

Příprava tavených sýrů pro skenovací elektronovou mikroskopii

Bc. Lada Řiháčková

Diplomová práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lada Řiháčková**
Osobní číslo: **T13453**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Příprava tavených sýrů pro skenovací elektronovou mikroskopii**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Popsat princip skenovací elektronové mikroskopie.
2. Zpracovat literární rešerši metod přípravy vzorků pro skenovací elektronovou mikroskopii se zaměřením na tavené sýry použité v praktické části práce.
3. Charakterizovat parametry mající vliv na přípravu vzorků.

II. Praktická část

1. Provést přípravu vybraných vzorků tavených sýrů pro skenovací elektronovou mikroskopii různými metodami.
2. Prohlédnout připravené vzorky ve skenovacím elektronovém mikroskopu při různém nastavení parametrů pozorování.
3. Popsat odlišnosti v jednotlivých metodách přípravy vzorků a charakterizovat jejich silné a slabé stránky.
4. Diskuze výsledků a formulace závěrů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] MORRIS, V.J., GROVES, K. Food Microstructures: Microscopy, Measurement and Modelling (Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition). 2013. 443 pp. ISBN-13: 978-0857095251.
- [2] KALÁB, M. Practical aspects of electron microscopy in dairy research. Food Structure. Vol. 12. 1993. pp. 95-114.
- [3] SAVELLO, P.A., ERNSTROM C.A., KALÁB, M. Microstructure and Meltability of Model Process Cheese Made with Rennet and Acid Casein. Journal of Dairy Science. 1989. Vol. 72. p. 1-11.
- [4] NEBESÁŘOVÁ, J., VANCOVÁ, M., NEBESÁŘ, M. 2001. Elektronová mikroskopie pro biology.
- [5] TAMINE, A. Structure of Dairy Products. 2007. 288 pp. ISBN-13: 978-1-4051-2975-6.

Vedoucí diplomové práce: **MVDr. Michaela Černíková, Ph.D.**
Ústav technologie potravin

Datum zadání diplomové práce: **2. února 2015**

Termín odevzdání diplomové práce: **22. dubna 2015**

Ve Zlíně dne 2. února 2015


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ŘIHAČKOVÁ LADA

Obor: TECHNOLOGIE POTRAVIN

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 obhajoby¹⁾;
- 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. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ 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 § 60³⁾ 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 22.4.2015

Řihačková Lada

¹⁾ 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 nahlázení 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.

²⁾ 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).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

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

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

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

ABSTRAKT

Předkládaná diplomová práce se zabývá chemickou a fyzikální přípravou vzorků tavených sýrů pro skenovací elektronovou mikroskopii. Cílem práce bylo optimalizovat přípravu vzorků chemickou a fyzikální cestou, provést skenovací elektronovou mikroskopii připravených vzorků, popsat odlišnosti metod, vliv lišících se parametrů přípravy na strukturu vzorků modelových tavených sýrů a charakterizovat silné a slabé stránky jednotlivých příprav. Teoretická část popisuje skenovací elektronový mikroskop, nejen jeho historii, ale hlavně konstrukci mikroskopu a princip funkce. Dále pojednává o chemických a fyzikálních metodách přípravy vzorků pro skenovací elektronovou mikroskopii, vyhodnocuje jejich klady a zápory a popisuje možný vznik artefaktů vznikajících během přípravy a prohlížení vzorků. Jsou zde charakterizovány tavené sýry, jejich složení, výroba a struktura. V praktické části jsou popsány a hodnoceny získané snímky vzorků tavených sýrů, u nichž se měnily parametry fixace, přípravy a pozorování. V závěru jsou doporučeny vhodné způsoby a parametry přípravy chemické i fyzikální fixace, které co nejméně ovlivňovaly přirozenou strukturu modelových vzorků tavených sýrů. Závěrem lze říci, že fyzikální fixace v porovnání s chemickou fixací způsobuje méně artefaktů a poskytuje přesnější obraz mikrostruktury taveného sýra. Dále bylo prokázáno, že mikrostruktura taveného sýra vzhledem k počtu a velikosti tukových kuliček odpovídá výsledkům získaným dynamickou oscilační reometrií.

Klíčová slova: skenovací elektronová mikroskopie, příprava vzorků potravin pro skenovací elektronovou mikroskopii, chemická fixace, fyzikální fixace, tavený sýr

ABSTRACT

This diploma thesis deals with chemical and physical preparation of samples of processed cheese for scanning electron microscopy. The aim of this study was to optimize chemical and physical preparation of samples with varying parameters of preparation, viewing prepared samples in scanning electron microscope, describe the differences between methods and influence of differing parameters of preparation on structure of model processed cheese, characterized advantages and disadvantages of preparations. In the theoretical part of this thesis are described scanning electron microscope, history of microscopy, design and operating principle of microscope. Additionally, chemical and physical preparation of samples for scanning electron microscopy, their advantages and disadvantages and artefacts, which can occur during preparation and viewing of samples, are there described. Processed cheese, composition, production and structure are there characterized. Images of samples of processed cheese are described and evaluated in the practical part of this work. Conditions and parameters of fixation, preparation and viewing were changing. In conclusion are recommended suitable parameters and methods of preparation of chemical and physical fixation to preserve the natural structure of the sample. In conclusion, the physical fixation causes less artefacts than chemical fixation, and provides more accurate picture of microstructure of processed cheese. It was also prove that the microstructure of the processed cheese due to the number and size of fat globules is corresponding with results of dynamic oscillatory rheometry.

Keywords: Scanning electron microscopy, sample preparation of food for scanning electron microscopy, chemical fixation, physical fixation, processed cheese

Touto cestou bych ráda poděkovala paní MVDr. Michaele Černíkové, PhD., za její odborné a cenné rady, trpělivost a čas, který mi věnovala při vedení této diplomové práce. Také děkuji pracovníkům Laboratoře elektronové mikroskopie Parazitologického Ústavu v Českých Budějovicích za umožnění a pomoc při práci na praktické části.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE	12
1.1 SKENOVACÍ ELEKTRONOVÝ MIKROSKOP	12
1.2 HISTORIE.....	13
1.2.1 Vznik elektronového mikroskopu	13
1.2.2 Historie přípravy vzorků pro elektronovou mikroskopii	14
1.3 KONSTRUKCE A PRINCIP FUNKCE SKENOVACÍHO ELEKTRONOVÉHO MIKROSKOPU	14
1.3.1 Elektrony a jejich využití v elektronové mikroskopii	16
1.3.2 Zdroje elektronů	16
1.3.3 Čočky	18
1.3.4 Využívané signály	18
1.3.4.1 Sekundární elektrony	18
1.3.4.2 Odražené elektrony	19
1.3.4.3 Absorbované elektrony	19
1.3.4.4 Rentgenové záření.....	19
1.3.4.5 Katodoluminiscence.....	19
1.3.4.6 Augerovy elektrony	19
1.3.5 Tvorba obrazu, detektory	20
1.3.6 Zvětšení	20
1.3.7 Rozlišení.....	21
1.3.8 Hloubka ostrosti	21
1.4 KRYO-SKENOVACÍ ELEKTRONOVÝ MIKROSKOP.....	22
2 METODY PŘÍPRAVY VZORKŮ PRO SKENOVACÍ ELEKTRONOVOU MIKROSKOPII	23
2.1 PŘÍPRAVA VZORKŮ CHEMICKOU CESTOU.....	23
2.1.1 Čištění povrchu vzorku	23
2.1.2 Fixace a postfixace	24
2.1.2.1 Glutaraldehyd.....	24
2.1.2.2 Formaldehyd	25
2.1.2.3 Oxid osmičelý	25
2.1.3 Promývání pomocí pufrů.....	26
2.1.3.1 Kakodylanový pufr	26
2.1.3.2 Fosforečnanový pufr	27
2.1.4 Odvodnění	27
2.1.5 Sušení	27
2.1.5.1 Sušení na vzduchu	28
2.1.5.2 Chemické sušení	28
2.1.5.3 Metoda sušení ke kritickému bodu, CPD	28
2.1.6 Lepení vzorku.....	29
2.1.7 Pokovování.....	29
2.2 PŘÍPRAVA VZORKŮ FYZIKÁLNÍMI METODAMI	29
2.2.1 Fixace mikrovlnným zářením	29
2.2.2 Mrazové metody, kryo-fixace	30

2.3	KLADY A ZÁPORY CHEMICKÉ A FYZIKÁLNÍ FIXACE	31
2.4	VZNIK ARTEFAKTŮ BĚHEM PŘÍPRAVY A POZOROVÁNÍ VZORKŮ	31
3	TAVENÝ SÝR	34
3.1	TECHNOLOGIE VÝROBY TAVENÝCH SÝRŮ	34
3.1.1	Složení a přísady	34
3.1.2	Mělnění surovin	35
3.1.3	Tavení.....	36
3.1.4	Balení	36
3.1.5	Chlazení a skladování	36
3.2	STRUKTURA TAVENÝCH SÝRŮ	37
II	PRAKTICKÁ ČÁST	41
4	CÍL PRÁCE	42
5	METODIKA PRÁCE.....	43
5.1	EXPERIMENT	43
5.2	CHEMICKÁ ANALÝZA TAVENÝCH SÝRŮ	46
5.3	REOLOGICKÉ MĚŘENÍ	47
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	48
6.1	VÝSLEDKY PRVNÍ ČÁSTI EXPERIMENTU	48
6.2	VÝSLEDKY DRUHÉ ČÁSTI EXPERIMENTU	49
6.3	VÝSLEDKY TŘETÍ ČÁSTI EXPERIMENTU	51
6.3.1	Chemická analýza	51
6.3.2	Chemická fixace.....	51
6.3.3	Fyzikální fixace.....	61
6.4	VISKOELASTICKÉ VLASTNOSTI MODELOVÝCH TAVENÝCH SÝRŮ	68
	ZÁVĚR	75
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	77
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	84
	SEZNAM OBRÁZKŮ	86
	SEZNAM TABULEK.....	89

ÚVOD

Mikroskopie je základní pozorovací metoda sloužící k pochopení vlastností potravin a procesů, ke kterým dochází uvnitř potravin během technologických procesů výroby, dalšího zpracování a skladování. Zobrazování vzorků potravin mikroskopem nám umožňuje poznat a vidět detaily struktury, které doplňují jejich celkovou charakteristiku.

