

# Účinky monoacylglycerolů na růst *Bacillus* sp. v tavených sýrech

Bc. Jan Navrátil

---

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. Jan NAVRÁTIL**  
Osobní číslo: **T09584**  
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie a ekonomika výroby tuků, detergentů a kosmetiky**

Téma práce: **Účinky monoacylglycerolů na růst Bacillus sp. v tavených sýrech**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na charakteristiku tavených sýrů, jejich výrobu, složení a základní vlastnosti.
2. Zabývejte se mikrobiologií tavených sýrů. Popište mikroorganismy, které mohou tyto produkty kontaminovat a dále faktory ovlivňující růst a množení mikroorganismů v tavených sýrech.

### II. Praktická část

1. Sledujte růst sporulujících bakterií v tavených sýrech s různým obsahem tuku v sušině.
2. Sledujte vliv inhibičních látek acylglycerolového typu na růst sporulujících bakterií v matrici taveného sýra.
3. Popište vztah mezi růstem sporulujících bakterií a obsahem tuku v sušině.
4. Zhodnoťte využitelnost aplikovaných acylglycerolů pro prodloužení údržnosti tavených sýrů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] ABABOUC, L.H.; BOUQUARTACHA, F.; BUSTA, F.B. Inhibition of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells by fatty acids and glyceryl monododecanoate. *Food Microbiology*. 1994, 11, s. 327–336.
- [2] BERESFORD, T.P., FITZSIMONS, N. A., BRENNAN, N. L., COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*. 2001, 11, s. 259–274.
- [3] BLACKBURN, C. W. *Food spoilage microorganisms*. Boca Raton: CRC Press, 2006. 712 s. ISBN 0–849–391563.
- [4] BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., KRÁČMAR, S.: Základní principy výroby tavených sýrů. *Folia Univ. Agric. et Silv. Mendel. Brun.*, 2009, Vol. II, No. 6, 70 s. ISBN 978–80–7375–336–8.
- [5] FOX, P. F. *Cheese: Chemistry, Physics and microbiology*. 2nd edition. Gaithersburg : Aspen Publishers, Inc., 1999. 579 s. ISBN 0–412–535106.
- [6] JAY, J. M. *Modern Food Microbiology*. 6th edition. Gaithersburg : Aspen Publishers, Inc., 2000. 767 s. ISBN 0–8342–1671–X.
- [7] MANSOUR, M.; MILLIERE, J.B. An inhibitory synergistic effect of a nisin–monolaurin combination on *Bacillus sp.* vegetative cells in milk. *Food Microbiology*. 2001, 18, s. 87–94.

Vedoucí diplomové práce:

**RNDr. Iva Doležálková**

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

**25. února 2011**

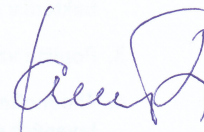
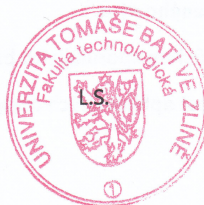
Termín odevzdání diplomové práce:

**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 výtěžku 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 přihlídí k výši výtěžku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## ABSTRAKT

Předložená práce se zabývá růstem sporulujících bakterií v taveném sýru s různým obsahem tuku v sušině a také inhibičním účinkem monoacylglycerolů a  $\iota$ -karagenanu v matrici taveného sýra. Modelové vzorky byly ihned po tavení zaočkovány kulturou *Bacillus cereus* a *Bacillus subtilis* a během skladování při  $6 \pm 2$  °C byl stanovován celkový počet mikroorganismů. Z výsledků vyplývá, že přídavek 0,15 % w/w monoacylglycerolu kyseliny undekanové (MAG C<sub>11:0</sub>) způsobil úplnou inhibici růstu testovaných bacilů. Sensorickou analýzou bylo prokázáno negativní ovlivnění chuti a vůně taveného sýra přídávkem 0,15 % w/w MAG C<sub>11:0</sub>. Ostatní použité monoacylglyceroly nevykazovaly takový inhibiční efekt a ani přídavek  $\iota$ -karagenanu neměl vliv na růst bakterií *B. cereus* a *B. subtilis*.

Klíčová slova: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, tavený sýr, monoacylglycerol,  $\iota$ -karagenan

## ABSTRACT

Present study is aimed at assessing the growth of spoilage bacteria in processed cheese with different fatness and antibacterial effect of monoacylglycerols and  $\iota$ -carrageenan in matrix of processed cheese. Model samples were inoculated with *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* immediately after melting operation and colony forming unit was determined during storage at  $6 \pm 2$  °C. Results indicate that 0,15 % w/w monoacylglycerol of undecanoic acid (MAG C<sub>11:0</sub>) inhibited both bacili strains tested. Negative impact on taste and smell was proven in processed cheese with 0,15 % w/w MAG C<sub>11:0</sub>. Other monoacylglycerols tested did not have significant inhibition effect to prevent the growth of spoilage microorganisms. Addition of  $\iota$ -carrageenan had no effect on the growth of bacteria *B. cereus* and *B. subtilis*.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, processed cheese, monoacylglycerols,  $\iota$ -carrageenan

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucí diplomové práce RNDr. Ivě Doležálkové za cenné rady a věcné připomínky při realizaci práce.

Poděkování patří rovněž doc. RNDr. Leoně Buňkové Ph.D. za poskytnutí cenných rad při provádění experimentální části práce a doc. Ing. Františkovi Buňkovi Ph.D. za pomoc při zpracování dat senzorické analýzy.

Také bych chtěl poděkovat zaměstnancům Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky a Ústavu technologie a mikrobiologie za vytvoření příjemného pracovního prostředí v laboratořích a taktéž zaměstnancům akreditované laboratoře pro vyšetřování potravin MVDr. Jana Šotoly.

# 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 SUROVINY PRO VÝROBU TAVENÝCH SÝRŮ.....	12
1.2 VÝROBA TAVENÝCH SÝRŮ.....	14
1.3 MIKROBIOLOGIE TAVENÝCH SÝRŮ.....	15
1.3.1 Vliv vodní aktivity .....	16
1.3.2 Vliv obsahu tuku .....	17
1.3.3 Vliv tavicích solí .....	18
1.3.4 Vliv pH a přítomnosti kyselin .....	18
1.3.5 Vliv ostatních přísad .....	19
1.3.6 Kontaminující mikroflóra.....	19
<b>2 BAKTERIE RODU <i>BACILLUS</i></b> .....	<b>22</b>
2.1 <i>BACILLUS CEREUS</i> .....	23
2.2 <i>BACILLUS SUBTILIS</i> .....	23
<b>3 MONOACYLGLYCEROLY</b> .....	<b>24</b>
3.1 VÝROBA MONOACYLGLYCEROLŮ .....	24
3.2 VLASTNOSTI MONOACYLGLYCEROLŮ .....	26
3.3 ANTIBAKTERIÁLNÍ ÚČINKY MONOACYLGLYCEROLŮ.....	27
<b>4 KARAGENANY</b> .....	<b>31</b>
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>33</b>
<b>5 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>34</b>
<b>6 MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>35</b>
6.1 TESTOVANÉ MIKROORGANIZMY .....	35
6.2 MONOACYLGLYCEROLY .....	35
6.3 KULTIVAČNÍ MÉDIA A ROZTOKY .....	35
6.4 PŘÍSTROJE A POMŮCKY:.....	36
6.5 METODIKA .....	37
6.5.1 Příprava bakteriální suspenze.....	37
6.5.2 Výroba vzorků taveného sýra.....	37
6.5.3 Stanovení celkového počtu mikroorganismů.....	39
6.5.4 Dekontaminace použitého zařízení a pomůcek.....	39
6.5.5 Měření vodní aktivity vzorků.....	39
6.5.6 Měření pH vzorků .....	40
6.5.7 Senzorická analýza vzorků.....	40
<b>7 VÝSLEDKY</b> .....	<b>41</b>



7.1	RŮST <i>BACILLUS</i> SP. V TAVENÝCH SÝRECH O RŮZNÉM OBSAHU TUKU V SUŠINĚ .....	41
7.2	VLIV PŘÍDAVKU MONOACYLGLYCEROLŮ NA RŮST <i>BACILLUS</i> SP. ....	43
7.2.1	Vliv monoacylglycerolu kyseliny undekanové.....	43
7.2.2	Vliv monoacylglycerolu kyseliny undecenové.....	45
7.2.3	Vliv monoacylglycerolu kyseliny 1-adamantankarboxylové .....	47
7.3	VLIV PŘÍDAVKU I-KARAGENANU NA RŮST <i>BACILLUS</i> SP. ....	48
7.4	SENZORICKÉ HODNOCENÍ .....	50
7.5	VODNÍ AKTIVITA VZORKŮ TAVENÝCH SÝRŮ .....	52
<b>8</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>53</b>
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>56</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>57</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>63</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>64</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>65</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>66</b>

## ÚVOD

Jedním z hlavních cílů při výrobě potravin je zamezit jejich kontaminaci, případně potlačit růst kontaminující mikroflóry. V minulosti byla vypracována celá řada konzervačních metod, ale i přesto jsou vyhledávány nové látky, které by inhibovaly růst mikroorganismů. Značné jsou však požadavky kladené na tyto látky. Neměly by mít negativní vliv na organoleptické vlastnosti potraviny a na lidský organizmus, měly by být přírodního charakteru a přídavek těchto látek by měl být minimální. Výsledky studií prováděných za laboratorních podmínek naznačují inhibiční účinek monoacylglycerolů vůči bakteriím, kvasinkám i plísním. V potravinách mohou monoacylglyceroly tvořit komplexy se složkami potravin a může tak být snížena jejich účinnost. Doposud jsou látky acylglycerolového typu využívány v potravinářském i kosmetickém průmyslu jako emulgátory. Uplatnění jako změkčovadla, maziva a antistatické prostředky našly i v jiných odvětví průmyslu.

I přesto, že během technologického postupu výroby tavených sýrů dochází k záhřevu (tavicí teplota 90 – 100 °C u diskontinuálního způsobu) a jsou usmrceny vegetativní formy mikroorganismů, k usmrcení bakteriálních spor nedochází. Díky hodnotám vnitřních faktorů (pH, vodní aktivita) mohou spory vyklíčit a bakterie mohou zapříčinit zhoršení organoleptických vlastností taveného sýra, případně mohou způsobit enterotoxikózy.

Cílem této práce bylo sledovat růst sporulujících bakterií rodu *Bacillus* v tavených sýrech s různým obsahem tuku v sušině. Převážná část experimentů byla věnována inhibičním účinkům monoacylglycerolů kyselin undekanové, undecenové a 1-adamantankarboxylové. V poslední fázi byl sledován růst bakterií v tavených sýrech s přídavkem ι-karagenanu. Vybrané vzorky (nekontaminované bakteriemi) byly podrobeny senzoričké analýze.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 TAVENÉ SÝRY

Výroba tavených sýrů se řadí k nejmladším mlékárenským technologiím, kdy první tavený sýr vyrobili v roce 1911 švýcarští obchodníci Walter Gerger a Fritz Stettler za použití citrátu sodného jako tavicí soli. Vedl je k tomu patrně rozvoj obchodování a potřeba získat stabilní produkt schopný transportu [1]. Kromě relativně dobré údržnosti je další výhodou tavených sýrů i snadná použitelnost [2]. S průmyslovou výrobou začala v roce 1917 americká firma Kraft a v roce 1923 firma Windemann v Norsku. Obě firmy začaly používat při výrobě také fosforečnan disodný [3].

Celosvětově patří tato skupina mlékárenských produktů k hojně konzumovaným a oblíbeným výrobkům. Česká Republika vede ve spotřebě tavených sýrů [4]. V letech 2001 – 2009 mírně poklesla průměrná spotřeba tavených sýrů z 2,9 kg na 2,4 kg na osobu za rok, ale i přesto češi konzumují nejvíce tavených sýrů. Pro srovnání spotřeba přírodních sýrů v ČR ve výše uvedených letech se pohybuje v rozmezí 7,2 – 11,1 kg na osobu za rok [5]. Ve vyspělých sýrařských zemích se spotřebuje daleko méně taveného sýra [6].

### 1.1 Suroviny pro výrobu tavených sýrů

Tavené sýry patří mezi výrobky, do jejichž surovinové skladby lze zahrnout velké množství surovin a přídatných látek a ovlivnit tak vlastnosti produktů. Pro výrobu jsou využívány přírodní sýry, tvaroh, máslo, smetana, pitná voda, tavicí soli, přísady ovlivňující chuť a barvu (koření, maso, zelenina), látky zlepšující vaznost vody (pektin, škrob, arabská guma), barviva, ochucovadla, konzervační látky a antioxidanty. Část přírodních sýrů lze nahradit mléčnými koncentráty (kasein a kaseináty, sušená syrovátka, sušené odstředěné mléko apod.) [7].

Základní surovinou jsou přírodní sýry. Dle vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 77/2003 Sb., v platném znění, musí 51 % hmotnosti sušiny pocházet z přírodního sýra. V České Republice se využívá Eidamská cihla a Eidamský blok, Moravský blok a méně využívaný je Primátor (z důvodu vyšší ceny) [4]. Výhodou je možnost využití přírodních sýrů s mechanickými vadami, které není možné použít pro přímý prodej. Do surovinové skladby se často zahrnují zralejší i mladší přírodní sýry a kombinují se tak jejich výhody [2]. Použití neproзраlé suroviny způsobuje tužší a gumovitější konzistenci taveného sýra. Směs je hůře tavitelná a hrozí nebezpečí bobtnání a tvorba vzduchových bublin díky vysoké visko-

zitě utavené směsi. Výhodou použití méně prozřálé suroviny je vysoká vaznost vody a využívá se při výrobě blokových a plátkových tavených sýrů [8]. Dobře vyzrálé přírodní sýry jsou nositelem plnosti chuti a vyrovnaného sýrového aroma. Díky tlaku na snížení nákladů a nižší prodejní cenu se velmi často nahrazuje část základní suroviny mléčnými koncentráty (sušená syrovátka, kasein a kaseináty), což ubírá na sensorické jakosti produktů [4].

Další surovinou je tvaroh. Používá se pro zvýšení obsahu tukuprosté sušiny taveného sýra a také do směsí velmi zralých přírodních sýrů, kde dodává tzv. intaktní kasein, u kterého neproběhla rozsáhlá proteolýza a který má podstatný vliv na stabilitu struktury taveného sýra i na jeho tuhost a roztíratelnost. Nezhydrolyzované bílkoviny napomáhají tvorbě stabilní proteinové matrice [2]. Krátké, příliš hydrolyzované peptidy způsobují tvorbu nestabilní emulze a může docházet k uvolňování vody [9].

Pro zvýšení obsahu tuku je do surovinové skladby zahrnuto máslo, případně smetana, která může výrobek i příjemně zjemnit. Zvýšením obsah tuku je narušována kompaktnost proteinové matrice a tavený sýr je méně tuhý a lépe roztíratelný [2].

Další surovinou při výrobě taveného sýra je pitná voda. jejímž přídavkem se upravuje obsah sušiny. Obdobně jako tuk i pitná voda narušuje proteinovou matici, působí jako změkčovadlo, zmírňuje tuhost a přispívá k lepší roztíratelnosti. S rostoucím obsahem vody se zvětšují tukové kuličky, což je důkazem zhoršené emulgace tuku [2].

Pro dosažení homogenní struktury finálního výrobku je nutný přídavek tavicích solí, které upravují prostředí tavené směsi tak, aby proteiny mohly uplatnit vlastnosti emulgátorů. Dochází k výměně iontů vápníku za ionty sodíku na proteinové matici a tím se zvyšuje rozpustnost kaseinu. Tavicí soli ovlivní i pH, které mírně zvyšují. Zvýší se i negativní náboj proteinů a rozrušení proteinové matrice vlivem odpudivé síly stejně nabitých částic zvýší vaznost vody [2]. Jejich přídavek se pohybuje v rozmezí 2 – 3 % a závisí na druhu, stáří a stupni zralosti přírodních sýrů [10]. Tavicí soli mohou být na bázi fosforečnanů či citranů. Fosforečnany jsou soli odvozené od kyseliny trihydrogenfosforečné a používají se především sodné soli. Draselné soli mohou způsobit hořkou chuť [2]. Fosforečnany využívané jako tavicí soli jsou uvedeny v následující tabulce.

Tab. 1- Fosforečnany používané při výrobě tavených sýrů [2]

E kód	látka	vzorec
E339	Dihydrogenfosforečnan sodný	$\text{NaH}_2\text{PO}_4$
	Monohydrogenfosforečnan sodný	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$
	Fosforečnan sodný	$\text{Na}_3\text{PO}_4$
E450	Dihydrogendifosforečnan sodný	$\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$
	Difosforečnan sodný	$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$
E451	Trifosforečnan sodný	$\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_7$
E452	Polyfosforečnan sodný	$(\text{NaPO}_3)_n$

Z citranů (soli kyseliny citronové) se využívají především trojsodné soli. Monosodná a disodná sůl způsobuje silné okyselení směsi a vzniká nestabilní emulze. Citrany mají vysokou pufrací schopnost a nízkou schopnost zvýšit hydrataci proteinů. Jsou využívány ve směsích především s polyfosforečnany a uplatnění našly při výrobě blokových a plátkových sýrů [2]. Přídavek citranů vede k získání lomivé konzistence taveného sýra [11].

## 1.2 Výroba tavených sýrů

Proces výroby tavených sýrů lze rozdělit do následujících kroků:

- ◆ výběr a příprava směsi:
  - výběr a mělnění přírodních sýrů,
  - výběr tavicích solí,
  - výběr a příprava dalších přísad,
- ◆ vlastní proces zpracování:
  - tavení připravené směsi,
  - balení, chlazení, skladování a expedice [12].

Na výběru správného typu a množství přírodních sýrů závisí požadované složení taveného sýra, jeho textura a funkční vlastnosti. Zpravidla se tavené sýry vyrábí z různých typů přírodních sýrů pro dodání požadované chuti a struktury. Ale v některých zemích je oblíbený tavený sýr vyrobený z jednoho druhu sýra například čedar v Austrálii, Ementál v USA, Kanadě, Francii a Německu. Obecně platí, že při použití tvrdých a polotvrdých sýrů dosta-

neme tužší tavené sýry než při použití plísňových sýrů. Pro zvětšení povrchu a usnadnění interakce mezi sýrem a ostatními složkami jsou přírodní sýry před tavením rozkrájeny a rozemlety. Tím se také urychlí prostup tepla a zvýší homogenita [13].

Složení směsi tavicích solí se odvíjí od charakteru přírodních sýrů (druh, stupeň zralosti, pH apod.). Dále bereme v úvahu i ostatní suroviny, požadovanou konzistenci finálního produktu, typ výrobního zařízení a balení. Kromě správného složení solí je důležité i správné množství, kdy předávkování může mít za následek změnu konzistence či změnu chuti (hořká pachut') [2].

Vlastní tavení probíhá v tavicím kotli. Do něj se nadávkují rozmělněné přírodní sýry, tavicí soli a ostatní suroviny a za sníženého tlaku a neustálého míchání směsi dochází k zahřívání. Alternativou může být "předsmísení" přírodních sýrů s tavicími solemi, vodou a vybranými přísadami a dávkování do tavicího kotle [13]. V tavicím kotli dochází v relativně krátkém čase k vzestupu teploty na tzv. tavicí teplotu, která se v praxi pohybuje v rozmezí 90 – 100 °C. Při této teplotě je směs udržována několik minut. Směs je zpravidla ohřívána přímým vstříkem páry a při sestavování surovinové skladby je nutno zohlednit zkondenzovanou vodu [2]. Tepelné zpracování má zajistit zdravotní nezávadnost, prodloužit údržnost produktu a napomáhá fyzikálně-chemickým změnám, které transformují směs ve finální výrobek požadované konzistence [13].

Co nejdříve po utavení by se měl tavený sýr balit. Teplota by neměla klesnout pod 60 °C. Sníží se tak pravděpodobnost kontaminace mikroorganismy [2] a sýr je v polotekutém stavu, což umožní vyplnění celého obalu a jeho snadnější přilnutí [14]. Většinou se balí do lakovaných hliníkových fólií, ale používají se i tuby, kelímky, sklenice, kovové obaly [2], plastová salámová střívka a plastové fólie [14]. Po zabalení se tavený sýr vychladí a skladuje se při 4 – 8 °C. Shär a Bosset [15] uvádí trvanlivost do 3-4 měsíců pro tavené sýry v plastových fóliích a pro výrobky v kovových obalech je tato doba ještě delší dokonce i jeden rok. Během této doby může docházet ke ztrátám vody, tvorbě krystalů, neenzymatickému hnědnutí a k interakcím s obalovým materiálem.

