se podílí na kažení želatiny. V masném průmyslu způsobuje hnití masa a masových konzerv [73]. *C. sporogenes* má negativní vliv i v cukrovinářském průmyslu, kde způsobuje prýšnění, nebo-li výtok náplní z čokoládových cukroviněk [26].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 CÍL PRÁCE

Cíle diplomové práce byly stanoveny následovně:

- Sledovat účinek různých koncentrací monoacylglycerolů na růst *Clostridium butyricum* CAPM 6342 a *Clostridium sporogenes* CAPM 6329 v modelových vzorcích tavených sýrů v závislosti na době skladování.
- Zhodnotit dynamiku růstu bakterií rodu *Clostridium* v modelových vzorcích tavených sýrů o různém obsahu tuku v sušině.
- Sledovat vliv karagenanů na růst bakterií rodu *Clostridium* v modelových vzorcích tavených sýrů během 140 dnů.
- Zhodnotit senzorickou jakost tavených sýrů s přidavkem monoacylglycerolů a karagenanů.

## 5 METODIKA PRÁCE

### 5.1 Výroba tavených sýrů

Pro výrobu modelových vzorků tavených sýrů byly použity následující suroviny:

- Eidamská cihla (Kromilk s.r.o, 30 % (w/w) TVS),
- čerstvé máslo,
- pitná voda,
- komerčně dodávané tavicí soli (Fosfa a.s):
  - difosforečnan sodný ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ , PYRO),
  - dihydrogendifosforečnan sodný ( $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ , KPS),
  - hydrogenfosforečnan disodný dihydrát ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , DIDI),
- monoacylglyceroly (vyrobeny na Ústavu technologie tuku, tenzidů a kosmetiky adicí příslušných mastných kyselin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) na glycidol (Sigma-Aldrich) za katalytického působení chromitých iontů (Sigma-Aldrich) dle postupu Janiš et al.[46]:
  - monoacylglycerol kyseliny undekanové (MAG C<sub>11:0</sub>),
  - monoacylglycerol kyseliny undecenové (MAG C<sub>11:1</sub>),
  - monoacylglycerol kyseliny 1-adamantankarboxylové (MAG ACA),
- karagenan (ι-karagenan, Sigma-Aldrich).

Výroba tavených sýrů byla rozdělena do šesti fází. V první fázi byly vyrobeny vzorky s různým obsahem tuku v sušině (30, 40 a 50 % (w/w) TVS). V dalších fázích se vyrobené vzorky lišily přítomnými monoacylglyceroly (MAG C<sub>11:0</sub>, MAG C<sub>11:1</sub>, MAG ACA), přičemž obsah tuku v sušině byl 50 % (w/w). Monoacylglyceroly byly aplikovány v koncentracích 0,01; 0,05 a 0,15 % (w/w). Poté byla vyrobena série vzorků s přídatkem karagenanů v množství 0,1 a 0,2 % (w/w) s 50 % TVS. Všechny vzorky byly kontaminovány bakteriemi rodu *Clostridium*. V poslední fázi byly vyrobeny kontrolní vzorky tavených sýrů s různým obsahem TVS, s přídatkem všech typů monoacyl-

glycerolů i karagenanů. Tyto vzorky nebyly kontaminovány bakteriemi rodu *Clostridium*. Poslední etapa sloužila k senzoričkému hodnocení a stanovení vodní aktivity sýrů.

Jednotlivé suroviny byly naváženy dle předem připravené surovinové skladby (Příloha PI, PII a PIII). Modelové vzorky tavených sýrů byly utaveny na zařízení Vorwerk Thermomix 31 blender cooker, přičemž tavicí teplota byla  $90 \pm 1$  °C s výdrží 1 minuty, kdy celková doba tavení byla 10 minut. V poslední fázi byly vzorky záměrně kontaminovány 5 ml bakteriální suspenze *Clostridium butyricum* CAPM 6342 nebo *Clostridium sporogenes* CAPM 6329. Poté byla tavenina rozlita do 16 plastových kelímků, následně zažehlena hliníkovým víčkem. Každá tavba byla opakována dvakrát. Vyrobené vzorky byly zchlazeny a skladovány při teplotě  $6 \pm 2$  °C.

Jako pozitivní kontrola byly utaveny vzorky s příslušnými bakteriemi rodu *Clostridium* bez přídavku monoacylglycerolů či karagenanů. Za negativní kontrolu lze považovat vzorky bez zaočkovaných mikroorganismů a s aplikací monoacylglycerolů nebo karagenanů.

## 5.2 Mikrobiologická analýza

### 5.2.1 Použité pomůcky a zařízení

- Autokláv Systec 2540 EL,
- Automatické mikropipety Biohit,
- Bakteriologické kličky,
- Biologický termostat Memmert INE 600,
- Flow Box Clean Air,
- Horkovzdušná sušárna Memmert UNB 500,
- Chladnička Elektrolux,
- Laboratorní předvážky KERN,
- Laboratorní sklo a běžné pomůcky:
  - Kádinky,
  - Petriho misky,

- Odměrné válce,
- Zkumavky,
- Mikrovlná trouba Elektrolux.

### 5.2.2 Testované kultury mikroorganismů

Pro sledování inhibičních účinků netradičních monoacylglycerolů byly vybrány následující kmeny rodu *Clostridium*.

- *Clostridium butyricum* CAPM 6342,
- *Clostridium sporogenes* CAPM 6329.

Bakterie rodu *Clostridium* byly získány ze Sbírký zoopatogenních mikroorganismů při Výzkumném ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. v Brně.

### 5.2.3 Příprava živné půdy

Pro růst bakterií rodu *Clostridium* bylo zvoleno jako živné médium Reinforced Clostridium Broth (RCB, HiMedia, Bombai, Indie). Na přípravu 400 ml živné půdy bylo naváženo 15,2 g RCB a 6 g agaru (HiMedia), poté byl obsah doplněn destilovanou vodou, důkladně protřepán a následně autoklávován při teplotě 121 °C po dobu 30 min.

### 5.2.4 Příprava fyziologického roztoku

Fyziologický roztok byl připraven navážením 8 g chloridu sodného (LachNer, Neratovice, ČR) do odměrné baňky o objemu 1 l a doplněním destilovanou vodou. Poté byl obsah promíchán a autoklávován při teplotě 121 °C po dobu 30 minut.

### 5.2.5 Příprava suspenze bakterií

Zaočkováním 20 ml kultivačního média bakteriemi rodu *Clostridium* z Petriho misky bylo připraveno inokulum. Buňky byly kultivovány při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin. Zaočkováním 10 ml kultivačního média připraveným inokulem o objemu 25 µl byla připravena bakteriální suspenze. Bakterie byly následně kultivovány při 30 °C po dobu 48 hodin. Takto připravenou suspenzí bakterií byly zaočkovány modelové vzorky tavených sýrů.



### 5.2.6 Dekontaminace použitého materiálu

Všechn použitý materiál (živné půdy, suspenze bakterií, vzorky taveného sýra se zaočkovanými bakteriemi, špičky na automatické pipety) byl dekontaminován v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 30 minut.

### 5.2.7 Stanovení celkového počtu mikroorganismů plotnovou metodou

K mikrobiologickému rozboru byl odebírán modelový vzorek taveného sýra v pravidelných časových intervalech. Po celou dobu byly vzorky skladovány při chladírenských teplotách ( $6 \pm 2$  °C). Celkový počet mikroorganismů byl stanoven 2., 7., 14., 28., 42., 56., 84. a 140. den skladování. Ke každému rozboru byly odebírány dva totožné vzorky. Dále byl proveden rozbor kontrolního vzorku bez přítomnosti přídatných látek (MAG, karagenanů).

Prvním krokem mikrobiologického vyšetření byl odběr vzorku. Po otevření obalu bylo sterilní lžící odebráno 5 g vzorku. Pro rovnoměrné rozptýlení mikroorganismů do celého objemu zkoušeného vzorku byla provedena homogenizace. K navážce byl přidán devítinásobek fyziologického roztoku, bylo dbáno, aby doba homogenizace nepřekročila 2,5 minuty. U homogenizovaného vzorku bylo provedeno desítkové ředění. Výchozí ředění ( $10^{-1}$ ) bylo získáno smícháním odváženého množství vzorku s fyziologickým roztokem. Každé ředění bylo důkladně promícháno.

Očkování bylo provedeno přelivem, kdy 1 ml vzorku příslušného ředění byl přelit agarovou půdou vytemperovanou na 45 °C, tak aby výše agarové vrstvy byla cca 5 mm. Nalitá půda byla krouživými pohyby důkladně promíchána s inokulem. Posledním krokem bylo vložení Petriho misek do anaerostatu (7 % CO<sub>2</sub>) a kultivace při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. Schéma mikrobiologického rozboru znázorňuje Obr. 4. Po uplynutí doby potřebné ke kultivaci byly na půdách odečteny vyrostlé kolonie. Celkové počty mikroorganismů byly přečteny na 1 g modelového vzorku taveného sýra (CFU/g).

Výpočet CFU/g pro dvě misky po sobě jdoucího ředění:

$$N = \frac{\sum c}{V \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d}$$

kde:

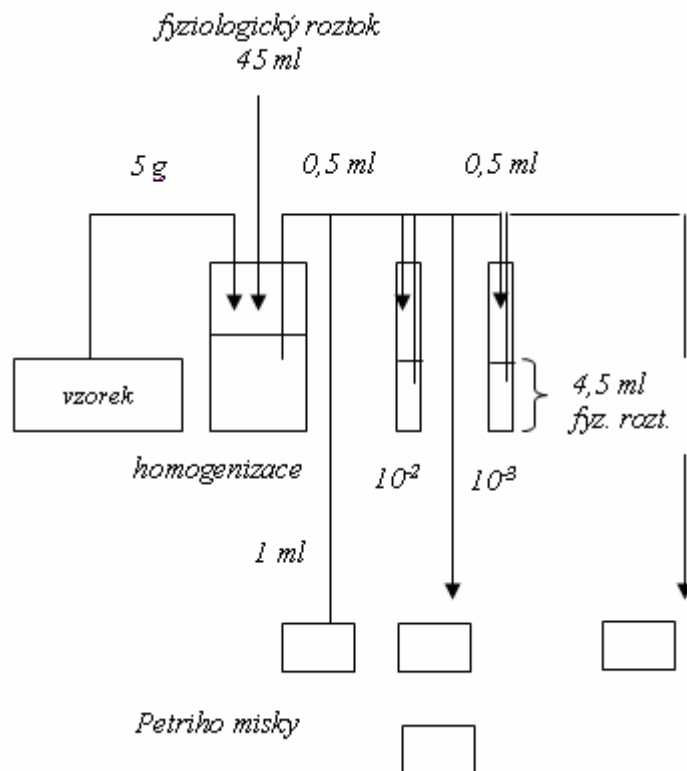
N.....celkový počet mikroorganismů [CFU/g]

$\sum c$  .....celkový počet kolonií na plotnách

V.....objem inokula [ml]

$n_1, n_2$ .....počet ploten prvního a druhého ředění

d .....ředící faktor odpovídající prvnímu ředění



Obr. 4 Schéma pracovního postupu při zpracování vzorku taveného sýra

## 5.3 Chemická analýza

### 5.3.1 Stanovení aktivní kyselosti (pH)

Po mikrobiologickém rozboru byla u každého vzorku změřena aktivní kyselost. Hodnoty pH tavených sýrů byly měřeny vpichovou elektrodou pomocí digitálního pH-metru. (pHSpear, Eutech Instrument, USA). Vpichový pH metr byl předem kalibrován, vlastní měření bylo prováděno při teplotě 20 °C. Pro získání přesného údaje, byly hodnoty pH měřeny na třech různých místech modelového vzorku taveného sýra.

### 5.3.2 Stanovení vodní aktivity ( $a_w$ )

Ke stanovení vodní aktivity byly použity vzorky z poslední série výroby tavených sýrů. Vodní aktivita byla měřena u vzorků s přidavkem monoacylglycerolů a karagenanů v různých koncentracích i u vzorků s různým obsahem tuku. Laboratorní analýza byla prováděna v laboratoři pro vyšetřování potravin MVDr. Šotola s.r.o., Kroměříž na přístroji LabMaster-  $a_w$ , Novasina 30. a 88. den skladování.

Příslušný vzorek taveného sýra byl naplněn do misky na vzorky tak, aby nepřesahoval výšku okrajů misky. Miska se vzorkem se vložila do měřicí cely, další vzorek se umístil do přípravné cely. Proces měření byl zahájen uzavřením poklopu přístroje. Měření bylo ukončeno po naplnění prostoru vodními parami odpovídajícími hodnotám  $a_w$  při ustálení teploty vzorku. Z důvodu optimalizace rychlosti měření byla upravena kritéria ustálení měření (hodnoty  $a_w$  a teplota) na dobu 15 minut. Referenční teplota byla nastavena na 25 °C. Po zvolenou dobu pro ustálení měření nesměla být změna v odečítací cele větší než 0,001  $a_w$  a 0,1 °C.

Hodnoty kontinuálního měření vodní aktivity a teploty byly průběžně zobrazovány až do dosažení rovnovážného stavu, kdy byla zaznamenána konečná hodnota  $a_w$ .

Kalibrace přístroje sloužícího na měření vodní aktivity je prováděna každý týden pomocí standardu SAL-T, v sedmi bodech  $a_w$  (0,06; 0,11; 0,33; 0,53; 0,75; 0,90 a 0,97).

## 5.4 Senzorická analýza

Senzorická analýza byla provedena v laboratoři senzorické analýzy, jejíž uspořádání je upraveno pomocí české technické normy ČSN ISO 8589 [80]. Za posuzovatele bylo zvole-

no 15 studentů třetího ročníku oboru Chemie a technologie potravin, specializace Kosmetika a technologie výroby kosmetických a hygienických přípravků, Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. K sensorickému hodnocení byly vybrány vzorky tavených sýrů obsahující: 0,01 % (w/w) MAG C<sub>11:0</sub>; 0,05 % (w/w) MAG C<sub>11:0</sub>; 0,15 % (w/w) MAG C<sub>11:0</sub>; 0,05 % (w/w) MAG C<sub>12:0</sub>; 0,15 % (w/w) MAG C<sub>12:0</sub>. Následně byla ohodnocena druhá série vzorků obsahující: 0,1 % (w/w) ι-karagenan; 0,2 % (w/w) ι-karagenan; 0,05 % (w/w) MAG C<sub>11:1</sub>; 0,15 % (w/w) MAG C<sub>11:1</sub>; 0,05 % (w/w) MAG ACA; 0,15 % (w/w) MAG ACA. Vzorky byly podávány v potřebném množství, anonymně, v náhodném pořadí a při pokojové teplotě. Jako kontrolní vzorek byl použit tavený sýr s 50 % (w/w) TVS bez přídatných látek, který byl vždy vložen mezi předložené vzorky. K neutralizaci mezi jednotlivými vzorky bylo podáváno pečivo a pitná voda. Pro sensorické posouzení organoleptických a mechanických vlastností jednotlivých vzorků byly použity tři zkoušky (sensorické hodnocení pomocí stupnic, pořadový test intenzity znaků a pořadový preferenční test). Při sensorickém posuzování pomocí stupnic byla použita hédonická ordinální stupnice o sedmi bodech, které byly slovně popsány, přičemž byly hodnoceny následující znaky: vzhled a barva, lesk, konzistence, chuť a vůně a celkové hodnocení. Poté byl proveden pořadový test intenzity znaků tuhosti a roztíratelnosti. Poslední zařazenou zkouškou byl pořadový preferenční test, kdy byly jednotlivé vzorky porovnávány dle celkového dojmu. Protokol pro sensorické hodnocení tavených sýrů a hédonická ordinální stupnice pro posuzování jednotlivých znaků jsou součástí příloh P IX a P X.

Data získaná sensorickým hodnocením byla zpracována programem STATVYD. Výsledky získané pomocí stupnice byly vyhodnoceny pomocí Kruskal-Wallisova testu, výsledky z pořadových zkoušek Friedmanovým testem, kdy hladina významnosti statistického vyhodnocení byla nastavena na 5% úroveň.

## 6 VÝSLEDKY

Pro studium účinku přídatných látek a vybraných faktorů v matrici taveného sýra byly zvoleny dvě technologicky nežádoucí bakterie rodu *Clostridium*. V modelových vzorcích tavených sýrů byl posuzován možný inhibiční vliv monoacylglycerolů, které mají ve své molekule lichý počet atomů uhlíku (monoacylglycerol kyseliny undekanové a monoacylglycerol kyseliny undecenové) a netradičního monoacylglycerolu kyseliny 1- adamantan- karboxylové na růst *Clostridium butyricum* CAPM 6342 a *Clostridium sporogenes* CAPM 6329 v pravidelných časových intervalech. Dále byl sledován růst bakterií v tavených sýrech s přidavkem  $\kappa$ -karagenanu. Růst buněk *Clostridium butyricum* CAPM 6342 a *Clostridium sporogenes* CAPM 6329 byl v modelových vzorcích tavených sýrů rovněž hodnocen i v přítomnosti různého obsahu tuku v sušině. Celkové počty bakterií rodu *Clostridium* v přítomnosti monoacylglycerolů a karagenanů vyjádřené jako log CFU/g tavených sýrů jsou součástí příloh P IV až P VII.

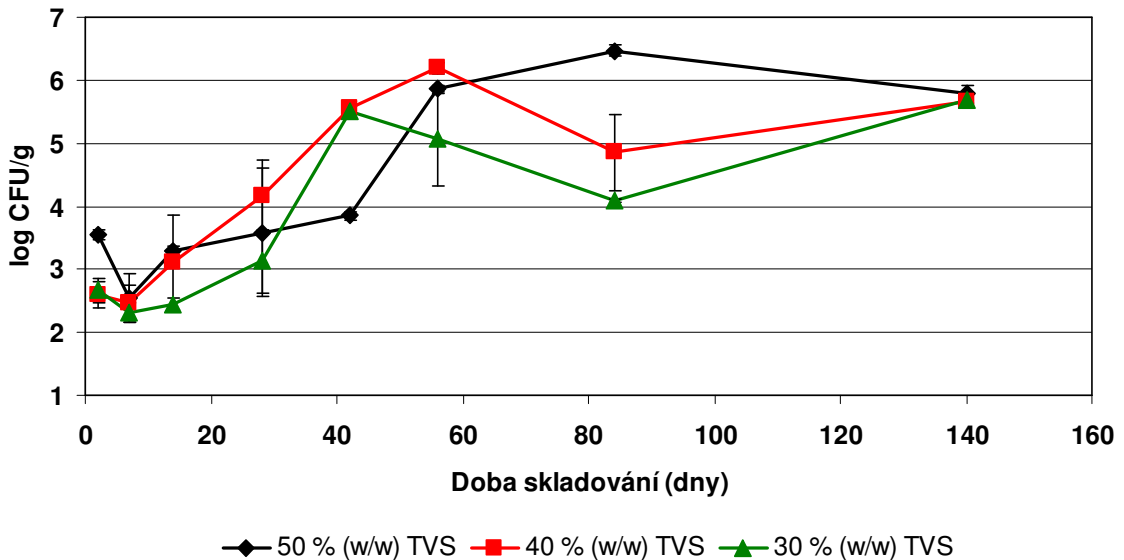
Mikrobiologický rozbor byl doplněn měřením pH prostředí a vodní aktivity. Z důvodu zjištění požitelnosti tavených sýrů s přidavkem monoacylglycerolů a karagenanů byla u vybraných vzorků provedena sensorická analýza.