Příprava vzorků potravin pro skenovací elektronovou mikroskopii není jednoduchou záležitostí. Hlavním cílem přípravy je získat vzorek s co nejméně porušenou přirozenou strukturou, jenž po zobrazení v mikroskopu dopomůže pochopit a charakterizovat vlastnosti dané potraviny. Je tedy velmi důležité optimalizovat přípravu vzorku a uvědomovat si, jaký vliv mohou mít parametry a podmínky přípravy na výslednou strukturu. Je také nutné znát technologii výroby a chemické složení dané potraviny.

V dnešní době jsou v odborných publikacích mikrofotografie potravin velmi žádány. Poskytují obraz o struktuře zkoumané matrice, což může podpořit výsledky jiných analytických metod. Proto bylo hlavním cílem této práce připravit vzorky tavených sýrů lišících se obsahem sušiny a tuku v sušině pro prohlížení ve skenovacím elektronovém mikroskopu a to chemickou i fyzikální cestou, optimalizovat podmínky přípravy, prohlédnout připravené vzorky ve skenovacím elektronovém mikroskopu s vhodnými parametry prohlížení a popsat a zhodnotit strukturu tavených sýrů ze získaných snímků.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 SKENOVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE

Elektronové mikroskopy mají mnohem vyšší rozlišovací schopnost v porovnání s optickými. Důvodem je fakt, že ke zvětšení obrazu vzorku jsou používány elektrony a ne fotony. Výsledné „fotografie“ jsou pouze černobílé. Existují dva hlavní typy elektronových mikroskopů, a to skenovací (rastrovací) elektronový mikroskop (SEM) a transmisní elektronový mikroskop (TEM). Lze konstatovat, že oba typy mikroskopů byly vyvinuty ve stejnou dobu, ale mají v podstatě rozdílné využití a ačkoli využívají k zobrazení struktury vzorků elektrony, výsledkem jsou velmi rozdílné typy informací. V transmisní elektronové mikroskopii prochází proud elektronů přes velmi tenký řez pozorovaného vzorku a výsledkem je dvojrozměrný (2D) obraz. Jas konkrétní oblasti vzorku je úměrný počtu elektronů, které projdou přes vzorek. SEM poskytuje zdánlivě trojrozměrné (3D) zobrazení vzorku. SEM využívá proud elektronů, které skenují po povrchu vzorku a vyvolávají tvorbu sekundárních elektronů, které jsou následně detekovány. Obraz je tvořen v průběhu času, jak je vzorek skenován. Snímek získaný v SEM je vykládán snadněji, poněvadž poskytuje obraz, který lze vidět pouhým okem, jen je zvětšený. TEM na rozdíl od SEM prozkoumává vnitřní strukturu látek a zpřístupňuje tak detaily, které jsou pro lidské oko neznámé. Proto je nezbytné znát nejen princip funkce mikroskopu, ale především umět interpretovat obrazy, které se pomocí mikroskopu získají. Třetím, méně využívaným typem elektronového mikroskopu, je skenovací transmisní elektronový mikroskop (STEM), který má vlastnosti obou výše zmíněných mikroskopů. STEM využívá skenování paprskem elektronů k proniknutí do tenkého vzorku a tak stanovuje a určuje přítomnost a distribuci prvků ve vzorku [2; 7; 8; 9].

1.1 Skenovací elektronový mikroskop

Skenovací elektronový mikroskop umožňuje pozorovat a charakterizovat heterogenní organické i anorganické materiály v rozmezí rozměrů nm - μm . Ačkoli je SEM velmi všestranná, hlavním využitím skenovací elektronové mikroskopie je získat topografické obrazy obvykle ve zvětšení 10 - 10 000 krát [4].

Skenovací elektronový mikroskop se používá k pozorování povrchů různých objektů. Výsledný obraz je tvořen pomocí sekundárních signálů, a to hlavně odražených a sekundárních elektronů, kvůli kterým je zobrazení pomocí SEM považováno za nepřímou metodu. Předností SEM je velká hloubka ostrosti, díky níž lze v dvojrozměrných obrazech nalézt jistý aspekt trojrozměrnosti. V literatuře se kromě názvu skenovací používá i rastrovací

nebo řádkovací elektronový mikroskop. V SEM je zkoumaná plocha vzorku ozářena zaměřeným elektronovým paprskem, který může po povrchu vzorku probíhat v rastru nebo může být statický pro získání obrazu v jednom bodě. Signály produkované po interakci vzorku s elektrony zahrnují sekundární elektrony, odražené elektrony, rentgenové záření a další elektrony s různou energií. Tyto signály jsou získávány v určitých objemech a mohou být použity ke zkoumání mnohých charakteristik daného vzorku (např. krystalografie, topografie, složení). Nejvhodnějším typem vzorku pro SEM je kov a to především proto, že tyto materiály jsou méně náchylné k nabíjení a poškození při ozáření elektronovým paprskem ve vakuu [3; 4; 7].

1.2 Historie

Skenovací elektronový mikroskop je nepochybně jeden z nejdůležitějších vynálezů elektronové technologie 20. století. Od té doby, co se objevily na začátku 60. let první komerční přístroje, se konstrukce a design elektronových mikroskopů neustále vyvíjí a zlepšuje [10].

1.2.1 Vznik elektronového mikroskopu

Základním kamenem k sestrojení elektronového mikroskopu bylo objevení elektronu J. J. Thomsonem v roce 1897. Důležitým krokem k využití elektronů k pozorování mikrosvěta byl poznatek, který v roce 1925 publikoval Luis de Broglie, že rychle letící částice mají nejen korpuskulární, ale i vlnový charakter jako např. viditelné světlo. Důležitou roli na cestě k elektronovému mikroskopu sehrály práce H. Buscha, zveřejněné v roce 1926, které prokázaly, že dráha elektronů může být odkloněna magnetickými čočkami, stejně jako světlo čočkami optickými. První transmisní elektronový mikroskop zkonstruoval tým na Vysoké technické univerzitě v Berlíně vedený Knollem a Ruskou začátkem 30. let 20. století. V roce 1939 zahájila firma Siemens a Halske komerční výrobu transmisních elektronových mikroskopů. Cesta ke skenovacímu elektronovému mikroskopu byla složitější. Nejstarší známá práce, která popisuje koncepci skenovacího elektronového mikroskopu je od Knolla z roku 1935. Následně v roce 1938 popsal německý fyzik Ardenne teoreticky i prakticky skenovací transmisní elektronový mikroskop (STEM). První skenovací elektronový mikroskop byl popsán v roce 1942 kolektivem vědců v čele s americkým vědcem Zworykinem. Zworykin vynalezl fotonásobič a použil jej k detekci sekundárních elektronů. Konstrukcí SEMu se v Anglii ve stejné době zabývali C. W. Oatley a jeho student

D. McMullan. Následovalo mnoho objevů, které vedly ke zdokonalování skenovacího elektronového mikroskopu do dnešní podoby. V roce 1963 byl postaven systém známý jako SEM V se třemi magnetickými čočkami. Tento přístroj se stal prototypem prvního komerčního přístroje (1965). V následujících letech bylo prodáno více než 50 000 SEM zařízení do desítek továren po celém světě. Německý fyzik Ernst Ruska získal v roce 1986 Nobelovu cenu za fyziku za zásadní práci v elektronové optice a za návrh prvního elektronového mikroskopu [3; 4; 8].

1.2.2 Historie přípravy vzorků pro elektronovou mikroskopii

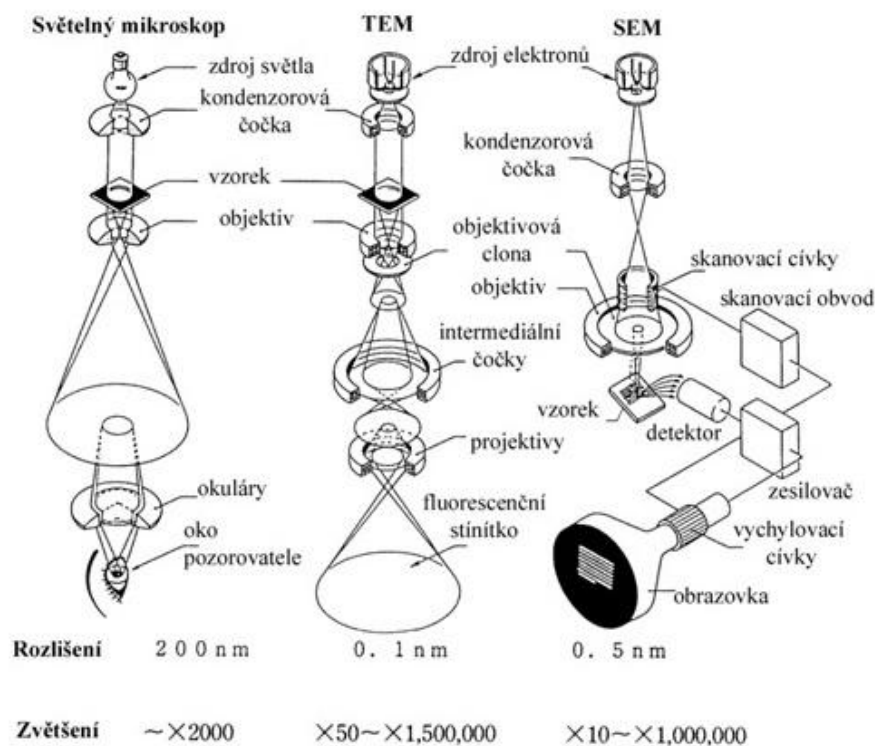
V roce 1934 byl publikován L. Martonem z Bruselské univerzity první snímek biologické tkáně. Obraz byl ale kvalitně horší, než obrazy získané optickým mikroskopem. Koncem 40. let 20. století A. Claude popularizoval fixaci osmiem a primitivní ultramikrotom. V roce 1952 využil Palade pufrovací systém k zafixování tkáně v oxidu osmičelém. Na začátku 50. let došlo k velkému pokroku v pozorování biologických materiálů. Jedny z prvních mikrofotografií biologických materiálů ze skenovacího elektronového mikroskopu, které vznikly v 50. letech, byly vzorky hmyzu s tvrdou schránkou, dřevěná vlákna, která jsou dostatečně pevná a vydrží proces sušení na vzduchu bez poškození. Později v roce 1960 ukázal Thornley SEM obrázky biologického materiálu sušeného mrazem. Pokroky v oboru biologie do jisté míry závisely na nových poznatcích přípravy vzorků. Mnohé biologické vzorky jsou vlhké, citlivé k záření, termolabilní a špatně vodivé. Velká pozornost byla směřována k dosažení zpevnění jemných organických struktur, odstranění nebo imobilizování buněčných tekutin a pokovování vzorků tenkou vrstvou vodivého kovu. V rozmezí let 1957 - 63 bylo rozvíjeno lámání vzorků v mrazu a v roce 1958 Watson představil pokovování vodivými kovy (olovem a uranem). V roce 1963 Sabatini a jeho spolupracovníci zavedli primární fixaci glutaraldehydem [4; 8].