### 1.3 Mikrobiologie tavených sýrů

Tavené sýry mohou být kontaminovány mikroorganismy, které pocházejí ze suroviny a přežívají procesy zpracování a nebo které pocházejí ze sekundární kontaminace. Ačkoli



jsou přírodní sýry považovány za relativně bezpečné potraviny, mohou se v nich vyskytovat patogenní bakterie [13]. Kromě toho je třeba dbát na čistotu vedlejších surovin, které mohou být zdrojem mikrobiálního znečištění, i když se v původním stavu nekadí [16]. Během technologického procesu výroby tavených sýrů dochází k tepelnému opracování (do 100 °C u diskontinuálního způsobu), což usmrtí většinu vegetativních forem bakterií, kvasinky a plísně. Bakteriální spory záhřev přežívají a jejich germinace může být podpořena právě teplotním záhřevem [2] [13]. Přítomnost nesporelujících mikroorganismů značí sekundární kontaminaci. Nejčastější příčinou je balení taveniny při nižší teplotě, dále je nutné dbát na jakost obalového materiálu, dodržení hygienických podmínek během výroby a podmínek skladování [2]. Mikrobiální jakost tavených sýrů je ovlivněna vodní aktivitou, obsahem tuku, přítomností tavicích solí, pH a přítomností kyselin a jiných přísad [2] [17].

### 1.3.1 Vliv vodní aktivity

Vodní aktivita ( $a_w$ ) je definovaná jako poměr tlaku vodních par nad potravinou ku tlaku vodní páry nad čistou vodou při stejné teplotě. U většiny čerstvých potravin neklesá pod 0,99 [18]. Pro tavené sýry je uváděna hodnota 0,94 – 0,96 (0,91 – 0,93 pro plátkové tavené sýry) [17]. Bakterie jsou schopny růstu při hodnotách vodní aktivity nad 0,91, plísně nad 0,8, halofilní bakterie nad 0,75 a osmofilní kvasinky rostou i při 0,61 [18]. V tabulce 2 jsou uvedeny minimální hodnoty vodní aktivity pro vybrané mikroorganismy.

Tab. 2- Přibližné minimální hodnoty  $a_w$  [18]

mikroorganismus	$a_w$
<i>Cl. botulinum</i> , typ E	0,97
<i>Pseudomonas</i> sp.	0,97
<i>Escherichia coli</i>	0,96
<i>Bacillus subtilis</i>	0,95
<i>Cl. botulinum</i> , typ A a B	0,94
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0,94
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,86
<i>Penicillium patulum</i>	0,81
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	0,62

Rozsah hodnot vodní aktivity, při které jsou mikroorganismy schopny růstu, závisí na teplotě a přítomnosti růstových faktorů. Při optimální teplotě je rozsah největší a také přítomnost živin zvyšuje schopnost růstu ve větším rozsahu vodní aktivity [18].

Při snížení vodní aktivity pod optimum dochází k prodloužení lag fáze, snížení růstové rychlosti a hustoty bakteriální suspenze [2]. Kromě vlastní hodnoty vodní aktivity záleží i na charakteru látky, která byla pro snížení vodní aktivity použita. Při použití sacharózy nebo chloridu sodného je minimální hodnota  $a_w$  pro germinaci spor *Clostridium perfringens* mezi 0,97 a 0,95. Pokud je použit glycerol, je hodnota snížena na 0,93. Germinaci spor *Bacillus* sp. nejvíce inhibuje snížení  $a_w$  pomocí chloridu sodného či vápenatého, méně glukóza a sorbitol a nejméně glycerol a etylenglykol [18].

Proti účinku nízké vodní aktivity se mikroorganismy brání hromaděním nejrůznějších rozpustných látek a tím vyrovnávají rozdíl v osmotickém tlaku uvnitř a vně buňky. *Staphylococcus aureus* akumuluje prolin a zvyšuje syntézu glutaminu. Hromaděním prolinu se brání osmotickému tlaku také *Escherichia coli* a *Salmonella* Typhimurium. Osmofilní kvasinky hromadí vícemocné alkoholy [18].

### 1.3.2 Vliv obsahu tuku

Obsah tuku taveného sýra může mít vliv na růst mikroorganismů. Méně tučné sýry mohou být pro bakterie méně příznivým prostředím. U bakterií *Listeria monocytogenes* a *Salmonella* sp. byl pozorován rychlejší pokles celkového počtu buněk v sýrech, v nichž byl snížen obsah tuku o 50 %, ve srovnání se sýry, u kterých nebyl obsah tuku redukován [19]. Při nižším obsahu tuku je také snížena produkce botulotoxinu v tavených sýrech. Nízkotučné sýry jsou tedy z tohoto hlediska bezpečnější než výrobky s vyšším obsahem tuku [20].

Existuje několik možných vysvětlení pro intenzivnější růst bakterií v prostředí s vyšším obsahem tuku. Tuk může zajistit bakteriím mikroprostředí, které je chrání před účinky inhibičních látek ve vodné fázi. Pravděpodobnějším mechanismem je interakce lipofilních částí antimikrobiálních látek spíše s molekulami tuku než s fosfolipidy buněčné membrány bakterií. Takto může být snížen účinek nisinu, volných mastných kyselin, kyseliny sorbové a sorbanu draselného [17].

### 1.3.3 Vliv tavicích solí

Fosforečnany, využívané jako tavicí soli, působí inhibičně především proti grampozitivním bakteriím, některým plísním a kvasinkám. U citranů byly pozorovány menší antibakteriální účinky. Inhibiční efekt je závislý na délce řetězce fosforečnanů, teplotě, pH či přídavku iontů kovů [2]. Fosforečnany s delšími řetězci inhibují více než fosforečnany s kratšími řetězci. Jejich antimikrobiální aktivita spočívá ve vazbě bivalentních iontů, především vápenatých a hořečnatých, které jsou esenciální pro udržení integrity buněčné stěny. Navíc jsou tyto ionty nedostupné pro některé fyziologické procesy růstu [21].

Antimikrobní působení fosforečnanů je ovlivněno i hodnotou pH. V prostředí s vyšším pH roste i tvorba komplexů a dostupnost hořečnatých a vápenatých iontů pro bakterie se zhoršuje. Při nízkém pH dochází k protonizaci vazebných míst a tím i k poklesu vazby iontů [22].

Přídavek polyfosforečnanů způsobuje výrazné prodloužení buněk *Bacillus cereus*, které mohou mít až tvar vláken. Také byla u této bakterie pozorována neschopnost tvorby septa při dělení v přítomnosti polyfosforečnanů [23]. Polyfosforečnany inhibují také růst bakterií rodu *Clostridium*. Růst *Clostridium perfringens* je inhibován daleko vyššími koncentracemi, než jsou potřebné pro inhibici ostatních bakterií, ale nižší koncentrace polyfosforečnanů u této bakterie potlačují proces sporulace a germinace spor [24]. Inhibice růstu vlivem polyfosforečnanů byla prokázána také u *Cl. sporogenes*, *Cl. botulinum*, *Cl. tyrobutyricum* a z bakterií s buněčnou stěnou gramnegativního typu u *Aeromonas hydrophila* [2].

### 1.3.4 Vliv pH a přítomnosti kyselin

Tavené sýry vykazují pH v rozmezí hodnot 5,6 – 6,0. Většina mikroorganismů nejlépe roste v neutrálním prostředí při pH 6,6 – 7,5 a pouze malá část bakterií je schopna rozmnožování pod pH 4,0. Hodnota pH tavených sýrů je tedy pro růst mnohých mikroorganismů příznivá [2]. Jejich růst je možné inhibovat přídavkem kyselin. Přídavkem kyseliny propionové lze inhibovat růst *Bacillus subtilis* při pH 6,0. Při nižší pH působí i proti kvasinkám a plísním [25]. Kromě kyseliny propionové působí inhibičně i její soli. Propionan vápenatý vykazuje inhibiční účinky vůči *B. subtilis* a *Listeria monocytogenes*, propionan sodný proti *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum* a *Listeria monocytogenes*. Efektivní koncentrace nepřesahují 1 % [2].

Inhibiční účinek vykazuje i kyselina mléčná a její sodné a draselné soli. Přídavek 1,5 % mléčnanu sodného do taveného sýra významně snižuje produkci botulotoxinu [20]. Růst *Clostridium botulinum* lze inhibovat také pomocí kyseliny octové nebo citronové [2].

Antimikrobiální aktivitu vykazují i mastné kyseliny. Jejich účinek je závislý na délce řetězce a počtu dvojných vazeb v řetězci a lze jej zvýšit přidavkem etylendiamintetraoctové kyseliny, eugenolu nebo citranu sodného [21].

### 1.3.5 Vliv ostatních přísad

Kontaminující mikroflóru tavených sýrů může inhibovat nizin, lysozym nebo produkty Maillardových reakcí.

Nisin produkují mnohé kmeny *Lactococcus lactis*. Je účinný především proti bakteriím s buněčnou stěnou grampozitivního typu. Tato látka se váže na fosfolipidy cytoplazmatické membrány a způsobuje tak porušení její propustnosti. Také brání germinaci spor a zvyšuje jejich citlivost vůči působení tepla [17].

Lysozym, enzym přítomný v mléce a vejcích, způsobuje degradaci buněčné stěny. Nejvyšší aktivitu vykazuje proti bakteriím s buněčnou stěnou grampozitivního typu. Jeho účinek může zvýšit přídavek etylendiamintetraoctové kyseliny. U přírodních sýrů je využíván jako prevence pozdního duření sýrů [17].

Některé melanoidy, produkty Maillardových reakcí, vykazují antibakteriální, antioxidační účinek a snižují aktivitu trypsinu. Reakční produkt Maillardových reakcí získaný ze směsi glukózy a glycinu inhibuje růst *Aeromonas hydrophila*, ale není účinný proti *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* a *Salmonella Typhimurium* [17].

### 1.3.6 Kontaminující mikroflóra

Primární kontaminaci tavených sýrů způsobují sporotvorné bakterie rodu *Clostridium* (*C. botulinum*, *C. butyricum*, *C. perfringens*, *C. sporogenes*, *C. tyrobutyricum*) a bakterie rodu *Bacillus* (*B. cereus*, *B. subtilis*, *B. coagulans*, *B. mycoides*). Sekundárními kontaminanty tavených sýrů mohou být *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* a plísně rodu *Penicillium* a *Cladosporium*. Příležitostně mohou být izolovány i termorezistentní plísně např. *Bysochlamis fulva* [2],[17].

### **Rod *Clostridium***

Bakterie rodu *Clostridium* tvoří rovné nebo mírně zakřivené tyčinky, uspořádané po dvojicích, případně v krátkých řetízcích. Jsou obligátně anaerobní, ale některé druhy jsou tolerantní ke kyslíku. Tvoří kulaté až oválné spory ztlušující buňku. Běžný je výskyt v půdě, mořských sedimentech, rozkládajících se rostlinných materiálech, živočišných a rostlinných produktech a ve střevním traktu člověka. [26]. Rod je značně heterogenní a zahrnuje mezofilní, psychofilní i psychrotrofní kmeny. V potravinách většinou uplatňují svoji sacharolytickou, proteolytickou a některé druhy i lipolytickou aktivitu, což se může projevit změnou pH, produkcí plynu a tvorbou nežádoucího aroma (produkce kyseliny máselné). Některé kmeny jsou pro člověka patogenní, především *C. botulinum* a *C. butyricum*, které produkují botulotoxin, a *C. perfringens* [2]. Patří mezi nejčastější kontaminanty tavených sýrů [17].

### ***Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* má buňky sférického tvaru, vyskytující se jednotlivě, po dvojicích nebo v nepravidelných shlucích. Je fakultativně anaerobní a roste i v přítomnosti 10 % chloridu sodného. Optimální růstová teplota je v rozmezí 30 – 37 °C [26], ale je schopen růstu i při 7 °C [17]. Vyskytuje se především na kůži a sliznicích zvířat, v půdě a vzduchu. Tvoří hemolysin a fosfolipázu C [27] a poměrně termostabilní enterotoxin [28].

### ***Listeria monocytogenes***

Buňky *Listeria monocytogenes* jsou krátké tyčinky občas kokovitého tvaru, vyskytují se jednotlivě či vytváří krátké řetízky. Starší kultury mohou tvořit dlouhá vlákna. Optimální růstová teplota je 30 – 37 °C. V prostředí je tato bakterie velice rozšířená a je patogenní pro člověka a zvířata [26]. Často bývá izolována ze syrového mléka, kontaminuje potravní systémy a chladírenská zařízení. V tavených sýrech byl zaznamenán pokles počtu životaschopných buněk během skladování při 5, 22 i 30 °C [2].

***Salmonella sp.***

Bakterie rodu *Salmonella* jsou fakultativně anaerobní pohyblivé tyčinky s buněčnou stěnou gramnegativního typu. Rostou při pH vyšší než 4 s optimální hodnotou v rozmezí 6,6 – 8,2 a optimální teplotou růstu 35 – 37 °C. Primárně se tyto bakterie vyskytují ve střevním traktu hospodářských zvířat, odkud mohou kontaminovat potraviny. Alimentární onemocnění způsobené bakteriemi rodu *Salmonella* bývá spojováno převážně s vejci, vaječnými produkty a drůbeží [18]. Často bývá detekována v syrovém mléce [2].

***Escherichia coli***

*Escherichia coli* je fakultativně anaerobní tyčinka schopná růstu v širokém rozmezí teplot 15 – 45 °C s optimem 37 °C. Escherchie primárně osídlují střevní trakt živočichů [29]. Heterofermentativním zkvašováním laktózy způsobují rané duření sýrů a působí inhibičně na růst mléčných koků [28]. Z hygienického hlediska mají v potravinářství velký význam, protože jsou podmíněně patogenní a také se využívají jako indikátorové mikroorganismy. Jejich přítomnost v potravine indikuje přítomnost střevních patogenů dále poukazuje na nedostatečnou hygienu a sanitaci při výrobě [30].

## 2 BAKTERIE RODU *BACILLUS*

Buňky bakterií rodu *Bacillus* jsou aerobní nebo fakultativně anaerobní tyčinky se zakulacenými nebo čtvercovými konci s buněčnou stěnou grampozitivního typu. Díky přítomnosti bičíků v peritrichálním uspořádání jsou pohyblivé. Bakterie rodu *Bacillus* se vyznačují širokou diverzitou fyziologických schopností. Optimální teplota se pohybuje v rozmezí 15 – 55 °C [26]. Některé termofilní kmeny rostou i při 65 °C [31] a psychrotrofní kmeny jsou schopny růstu při teplotách nad 1 °C [2]. Dobře rostou v rozmezí pH 5,5 – 8,5 [34].

Důležitým znakem tohoto rodu je schopnost tvorby nejvýše jedné endospory, která je velmi rezistentní k mnoha nepříznivým podmínkám prostředí. Spora je kulatého nebo oválného tvaru, může zduřovat mateřskou buňku a může být umístěna centrálně, paracentrálně, subterminálně, terminálně nebo laterálně. energii pro sporulaci získává buňka oxidací zásobních lipidů z cytoplazmy a sporulace tedy probíhá pouze za přítomnosti kyslíku [32]. Ke germinaci spor nejsou u většiny druhů vyžadovány žádné aktivační faktory [26]. Spory, ale i vegetativní buňky se hojně vyskytují v půdě (až 10<sup>6</sup> spor v 1 g) [31], vodě a mořských sedimentech (dokonce i v hlubinách), často bývají izolovány z rostlin a zvířat [33] a psychrofilní kmeny byly izolovány z mléka a smetany [2].

Za obligátně patogenní druh je považován pouze *Bacillus anthracis*, původce antraxu. Enterotoxikóxy jsou vyvolány toxiny, jejichž producentem je nejčastěji *B. cereus*, méně často některé kmeny *B. subtilis*, *B. pumilis*, *B. licheniformis*. I když jsou tyto alimentární otravy snadno identifikovatelné díky rychlému počátku, odeznění příznaků je poměrně rychlé a nakažení lidé se často obejdou bez určení diagnózy a lékařského ošetření [33]. Většina příslušníků rodu je považována za nepatogenní nebo oportunně patogenní a uplatňují se spíše u osob se sníženou imunitou. Mohou vyvolat infekce ran, sepse, endokarditidy, meningitidy či pneumonie. Významně se podílí na očních infekcích [32].

Díky hojnému výskytu v životním prostředí a schopnosti přežívat extrémní podmínky, jsou bacily častými kontaminanty potravin. Zástupci tohoto rodu tvoří část kontaminující mikroflóry na povrchu vemene a při dojení se dostávají do mléka. Spory jsou odolné k tepelné ošetření a poté mohou vyklíčit a nacházet se tak v nejrůznějších mlékárenských výrobcích. Z půdy a vzduchu se bacily dostávají na obilí a odtud do výrobků díky možnosti přežití teplot při pečení. Obdobně kontaminují i zeleninu a zeleninové výrobky, se spory rodu *Bacillus* se setkáme především u sušené zeleniny a koření [34].



## 2.1 *Bacillus cereus*

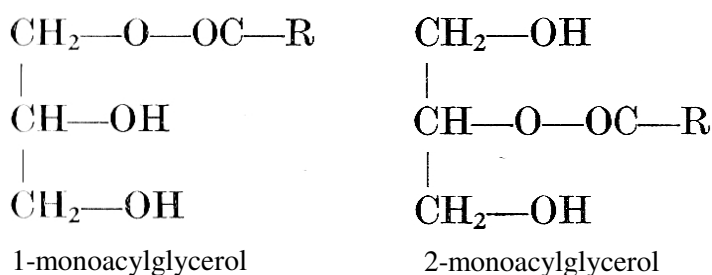
*Bacillus cereus* je nejběžnějším bacilem spojovaným s otravou z potravin. Způsobuje alimentární onemocnění dvojího typu. Méně běžná je otrava emetickým toxinem. Tento cyklický peptid je termostabilní a může se vyskytovat v potravinách, které byly tepelně ošetřeny a jsou negativní na přítomnost *B. cereus*. Doba od příjmu toxinu po objevení příznaků otravy je velmi krátká, často jen několik hodin a zřídka je delší než jeden den. Vyvolává nevolnost a zvracení [31],[33]. Zřídka se může objevit horečka a průjem ve spojení s tímto toxinem a byly popsány i případy selhání jater. Druhé a významnější je průjmové onemocnění. Jeho příčinou je enterotoxin, který působí v tenkém střevu. Ve skutečnosti se jedná o směs dvou a více proteinů s molekulovou hmotností 36 – 45 kDa. První příznaky se dostávají po 8 – 16 hodinách po požití kontaminované potraviny a délka trvání je krátká, zpravidla jeden den. Tento toxin je labilní vůči účinkům tepla, ale nebezpečí hrozí při požití potraviny kontaminované sporami *B. cereus*, jejich germinaci a produkci toxinu v horním gastrointestinálním traktu. Nejčastěji je průjmové onemocnění spojováno s pokrmy z masa, zeleniny a omáčkami. Ačkoli je toto onemocnění častější než otrava emetickým toxinem, je méně běžné než jiná průjmová onemocnění. Odhaduje se, že na jeden případ způsobený *B. cereus* připadá 5,6 případů způsobených *Clostridium perfringens*, 95 případů způsobených patogenními bakteriemi s buněčnou stěnou gramnegativního typu (*Shigella*, *Salmonella* a jiné) a 129 případů způsobených *Campylobacter* spp. [33]

## 2.2 *Bacillus subtilis*

Alimentární otrava spojovaná s *B. subtilis* se vyznačuje krátkou inkubační dobou asi 2,5 hodiny. Vyvolává zvracení a asi u poloviny případů i průjem. U menšího počtu případů se objevilo také pocení a bolest hlavy [33]. Produkovaný extracelulární enzym subtilisin může u některých jedinců při častějším styku vyvolat alergickou reakci [35]. Jako kontaminant potravinářských surovin zhoršuje jakost výrobků. Hojně se *B. subtilis* vyskytuje na obilí. V pekárenství způsobuje nitkovitost chleba tvorbou slizu, kdy při skladování výrobků na vlhkém a teplém místě se střída stává mazlavou a vykazuje hořkou chuť [28]. Nalezne se jej v sušené a kvašené zelenině a je jednou z možných příčin měknutí okurek za předpokladu nízké kyselosti a nízkého obsahu soli [34].