### 6.1 Vliv tuku na růst bakterií rodu *Clostridium*

#### 6.1.1 Účinek obsahu tuku v sušině na růst *Clostridium butyricum* CAPM 6342

Průběh růstu bakteriálního kmene *Clostridium butyricum* CAPM 6342 v modelových vzorcích tavených sýrů o různém obsahu tuku v sušině znázorňuje Obr. 5. Vzorky byly skladovány po dobu 140 dnů, k mikrobiologickému rozboru byl odebírán vzorek 2., 7., 14., 28., 42., 56., 84. a 140. den skladování. Množství buněk *C. butyricum* CAPM 6342 ve vzorku taveného sýra s 50 % (w/w) TVS první den rozboru dosahovalo hodnoty  $3,55 \pm 0,07$  log CFU/g. Sedmý den skladování nastal pokles celkového počtu buněk o 1 řád log CFU/g, poté až do 56. dne skladování docházelo k neustálému nárůstu počtu buněk. 84. den skladování celkový počet buněk vzrostl na hodnotu  $6,47 \pm 0,09$  log CFU/g, poslední den skladování byl pozorován pokles na  $5,78 \pm 0,14$  log CFU/g. Růst buněk *C. butyricum* CAPM 6342 v modelovém vzorku se 40 % (w/w) TVS měl stoupající tendenci, až do 56. dne skladování, kdy hodnoty CPM byly  $6,19 \pm 0,09$  log CFU/g. Poslední den skladování byly pozorovány totožné hodnoty jako při růstu bakteriálních buněk v prostředí

s 50 % (w/w) TVS. V taveném sýru s nejnižším obsahem TVS (30 % w/w), byly první den rozboru hodnoty celkového počtu mikroorganismů shodné jako v taveném sýru se 40 % (w/w) TVS, poté byly hodnoty nižší s výjimkou 42. dne skladování. 84. den skladování klesl růst *C. butyricum* CAPM 6342 na hodnotu  $4,08 \pm 0,03$  log CFU/g.

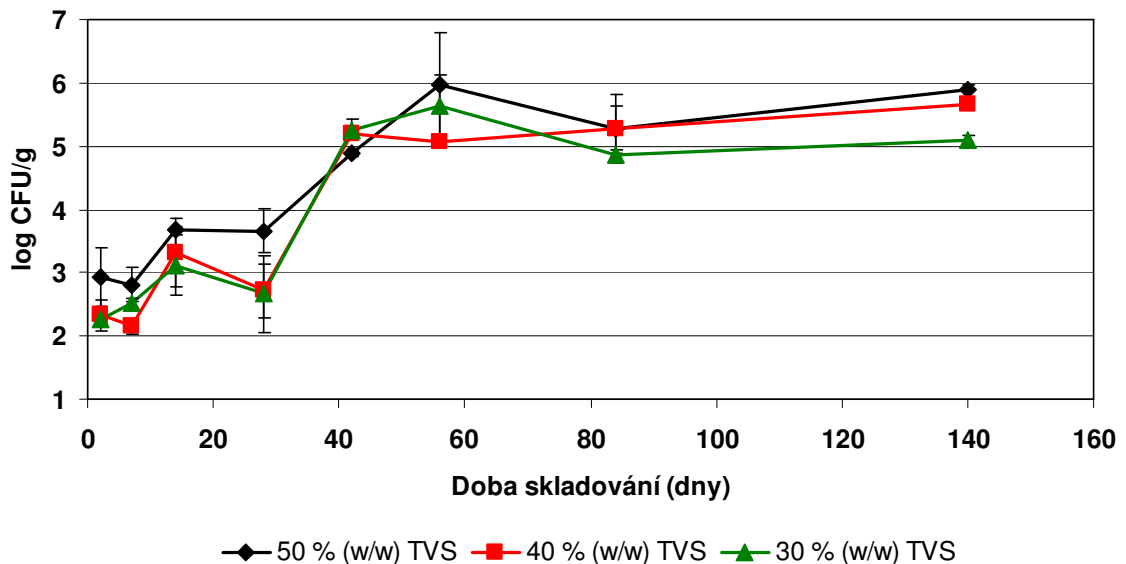


Obr. 5 Dynamika růstu *C. butyricum* CAPM 6342 v modelových vzorcích tavených sýrů s různým obsahem TVS

### 6.1.2 Účinek obsahu tuku v sušině na růst *Clostridium sporogenes* CAPM 6329

Dalším vybraným zástupcem rodu *Clostridium* podílejícím se na kažení mléčných výrobků, u něhož byl posuzován účinek různého obsahu TVS, byl *Clostridium sporogenes* CAPM 6329. Tavené sýry byly uloženy při chladírenské teplotě po dobu 2, 7, 14, 28, 42, 56, 84 a 140 dnů. Z výsledků, které prezentuje Obr. 6, lze vyhodnotit, že se snižujícím se obsahem tuku v sušině klesá růst bakteriálního kmene *Clostridium sporogenes* CAPM 6329. V modelových vzorcích tavených sýrů s 50 % (w/w) TVS byl nejvyšší nárůst pozorován 56. den skladování ( $5,98 \pm 0,81$  log CFU/g), poslední den skladování byl celkový počet bakteriálních buněk snížen jen nepatrně na hodnotu  $5,90 \pm 0,06$  log CFU/g. Při sledování dynamiky růstu *C. sporogenes* CAPM 6329 v matrici tavených sýrů se 40 % (w/w) TVS byl ve srovnání s tavenými sýry o vyšším obsahu TVS zjištěn nižší bakteriální nárůst

s výjimkou 42. dne skladování, kdy hodnoty byly o 0,3 řádu log CFU/g vyšší. Ve vzorcích obsahujících 30 % (w/w) TVS byly hodnoty druhého dne skladování  $2,27 \pm 0,06$  log CFU/g, ve vzorcích obsahující 40 % (w/w) TVS byly hodnoty druhého dne skladování  $2,33 \pm 0,25$  log CFU/g a ve vzorcích obsahující 50 % (w/w) TVS byly hodnoty  $2,93 \pm 0,47$  log CFU/g. Podobný trend ve snižování nárůstu bakteriálních buněk se snižujícím se obsahem tuku byl potvrzen i po 140 dnech skladování. Ve vzorcích s 50 % (w/w) TVS byl 140. den skladování zaznamenán nárůst bakterií na hodnoty  $5,90 \pm 0,06$  log CFU/g, ve vzorcích se 40 % (w/w) TVS  $5,68 \pm 0,09$  log CFU/g a ve vzorcích se 30 % (w/w) TVS  $5,08 \pm 0,09$  log CFU/g.

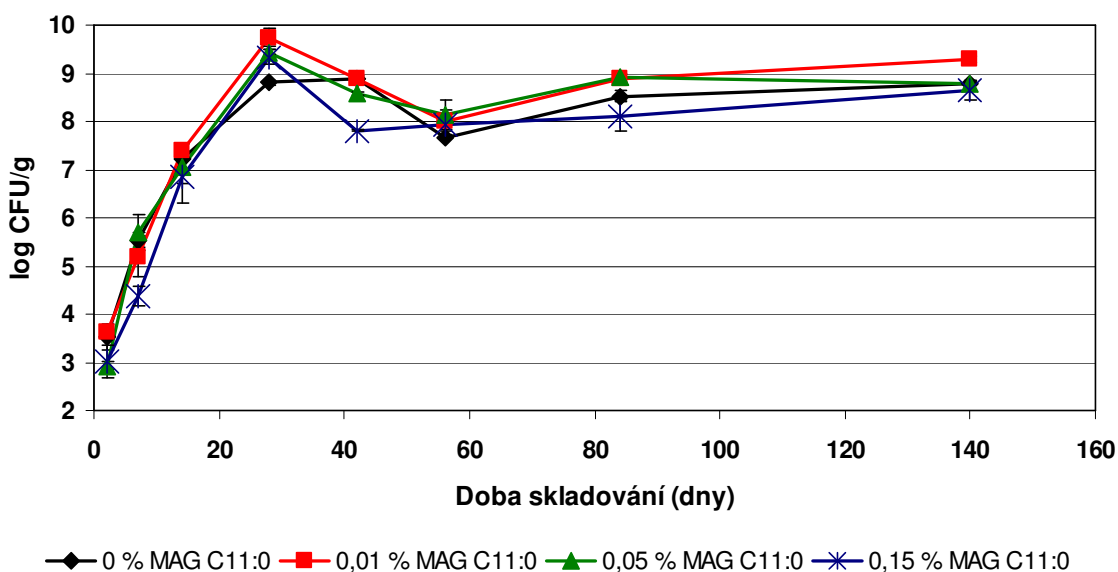


Obr. 6 Dynamika růstu *C. sporogenes* CAPM 6329 v modelových vzorcích tavených sýrů s různým obsahem TVS

## 6.2 Vliv monoacylglycerolů na růst bakterií rodu *Clostridium*

### 6.2.1 Účinek monoacylglycerolu kyseliny undekanové na růst *Clostridium butyricum* CAPM 6342

Dynamika růstu bakteriálního kmene *Clostridium butyricum* CAPM 6342 byla testována ve vzorcích tavených sýrů, do kterých byly při výrobě spolu s dalšími surovinami aplikovány antimikrobiální látky. Na Obr. 7 je znázorněna závislost hodnot log CFU/g na použitých koncentracích monoacylglycerolu obsahujícího ve své molekule lichý počet uhlíků. Jako v předchozím experimentu byly k mikrobiologickému rozboru použity vzorky, které byly skladovány po dobu 140 dnů. Odběry vzorků pro mikrobiologickou analýzu byly realizovány ve stejnou dobu (2., 7., 14., 28., 42., 56., 84. a 140. den) jako při sledování obsahu TVS na růst testovaných bakterií. Růst buněk *Clostridium butyricum* CAPM 6342 v prostředí s obsahem monoacylglycerolu kyseliny undekanové byl sledován v intervalu koncentrací 0,01 až 0,15 % (w/w). Významné negativní působení v přítomnosti 0,01 a 0,05 % (w/w) monoacylglycerolu kyseliny undekanové pozorováno nebylo. Od 28. dne skladování celkový nárůst bakteriálních buněk v prostředí s 0,01 a 0,05 % (w/w) MAG C<sub>11:0</sub> přesahoval nárůst bakteriálních buněk u vzorků tavených sýrů bez přítomných monoacylglycerolů.



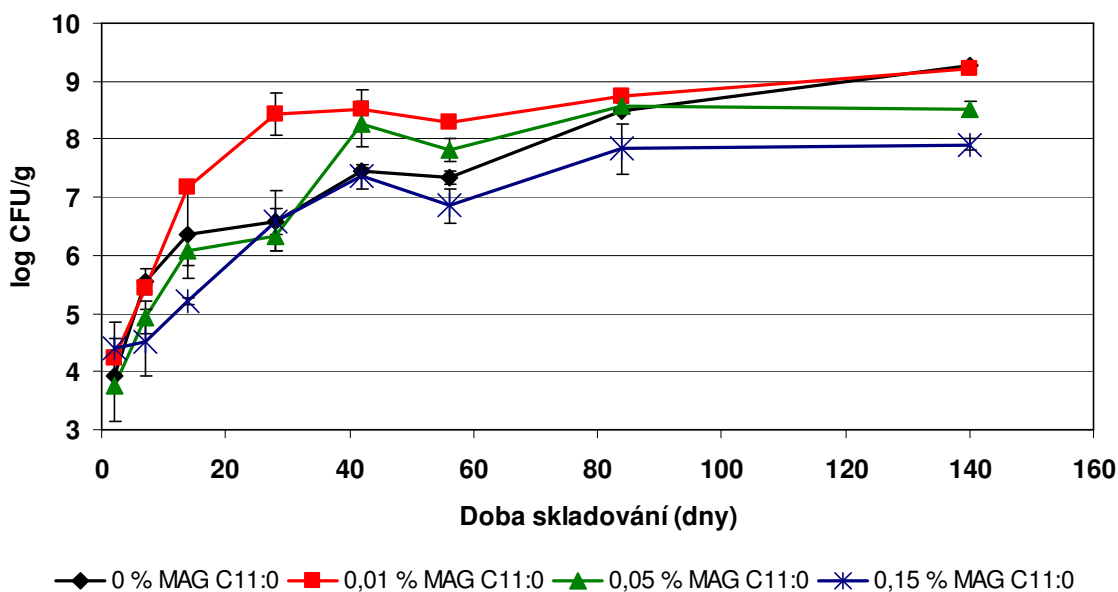
Obr. 7 Dynamika růstu *C. butyricum* v modelových vzorcích tavených sýrů v přítomnosti MAG C<sub>11:0</sub>



140. den skladování byl celkový počet mikroorganismů v přítomnosti 0,01 % (w/w) MAG C<sub>11:0</sub> o 0,5 řádu log CFU/g vyšší ve srovnání s kontrolním vzorkem (bez přítomnosti MAG C<sub>11:0</sub>). Při aplikaci 0,15 % (w/w) MAG C<sub>11:0</sub> byl pozorován o něco menší nárůst *C. butyricum* CAPM 6342, ale úplná inhibice růstu nenastala. 42. den skladování došlo k ustálení růstu bakteriálních buněk v přítomnosti 0,15 % MAG C<sub>11:0</sub>, poté se hodnoty zvyšovaly jen nepatrně.

### 6.2.2 Účinek monoacylglycerolu kyseliny undekanové na růst *Clostridium sporogenes* CAPM 6329

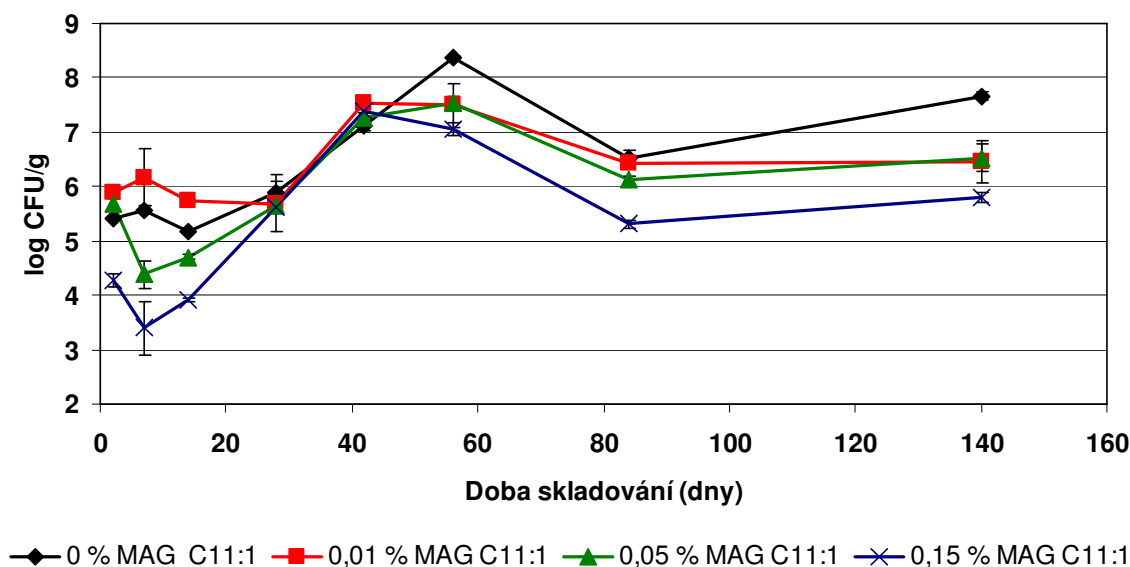
Podmínky uchování a skladování testovaných vzorků tavených sýrů byly i v případě sledování vlivu monoacylglycerolu kyseliny undekanové na růst bakteriálních buněk *Clostridium sporogenes* CAPM 6329 v souladu s předepsanou teplotou skladování pro tavené sýry. Rozmezí dnů, ve kterých byl růst sledován, bylo 2 – 140. Monoacylglycerol byl aplikován v koncentračním rozpětí 0,01 – 0,15 % (w/w).



Obr. 8 Dynamika růstu *C. sporogenes* v modelových vzorcích tavených sýrů v přítomnosti MAG C<sub>11:0</sub>

Z Obr. 8 je znatelné, že růstová křivka bakteriálních buněk v přítomnosti monoacylglycerolu kyseliny undekanové o nejnižší testované koncentraci 14. den skladování převyšuje nárůst bakteriálních buněk ve vzorcích bez přítomnosti monoacylglycerolu kyseliny undekanové, o více než 0,5 řádu log CFU/g. V průběhu dalšího skladování byl rozdíl mezi vyššími hodnotami počtu bakterií v přítomnosti 0,01 % (w/w) MAG C<sub>11:0</sub> a kontrolním vzorkem postupně snižován až do 140. dne skladování, kdy byly zjištěny nižší hodnoty celkového počtu mikroorganismů v přítomnosti 0,01 % (w/w) MAG C<sub>11:0</sub> než u kontrolního vzorku. V případě kultivace buněk v prostředí monoacylglycerolu kyseliny undekanové o nejvyšší testované koncentraci (0,15 % w/w) docházelo do 42. dne skladování k pozvolnému nárůstu bakteriálních buněk, přičemž hodnoty byly vždy nižší než v přítomnosti MAG o nižších koncentracích. Od 84. dne skladování se celkový počet buněk téměř neměnil. Hodnoty celkového počtu *C. sporogenes* CAPM 6329 byly poslední den skladování v přítomnosti 0,01 % (w/w) MAG C<sub>11:0</sub>  $9,22 \pm 0,04$  log CFU/g, v prostředí s nejvyšší testovanou koncentrací došlo ke snížení hodnot na  $7,91 \pm 0,11$  log CFU/g.

### 6.2.3 Účinek monoacylglycerolu kyseliny undecenové na růst *Clostridium butyricum* CAPM 6342

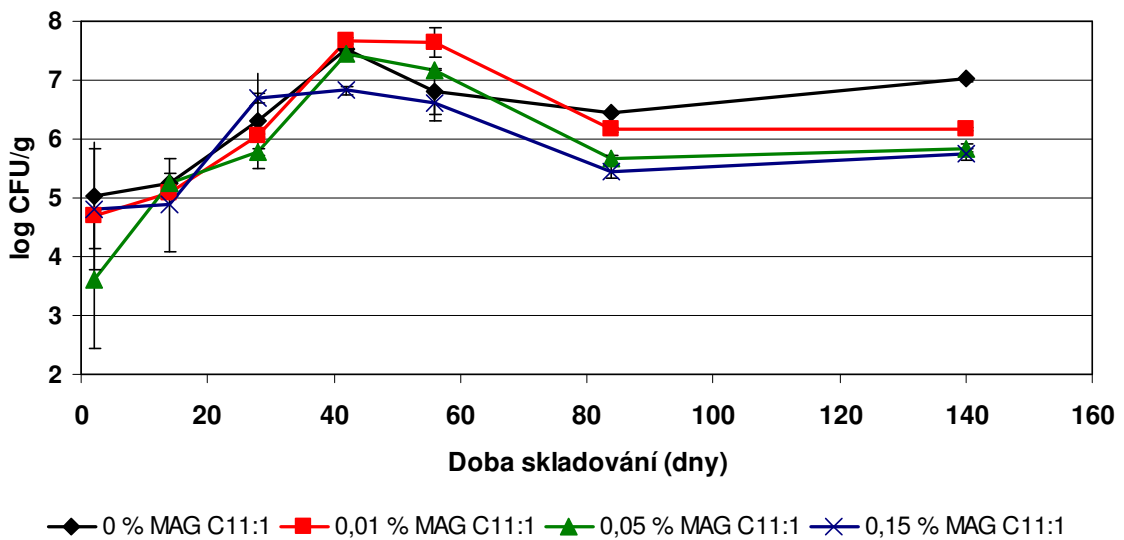


Obr. 9 Dynamika růstu *C. butyricum* v modelových vzorcích tavených sýrů v přítomnosti MAG C<sub>11:1</sub>

K ověření inhibičního účinku dalšího z monoacylglycerolů aplikovaných do reálných potravin byl vybrán monoacylglycerol nenasyčené mastné kyseliny s lichým počtem uhlíků. Jako pro dříve diskutované monoacylglyceroly byla zvolena stejná škála koncentrací (0,01 až 0,15 % w/w) k otestování inhibičního vlivu na růst *Clostridium butyricum* CAPM 6342 v modelových vzorcích tavených sýrů. Obecně lze konstatovat, že se zvyšující se koncentrací monoacylglycerolu kyseliny undecenové se snižovala intenzita růstu bakteriálního kmene (s výjimkou nejnižší testované koncentrace v počátečních dnech skladování). Jestliže byl do vzorků tavených sýrů aplikován MAG C<sub>11:1</sub> v koncentraci 0,01 % (w/w) byl nejvyšší nárůst bakteriálních buněk zaznamenán 42. den skladování (7,52 ± 0,08 log CFU/g), v dalších dnech již docházelo k redukcí celkového počtu mikroorganismů. Z Obr. 9 je patrné, že i v přítomnosti dalších testovaných koncentrací monoacylglycerolu docházelo k redukcí bakteriálních buněk po 42. dnu skladování. Úbytek počtu buněk *C. butyricum* CAPM 6342 mezi vzorkem s 0,15 % (w/w) MAG C<sub>11:1</sub> a kontrolním vzorkem 7. den skladování dosahoval 2,2 řádu log CFU/g, 140. den skladování dosahoval 1,9 řádu log CFU/g.