1.3 Konstrukce a princip funkce skenovacího elektronového mikroskopu

Obvykle se SEM skládá ze zdroje elektronů, který generuje primární svazek elektronů, kolony s elektromagnetickými čočkami, které slouží k zaostřování a zvětšování svazku primárních elektronů, dále z cívek pro rastrování elektronů na povrchu vzorku, komory se stolcem pro uchycení vzorku, vakuové pumpy k udržování systému ve vakuu (obvykle

v řádech 10^{-5} - 10^{-7} Pa) a jednoho nebo více detektorů, které sbírají signály tvořené ozářením vzorku elektrony, nakonec je zvětšený obraz zobrazen na monitoru [7].

V porovnání s transmisním elektronovým mikroskopem (TEM) má skenovací poloviční délku tubusu, jelikož se zde detekují signály, které uvolnil primární svazek elektronů nad povrch preparátu a není třeba soustavy čoček, které u TEM tvoří zobrazovací systém ve spodní části tubusu. Zdrojem elektronů (ve špičce tubusu) bývá u SEM obvykle přímo žhavené wolframové vlákno. Primární elektrony jsou urychlovány potenciálem mezi katódou a anodou, která má ve svém středu kruhový otvor, kterým elektrony prolétají směrem k soustavě elektromagnetických čoček. Soustava elektromagnetických čoček má za úkol co nejvíce zmenšit průměr svazku elektronů, které dopadají na povrch pozorovaného preparátu. V dolní části tubusu se nachází komora preparátů, ve které je umístěn goniometrický stolek, na který se upevňují vzorky umístěné v držáku preparátů. Stolek umožňuje s preparátem otáčet a pohybovat. V blízkosti stolku jsou umístěny detektory jednotlivých signálů (sekundárních a odražených elektronů, rentgenového záření a dalších, dle vybavení mikroskopu) [3]. Porovnání konstrukce jednotlivých typů mikroskopů je zobrazeno na Obr. č. 1.



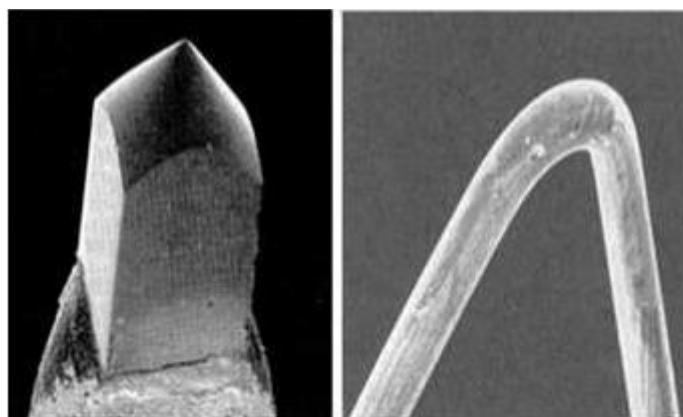
Obr. č. 1 Porovnání konstrukce jednotlivých typů mikroskopů [3].

1.3.1 Elektrony a jejich využití v elektronové mikroskopii

Světlo je obvykle chápáno jako elektromagnetické vlnění o určité vlnové délce a elektrony jako subatomární částice. Oba typy popisu lze samozřejmě aplikovat na světlo i elektrony, tudíž může být světlo popisováno jako fotony nebo jako záření o vlnové délce 400 až 700 nm, zatímco elektrony mohou být také považovány za záření (zejména v mikroskopii) s vlnovou délkou v rozmezí mezi 0,001 až 0,01 nm. Tímto se naráží na první zřetelný rozdíl mezi fotony a elektrony a to, že jejich vlnová délka se liší v řádech několika tisíců. Dalším hlavním rozdílem je to, že elektrony jsou mnohem více rozptýleny v plynech než světlo. Kvůli tomuto faktu musí být při použití elektronů v mikroskopu všechny optické dráhy evakuovány na tlak cca 10^{-10} Pa. Elektrony při atmosférickém tlaku pronikají sotva několika milimetry vzduchu. Důležitým rozdílem mezi elektrony a světlem je také to, že elektrony nesou náboj [9].

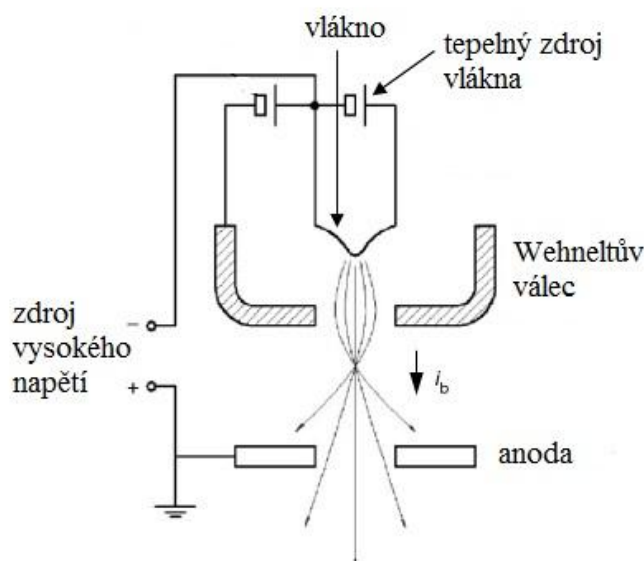
1.3.2 Zdroje elektronů

Jako zdroje elektronů jsou používány kovy, u nichž je výstupní práce elektronů co možná nejnižší a hustota proudu co nejvyšší. Uvolnění elektronu z kovu do prostředí nastane pouze v případě, získá-li elektron v kovu dostatečnou energii. Existuje několik způsobů, kterými je možné emise elektronů z kovu dosáhnout, např. termoemisí, fotoemisí nebo působením elektrického pole. Nejrozšířenějším elektronovým zdrojem je termoemisní tryska. Jako emitorelektronů se nejčastěji používá žhavené wolframové vlákno, wolframový monokrystal nebo hexaborid lanthanu (LaB_6) viz Obr. č. 2 [28].



Obr. č. 2 Ukázka LaB_6 krystalu (vlevo) a wolframového vlákna (vpravo) [28].

Termoemisní zdroj elektronů je umístěný ve vrcholu tubusu a má obvykle tři části: wolframové vlákno, které emituje elektrony, Wehneltův válec, jenž kontroluje množství elektronů opouštějících zdroj a anodu, která udává elektronům urychlovací napětí 0,1 až 30 keV. Je zde nutná přítomnost vakua, jelikož elektrony jsou, jak již bylo řečeno výše, schopny se ve vzduchu pohybovat jen po velmi krátkou vzdálenost. Průchodem elektrického proudu vláknem dojde k zahřátí a následné termoemisi. Pravděpodobnost úniku elektronů je zvýšena vytvarováním wolframového vlákna do tvaru písmene „V“. Wolframový hrot bývá žhaven nepřímo, stejně jako katoda LaB_6 , která bývá uložena mezi dvěma uhlíkovými elektrodami. Elektronový zdroj by měl poskytovat soudržný svazek elektronů, elektrony by měly vycházet z bodového zdroje, měly by mít stejnou energii a jejich vlna by měla být ve stejné fázi. Bod na wolframovém vlákně je příliš široký na to, aby vznikl ostrý obraz, proto se využívá elektronových čoček k zúžení elektronového paprsku dopadajícího na vzorek. Většina SEM dokáže produkovat svazek elektronů o průměru menším než 10 nm. Jelikož je u SEM požadován větší emisní proud, dochází k přezhazování katody, což vede ke zkrácení její životnosti. Výběr urychlovacího napětí závisí na vlastnostech preparátu, na požadovaném zvětšení, míře nabíjení se povrchu pozorovaného vzorku. Snížením urychlovacího napětí lze sice omezit nepříznivé efekty nabíjení, ale dojde ke snížení rozlišovací schopnosti [1; 3; 4; 12; 28]. Schéma a složení zdroje elektronů je zobrazen na Obr. č. 3.



Obr. č. 3 Schéma zdroje elektronů [24].

1.3.3 Čočky

Svazek elektronů vycházející ze zdroje má určitou velikost v příčné rovině (kolmé na jeho směr), která se nazývá velikost zdroje. Úkolem soustavy elektromagnetických čoček je zmenšit průměr elektronového svazku, který dopadá na sledovaný vzorek. Soustava čoček je obvykle tvořena jednou nebo dvěma kondenzorovými čočkami umístěnými blíže zdroji a objektivovou čočkou s proměnou zmenšovací výkonností, která je blíže pozorovanému vzorku. Elektromagnetickými čočkami zkoncentrovaný paprsek primárních elektronů je před dopadem na povrch preparátů rozpoříván vychylovacími cívkami tak, že pokryje řádky - rastruje - malou plošku pozorovaného objektu. Vychylovací cívky jsou obvykle umístěny uvnitř objektivové čočky. Synchronně s primárním svazkem elektronů rastruje

i paprsek uvnitř katodové trubice (CRT) tvořící obraz na obrazovkách mikroskopu. Počet řádků je možné měnit od desítek do několika tisíc a zároveň lze měnit i rychlost přeběhu paprsku v jednom řádku. Pod objektivovou čočkou se nachází komora vzorku, která obsahuje držák na pozorovaný vzorek, detektory elektronových signálů a je napojena na vakuovou pumpu [3; 10; 12].

1.3.4 Využívané signály

Paprsek vystupující z poslední čočky do komory preparátu proniká vzorkem do hloubky přibližně 1 μm a vytváří signály, které jsou použity ke vzniku obrazu, přičemž každý signál poskytuje různé informace o vzorku. Jak primární svazek pronikne do povrchu vzorku, rozptýlí elektrony z různých hloubek, některé se uvolní přímo z povrchu vzorku. K detekci při použití SEM jsou k dispozici sekundární, odražené, absorbované elektrony, rentgenové záření a katodoluminiscence [4; 10]. Popis signálů vznikajících v různých hloubkách vzorku je zobrazen na Obr. č. 4.