### 3 MONOACYLGLYCEROLY

Monoacylglyceroly jsou parciální estery glycerolu a mastných kyselin. Jejich základem je molekula trojsytného alkoholu, u kterého dochází k substituci vodíku hydroxylové skupiny a navázání mastné kyseliny esterovou vazbou. Vznikají tak dva izomerní monoacylglyceroly, které jsou znázorněny na obrázku 1. V potravinách převažují 1-monoacylglyceroly, které jsou stabilnější [36].



Obr. 1- Izomery monoacylglycerolu [36]

Poprvé byly monoacylglyceroly syntetizovány v roce 1853. Průlomem pro jejich využití byla aplikace při výrobě emulgovaných tuků v 30. letech 20. století a v roce 1936 bylo patentováno použití monoacylglycerolů při výrobě zmrzliny [37].

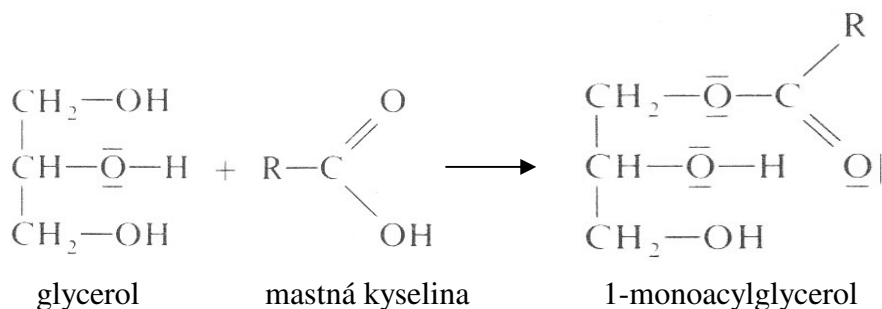
#### 3.1 Výroba monoacylglycerolů

Monoacylglyceroly je možné vyrábět několika způsoby:

- esterifikací mastných kyselin s glycerolem,
- interesterifikací:
  - alkoholýzou,
  - acidolýzou,
  - transesterifikací,
- hydrolýzou tuků a olejů,
- adicí mastné kyseliny na glycidol ((oxiran-2-yl)metanol) [21],[38],[39].

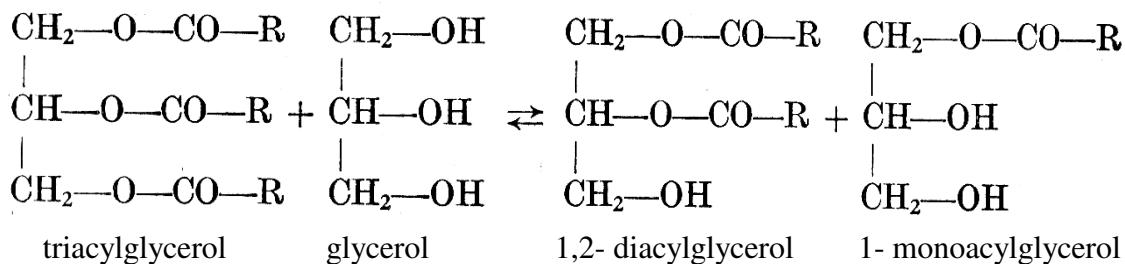
Přímá esterifikace (obrázek 2) je reakce mezi mastnou kyselinou a glycerolem za současného odštěpení molekuly vody. Reakční rychlost klesá s rostoucí molekulovou hmotností,

rozvětvené kyseliny se esterifikují hůře. Reakci lze urychlit přítomností kyselých katalyzátorů (kyselina sírová, sulfonové kyseliny, fluorid boritý) nebo alkalických katalyzátorů (alkoholáty a hydroxidy alkalických kovů). Při esterifikaci se vytvoří nejprve monoacylglyceroly a poté probíhá esterifikace dále na diacylglyceroly až triacylglyceroly [36].



Obr. 2- Esterifikace mastné kyseliny glycerolem [39]

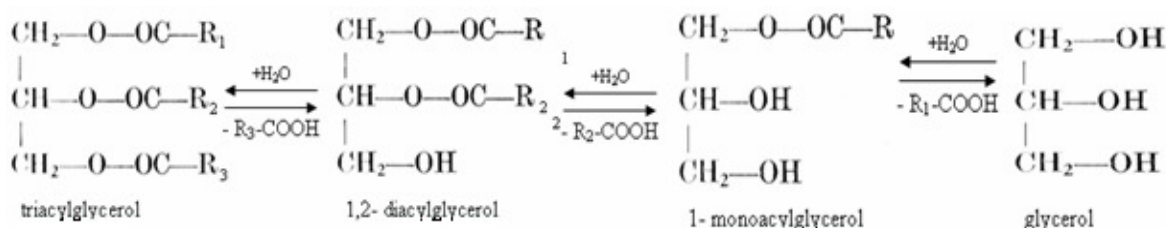
Kromě přímé esterifikace mohou být monoacylglyceroly připraveny i interesterifikačními reakcemi, mezi které se řadí alkoholýza, acidolýza a esterová výměna. Nejpoužívanější pro průmyslovou výrobu monoacylglycerolů je alkoholýza tuků pomocí glycerolu tzv. glycerolýza (obrázek 3). Reakce probíhá v přítomnosti alkalických katalyzátorů při teplotě nad 200 °C. Vzniklá směs se podrobí víceetapové destilaci. Destilát obsahuje až 95 % monoacylglycerolů [36],[39].



Obr. 3- Glycerolýza [36]

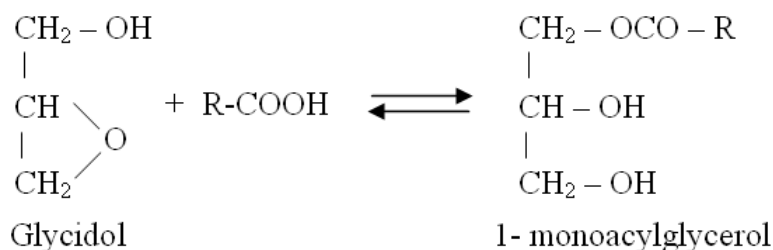
Alkoholýzou se rozumí také přesmyk esterové skupiny v rámci jedné molekuly vícefunkčních alkoholů. Dochází k tomu při skladování monoacylglycerolů při vyšší teplotě a 1-monoacylglycerol přechází na 2-monoacylglycerol. Při acidolýza reaguje ester s kyselinou nejprve za vzniku meziproductu, ze kterého se uvolní kyselina původně vázaná v esteru a vzniká nový ester. Dochází tedy k výměně kyselinové složky esteru. Výměna acylových zbytků může probíhat i mezi estery [40].

Další reakcí, při níž vznikají monoacylglyceroly, je hydrolýza tuků, respektive triacylglycerolů (obrázek 4). Z triacylglycerolů se postupně odštěpují mastné kyseliny a přes diacylglyceroly vznikají monoacylglyceroly. Reakce může být katalyzována hydroxidy nebo oxidy kovů alkalických zemin [36]. Hydrolýzu je možné katalyzovat i enzymaticky, kdy se využívá především 1,3-specifických lipáz. Výhodné jsou mírné reakční podmínky, ale reakce je časově a finančně náročnější [41].



Obr. 4- Hydrolýza triacylglycerolu

Relativně mladým způsobem syntézy monoacylglycerolů je adice mastných kyselin na glycidol nukleofilním otevřením epoxidového kruhu. Tato reakce (obrázek 5), katalyzovaná chromitými sloučeninami, teoreticky umožňuje výrobu monoacylglycerolu jakékoliv organické kyseliny za podstatně kratší dobu a reakční podmínky jsou mírné (teplota 90 °C). Při použití chromitých komplexních sloučenin mastných kyselin lze dosáhnout konverze reakce přes 90 %, ale produkt obsahuje jisté množství reziduí katalyzátoru a jedovatý glycidol a je nutné přečištění [42].



Obr. 5- Adice mastné kyseliny na glycidol [39]

### 3.2 Vlastnosti monoacylglycerolů

Molekula monoacylglycerolu obsahuje polární (hydrofilní) a nepolární (lipofilní) částí, která je tvořena převážně řetězcí mastných kyselin. Tato amfipatická struktura umožňuje orientaci na fázovém rozhraní a monoacylglyceroly vytváří orientovaný monomolekulární film usnadňující dispergaci a emulgaci [40].

Monoacylglyceroly jsou rozpustné v alkoholu, chloroformu a dietyleru, jsou nerozpustné v petroleteru a vodě [40]. Při zahřívání ve vodném prostředí dochází k jejich roztavení a vzniká gel, jehož struktura je laminární a podobá se lipidovým dvojvrstvám [43].

Monoacylglyceroly, ve kterých je esterově vázána nasycená mastná kyselina, jsou většinou bílé, tuhé, krystalické látky [40], které mohou být ve formě vloček, prášku či drobných kórálků [37]. Pokud je navázána nenasycená mastná kyselina, jsou monoacylglyceroly olejovité nebo sirupovité konzistence [40] s bílým, slámovým až hnědým zbarvením [37].

Tuhé monoacylglyceroly jsou značně polymorfní a vyskytují se v různých krystalických strukturách. Pomalým ochlazením taveniny se připraví nestabilní  $\alpha$  modifikace. Ta přechází v metastabilní modifikaci  $\beta'$ , která zvýšením teploty těsně pod bod tání přechází na stabilní modifikaci  $\beta$ . Bod tání monoacylglycerolů je zpravidla vyšší, než má příslušná mastná kyselina, zvyšuje se s délkou uhlovodíkového řetězce [40] a klesá se zvyšujícím se počtem dvojných vazeb v acylovém zbytku [36].

Hodnota HLB (hydrophilic-lipophilic balance), která je mírou vyváženosti hydrofilní a lipofilní části molekuly a která rozhoduje o praktickém využití, je u běžných monoacylglycerolů nízká (v rozmezí 3 – 6). Látky s nízkými hodnotami HLB jsou vhodné pro emulze typu voda v oleji a proto našly monoacylglyceroly četné uplatnění jako emulgátory [43].

### 3.3 Antibakteriální účinky monoacylglycerolů

V posledních letech byly publikovány četné studie zaměřené na inhibiční účinky monoacylglycerolů a bylo navrženo několik možných mechanismů působení. Antibakteriální aktivita těchto látek závisí na délce uhlíkového řetězce mastné kyseliny, počtu a poloze dvojných vazeb [43] a na použité koncentraci [25]. Monoacylglyceroly inhibují růst širokého spektra mikroorganismů (vegetativní formy bakterií s buněčnou stěnou grampozitivního i gramnegativního typu, spory, kvasinky a plísňe) [38], ale efekt není dosti široký, aby se uplatnily jako univerzální ochranné prostředky. Kombinací s ostatními látkami potlačujícími růst bakterií lze tento nedostatek eliminovat [25]. Těmito látkami mohou být kyseliny, chelatační činidla nebo nizin. Inhibiční aktivitu lze zvýšit také působením vyšší teploty [38]. Oproti tomu některé složky potravin jako albumin, škrob, fosfolipidy, nebo cholesterol, mohou snižovat inhibiční aktivitu monoacylglycerolů vytvořením neúčinných komplexů [45].

Díky částečně hydrofilnímu charakteru jsou monoacylglyceroly schopné udržet se ve vodné fázi, lipofilní část molekuly je důležitá pro interakci s membránou bakterií. Interakce s cytoplazmatickou membránou může být dvojitá. Jednak mohou být začleněny do struktury membrány a nebo mohou svými detergenčními účinky způsobit její deformaci. V obou případech je membrána destabilizována, tvoří se vychlípeniny a zvyšuje se pórovitost. Také dochází k přesunu součástí energetického systému a inhibici syntézy adenosintrifosfátu, který je zásobou buněčné energie. Omezení hospodaření s energií omezuje transport aminokyselin a ketokyselin. U aerobních bakterií jsou na membránu také vázány enzymy spojené s kyslíkovou adsorpcí, které jsou účinky monoacylglycerolů inaktivovány [25].

Pro dosažení cytoplazmatické membrány je zapotřebí nejprve zdolat buněčnou stěnu. U bakterií s buněčnou stěnou grampozitivního typu nebyly pozorovány elektronovou mikroskopií žádné změny velikosti ani tvaru buněčné stěny a monoacylglyceroly mohou proniknout rozsáhlou strukturou peptidoglykanu a dosáhnout tak cytoplazmatické membrány. Bakterie s buněčnou stěnou gramnegativního typu mají navíc vnější membránu tvořenou lipopolysacharidy, které patrně brání průniku monoacylglycerolů a zvyšují tak odolnost gramnegativních bakterií. Kombinací s činidly odstraňujícími lipopolysacharidovou vrstvu lze zvýšenou odolnost eliminovat [46].

Dosavadní studie, prováděné za laboratorních podmínek, naznačují antimikrobiální účinek monoacylglycerolů proti bakteriím rodu *Bacillus*. Vyhodnocení inhibičního účinku se mnohdy liší a jsou uváděny různé účinné koncentrace vzhledem k odlišným podmínkám zvolené metodiky. Při hodnocení inhibičního účinku monoacylglycerolů vůči *B. cereus* a *Bacillus subtilis* během 24 hodinové kultivace při laboratorní teplotě byly za nejúčinnější označeny monoacylglycerol kyseliny laurové (MAG C<sub>12:0</sub>), undekanové (MAG C<sub>11:0</sub>) a undecenové (MAG C<sub>11:1</sub>). Kompletní inhibice růstu *B. cereus* byla pozorována při koncentraci 100 mg.l<sup>-1</sup> pro MAG C<sub>12:0</sub> a nebo při koncentraci 250 mg.l<sup>-1</sup> pro MAG C<sub>11:0</sub> a MAG C<sub>11:1</sub>. Monoacylglycerol kyseliny 1-adamantankarboxylové patřil k nejméně účinným. Podobně i u *B. subtilis* bylo úplné potlačení růstu způsobeno přídatkem MAG C<sub>12:0</sub> nebo MAG C<sub>11:0</sub> o koncentraci 100 mg.l<sup>-1</sup>, nebo při koncentraci 250 mg.l<sup>-1</sup> MAG C<sub>11:1</sub> [38].

Za jiných podmínek metody testovali antimikrobiální účinek monoacylglycerolu kyseliny laurové Růžička a kol.[47]. Bakterie *Bacillus subtilis* vystavili účinku monoacylglycerolu kyseliny laurové (MAG C<sub>12:0</sub>) a kaprinové (MAG C<sub>10:0</sub>) o různé koncentraci po dobu 48 hodin při kultivační teplotě 37 °C. Minimální inhibiční koncentrace (koncentrace, při

kteřé nebyl pozorován růst) MAG C<sub>12:0</sub> byla 20 mg.l<sup>-1</sup> a MAG C<sub>10:0</sub> 100 mg.l<sup>-1</sup>. Suspenze, kde nebyl pozorován růst byly dále naočkovány na plotny masopeptonového agaru. Tím došlo ke snížení koncentrace monoacylglycerolu a to umožnilo zhodnocení minimální mikrobicidní koncentrace. Pro *B. subtilis* byla shodná s minimální inhibiční koncentrací.

Účinek může být ovlivněn teplotou kultivace, počáteční koncentrací bakteriální suspenze nebo přípravou monoacylglycerolu. Cotton a Marshall [48] srovnávali účinek monoacylglycerolu kyseliny laurové (MAG C<sub>12:0</sub>) o koncentraci 25 mg.l<sup>-1</sup> připravené dvěma způsoby. Jedním způsobem bylo rozpuštění MAG C<sub>12:0</sub> v etanolu a druhým dispergace ve vodě při 40 °C. Testovanou bakterií byl *Bacillus cereus* a bylo hodnoceno přežití populací 10<sup>3</sup> a 10<sup>5</sup> CFU.ml<sup>-1</sup> při 25 °C a 5 °C po dobu 24 hodin. Výsledky jejich studie ukazují, že MAG C<sub>12:0</sub> rozpuštěný v etanolu je účinnější proti populaci 10<sup>5</sup> CFU.ml<sup>-1</sup> než jeho disperze ve vodě při 25 °C. Ale při teplotě 5 °C a nebo při hodnocení přežití menší populace *B. cereus* nebyl pozorován významný rozdíl v aktivitě monoacylglycerolů připravených odlišným způsobem.

Inhibiční účinek monoacylglycerolů může být zvýšen přidavkem dalších látek. Výborný synergický efekt byl pozorován mezi monoacylglycerolem kyseliny laurové a kyselinou linolenovou při hodnocení inhibice růstu *Bacillus cereus*. Účinek byl hodnocen při kultivační teplotě 30 °C během 72 hodin. Minimální inhibiční koncentrace MAG C<sub>12:0</sub> byla 25 ppm (hodnota korespondující s 25 mg.l<sup>-1</sup>) a pro kyselinu linolenovou 20 ppm. Obdobného inhibičního účinku bylo dosaženo kombinací 10 ppm kyseliny linolenové a 10 ppm monoacylglycerolu kyseliny laurové [49]. Synergický efekt byl pozorován také mezi MAG C<sub>12:0</sub> a nizinem. Tento efekt vůči bakteriím rodu *Bacillus* v mléce ohodnotili Mansour a Millière [50] při kultivační teplotě 37 °C po dobu pěti dní. Přídavek nizinu 100 IU.ml<sup>-1</sup> způsobil jen nepatrné snížení celkového počtu buněk během počátku kultivace a po 5 dnech bylo dosaženo hodnoty shodné s kontrolou. Monoacylglycerol kyseliny laurové o koncentraci 250 mg.l<sup>-1</sup> vykazoval bakteriostatický účinek a v kombinaci s nizinem byl tento účinek ještě větší.

Pro zvýšení inhibičního účinku je také možný i přídavek citranu sodného a eugenolu. Bakteriostatický efekt byl prokázán vůči *Lactobacillus curvatus* za použití 100 ppm MAG C<sub>12:0</sub>, 0,1 % citranu sodného a 1000 ppm eugenolu. Po celou dobu 4 denní kultivace nebyl pozorován růst ani sporulace [51].



Kromě inhibičního účinku na vegetativní buňky *Bacillus* sp. je v dosavadních studiích popisován i účinek na germinaci spor. Ababouch a kol. [52] testovali inhibiční účinek mastných kyselin a monoacylglycerolu kyseliny laurové vůči dvěma kmenům *B. cereus*. Germinace spor byla u obou kmenů zcela inhibována přidavkem 0,109 mM MAG C<sub>12:0</sub> (29,9 mg.l<sup>-1</sup> MAG C<sub>12:0</sub>) do živného média. Ještě lepší účinek vykazovala kyselina linolenová, kdy úplná inhibice germinace spor byla pozorována při koncentraci 0,056 mM (15,6 mg.l<sup>-1</sup>).

Monoacylglyceroly mohou snižovat odolnost spor *B. cereus* vůči účinkům tepla. Významné snížení tepelné odolnosti bylo pozorováno po přidavku monoacylglycerolu kyseliny laurové a nebo linolenové, zatímco monoacylglycerol kyseliny myristové a linolové odolnost mírně zvýšil [53]. I samotné mastné kyseliny snižují odolnost spor vůči působení tepla. Nenasycené mastné kyseliny vykazují větší účinek. Záhřevem při 100 °C v přítomnosti 0,2 mM kyseliny palmitoolejové bylo dosaženo snížení pod 1 log CFU během 3 minut, v přítomnosti 0,8 mM kyseliny olejové během 4 minut. V přítomnosti 2 mM kyseliny palmiové a nebo stearové byla doba k dosažení obdobného účinku delší než 10 minut [54].

## 4 KARAGENANY

Karagenany jsou lineární polysacharidy. Základem jejich struktury je disacharid karabióza ( $\beta$ -D-galaktopyranóza a 3,6-anhydro- $\alpha$ -D-galaktopyranóza spojené vazbou  $\beta$ -(1-4)), které jsou v řetězci spojeny především vazbou  $\alpha$ -(1-3). Podle rozdílů v počtu a poloze sulfátových skupin se rozlišuje 8 frakcí (tabulka 3). Z nich  $\kappa$ -karagenan,  $\iota$ -karagenan a  $\lambda$ -karagenan jsou považovány za hlavní a využívají se v potravinářství [2].