#### 6.2.4 Účinek monoacylglycerolu kyseliny undecenové na růst *Clostridium sporogenes* CAPM 6329

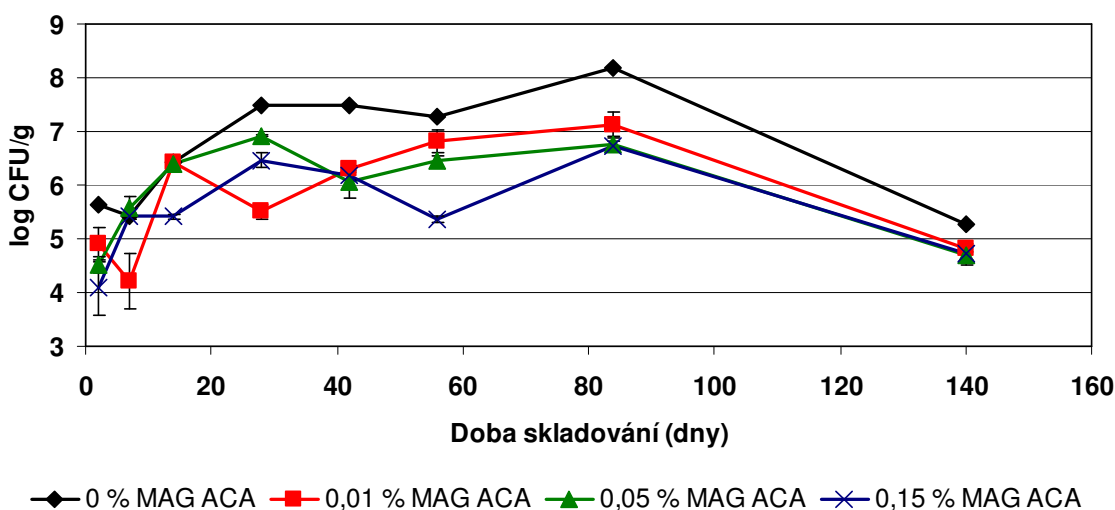
Účinek monoacylglycerolu kyseliny undecenové na růst sporotvorné grampozitivní bakterie *Clostridium sporogenes* CAPM 6329 v modelových vzorcích tavených sýrů byl testován za použití následujících koncentrací MAG: 0,01 % (w/w), 0,05 % (w/w) a 0,15 % (w/w), v pravidelných časových intervalech po dobu 140 dnů. Z obrázku 10 je zřejmé, že v prvních dnech skladování nedocházelo k významnému inhibičnímu účinku monoacylglycerolu kyseliny undecenové na růst testovaných bakterií. 42. a 56. den skladování byl pozorován intenzivnější růst buněk v prostředí s 0,01 a 0,05 % w/w MAG C<sub>11:1</sub> než v kontrolním vzorku bez MAG. V dalších skladovacích dnech vlivem MAG C<sub>11:1</sub> již docházelo k redukcí buněk *C. sporogenes* CAPM 6329. Výsledky jednoznačně ukazují, že pokud byly vzorky tavených sýrů skladovány 84 dnů, tak počet mikroorganismů klesal se zvyšující se koncentrací monoacylglycerolu. Poslední den skladování došlo v prostředí s 0,01 % (w/w) MAG C<sub>11:1</sub> k redukcí bakteriálních buněk o 0,9 řádu log CFU/g, v prostředí s 0,05 % (w/w) MAG C<sub>11:1</sub> byl sledován pokles buněk o 1,2 řádu log CFU/g a přítomností nejvyšší koncentrace MAG o 1,3 řádu log CFU/g v porovnání s kontrolním vzorkem.



Obr. 10 Dynamika růstu *C. sporogenes* v modelových vzorcích tavených sýrů v přítomnosti MAG C<sub>11:1</sub>

### 6.2.5 Účinek monoacylglycerolu kyseliny 1-adamantankarboxylové na růst *Clostridium butyricum* CAPM 6342

Posledním monoacylglycerolem, testovaným pro ověření antimikrobiální aktivity v rozdíratelných tavených sýrech, byl netradiční monoacylglycerol kyseliny 1- adamantankarboxylové. Antimikrobiální aktivita MAG ACA vůči růstu *Clostridium butyricum* CAPM 6342 v tavených sýrech byla testována 2., 7., 14., 28., 42., 56., 84. a 140. den skladování. Z růstových křivek (Obr. 11) je patrné, že antimikrobiální účinek MAG ACA v modelových vzorcích tavených sýrů nastal 28. den skladování, kdy hodnoty celkového počtu mikroorganismů v kontrolním vzorku byly  $7,49 \pm 0,01$  log CFU/g, v případě kultivace buněk klostridií v prostředí tavených sýrů s koncentrací MAG ACA 0,15 % (w/w) byly hodnoty nárůstu  $6,46 \pm 0,13$  log CFU/g.

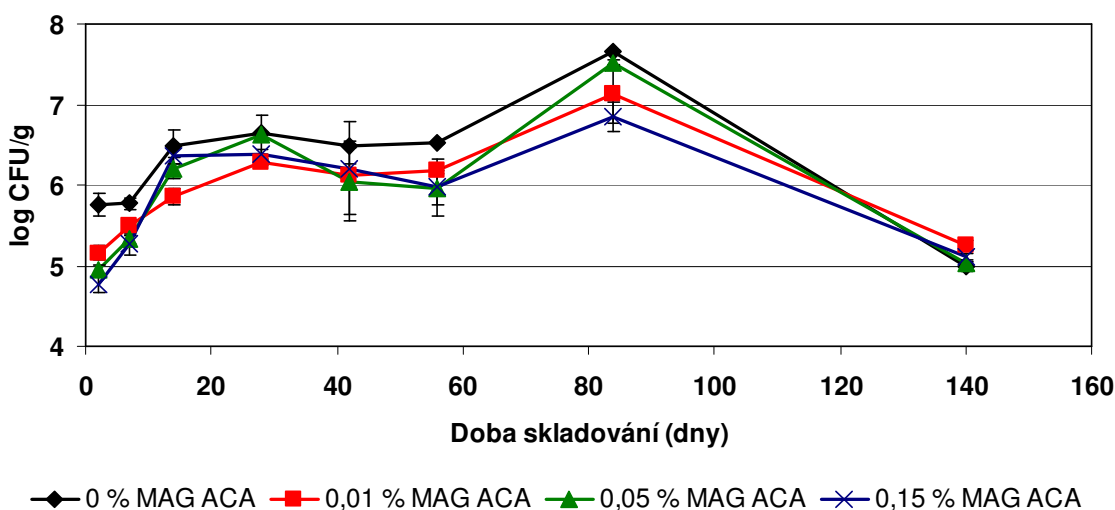


Obr.11 Dynamika růstu *C. butyricum* v modelových vzorcích tavených sýrů v přítomnosti MAG ACA

Největší úbytek bakterií rodu *Clostridium* působením 0,15 % (w/w) MAG ACA nastal 56. den skladování, a to o 1,9 řádu log CFU/g. Poslední den skladování byl pozorován nižší počet sporotvorných bakterií i u kontrolního vzorku taveného sýra, přesto byl účinek monoacylglycerolu znatelný, kdy v přítomnosti 0,15 % (w/w) MAG došlo v porovnání s kontrolním vzorkem k redukci o 0,5 řádu log CFU/g.

### 6.2.6 Účinek monoacylglycerolu kyseliny 1-adamantankarboxylové na růst *Clostridium sporogenes* CAPM 6329

Inhibiční efekt monoacylglycerolu kyseliny 1-adamantankarboxylové byl ověřován u bakteriálního kmene *Clostridium sporogenes* CAPM 6329 v modelových tavených sýrech, které byly skladovány po dobu 140 dnů. MAG ACA byl aplikován do tavených sýrů v koncentracích 0,01 až 0,15 % (w/w). Prvním rozborem prezentovaným na Obr. 12, který byl proveden již druhý den skladování, byly zjištěny počáteční hodnoty celkového počtu mikroorganismů, u kontrolního vzorku byly hodnoty nárůstu  $5,76 \pm 0,13$  log CFU/g, se zvyšující se koncentrací docházelo ke snižování hodnot, v prostředí s koncentrací MAG ACA 0,15 % (w/w) se celkový počet mikroorganismů snížil na hodnoty  $4,77 \pm 0,11$  log CFU/g.



Obr. 12 Dynamika růstu *C. sporogenes* v modelových vzorcích tavených sýrů v přítomnosti MAG ACA

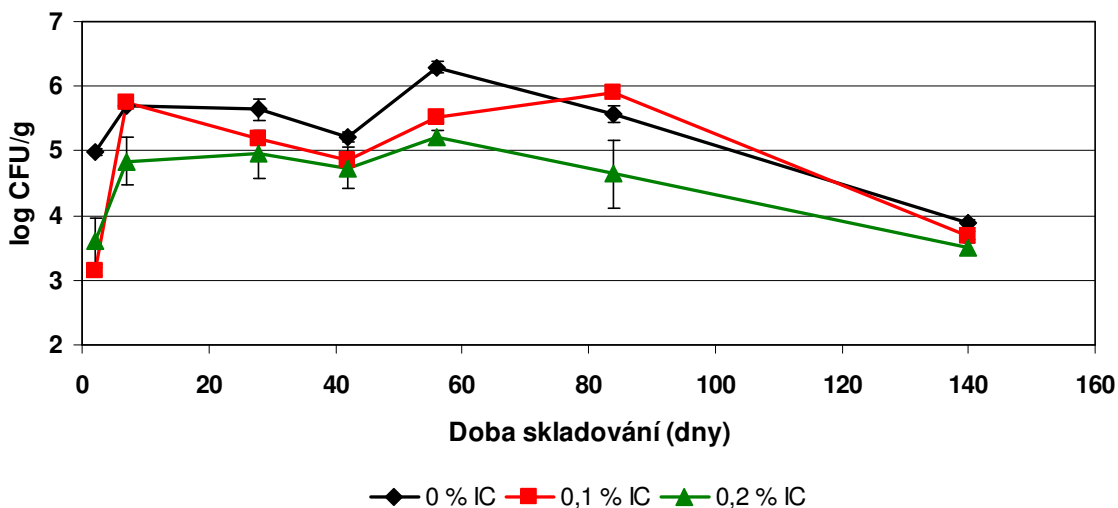
Podobný průběh růstu byl zaznamenán po celou dobu skladování tavených sýrů. Největší inhibiční účinek byl pozorovaný 84. den skladování působením 0,15 % (w/w) monoacylglycerolu kyseliny 1-adamantankarboxylové, redukcí bakteriálních buněk o 0,8 řádu log CFU/g. Poslední den skladování došlo k redukci bakteriálních buněk u všech vzorků.

### 6.3 Vliv karagenanů na růst bakterií rodu *Clostridium*

#### 6.3.1 Účinek ι-karagenanu na růst *Clostridium butyricum* CAPM 6342

Další látkou, aplikovanou do tavených sýrů za účelem potlačení růstu nežádoucích mikroorganismů, byl ι-karagenan (IC). Dynamika růstu bakteriálního kmene *Clostridium butyricum* CAPM 6342 byla sledována v matrici tavených sýrů skladovaných 140 dnů za použití ι-karagenanů v koncentracích 0,1 a 0,2 % (w/w). Z výsledků vyjádřených jako log CFU/g (Obr. 13) je patrné, že během 140 dnů skladování tavených sýrů docházelo k neustálému nárůstu počtu buněk bakteriálního kmene *C. butyricum* CAPM 6342. Se zvyšující se koncentrací ι-karagenanu byla pozorována tendence o něco nižšího růstu bakteriální populace. Velmi nízký inhibiční účinek testované látky dokazují i hodnoty log CFU/g poslední den skladování tavených sýrů kontaminovaných *C. butyricum* CAPM 6342, kdy v kontrolním

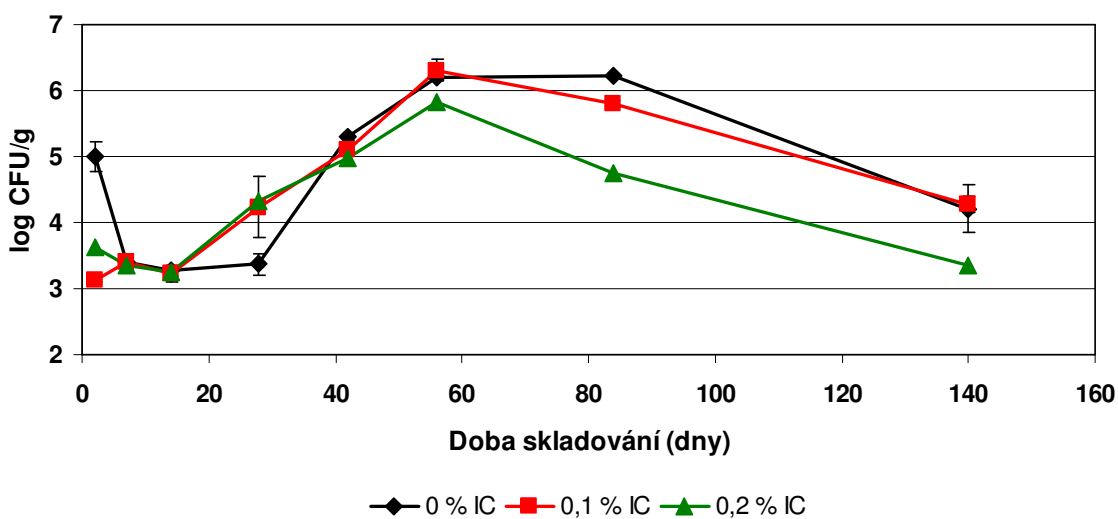
vzorku byly hodnoty růstu  $3,88 \pm 0,07$  log CFU/g, v přítomnosti 0,1 % (w/w) IC  $3,69 \pm 0,06$  log CFU/g a v přítomnosti 0,2 % (w/w) IC  $3,49 \pm 0,08$  log CFU/g.



Obr. 13 Dynamika růstu *C. butyricum* v modelových vzorcích tavených sýrů v přítomnosti ι-karagenanů

### 6.3.2 Účinek ι-karagenanu na růst *Clostridium sporogenes* CAPM 6329

Pro srovnání účinku ι-karagenanu aplikovaného do tavených sýrů s 50 % TVS vůči ovlivnění růstu bakterií rodu *Clostridium*, byl jako druhý testovaný kmen zvolen *Clostridium sporogenes* CAPM 6329. Iota-karagenan o koncentraci 0,1 % neměl téměř žádný vliv na růst sledované bakterie, po celou dobu skladování tavených sýrů měla růstová křivka s nejnižším aplikovaným množstvím iota-karagenanu velmi podobný průběh jako růstová křivka bez přítomnosti karagenanů. Poněkud odlišný charakter růstu bakteriálního kmene *Clostridium sporogenes* CAPM 6329 byl pozorován v přítomnosti 0,2 % IC. Jak je patrné z grafu na obrázku 14, působením 0,2 % IC byl zaznamenán 56. dnem skladování nižší nárůst bakteriálních buněk. Rozdíl v účinnosti 0,2 % IC byl dále znatelný 84. a 140. den skladování. 140. den skladování došlo k redukci bakterií o 0,9 řádu log CFU/g. Naopak v počátečních dnech skladování nebyl pozorován žádný znatelný rozdíl mezi vzorky kontrolními a s přísadkou IC.



Obr. 14 Dynamika růstu *C. sporogenes* v modelových vzorcích tavených sýrů v přítomnosti  $\kappa$ -karagenanů

#### 6.4 Hodnoty pH tavených sýrů o různém obsahu tuku v sušině

Vedle mikrobiologického rozboru byly v modelových vzorcích tavených sýrů měřeny hodnoty aktivní kyselosti. Hodnoty pH byly měřeny s odstupem 2, 7, 14, 28, 42, 56, 84 a 140 dnů.

Tab. 1 Hodnoty pH tavených sýrů o různém obsahu TVS kontaminovaných *C. butyricum*

Doba skladování (dny)	pH		
	TVS (% w/w)		
	50	40	30
2	6,00 ± 0,00	5,92 ± 0,00	5,83 ± 0,07
7	6,13 ± 0,02	6,06 ± 0,01	5,90 ± 0,03
14	6,12 ± 0,01	6,07 ± 0,01	5,90 ± 0,01
28	6,12 ± 0,02	6,06 ± 0,00	5,90 ± 0,02
42	6,03 ± 0,01	5,97 ± 0,01	5,82 ± 0,01
56	6,06 ± 0,01	6,01 ± 0,01	5,84 ± 0,02
84	6,07 ± 0,03	6,01 ± 0,03	5,83 ± 0,02
140	6,04 ± 0,01	5,99 ± 0,02	5,81 ± 0,01



Výsledky, které uvádí Tab. 1, poukazují na skutečnost, že s klesajícím obsahem tuku v sušině tavených sýrů klesala i hodnota pH. V modelových vzorcích tavených sýrů s 50 % (w/w) TVS se pH hodnoty pohybovaly v intervalu 6,00 až 6,13 v závislosti na době skladování. Rozmezí hodnot pH tavených sýrů se 40% (w/w) TVS bylo 5,92 až 6,06. Přítomností 30 % (w/w) TVS byly pH hodnoty tavených sýrů naměřeny v rozpětí 5,81 až 5,90, přičemž nejnižší pH bylo naměřeno druhý den skladování. Zjištěné hodnoty pH vyhovují vnějším podmínkám pro růst klostridií.

### 6.5 Hodnoty pH tavených sýrů v přítomnosti monoacylglycerolů

Během 140 dnů, po kterých byly modelové vzorky tavených sýrů s přítomností monoacylglycerolu kyseliny undekanové, undecenové a 1-adamantankarboxylové (příloha P V III) skladovány v chladírenských podmínkách, byly kontrolovány pH hodnoty.

Tab. 2 Hodnoty pH tavených sýrů s přidavkem MAG C<sub>11:0</sub> kontaminovaných *C. butyricum*

Doba skladování (dny)	pH			
	MAG C <sub>11:0</sub> (% w/w)			
	0,01	0,05	0,15	0 (kontrola)
2	6,29 ± 0,01	6,30 ± 0,01	6,27 ± 0,00	6,27 ± 0,00
7	6,22 ± 0,01	6,25 ± 0,01	6,21 ± 0,02	6,22 ± 0,01
14	6,21 ± 0,01	6,24 ± 0,01	6,21 ± 0,01	6,22 ± 0,01
28	6,19 ± 0,01	6,20 ± 0,01	6,18 ± 0,00	6,21 ± 0,01
42	6,15 ± 0,02	6,18 ± 0,01	6,16 ± 0,01	6,17 ± 0,01
56	6,24 ± 0,01	6,26 ± 0,00	6,25 ± 0,01	6,25 ± 0,00
84	6,24 ± 0,01	6,24 ± 0,00	6,29 ± 0,01	6,23 ± 0,00
140	6,24 ± 0,01	6,26 ± 0,01	6,34 ± 0,01	6,33 ± 0,01

Zjištěné výsledky, ukazují, že hodnoty pH neklesly ani nevzrostly na hodnoty, které by negativním způsobem ovlivňovaly růst mikroorganismů. pH hodnoty se neměnily ani v důsledku různých koncentrací inhibičních látek, potvrzují to výsledky uvedené v Tab. 2. Pro příklad je možno uvést rozpětí pH hodnot v modelových vzorcích tavených

sýrů s aplikací MAG C<sub>11:0</sub> o nejnižší testované koncentraci 6,19 – 6,29 a hodnoty pH v koncentraci 0,15 % MAG C<sub>11:0</sub> 6,16 – 6,29.

## 6.6 Hodnoty pH tavených sýrů v přítomnosti karagenanů

V modelových vzorcích tavených sýrů s aplikací 0,1 a 0,2 % (w/w) ι-karagenanů byly jako v předchozích experimentech kontrolovány pH hodnoty po celou dobu skladování. Opět byl shledán podobný závěr jako ve výše uvedené problematice. Testované hydrokoloidy neovlivňovaly pH hodnoty testovaných tavených sýrů. Zjištěné hodnoty, které jsou prezentované v Tab. 3 jsou ideální pro růst bakterií rodu *Clostridium*.