1.3.4.1 Sekundární elektrony

Sekundární elektrony jsou v SEM nejpoužívanější, jelikož poskytují informace o povrchu vzorku s vysokým rozlišením. Tyto elektrony jsou výsledkem interakce svazku primárních elektronů se vzorkem. Uvolňují se z místa velmi blízkého povrchu vzorku a mají nižší energii, než ostatní elektrony. Jejich energie je menší než 50 eV, energie mnohých z nich se nachází v rozmezí 0,5 až 5,0 eV. Obraz ze sekundárních elektronů může být získán u jakéhokoli tuhého vzorku za předpokladu, že je elektricky vodivý. Pokud není vodivý,

vznikne zakřivený obraz se světlými záblesky, které vzniknou kvůli nabíjení. Kvalitní obrazy nevodivých vzorků mohou být získány nanesením (naprášením) tenké vrstvy např. zlata nebo uhlíku na povrch vzorku, což eliminuje efekty nabíjení. Sekundární elektrony se používají k zobrazení tvaru povrchu [5; 6; 10].

1.3.4.2 Odražené elektrony

Odražené elektrony vznikají v hlubších vrstvách pod povrchem vzorku. Po interakci elektronů se vzorkem si může část elektronů udržet relativně vysokou energii a odrazit se zpět od povrchu vzorku. Jejich energie leží v rozmezí od 50 eV až po velikost energie primárních elektronů. Množství odražených elektronů a směr odrazu závisí na složení pozorovaného objektu, tvaru jeho povrchu, krystalinitě a magnetických vlastnostech vzorku. Zkráceně se tyto elektrony značí BSE (z anglického *backscattered electrons*) a využívají se hlavně ke sledování složení povrchu vzorku [5; 6; 10].

1.3.4.3 Absorbované elektrony

Část elektronů dopadajících na vzorek ztratí svou energii a jsou vzorkem absorbovány. Tak vznikají tzv. absorbované elektrony. Tento signál závisí na průměrném atomovém čísle a nerovnostech povrchu daného vzorku [5; 6; 10].

1.3.4.4 Rentgenové záření

Působením primárních elektronů dochází v elektronové vrstvě atomu k elektronovému přechodu, který je doprovázen emisí rentgenového záření (RTG). RTG záření je charakteristické energií a vlnovou délkou, které souvisí s prvkem, ze kterého pochází a může být použito jako základ pro velmi přesnou analytickou metodu [5; 6; 10].

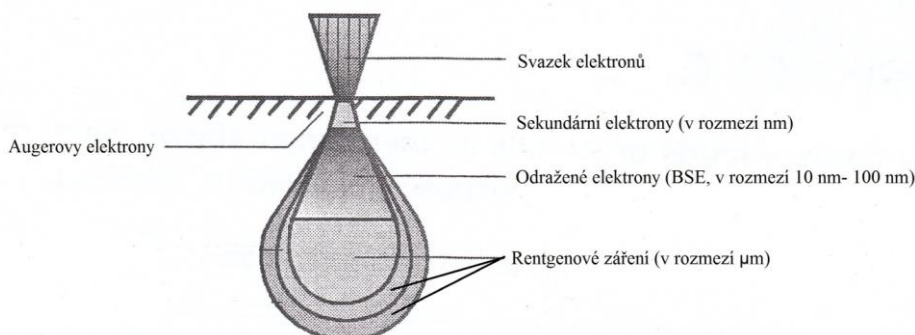
1.3.4.5 Katodoluminiscence

Při ozáření vzorku paprskem elektronů, jsou elektrony ve valenčních vrstvách atomů vzorku excitovány. Při procesu nahrazování vzniklého volného prostoru ve valenční vrstvě elektrony, dojde k uvolnění světla, které se nazývá katodoluminiscence [5; 6; 10].

1.3.4.6 Augerovy elektrony

Z energie, která se uvolní při vrácení atomů vzorku excitovaných dopadem svazku elektronů do původního stavu, se většinou vytvoří rentgenové záření nebo jsou uvolněny fotony.

Část uvolněné energie je ale použita na vyražení elektronů z atomů vzorku. Tento proces se nazývá Augerův jev a elektrony, které se uvolní, se označují Augerovy elektrony [6].



Obr. č. 4 Signály vznikající v různých hloubkách vzorku [6].

1.3.5 Tvorba obrazu, detektory

Mezi signály, které jsou v SEM nejvíce využívány k tvorbě obrazu, patří, jak již bylo uvedeno, sekundární a odražené elektrony. Detektor odražených elektronů bývá umístěn těsně pod poslední čočkou a může být využit křemíkový detektor s PN přechodem (rozhraní příměsového polovodiče typu P a polovodiče typu N, elektrický proud se zde propouští jen jedním směrem [29]) nebo mikrokanálová destička. Nejpoužívanějším detektorem je tzv. Everhart - Thornley detektor, který pracuje zároveň se sekundárními (SE) i odraženými elektrony (BSE). Je tvořen scintilátorem, který po dopadu elektronu uvolní záblesk světla o vlnové délce 550 - 650 nm. Intenzita záblesku je pak přímo úměrná energii elektronů, které ho vyvolaly. Světlo je dále vedeno světlovodem a komoru SEM opustí průchodem křemenným okénkem. Mimo vakuum je umístěn fotonásobič, který zachytí světelný signál a převede jej na elektrický, přičemž dojde k zesílení signálu zhruba 1 000 až 1 000 000 krát. Everhart - Thornley detektor je elektricky izolovaný od ostatních částí mikroskopu. Tradičním výstupem ze SEM je fotografie, resp. mikrofotografie pozorovaného objektu [3; 4; 10].

1.3.6 Zvětšení

Zvětšení obrazu lze definovat jako poměr velikosti zobrazovací obrazovky k velikosti rasteru dopadajícího na pozorovaný vzorek. Žádané specifické vlastnosti povrchu vzorku je možno vidět na obrazovce CRT ve zvětšení. Zvětšení tedy vyplývá z poměru rozměrů ras-

tru na vzorku k rastru na zobrazovacím zařízení. Za předpokladu, že obrazovka má fixní velikost, lze dosáhnout většího zvětšení zmenšením rastru na vzorku a naopak [6; 10].

1.3.7 Rozlišení

Rozlišení znamená schopnost rozlišit dva body vzájemně vzdálené o určitou délku. Pro představu je lidské oko schopno rozlišit dva body od sebe vzdálené 0,1 mm ze vzdálenosti 25 cm [28]. Prostorové rozlišení závisí v SEM na velikosti elektronového bodu. Ten zase závisí na vlnové délce elektronů a na elektromagnetickém optickém systému, který produkuje rastrující paprsek. Rozlišení je také limitováno interakcí a mírou vzájemného působení materiálu se svazkem elektronů. Mezi výhody SEM patří schopnost zobrazovat poměrně rozsáhlou plochu vzorku a sledovat objemné materiály (ne pouze tenké filmy nebo fólie jako v případě TEM). Rozlišení u SEM je omezeno instrumentálním provedením a vlastnostmi kovů, kterými jsou vzorky pokovovány (např. zlato a platina). Maximální rozlišení je určováno plochou vytvořeného signálu, která závisí na průměru elektronového paprsku, který dopadá na povrch vzorku, a na rozsahu signálu shromážděných elektronů. V závislosti na přístroji se rozlišení pohybuje od méně než 1 nm do 20 nm [6].

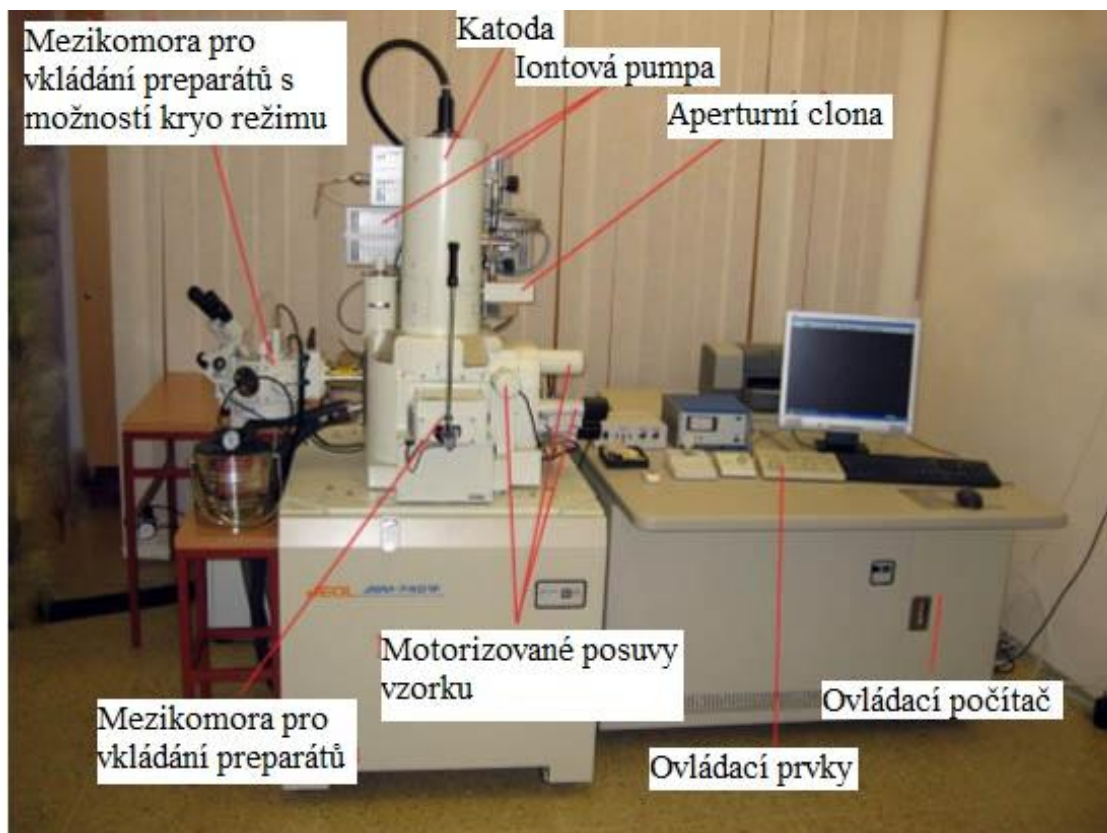
1.3.8 Hloubka ostrosti

Hloubka ostrosti představuje tloušťku preparátu, kterou lze zobrazit ostře. SEM má velmi vysokou hloubku ostrosti, která umožňuje dobré zobrazení komplikovaných povrchů. Trojrozměrný vzhled obrazu je zvyšován i možností vzorek v mikroskopu naklánět od 0° do 90° při použití dynamického zaostřování. Hloubka ostrosti (h) závisí na délce pracovní vzdálenosti (WD - *working distance*), průměru clony (A - *aperture diameter*) a na zvětšení (M - *magnification*), viz vzorec (1). Vysoká hloubka ostrosti se získá použitím dlouhé pracovní vzdálenosti. Pracovní vzdálenost je vzdálenost mezi spodní stranou dolní objektivové čočky a povrchem vzorku [6; 9].