Tab. 3- Frakce karagenanů [55]

	stavební jednotky	
$\lambda$ -karagenan	$\beta$ -D-galaktóza-2-sulfát	$\alpha$ -D-galaktóza-2,6-disulfát
$\kappa$ -karagenan	$\beta$ -D-galaktóza-4-sulfát	3,6-anhydro- $\alpha$ -D-galaktóza
$\iota$ -karagenan	$\beta$ -D-galaktóza-4-sulfát	3,6-anhydro- $\alpha$ -D-galaktóza-2-sulfát
$\mu$ -karagenan	$\beta$ -D-galaktóza-4-sulfát	$\alpha$ -D-galaktóza-6-sulfát
$\theta$ -karagenan	$\beta$ -D-galaktóza-2-sulfát	3,6-anhydro- $\alpha$ -D-galaktóza-2-sulfát
$\xi$ -karagenan	$\beta$ -D-galaktóza-2-sulfát	$\alpha$ -D-galaktóza-2-disulfát
$\nu$ -karagenan	$\beta$ -D-galaktóza-4-sulfát	$\alpha$ -D-galaktóza-2,6-disulfát
$\beta$ -karagenan	$\beta$ -D-galaktóza	3,6-anhydro- $\alpha$ -D-galaktóza

Karagenany jsou extrahovány z červených mořských řas čeledi *Rhodophyceae* a především z rodů *Euchema*, *Chondrus* a *Gigantina*. Po sklizni jsou mořské řasy vyprány, aby se odstranily nečistoty a poté jsou rychle usušeny, aby se zabránilo mikrobiální degradaci a byla zachována kvalita karagenanů. Usušené mořské řasy putují do zpracovatelských závodů, kde se karagenany extrahují v alkalickém prostředí. Výběrem vhodné alkálie se určují vlastnosti získaného karagenanu jako dispergace, hydratace a tvorba gelu. Po extrakci následuje filtrace, odstředování, vysrážení 2-propanolem a sušení [56].

Karagenany jsou hydrofilní anionaktivní koloidy. Jsou stabilní v prostředí o pH 5 – 10, při pH nižším než 4 podléhají hydrolýze. Jejich rozpustnost ve vodě je závislá na teplotě, pH prostředí, přítomných iontech a na poměru hydrofilní (hydroxylové a sulfátové skupiny) a hydrofobní (3,6-anhydro- $\alpha$ -D-galaktózové zbytky) části. Nejlépe rozpustný je  $\lambda$ -karagenan, který vytváří viskózní disperze. Méně rozpustný je  $\iota$ -karagenan a nejméně  $\kappa$ -karagenan.  $\iota$ -karagenan a  $\kappa$ -karagenan jsou schopné tvořit gel, který vzniká ochlazením již 0,5% disperze [55]. Schopnost tvořit gel je podmíněna tvorbou helikálních struktur a jejich asociací.

Kromě toho se mohou karagenany vyskytovat v neuspořádaném stavu a teplota přechodu z helikální struktury do neuspořádaného stavu je ve vodném prostředí 35 – 55 °C. Vytvoření gelu probíhá ve dvou fázích, kdy nejprve vzniká šroubovice a následně dochází k agregaci a tvorbě trojrozměrné sítě.  $\kappa$ -karagenan tvoří křehký a pevný gel, zatímco pružný a soudržný gel vytváří  $\iota$ -karagenan. Síla gelů je ovlivněna přítomností kationtů, které neutralizují záporně nabitě sulfátové skupiny.  $\iota$ -karagenan je citlivý vůči vápenatým iontům,  $\kappa$ -karagenan především k draselným iontům [57].

Další důležitou vlastností karagenanů je tvorba komplexů s mléčnými bílkovinami. Za reakci mezi řetězcí karagenanů a kaseinovými micelami jsou odpovědné elektrostatické interakce záporně nabitých sulfátových skupin s kladně nabitou oblastí  $\kappa$ -kaseinové frakce. K adsorpci dochází při teplotách, když jsou karagenany v helikálním uspořádání a je teplotně reverzibilní pro  $\kappa$ -karagenan a teplotně ireverzibilní pro  $\iota$ -karagenan [58].

Komerční karagenan používaný v potravinářském průmyslu je směsí všech tří typů, v němž většinou převládá  $\kappa$ -karagenan nad  $\lambda$ -karagenanem a jejich poměr je přibližně 3:2. Používá se jako zahušňovadlo, gelotvorná látka, stabilizátor a emulgátor při výrobě mléčných nápojů a zmrzlin a při výrobě masových konzerv [55]. Přídavek 0,25 % w/w karagenanů do tavených sýrů zvyšuje tuhost a snižuje roztíratelnost, přičemž  $\iota$ -karagenan je účinnější [58].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 CÍL PRÁCE

Cíle diplomové práce byly stanoveny následovně:

- v teoretické části zpracovat literární rešerši zabývající se charakteristikou tavených sýrů a jejich výrobou,
- popsat mikroorganismy, které mohou kontaminovat tavené sýry a faktory ovlivňující růst a množení mikroorganismů v tavených sýrech,
- v praktické části sledovat růst sporulujících bakterií v tavených sýrech s různým obsahem tuku v sušině a dále sledovat inhibiční vliv látek acylglycerolového typu a karagenanů na růst sporulujících bakterií v matrici taveného sýra,
- na základě poznatků teoretické části a výsledků experimentů popsat vztah mezi růstem bakterií a obsahem tuku v sušině a zhodnotit využitelnost aplikovaných acylglycerolů a karagenanů.

## 6 MATERIÁL A METODY

### 6.1 Testované mikroorganismy

Ke zhodnocení růstu sporulujících bakterií v tavených sýrech s různým obsahem tuku v sušině a ke zhodnocení inhibičního vlivu látek acylglycerolového typu byly použity následující mikroorganismy:

- *Bacillus cereus* CCM 2010,
- *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062.

Kmeny pocházely z České sbírky mikroorganismů.

### 6.2 Monoacylglyceroly

Ke sledování inhibičního vlivu byly vybrány následující monoacylglyceroly:

- monoacylglycerol kyseliny undekanové (MAG C<sub>11:0</sub>),
- monoacylglycerol kyseliny undecenové (MAG C<sub>11:1</sub>),
- monoacylglycerol kyseliny 1-adamantankarboxylové (MAG ACA).

Monoacylglyceroly byly vyrobeny zaměstnanci Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky adicí příslušných mastných kyselin na glycidol za katalýzy chromium (III) acetát hydroxidu postupem podle Janiš a kol. [42]. Vyrobené produkty byly přečištěny rekrystalizací v etanolu a filtrací. Poté byly uchovány při laboratorní teplotě.

### 6.3 Kultivační média a roztoky

#### Masopeptonový bujón (MPB)

Složení:

- masový výtažek..... 6,0 g,
- pepton..... 10,0 g,
- chlorid sodný..... 3,0 g,
- deionizovaná voda ..... 1000,0 ml.

**Plate-Count Agar (PCA)**

Složení:

- plate-count agar ..... 23,5 g,
- deionizovaná voda ..... 1000,0 ml.

**Fyziologický roztok**

Složení:

- NaCl ..... 8 g,
- deionizovaná voda ..... 1000,0 ml.

**6.4 Přístroje a pomůcky:**

Vorwerk Thermomix TM 31,

Autokláv Systec 2540EL,

Autokláv Varioklav H+P,

Biologický termostat Memmert INE 600,

Homogenizátor Stomacher,

Chladnička Electrolux,

Laboratorní předvážky KERN,

pH Spear Eutech Instruments,

LabMasters- $a_w$ ,

Laboratorní sklo:

- zásobní lahve 100, 500, 1000 ml,
- zkumavky,
- Petriho misky.

## 6.5 Metodika

### 6.5.1 Příprava bakteriální suspenze

Bakteriální kultury *Bacillus cereus* CCM 2010 a *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062 byly uchovány na plotnách PCA při teplotě  $4 \pm 2$  °C a každé 4 týdny byly přeočkovány. Pro zaočkování vzorků taveného sýra byly připraveny bakteriální suspenze v masopeptonovém bujónu. Do 50 ml MPB v zásobní láhvi byla pomocí sterilní očkovací kličky přenesena jedna kolonie charakteristická pro daný kmen. Po kultivaci za stálého míchání při laboratorní teplotě po dobu 48 hodin byla suspenze použita k očkování vzorků.

### 6.5.2 Výroba vzorků taveného sýra

K výrobě vzorků taveného sýra byly použity následující suroviny:

- eidamská cihla 30 % w/w tuku v sušině,
- máslo min. 82 % w/w tuku,
- pitná voda,
- tavicí soli,

DIDI- hydrogenfosforečnan disodný dihydrát,

KPS- dihydrogendifosforečnan sodný,

PYRO- difosforečnan sodný.

Pro výrobu vzorků taveného sýra bylo použito zařízení Vorwerk Thermomix TM 31. Po navážení surovin dle surovinové skladby (příloha PI až PIII) byla nejprve rozmělněna eidamská cihla. Poté byly přidány další suroviny (máslo, tavicí soli, případně monoacylglyceroly či karagenany a na konec pitná voda) a směs byla zahřívána za intenzivního míchání až bylo dosaženo tavicí teploty 90 °C s výdrží 1 minuta. Tavenina byla zaočkována 5 ml bakteriální suspenze. Po promísení byla rozdělena do 16 plastových kelímků, které byly uzavřeny nažehlením hliníkové fólie. Po ochlazení taveniny při laboratorní teplotě byly vzorky skladovány při teplotě  $6 \pm 2$  °C.

Vzhledem k pracnosti, časové náročnosti a vysokým požadavkům na laboratorní pomůcky byla experimentální část rozdělena do pěti etap. V první etapě byl zkoumán růst bakterií



v tavených sýrech o různém obsahu tuku v sušině, což zahrnovalo 15 taveb. Surovinová skladba je uvedena v příloze PI a charakteristiky v tabulce 4. V dalších třech etapách byl zkoumán inhibiční vliv monoacylglycerolů v koncentraci 0,01, 0,05 a 0,15 % w/w ve vzorcích taveného sýra s obsahem tuku v sušině 50 % w/w. Příloha PII znázorňuje surovinovou skladbu pro tyto etapy. Pro jeden typ monoacylglycerolu bylo utaveno 16 taveb, které jsou specifikovány v tabulce 5. Poslední etapa se zabývala vlivem přídatku karagenanů v koncentraci 0,1 a 0,2 % w/w do taveného sýra s obsahem tuku v sušině 50 % w/w. V této etapě bylo utaveno 12 taveb dle surovinové skladby uvedené v příloze PIII. Taveby jsou charakterizovány v tabulce 6.

Tab. 4- Charakteristika taveb 1. etapy

kód tavyby	obsah tuku v sušině [% w/w]	bakterie	počet taveb
30 K	30	x	1
30 BC a (b)	30	<i>Bacillus cereus</i>	2
30 BS a (b)	30	<i>Bacillus subtilis</i>	2
40 K	40	x	1
40 BC a (b)	40	<i>Bacillus cereus</i>	2
40 BS a (b)	40	<i>Bacillus subtilis</i>	2
50 K	50	x	1
50 BC a (b)	50	<i>Bacillus cereus</i>	2
50 BS a (b)	50	<i>Bacillus subtilis</i>	2

x ... bez přídatku bakteriální suspenze

Tab. 5- Charakteristika taveb 2., 3. a 4. etapy

kód tavyby	obsah MAG C <sub>11:0</sub> [% w/w]	bakterie	počet taveb
0,01 BC a (b)	0,01	<i>Bacillus cereus</i>	2
0,01 BS a (b)	0,01	<i>Bacillus subtilis</i>	2
0,05 BC a (b)	0,05	<i>Bacillus cereus</i>	2
0,05 BS a (b)	0,05	<i>Bacillus subtilis</i>	2
0,15 BC a (b)	0,15	<i>Bacillus cereus</i>	2
0,15 BS a (b)	0,15	<i>Bacillus subtilis</i>	2
K BC	0	<i>Bacillus cereus</i>	1
K BS	0	<i>Bacillus subtilis</i>	1
K 0,15	0,15	x	1
K	0	x	1

Tab. 6- Charakteristika taveb 5. etapy

kód tavy	obsah karagenanů [% w/w]	bakterie	počet taveb
0,1 BC a (b)	0,1	<i>Bacillus cereus</i>	2
0,1 BS a (b)	0,1	<i>Bacillus subtilis</i>	2
0,2 BC a (b)	0,2	<i>Bacillus cereus</i>	2
0,2 BS a (b)	0,2	<i>Bacillus subtilis</i>	2
K BC	0	<i>Bacillus cereus</i>	1
K BS	0	<i>Bacillus subtilis</i>	1
K 0,2	0,2	x	1
K	0	x	1

### 6.5.3 Stanovení celkového počtu mikroorganismů

Po dobu skladování byly v určitých časových intervalech odebírány vždy dva vzorky z každé tavy, u kterých byl stanoven celkový počet mikroorganismů plotnovou metodou. K navážce vzorku byl za aseptických podmínek přidán devítinásobek fyziologického roztoku a byla provedena homogenizace po dobu 2 minut na stomacheru. Takto bylo připraveno první ředění vzorku. V případě dalšího ředění bylo odebráno vždy 0,5 ml předchozího ředění a promícháno s 4,5 ml sterilního fyziologického roztoku. Na základě předpokládaného počtu mikroorganismů byl z příslušného ředění odebrán 1 ml na Petriho misky, které byly poté přelity cca 15 ml PCA. Z každého vzorku byly očkované tři po sobě jdoucí ředění. Po utužení byly misky kultivovány v termostatu při 37 °C po dobu 48 hodin. Po kultivaci byly spočteny narostlé kolonie a přepočteny na CFU.g<sup>-1</sup>.

### 6.5.4 Dekontaminace použitého zařízení a pomůcek

Zařízení Vorwerk Thermomix TM 21 a ostatní pomůcky použité při výrobě vzorků taveného sýra byly mezi tavnými dekontaminovány 10% roztokem SAVA s následným oplachem pitnou vodou. Tavené sýry po odebrání dílčího vzorku pro stanovení celkového počtu mikroorganismů a živná média po kultivaci byly podrobeny sterilaci při teplotě 132 °C po dobu 20 minut. Pracovní plochy byly ošetřeny 70% etanolem.

### 6.5.5 Měření vodní aktivity vzorků

U vybraných vzorků nezaočkovaných bakteriemi byla změřena vodní aktivita. Měření probíhalo pomocí přístroje LabMaster-aw. Vzorky taveného sýra byly rozetřeny do připrave-

ných misek a vloženy do levé měřící cely přístroje, kde je umístěno elektrolytické odporové čidlo. Do pravé cely byl umístěn následující vzorek, aby se urychlila temperace na teplotu měření 25 °C. Přístroj průběžně zobrazuje hodnotu naměřené vodní aktivity a měření je ukončeno pokud po dobu 15 minut není změna hodnoty větší než 0,001.

### **6.5.6 Měření pH vzorků**

U vzorků taveného sýra odebíraných ke stanovení celkového počtu mikroorganismů byla měřena aktivní kyselost pomocí pHSpear s vpichovou elektrodou. Vzorky byly před měřením vytemperovány na laboratorní teplotu a každý vzorek byl proměřen třikrát. Mezi měřeními byla elektroda oplachována pitnou vodou.

### **6.5.7 Senzorická analýza vzorků**

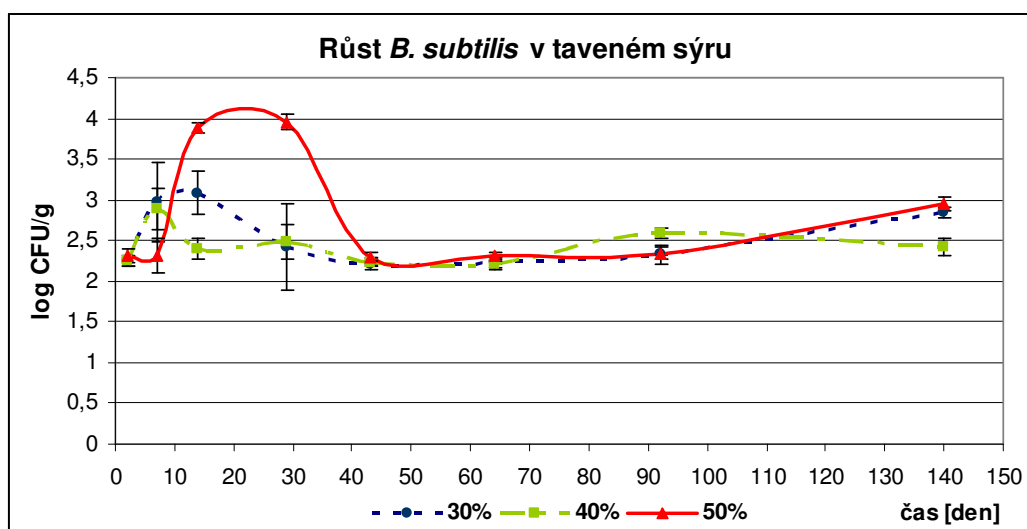
Vybrané vzorky s přidavkem monoacylglycerolů a *l*-karagenanu, které nebyly kontaminovány bakteriemi, byly podrobeny sensorické analýze. Posuzování bylo provedeno 15 vybranými hodnotiteli (studenti Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky). Vzorky byly předkládány anonymně při pokojové teplotě  $22 \pm 2$  °C. Sensorické znaky vzhled a barva, lesk, konzistence chuť a vůně a celkové hodnocení byly hodnoceny pomocí sedmibodových hédonických ordinálních stupnic (Příloha IV). Dále byl zařazen pořadový test intenzity znaků tuhost a roztíratelnost a pořadový preferenční test. Protokol pro sensorické hodnocení tavených sýrů je uveden v příloze PV. Pro statistické vyhodnocení sensorického hodnocení pomocí stupnic byl použit Kruskal-Wallisův test a pořadové testy byly vyhodnoceny pomocí Friedmanova testu za použití programu STATVYD verze 2.0 beta.

## 7 VÝSLEDKY

V první etapě experimentální části byl sledován růst *Bacillus cereus* CCM 2010 a *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062 v taveném sýru s různým obsahem tuku v sušině. V dalších etapách byl sledován inhibiční účinek monoacylglycerolu kyseliny undekanové (MAG C<sub>11:0</sub>), undecenové (MAG C<sub>11:1</sub>) a 1-adamantankarboxylové (MAG ACA) vůči oběma testovaným kmenům. Poslední etapa se zabývala přidavkem ι-karagenanu a jeho vlivem na růst testovaných bakterií. Pro každou kombinaci testované bakterie a koncentrace MAG byly připraveny 4 vzorky a při stanovení celkového počtu mikroorganismů byly očkované 3 po sobě jdoucí ředění daného vzorku. Vypočtené hodnoty CFU.g<sup>-1</sup> byly přepočteny na log CFU.g<sup>-1</sup> a zprůměrovány včetně výpočtu směrodatných odchylek a jsou uvedeny v příloze VI. Během stanovení celkového počtu mikroorganismů bylo u vzorků měřeno pH. Každý vzorek byl měřen třikrát a v příloze PVII jsou uvedeny průměrné hodnoty. Vybrané vzorky tavených sýrů byly podrobeny sensorické analýze.

### 7.1 Růst *Bacillus* sp. v tavených sýrech o různém obsahu tuku v sušině

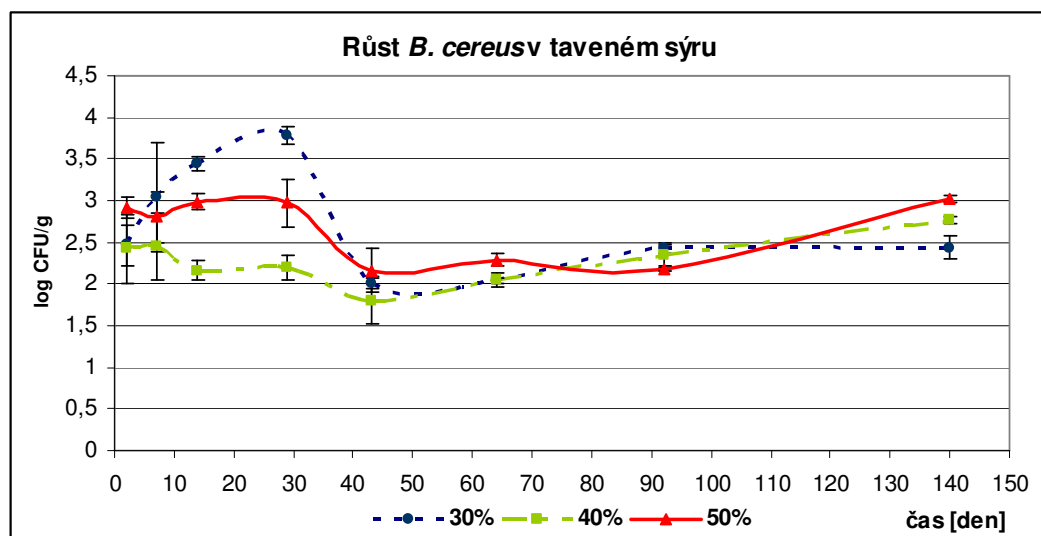
Růst testovaných bacilů byl sledován v tavených sýrech s obsahem tuku v sušině 30, 40 a 50 % w/w. Na obrázku 6 je znázorněna míra růstu u vzorků zaočkovaných kulturou *B. subtilis* vyjádřená jako log CFU.g<sup>-1</sup> v závislosti na délce skladování. Během prvních 7 dní skladování byl pozorován růst pouze u vzorků o tučnosti 30 a 40 % w/w, kdy došlo k mírnému zvýšení o 0,7 log CFU.g<sup>-1</sup> u vzorků s tučností 30 % w/w a o 0,6 log CFU.g<sup>-1</sup> pro tučnost 40 % w/w.