Tab. 3 Hodnoty pH tavených sýrů s přidavkem ι-karagenanů kontaminovaných *C. butyricum*

Doba skladování (dny)	pH		
	ι-karagenan (% w/w)		
	0,1	0,2	0 (kontrola)
2	6,27 ± 0,02	6,21 ± 0,01	6,24 ± 0,00
7	6,19 ± 0,00	6,14 ± 0,00	6,18 ± 0,01
14	6,28 ± 0,02	6,22 ± 0,01	6,22 ± 0,00
28	6,19 ± 0,02	6,13 ± 0,01	6,16 ± 0,00
42	6,29 ± 0,00	6,23 ± 0,02	6,24 ± 0,00
56	6,29 ± 0,01	6,23 ± 0,01	6,23 ± 0,01
84	6,29 ± 0,01	6,23 ± 0,01	6,23 ± 0,01
140	6,35 ± 0,00	6,30 ± 0,01	6,28 ± 0,01

## 6.7 Vodní aktivita modelových tavených sýrů

V modelových vzorcích tavených sýrů byly 30. a 88. den skladování změřeny hodnoty vodní aktivity. Z výsledků prezentovaných v tabulce 4 je možné konstatovat, že se zvyšující se dobou skladování docházelo v tavených sýrech s aplikací monoacylglycerolů k mírnému nárůstu hodnot aktivity vody. U vzorků s 0,1 % (w/w) ι-karagenanu nedošlo během 30. a 88. dne skladování ke změně  $a_w$ , vyšší koncentrace ι-karagenanu způsobily

pokles  $a_w$ . Je nutné však podotknout, že zaznamenané rozdíly se řádově pohybovaly v setinách až tisícinách.

Tab. 4 Hodnoty vodní aktivity modelových tavených sýrů

vzorky tavených sýrů	$a_w$	
	30. den skladování	88. den skladování
30 % TVS	0,965	0,969
40 % TVS	0,967	0,974
50 % TVS	0,971	0,977
0,01 % MAG C <sub>11:0</sub>	0,971	0,976
0,05 % MAG C <sub>11:0</sub>	0,969	0,975
0,15 % MAG C <sub>11:0</sub>	0,969	0,974
0,01 % MAG C <sub>11:1</sub>	0,970	0,974
0,05 % MAG C <sub>11:1</sub>	0,968	0,974
0,15 % MAG C <sub>11:1</sub>	0,967	0,975
0,01 % MAG C <sub>12:0</sub>	0,968	0,974
0,05 % MAG C <sub>12:0</sub>	0,968	0,975
0,15 % MAG C <sub>12:0</sub>	0,968	0,974
0,01 % MAG ACA	0,966	0,974
0,05 % MAG ACA	0,967	0,974
0,15 % MAG ACA	0,967	0,974
0,1 % IC	0,971	0,971
0,2 % IC	0,971	0,967

## 6.8 Výsledky senzorické analýzy modelových tavených sýrů

Senzorická analýza modelových vzorků tavených sýrů s přidavkem monoacylglycerolů a karagenanů byla posuzována 49. den skladování. Pro posouzení jednotlivých znaků (vzhled a barva, lesk, konzistence, chuť a vůně, celkové hodnocení) bylo použito senzorické hodnocení pomocí sedmibodové stupnice (stupnice pro senzorické hodnocení modelových vzorků tavených sýrů je uvedena v příloze P IX). Čím je uvedený stupeň nižší, tím je senzorický znak lépe hodnocený. Dále jsou uvedeny výsledky pořadového preferenčního

testu. V první sérii bylo provedeno senzoričké hodnocení modelových vzorků tavených sýrů s přidavkem 0,01 % (w/w) MAG C<sub>11:0</sub>; 0,05 % (w/w) MAG C<sub>11:0</sub>; 0,15 % (w/w) MAG C<sub>11:0</sub>; 0,05 % (w/w) MAG C<sub>12:0</sub>; 0,15 % (w/w) MAG C<sub>12:0</sub>. Získané výsledky jsou vyjádřeny jako mediány v Tab. 5.

Tab. 5 Výsledky senzoričké analýzy první série tavených sýrů

Tavený sýr	Znak				
	Vzhled a barva	Lesk	Konzistence	Chuť a vůně	Celkové hodnocení
0 % MAG (kontrola)	4 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	4 <sup>a,b</sup>
0,01% MAG C <sub>11:0</sub>	2 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	3 <sup>a,b</sup>	3 <sup>a</sup>
0,05 % MAG C <sub>11:0</sub>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	4 <sup>a,b</sup>	4 <sup>a,b</sup>
0,15 % MAG C <sub>11:0</sub>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	6 <sup>c</sup>	5 <sup>b</sup>
0,05 % MAG C <sub>12:0</sub>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	3 <sup>a,b</sup>	3 <sup>a,b</sup>
0,15 % MAG C <sub>12:0</sub>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	5 <sup>b,c</sup>	4 <sup>a,b</sup>

*Poznámka:* Horní indexy značí statisticky významné rozdíly mezi hodnotami v rámci jednoho sledovaného znaku ( $P < 0,05$ ). Mezi vzorky nebyl shledán statisticky významný rozdíl, jestliže je alespoň jedno z písmen shodné.

Při statistickém hodnocení vzhledu a barvy modelových vzorků tavených sýrů pomocí Kruskal-Wallisova testu nebyl na hladině významnosti 5 % shledán mezi vzorky významný rozdíl. Ve sledovaném znaku chuť a vůně byl mezi jednotlivými vzorky tavených sýrů shledán na téže hladině významnosti statisticky významný rozdíl. Signifikantní rozdíly byly detekovány mezi vzorky tavených sýrů obsahující 0 % (w/w) MAG a 0,15 % (w/w) MAG C<sub>11:0</sub>; 0,01% (w/w) MAG C<sub>11:0</sub> a 0,15 % MAG C<sub>11:0</sub>; 0,05 % MAG C<sub>11:0</sub> a 0,15 % MAG C<sub>11:0</sub>; 0,05 % MAG C<sub>12:0</sub> a 0,15 % (w/w) MAG C<sub>11:0</sub>; 0 % (w/w) MAG a 0,15 % (w/w) MAG C<sub>12:0</sub>. Za vzorek s nejlepší chutí a vůní označili posuzovatelé kontrolní vzorek bez přítomnosti MAG, poté tavený sýr s 0,01% (w/w) MAG C<sub>11:0</sub>, 0,05 % (w/w) MAG C<sub>12:0</sub>, 0,05 % (w/w) MAG C<sub>11:0</sub>, 0,15 % (w/w) MAG C<sub>12:0</sub> a jako nejhorší byl vyhodnocen tavený sýr s aplikací 0,15 % (w/w) MAG C<sub>11:0</sub>.

K seřazení šesti vzorků tavených sýrů dle preferencí byla použita pořadová zkouška s následným statistickým vyhodnocením pomocí Friedmanova testu. Opět byly s 95 % pravděpodobností shledány statisticky významné rozdíly v preferencích jednotlivých vzorků. Preference jednotlivých vzorků klesaly v pořadí: 0,01% (w/w) MAG C<sub>11:0</sub>, 0 % (w/w) MAG, 0,05 % (w/w) MAG C<sub>12:0</sub>, 0,05 % (w/w) MAG C<sub>11:0</sub>, 0,15 % (w/w) MAG C<sub>12:0</sub>, 0,15 % (w/w) MAG C<sub>11:0</sub>. Statisticky významné rozdíly byly shledány mezi dvěma dvojicemi vzorků: 0 % (w/w) MAG a 0,15 % (w/w) MAG C<sub>11:0</sub>, 0,01% (w/w) MAG C<sub>11:0</sub> a 0,15 % (w/w) MAG C<sub>11:0</sub>.

Senzorická analýza druhé série modelových tavených sýrů zahrnovala vzorky s aplikací 0,05 a 0,15 % (w/w) monoacylglycerolu kyseliny undecenové a 0,05 a 0,15 % (w/w) monoacylglycerolu kyseliny 1-adamantankarboxylové, dále dva vzorky s přidavkem ι-karagenanu o koncentraci 0,1 a 0,2 (w/w). Výsledky sensorického hodnocení pomocí stupnic jsou znázorněny tabulkou 6 v podobě mediánů.

Tab. 6 Výsledky sensorické analýzy druhé série tavených sýrů

Tavený sýr	Znak				
	Vzhled a barva	Lesk	Konzistence	Chuť a vůně	Celkové hodnocení
0 % MAG (kontrola)	3 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a,c</sup>
0,1 % ι-karagenan	3 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	3 <sup>a,b,c</sup>
0,2 % ι-karagenan	3 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	3 <sup>c</sup>
0,05 % MAG C <sub>11:1</sub>	4 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	4 <sup>a,b</sup>	4 <sup>a,b,c,d</sup>
0,15 % MAG C <sub>11:1</sub>	5 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	6 <sup>b</sup>	5 <sup>b,d</sup>
0,05 % MAG ACA	4 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	4 <sup>a,b</sup>	4 <sup>a,b,d</sup>
0,15 % MAG ACA	5 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	6 <sup>b</sup>	6 <sup>d</sup>

*Poznámka:* Horní indexy značí statisticky významné rozdíly mezi hodnotami v rámci jednoho sledovaného znaku ( $P < 0,05$ ). Mezi vzorky nebyl shledán statisticky významný rozdíl, jestliže je alespoň jedno z písmen shodné.

Pro posouzení jednotlivých znaků byla zvolena sedmibodová stupnice, přičemž stupeň 1 zpravidla představuje nejvyšší možné hodnocení.

Kruskall-Wallisovým testem bylo potvrzeno, že tavené sýry s různým přídatkem aditivních látek se v chuti a vůni významně liší ( $P < 0,05$ ). Tavený sýr s přídatkem 0,2 %  $\iota$ -karagenanu byl označen za nejlepší, dále následovaly sýry s 0 % (w/w) MAG (kontrola), 0,1 % (w/w)  $\iota$ -karagenan, 0,05 % (w/w) MAG C<sub>11:1</sub>, 0,05 % (w/w) MAG ACA, 0,15 % (w/w) MAG C<sub>11:1</sub>, nejhorším taveným sýrem v chuti a vůni byl určen vzorek s přídatkem 0,15 % (w/w) MAG ACA. Pomocí výsledků lze konstatovat, že byly detekovány rozdíly ( $P < 0,05$ ) mezi výrobky 0 % (w/w) MAG a 0,15 % (w/w) MAG C<sub>11:1</sub>, 0,1 % (w/w)  $\iota$ -karagenan a 0,15 % (w/w) MAG C<sub>11:1</sub>, 0,2 % (w/w)  $\iota$ -karagenan a 0,15 % (w/w) MAG C<sub>11:1</sub>, dále mezi 0 % (w/w) MAG a 0,15 % (w/w) MAG ACA, 0,1 % (w/w)  $\iota$ -karagenan a 0,15 % (w/w) MAG ACA, 0,2 % (w/w)  $\iota$ -karagenan a 0,15 % (w/w) MAG ACA.

Na základě Friedmanova testu byla na 5 % hladině významnosti potvrzena existence statisticky významného rozdílu v jednotlivých preferencích mezi vzorky tavených sýrů jako celkem. Preference jednotlivých vzorků tavených sýrů klesaly v pořadí: 0,2 % (w/w)  $\iota$ -karagenan, 0 % (w/w) MAG, 0,1 % (w/w)  $\iota$ -karagenan, 0,05 % (w/w) MAG C<sub>11:1</sub>, 0,05 % (w/w) MAG ACA, 0,15 % (w/w) MAG C<sub>11:1</sub>, 0,15 % (w/w) MAG ACA. Prokazatelné rozdíly byly shledány mezi následujícími předloženými vzorky tavených sýrů: 0,2 % (w/w)  $\iota$ -karagenan a 0,05 % (w/w) MAG C<sub>11:1</sub>, 0 % (w/w) MAG a 0,15 % (w/w) MAG C<sub>11:1</sub>, 0,2 % (w/w)  $\iota$ -karagenan a 0,15 % (w/w) MAG C<sub>11:1</sub>, 0 % (w/w) MAG a 0,05 % (w/w) MAG ACA, 0,2 % (w/w)  $\iota$ -karagenan a 0,05 % (w/w) MAG ACA, 0 % (w/w) MAG a 0,15 % (w/w) MAG ACA, 0,1 % (w/w)  $\iota$ -karagenan a 0,15 % (w/w) MAG ACA, 0,2 % (w/w)  $\iota$ -karagenan a 0,15 % (w/w) MAG ACA.

## 7 DISKUZE

Zdravotní nezávadnost tavených sýrových výrobků je zajištěna fyzikálním procesem v podobě tepelného ošetření. Běžné tavené sýry, na které je zvyklý náš konzument, podléhají při výrobě tepelnému ošetření do 100 °C. Výše teploty ani pH prostředí nezajistí usmrcení bakterií se schopností tvorby spor, proto bakterie rodu *Clostridium* patří mezi časté kontaminanty tavených sýrů. Jejich eliminace tedy není zajištěna tepelným ošetřením, a proto je nutné jim věnovat velkou pozornost. Možnou ochranou před nežádoucí mikroflórou je aplikace acylglycerolů, které mají antimikrobiální účinek. Navíc by se mohl uplatnit i jejich emulgační účinek při samotném technologickém zpracování.

Podstatou práce bylo ověřit antimikrobiální aktivitu vybraných acylglycerolů s různým počtem uhlíků v esterově navázané mastné kyselině proti růstu bakterií rodu *Clostridium*. Vzhledem k době použitelnosti tavených sýrů byl účinek sledován několik měsíců. Dále byl ověřován růst klostridií v závislosti na různém obsahu TVS a také v přítomnosti látky hydrokoloidní povahy. Přídavek hydrokoloidů do potravin je mezi odborníky v poslední době velmi diskutovanou oblastí.

Z dostupné literatury vyplývá, že mezi acylglyceroly vykazující inhibiční účinek proti růstu bakterií s buněčnou stěnou grampozitivního typu patří monoacylglyceroly, jejichž mastná kyselina má středně dlouhý uhlíkový řetězec [69]. Podobně Issacs et al. [81] publikovali, že mastné kyseliny a jejich monoacylglyceroly, které obsahují 8 až 12 atomů uhlíků, mají v porovnání s mastnými kyselinami a monoacylglyceroly s delšími uhlíkovými řetězci vyšší inhibiční aktivitu.

Většina studií zaměřených na inhibiční účinky monoacylglycerolů vůči růstu bakterií, kvasinek i plísní se zabývá monoacylglyceroly, které obsahují ve své substanci nasycené mastné kyseliny se sudým počtem atomu uhlíků. Námi vybrané monoacylglyceroly obsahovaly nefyziologickou mastnou kyselinu s jedenácti atomy uhlíku. Pro ověření vlivu přítomnosti dvojně vazby, byli použity monoacylglyceroly o stejném počtu uhlíku lišící se přítomností dvojně vazby (MAG C<sub>11:0</sub> a MAG C<sub>11:1</sub>). Použité monoacylglyceroly byly vyrobené na Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky Fakulty technologické UTB ve Zlíně.

Antimikrobiální účinek monoacylglycerolu kyseliny undekanové v podmínkách *in vitro* zveřejnili Bartošová et al. [82]. Ze studie vyplývá, že inhibiční koncentrace MAG C<sub>11:0</sub>, která způsobuje zastavení růstu *Bacillus subtilis* DMF 2006 byla 50 mg/l. Vyšší koncentra-

ce potlačily spory. Inhibiční účinek MAG C<sub>11:0</sub> vůči růstu *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus* a *Bacillus subtilis* potvrdila ve své práci i Buňková [83].

Pokud byl do modelových vzorků tavených sýrů aplikován monoacylglycerol kyseliny undekanové docházelo k nárůstu bakteriálních buněk *Clostridium butyricum* CAPM 6342 i *Clostridium sporogenes* CAPM 6342 po celou dobu skladování. Úplná inhibice růstu nenastala. Přítomnost monoacylglycerolu kyseliny undekanové o nejvyšší testované koncentraci (0,15 % w/w) v taveném sýru způsobila 56. a 84. den skladování redukci růstu kmene *C. sporogenes* CAPM 6329 o více než 0,5 řádu log CFU/g, 140. den skladování byl růst bakteriální populace dokonce snížen o 1,4 řádu log CFU/g. V počátečních dnech skladování docházelo v přítomnosti MAG C<sub>11:0</sub> o koncentraci 0,01 a 0,05 % (w/w) ke zvýšené intenzitě nárůstu buněk *C. butyricum* CAPM 6342 i *C. sporogenes* CAPM 6329 oproti růstu buněk kultivovaných v prostředí bez přítomnosti MAG. Podle Altieri et al. [83] může být zvýšený nárůst bakteriálních buněk v přítomnosti MAG způsoben v důsledku zvýšení permeability cytoplazmatické membrány a následné rychlejší výměny látek a živin bakteriální buňkou s okolním prostředím.

Ani aplikace monoacylglycerolu kyseliny undecenové neměla výrazné inhibiční účinky vůči růstu *Clostridium butyricum* CAPM 6342 a *Clostridium sporogenes* CAPM 6329 ve vzorcích tavených sýrů s 50 % (w/w) TVS skladovaných v chladírenských podmínkách po dobu 140 dní. Během chladírenského skladování vzorků s přídavkem 0,15 % (w/w) MAG C<sub>11:1</sub> docházelo k významnému úbytku bakteriálních buněk *C. butyricum* CAPM 6342 a *C. sporogenes* CAPM 6329, přičemž největší snížení růstu v porovnání s kontrolním vzorkem bylo pozorováno 140. den skladování nejvyšší testovanou koncentrací MAG C<sub>11:1</sub> u buněk *C. butyricum* CAPM 6342 (o 1,9 řádu log CFU/g). I v případě účinku MAG C<sub>11:1</sub> na růst *C. sporogenes* CAPM 6329 došlo k redukci bakteriálních buněk o 1,3 řádu log CFU/g.

Ve vzorcích tavených sýrů s 0,15 % (w/w) MAG C<sub>11:1</sub> docházelo k větší redukci bakteriálních buněk dvou kmenů rodu *Clostridium* v porovnání s redukcí bakterií ve vzorcích tavených sýrů s aplikací 0,15 % (w/w) MAG C<sub>11:0</sub>.



Nižší inhibiční účinek MAG C<sub>11:0</sub> a MAG C<sub>11:1</sub> na růst bakterií rodu *Clostridium* v modelových vzorků tavených sýrů může být způsoben jejich interakcí s ostatními látkami, které jsou jejich nepostradatelnou součástí.

Předložená práce dále popisuje dynamiku růstu bakterií rodu *Clostridium* v modelových vzorcích tavených sýrů s přísadkou MAG obsahující organickou kyselinu s adamantanovým skeletem. Deriváty adamantanu jsou známé svou antivirovou [83] a antibakteriální aktivitou [85], [86]. Diskutované výsledky potvrzují antibakteriální aktivitu MAG ACA ve vzorcích tavených sýrů pouze 56. a 84. den skladování. Ze třech testovaných monoacylglycerolů byl antibakteriální účinek MAG ACA ve vzorcích tavených sýrů nejnižší.

Při aplikaci karagenanů o koncentraci 0,1 a 0,2 % (w/w) do tavených sýrů nebyla během 140 dnů skladování pozorována výrazná změna dynamiky růstu *Clostridium butyricum* CAPM 6342. Poněkud odlišný charakter růstu kmene *Clostridium sporogenes* CAPM 6329 nastal působením 0,2 % iota-karagenanu, kdy docházelo k redukci růstu tohoto kmene.

Výsledky experimentální části zaměřené na sledování vlivu různého obsahu tuku v sušině na dynamiku růstu bakteriální populace lze obecně shrnout do konstatování, že se snižujícím se obsahem tuku v sušině tavených sýrů klesal nárůst bakterií *Clostridium sporogenes* CAPM 6329.

Přídavek monoacylglycerolů ani karagenanů neměl výrazný vliv na pH hodnoty modelových vzorků tavených sýrů. Rovněž Nair et al. [87] nezaznamenali přísadkou monoacylglycerolu kyseliny kaprylové do mléka změny pH hodnot, kdežto aplikací kyseliny kaprylové došlo ke snížení pH mléka (z 6,6 na 5,6).