$$h = \frac{0,2 * WD}{A * M} \quad (1)$$

1.4 Kryo-skenovací elektronový mikroskop

Kryo-skenovací elektronový mikroskop (kryo-SEM) je běžný SEM, který je navíc vybaven zvláštním zařízením umožňujícím pozorovat vzorky ve zmrazeném stavu. Tento způsob je využíván hlavně pro velmi hydratované (vlhké) vzorky, jemné biologické vzorky, hydrogely, potraviny, biofilmy, pěny, vosky, suspenze, léčiva a nanočástice. Práce metodou kryo-SEM je založena na fixaci vzorku rychlým zmrazením v kapalném dusíku nebo mražením při vysokém tlaku. Kryo-SEM je opatřen tzv. kryo-držákem, kde mohou být vzorky pozorovány při velmi nízkých teplotách. Moderní kryo-elektronové mikroskopy mají vakuovanou komoru pro přípravu vzorků připojenou přímo k mikroskopu, ale u některých zařízení je od mikroskopu oddělena. Komora pro přípravu vzorků je chlazená a umožňuje udržovat vzorek při kontrolované teplotě. Vzorek může být zachován beze změny nebo může být v přípravné komoře zlomen. Vzorky mohou být také pokoveny. Poté jsou přemísťovány do komory mikroskopu a pozorovány ve vysokém vakuu [6; 13; 14]. Zobrazení a popis elektronového mikroskopu je uveden na Obr. č. 5.



Obr. č. 5 Skenovací elektronový mikroskop JEOL JSM-7401F [3].

2 METODY PŘÍPRAVY VZORKŮ PRO SKENOVACÍ ELEKTRONOVOU MIKROSKOPII

Většinu materiálů (hlavně biologických) nelze ve skenovacím elektronovém mikroskopu prohlížet bez úpravy. Proto bylo vyvinuto mnoho různých metod přípravy vzorků, které závisí na cíli a účelu studie.

Preparát vhodný pro prohlížení v mikroskopu by měl splňovat následující kritéria, která musí být v průběhu přípravy vzorku brána v úvahu. Vzorek musí být čistý, což znamená, že na jeho povrchu by se neměly vyskytovat cizí částice (např. prach). Musí být udržována původní morfologická struktura, musí být stabilní ve vakuu i při ozáření elektronovým paprskem. Když vzorek obsahuje vodu nebo plyn a je vložen do vakua, může se deformovat a zmenšovat. Proto se u biologických vzorků musí před pozorováním provést fixace, dehydratace a sušení. Pro emulzní vzorky je často používána kryo-technologie. Při expozici primárními elektrony by nemělo docházet k nabíjení vzorku. Pokud není vzorek vodivý, absorbované elektrony ho mohou nabíjet. K minimalizování nabíjecích efektů se používá pokovování povrchu vzorku, pozorování při nízkém urychlovacím napětí a v hlubokém vakuu. Přípravy vzorků pro SEM lze rozdělit dle druhu fixace na metody chemické a fyzikální [3; 6].

2.1 Příprava vzorků chemickou cestou

Biologické vzorky obvykle vyžadují k zachování jejich struktury fixaci. Ta se obvykle provádí pomocí chemických fixačních činidel v pufru. Poté jsou vzorky dehydrovány organickými rozpouštědly. Příprava vzorku chemickou cestou zahrnuje tyto kroky: čištění povrchu, primární fixace, promývání, postfixace, promývání, dehydratace, sušení (nejčastěji sušení při kritickém bodu oxidu uhličitého), lepení vzorku a pokovení povrchu vzorku [6].

2.1.1 Čištění povrchu vzorku

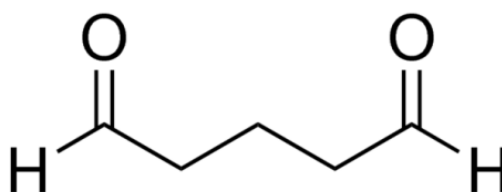
Cílem sledování vzorku v SEM je zobrazit povrch vzorku přesně tak, jak vypadá ve skutečnosti. A protože povrchy vzorků jsou často kontaminovány a pokryty nechtěnými materiály, musí být tyto odstraněny. U větších částic lze použít k odstranění jemnou jehlu za současné práce pod stereomikroskopem, nebo se pokusit objekt opláchnout izotonickým roztokem např. s NaCl nebo HCl, destilovanou vodou nebo pufrům se kterým se pracuje při fixaci [3; 6].

2.1.2 Fixace a postfixace

Proces fixace a postfixace se provádí za účelem zpevnění proteinových a lipidových složek v jejich přirozeném morfologickém uspořádání, aby se předešlo deformaci vzorku při pobytu ve vakuu a při poměrně drastických procesech jako je dehydratace, vkládání vzorku do mikroskopu a vystavení elektronovému paprsku. Cílem je fixace s pokud možno minimálními změnami struktury. Při chemické fixaci se obvykle používá jako primární fixační činidlo glutaraldehyd (GA) k fixaci proteinů a jako sekundární, postfixační činidlo k fixaci lipidů oxid osmičelý (OsO_4). Volba fixačního činidla ale závisí na vlastnostech vzorku a na požadavcích studie [15]. Prozatím nebylo nalezeno fixační činidlo, které by bylo vhodné pro všechny typy vzorků. Proměnnými, které mohou ovlivňovat fixaci, je nejen samotné činidlo a např. složení pufru, ve kterém je rozpuštěno, ale také koncentrace činidla, doba a teplota jeho působení. Doporučené koncentrace, doby i teploty pro fixaci se v různých literárních zdrojích liší. Výběr fixačního činidla hraje významnou a důležitou roli ve výsledku dané studie. Mnohá činidla jsou používána jen zřídka, jiná, zejména glutaraldehyd (GA) a oxid osmičelý (OsO_4), jsou aplikovány velmi často [6; 8; 15; 19].

2.1.2.1 Glutaraldehyd

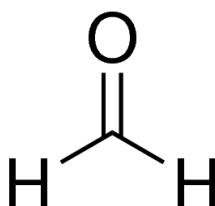
Od prvního představení použití glutaraldehydu (GA) jako fixačního činidla proteinů v roce 1962 je značně využíván pro přípravu vzorků pro elektronovou mikroskopii. Jedná se o dialdehyd (obsahuje dvě vysoce reaktivní aldehydické skupiny), který je složen z pěti uhlíků s molekulovou hmotností $100,12 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, jeho strukturní vzorec je na Obr. č. 6. Glutaraldehyd zesiluje polypeptidové řetězce proteinů, ale nereaguje s lipidy. Proces chemické fixace GA je složitý a není dosud zcela objasněn. Glutaraldehyd tvoří Schiffovy báze s aminoskupinami proteinů. Schopnost polymerizace umožňuje glutaraldehydu tvořit příčné vazby- síťovat. GA reaguje rychle a ireverzibilně s aminokyselinami. Reakce aldehydických skupin s aminoskupinami proteinů vede ke tvorbě kyselých reagujících složek, a proto je nutné použít adekvátní pufr pro udržení stálé hodnoty pH vzorku během fixace. Na rozdíl od formaldehydu proniká do vzorku velmi pomalu (cca 2 mm za 24 h), ale jeho schopnost fixace je rychlá a nevratná. Ideálním fixačním činidlem je tedy jejich směs. Glutaraldehyd není schopen imobilizovat všechny druhy proteinů, a proto mohou být některé proteiny z fixovaného materiálu vyextrahovány. Komerčně se GA dodává jako 25% nebo 8% roztok [6; 15; 17].



Obr. č. 6 *Strukturní vzorec glutaraldehydu* [23].

2.1.2.2 *Formaldehyd*

Formaldehyd se používal jako histologické fixační činidlo ještě před objevením elektronové mikroskopie. Jedná se o nejjednodušší aldehyd se sumárním vzorcem CH_2O , strukturní vzorec je vyobrazen na Obr. č. 7. Při pokojové teplotě je v plynném skupenství. Formaldehyd bývá připravován z paraformaldehydu, aby se zabránilo přítomnosti látek metanolu a kyseliny mravenčí, které se vyskytují v komerčně dodávaných produktech. Využívá se jako primární fixační činidlo, proniká do fixovaného vzorku velmi rychle v porovnání s glutaraldehydem, což se dá vysvětlit malou velikostí jeho molekuly, má ale menší fixační schopnost. Fixace formaldehydem je reverzibilní, lze jej odstranit dostatečným promýváním vodným roztokem. Formaldehyd reaguje přes svou aldehydovou skupinu zejména s aminoskupinami aminokyseliny lyzinu za vzniku můstků, také reaguje s DNA a histony buněk, ale nereaguje s lipidy ani sacharidy [6; 19].

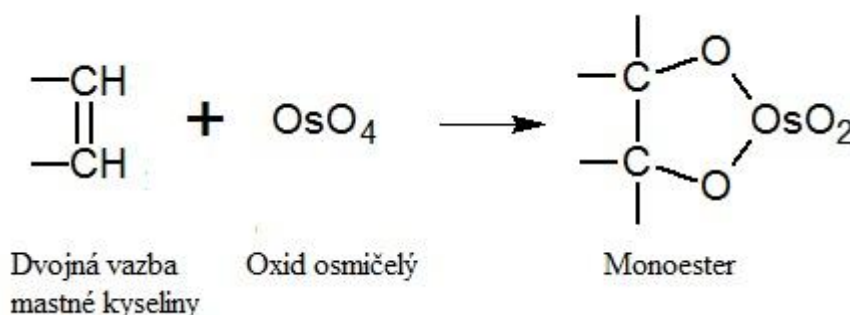


Obr. č. 7 *Strukturní vzorec formaldehydu* [45].

2.1.2.3 *Oxid osmičelý*

Oxid osmičelý (OsO_4) je pevná toxická látka, rozpustná ve vodě a v nepolárních rozpouštědlech, je to oxidační činidlo. Nejvíce charakteristická pro oxid osmičelý je reakce s nenasycenými (vícesytnými) vazbami v lipidech a fosfolipidech (viz Obr. č. 8). Dále reaguje s hydrofilními i hydrofobními skupinami na postranních řetězcích proteinů. O oxidu osmičelém je známo, že interaguje s nukleonovými kyselinami. Typicky černé

zabarvení po fixaci oxidem osmičelým je zapříčiněné tvorbou oxidu osmičitého (OsO_2). Správně fixovaný vzorek by měl být černě zbarven v celém svém objemu, hlavně ve středu. Vodný roztok oxidu osmičelého je schopen fixovat pouze nenasyčené mastné kyseliny v lipidech. Pro fixaci tuku s obsahem nasycených masných kyselin bývá využíván oxid osmičelý v imidazolovém pufru, který reaguje mnohem intenzivněji i s nenasyčenými mastnými kyselinami, obzvláště linolovou a linoleovou. Oxid osmičelý bývá dodáván v krystalické formě nebo jako 4% vodný roztok [2; 8; 18; 44].