Obr. 6- Růst *B. subtilis* v taveném sýru

Od 7. dne skladování byl pozorován růst i ve vzorcích s nejvyšší testovanou tučností. Do 14. dne došlo ke zvýšení počtu buněk o  $1,56 \log \text{CFU.g}^{-1}$ , zatímco u vzorků s nižší tučností bylo během této doby pozorováno jen nepatrné zvýšení, či dokonce snížení. Rostoucí trend u vzorků o tučnosti 50 % w/w pokračoval do 29. dne, kdy byla stanovena nejvyšší hodnota  $3,96 \log \text{CFU.g}^{-1}$ . U vzorků o tučnosti 30 a 40 % w/w zaočkovaných *B. subtilis* poklesl počet buněk téměř na původní hodnotu a během dalšího skladování nebyly pozorovány výraznější změny v počtu buněk. Pokles na původní hodnotu byl během 43. dne skladování pozorován i u vzorků o tučnosti 50 % w/w. V době mezi 43. a 92. dnem skladování se pohybovala hodnota  $\log \text{CFU.g}^{-1}$  všech vzorků v rozmezí 2,20 – 2,59. Na konci skladování (140. den) byl mírně zvýšený počet buněk u vzorků s tučností 30 a 50 % w/w ve srovnání se vzorky o tučnosti 40 % w/w. Během skladování byly také pozorovány případné vizuální změny vzorků. U žádného ze vzorků kontaminovaných *B. subtilis* nebyly zpozorovány změny barvy, vůně ani přítomnosti bublinek v důsledku tvorby plynu. Hodnoty pH (Příloha PVII) vzorků tavených sýrů se během skladování výrazně neměnily a odpovídaly optimální hodnotě pro růst bakterií rodu *Bacillus*.

U vzorků kontaminovaných bakteriemi *Bacillus cereus* byl pozorován odlišný růst ve srovnání s *B. subtilis*. Míra růstu v závislosti na délce skladování je znázorněna na obrázku 7. Během 29 dní skladování bylo pozorováno zvýšení počtu buněk pouze u vzorků o tučnosti 30 % w/w s maximem  $3,78 \log \text{CFU.g}^{-1}$ . U vzorků s tučností 40 % w/w docházelo k pozvolnému snižování počtu buněk až do 43. dne, kdy byla stanovena nejnižší hodnota  $1,80 \log \text{CFU.g}^{-1}$ .



Obr. 7- Růst *B. cereus* v taveném sýru

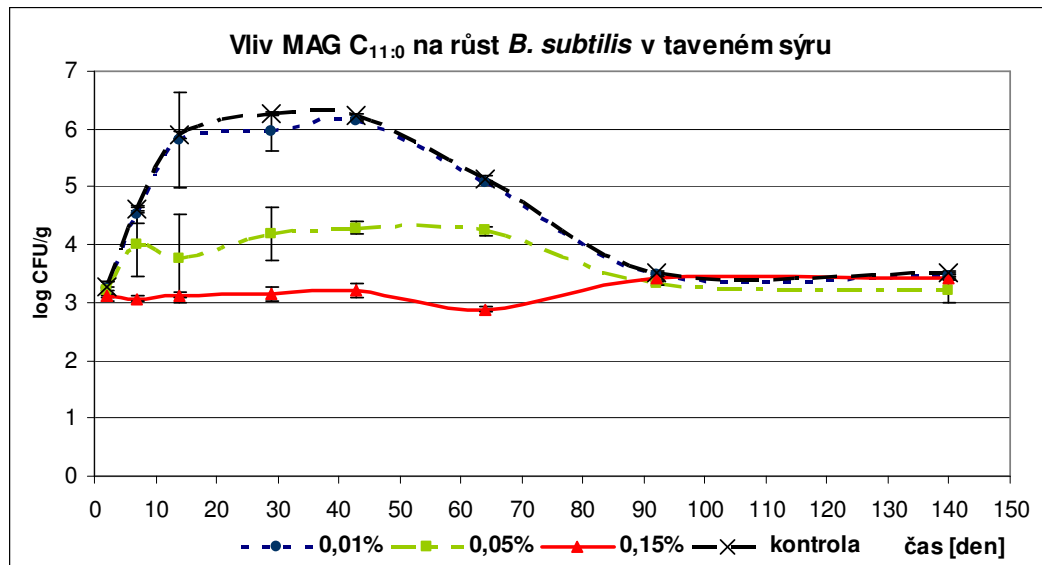
Ve vzorcích s obsahem tuku v sušině 50 % w/w nebyla během 29 dní skladování zpozorována výraznější změna v počtu buněk a hodnota  $\log \text{CFU.g}^{-1}$  se pohybovala v rozmezí 2,80 – 2,98, poté počet buněk klesal. 43. den došlo v vyrovnání celkového počtu buněk u všech vzorků na hodnotě okolo 2  $\log \text{CFU.g}^{-1}$ . V období od 43. do 92. dne skladování nedocházelo k výrazným změnám v růstu u vzorků s obsahem tuku v sušině 50 %, u vzorku s nižší tučností se počet mikroorganismů pozvolna zvyšoval. U tučnosti 40 % w/w pokračoval tento trend až do konce skladování, zatímco při obsahu tuku v sušině 30 % w/w nedošlo v závěru skladování k dalšímu zvýšení. Ve vzorcích tavených sýrů s tučností 50 % w/w docházelo v závěrečné fázi skladování k růstu a 140. den dosahoval vyšší hodnoty než u vzorků s nižší tučností. U všech vzorků kontaminovaných bakteriemi *Bacillus cereus* odpovídala hodnota pH během skladování optimální hodnotě a nebyla zpozorována žádná změna vzhledu, vůně a konzistence.

## 7.2 Vliv přídavku monoacylglycerolů na růst *Bacillus* sp.

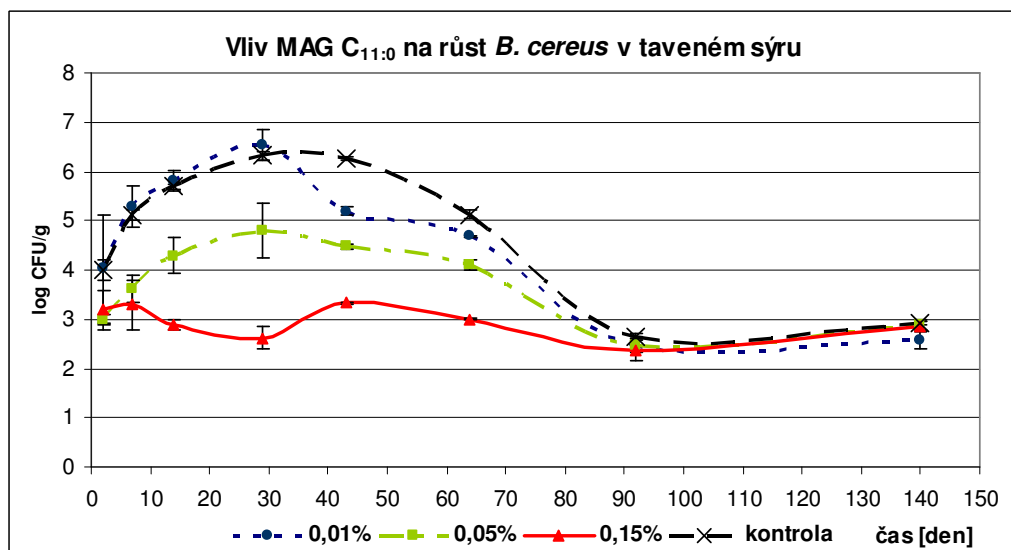
Pro sledování inhibičního účinku monoacylglycerolu kyseliny undekanové (MAG C<sub>11:0</sub>), undecenové (MAG C<sub>11:1</sub>) a 1-adamantankarboxylové (MAG ACA) vůči oběma testovaným kmenům byl použit tavený sýr s obsahem tuku v sušině 50 % w/w. Během tavení (společně s tavicími solemi) byla přidána vypočtená navážka MAG, taky aby bylo dosaženo testovaných koncentrací 0,01, 0,05 a 0,15 % w/w.

### 7.2.1 Vliv monoacylglycerolu kyseliny undekanové

Účinek monoacylglycerolu kyseliny undekanové na růst *Bacillus subtilis* ve vzorcích taveného sýru je znázorněn na obrázku 8. U nejnižší testované koncentrace MAG C<sub>11:0</sub> nebyl pozorován inhibiční účinek a růst byl téměř shodný s kontrolními vzorky. Během 14 dní skladování došlo ke zvýšení z 3,22  $\log \text{CFU.g}^{-1}$  na 5,8  $\log \text{CFU.g}^{-1}$  a 43. den byl pozorován maximální nárůst 6,16  $\log \text{CFU.g}^{-1}$ . Při dalším skladování počet životaschopných buněk klesal a ustálil se na hodnotě nepřevyšující 3,5  $\log \text{CFU.g}^{-1}$ . U vzorků obsahujících MAG C<sub>11:0</sub> v koncentraci 0,05 % byla pozorována částečná inhibice růstu. Pouze během prvních 7 dní skladování došlo ke zvýšení počtu buněk na 4,01  $\log \text{CFU.g}^{-1}$  a kolem této hodnoty kolísal počet buněk až do 64. dne, poté mírně klesal. 92. den byl u všech koncentrací i kontroly stanoven celkový počet mikroorganismů v rozmezí 3,33 – 3,51  $\log \text{CFU.g}^{-1}$ , který se již během konečné fáze skladování výrazně neměnil.

Obr 8- Vliv MAG C<sub>11:0</sub> na růst *B. subtilis*

U vzorků taveného sýra s přidavkem MAG C<sub>11:0</sub> o koncentraci 0,15 % w/w nebyly pozorovány výraznější změny v celkovém počtu mikroorganismů a lze usuzovat o bakteriostatickém účinku vůči *Bacillus subtilis*. Během 140 dní skladování nedošlo k výraznější změně pH vzorků, jehož hodnoty odpovídaly přijatelnému rozmezí pH pro růst bakterií rodu *Bacillus*. Rovněž nebyla pozorována žádná změna barvy, vůně či konzistence tavených sýrů. Žádné změny vzhledu a vůně nebyly pozorovány ani u vzorků s přidavkem MAG C<sub>11:0</sub> kontaminovaných bakteriemi *Bacillus cereus*. Míra růstu pro tyto vzorky v závislosti na délce skladování je znázorněna na obrázku 9. U vzorků obsahujících 0,01 % w/w MAG C<sub>11:0</sub> docházelo během prvních 29 dní skladování ke zvyšování celkového počtu

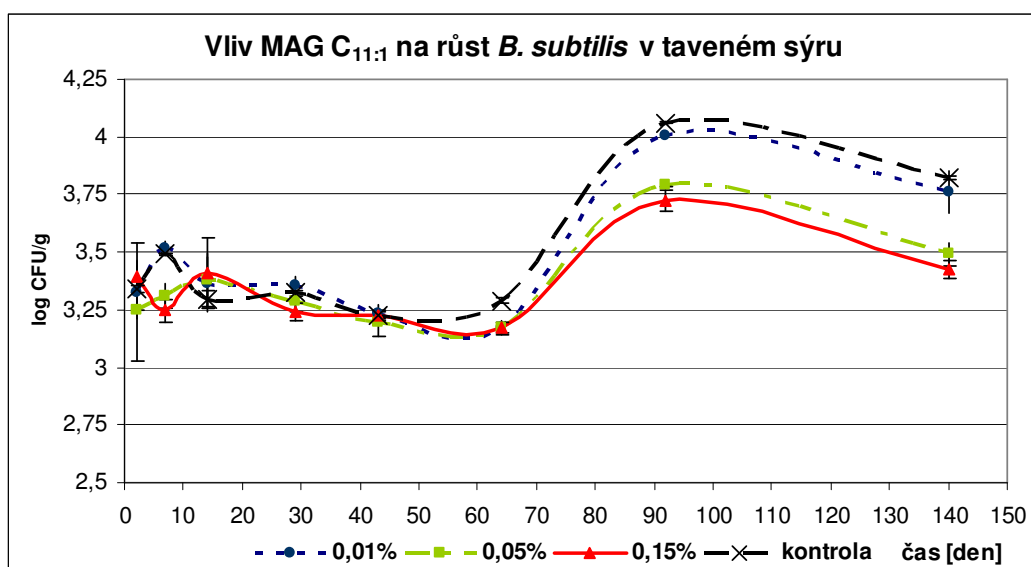
Obr. 9- Vliv MAG C<sub>11:0</sub> na růst *B. cereus*

mikroorganismů obdobně jako u kontrolních vzorků bez přídavku MAG C<sub>11:0</sub> a 29. den bylo dokonce dosaženo nepatrně vyššího nárůstu 6,53 log CFU.g<sup>-1</sup>. V období mezi 29. a 92. dnem se počet buněk postupně snižoval, u vzorků s 0,01 % w/w MAG C<sub>11:0</sub> zpočátku rychleji a 92. den skladování klesl až pod 3 log CFU.g<sup>-1</sup> a pod touto hodnotou setrval až do závěru skladovací doby. Přídavek MAG C<sub>11:0</sub> o koncentraci 0,05 % w/w působil částečnou inhibicí růstu, kdy 29. den bylo dosaženo maximálního počtu buněk 4,80 log CFU.g<sup>-1</sup>. Poté celkový počet mikroorganismů postupně klesal až 92. den dosáhl hodnoty nižší než 3 log CFU.g<sup>-1</sup>, která se výrazně nezměnila během dalšího skladování.

Při přídavku nejvyšší testované koncentrace MAG C<sub>11:0</sub> do taveného sýra nebyly pozorovány výraznější změny v celkovém počtu mikroorganismů, který po celou dobu skladování mírně kolísal v rozmezí 2,62 – 3,33 log CFU.g<sup>-1</sup>. Koncentrace 0,15 % w/w MAG C<sub>11:0</sub> vykazuje bakteriostatický účinek i proti *Bacillus cereus* v taveném sýru.

### 7.2.2 Vliv monoacylglycerolu kyseliny undecenové

Na obrázku 10 je znázorněna grafická závislost log CFU.g<sup>-1</sup> na délce skladování pro tavené sýry kontaminované *B. subtilis* a s přídavkem monoacylglycerolu kyseliny undecenové. V tomto případě nebyl po dobu 64 denního skladování zaznamenán růst v žádném ze vzorků a celkový počet mikroorganismů se pohyboval v rozmezí 3,17 – 3,52 log CFU.g<sup>-1</sup> včetně kontrolních vzorků. Od 64. dne se začal počet buněk zvyšovat a 92. den skladování ustal celkový počet mikroorganismů na hodnotách 4,00 log CFU.g<sup>-1</sup> pro kontrolní vzorky,

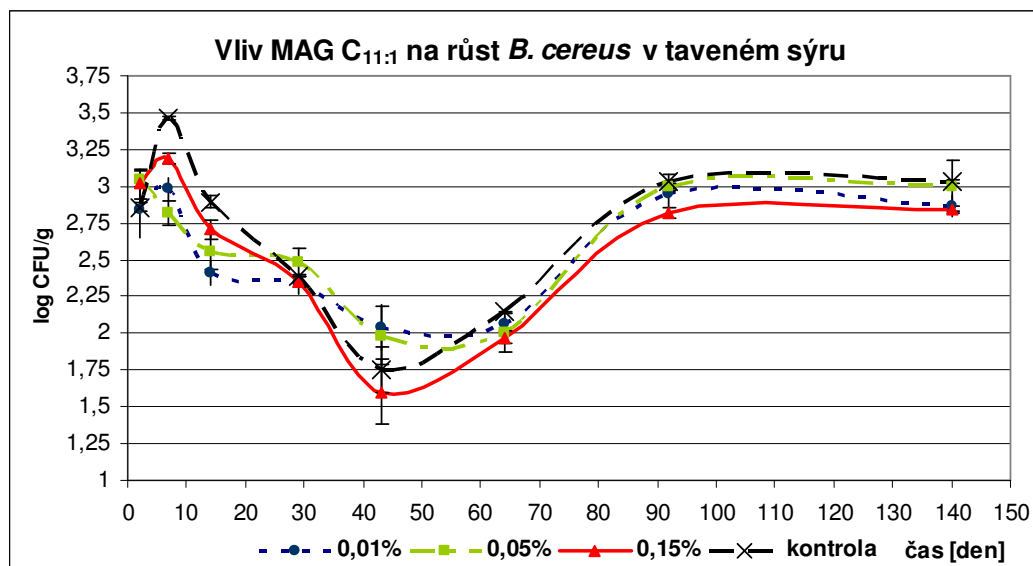


Obr. 10- Vliv MAG C<sub>11:1</sub> na růst *B. subtilis*



4,06 log CFU.g<sup>-1</sup> pro vzorky s obsahem 0,01 % w/w MAG C<sub>11:1</sub>, 3,79 log CFU.g<sup>-1</sup> pro vzorky s obsahem 0,05 % w/w MAG C<sub>11:1</sub> a 3,72 log CFU.g<sup>-1</sup> pro vzorky s obsahem 0,15 % w/w MAG C<sub>11:1</sub>. V závěru skladování celkový počet mírně klesl, ale ne o více než 0,3 log CFU.g<sup>-1</sup>.

Hodnoty pH vzorků tavených sýrů kontaminovaných *B. subtilis* použitých v této etapě vyhovovaly požadavkům pro růst bakterií rodu *Bacillus* a během skladování po dobu 140 dní nebyla pozorována výraznější změna pH. U žádného ze vzorků se neobjevila změna barvy, vůně ani konzistence. Obdobně i u vzorků s přidavkem MAG C<sub>11:1</sub> kontaminovaných *B. cereus*. Míra růstu je znázorněna na obrázku 11. Ani v tomto případě se růst v přítomnosti MAG C<sub>11:1</sub> výrazně neliší od kontrolních vzorků a po celou dobu skladování vykazuje obdobný trend.