Vodní aktivita tavených sýrů v přítomnosti monoacylglycerolů byla v souladu s hodnotami, které jsou uváděny dostupnou literaturou. 30. den skladování se hodnoty pohybovaly v rozmezí 0,965 až 0,971. 88. den skladování se hodnoty nepatrně zvýšily. Pouze u vzorků s 0,2 % iota-karagenanů byl pozorován mírný pokles. Zjištěné hodnoty vyhovovaly růstu bakterií.

Poslední část diplomové práce byla zaměřena na senzoričnou analýzu modelových vzorků tavených sýrů s 50 % (w/w) TVS, do kterých byly aplikovány přídatné látky. Na možný problém způsobený omezenou požitelností při aplikaci monoacylglycerolu kyseliny kaprylové do mléka upozornili i Nair et al [87]. První série vzorků určených k senzoričkému

hodnocení obsahovala přídavek monoacylglycerolu kyseliny undekanové a laurové. Výsledky poukazují na zhoršenou chuť a vůni tavených sýrů s přídavkem monoacylglycerolů ve vyšších koncentracích. Při porovnání přídavku monoacylglycerolu kyseliny laurové a undekanové, lze říci, že tavený sýr s přídavkem kyseliny laurové byl posuzovateli hodnocen lépe. Za naprosto nevyhovující byl označen tavený sýr s přídavkem 0,15 % monoacylglycerolu kyseliny undekanové. Naopak sýry s nízkou koncentrací monoacylglycerolu kyseliny undekanové se staly nejvíce preferovanými vzorky. Ve druhé sérii vzorků tavených sýrů určených k sensorickému posouzení byly zařazeny tavené sýry s přídavkem karagenanů, monoacylglycerolu kyseliny undecenové a monoacylglycerolu kyseliny 1- adamantan- karboxylové. Opět se zvyšující se koncentrací monoacylglycerolů se zhoršoval stupeň jejich preferencí. Tavené sýry s aplikací 0,05 % (w/w) MAG C<sub>11:1</sub> a MAG ACA byly hodnotiteli ve sledovaném znaku chuti a vůně označeny jako dobré, sýry s vyššími testovanými koncentracemi byly hodnoceny jako nevyhovující. Pomocí pořadového preferenčního testu byl jako nejhorší vzorek označen tavený sýr s přítomností 0,15 % (w/w) MAG ACA. Ostatní sledované znaky (vzhled a barva, lesk, konzistence) nebyly statisticky významným způsobem ( $P < 0,05$ ) ovlivněny v přítomnosti monoacylglycerolů.

Přítomnost karagenanů neměla negativní vliv na sensorické hodnocení tavených sýrů, naopak tavený sýr s aplikací 0,2 % (w/w) iota-karagenanu byl ve sledovaném znaku chuti a vůni ohodnocen jako nejlepší vzorek. Výsledek byl potvrzen i pořadovým preferenčním testem.

## ZÁVĚR

Předložená práce je zaměřena na aplikaci vybraných monoacylglycerolů jako antimikrobiálních látek do tavených sýrů. Pro ověření antimikrobiální aktivity byly vybrány zástupci bakterií se schopností tvorby spor. Na základě získaných výsledků lze konstatovat následující tvrzení:

- v počátečních dnech skladování nedocházelo k významné redukci růstu bakterií rodu *Clostridium* v modelových vzorcích tavených sýrů s 50 % (w/w) TVS v přítomnosti vybraných monoacylglycerolů,
- se snižujícím se obsahem tuku v sušině docházelo u vzorků tavených sýrů k nižšímu nárůstu bakteriálních buněk rodu *Clostridium*,
- ve vzorcích tavených sýrů s 0,01 % (w/w) monoacylglycerolu nedocházelo k významnému potlačení růstu bakteriální populace,
- antimikrobiální účinek vybraných MAG vůči bakteriím rodu *Clostridium* klesal v pořadí: MAG C<sub>11:1</sub> > MAG C<sub>11:0</sub> > MAG ACA,
- nejvyšší snížení růstu bakterií ve vzorcích tavených sýrů bylo pozorováno v přítomnosti 0,15 % (w/w) monoacylglycerolu kyseliny undecenové 7. a 140. den skladování u *Clostridium butyricum* CAPM 6342,
- nízké koncentrace ι-karagenanu významným způsobem neovlivnily dynamiku růstu bakterií rodu *Clostridium* v modelových vzorcích tavených sýrů,
- aplikací 0,15 % ι-karagenanu došlo během 140 dnů skladování tavených sýrů k redukci bakteriálních buněk *Clostridium sporogenes* CAPM 6329,
- po celou dobu skladování tavených sýrů vyhovovaly hodnoty pH a a<sub>w</sub> růstu bakterií,
- se zvyšující se koncentrací monoacylglycerolů aplikovaných do tavených sýrů s 50 % (w/w) TVS klesaly preference jednotlivých výrobků,
- tavené sýry s přítomností 0,15 % (w/w) monoacylglycerolu kyseliny undekanové a 1-adamantankarboxylové byly sensorickým hodnocením pomocí stupnic ve sledovaném znaku chuti a vůně označeny za nejméně přijatelné,
- přítomnost ι-karagenanů neměla negativní vliv na chuť a vůni tavených sýrů.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] CARIĆ, M., KALÁB, M. Processed cheese products. In Fox, P.F. (ed) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Volume 2. Major Cheese Groups, 2 ed. Elsevier Applied Science, London and New York, 1997, 467 – 505.
- [2] Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje, v platném znění.
- [3] GAJDŮŠEK, S. *Mlékařství II*, 1.vydání. Brno: MZLU, 1998. s. 86-91. ISBN 80-7157-342-6.
- [4] PAVELKA, A. *Mléčné výrobky pro vaše zdraví*. 1. vydání. Brno: Littera, 1996, 105 s. ISBN 80-85763-09-5.
- [5] GUINEE, T. P., CARIĆ, M., KALÁB, M. Pasteurized processed cheese and substitute/imitation cheese products. In Fox, P. F. (ed), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Volume 2. Major Cheese Groups. 3 ed. London: Elsevier Applied Science, 2004, 349 – 394. ISBN 0122636530.
- [6] BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., KRÁČMAR, S. *Základní principy výroby tavených sýrů*. Mendelova lesnická a zemědělská univerzita v Brně. Folia II, 2009, 6. 70 s. ISSN 1803-2109.
- [7] BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., KRÁČMAR, S. Vybrané hydrokoloidy a emulgátory ve výrobě tavených sýrů. *Acta fytotechnica et zootechnica*, Nitra, 2009, s. 69-78, ISSN 1336-9245.
- [8] FORMAN, L., STRMISKA, J. *Mlékárenství II*. 1. vydání. Praha: SNTL, 1984. 176 s.
- [9] SCHÄR, W., BOSSET, J.O. Chemical and physico-chemical changes in processed cheese and ready-made fondue during storage. A review. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*. 2002, 35, s. 15 – 20.
- [10] BUŇKA, F., HRABĚ, J. Tavené sýry. *Potravinářská revue*, 2006, č. 4, s. 13 – 16, ISSN 1801-9102.
- [11] BACHMANN, H., P. Cheese analogues: a review. *International Dairy Journal*. 2001, vol. 11, p. 505 – 515.

- [12] KNABEL, S. J., WALKER, H. W., HARTMAN, P. A. Inhibition of *Aspergillus flavus* and selected Gram-positive bacteria by chelation of essential metal-cations by polyphosphates. *Journal of Food Protection*. 1991, vol. 54, p. 360–365.
- [13] LEE, R. M., HARTMAN, P. A., OLSON, D. G., WILLIAMS, F. D. Bactericidal and bacteriolytic effects of selected food-grade phosphates, using *Staphylococcus aureus* as a model system. *Journal of Food Protection*. 1994, vol. 57, p. 276 – 283.
- [14] LEE, S., K., KLOSTERMEYERS, H. The effect of pH the rheological properties of reduced-fat mode processed cheese spreads. *LWT-Food Science and Technology*, 2001, vol. 34, p. 288 – 292.
- [15] BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L. Úloha tavicích solí při výrobě tavených sýrů. *Potravinářská revue*, 2009, č. 1, s. 13-16, ISSN 1801-9102.
- [16] ŠILHÁNKOVÁ., L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. vydání. Praha: Akademie věd České republiky, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [17] NĚMEC, M., HORÁKOVÁ, D. *Základy mikrobiologie*. 3. vydání. Brno: Masarykova univerzita v Brně. Fakulta přírodovědecká. 2002. 233 s. ISBN 80-210-2060-1.
- [18] GLASS, M. R., DOYLE, M. *Safety of processed cheese*. Madison, Wisconsin: FRI Briefings, Food Research Institute, University of Wisconsin, 2005.
- [19] BARBARA, M.L., BAIRD-PARKER, T.C., GOULD G.W., *The microbiological safety and quality of food*, Aspen Publishers, Maryland, 2000.
- [20] KAPOOR, R., METZGER, L. E. Process cheese: Scientific and technological aspects – A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2008, vol. 7, p. 194 – 214.
- [21] DIMITRELI, G., THOMAREIS, A. S. Texture evaluation of block-type processed cheese as a function of chemical composition and in relation to its apparent viscosity. *Journal of Food Engineering*. 2007, vol. 79, p. 1364 – 1337.
- [22] DIMITRELI, G., THOMAREIS, A., S. Effect of chemical composition on the linear viscoelastic properties of spreadable-type processed cheese. *Journal of Food Engineering*. 2008, vol. 84, p. 368 – 374.

- [23] LE PAGE, J. F., MIRADE, P. S., DAULIN, J. D. Development of a device and method for the time-course estimation of low water fluxes and mean surface water activity of food products during ripening and storage. *Food Research International*. 2010, vol. 43, p. 1180 – 1186.
- [24] YU, X., SCHMIDT, A. R., SCHMIDT, S. J. Uncertainty analysis of hygrometer-obtained water activity measurements of saturated salt slurries and food materials. *Food Chemistry*. 2009, vol. 115, p. 214 – 226.
- [25] VAAMONDE, G., CHIRIFE, J. Effect of phosphate buffer on *Staphylococcus aureus* growth at a reduced water activity. *International Journal of Food Microbiology*. 1986, vol. 3, p. 51 – 55.
- [26] Potravinářská mikrobiologie [online]. [cit 2011-2-25] Dostupný z WWW: <http://www.cepac.cz>
- [27] GLASS, K. A., JOHNSON, E. A. Factors that contribute to the botulinal safety of reduced-fat and fat-free process cheese products. *Journal of Food Protection*. 2004, vol. 67, p. 1687 – 1693.
- [28] IMESON, A. P. Carrageenan and furcellaran. In Phillips, G. O., Williams, P. A. (eds.) *Handbook of hydrocolloids*. 1st ed., CRC Press Boca Raton. 2000. p. 164–185.
- [29] VELÍŠEK, J. Chemie potravin I. 1. vydání. Tábor: OSSIS, 1999. 352 s. ISBN 80-902391-3-7.
- [30] THAIDOM, S., GOFF H. D. Effect of  $\kappa$ -carrageenan on milk protein polysaccharide mixtures. *International Dairy Journal*. 2003, vol. 13, p. 763 – 771.
- [31] ČERNÍKOVÁ M., BUŇKA, F., PAVLÍNEK, V., ČECHOVÁ, L., BŘEZINA, P., HRABĚ, J. Vliv přísady kappa- a iota- karagenanu na viskoelastické a organoleptické vlastnosti tavených sýrů. In *Celostátní přehlídka sýrů 2007, výsledky přehlídek a sborník přednášek semináře Mléko a sýry*. Štětina, J., Čurda, L. Praha: VŠCHT, 2007, ISBN 978–80-7080-661-6.
- [32] ČERNÍKOVÁ M., BUŇKA, F., PAVLÍNEK, V., BŘEZINA, P., HRABĚ, J., VALÁŠEK, P. Effect of carrageenan type on viscoelastic properties of processed cheese. *Food Hydrocolloids*. 2008, vol. 22, p. 1054 – 1061.

- [33] SPAGNUOLO, P. A., DALGLEISH D. G, GOFF H. D., MORRIS E.R. Kappa-carrageenan interactions in systems containing casein micelles and polysaccharide stabilizers. *Food Hydrocolloids*. 2005, vol. 19, p. 371 – 377.
- [34] ARLTOFT, D., MADSEN, F., IPSEN, R. Relating the microstructure of pectin and carrageenan in dairy desserts to rheological and sensory characteristics. *Food Hydrocolloids*. 2008, vol. 22, p. 660 – 673.
- [35] POKORNÝ, J., DUBSKÁ, L. *Technologie tuků*, Praha: SNTL, 1986. 452 s.
- [36] MOONEN, H., BAS, H., Mono- and diglycerides. In Whitehurst, R. J. (ed.) *Emulsifiers in food technology*. Oxford: Blackwell Publishing , 2004, s. 40 – 57, ISBN 978-1-4051-1802-6.
- [37] MOULOUGUI, Z., RAKOTONDRAZAFY, V., PEYROU, G., GACHEN, EYCHENNE. Pure  $\alpha$ -monoglycerides for industrial applications. *Agro Food Industry Hi-Tech*. 1998, vol. 9, p. 10 – 14.
- [38] Systematika povrchově aktivních látek [online]. [cit 2011-3-10] Dostupný z WWW: <http://www.cepac.cz>
- [39] KOLLANOOR, A., VASUDEVAN, P., NAIR, M. K. M., HOAGLAND, T., VENKITANARAYNAN, K. Inactivation of bacterial fish pathogens by medium-chain lipid molecules (caprylic acid, monocaprylin and sodium caprylate). *Aquaculture Research*. 2007, vol. 38, p. 1293 – 1300.
- [40] SÁNCHEZ, C. C., NINO, M. R. R, PATINO J. M. R. Relaxation phenomena in monoglyceride films at the air–water interface. *Colloids and Surfaces*. 1999, vol. 12, p. 175 – 192.
- [41] CHANG, CH. M., BODNEIER, R. Effect of dissolution media and additives on the drug release from cubic phase delivery systems. *Journal of Controlled Release*. 1997, vol. 46, p. 215 – 222.
- [42] ESPOSITO, E., BORTOLOTTI, E., MENEGATTI, R., CORTESI, R. Amphiphilic association systems for amphotericin B delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003, vol. 260, p. 249 – 260.

- [43] WITCHER, K. J., NOVICK, R. P., SCHLIEVERT, P. M. Modulation of immune cell proliferation by glycerol monolaurate. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 1999, vol. 3, p. 10 - 13.
- [44] LANGMAIER, F., MLÁDEK, M., RADIL, M. *Pomocné látky kožedělného průmyslu*. Praha: SNTL, 1985. 456 s.
- [45] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J., *Chemie potravin*. 1. vydání. Praha: SNTL, 1983. 629 s.
- [46] JANIŠ, R., KREJČÍ, J., KLÁSEK, A. Preparation of 1-monoacylglycerols from glycidol and fatty acids catalyzed by the chromium(III)-fatty acid system. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2000, vol. 102, p. 351 – 354.
- [47] DARNOKO, D., CHERYAN, M. Kinetics of palm oil transesterification in batch reactor. *Journal of American Oil Chemists Society*. 2000, vol. 77, p. 1263-1267.
- [48] DAVINSON, P. M., SOFOS, J. N., BRANNERN, A. L. *Antimicrobials in food*, CRC Press, Boca Raton, 2005.
- [49] NAIR, M. K. M., JOY, J., VASUDEVAN, P., HINCKLEY, L., HOAGLAND, T. A., VENKITANARAYANAN, K. S. Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*. 2005, vol. 88, p. 3488 – 3495.
- [50] DUFOUR, M., MANSON, J. M., BREMER, P. J., DUFOUR, J. P., COOK, G. R., SIMMONDS, R. S. Characterization of Monolaurin Resistance in *Enterococcus faecalis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, vol. 73, p. 5507 – 5515.
- [51] WANG, L. L., JOHSON, E. A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Fatty Acids and Monoglycerides. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992, vol. 58, p. 624 – 629.
- [52] KRISTMUNDSÓTTIR, T., ÁRNADÓTTIR, S. G., BERGSON, G., THORMAR, H. Development and evaluation of microbicidal hydrogels containing monoglyceride as the active ingredient. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1999, vol. 88, p. 1011 – 1015.



- [53] SPRONG, R. C., HULSTEIN, M. F. E., MEER, R. Bovine milk fat components inhibit food-borne pathogens. *International Dairy Journal*, 2002, vol. 12, p. 209 – 215.
- [54] CONLEY, A. J., KABARA, J. J. Antimicrobial action of esters of polyhydric alcohols. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1973, vol. 4, p. 501-506.
- [55] SPRONG, R. C., HULSTEIN, F. E., VAN DER MEER, R. Bactericidal activities of milk lipids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, vol. 45, p. 1298 – 1301.
- [56] BALA, M. F. A, MARSHALL, D. L. Testing matrix, inoculum size, and incubation temperature affect monolaurin activity against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*. 1996, vol. 13, p. 467 – 473.
- [57] STECCHINI, M. L., DI LUCH, R., BORTOLUSSI, G., DEL TORRE, M. Evaluation of lactic and monolaurin to control *Listeria monocytogenes* on Stracchino cheese. *Food Microbiology*. 1996, vol. 13, p. 483 – 488.
- [58] MANSOUR, M., MILLIÉRE, J. B. An inhibitor synergistic effect of a nisin- monolaurin combination on *Bacillus* sp. Vegetative cells in milk. *Food Microbiology*. 2001, vol. 18, p. 87 – 94.
- [59] BRANEN, J. K, DAVIDSON, P. M. Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, vol. 90, p. 63 – 74.
- [60] McLAY, J. C., KENNEDY, M. J., McLay J.C., O'ROUKE, A. L., ELLIOT, R. M., SIMMONDS, R. S. Inhibition of bacterial foodborne pathogens by the lactoperoxidase system in combination with monolaurin. *International Journal of Food Microbiology*. 2002, vol. 73, p.1 – 9.
- [61] ZHANG, H., FENG, F., FU, X., DU, Y., ZHANG, L., ZHENG, X. Antimicrobial effect of food-grade GML microemulsions against *Staphylococcus aureus*. *European Food Research Technology*. 2007, vol. 226, p. 281 – 286.
- [62] PETSCHOW, B. W., BATEMA, R. P., FORD, L. L. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to bactericidal properties of medium – chain monoglycerides and free fatty acids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1996, vol. 40, p.302 – 306.

- [63] PETSCHOW, B. W., BATEMA, R. D., TALBOTT, FORD, L. L. Impact of medium-chain monoglycerides on intestinal colonisation by *Vibrio cholerae* or enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*. 1998, vol. 47, p. 383–389.
- [64] THORMAR, H., HILMARSSON, H., BERGSSON, G. Stable concentrated emulsions of the 1-Monoglyceride of capric acid (monocaprin) with microbicidal activities against the food-borne bacteria *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, vol. 72, p. 522 – 526.
- [65] BERGSSON, G., STEINGRÍMSSON, Ó., THORMAR, H. Bactericidal effects of fatty acids and monoglycerides on *Helicobacter pylori*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2002, vol. 20, p. 258 – 262.
- [66] GLASS, K. A., JOHNSON, E. A. Antagonistic effect of fat on the antibotulinal activity of food preservatives and fatty acids. *Food Microbiology*. 2004, vol. 21, p. 675 - 682.
- [67] CHAIBI, A., ABABOUCHE, L. H., GHOUILA, M. R., BUSTA, F. F. Effect of monoglycerides on the thermal inactivation kinetics of *Bacillus cereus* F4165/75 spores. *Food Microbiology*. 1998, vol. 15, p. 527 – 537.
- [68] SKŘIVANOVÁ, E., MAROUNEK, M., BENDA, V., BŘEZINA, P. Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Clostridium perfringens* to organic acids and monolaurin. *Veterinární medicína*. 2006, vol. 51, p. 81 – 88.
- [69] NIEMAN, C. Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms. *Bacteriological Reviews*. 1954, vol. 18, p. 147–163.
- [70] SKŘIVANOVÁ, E., MAROUNEK, M., DLOUHÁ, G., KAŇKA, J. Susceptibility of *Clostridium perfringens* to C<sub>2</sub>–C<sub>18</sub> fatty acids. *Letters in Applied Microbiology*. 2005, vol. 41, p. 77 – 81.
- [71] CHAIBI, A., ABABOUCHE, L. H., BUSTA, F. Inhibition of bacterial spores and vegetative cells by glycerides. *Journal of Food Protection*. 1996, vol. 59, p. 716-722.