Obr. č. 8 Interakce oxidu osmičelého s dvojnou vazbou v mastné kyselině lipidu za vzniku monoesteru [19].

2.1.3 Promývání pomocí pufrů

Po fixaci glutaraldehydem i postfixaci oxidem osmičelým bývá vzorek vymýván pomocí pufru. Promývání je velmi důležité kvůli úplnému odstranění stop volného nezreagovaného fixačního činidla, které ve vzorku zůstává a mohlo by reagovat v dalších krocích fixace. Používá se tentýž pufr, který byl použit pro přípravu fixačního činidla. Osmolarita a pH pufru by měly zůstat zachovány stejné jako při primární fixaci. Obvykle je dostačující promýt vzorek celkem třikrát po asi 10 minutách. Pufrы používané v elektronové mikroskopii by měly mít dostatečnou tlumicí kapacitu, měly by být chemicky stabilní, neměly by být cytotoxické, neměly by se navzájem ovlivňovat s fixačními činidly. Mezi v současné době nejpoužívanější tlumicí roztoky patří kakodylanový a fosforečnanový pufr. Většina používaných pufrů mají hodnotu pH nižší než 7 a nesou záporný náboj [3; 6].

2.1.3.1 Kakodylanový pufr

Kakodylanový tlumicí roztok se získává ze sodné soli kakodylové kyseliny, jejíž sumární vzorec je $(\text{CH}_3)_2 \text{AsO}_2 \text{Na}$. Kvůli obsahu arsenu je toxický, je také velmi drahý, ale nenesou velmi reaktivní skupiny. Jeho výhodou je dlouhá trvanlivost zásobních roztoků. Nebývá kontaminován mikroorganismy, jelikož velmi silně inhibuje jejich růst. Po použití

kakodylanového pufru k promývání může být vzorek v pufru skladován po dobu i několik dní [3; 6; 19].

2.1.3.2 Fosforečnanový pufr

Fosforečnanový pufr je považován za netoxický, na rozdíl od kakodylanového a je levnější. Snadno ale bývá kontaminován mikroorganismy, proto je nutné jej připravovat čerstvě a není možné jej dlouhodobě skladovat. Kvůli obsahu negativně nabitých skupin reaguje s pozitivně nabitými ionty a precipituje. Existuje více druhů fosforečnanových pufrů, tzv. Sorensův pufr se vyrábí ze sodných a draselných solí fosforečnanu [6; 19].

2.1.4 Odvodnění

Odvodnění neboli dehydratace je proces výměny vody ve vzorku za jiné organické rozpouštědlo. Tento krok následuje po sekundární fixaci oxidem osmičelým a jeho vymývání ze vzorku pufrům. Běžně se jako dehydratační činidla používají etanol a aceton. Etanol bývá využíván více, protože bezvodý aceton ochotně absorbuje vodu z atmosféry a také mnohem lépe extrahuje lipidy. Obecným principem dehydratace je postupně nahradit vodu přítomnou ve vzorku použitím koncentrační řady dehydratačního činidla. Obvykle se v prvním kroku používá 30% nebo 50% roztok etanolu či acetonu a pokračuje se za použití 70%, 80%, 90%, 95% a nakonec 100% etanolu respektive acetonu. Dehydratace bývá prováděna při pokojové teplotě a každý krok trvá asi 10 až 15 minut. Aceton a etanol mají tendenci extrahovat ze vzorku lipidy, což má za následek smrštění vzorku, ale oxid osmičelý využívaný v sekundární fixaci nenasycené tuky stabilizuje [6; 8].

2.1.5 Sušení

Po úplném nahrazení vody v procesu odvodnění je nutné ze vzorku odstranit dehydratační činidlo, k čemuž se využívá krok sušení. Sušení je možné provádět různými způsoby, z nichž každý má jisté výhody i nevýhody. Nejčastěji se používá sušení na vzduchu, chemické sušení a sušení metodou kritického bodu. Vysušený vzorek by měl být minimálně porušen, bez artefaktů způsobenými procesem sušení. Poté, co je vzorek vysušen, nalepen k držáku vzorků, je připraven k přenesení do vakuové komory v naprašovací zařízení pro pokovení a pro prohlížení v SEM [3; 20; 21].

2.1.5.1 Sušení na vzduchu

Prosté sušení na vzduchu je nejjednodušší metoda, má ale mnoho nevýhod. Po vysušení na vzduchu dochází k různým deformacím zkoumaného objektu, např. ke zkroucení, zborcení struktury, praskání a smrštění vzorku. Může dojít k porušení, zploštění povrchu vzorku kvůli tlakovým silám povrchového napětí na rozhraní kapaliny a plynu [6].

2.1.5.2 Chemické sušení

Pro sušení vzorku mohou být použity i některé chemické látky, např. hexametyldisilazan (HDMS). HDMS má nízké povrchové napětí a při sušení rychle sublimuje. Výsledkem je v porovnání se sušením na vzduchu dobře fixovaná struktura. Výhodou této metody je, že je v porovnání s metodou CPD (*critical point drying*, sušení ke kritickému bodu) relativně levná. Metoda CPD je ale ke vzorku šetrnější a proto je stále více využívána. HDMS je toxická látka, se kterou se musí pracovat v chemické digestoři [6; 30].

2.1.5.3 Metoda sušení ke kritickému bodu, CPD

Metoda sušení při kritickém bodu oxidu uhličitého je běžně užívaná metoda k odstranění kapalných fází ze vzorku. Zabraňuje poškození povrchu vzorku, které by způsobila síla povrchového napětí při odpařování rozpouštědla na vzduchu. Vysušení metodou kritického bodu následuje po odvodnění vzorku absolutním etanolem či acetonem, kdy se vzorek zbaví dehydratačního činidla. V laboratorních podmínkách se nejčastěji provádí pomocí oxidu uhličitého (CO₂) [3; 26; 36; 66], používá se také argon. Sušení při kritickém bodu je založeno na teorii, že při určité teplotě (31 °C) a tlaku (7,39 MPa) v omezeném prostoru přechází CO₂ z kapalných fází do plynné. Kapalný CO₂ je přiveden do komory se vzorkem, která je chlazená a udržovaná pod tlakem. Poté, co je etanol či aceton úplně nahrazen CO₂, prostředí komory je převedeno do kritického bodu, tzn., že teplota se zvýší na cca 35 °C a tlak na hodnotu kolem 8 MPa. Mezi dvěma fázemi dané látky zmizí rozhraní, obě mají v danou chvíli stejnou měrnou hustotu i objem a povrchové napětí je nulové. Teplota se udržuje na kritickém bodě, dokud se plynný CO₂ neodpaří z komory. Poté se tlak v zařízení vrátí na atmosférický a tím je proces kritického sušení u konce. Po vysušení by měl být vzorek úplně suchý a neměl by obsahovat žádný etanol, případně aceton, ani oxid uhličitý [20; 21; 36].

2.1.6 Lepení vzorku

Vysušený vzorek je přichycen na kovový nosič většinou pomocí vodivé oboustranné lepící pásky nebo lepidla. Lepící médium by mělo být tepelně stabilní, stabilní ve vakuu, elektricky vodivé, nemělo by obsahovat vodu, nemělo by být hygroskopické. Nosič ani lepidlo by neměli emitovat zpětně odražené elektrony. Je důležité, aby byl vzorek k terčíku přichycen pevně kvůli možnému náklonu při samotném pozorování. Při upevňování vzorku je nesmírně důležitá jeho orientace. Vzorek se připevňuje tak, aby jeho zkoumaná oblast byla co nejlépe pozorovatelná [3; 6].

2.1.7 Pokovování

Mnoho vzorků obsahuje nekovové oblasti, které se při prohlížení v SEM mohou nabíjet. Proto je nutné tyto vzorky pokovovat. Látka, kterou bývá vzorek pokovován, musí být vodivá a také by neměla ve velké míře vytvářet sekundární nebo odražené elektrony. U biologických materiálů je vzorek většinou pokoven tenkou vrstvou kovu (přibližně 20 - 30 nm), např. zlata, palladia. Pokovování bývá obvykle prováděno ve vysokém vakuu magnetronovým naprašováním. Tloušťka nanesené vrstvy materiálu je velmi důležitá. Silnější vrstva kovu zajistí vyšší signál a více redukuje nabíjení, ale pokryje detaily a tím snižuje rozlišení [8; 10; 11].

2.2 Příprava vzorků fyzikálními metodami

Z fyzikálních postupů přípravy vzorků pro SEM se uplatňují především mrazové metody. Mikrovlnné záření se používá většinou jen k urychlení jednotlivých kroků při přípravě chemickou cestou [3].

2.2.1 Fixace mikrovlnným zářením

Díky využití mikrovlnného ohřevu lze zkrátit dobu fixace chemickými činidly z hodin na minuty, či dokonce sekundy. Posílí se konzervace struktury, lépe se uchovají tuky i rozpustné bílkoviny. Mikrovlny jsou ve formě neionizujícího záření, které vzájemně působí s bipolárními molekulami (např. s vodou a polárními postranními řetězci proteinů) a způsobují rotaci těchto molekul. Jak se molekuly rozpohybují, rychlost difuze všech molekul v roztoku se zvýší. Mikrovlnné záření má také vliv na zvýšení rychlosti reakcí. Třením molekul vzniká teplo, které však nemá vliv na zrychlení fixace. Při fixaci mikrovlnným

ohřevem nesmí být vystavení vzorku záření delší než 30 až 60 s, teplota se musí udržovat pod 50 °C a musí se určit správné umístění vzorku v mikrovlnné troubě [8].