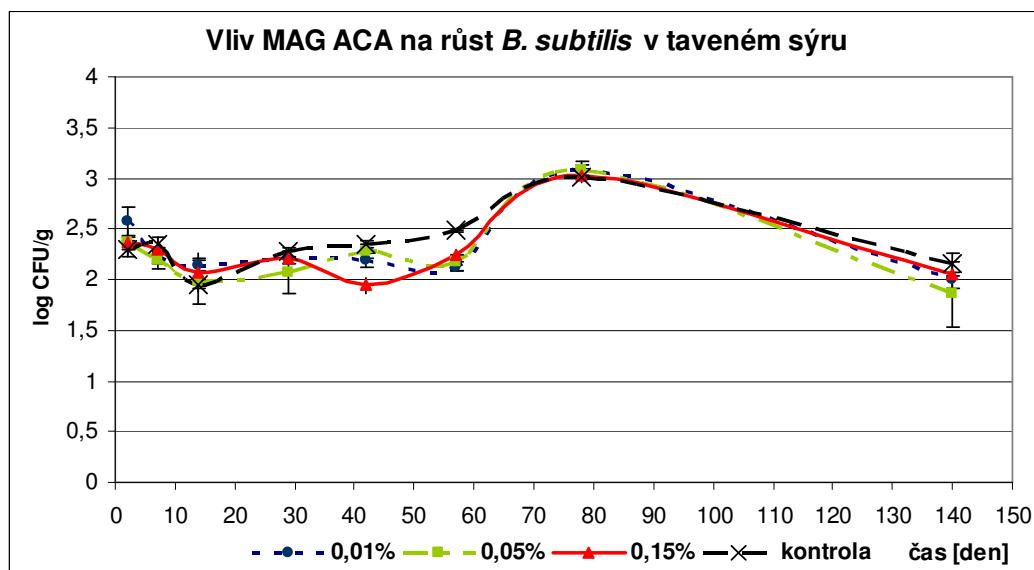


Obr. 11- Vliv MAG C<sub>11:1</sub> na růst *B. cereus*

U kontrolních vzorků bylo 7. den pozorováno mírné zvýšení celkového počtu buněk o 0,61 log CFU.g<sup>-1</sup>. U vzorků s přidavkem MAG C<sub>11:1</sub> bylo pozorováno menší zvýšení, či dokonce snížení. V období od 7. do 43. dne klesal celkový počet mikroorganismů u všech vzorků až bylo dosaženo minimálních hodnot 1,75 log CFU.g<sup>-1</sup> pro kontrolní vzorky, 2,04 log CFU.g<sup>-1</sup> pro 0,01 % w/w MAG C<sub>11:1</sub>, 1,98 log CFU.g<sup>-1</sup> pro 0,05 % w/w MAG C<sub>11:1</sub> a 1,60 log CFU.g<sup>-1</sup> pro 0,15 % w/w MAG C<sub>11:1</sub>. Poté se celkový počet buněk zvyšoval až do 92. dne, kdy bylo dosaženo téměř původních hodnot celkového počtu mikroorganismů v rozmezí 2,84 – 3,02 log CFU.g<sup>-1</sup>. Podobné hodnoty byly stanoveny i na konci skladovací doby.

### 7.2.3 Vliv monoacylglycerolu kyseliny 1-adamantankarboxylové

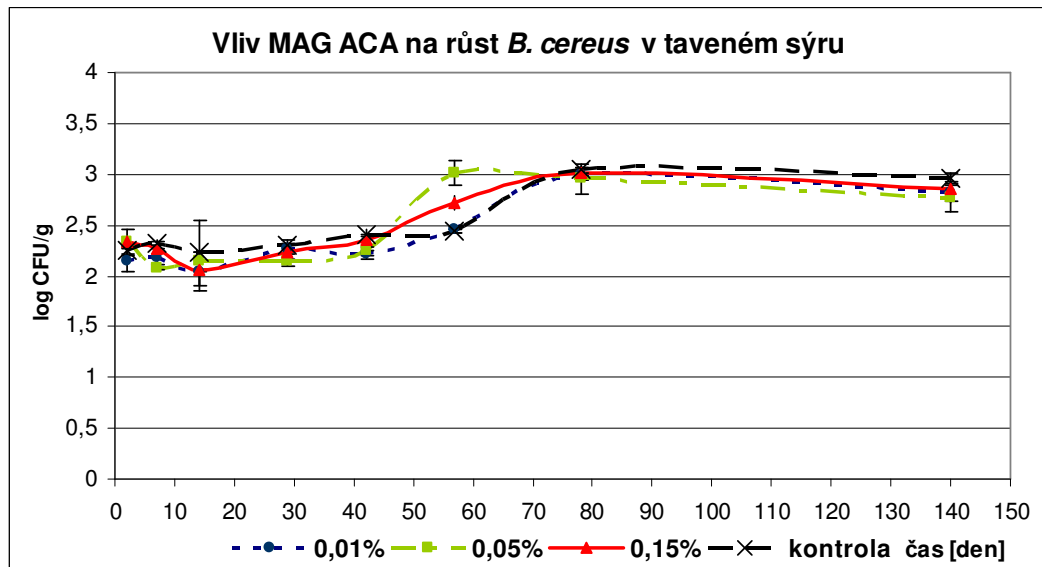
Oba testované kmeny bacilů byly vystaveny i účinku monoacylglycerolu kyseliny 1-adamantankarboxylové. Míra růstu pro vzorky kontaminované *B. subtilis* je znázorněna na obrázku 12. Během skladovací doby nebyly pozorovány výraznější rozdíly v celkovém počtu mikroorganismů u vzorků s přídatkem MAG ACA ve srovnání s kontrolními vzorky.



Obr. 12- Vliv MAG ACA na růst *B. subtilis*

Během prvních 57 dní skladování kolísala hodnota  $\log \text{CFU.g}^{-1}$  v rozmezí 1,94 – 2,57. Poté bylo pozorováno mírné zvýšení nad 3  $\log \text{CFU.g}^{-1}$  u všech testovaných koncentrací i kontrolních vzorků. V závěrečné fázi skladování (78. – 140. den) došlo k mírnému poklesu celkového počtu mikroorganismů přibližně o jeden řád.

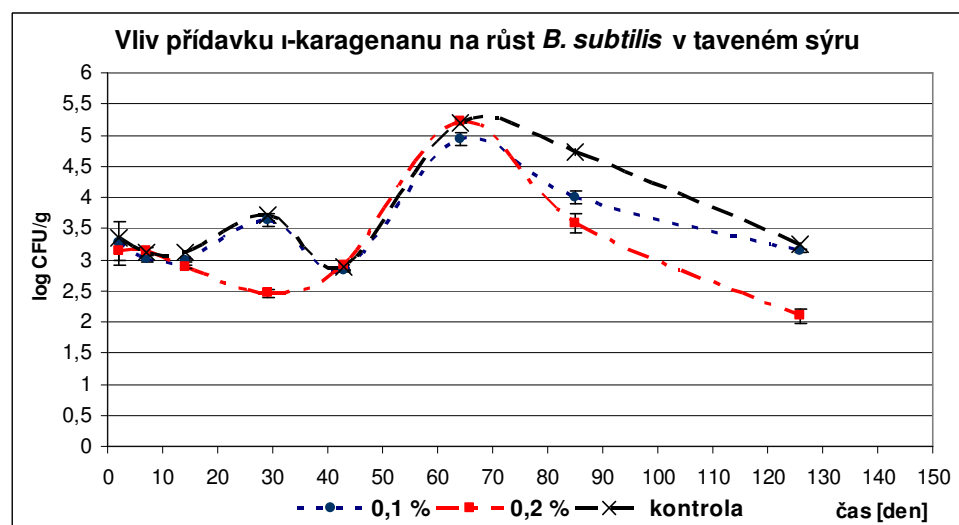
Přídavek monoacylglycerolu kyseliny 1-adamantankarboxylové nevykazoval inhibiční účinek ani proti *B. cereus*. Grafická závislost  $\log \text{CFU.g}^{-1}$  na délce skladování je znázorněna na obrázku 13. Vzorky byly po utavení zaočkovány suspenzí *B. cereus* na původní hodnotu 2,15 – 2,34  $\log \text{CFU.g}^{-1}$ . Během počátečních 42 dní kolísala celkový počet mikroorganismů kolem těchto hodnot bez výrazného rozdílu mezi testovanými koncentracemi. 57. den bylo pozorováno mírné zvýšení počtu životaschopných buněk a dokonce u koncentrací 0,05 a 0,15 % w/w MAG ACA více než u kontrolních vzorků a nejnižší testované koncentrace. 78. den bylo dosaženo celkového počtu mikroorganismů okolo 3  $\log \text{CFU.g}^{-1}$  a během závěrečné fáze skladování nebylo pozorováno výraznější snížení.

Obr. 13- Vliv MAG ACA na růst *B. cereus*

Hodnoty pH vzorků tavených sýrů vyhovovaly optimu pro růst bacilů a během 140 dní skladování nebyly pozorovány výrazné změny pH u žádného ze vzorků kontaminovaných *B. subtilis* ani *B. cereus*. Rovněž nedošlo ke změnám barvy, vůně ani konzistence u žádného ze vzorků.

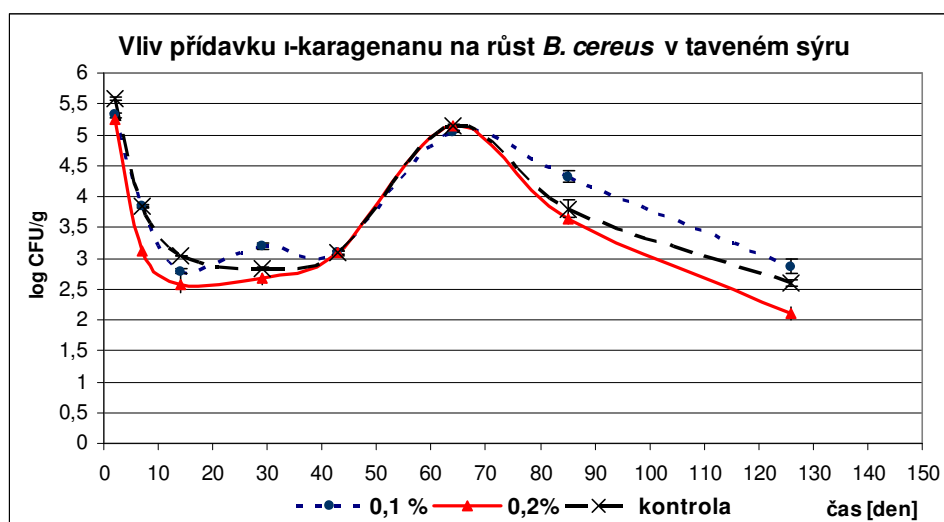
### 7.3 Vliv přídatku ι-karagenanu na růst *Bacillus* sp.

V poslední etapě byly vyrobeny vzorky taveného sýra s přídatkem ι-karagenanu a byl sledován jejich vliv na testované bakterie. Na obrázku 14 je znázorněna grafická závislost  $\log \text{CFU} \cdot \text{g}^{-1}$  na délce skladování pro tavené sýry kontaminované *B. subtilis*.

Obr. 14- Vliv ι-karagenanu na růst *B. subtilis*

Během 29 dní skladování došlo jen k mírnému zvýšení celkového počtu mikroorganismů z původní hodnoty  $3,36 \log \text{CFU.g}^{-1}$  na  $3,71 \log \text{CFU.g}^{-1}$  u kontrolních vzorků a z  $3,6$  na  $3,64 \log \text{CFU.g}^{-1}$  u vzorků s přidavkem  $0,1 \%$  w/w  $\iota$ -karagenanu, zatímco u vzorků s přidavkem  $0,2 \%$   $\iota$ -karagenanu došlo k mírnému snížení. Poté byl u nejvyšší testované koncentrace pozorován prudký vzestup celkového počtu mikroorganismů a 64. den bylo dosaženo maximálního nárůstu  $5,22 \log \text{CFU.g}^{-1}$  obdobně jako u kontrolních vzorků. V závěrečné fázi skladování se snižoval celkový počet životaschopných buněk u všech vzorků, přičemž u kontrolních vzorků a vzorků s přidavkem  $0,1 \%$  bylo dosaženo téměř původních hodnot. Při koncentraci  $0,2 \%$  w/w  $\iota$ -karagenanu byl pokles ještě výraznější.

U vzorků kontaminovaných *B. cereus* (obrázek 15) byl pozorován podobný vývoj s tím rozdílem, že vzorky byly po utavení zaočkovány na hodnotu  $5,26 - 5,58 \log \text{CFU.g}^{-1}$  a během 14 dní počet životaschopných buněk prudce poklesl na hodnoty kolem  $3 \log \text{CFU.g}^{-1}$ .



Obr. 15- Vliv  $\iota$ -karagenanu na růst *B. cereus*

V období mezi 14. a 43. dnem nedošlo k výrazné změně v celkovém počtu mikroorganismů, poté byl pozorován růst a 64. den se zastavil na hodnotě těsně nad  $5 \log \text{CFU.g}^{-1}$ . Během dalšího skladování klesal počet životaschopných buněk u všech vzorků na konci skladovací doby (126. den) byly stanoveny hodnoty  $2,60 \log \text{CFU.g}^{-1}$  pro kontrolní vzorky a  $2,86 \log \text{CFU.g}^{-1}$  pro vzorky s přidavkem  $0,1 \%$  w/w  $\iota$ -karagenanu. U vzorků s přidavkem  $0,2 \%$  w/w  $\iota$ -karagenanu poklesla hodnota až na  $2,10 \log \text{CFU.g}^{-1}$ . Obdobně jako u předchozích etap, ani u vzorků této etapy nebyly během skladování po dobu 126 dní pozorovány změny barvy, vůně a konzistence a pH tavených sýrů, které bylo v rozmezí přijatelném pro růst bacilů.

## 7.4 Senzorické hodnocení

Vzhledem k vyššímu počtu vzorků byla senzorická analýza rozdělena na dvě série. Prvním 15 hodnotitelům byly předloženy vzorky s přídatkem MAG C<sub>11:0</sub> o koncentraci 0,01, 0,05 a 0,15 % w/w společně s kontrolním vzorkem (tavený sýr bez přídatku testované inhibiční látky). Ve druhé sérii byly předloženy vzorky s přídatkem MAG C<sub>11:1</sub> o koncentraci 0,05 a 0,15 % w/w, MAG ACA o koncentraci 0,05 a 0,15 % w/w a s přídatkem ι-karagenanu o koncentraci 0,1 a 0,2 % w/w společně s kontrolním vzorkem. Senzorické znaky vzhled a barva, chuť a vůně a celkové hodnocení byly hodnoceny pomocí sedmibodové ordinální hédonické stupnice.

V tabulce 7 jsou prezentovány výsledky vybraných senzorických znaků jako mediány. Čím nižší je hodnota, tím lépe byl daný vzorek ohodnocen. Písmena v horních indexech značí signifikantní rozdíly na hladině významnosti 5 % mezi hodnotami v rámci sloupce a série. Pokud je alespoň jedno z písmen shodné, nebyl mezi vzorky shledán rozdíl.

Tab. 7- Výsledky senzorického hodnocení pomocí stupnic

	vzorek	vzhled a barva	chuť a vůně	celkové hodnocení
1. série	kontrola	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>	3 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>
	0,05 % MAG C <sub>11:0</sub>	2 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	4 <sup>a,b</sup>
	0,15 % MAG C <sub>11:0</sub>	2 <sup>a</sup>	6 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>
2. série	kontrola	3 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a,c</sup>
	0,1 % ι-karagenanu	3 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	3 <sup>a,b,c</sup>
	0,2 % ι-karagenanu	3 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	3 <sup>c</sup>
	0,05 % MAG C <sub>11:1</sub>	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>	6 <sup>b</sup>	5 <sup>b,d</sup>
	0,05 % MAG ACA	4 <sup>a</sup>	4 <sup>a,b</sup>	4 <sup>a,b,d</sup>
	0,15 % MAG ACA	5 <sup>a</sup>	6 <sup>b</sup>	6 <sup>d</sup>

Ve vzhledu a barvě nebyly na hladině významnosti 5 % shledány statisticky významné rozdíly mezi vzorky tavených sýrů v první ani druhé sérii. U senzorického znaku chuť a vůně byly na téže hladině významnosti shledány statisticky významné rozdíly v rámci 1. série vzorků, kdy vzorek s přídatkem 0,15 % w/w MAG C<sub>11:0</sub> byl označen za nevyhovující. V celkovém hodnocení byl tento vzorek označen na méně dobrý, přičemž statisticky významný rozdíl byl shledán pouze mezi 0,01 % w/w a 0,15 % w/w MAG C<sub>11:0</sub>.

Přídavek  $\iota$ -karagenanu do taveného sýra neměl vliv na sledované senzorní znaky a vzorky byly hodnoceny shodně s kontrolními vzorky, případně se lišily o jeden stupeň bez statisticky významného rozdílu na hladině významnosti 5 %. Přídavek monoacylglycerolů ovlivnil sledované senzorní znaky. V chuti a vůni byl shledán statisticky významný rozdíl na hladině významnosti 5 %. Signifikantní rozdíly byly detekovány mezi vzorky s přídavkem 0,15 % w/w MAG C<sub>11:1</sub> a kontrolními vzorky, vzorky s přídavkem  $\iota$ -karagenanu a také mezi 0,15 % w/w MAG ACA a kontrolními vzorky, vzorky s přídavkem  $\iota$ -karagenanu. Tavené sýry s nejvyšší testovanou koncentrací monoacylglycerolu kyseliny undecenové a 1-adamantanokarboxylové byly ohodnoceny posuzovateli za nevyhovující v chuti a vůni. Obdobných výsledků bylo dosaženo i v rámci celkového hodnocení vzorků. Vzorek s přídavkem 0,15 % w/w MAG C<sub>11:1</sub> byl hodnotiteli označen za méně dobrý a vzorek s přídavkem 0,15 % w/w MAG ACA za nevyhovující.

Součástí senzorního hodnocení byl i pořadový preferenční test. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 8 jako součty pořadí. Čím je hodnota součtu nižší, tím je vzorek preferovanější.

Tab. 8- Výsledky pořadového preferenčního testu

	vzorek	součet pořadí
1. série	kontrola	38
	0,01 % MAG C <sub>11:0</sub>	42
	0,05 % MAG C <sub>11:0</sub>	51
	0,15 % MAG C <sub>11:0</sub>	75
2. série	kontrola	37
	0,1 % $\iota$ -karagenanu	42
	0,2 % $\iota$ -karagenanu	31
	0,05 % MAG C <sub>11:1</sub>	66
	0,15 % MAG C <sub>11:1</sub>	74
	0,05 % MAG ACA	72
	0,15 % MAG ACA	98

V první sérii byl za nejvíce preferovaný označen kontrolní vzorek, u dalších vzorků klesala preference s rostoucí koncentrací MAG C<sub>11:0</sub>. Statisticky významné rozdíly jsou však pouze mezi 0,15 % w/w MAG C<sub>11:0</sub> a kontrolním vzorkem (i vzorkem s nejnižší testovanou koncentrací). Ve druhé sérii vzorků byl nejvíce preferovaný vzorek s přídavkem 0,2 %  $\iota$ -karagenanu, ale na hladině významnosti 5 % nebyl shledán rozdíl mezi kontrolním vzorkem a vzorky s přídavkem  $\iota$ -karagenanu v koncentraci 0,1 a 0,2 % w/w.

Další v pořadí byly vzorky: 0,1 % w/w  $\iota$ -karagenanu, kontrola, 0,05 % w/w MAG C<sub>11:0</sub>, 0,05 % w/w MAG ACA, 0,15 % w/w MAG C<sub>11:0</sub> a jako nejhorší byl hodnocen vzorek s přidavkem 0,15 % w/w monoacylglycerolu kyseliny 1-adamantankarboxylové.

## 7.5 Vodní aktivita vzorků tavených sýrů

U vzorků, které nebyly zaočkovány testovanými bakteriemi, byla během skladování stanovena vodní aktivita. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce 9.

Tab.9- Vodní aktivita vzorků taveného sýra

vzorek	doba skladování [den]	
	30	88
30 % w/w tuku	0,967	0,974
40 % w/w tuku	0,965	0,969
50 % w/w tuku	0,971	0,977
0,01 % w/w MAG C <sub>11:0</sub>	0,971	0,976
0,05 % w/w MAG C <sub>11:0</sub>	0,969	0,975
0,15 % w/w MAG C <sub>11:0</sub>	0,969	0,974
0,01 % w/w MAG C <sub>11:1</sub>	0,970	0,974
0,05 % w/w MAG C <sub>11:1</sub>	0,968	0,974
0,15 % w/w MAG C <sub>11:1</sub>	0,967	0,975
0,01 % w/w MAG ACA	0,966	0,974
0,05 % w/w MAG ACA	0,967	0,974
0,15 % w/w MAG ACA	0,967	0,974
0,1 % w/w $\iota$ -karagenanu	0,971	0,971
0,2 % w/w $\iota$ -karagenanu	0,971	0,967

Mezi kontrolními vzorky, vzorky s přidavkem monoacylglycerolů a vzorky s přidavkem  $\iota$ -karagenanu nebyly pozorovány výraznější rozdíly v hodnotách vodní aktivity, která se pohybovala v rozmezí 0,966 – 0,971 během 30. dne skladování. 88: den byly naměřeny u téměř všech vzorků nepatrně vyšší hodnoty v rozmezí 0,969 – 0,977, kromě vzorků s přidavkem 0,2 %  $\iota$ -karagenanu, kde došlo k mírnému snížení na 0,967. Vodní aktivita všech vzorků odpovídá optimálnímu rozmezí pro růst bakterií 0,93 – 0,99 [34] a dokonce byla vyšší i než přibližná minimální hodnota pro růst *B. subtilis* 0,95 [18].