- [72] GARCIA, M., AMALARADJOU, M. A. R., NAIR, M. K. M., ANNAMALAI, T. V., SURENDRANATH, S., LEE, S., HOAGLAND, T., DZUREC, D., FAUSTMAN C., VENKITANARAYANAN, K. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on frankfurters by monocaprylin alone or in combination with acetic acid. *Journal of Food Protection*. 2007, vol. 70, p. 1594 – 1599.
- [73] ŽIŽKA, B., KORBELOVÁ, M. *Mikrobiologie I*. 1. vydání. Praha, 1992, 194 s.
- [74] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. 1. vydání. Masarykova univerzita Brno, 2007, 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [75] JAY, J.M., *Modern food microbiology*, An Aspen Publication, Maryland. 2000. 767 s. ISBN 0-8342-1671-X.
- [76] GHODDUSI, P., SHERBURN, R. Preliminary study on the isolation of *Clostridium butyricum* strains from natural sources in the UK and screening the isolates for presence of type E botulinal toxin gene. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, vol. 142, p. 202 – 206.
- [77] MENG, X., KARASAWA, T., ZOU, K., KUANG, X., WANG, X., LU, C., WANG, CH., YAMAKAWA, K., NAKAMURA, S. Characterization of a neurotoxicogenic *Clostridium butyricum* strain isolated from the food implicated in an outbreak of food-borne type E botulism. *Journal of Clinical Microbiology*. 1997, vol. 35, p. 2160 – 2162.
- [78] GORNER, F., VALÍK, L'. *Aplikovaná mikrobiológia požívateľín*. 1. vydání. Bratislava: Malé centrum, 2004. s. 528, ISBN 80-967664-9-7.
- [79] VAŘEJKA, F., MRÁZ, O., SMOLA, J. *Speciální veterinární mikrobiologie*. 1. vydání. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1989, 264 s.
- [80] ČSN ISO 8589, *Senzorická analýza. Obecná směrnice pro uspořádání senzorického pracoviště*, Český normalizační institut, 1993, 16 s.
- [81] ISAACS, CH. E., LITOV, R., THORMAR, H. Antimicrobial activity of lipids added to human milk, infant formula, and bovine milk. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 1995, vol. 6, p. 362 - 366.

- [82] BARTOŠOVÁ, E., ČERVENKOVÁ, R., ŠPIČKOVÁ, Z., ŠMIDRKAL, J., FILIP, Monoacylglycerols as food additives with antimicrobial properties. *Czech Journal of Food Sciences*. 2004, vol. 22, p. 238-241, ISSN 1212-1800.
- [83] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., JANIŠ, R., KREJČÍ, J., DOLEŽÁLKOVÁ, I., POSPÍŠIL, Z., RŮŽIČKA, J., TREMLOVÁ, B. Comparison of antibacterial of seven 1-monoglycerides on food-borne pathogens or spoilage bacteria. *Acta Veterinaria Brno*. 2011.
- [84] ALTIERI, C., BEVILACQUA, A., CARDILLO, D. Effectiveness of fatty acids and their monoglycerides against gram-negative pathogens. *International Journal of Food Science and Technology*. 2009, vol 44, p. 359 – 366.
- [85] DAVIES, W. L., HOFFMANN, C. E., PAULSHOCK, M., WOOD, T. R., HAFF, R. F., GRUNERT, R. R., WATTS, J. C., HERMANN, E. C., NEUMAYER, E. M., MCGAHEN, J. W. Antiviral activity of 1-adamantanamine (Amantadine). *Science*. 1964, vol. 144, p. 862.
- [86] KADI, A. A., EL-BROLLOSY, N. R., AL-DEEB, O. A., HABIB, E. E., IBRAHIM, T. M., EL-EMAM, A. A. Synthesis, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of novel 2-(1-adamantyl)-5-substituted-1,3,4-oxadiazoles and 2-(1-adamantylamino)-5-substituted-1,3,4-thiadiazoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2007, vol. 42, p. 235-242.
- [87] NAIR, M. K. M., VASUDEVAN, P., HOAGLAND, T., VENKITANARAYNAN, K. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in milk by caprylic acid and monocaprylin. *Food Microbiology*. 2004, vol. 21, p. 611 – 616.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

$a_w$	vodní aktivita.
BHA	butylhydroxyanizol.
CPM	celkový počet mikroorganismů.
EDTA	etylendiamintetraoctová kyseliny.
HLB	hydrofilně-lipofilní rovnováha.
IC	iota-karagenan.
MAG	monoacylglycerol.
MAG ACA	monoacylglycerol kyseliny 1-adamantankarboxylové.
MAG C <sub>11:0</sub>	monoacylglycerol kyseliny undekanové.
MAG C <sub>11:1</sub>	monoacylglycerol kyseliny undecenové.
MAG C <sub>12:0</sub>	monoacylglycerol kyseliny laurové.
pH	aktivní kyselost.
TVS	tuk v sušině.
V/O	emulze voda v oleji.
V/O/V	složená emulze
w/w	hmotnostní procenta.

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1 Schéma výroby tavených sýrů. Upraveno podle Kapoor a Metzger [20].	16
Obr. 2 Karabióza [30]	21
Obr. 3 Estery glycerolů [36].	24
Obr. 4 Schéma pracovního postupu při zpracování vzorku taveného sýra.	42
Obr. 5 Dynamika růstu <i>C. butyricum</i> CAPM 6342 v modelových vzorcích tavených sýrů s různým obsahem TVS.	46
Obr. 6 Dynamika růstu <i>C. sporogenes</i> CAPM 6329 v modelových vzorcích tavených sýrů s různým obsahem TVS.	47
Obr. 7 Dynamika růstu <i>C. butyricum</i> v modelových vzorcích tavených sýrů v přítomnosti MAG C <sub>11:0</sub> .	48
Obr. 8 Dynamika růstu <i>C. sporogenes</i> v modelových vzorcích tavených sýrů v přítomnosti MAG C <sub>11:0</sub> .	49
Obr. 9 Dynamika růstu <i>C. butyricum</i> v modelových vzorcích tavených sýrů v přítomnosti MAG C <sub>11:1</sub> .	50
Obr. 10 Dynamika růstu <i>C. sporogenes</i> v modelových vzorcích tavených sýrů v přítomnosti MAG C <sub>11:1</sub> .	52
Obr.11 Dynamika růstu <i>C. butyricum</i> v modelových vzorcích tavených sýrů v přítomnosti MAG ACA.	53
Obr. 12 Dynamika růstu <i>C. sporogenes</i> v modelových vzorcích tavených sýrů v přítomnosti MAG ACA.	54
Obr. 13 Dynamika růstu <i>C. butyricum</i> v modelových vzorcích tavených sýrů v přítomnosti ι-karagenanů.	55
Obr. 14 Dynamika růstu <i>C. sporogenes</i> v modelových vzorcích tavených sýrů v přítomnosti ι-karagenanů.	56

**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1 Hodnoty pH tavených sýrů o různém obsahu TVS kontaminovaných <i>C. butyricum</i> .....	56
Tab. 2 Hodnoty pH tavených sýrů s přídavkem MAG C <sub>11:0</sub> kontaminovaných <i>C. butyricum</i> .....	57
Tab. 3 Hodnoty pH tavených sýrů s přídavkem ι-karagenanů kontaminovaných <i>C. butyricum</i> .....	58
Tab. 4 Hodnoty vodní aktivity modelových tavených sýrů .....	59
Tab. 5 Výsledky sensorické analýzy první série tavených sýrů.....	60
Tab. 6 Výsledky sensorické analýzy druhé série tavených sýrů .....	61

## SEZNAM PŘÍLOH

P I: Surovinové skladby tavených sýrů s různým obsahem TVS

P II: Surovinové skladby tavených sýrů s přídavkem monoacylglycerolů

P III: Surovinové skladby tavených sýrů s přídavkem karagenanů

P IV: Celkové počty bakterií rodu *Clostridium* vyjádřené jako log CFU/g tavených sýrů s aplikací MAG C<sub>11:0</sub>

P V: Celkové počty bakterií rodu *Clostridium* vyjádřené jako log CFU/g tavených sýrů s aplikací MAG C<sub>11:1</sub>

P VI: Celkové počty bakterií rodu *Clostridium* vyjádřené jako log CFU/g tavených sýrů s aplikací MAG ACA

P VII: Celkové počty bakterií rodu *Clostridium* vyjádřené jako log CFU/g tavených sýrů s aplikací IC

P VIII: Hodnoty aktivní kyselosti tavených sýrů

P IX: Stupnice pro sensorické hodnocení tavených sýrů

P X: Protokol pro sensorické hodnocení tavených sýrů

P XI: Článek publikovaný v časopise *Potravinářská revue*, 2010, č. 1, s. 82 – 85, ISSN 1801-9102.



## PŘÍLOHA P I: SUROVINOVÉ SKLADBY TAVENÝCH SÝRŮ S RŮZNÝM OBSAHEM TVS

Surovinová skladba tavených sýrů s 50 % (w/w) TVS

Surovina		Množství [kg]	Obsah sušiny [% w/w]	Obsah tuku [% w/w]
Eidamská cihla 30 % (w/w)		0,550	50,0	15,0
Máslo		0,170	82,0	82,0
Tavicí soli	DIDI	0,021	95,0	0,0
	KPS	0,006	95,0	0,0
	PYRO	0,003	95,0	0,0
Voda		0,355	0,0	0,0

Surovinová skladba tavených sýrů se 40 % (w/w) TVS

Surovina		Množství [kg]	Obsah sušiny [% w/w]	Obsah tuku [% w/w]
Eidamská cihla 30 % (w/w)		0,650	50,0	15,0
Máslo		0,090	82,0	82,0
Tavicí soli	DIDI	0,021	95,0	0,0
	KPS	0,006	95,0	0,0
	PYRO	0,003	95,0	0,0
Voda		0,300	0,0	0,0

Surovinová skladba tavených sýrů se 30 % (w/w) TVS

<b>Surovina</b>		<b>Množství [kg]</b>	<b>Obsah sušiny [% w/w]</b>	<b>Obsah tuku [% w/w]</b>
Eidamská cihla 30 % (w/w)		0,800	50,0	15,0
Máslo		0,015	82,0	82,0
Tavicí soli	DIDI	0,021	95,0	0,0
	KPS	0,006	95,0	0,0
	PYRO	0,003	95,0	0,0
Voda		0,255	0,0	0,0

## PŘÍLOHA P II: SUROVINOVÉ SKLADBY TAVENÝCH SÝRŮ S PŘÍDAVKEM MONOACYLGLYCEROLŮ

Surovinová skladba tavených sýrů s přidavkem 0,01 % (w/w) monoacylglycerolu

Surovina	Množství [kg]	Obsah sušiny [% w/w]	Obsah tuku [% w/w]
Eidamská cihla 30 % (w/w)	0,550	50,0	15,0
Máslo	0,170	82,0	82,0
Tavicí soli	DIDI	0,021	95,0
	KPS	0,006	95,0
	PYRO	0,003	95,0
Monoacylglycerol	$1,11 \cdot 10^{-4}$	99,0	99,0
Voda	0,355	0,0	0,0

Surovinová skladba tavených sýrů s přidavkem 0,05 % (w/w) monoacylglycerolu

Surovina	Množství [kg]	Obsah sušiny [% w/w]	Obsah tuku [% w/w]
Eidamská cihla 30 % (w/w)	0,550	50,0	15,0
Máslo	0,170	82,0	82,0
Tavicí soli	DIDI	0,021	95,0
	KPS	0,006	95,0
	PYRO	0,003	95,0
Monoacylglycerol	$5,53 \cdot 10^{-4}$	99,0	99,0
Voda	0,355	0,0	0,0

Surovinová skladba tavených sýrů s přidavkem 0,15 % (w/w) monoacylglycerolu

Surovina		Množství [kg]	Obsah sušiny [% w/w]	Obsah tuku [% w/w]
Eidamská cihla 30 % (w/w)		0,550	50,0	15,0
Máslo		0,170	82,0	82,0
Tavicí soli	DIDI	0,021	95,0	0,0
	KPS	0,006	95,0	0,0
	PYRO	0,003	95,0	0,0
Monoacylglycerol		$1,65 \cdot 10^{-3}$	99,0	99,0
Voda		0,355	0,0	0,0

## PŘÍLOHA P III: SUROVINOVÉ SKLADBY TAVENÝCH SÝRŮ S PŘÍDAVKEM KARAGENANŮ

Surovinová skladba tavených sýrů s přidavkem 0,1 % (w/w) ι-karagenanu

Surovina	Množství [kg]	Obsah sušiny [% w/w]	Obsah tuku [% w/w]
Eidamská cihla 30 % (w/w)	0,550	50,0	15,0
Máslo	0,170	82,0	82,0
Tavicí soli	DIDI	0,021	95,0
	KPS	0,006	95,0
	PYRO	0,003	95,0
ι-karagenan	0,0006	90,0	0,0
Voda	0,355	0,0	0,0

Surovinová skladba tavených sýrů s přidavkem 0,2 % (w/w) ι-karagenanu

Surovina	Množství [kg]	Obsah sušiny [% w/w]	Obsah tuku [% w/w]
Eidamská cihla 30 % (w/w)	0,550	50,0	15,0
Máslo	0,170	82,0	82,0
Tavicí soli	DIDI	0,021	95,0
	KPS	0,006	95,0
	PYRO	0,003	95,0
ι-karagenan	0,0012	90,0	0,0
Voda	0,355	0,0	0,0

**PŘÍLOHA P IV: CELKOVÉ POČTY BAKTERIÍ RODU  
*CLOSTRIDIUM* VYJÁDŘENÉ JAKO LOG CFU/G TAVENÝCH SÝRŮ  
S APLIKACÍ MAG C<sub>11:0</sub>**

Hodnoty log CFU/g růstu *Clostridium butyricum* CAPM 6342 v tavených sýrech s aplikací MAG C<sub>11:0</sub>

vzorek	Doba skladování (dny)							
	2	7	14	28	42	56	84	140
0,01 CB a 1	3,63	4,49	7,51	9,60	8,87	7,66	9,02	9,34
0,01 CB a 2	3,56	5,42	7,52	9,89	8,92	8,22	8,81	9,33
0,01 CB b 1	3,56	5,40	7,38	9,96	8,88	8,21	8,83	9,31
0,01 CB a 2	3,70	5,50	7,17	9,50	8,80	7,83	8,89	9,19
0,05 CB a 1	3,02	5,72	7,26	9,36	8,61	8,52	8,93	8,72
0,05 CB a 2	2,96	5,43	7,26	9,41	8,52	8,33	8,82	8,76
0,05 CB b 1	2,90	5,33	7,25	9,47	8,59	7,75	8,83	8,80
0,05 CB b 2	2,81	6,28	6,48	9,49	8,62	7,94	9,04	8,80
0,15 CB a 1	2,77	4,23	7,48	9,52	7,84	7,75	7,80	8,39
0,15 CB a 2	2,60	4,25	7,29	9,39	7,82	8,15	7,77	8,95
0,15 CB b 1	3,18	4,28	6,34	9,12	7,80	7,91	8,53	8,62
0,15 CB b 2	3,51	4,72	6,26	9,28	7,78	7,89	8,35	8,60
CB	3,27	5,68	7,19	8,85	8,86	7,66	8,41	8,75
CB	3,80	5,39	7,22	8,75	8,93	7,66	8,63	8,83

Hodnoty log CFU/g růstu *Clostridium sporogenes* CAPM 6329 v tavených sýrech s aplikací MAG C<sub>11:0</sub>

vzorek	Doba skladování (dny)							
	2	7	14	28	42	56	84	140
0,01 CS a 1	3,69	5,35	7,12	7,85	8,83	8,32	8,79	9,17
0,01 CS a 2	4,90	5,44	7,22	8,67	8,88	8,30	8,78	9,19
0,01 CS b 1	4,77	5,45	7,16	8,38	8,10	8,30	8,71	9,23
0,01 CS a 2	3,58	5,50	7,15	8,83	8,21	8,30	8,70	9,27
0,05 CS a 1	3,34	5,40	6,10	6,73	7,89	7,89	8,49	8,72
0,05 CS a 2	4,66	4,61	6,07	6,21	7,85	8,12	8,63	8,46
0,05 CS b 1	3,06	4,85	6,47	6,31	8,70	7,58	8,61	8,51
0,05 CS b 2	3,96	4,88	5,70	6,08	8,61	7,67	8,52	8,38
0,15 CS a 1	4,11	5,32	5,28	5,70	7,56	6,38	7,42	8,07
0,15 CS a 2	4,48	3,80	5,18	6,91	7,56	7,15	7,40	7,77
0,15 CS b 1	4,44	4,70	5,23	6,94	7,19	6,96	8,29	7,95
0,15 CS b 2	4,53	4,19	5,14	6,80	7,11	6,94	8,21	7,86
CS	3,95	5,31	7,11	6,37	7,51	7,45	8,52	9,28
CS	3,92	5,78	5,61	6,81	7,42	7,23	8,45	9,27

**PŘÍLOHA P V: CELKOVÉ POČTY BAKTERIÍ RODU  
*CLOSTRIDIUM* VYJÁDŘENÉ JAKO LOG CFU/G TAVENÝCH SÝRŮ  
S APLIKACÍ MAG C<sub>11:1</sub>**

Hodnoty log CFU/g růstu *Clostridium butyricum* CAPM 6342 v tavených sýrech s aplikací MAG C<sub>11:1</sub>

vzorek	Doba skladování (dny)							
	2	7	14	28	42	56	84	140
0,01 CB a 1	5,90	7,07	5,78	5,67	7,42	7,09	6,38	6,00
0,01 CB a 2	5,82	5,81	5,72	5,73	7,51	7,08	6,45	6,12
0,01 CB b 1	5,92	5,93	5,72	5,65	7,50	7,87	6,43	6,86
0,01 CB a 2	5,91	5,85	5,68	5,68	7,65	7,93	6,44	6,83
0,05 CB a 1	5,58	4,32	4,77	5,13	7,24	7,68	6,00	6,71
0,05 CB a 2	5,67	4,37	4,70	5,26	7,41	7,61	6,08	6,10
0,05 CB b 1	5,66	4,07	4,66	6,20	7,16	7,45	6,17	6,66
0,05 CB b 2	5,84	4,79	4,68	5,96	7,28	7,43	6,21	6,64
0,15 CB a 1	4,23	4,03	3,85	5,50	7,37	6,93	5,43	5,68
0,15 CB a 2	4,18	3,70	3,90	5,54	7,38	6,91	5,26	5,83
0,15 CB b 1	4,48	2,92	3,95	5,66	7,34	7,17	5,34	5,76
0,15 CB b 2	4,22	2,92	3,93	5,73	7,42	7,15	5,21	5,92
CB	5,38	5,50	5,17	5,53	7,03	8,37	6,66	7,74
CB	5,42	5,64	5,18	6,22	7,18	8,39	6,39	7,58



Hodnoty log CFU/g růstu *Clostridium sporogenes* CAPM 6329 v tavených sýrech s aplikací MAG C<sub>11:1</sub>

vzorek	Doba skladování (dny)							
	2	7	14	28	42	56	84	140
0,01 CS a 1	5,22	2,62	5,07	5,11	7,65	7,17	6,12	6,22
0,01 CS a 2	5,48	2,88	5,08	5,43	7,68	7,12	6,15	6,16
0,01 CS b 1	4,91	2,22	5,11	6,71	7,64	8,13	6,19	6,17
0,01 CS a 2	3,17	2,77	5,08	6,96	7,72	8,14	6,16	6,12
0,05 CS a 1	4,01	2,62	5,46	5,70	7,50	7,18	5,68	5,77
0,05 CS a 2	5,26	3,49	5,38	5,76	7,42	7,19	5,54	5,95
0,05 CS b 1	2,15	3,03	5,14	5,82	7,45	7,17	5,68	5,78
0,05 CS b 2	3,01	3,91	5,04	5,85	7,38	7,16	5,71	5,88
0,15 CS a 1	3,69	3,24	5,70	6,77	6,94	6,51	5,26	5,85
0,15 CS a 2	3,89	3,45	3,79	6,78	6,82	6,56	5,49	5,61
0,15 CS b 1	5,60	1,92	5,59	6,61	6,75	6,47	5,47	5,74
0,15 CS b 2	6,05	3,00	4,43	6,60	6,82	6,95	5,58	5,75
CS	5,02	3,18	5,27	6,27	7,48	6,53	6,48	7,04
CS	5,06	5,48	5,21	6,34	7,59	7,05	6,38	7,00