2.2.2 Mrazové metody, kryo-fixace

Jeden z problémů chemické fixace při pokojové teplotě je ten, že činidlo se nedostane ke každé molekule současně a nemůže zafixovat vzorek v jeho přirozené podobě. Fixační a dehydratační činidla také mohou extrahovat nestabilní složky vzorku. Při použití kryo-metod není vzorek chemicky fixován, ale je velmi rychle zmrazen v tekutém dusíku ve vakuu (tzv. *slush*, který lze v českém jazyce přirovnat k ledové tříšti) a tak je struktura vzorku fixována téměř okamžitě. Pokud by byly vzorky mrazeny pozvolna při atmosférickém tlaku, voda by vykristalizovala a došlo by k denaturaci okolních makromolekul. Jednou z možností, jak tomuto předejít, je zmrazit vzorek tak rychle, že se molekuly vody přestanou pohybovat dříve, než začnou tvořit vodíkové můstky a krystalky ledu. Výsledkem tohoto procesu je amorfní led, tzv. vitrifikovaný, skelný, který zůstává v neorganizovaném uspořádání (jako by byl pořád v kapalné formě) a nedochází tak k narušení nativního stavu buněk vzorku. Chladicí médium by mělo mít dobrou tepelnou vodivost a vysokou tepelnou kapacitu, mělo by být viskózní při nízkých teplotách, mít vysokou hustotu a bezpečně se používat. Většinou požadavků vyhovuje propan a etan, které jsou avšak vysoce explozivní. Nejvíce je využíván kapalný dusík. Po rychlém zmrazení ve vakuu při méně než -140 °C v ledové tříšti dusíku je vzorek přenesen do speciální chlazené komory většinou připojené k mikroskopu. Zde může být vzorek udržován při teplotách kapalného dusíku, může být zlomen a pokoven předtím, než je vložen do komory SEM pro prohlížení. Obvykle se před pokovením zvýší teplota (na cca -95 °C, dle typu vzorku), aby vytvořený led vysublimoval. V některých případech je nutné aplikovat tzv. kryoprotektanty, a to zejména u vzorků s vyšším obsahem vody. Nejvíce využívané kryoprotektanty jsou dimetylsulfoxid, glycerol, etylenglykol, sacharóza a dextran. Kryo-skenovací elektronová mikroskopie má široké využití. Je využívána pro tučné potraviny (čokoláda) a pro tučné mražené potraviny (zmrzlina), pro různé emulze v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu, v biologických vědách [3; 6; 7; 22; 37].

Po zmrazení materiálu se může provádět tzv. mrazové lámání, které umožní odhalení vnitřní struktury. Samotné lámání může být prováděno ve speciálním zařízení připojeném ke skenovacímu elektronovému mikroskopu (např. v našem případě to bude kryoattachment Alto 2500, Gatan). Mrazové lámání může být použito i při chemické fixaci.

Poté, co je vzorek dehydrován absolutním etanolem, je zmrazen v kapalném dusíku a zde i zlomen. Lom se ve zmrazeném materiálu šíří cestou co nejmenšího odporu. Po lámání může následovat tzv. mrazové leptání. Tato metoda spočívá v částečné sublimaci ledu za sníženého tlaku, která vede k lepšímu odhalení struktur v lomu vzorku [2; 3; 6; 26].

2.3 Klady a zápory chemické a fyzikální fixace

Mezi výhody fixace chemickou cestou patří především dlouhá historie používání. Metoda je dobře zavedená, příprava jednotlivých činidel a posléze i vzorků je relativně jednoduchá, pokud se pracuje s matricí, pro kterou jsou postupy dobře popsány. Se vzorky se snadno manipuluje, dobře se skladují a přemísťují. Mezi nevýhody lze zařadit v první řadě to, že může docházet k modifikaci a narušení jemné struktury připravovaných vzorků a k nevratným chemickým změnám složek vzorku. Dalšími nevýhodami je relativní finanční náročnost na pořízení jednotlivých činidel, nutnost jejich likvidace ve speciálním režimu, neboť se povětšinou jedná o látky toxické. Jako nevýhoda se také může považovat nutnost modifikace přípravy jednotlivých matic [6; 26].

Kladnou vlastností přípravy vzorků fyzikální cestou je, že se jedná o okamžitý a rychlý proces, kdy vodné prostředí vzorku zůstává nenarušené, ultrastruktura i chemické složení vzorku jsou zachovány. Nevýhodou je, že vzorky by měly být co nejmenší, aby byly co nejrychleji zafixovány („zmrzly“) v celém svém objemu a nedocházelo k fixaci pouze na povrchu vzorku, což by se negativně projevilo při další manipulaci se vzorkem, například v průběhu lámání. U teplotně citlivých vzorků může nastat problém, kdy se nepovede zabránit tvorbě krystalů ledu a tím dojde k narušení struktury vzorku [6].

2.4 Vznik artefaktů během přípravy a pozorování vzorků

Artefakty jsou změny v mikrostruktuře vzorku, které se tvoří v důsledku nevhodné přípravy vzorku a při samotném pozorování. Ve většině případů se artefakty tvoří během fixace, odvodnění, sušení při kritickém bodu, mražení, lepení na terčík, pokovování a mikroskopickém pozorování. Vzorek zkoumané potraviny musí být odebrán z místa pod povrchem, kde produkt není vystaven působení vnějších sil (tlaku, povrchovému napětí, vlivu obalu, vypařování apod.) Při odběru vzorků jsou používány ostré nástroje (skalpel, nožik, žiletka a další), které mohou porušit povrch odebíraného vzorku a narušit tak přirozenou mikrostrukturu studovaného materiálu. V těchto případech je vhodné před pozorováním vzorek zlomit a podrobit zkoumání lomnou plochu. Při chemické fixaci se pro zafixování proteinů

využívá glutaraldehyd, pro tuky oxid osmičelý. V tavených sýrech nejsou tukové kuličky chráněny membránami (během procesu tavení se vytvoří membrány proteinové) a proto se během postfixace oxidem osmičelým stabilizuje pouze část z nich (ty, které obsahují nenasyčené mastné kyseliny). Zbytek tuku je během odvodnění a sušení při kritickém bodu extrahován. Zbytky stabilizovaného tuku zůstávají v prostorech, které byly vyplněné tukem a mohou být považovány za artefakty. Nejtypičtějším artefakty vznikajícími při fyzikální fixaci v kryo-SEM jsou struktury porušené růstem krystalů ledu v průběhu mražení, kdy dochází k narušení proteinové matrice. Tento typ artefaktu vyvolává především pomalé mražení vzorku. Nastává, když je vzorek příliš velký, anebo je použito nevhodné chladicí médium. Pro dosažení amorfního ledu a zabránění růstu krystalů musí být rychlost chlazení vyšší než $107\text{ }^{\circ}\text{C}$ za sekundu. Při sublimaci ledu může dojít k rekrystalizaci zmrzlé vodné fáze, obzvláště zvýší-li se teplota nad $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ dříve, než vysublimuje všechn led. Tyto artefakty jsou podobné poškozením způsobeným pomalým mražením vzorku. Při odvodnění organickými činidly může dojít ke vzniku artefaktů kvůli nedostatečnému odstranění vody ze vzorku. Doba působení dehydratačního činidla se odvíjí od velikosti vzorku, obvykle je dostačujících 10 minut. Přestože je metoda sušení při kritickém bodu ke vzorkům velmi šetrná, může i zde docházet ke tvorbě určitých artefaktů. Zejména u jemných biologických struktur dochází k jejich smršťování. Vysušení na vzduchu není, jak již bylo zmíněno výše, doporučováno kvůli možnému zborcení přirozených struktur vzorku působením povrchového napětí. Nesprávné uchycení vzorku na terčík pro pozorování také může vést k poškození struktury. Pokud mezi vzorkem a podkladem není dostatečná elektrická vodivost, dojde k nabíjení a tvorbě artefaktů. Důvodem může být nedostatečné množství použitého lepícího média nebo jeho nevhodná konzistence (viskozita). Dalším artefaktem mohou být otisky nástrojů používaných k manipulaci se vzorkem. Po ozáření nevodivého vzorku primárním svazkem elektronů může dojít k jeho nabíjení. Při tomto procesu se vytváří artefakty, které jsou viditelné na obrazu jako světlé nebo tmavé skvrny. Za jistých okolností mohou dokonce zpět odrážet primární elektrony a tak nedochází ke správnému zobrazení povrchu vzorku. Řešením tohoto problému je pokovování povrchu vzorku, které samo o sobě také může přispět k tvorbě artefaktů nebo nereálnému zobrazení zkoumaného povrchu. Příliš slabá vrstva nemusí být dostatečná pro zabránění efektů nabíjení, naopak příliš silná vrstva kovu na povrchu znemožňuje sledovat některé detaily prohlíženého preparátu. Každý skenovací elektronový mikroskop nabízí celou řadu podmínek, při kterých je možné sledovat pozorovaný objekt. Mezi variabilní podmínky se řadí urychlovací

napětí, pracovní vzdálenost, sklon stolku, proud paprsku, kontrast. Je obecně známo, že se zvyšujícím se urychlovacím napětím se zvyšuje rozlišení. Vysoké urychlovací napětí není nezbytné, pokud jsou pozorovány objekty při malém zvětšení (méně jak 1 000 krát). Kinetická energie elektronů se zvyšujícím se napětím stoupá a tak se zvyšuje riziko porušení vzorku proudem elektronů. U polymerních a organických materiálů se tvoří artefakty v podobě puchýčků a prasklin, které se na první pohled mohou zdát jako vzorku přirozené, ale při bližším pozorování mohou být rozpoznány jako chyby [10; 16; 26; 35].

3 TAVENÝ SÝR

Taveným sýrem lze dle vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje, v platném znění nazvat sýr, který byl tepelně upraven za přídavku tavicích solí. Jedná se o produkt vyrobený mísením přírodních sýrů v různé fázi zrání s tavicími solemi za vytvoření jemné a homogenní směsi pomocí působení tepla a mechanického namáhání. Mezi funkční vlastnosti, kterými se popisují tavené sýry, patří tuhost, roztíratelnost, opětovná tavitelnost, uvolňování lipidové (olejové) fáze při mechanickém namáhání. Druhy tavených sýrů zahrnují širokou škálu od pevného a krájitelného produktu obvykle distribuovaného v blocích, jako plátkový nebo strouhaný sýr, ke krémovým roztíratelným produktům. Na trhu se lze setkat s tzv. analogy tavených sýrů, pro jejichž výrobu mohou být použity i tuky a proteiny nepocházející z mléka ale většinou jsou rostlinného původu. Takové výrobky pak není možné dle legislativy nazývat tavenými „sýry“ [1; 25; 27; 31; 46].