## 8 DISKUZE

Tavené sýry jsou potraviny, během jejichž výroby dochází k tepelnému ošetření do 100 °C a dochází k usmrcení vegetativních forem mikroorganismů. Bakteriální spory, jejichž zdrojem mohou být přírodní sýry, vedlejší suroviny i okolní prostředí, tepelné ošetření na úrovni pasteurace přežívají a klíčení spor může být navíc teplotním záhřevem podpořeno. Také hodnoty pH a vodní aktivity tavených sýrů dovolují vyklíčení spor v taveném sýru. Díky bohatému enzymatickému vybavení mohou sporulující bakterie rodu *Bacillus* způsobovat vady tavených sýrů, případně mohou být původci alimentárních otrav. Pro simulaci kontaminace během technologického procesu, případně již kontaminovanou surovinu, byla suspenze bakterií přidávána do taveniny bezprostředně po tavení.

Růst a množení kontaminující mikroflóry může být ovlivněn řadou faktorů. Kromě hodnoty pH či vodní aktivity může být mikroflóra ovlivněna i množstvím tuku, což bylo testováno v první etapě, kdy byl sledován růst *B. subtilis* a *B. cereus* v tavených sýrech s obsahem tuku v sušině 30, 40 a 50 % w/w. U vodní aktivity a pH tavených sýrů nedocházelo v průběhu skladování k výraznějším změnám a hodnoty se nacházely v rozmezí přijatelném pro růst bakterií rodu *Bacillus*. U vzorků o tučnosti 30 a 40 % w/w zaočkovaných *B. subtilis* byl pozorován růst hned z začátku, kdežto u vzorků o tučnosti 50 % w/w bylo zaznamenáno zvýšení celkového počtu mikroorganismů až od 7. dne. Vyšší tučnost patrně zapříčinila prodloužení lag-fáze u *B. subtilis*, ale maximální nárůst byl přibližně o jeden řád vyšší, než u vzorků s nižší tučností. Obdobně i Mehta a Tatiny [19] uvádějí, že méně tučné sýry jsou méně příznivým prostředím pro růst bakterií *Listeria monocytogenes* a *Salmonella* sp. A také ter Steeg a kol. [59] uvádějí snížený růst *Clostridium botulinum* v prostředí s nižším obsahem tuku. Od 43. dne nebyly pozorovány výraznější rozdíly mezi vzorky s různou tučností a počet životaschopných buněk kolísal kolem původní hodnoty. Během prvních 40 dní skladování tavených sýrů kontaminovaných *B. cereus* došlo ke zvýšení celkového počtu mikroorganismů pouze u tavených s obsahem tuku v sušině 30 % w/w. Při vyšším obsahu tuku v sušině docházelo pouze k pozvolnému poklesu a situace je tedy zcela opačná jako u *B. subtilis*. Od 40. dne nastává nepatrné zvýšení celkového počtu buněk a v závěru skladovací doby je nárůst u vzorků s nejvyšší testovanou tučností mírně vyšší.

Kontaminující mikroflóra může být potlačena i přidávkem některých látek, které musí vyhovovat řadě požadavků. Inhibiční látky by neměly mít negativní vliv na lidský organismus, neměly by negativně ovlivňovat organoleptické vlastnosti potraviny a pokud možno



by měly být přírodního charakteru. V tavených sýrech mohou působit inhibičně látky s emulgačními účinky (tavicí soli) a emulgátory, kterými mohou být monoacylglyceroly. Fosforečnanové soli vykazují antibakteriální účinky především vůči bakteriím s buněčnou stěnou grampozitivního typu a některým kvasinkám a plísním. Efekt je závislý na délce řetězce a roste s délkou řetězce [2]. Složení tavicích solí modelových vzorků tavených sýrů bylo voleno tak, aby nebyl ovlivněn růst testovaných bakterií. Tuto skutečnost potvrzují i kontrolní vzorky, které byly utaveny při každé etapě.

U monoacylglycerolů byl v minulosti prokázán inhibiční účinek vůči širokému spektru mikroorganismů za laboratorních podmínek. Inhibiční aktivita však může být snížena tvorbou komplexů se složkami potravin. Jedním z cílů předložené práce bylo sledovat inhibiční vliv látek acylglycerolového typu na růst sporulujících bakterií v matrici taveného sýra s obsahem tuku v sušině 50 % w/w. Do surovinové skladby byly zahrnuty monoacylglycerol kyseliny undekanové (MAG C<sub>11:0</sub>), undecenové (MAG C<sub>11:1</sub>) a 1-adamantankarboxylové (MAG ACA) v koncentraci 0,01, 0,05 a 0,15 % w/w.

U žádného monoacylglycerolu v nejnižší testované koncentraci nebyl pozorován inhibiční účinek vůči testovaným bacilům a celkový počet mikroorganismů dosahoval obdobných hodnot jako u kontrolních vzorků. Přídavek 0,05 % w/w monoacylglycerolu kyseliny undekanové způsobil částečnou inhibici růstu. Počet životaschopných buněk u vzorků kontaminovaných *B. subtilis* byl snížen téměř o dva řády, u vzorků kontaminovaných *B. cereus* o více jak 1,5 řádu. Nejvyšší testovaná koncentrace 0,15 % w/w MAG C<sub>11:0</sub> způsobila úplnou inhibici růstu obou kmenů testovaných bacilů a hodnoty celkového počtu mikroorganismů kolísaly kolem původní hodnoty. Kompletní inhibici růstu *B. subtilis* a *B. cereus* uvádí ve své práci i Doležálková [38] a Buňková [21], kdy během 24 hodinové kultivace v živném médiu s 100 mg.l<sup>-1</sup> MAG C<sub>11:0</sub> nebyl zaznamenán růst žádné z testovaných bakterií rodu *Bacillus*. Při senzoričké analýze vzorků bylo zjištěno, že přídavek MAG C<sub>11:0</sub> neměl negativní vliv na vzhled a barvu taveného sýra. Ovlivněna byla chuť a vůně. S rostoucí koncentrací monoacylglycerolu se výrazněji objevovala cizí příchut' a vzorek s přídavkem 0,15 % w/w MAG C<sub>11:0</sub> byl hodnotiteli označen jako nevyhovující v chuti a vůni.

Antibakteriální účinek monoacylglycerolů závisí kromě délky řetězce mastné kyseliny i na poloze a počtu dvojných vazeb [21], [38], [43]. Přítomnost jedné dvojně vazby v řetězci snižuje účinek monoacylglycerolů, což dokládají výsledky působení monoacylglycerolu kyseliny undecenové. Oba testované kmeny bacilu byly schopny růstu ve vzorcích tavené-

ho sýra s přidavkem 0,15 % w/w MAG C<sub>11:1</sub>. U vzorků s nejvyšší testovanou koncentrací MAG C<sub>11:1</sub> kontaminovaných *B. subtilis* byl celkový počet mikroorganismů v závěru skladovací doby přibližně o jeden řád nižší ve srovnání s kontrolou. U vzorků s *B. cereus* byl pozorován růst shodný s kontrolními vzorky.

Nejméně účinný vůči bakteriím rodu *Bacillus* byl monoacylglycerol kyseliny 1-adamantankarboxylové. U obou testovaných kmenů byl růst v tavených sýrech s přidavkem MAG ACA téměř shodný s kontrolními vzorky. Navíc sensorickou analýzou byl prokázán negativní vliv na chuť a vůni a s rostoucí koncentrací MAG ACA klesala preferovanost tavených sýrů.

Růst testovaných bakterií v přítomnosti ι-karagenanu byl v průběhu skladování obdobný jako u kontrolních vzorků. V závěru skladovací doby došlo k výraznějšímu poklesu životaschopných buněk u tavených sýrů s 0,2 % w/w ι-karagenanu. U vzorků kontaminovaných *B. subtilis* byl celkový počet mikroorganismů o jeden řád nižší. Sensorickou analýzou nebylo prokázáno negativní ovlivnění vzhledu a barvy ani chuti a vůně při přidavku ι-karagenanu do taveného sýra.

## ZÁVĚR

V experimentální části práce byl sledován růst sporotvorných bakterií *Bacillus subtilis* CCM 4062 a *Bacillus cereus* CCM 2010. Těmito kmeny byly zaočkovány modelové vzorky tavených sýrů o různé tučnosti, ale také s přidavkem monoacylglycerolů. Výsledky lze shrnout v následujících bodech:

- sýry s nižším obsahem tuku v sušině jsou méně příznivým prostředím pro růst *B. subtilis*,
- *B. cereus* rostl lépe v počáteční fázi skladování ve vzorcích s nižší tučností,
- po 43. dni skladování nebyl pozorován rozdíl mezi vzorky s rozdílnou tučností a během dalšího skladování nebyly zaznamenány významnější změny celkového počtu mikroorganismů,
- přidavek monoacylglycerolu kyseliny undekanové o koncentraci 0,15 % w/w způsobil kompletní inhibici růstu *B. subtilis* i *B. cereus* ve vzorcích taveného sýra,
- přidavek monoacylglycerolu kyseliny undecenové o koncentraci 0,15 % způsobil pouze snížení počtu buněk o jeden řád u *B. subtilis*,
- přidavek monoacylglycerolu kyseliny 1-adamantankarboxylové neměl negativní vliv na růst testovaných bacilů,
- přidavek  $\iota$ -karagenanu nepůsobil inhibičně proti *B. subtilis* ani i *B. cereus*,
- přidavek monoacylglycerolů ani  $\iota$ -karagenanu neměl vliv na vodní aktivitu a pH tavených sýrů,
- s rostoucí koncentrací monoacylglycerolů klesala sensorická přijatelnost tavených sýrů,
- vzorky s přidavkem 0,15 % w/w MAG C<sub>11:0</sub>, MAG C<sub>11:1</sub> a MAG ACA byly označeny za nevyhovující v chuti a vůni,
- s rostoucí koncentrací monoacylglycerolů klesala také preferovanost tavených sýrů.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] NĚMCOVÁ, T. *Vliv podmínek skladování na obsah mastných kyselin v tavených sýrech*. Brno, 2008. 54 s. Diplomová práce na Chemické fakultě VUT v Brně
- [2] BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., KRÁČMAR, S. *Základní principy výroby tavených sýrů*. Brno:Ediční středisko MZLU, 2009. 70 s. ISBN 978-80-7375-336-8
- [3] FORMAN, L., ČEPIČKA, J. *Mlékárenská technologie II*, 2. vyd. Praha VŠCHT, 1996, 217 s. ISBN 80-7080-250-2
- [4] BUŇKA, F.; HRABĚ, J. Tavené sýry. *Potravinářská revue*. 2006, 3, s. 13-16. ISSN 1801-9102
- [5] Spotřeba potravin a nealkoholických nápojů (na obyvatele za rok) [online]. 2008 [2011-2-12]. Dostupné z WWW:  
<[http://www.czso.cz/csu/2010edicniplan.nsf/t/EA0049D17E/\\$File/30041001.pdf](http://www.czso.cz/csu/2010edicniplan.nsf/t/EA0049D17E/$File/30041001.pdf)>
- [6] ŠTÍPKOVÁ, J. Mléčné výrobky- sýry, ne-sýry a jiné mléčné analogy. *Potravinářská revue*. 2007, s. 23-26
- [7] CARIĆ, M., KALÁB, M. Processed Cheese Products. In Fox, P.F. (Ed.) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Volume 2, Major Cheese Groups*. 2. ed. London and New York: Elsevier Applied Science, 1997. s. 467 – 505
- [8] GUINEE, T. P. Pasteurized processed cheese products. In Roginski, H., Fuguay, J. W., Fox, P. F. (Ed.) *Encyklopedia of Dairy Science, Volume I*. London: Elsevier Science, 2003, s. 411-418. ISBN 0122272358
- [9] BRICKEY, C. A., AUTY, M. A. E., PIRANIO, P., MCSWEENEY, P. L. H. The Effect of Natural Cheddar Cheese Ripening on the Functional and Textural Properties of the Processed Cheese Manufactured Therefrom. *Journal of Food Science*. 2007, 72, s. 483-490, ISBN 0022-1147
- [10] BUŇKA, F. *Vliv sterilačního záhřevu na jakost tavených sýrů určených pro krizové situace*. Vyškov, 2004. 111 s. Disertační práce na Fakultě ekonomiky a managementu VVŠ PV
- [11] LUKÁŠOVÁ, J. *Hygiena a technologie mléčných výrobků*, 1. vyd, Brno Veterinární a farmaceutická univerzita, 2001, 180 s. ISBN 8073054159

- [12] 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
- [13] 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. vol. 2, Major Cheese Groups*. 3. ed. London and New York: Elsevier Applied Science, 2004. s. 349 – 394. ISBN 0-1226-3653-8
- [14] PAVELKA, A., *Mléčné výrobky pro vaše zdraví*. Litera Brno, 1996, 106 s. ISBN 80-85763-09-5
- [15] 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, vol. 35, p. 15 – 20
- [16] Konzervace a balení potravin [online]. 2007 [2011-2-20]. Dostupné z WWW: <<http://utb.cepac.cz/Screens/Explorer.aspx?id=8>>
- [17] GLASS, K., DOYLE, M. E. *Safety of processed cheese*. Madison, Wisconsin: FRI Briefings, Food Research Institute, University of Wisconsin, 2005.
- [18] JAY, J.M., *Modern Food Microbiology*, Maryland: Aspen publication, 2000, 767 s. ISBN 0-8342-1671-X
- [19] MEHTA, A., TATINI S. R. An evaluation of the microbiological safety of reduced-fat Cheddar-like cheese. *Journal of Food Protection*. 1994, vol. 57, p.776-779.
- [20] GLASS, K. A., JOHNSON, E. A. Factors that contribute to the botulinal safety of reduce-fat and fat free process cheese products. *Journal of Food Protection*. 2004, vol. 67, p. 1687-1693
- [21] BUŇKOVÁ, L., *Účinky přídatných látek používaných v potravinářství a kosmetice na růst vybraných bakterií*. Brno, 2008, 98 s. Rigorózní práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy Univerzity v Brně
- [22] KNABEL, S., WALKER, H., HARTMAN, P. Inhibition of *Aspergillus flavus* and Selected Gram-positive Bakteria by Chelation of Essentials Metal Cationts by Polyphosphates. *Journal of Food Protection*. 1991, Vol.54, p.360-365

- [23] MAIER, S. K., SCHERER, S., LOESSNER, M. J., Long-chain polyphosphate causes cell lysis and inhibits *Bacillus cereus* septum formation, which is dependent on divalent cations, *Applied and Environment Microbiology*, 1999, vol. 65, p. 3942-3949, ISSN 0099-2240
- [24] AKHTAR, S., PAREDES-SEBJA, D., SARKER, M. Inhibitory effects of polyphosphates on *Clostridium perfringens* growth, sporulation and sporeoutgrowth. *Food Microbiology*. 2008, vol. 25, p. 802-808, ISSN 0740-0020
- [25] DAVIDSON, P. M., SOFOS, J. N., BRANEN, A. L. *Antimicrobials in Food*, Boca Raton: CRC Press, 2005, ISBN 0824740378
- [26] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita, 2007, ISBN 8021042079
- [27] VAŘEJKA, F., MRÁZ, O., SMOLA, J. *Speciální veterinární mikrobiologie*, Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1989, 258 s. ISBN 80-209-0042-X
- [28] GÖRNER, F., VALÍK, L. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*, Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 8096706497
- [29] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*, Praha: Academia, 2009, 364 s. ISBN 978-80-200-1703-1
- [30] ŽIŽKA, B., KORBELOVÁ, M. *Mikrobiologie I pro SPŠ potravinářské*, Praha, 1992, 195 s.
- [31] BARBARA, M.L., BAIRD-PARKER, T.C., GOULD, G.W., *The Microbiological Safety and Quality of Food*, Maryland: Aspen Publishers, 2000
- [32] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*, Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902896-6-5
- [33] FEKETE, T. *Bacillus* species (not *anthracis*), *Clinical Microbiology Newsletter*, 2009, vol. 31, p. 87-92
- [34] Potravinářská mikrobiologie. [online]. 2007 [cit 2011 2 23] Dostupný z WWW: <<http://utb.cepac.cz/Screens/Explorerer.aspx?id=7>>
- [35] *Bacillus subtilis* Final Risk Assessment [online]. 1997 [cit 2010-10-01]. Dostupný z WWW: <[http://www.epa.gov/biotech\\_rule/pubs/fra/fra009.htm](http://www.epa.gov/biotech_rule/pubs/fra/fra009.htm)>

- [36] POKORNÝ, J., DUBSKÁ, L., *Technologie tuků*, Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1986, 450 s.
- [37] 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.
- [38] DOLEŽÁLKOVÁ, I. *Účinky vybraných monoacylglycerolů na růst bakterií a mikroskopických vláknitých hub*, Brno, 2010, 98 s. Rigorózní práce na Přírodovědecké fakultě Masarykovy Univerzity v Brně.
- [39] MOULOUNGUI, Z., RAKOTONDRAZAFY, V., PEYROU, G., GACHEN C., EYCHENNE V. Pure  $\alpha$ -monoglycerides for industrial applications. *Agro Food Industry Hi-Tech*, 1998, vol. 9, p. 10-14.
- [40] DAVÍDEK, J., JANÍČEK, G., POKORNÝ, J., *Chemie potravin*, 1. vyd. Praha: SNTL, 1983, 629 s.
- [41] BORNSCHEUER, U. T. Lipase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols. *Enzyme and Microbial Technology*. 1995, vol. 17, p. 578-586.
- [42] JANIŠ, R., KREJČÍ, J., KLÁSEK, A. (2000). 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.
- [43] *Chemie a technologie tenzidů a detergentů*. [online]. 2007 [cit 2011 3 01] Dostupný z WWW: <<http://utb.cepac.cz/Screens/Explorer.aspx?id=3>>
- [44] CONLEY, A. J., KABARA, J. J. Antimicrobial action of esters of polyhydric alcohols. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1973, vol. 4, p. 501-506.
- [45] NAIR M.K.M., JOY J., VASUDEVAN P., HINCKLEY L., HOAGLAND T.A., VENKITANARAYANAN K.S. Antibacterial effect of caprylic acid and monokaprylin on major bacterial mastitis pathogens. *Journal of Dairy Science*.2005, vol. 88, p. 3488-3495.
- [46] LEE, J.Y., KIM, Y.S., SHIN, D.W. Antimicrobial synergistic effect of linolenic acid and monoglyceride against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2002, vol. 50, p. 2193-2199.

- [47] RŮŽIČKA J., VELCLOVÁ K., JANIŠ R., KREJČÍ J., Antimicrobial effects of 1-monoacylglycerol prepared by catalytic reaction of glycidol with fatty acids, *European Food Research and Technology*, 2003, vol. 217, p. 329-331.
- [48] COTTON, L. N., MARSHALL, D.L. Monolaurin preparation method affects activity against vegetative cells of *Bacillus cereus*. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*. 1997, vol. 30, p. 830-833.
- [49] LEE, J.Y., KIM, Y.S., SHIN, D.H. Antimicrobial synergistic effect of linolenic acid and monoglyceride against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2002, vol. 50, p. 2193-2199.
- [50] MANSOUR, M., MILLIÉRE, J.B. An inhibitory effect of a nisin-monolaurin combination on *Bacillus* sp. vegetative cells in milk. *Food Microbiology*. 2001, vol. 18, p. 87-94.
- [51] BLASZYK, M., HOLLEY, R.A. Interaction of monolaurin, eugenol and sodium citrate on growth of common meat spoilage and pathogenic organisms. *International Journal of Food Microbiology*. 1998, vol. 39, p.175-183.
- [52] ABABOUCHE, L.H., BOUQARTACHA, F., BUSTA, F.F. Inhibition of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells by fatty acids and glyceryl monododecanoate. *Food Mikrobiology*. 1994, vol.11, p. 327-336.
- [53] 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*. vol. 15, p. 527-537.
- [54] LEKOGO, B.M., COROLLER, L., MATHOT, A.G., MAFART, P., LEGUERINEL, I., Modeling the influence of palmitic, palmitoleic, stearic and oleic acids on apparent heat resistance of spores *Bacillus cereus* NTCC 11145 and *Clostridium sporogenes* Pasteur 79.3. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, vol. 141, p. 242-247.
- [55] VELÍŠEK, J., *Chemie potravin I*, Tábor:OSSIS, 1999, 331 s. ISBN 80-86659-00-3
- [56] IMESON, A. P. Carrageenan and furcellaran. In PHILLIPS, G.O., WILLIAMS, P.A. (eds.) *Handbook of hydrocolloids*. 1. ed., Boca Raton:CRC Press. 2000. p.164-185.