**PŘÍLOHA P VI: CELKOVÉ POČTY BAKTERIÍ RODU  
*CLOSTRIDIUM* VYJÁDŘENÉ JAKO LOG CFU/G TAVENÝCH SÝRŮ  
S APLIKACÍ MAG ACA**

Hodnoty log CFU/g růstu *Clostridium butyricum* CAPM 6342 v tavených sýrech s aplikací MAG ACA

vzorek	Doba skladování (dny)							
	2	7	14	28	42	56	84	140
0,01 CB a 1	5,18	3,54	6,38	5,38	6,35	7,16	7,28	4,74
0,01 CB a 2	5,22	4,00	6,45	5,38	6,36	6,67	7,30	4,90
0,01 CB b 1	4,74	4,33	6,46	5,68	6,33	6,65	7,20	4,77
0,01 CB a 2	4,44	4,94	6,43	5,57	6,20	6,76	6,76	4,91
0,05 CB a 1	4,75	5,21	6,44	6,95	6,51	6,50	6,71	4,76
0,05 CB a 2	4,56	5,78	6,38	6,90	5,73	6,47	6,65	4,86
0,05 CB b 1	4,43	5,64	6,37	6,90	6,10	6,53	6,71	4,79
0,05 CB b 2	4,33	5,66	6,44	6,93	5,89	6,26	6,96	4,37
0,15 CB a 1	4,02	5,37	5,36	6,40	6,26	5,35	6,73	4,90
0,15 CB a 2	4,60	5,43	5,40	6,43	6,22	5,35	6,76	4,79
0,15 CB b 1	3,30	5,52	5,49	6,68	6,24	5,31	6,62	4,77
0,15 CB b 2	4,48	5,38	5,43	6,34	6,02	5,46	6,83	4,50
CB	5,62	5,38	6,41	7,47	7,48	7,27	8,19	5,27
CB	5,65	5,45	6,43	7,50	7,51	7,29	8,15	5,24

Hodnoty log CFU/g růstu *Clostridium sporogenes* CAPM 6329 v tavených sýrech s aplikací MAG ACA

vzorek	Doba skladování (dny)							
	2	7	14	28	42	56	84	140
0,01 CS a 1	5,31	5,35	6,00	6,25	5,99	6,20	6,57	5,16
0,01 CS a 2	5,14	5,58	5,70	6,24	5,99	6,21	7,42	5,22
0,01 CS b 1	5,13	5,53	5,86	6,33	6,15	6,12	7,07	5,33
0,01 CS a 2	5,06	5,49	5,85	6,31	6,33	6,20	7,48	5,27
0,05 CS a 1	4,94	5,29	6,00	6,30	6,54	5,62	7,57	4,99
0,05 CS a 2	5,02	5,40	6,24	6,51	6,53	6,07	7,45	5,01
0,05 CS b 1	4,83	5,29	6,30	6,87	6,66	5,97	7,52	5,10
0,05 CS b 2	4,98	5,33	6,31	6,82	5,46	6,20	7,52	5,02
0,15 CS a 1	4,90	5,16	6,45	6,44	6,72	6,31	6,72	5,16
0,15 CS a 2	4,73	5,54	6,46	6,29	6,84	5,42	6,65	5,14
0,15 CS b 1	4,84	5,23	6,24	6,40	5,66	5,93	7,10	5,03
0,15 CS b 2	4,62	5,20	6,28	6,42	5,62	6,21	6,97	5,10
CS	5,89	5,84	6,69	6,64	6,47	6,53	7,67	5,05
CS	5,62	5,69	6,27	6,67	6,51	6,51	7,65	4,92

**PŘÍLOHA P VII: CELKOVÉ POČTY BAKTERIÍ RODU  
CLOSTRIDIUM VYJÁDŘENÉ JAKO LOG CFU/G TAVENÝCH SÝRŮ  
S APLIKACÍ IC**

Hodnoty log CFU/g růstu *Clostridium butyricum* CAPM 6342 v tavených sýrech s aplikací IC

vzorek	Doba skladování (dny)							
	2	7	14	28	42	56	84	140
0,1 CB a 1	3,06	5,73	3,93	5,30	4,91	5,58	5,92	3,68
0,1 CB a 2	3,18	5,83	3,20	5,11	4,88	5,57	5,89	3,67
0,1 CB b 1	3,16	5,79	3,84	5,21	4,88	5,49	5,86	3,80
0,1 CB a 2	3,22	5,65	3,84	5,14	4,74	5,41	5,91	3,62
0,2 CB a 1	4,25	5,39	2,92	5,55	4,98	5,26	5,24	3,37
0,2 CB a 2	5,10	4,99	2,82	4,58	5,12	5,30	5,09	3,49
0,2 CB b 1	5,03	4,46	2,88	4,94	4,39	5,26	4,26	3,55
0,2 CB b 2	5,08	4,53	2,82	4,74	4,57	5,09	4,00	3,56
CB	3,27	5,67	3,30	5,80	5,28	6,38	5,45	3,81
CB	3,36	5,73	3,41	5,48	5,13	6,21	5,70	3,95

Hodnoty log CFU/g růstu *Clostridium sporogenes* CAPM 6329 v tavených sýrech s aplikací IC

vzorek	Doba skladování (dny)							
	2	7	14	28	42	56	84	140
0,1 CS a 1	3,12	3,45	3,15	4,70	5,03	6,41	5,87	4,48
0,1 CS a 2	3,10	3,20	3,07	4,69	5,04	6,51	5,75	4,25
0,1 CS b 1	3,11	3,52	3,34	3,71	5,23	6,15	5,74	4,13
0,1 CS a 2	3,22	3,41	3,34	3,82	5,09	6,17	5,80	4,27
0,2 CS a 1	3,94	3,45	3,10	4,59	5,23	5,70	4,82	3,37
0,2 CS a 2	3,17	3,22	3,03	4,13	5,05	5,84	4,88	3,44
0,2 CS b 1	4,05	3,38	3,44	4,36	4,81	5,88	4,69	3,30
0,2 CS b 2	3,31	3,37	3,48	4,25	4,78	5,89	4,60	3,26
CS	5,22	3,34	3,20	3,53	5,34	6,16	6,19	3,84
CS	4,76	3,49	3,34	3,20	5,24	6,22	6,25	4,57

## PŘÍLOHA P VIII: HODNOTY AKTIVNÍ KYSELOSTI TAVENÝCH SÝRŮ

Hodnoty pH tavených sýrů s přidavkem MAG ACA kontaminovaných *C. butyricum*

Doba skladování (dny)	pH			
	MAG ACA (% w/w)			
	0,01	0,05	0,15	0 (kontrola)
2	6,05 ± 0,01	6,08 ± 0,02	6,11 ± 0,01	6,09 ± 0,00
7	6,08 ± 0,01	6,09 ± 0,02	6,13 ± 0,01	6,11 ± 0,00
14	6,08 ± 0,00	6,12 ± 0,02	6,14 ± 0,00	6,13 ± 0,01
28	6,08 ± 0,01	6,09 ± 0,01	6,13 ± 0,02	6,10 ± 0,01
42	6,07 ± 0,00	6,10 ± 0,01	6,12 ± 0,01	6,10 ± 0,00
56	6,05 ± 0,03	6,03 ± 0,01	6,06 ± 0,01	6,04 ± 0,01
84	6,03 ± 0,01	6,08 ± 0,01	6,10 ± 0,00	6,11 ± 0,01
140	6,15 ± 0,01	6,16 ± 0,00	6,18 ± 0,00	6,14 ± 0,00

Hodnoty pH tavených sýrů s přidavkem MAG C<sub>11:1</sub> kontaminovaných *C. butyricum*

Doba skladování (dny)	pH			
	MAG C <sub>11:1</sub> (% w/w)			
	0,01	0,05	0,15	0 (kontrola)
2	6,11 ± 0,00	6,11 ± 0,01	6,12 ± 0,00	6,11 ± 0,00
7	6,21 ± 0,01	6,20 ± 0,01	6,24 ± 0,02	6,20 ± 0,00
14	6,14 ± 0,01	6,12 ± 0,01	6,14 ± 0,01	6,12 ± 0,00
28	6,23 ± 0,02	6,21 ± 0,01	6,28 ± 0,01	6,22 ± 0,00
42	6,23 ± 0,01	6,22 ± 0,01	6,25 ± 0,00	6,22 ± 0,00
56	6,23 ± 0,00	6,22 ± 0,00	6,24 ± 0,01	6,23 ± 0,00
84	6,11 ± 0,02	6,11 ± 0,01	6,15 ± 0,01	6,10 ± 0,01
140	6,11 ± 0,01	6,12 ± 0,01	6,12 ± 0,01	6,10 ± 0,01

# PŘÍLOHA P IX: STUPNICE PRO SENZORICKÉ HODNOCENÍ TAVENÝCH SÝRŮ

## Vzhled a barva

1. **Vynikající** – barva smetanově bílá, stejnorodá, bez cizích odstínů. Sýr hladký, lesklý.
2. **Výborná** – nepatrná odchylka od deklarované barvy a vzhledu, bez cizích odstínů, homogenní, typická pro smetanový tavený sýr. Změny barvy způsobené osýcháním sýru, oxidačními změnami vyloučeny. Vzhled bez jakýchkoliv známek deformace, čistý, hladký, lesklý.
3. **Velmi dobrá** – mírná odchylka od deklarované barvy a vzhledu, bez cizích odstínů, homogenní, typická pro smetanový tavený sýr. Změny barvy způsobené osýcháním sýru, oxidačními změnami jen nepatrné. Vzhled bez jakýchkoliv známek deformace, na povrchu sýra čistý, hladký, lesklý.
4. **Dobrá** - barva odpovídá druhu taveného sýra, je homogenní s vyloučením mramorování barvy. Vzhled vykazuje odchylky způsobené mírnou deformací tvaru, drobnější závady v hladkosti povrchu, povrch sýra je nepatrně matný, stále však hladký.
5. **Méně dobrá** - barva odpovídá druhu taveného sýra, je homogenní s nepatrnými náznaky mramorování barvy. Vzhled vykazuje odchylky způsobené deformací tvaru, drobnější závady v hladkosti povrchu, povrch sýra je mírně matný, mírné odchylky v hladkosti.
6. **Nevyhovující** - barva mírně nehomogenní (mramorovitá), povrch sýra matný bez lesku, na povrchu mírné barevné změny v důsledku oxidativních změn.
7. **Nepříjemný** – barva na povrchu i v těstě nehomogenní, silné oxidativní změny na povrchu, výskyt plísně, značná deformace povrchu, vzhled narušen duřením sýra, vytavený, oddělený tuk.

## Lesk sýra

1. **Vynikající vysoký lesk** – sýr s vynikajícím leskem
2. **Výborný lesk**
3. **Dobrý lesk**
4. **Uspokojivý lesk**
5. **Méně dobrý lesk**
6. **Nevyhovující lesk**
7. **Naprosto nevhovující lesk** – naprosto matný sýr

## Konzistence

1. **Vynikající** – lehce roztíratelná, plastická, dokonale utavená, bez vzduchových dutin, homogenní, bez výskytu neutavených kousků sýra.
2. **Výborná** – konzistence výborně roztíratelná, jemná, nelepivá.
3. **Velmi dobrá** - roztíratelnost velmi dobrá, nepatrně tužší nebo měkčí.
4. **Dobrá** – roztíratelnost dobrá, mírně tužší nebo měkčí, slabě lepivá.
5. **Méně dobrá** – roztíratelnost horší, tužší, pastovitá nebo měkčí, lepivá.
6. **Nevyhovující** – lepivá, tuhá, řídká, nehomogenní, špatně roztíratelná.
7. **Nepřijatelná** – velmi tuhá až drobivá, silně lepivá, rozbředlá, nehomogenní s oddělovacím tukem, zduřelá s výskytem provzdušnění, silně krupičkovitá, roztekavá.

## Chuť a vůně

1. **Vynikající** - chuť jemná, mléčně sýrová, nebo máslová, smetanová, jemně sýrově nasládlá, výrazná. Vůně čistá velmi harmonická, cizí příchutě jsou vyloučeny.
2. **Výborná** – nepatrné odchylky od vynikající chuti a vůně, chuť a vůně harmonická, sýrová, nebo máslová, smetanová, jemně mléčně nakyslá nebo nasládlá, typická, cizí příchutě vyloučeny.
3. **Velmi dobrá** – mírné odchylky od vynikající chuti a vůně, přesto harmonická, odpovídající deklarovanému druhu, přirozeně mléčně nakyslá nebo nasládlá, typická, cizí příchutě vyloučeny.
4. **Dobrá** – chuť a vůně typická pro smetanový tavený sýr s odchylkami ne zásadního charakteru, avšak charakteristická a čistá pro deklarovaný druh.
5. **Méně dobrá** – výskyt cizích příchutí ve velmi malé intenzitě, méně harmonická, slabě nahořklá nebo slanější, slabá příchutě po tavicích solích, mírně kyselejší, dílčí odchylky v chuti, slabě nečistá, slabě kvasničná.
6. **Nevyhovující** – výskyt cizích příchutí, méně harmonická, nahořklá, slanější, příchutě po tavicích solích, kyselejší, mírně oxidovaná, dílčí odchylky v chuti, mírně nečistá, mírně kvasničná.
7. **Nepřijatelná** – nečistá, žluklá, slaná, hořká, cizí, netypická, silně oxidovaná (žluklá), zatuchlá, kvasnicová, ostře kyselá aj.

## Celkové hodnocení

1. **Vynikající** - chuť a vůně musí mít hodnocení vynikající, ve všech ostatních relevantních ukazatelích ne hůře než výborný.
2. **Výborný** - chuť a vůně musí mít hodnocení ne horší než výborný, ve všech ostatních relevantních ukazatelích ne hůře než velmi dobrý.
3. **Velmi dobrý** - chuť a vůně musí mít hodnocení ne horší než velmi dobrý, ve všech ostatních relevantních ukazatelích ne hůře než dobrý.

4. **Dobrý** - chuť a vůně musí mít hodnocení ne horší než dobrý, ve všech ostatních ukazatelích ne hůře než méně dobrý.
5. **Méně dobrý** - tavený sýr hodnocený ve všech ukazatelích ne hůře než méně dobrý.
6. **Nevyhovující** - tavený sýr hodnocený ve všech ukazatelích ne hůře než nevyhovující.
7. **Naprosto nevyhovující** - tavený sýr, který je u jakéhokoliv ukazatele hodnocen jako naprosto nevyhovující.



## PŘÍLOHA P X: PROTOKOL PRO SENZORICKÉ HODNOCENÍ TAVENÝCH SÝRŮ

**Jméno:**

**Datum a hodina:**

**Podpis:**

Úkol 1 - Sensorické hodnocení pomocí stupnic (zapište zvolený stupeň)

Tavený sýr	Znak				
	Vzhled a barva	Lesk	Konzistence	Chuť a vůně	Celkové hodnocení
A					
B					
C					
D					
E					
H					

Úkol 2 - Pořadové testy intenzity znaků

Seřaďte následující vzorky podle intenzity znaku (1 – vzorek nejméně tuhý, 6 – nejtušší vzorek pro tuhost; 1 – vzorek nejméně roztíratelný, 6 – nejvíce roztíratelný pro roztíratelnost, dva a více vzorků nesmí mít stejné pořadí)

Znak	Tavený sýr					
	A	B	C	D	E	H
Tuhost						
Roztíratelnost						

### Úkol 3 – Pořadový preferenční test

Seřad'te následující vzorky podle Vašich preferencí (1 - nejlepší, 6 – nejhorší, dva a více vzorků nesmí mít stejné pořadí)

Znak	Tavený sýr					
	A	B	C	D	E	H
Preference						

Tavený sýr	Poznámky
A	
B	
C	
D	
E	
H	

## Inhibiční působení 1-monoacylglycerolů na bakterie

RNDr. LEONA BUŇKOVÁ, Ph.D.,

Bc. KRISTÝNA JANEČKOVÁ,

Bc. JAN NAVRÁTIL,

Bc. DORA JURČOVÁ,

Mgr. IVA DOLEŽÁLKOVÁ,

doc. Ing. RAHULA JANIŠ, CSc.,

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky,  
Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati  
ve Zlíně



RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

### Úvod

**P**roblematika údržnosti potravin a potravinových surovin je v současné době v popředí zájmu zástupců průmyslu, obchodu i vědeckých týmů. Jejich snahou je hledat neustále nové prostředky, které by napomohly k potlačení růstu nežádoucích mikroorganismů v potravinách. Za tímto účelem jsou vyhledávány látky, které by mohly inhibičně působit na mikroorganismy. V ideálním případě by tyto látky měly být součástí potravin nebo by dokonce mohly zlepšovat jejich vlastnosti. Příkladem takových látek mohou být právě monoacylglyceroly (MAG).

Monoacylglyceroly (starší název monoglyceridy) jsou parciální estery trojsytného alkoholu glycerolu s vyššími mastnými kyselinami. Estery glycerolu, mezi které MAG patří, jsou významnou skupinou lipidů. Monoacylglyceroly vznikají substitucí jednoho vodíku hydroxylové skupiny glycerolu zbytkem mastné kyseliny (acylem). Mohou se tedy vyskytovat ve dvou izomerních formách, jako 1-monoacylglyceroly a 2-monoacylglyceroly. Monoacylglyceroly mají povahu povrchově aktivních látek, jejichž vlastností je schopnost snižovat povrchové napětí.

Monoacylglyceroly nacházejí uplatnění hlavně při technologickém zpracování margarínů, mražených smetanových krémů a pekárenských výrobků. Monoacylglyceroly lze rovněž použít při výrobě masných výrobků, a to tepelně opracova-

ných i neopracovaných. Pekárenský průmysl a výroba těstovin jsou dalšími obory, kde monoacylglyceroly pro svou schopnost interakce s proteiny mouky nachází své uplatnění. Výsledkem je zlepšení konzistence kynutých těst. Nověji se monoacylglyceroly využívají při výrobě nízkotučných produktů a instantních pokrmů.

Zájem o studium monoacylglycerolů se v posledních letech zvýšil. Kromě možnosti jejich přípravy se zájem týká i možných aplikací, protože tyto látky mají řadu vlastností, pro které nacházejí široké uplatnění v nejrůznějších oblastech lidské činnosti. V potravinářském průmyslu se monoacylglyceroly využívají velmi často pro své emulgační vlastnosti.

Výhodou monoacylglycerolů je, že se jedná o látky biokompatibilní a biodegradabilní a zároveň nemají iritující účinky. Jsou také dobře tolerovány kůží i sliznicí. Z tohoto důvodu je lze využít ve farmaceutickém průmyslu jako součásti transportních gelů farmak do organismu. Pro tyto účely se využívají MAG obsahující nenasycené mastné kyseliny nebo mastné kyseliny se středně dlouhým uhlíkatým řetězcem, které zároveň zlepšují resorpci léčiv ve tkáních. Farmaceutické preparáty obsahující mikrobicidní lipidy na bázi MAG jsou rovněž testovány jako přípravky zabráňující přenosu patogenních mikroorganismů na sliznicích nebo k léčbě již diagnostikovaných slizničních a kožních infekcí. Monoacylglyceroly našly uplatnění i v zubním lékařství. Při aplikacích v kosmetice se využívají monoacylglyceroly, protože jsou stabilní v přítomnosti aktivních substancí, vykazují stabilitu vůči vzdušné oxidaci, mají dobré emulgační, lubrikační a měkčící vlastnosti a jsou bez výrazného zbarvení a zápachu.

V poměrně nedávné době bylo zjištěno, že monoacylglyceroly mohou působit proti růstu a množení některých mikroorganismů. Tím se rozšířily možnosti jejich využití, a to nejen v potravinářském průmyslu, ale také v průmyslu farmaceutickém a v medicíně, nebo také v průmyslu textilním a obuvnickém. Monoacylglyceroly mohou být také využívány v kosmetice jako stabilizátory nejrůznějších přípravků.

Inhibiční účinky mastných kyselin, jejich solí nebo esterů jsou známy dlouhou dobu. Antimikrobní aktivita mastných kyselin a monoacylglycerolů je závislá na počtu atomů uhlíku a na poloze a zastoupení dvojných vazeb v řetězci mastných kyselin. Tyto látky mohou inhibovat růst vegetativních forem řady patogenních bakterií, sporulujících bakterií, virů nebo kvasinek. Složení potravin však může ovlivnit inhibiční aktivitu monoacylglycerolů i mastných kyselin. Určité složky potravin (např. škroby, sérový albumin, fosfolipidy, cholesterol) mohou s MAG reagovat, a tak snížit jejich inhibiční účinky na mikroorganismy. Navíc v některých potravinách může být použití inhibičních látek nevhodné, protože může v důsledku jejich přítomnosti docházet ke změnám organoleptických vlastností potravin.

Přesný mechanismus inhibičního působení MAG není dosud přesně popsán, má se však zato, že působí prostřednictvím svých mastných kyselin. Mastné kyseliny a jejich estery mají, na rozdíl od antibiotik, několik nespecifických mechanismů působení. Primárním cílem jejich útoku je cytoplazmatická membrána buněk. Ačkoliv mechanismus antibakteriálního působení mastných kyselin a jejich derivátů není doposud přesně znám, bylo zjištěno, že začleněním do struktury membrány způsobují deformace buněčné membrány, čímž porušují její vlastnosti polopropustné bariéry. Další z hypotéz se opírá o průnik mastných kyselin s krátkým a středně dlouhým řetězcem do bakteriálních buněk v nedisociované formě a jejich disociaci uvnitř buněk, což způsobí oxyselení buněčného obsahu. Snížení vnitrobuněčného pH tak může vést k inaktivaci intracelulárních enzymů. Inhibiční



aktivita MAG může být zvýšena působením teploty, kyselin, nisinu, NaCl nebo chelatačních činidel.

Cílem této studie bylo srovnat inhibiční účinky sedmi 1-monoacylglycerolů na vybrané grampozitivní a gramnegativní bakterie, které reprezentují patogenní mikroorganismy a/nebo mikroorganismy podílející se na kažení potravinářských produktů.

### Metodika práce

Vliv 1-monoacylglycerolů na růst bakterií byl sledován s použitím přístroje TECAN Sunrise TW/TC (TECAN, Rakousko). Růst bakterií byl pozorován na mikrotitračních destičkách po dobu 24 hodin při teplotě 25 °C a byl hodnocen jako změna optické denzity (OD) suspenze buněk. Nárůst bakterií byl měřen při vlnové délce 600 nm v 30minutových intervalech. Přístroj byl řízen pomocí software Magellan.

Do každé z jamek mikrotitrační destičky byl pipetován vzorek v celkovém objemu 255 µl, a to 250 µl kultivačního média s příslušnou koncentrací 1-monoacylglycerolu a 5 µl 24hodinové suspenze bakterií. Růst buněk byl u všech testovaných bakterií sledován při následujících koncentracích MAG: 25 mg/l, 50 mg/l, 100 mg/l, 250 mg/l, 500 mg/l, 1000 mg/l a 1500 mg/l (w/v). Jako pozitivní kontrola byly použity jamky, do kterých bylo pipetováno 250 µl kultivačního média bez příslušného monoacylglycerolu a 5 µl suspenze bakterií. V případě negativní kontroly bylo do jamek pipetováno 255 µl bujónu obsahujícího MAG v příslušné koncentraci bez buněčné suspenze. U všech koncentrací MAG, včetně kontrol, byl růst sledován minimálně ve 2 jamkách mikrotitrační destičky. Z naměřených hodnot optické denzity byl vypočítán průměr a poté byly sestrojeny růstové křivky. Změny růstu bakterií v prostředí s monoacylglyceroly byly hodnoceny jako index růstu (IR):

$$IR = \frac{(OD_{600} - NK)}{PK} \cdot 100$$

kde IR je index růstu,  
 OD<sub>600</sub> hodnota optické denzity testované kultury v médiu s příslušnou koncentrací MAG,  
 NK optická denzita negativní kontroly pro příslušnou koncentraci MAG,  
 PK optická denzita pozitivní kontroly.

Testliže byl zaznamenán index růstu kolem 100 %, rostly bakterie v přítomnosti MAG prakticky stejně jako v bujónu bez aplikované látky. Pokud se hodnota IR významně snižovala, došlo k inhibici růstu, přičemž při hodnotě 0 % lze hovořit o úplné inhibici růstu. Hodnoty vyšší než 100 % ukazují na lepší růst bakterií v přítomnosti MAG (aplikované látky) než v prostředí kultivačního média (bujónu).

### Výsledky a diskuze

Pro testování inhibičních účinků 1-monoacylglycerolů byly použity MAG, které byly vyrobeny na Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky Fakulty technologické UTB ve Zlíně. Použité 1-monoacylglyceroly obsahovaly nasycené mastné kyseliny se sudým počtem uhlíků v řetězci, které jsou běžné součástí živých organismů (kyseliny kaprylová – 8 uhlíků v řetězci, kaprinová – 10 uhlíků v řetězci, laurová – 12 uhlíků v řetězci, myristová – 14 uhlíků v řetězci a palmitová – 16 uhlíků v řetězci), a dále dvě nefyziologické mastné kyseliny, nasycenou a nenasyčenou mastnou kyselinu s 11 uhlíky

(kyseliny undekanová a undecenová). Pro srovnání možných inhibičních účinků byly všechny 1-monoacylglyceroly testovány u celého souboru bakterií v rozmezí koncentrací 25–1500 mg/l. Vliv monoacylglycerolů byl sledován u pěti grampozitivních bakterií (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus* a *Staphylococcus aureus*) a pěti gramnegativních bakterií (*Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica* ser. Enteritidis a *Pseudomonas aeruginosa*). Testované bakterie byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM). Bakterie byly voleny tak, aby soubor testovaných kmenů zahrnoval bakterie, které mohou způsobovat kažení potravin, a potenciálně patogenní bakterie. Mnohé z těchto bakterií jsou považovány za indikátory hygieny a jakosti potravin (např. zástupci rodů *Salmonella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Bacillus* apod.).

Z výsledků experimentů vyplývá, že gramnegativní bakterie nejsou k účinkům zvolených 1-monoacylglycerolů příliš citlivé. Z testovaných gramnegativních bakterií byl vůči 1-monoacylglycerolům nejvíce odolný *Proteus mirabilis*, u něhož nebyla po 24hodinové kultivaci zjištěna v přítomnosti monoacylglycerolů inhibice růstu vyšší než 88 %. Z testovaných 1-monoacylglycerolů působil vůči růstu vybraných kmenů bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* (tj. *Escherichia*, *Citrobacter*, *Proteus* a *Salmonella*) nejvíce inhibičně MAG kyseliny kaprinové, u kterého byl zjištěn pokles indexu růstu u *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis a *Citrobacter freundii* o 93 %, pokud byl tento MAG aplikován do kultivačního média v koncentraci 1500 mg/l. K redukci růstu alespoň o 80 % došlo u testovaných kmenů enterobakterií po přidání MAG kyseliny kaprylové do živné půdy v koncentraci 1500 mg/l. U 1-monoacylglycerolu kyseliny undekanové, undecenové, laurové, myristové a palmitové nebyly zaznamenány výraznější inhibiční účinky vůči bakteriím čeledi *Enterobacteriaceae*. Tyto výsledky jsou v souladu s jinými autory, kteří rovněž nezaznamenali inhibiční působení monoacylglycerolů na enterobakterie.

Jako nejcitlivější gramnegativní bakterie se vůči působení MAG jevila *Pseudomonas aeruginosa*. Pokud byla tato bakterie kultivována v přítomnosti MAG kyseliny kaprinové a laurové o koncentracích 1500 mg/l, nebyl zaznamenán její růst. Další dva monoacylglyceroly – MAG kyseliny kaprylové a undecenové – rovněž výrazně snižovaly index růstu *P. aeruginosa*.

Grampozitivní bakterie byly k testovaným 1-monoacylglycerolům více citlivé než bakterie gramnegativní. Nejvíce odolné vůči působení monoacylglycerolů byly kmeny *Staphylococcus aureus* a *Enterococcus faecalis*. Z testovaných monoacylglycerolů vykazují nejlepší inhibiční účinky vůči růstu grampozitivních bakterií monoacylglyceroly kyseliny kaprinové, undekanové a laurové. Jako nejméně účinné se vůči testovaným kmenům grampozitivních bakterií jeví MAG kyseliny kaprylové a palmitové.

Po aplikaci MAG kyseliny kaprylové v nejvyšší testované koncentraci (1500 mg/l) do kultivačního média nebyl po 24 hodinách kultivace zaznamenán růst u bakterií *S. aureus*, *B. subtilis* a *E. faecalis*. U kmene *M. luteus* byla pozorována úplná inhibice růstu již při aplikaci tohoto MAG v koncentraci 1000 mg/l. U buněk *B. cereus* byl zjištěn růst buněk i po přidání MAG kyseliny kaprylové do média v nejvyšší zvolené koncentraci (Obr. 1–5).

MAG kyseliny kaprinové působil na testované bakterie v nižších koncentracích než MAG kyseliny kaprylové (Obr. 1–5). Nejméně odolný byl vůči působení MAG kyseliny kaprinové *M. luteus*, u něhož došlo k téměř úplné inhibici růstu po aplikaci tohoto MAG v koncentraci 50 mg/l. Růst *B. subtilis* byl inhibován monoacylglycerolem kyseliny kaprinové v koncentraci 100 mg/l, u *B. cereus* a *E. faecalis*



nebyl pozorován růst po aplikaci monokaprinu v koncentraci 250 mg/l a konečně u *S. aureus* v koncentraci 500 mg/l. K podobným výsledkům dospěli i jiní autoři.

Dalším testovaným monoacylglycerolem, obsahujícím nasycenou mastnou kyselinu se sudým počtem uhlíků v řetězci, byl MAG kyseliny laurové. Srovnáním koncentrací testovaných MAG, u kterých již nebyl zaznamenán růst mikroorganismů, lze konstatovat, že tento 1-monoacylglycerol vykazoval nejlepší inhibiční účinky vůči vybraným kmenům grampozitivních bakterií (Obr. 1–5). U *B. cereus* a *M. luteus* byla zjištěna téměř úplná inhibice růstu při aplikaci monoacylglycerolu kyseliny laurové v koncentracích 25 mg/l, u *B. subtilis* nebyl pozorován růst po přidání MAG kyseliny laurové do kultivační pudy v koncentraci 50 mg/l a u *S. aureus* v koncentraci 250 mg/l. Z literárních pramenů vyplývá, že inhibiční koncentrace monoacylglycerolu kyseliny laurové, které způsobují zastavení růstu *B. cereus* nebo *B. anthracis*, leží v rozmezí hodnot 25–70 mg/l, s těmito hodnotami korespondují i naše výsledky.

Dalším monoacylglycerolem, který vykazoval inhibiční účinky vůči růstu grampozitivních bakterií, byl MAG kyseliny myristové. U *M. luteus* bylo pozorováno téměř úplné zastavení růstu bakterií po aplikaci monoacylglycerolu kyseliny myristové v koncentraci 100 mg/l, růst *B. cereus* byl inhibován monoacylglycerolem kyseliny myristové v koncentraci 250 mg/l, *S. aureus* koncentrací 500 mg/l, *B. subtilis* koncentrací 1000 mg/l. MAG kyseliny myristové tedy vykazoval poměrně dobré inhibiční účinky na testované grampozitivní bakterie. Tyto výsledky jsou zajímavé zejména z toho důvodu, že působením MAG kyseliny myristové na růst bakterií se studie zabývají v menší míře než např. působením MAG s mastnými kyselinami s 8 až 12 uhlíky v řetězci.

U bakterií *E. faecalis* bylo zjištěno, že jejich růst je inhibován MAG kyseliny laurové v koncentracích 100–500 mg/l a MAG kyseliny myristové v koncentracích 250–1000 mg/l. Pokud však byly oba monoacylglyceroly na uvedený kmen aplikovány ve vyšších koncentracích, došlo pouze k redukci růstu buněk, avšak úplná inhibice pozorována nebyla. Jedním z možných vysvětlení tohoto zjištění je to, že se v populaci bakterií mohou vyskytovat mutantní buňky, u kterých je rezistence k MAG dána geneticky. Tyto výsledky tak mohou být v souladu s dalšími studiemi, ve kterých bylo zjištěno, že u mutantních kmenů *E. faecalis* je rezistence k MAG kyselině laurové dána změnami buněčného povrchu a MAG kyseliny laurové potom nemůže proniknout do buňky k možnému místu působení.

Posledním testovaným monoacylglycerolem s mastnou kyselinou se sudým počtem uhlíků byl MAG kyseliny palmítové. Působením tohoto MAG byla pozorována úplná inhibice růstu buněk pouze u *E. faecalis*, pokud byl tento MAG aplikován v koncentraci 1500 mg/l. K významnější inhibici růstu

došlo působením MAG kyseliny palmítové u *M. luteus*, kde byl růst buněk redukován o 95 % monoacylglycerolem o koncentraci 1500 mg/l. U ostatních sledovaných bakterií nebyly zjištěny významné inhibiční účinky na jejich růst ani v případě, kdy byl tento MAG aplikován v nejvyšší testované koncentraci (1500 mg/l).

Méně poznatků je prozatím známo o působení mastných kyselin s lichým počtem uhlíků nebo jejich MAG. Proto byly na souboru bakterií testovány i dva MAG, obsahující v řetězci nasycenou a nenasycenou kyselinu s 11 uhlíky. U monoacylglycerolu kyseliny undekanové došlo k zastavení růstu grampozitivních bakterií po působení MAG v koncentracích 25–250 mg/l, přičemž nejvíce byly k MAG kyseliny undekanové citlivé kmeny *M. luteus* a *B. subtilis*. U MAG kyseliny undecenové došlo s výjimkou *M. luteus* k zastavení růstu bakterií po aplikaci MAG v koncentracích 250–100 mg/l. U *M. luteus* byla zaznamenána téměř úplná inhibice růstu až po aplikaci MAG C11:1 v koncentraci 1500 mg/l.

Pokud srovnáme inhibiční účinky monoacylglycerolů obsahující mastné kyseliny se sudým a lichým počtem uhlíků, lze říci, že v inhibičním účinku na růst bakterií se příliš neliší, protože jako neúčinnější MAG vůči testovaným bakteriím byly vyhodnoceny MAG C10:0, MAG C11:0, MAG C12:0.

## Závěr

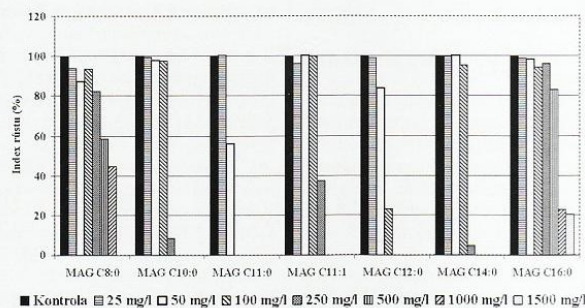
Testované grampozitivní bakterie byly citlivé zejména k 1-monoacylglycerolům obsahujícím v řetězci nasycené mastné kyseliny s 10 až 14 uhlíky (MAG kyseliny kaprinové, undekanové, laurové a myristové). Inhibiční účinky testovaných MAG vůči grampozitivním bakteriím lze podle minimálních inhibičních koncentrací a růstových parametrů seřadit následovně:

MAG-C12:0 > MAG-C11:0 > MAG-C10:0 > MAG-C14:0 > MAG-C11:1 > MAG-C8:0 > MAG-C16:0.

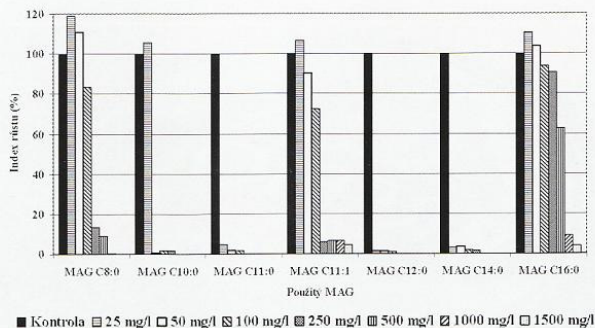
Použité 1-monoacylglyceroly nepůsobily s výjimkou nejvyšších aplikovaných koncentrací (1500 mg/l) na testované gramnegativní bakterie.

V této studii byly prováděny experimenty s vybranými 1-monoacylglyceroly, které působily inhibičně na testované sbírkové grampozitivní bakterie. Aby bylo možno rozšířit spektrum bakterií, na které MAG působí prokazatelně negativně, bude nutno testovat inhibiční účinky MAG v kombinaci s jinými látkami za účelem nalezení substancí, které by měly s MAG kumulativní inhibiční účinky vůči růstu a množení mikroorganismů. Jelikož je možné v budoucnu počítat s aktivním využíváním MAG v potravinových výrobcích, kam jsou v průběhu technologického postupu aplikovány startérové kultury, je nutné otestovat, zda MAG nemají negativní

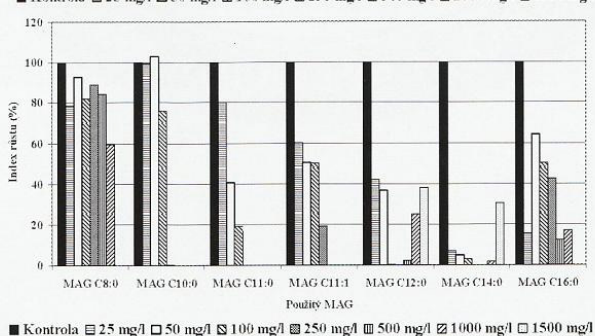
Obr. 1 Účinky vybraných 1-monoacylglycerolů na růst buněk *Staphylococcus aureus* po 24 hodinách kultivace



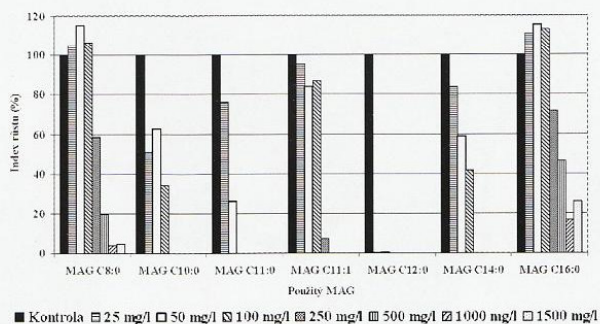
Obr. 2 Účinky vybraných 1-monoacylglycerolů na růst buněk *Micrococcus luteus* po 24 hodinách kultivace



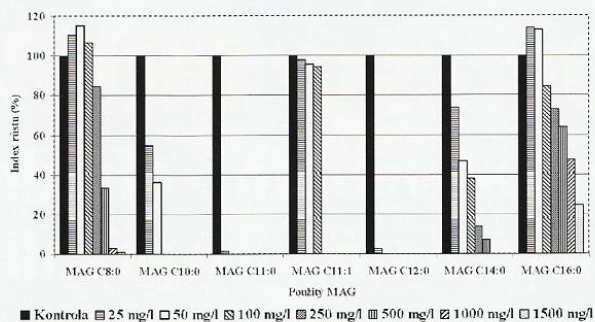
Obr. 3 Účinky vybraných 1-monoacylglycerolů na růst buněk *Enterococcus faecalis* po 24 hodinách kultivace



Obr. 4 Účinky vybraných 1-monoacylglycerolů na růst buněk *Bacillus cereus* po 24 hodinách kultivace



Obr. 5 Účinky vybraných 1-monoacylglycerolů na růst buněk *Bacillus subtilis* po 24 hodinách kultivace



vliv na používané starterové kultury. Lze také předpokládat, že v komplexní matici, jakou jsou potraviny nebo potravinové suroviny, bude nutno minimální koncentraci, která bude mít inhibiční efekt na přítomné mikroorganismy, zvýšit.

Literatura u autorů  
bunkova@ft.utb.cz  
Práce vznikla za podpory projektu MŠMT:  
MSM 7088352101. ■