- [57] BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., KRÁČMAR, S. Vybrané hydrokoloidy a emulgátory ve výrobě tavených sýrů. *Acta fytotechnica et zootechnica*. 2009, p. 69-78.
- [58] ČERNÍKOVÁ, M. BUŇKA, F., PALVÍNEK, V., ČECHOVÁ, L., BŘEZINA, P., HRABĚ, J., Vliv přísady kappa- a iota-karagenanu na viskoelastické a organoleptické vlastnosti tavených sýrů. In *Celostátní přehledy sýrů 2007, výsledky přehledů a sborník přednášek semináře Mléko a sýry*. Štětina, J., Čurda, L. Praha: VŠCHT, 2007, ISBN 978-80-7080-661-6.
- [59] TER STEEG, P. F., CUPPERS, H. G. A. M., HELLEMONS, J. C & RIJKE, G. Growth of proteolytic *Clostridium botulinum* in process cheese product. *Journal of Food Protection*. 1995, vol. 58, p. 1091-1099

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

CCM	Česká sbírka mikroorganismů
DIDI	hydrogenfosforečnan disodný dihydrát
KPS	dihydrogendifosforečnan sodný
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 dodekanové (laurové)
MPB	masopeptonový bujón
PCA	Plate-Count agar
PYRO	difosforečnan sodný

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1- Izomery monoacylglycerolu [36].....	24
Obr. 2- Esterifikace mastné kyseliny glycerolem [39].....	25
Obr. 3- Glycerolýza [36] .....	25
Obr. 4- Hydrolýza triacylglycerolu .....	26
Obr. 5- Adice mastné kyseliny na glycidol [39] .....	26
Obr. 6- Růst <i>B. subtilis</i> v taveném sýru .....	41
Obr. 7- Růst <i>B. cereus</i> v taveném sýru .....	42
Obr 8- Vliv MAG C <sub>11:0</sub> na růst <i>B. subtilis</i> .....	44
Obr. 9- Vliv MAG C <sub>11:0</sub> na růst <i>B. cereus</i> .....	44
Obr. 10- Vliv MAG C <sub>11:1</sub> na růst <i>B. subtilis</i> .....	45
Obr. 11- Vliv MAG C <sub>11:1</sub> na růst <i>B. cereus</i> .....	46
Obr. 12- Vliv MAG ACA na růst <i>B. subtilis</i> .....	47
Obr. 13- Vliv MAG ACA na růst <i>B. cereus</i> .....	48
Obr. 14- Vliv ι-karagenanu na růst <i>B. subtilis</i> .....	48
Obr. 15- Vliv ι-karagenanu na růst <i>B. cereus</i> .....	49

**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1- Fosforečnany používané při výrobě tavených sýrů [2].....	14
Tab. 2- Přibližné minimální hodnoty $a_w$ [18] .....	16
Tab. 3- Frakce karagenanů [55] .....	31
Tab. 4- Charakteristika taveb 1. etapy .....	38
Tab. 5- Charakteristika taveb 2., 3. a 4. etapy.....	38
Tab. 6- Charakteristika taveb 5. etapy .....	39
Tab. 7- Výsledky sensorického hodnocení pomocí stupnic.....	50
Tab. 8- Výsledky pořadového preferenčního testu .....	51
Tab.9- Vodní aktivita vzorků taveného sýra.....	52

## SEZNAM PŘÍLOH

PI- Surovinová skladba pro 1. etapu

PII- Surovinová skladba pro 2., 3. a 4. etapu

PIII- Surovinová skladba pro 5. etapu

PIV- Stupnice pro hodnocení tavených sýrů

PV- Protokol pro senzorické hodnocení tavených sýrů

PVI- Průměrné hodnoty celkového počtu mikroorganismů během skladování

PVII- Průměrné hodnoty pH vzorků tavených sýrů

## PŘÍLOHA P I: SUROVINOVÁ SKLADBA PRO 1. ETAPU

A- Tavený sýr s obsahem 30 % w/w tuku v sušině

složka	m [g]
eidamská cihla 30%	800
máslo	15
DIDI	21
KPS	6
PYRO	3
voda	255

B- Tavený sýr s obsahem 40 % w/w tuku v sušině

složka	m [g]
eidamská cihla 30%	650
máslo	90
DIDI	21
KPS	6
PYRO	3
voda	300

C- Tavený sýr s obsahem 50 % w/w tuku v sušině

složka	m [g]
eidamská cihla 30%	550
máslo	170
DIDI	21
KPS	6
PYRO	3
voda	355

## PŘÍLOHA P II: SUROVINOVÁ SKLADBA PRO 2., 3. A 4. ETAPU

A- Kontrolní vzorky

složka	m [g]
eidamská cihla 30%	550
máslo	170
DIDI	21
KPS	6
PYRO	3
voda	355

B- Vzorky s 0,01 % w/w MAG

složka	m [g]
eidamská cihla 30%	550
máslo	170
DIDI	21
KPS	6
PYRO	3
MAG	0,111
voda	355

C- Vzorky s 0,05 % w/w MAG

složka	m [g]
eidamská cihla 30%	550
máslo	170
DIDI	21
KPS	6
PYRO	3
MAG	0,553
voda	355

D- Vzorky s 0,15 % w/w MAG

složka	m [g]
eidamská cihla 30%	550
máslo	170
DIDI	21
KPS	6
PYRO	3
MAG	1,658
voda	355

## PŘÍLOHA P III: SUROVINOVÁ SKLADBA PRO 5. ETAPU

A- Kontrolní vzorky

složka	m [g]
eidamská cihla 30%	550
máslo	170
DIDI	21
KPS	6
PYRO	3
voda	355

B- Vzorky s 0,1 % w/w ι-karagenanu

složka	m [g]
eidamská cihla 30%	550
máslo	170
DIDI	21
KPS	6
PYRO	3
ι-karagenan	0,6
voda	355

C- Vzorky s 0,2 % w/w ι-karagenanu

složka	m [g]
eidamská cihla 30%	550
máslo	170
DIDI	21
KPS	6
PYRO	3
ι-karagenan	1,2
voda	355



## PŘÍLOHA PIV- STUPNICE PRO 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. **Nepřijatelný** – barva na povrchu i v těstě nehomogenní, silné oxidativní změny na povrchu, výskyt plísňe, 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. **Naprostο nevhovující lesk** – naprostο 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 oddělujícím se tukem, zduřelá s výskytem provzdušnění, silně krupičkovitá, roztékavá.

### ***Tuhost***

1. **Tavený sýr velmi tuhý**
2. **Tavený sýr tuhý**
3. **Tavený sýr mírně tužší**
4. **Tuhost taveného sýra optimální**
5. **Tavený sýr mírně měkčí než jeho optimum**
6. **Tavený sýr měkký**
7. **Tavený sýr velmi měkký**

### ***Roztíratelnost taveného sýra***

1. **Tavený sýr není roztíratelný**
2. **Tavený sýr je obtížně roztíratelný**
3. **Tavený sýr je hůře roztíratelný**
4. **Roztíratelnost je typická, optimální**
5. **Tavený sýr je velmi roztíratelný až mírně řídký**
6. **Tavený sýr je roztékavý**
7. **Tavený sýr má tekutý charakter**

### ***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***

zohledňují se všechny ukazatele, prioritní postavení mají **chuť a vůně**, dalšími relevantními ukazateli jsou **vzhled a barva a konzistence**, ostatní deskriptory mají pouze „poradní sílu“

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 PV- PROTOKOL PRO SENZORICKÉ HODNOCENÍ TAVENÝCH SÝRŮ

Jméno:

Datum a hodina:

Podpis:

## Úkol 1 - Senzorické hodnocení pomocí stupnic (zapište zvolený stupeň)

Tavený sýr	Znak						
	Vzhled a barva	Lesk	Konzistence	Tuhost	Roztíratelnost	Chut' a vůně	Celkové hodnocení
A							
B							
C							
D							
E							
H							

## Úkol 2 - Pořadové testy intenzity znaků

Seřadte následující vzorky podle intenzity znaku (1 – vzorek nejméně tuhý, 6 – nejtužší 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

Seřadte 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	

## PŘÍLOHA PVI- PRŮMĚRNÉ HODNOTY CELKOVÉHO POČTU MIKROORGANIZMŮ BĚHEM SKLADOVÁNÍ

A-Průměrné hodnoty celkového počtu mikroorganismů vyjádřené jako log CFU.g<sup>-1</sup> pro první etapu

MO	tučnost [%]	délka skladování [den]							
		2	7	14	29	43	64	92	140
<i>B. subtilis</i>	30	2,24±0,05	2,97±0,49	3,08±0,26	2,42±0,53	2,20±0,07	2,22±0,08	2,34±0,07	2,84±0,06
	40	2,24±0,07	2,88±0,25	2,40±0,12	2,49±0,21	2,24±0,05	2,20±0,05	2,59±0,06	2,43±0,11
	50	2,32±0,08	2,32±0,21	3,88±0,06	3,96±0,10	2,30±0,06	2,31±0,05	2,33±0,11	2,95±0,08
<i>B. cereus</i>	30	2,47±0,24	3,03±0,65	3,44±0,08	3,78±0,11	2,00±0,06	2,04±0,08	2,43±0,05	2,44±0,13
	40	2,42±0,42	2,45±0,40	2,16±0,12	2,20±0,15	1,80±0,28	2,04±0,03	2,34±0,14	2,76±0,04
	50	2,92±0,13	2,80±0,30	2,99±0,09	2,97±0,28	2,16±0,27	2,29±0,07	2,19±0,04	3,01±0,04

B- Průměrné hodnoty celkového počtu mikroorganismů vyjádřené jako log CFU.g<sup>-1</sup> pro druhou etapu

MO	obsah MAG C <sub>11:0</sub> [% w/w]	délka skladování [den]							
		2	7	14	29	43	64	92	140
<i>B. subtilis</i>	0	3,26±0,12	4,61±0,04	5,90±0,07	6,27±0,03	6,23±0,04	5,15±0,05	3,51±0,074	3,51±0,01
	0,01	3,23±0,13	4,52±0,16	5,80±0,82	5,95±0,32	6,16±0,03	5,06±0,02	3,49±0,03	3,47±0,08
	0,05	3,20±0,07	4,01±0,54	3,77±0,79	4,19±0,46	4,29±0,11	4,24±0,07	3,33±0,03	3,21±0,21
	0,15	3,12±0,09	3,07±0,04	3,13±0,05	3,16±0,12	3,20±0,11	2,88±0,04	3,42±0,03	3,42±0,03
<i>B. cereus</i>	0	3,99±0,21	5,12±0,11	5,69±0,05	6,32±0,09	6,27±0,03	5,13±0,08	2,65±0,05	2,94±0,06
	0,01	4,03±1,09	5,29±0,42	5,81±0,22	6,53±0,30	5,20±0,08	4,68±0,03	2,48±0,11	2,58±0,18
	0,05	3,00±0,10	3,61±0,29	4,29±0,36	4,80±0,55	4,47±0,06	4,11±0,11	2,49±0,15	2,87±0,09
	0,15	3,18±0,39	3,29±0,49	2,90±0,10	2,62±0,23	3,33±0,01	2,99±0,02	2,37±0,20	2,85±0,11

C- Průměrné hodnoty celkového počtu mikroorganismů vyjádřené jako log CFU.g<sup>-1</sup> pro třetí etapu

MO	obsah MAG C <sub>11:1</sub> [% w/w]	délka skladování [den]							
		2	7	14	29	43	64	92	140
<i>B. subtilis</i>	0	3,34±0,02	3,49±0,01	3,30±0,04	3,32±0,01	3,23±0,02	3,29±0,01	4,06±0,01	3,82±0,01
	0,01	3,33±0,12	3,52±0,03	3,36±0,12	3,36±0,04	3,24±0,03	3,17±0,02	4,01±0,02	3,76±0,09
	0,05	3,25±0,22	3,31±0,05	3,38±0,12	3,28±0,04	3,19±0,06	3,17±0,03	3,79±0,01	3,49±0,05
	0,15	3,39±0,15	3,25±0,05	3,41±0,16	3,24±0,04	3,23±0,02	3,17±0,02	3,72±0,05	3,42±0,04
<i>B. cereus</i>	0	2,86±0,04	3,46±0,01	2,89±0,04	2,39±0,01	1,75±0,15	2,14±0,01	3,03±0,05	3,03±0,01
	0,01	2,84±0,19	2,98±0,08	2,41±0,09	2,34±0,07	2,04±0,15	2,06±0,05	2,95±0,09	2,86±0,07
	0,05	3,05±0,05	2,81±0,08	2,56±0,12	2,48±0,10	1,98±0,20	2,00±0,13	3,00±0,02	3,00±0,17
	0,15	3,02±0,10	3,19±0,03	2,70±0,07	2,35±0,03	1,60±0,22	1,97±0,04	2,81±0,04	2,85±0,02

D- Průměrné hodnoty celkového počtu mikroorganismů vyjádřené jako log CFU.g<sup>-1</sup> pro čtvrtou etapu

MO	obsah MAG ACA [% w/w]	délka skladování [den]							
		2	7	14	29	42	57	78	140
<i>B. subtilis</i>	0	2,30±0,08	2,35±0,07	1,96±0,04	2,27±0,05	2,35±0,03	2,48±0,01	3,01±0,02	2,14±0,11
	0,01	2,57±0,14	2,23±0,07	2,14±0,05	2,22±0,07	2,19±0,07	2,13±0,04	3,09±0,08	1,99±0,08
	0,05	2,36±0,07	2,19±0,08	1,97±0,23	2,07±0,21	2,28±0,07	2,17±0,08	3,07±0,06	1,86±0,32
	0,15	2,37±0,12	2,29±0,13	2,07±0,19	2,21±0,06	1,94±0,08	2,25±0,05	3,02±0,07	2,05±0,05
<i>B. cereus</i>	0	2,25±0,03	2,32±0,02	2,23±0,32	2,31±0,01	2,41±0,01	2,44±0,01	3,05±0,03	2,96±0,05
	0,01	2,15±0,11	2,17±0,09	2,04±0,18	2,26±0,10	2,21±0,05	2,47±0,04	3,00±0,06	2,82±0,08
	0,05	2,33±0,12	2,09±0,03	2,14±0,10	2,15±0,06	2,25±0,05	3,01±0,12	2,96±0,15	2,78±0,14
	0,15	2,35±0,04	2,27±0,08	2,06±0,16	2,24±0,04	2,36±0,10	2,72±0,08	3,01±0,07	2,87±0,14

E- Průměrné hodnoty celkového počtu mikroorganismů vyjádřené jako log CFU.g<sup>-1</sup> pro pátou etapu

MO	obsah ι-karagenanu [% w/w]	délka skladování [den]							
		2	7	14	29	43	64	85	126
<i>B. subtilis</i>	0	3,36±0,03	3,11±0,05	3,13±0,01	3,71±0,00	2,89±0,06	5,20±0,03	4,73±0,04	3,24±0,02
	0,1	3,26±0,36	3,03±0,07	2,99±0,03	3,64±0,11	2,82±0,02	4,93±0,11	4,00±0,09	3,15±0,03
	0,2	3,13±0,15	3,13±0,06	2,88±0,03	2,46±0,06	2,90±0,06	5,22±0,03	3,59±0,16	2,10±0,12
<i>B. cereus</i>	0	5,58±0,02	3,84±0,02	3,04±0,00	2,84±0,03	3,08±0,02	5,15±0,02	3,80±0,15	2,60±0,04
	0,1	5,32±0,03	3,83±0,02	2,78±0,04	3,19±0,05	3,08±0,03	5,05±0,01	4,32±0,09	2,86±0,12
	0,2	5,26±0,02	3,11±0,05	2,57±0,14	2,67±0,09	3,10±0,03	5,14±0,02	3,64±0,07	2,10±0,11



## PVII- PRŮMĚRNÉ HODNOTY PH VZORKŮ TAVENÝCH SÝRŮ

A- Průměrné hodnoty pH vzorků tavených sýrů pro první etapu

MO	tučnost [%]	délka skladování [den]							
		2	7	14	29	43	64	92	140
<i>B. subtilis</i>	30	5,80	5,89	5,89	5,89	5,82	5,87	5,86	5,86
	40	5,97	6,07	6,08	6,08	6,02	6,03	6,04	6,03
	50	6,09	6,18	6,18	6,18	6,12	6,13	6,13	6,14
<i>B. cereus</i>	30	5,77	5,88	5,88	5,89	5,81	5,84	5,84	5,84
	40	5,97	6,06	6,05	6,06	6,01	6,02	6,03	6,02
	50	6,09	6,18	6,19	6,18	6,11	6,13	6,14	6,13

B- Průměrné hodnoty pH vzorků tavených sýrů pro druhou etapu

MO	obsah MAG C <sub>11:0</sub> [% w/w]	délka skladování [den]							
		2	7	14	29	43	64	92	140
<i>B. subtilis</i>	0	6,26	6,23	6,22	6,24	6,20	6,24	6,24	6,24
	0,01	6,23	6,20	6,23	6,23	6,23	6,25	6,25	6,24
	0,05	6,26	6,22	6,24	6,22	6,26	6,26	6,26	6,25
	0,15	6,26	6,21	6,22	6,20	6,23	6,24	6,24	6,23
<i>B. cereus</i>	0	6,26	6,23	6,22	6,24	6,19	6,22	6,22	6,22
	0,01	6,22	6,18	6,20	6,16	6,20	6,23	6,22	6,23
	0,05	6,25	6,21	6,21	6,20	6,22	6,24	6,24	6,24
	0,15	6,29	6,25	6,23	6,22	6,25	6,27	6,27	6,25

C- Průměrné hodnoty pH vzorků tavených sýrů pro třetí etapu

MO	obsah MAG C <sub>11:1</sub> [% w/w]	délka skladování [den]							
		2	7	14	29	43	64	92	140
<i>B. subtilis</i>	0	6,21	6,19	6,23	6,21	6,23	6,23	6,21	6,23
	0,01	6,16	6,21	6,25	6,21	6,25	6,25	6,25	6,24
	0,05	6,16	6,21	6,24	6,20	6,24	6,24	6,22	6,23
	0,15	6,14	6,19	6,23	6,21	6,24	6,23	6,23	6,23
<i>B. cereus</i>	0	6,21	6,20	6,23	6,21	6,23	6,23	6,24	6,23
	0,01	6,17	6,20	6,24	6,21	6,23	6,24	6,24	6,24
	0,05	6,15	6,20	6,23	6,21	6,24	6,23	6,23	6,23
	0,15	6,16	6,18	6,23	6,21	6,24	6,23	6,24	6,23

D- Průměrné hodnoty pH vzorků tavených sýrů pro čtvrtou etapu

MO	obsah MAG ACA [% w/w]	délka skladování [den]							
		2	7	14	29	43	64	92	140
<i>B. subtilis</i>	0	6,13	6,14	6,14	6,14	6,09	6,11	6,09	6,09
	0,01	6,13	6,14	6,13	6,08	6,08	6,07	6,09	6,10
	0,05	6,13	6,13	6,15	6,10	6,10	6,10	6,12	6,08
	0,15	6,13	6,12	6,13	6,08	6,08	6,08	6,12	6,10
<i>B. cereus</i>	0	6,11	6,13	6,14	6,09	6,08	6,08	6,07	6,09
	0,01	6,12	6,13	6,13	6,10	6,10	6,10	6,10	6,10
	0,05	6,11	6,13	6,13	6,05	6,05	6,08	6,07	6,05
	0,15	6,13	6,14	6,14	6,10	6,10	6,11	6,10	6,08

E- Průměrné hodnoty pH vzorků tavených sýrů pro pátou etapu

MO	obsah ι-karagenanu [% w/w]	délka skladování [den]							
		2	7	14	29	43	64	85	126
<i>B. subtilis</i>	0	6,19	6,18	6,21	6,25	6,29	6,24	6,28	6,23
	0,1	6,18	6,20	6,20	6,23	6,23	6,23	6,26	6,26
	0,2	6,19	6,17	6,16	6,21	6,25	6,22	6,23	6,22
<i>B. cereus</i>	0	6,17	6,19	6,18	6,21	6,20	6,23	6,21	6,22
	0,1	6,21	6,18	6,20	6,20	6,21	6,24	6,23	6,24
	0,2	6,17	6,18	6,21	6,21	6,24	6,22	6,24	6,22