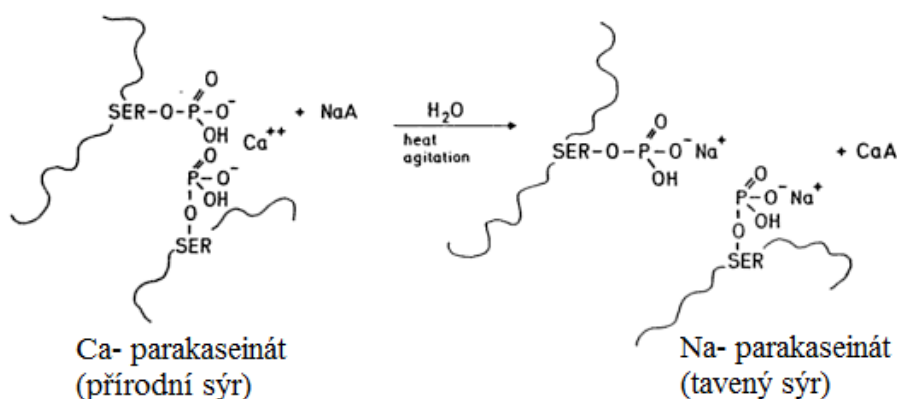
3.1 Technologie výroby tavených sýrů

Výrobní proces tavených sýrů zahrnuje výběr přírodního sýra, výpočet množství jednotlivých surovin a složek dle požadovaných vlastností, míchání surovin, mělnění, přídavek tavicích solí, záhřev (tepelné zpracování), homogenizaci a konečně balení, chlazení a skladování [48].

3.1.1 Složení a přísady

Hlavní surovinou pro výrobu taveného sýra jsou přírodní sýry. Hrají důležitou roli ve tvorbě struktury, reologických a texturních vlastností, které ovlivňuje především obsah proteinů, obzvláště intaktního kaseinu. Dalšími kritérii pro výběr sýrů jako suroviny jsou chuť a vůně, konzistence a kyselost. Pro výrobu tavených sýrů je možné na základě požadovaných vlastností finálního produktu použít jeden či více druhů sýrů najednou a také smíchat sýry v různých fázích zrání. Mezi další mléčné suroviny používané k výrobě tavených sýrů patří mléčný tuk (bezvodý mléčný tuk, máslo, smetana), mléčné proteiny (kaseiny, kaseináty, syrovátkové bílkoviny), které ovlivňují stabilitu, sensorické vlastnosti a strukturu, a laktóza (sušená syrovátka). Do tavených sýrů je také možné přidávat řadu „nemléčných“ surovin, například koření pro úpravu barvy a chuti, jedlou sůl, aromata, gummy pro potravinářské účely k úpravě textury, zahuštění apod. Nejdůležitější a stěžejní ingrediencí pro výrobu tavených sýrů jsou tavicí soli. Obecně se jedná o soli, které obsahují

monovalentní kationty (Na^+) a polyvalentní anionty (fosforečnany, citronany). Nejpoužívanější tavicí soli jsou citronany sodné, hydrogenfosforečnany sodné, polyfosforečnany sodné. Tavicí soli jsou přidávány v množství od 1 do 3 g na 100 g výrobku obvykle v závislosti na obsahu proteinů a požadovaných vlastností finálního výrobku. Soli jsou používány kvůli prevenci oddělování tuku a vody během výroby a chlazení. Zvyšují hydrataci proteinu a emulgaci volného tuku. Molekuly tavicích solí nemají amfifilní charakter a proto je nelze nazvat emulgátory. Jedná se v podstatě o emulgační činidla, která přeměňují nerozpustný parakaseinát vápenatý na rozpustnější parakaseinát sodný. Parakaseinát sodný během záhřevu a míchání emulguje rozptýlené tukové kuličky a přispívá tak k vytvoření stabilní emulze typu olej ve vodě. Tavicí soli zajistí iontovou výměnu vápenatých iontů (Ca^{2+}) proteinové (kaseinové) matrice za ionty sodné (Na^+), zajišťují hydrataci a bobtnání proteinů, emulgaci tuků a stabilizaci emulze, upravují a stabilizují hodnotu pH. Tyto procesy vedou k získání jemné a homogenní struktury taveného sýra. Schéma působení je znázorněno na Obr. č. 9. Do surovinové skladby při výrobě tavených sýrů může být použit i tzv. *rework* neboli krém, což je směs již utaveného sýra [1; 27; 28; 52; 63].



Obr. č. 9 Chemické reakce tavicích solí a proteinů během výroby tavených sýrů (*A-anion fosforečnanu, polyfosforečnanu, citronanu apod.*) [33].

3.1.2 Mělnění surovin

Po výběru surovin dle žádoucích vlastností konečného výrobku a poté, co přírodní sýry projdou kontrolou kvality, jsou pro rozmělnění sýra na menší kousky použita různá mlecí zařízení. Mletím suroviny se zvětšuje povrch částic, čímž se zlepšují podmínky pro interakci se surovinami a vodou a také se zvyšuje efektivita zahřívání a tavení, které poté

působí ve hmotě stejnoměrně. Tato operace může být prováděna několika způsoby. Rozmělněný přírodní sýr je míchán samostatně nebo v kombinaci s dalšími složkami (máslo, sušené mléko, sušená syrovátka), může být také míchán s vodou a dalšími ingrediencemi nebo i s tavicími solemi. Posledním krokem přípravy směsi pro tavení je přidavek tavicích solí. Takto připravená směs je obvykle přímo dávkována do tavicího zařízení [1; 32].

3.1.3 Tavení

Tavicí proces zahrnuje tepelné zpracování předem připravené směsi pomocí přímého nebo nepřímého ohřevu. Pro zpracování taveniny existuje mnoho tavicích zařízení lišících se konstrukcí a provozními podmínkami. Při diskontinuálním zpracování je směs všech surovin dávkována do tavicího kotle. Tavicí kotle jsou dvouplášťové a konstruované pro vývoj mírného podtlaku uvnitř kotle. Produkt je neustále míchán rychlostí stovek až tisíců otáček za minutu. Směs je zahřívána parou díky dvouplášťovému sestrojení kotle nebo může být okamžitě ohřátá přímým vstřikem páry. Při diskontinuálním tavení se dosahuje teploty 71 - 110 °C po dobu působení 4 - 15 minut, přičemž v dnešní době se využívá obvykle záhřevu v rozmezí 90 - 105 °C. Při tavení dochází (vzhledem k pH hmoty) k pasteraci produktu. Při kontinuálním ošetření je směs tepelně ošetřena při teplotách 130 - 145 °C po dobu 2 - 3 s v soustavě ocelových trubek. Kontinuální proces tavení sýrů ale není v České republice prozatím příliš využíván [1; 32; 52].

3.1.4 Balení

Výsledný produkt se do obalu plní za horka (obvykle při teplotách nad 65 - 70 °C). Tavený sýr je obvykle balený v laminované folii, tubách, kelímcích, krabičkách, plastových obalech a příležitostně i ve skleněných obalech [32].

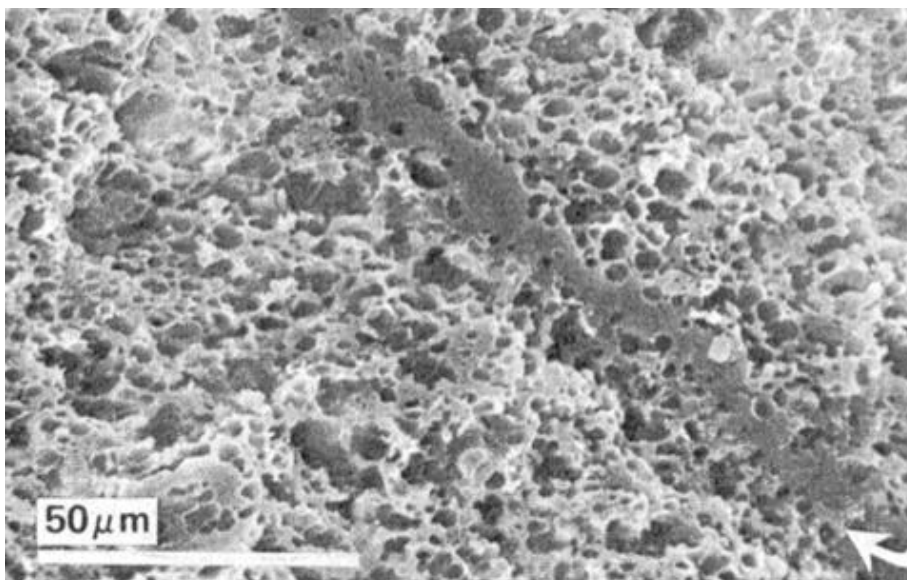
3.1.5 Chlazení a skladování

Po nadávkování horkého taveného sýra a zabalení následuje chlazení. Způsob a intenzita chlazení závisí na typu taveného sýra. Tavené sýry v blocích jsou chlazeny pomalu, rozdíratelné produkty jsou chlazeny rychle, šokově. Zabalené výrobky jsou chlazeny v chladicích tunelech, kde jsou nechány po dobu 30 až 60 min a chlazeny na teplotu 25 až 35 °C. Pokud nejsou k dispozici chladicí tunely, jsou výrobky uloženy v chladných místnostech. Tavený sýr může být také uzen. Zabalený hotový produkt by měl být sklado-

ván a uváděn do oběhu dle vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 77/2003 Sb., v platném znění při teplotách od 4 do 8 °C [32; 34; 46].

3.2 Struktura tavených sýrů

Tavený sýr je komplexní systém sestávající z proteinů, tuku, solí, vody a dalších složek. Je tvořen kontinuální proteinovou sítí, ve které jsou dispergovány tukové kuličky. Je možné ho definovat, jak je již uvedeno výše, jako stabilní emulzi typu olej ve vodě. Jeho vlastnosti závisí na jeho složení a povaze (např. stáří) použitého přírodního sýra jako výchozí suroviny, na pH hmoty, na druhu a množství tavicích solí, na výrobním procesu, podmínkách skladování. Textura taveného sýra souvisí s jeho složením, organizací jednotlivých složek ve struktuře (mikrostruktura), fyzikálně-chemických vlastnostech složek a na makrostruktuře, která ovlivňuje konzistenci, krémovitost a roztíratelnost výrobku. Během zpracování se mění vlastnosti přírodního sýra a výsledkem je vyvinutí nové mikrostruktury s charakteristickými rysy [52]. Přírodní sýr je vyroben sladkým srážením kaseinů v mléce pomocí syřidla (enzymu) za vzniku gelu, jehož dalším zpracováním se získávají sýrová zrna, která se tlakem slisují do kompaktní hmoty. V místě kontaktu jednotlivých zrn vznikají spoje, jež jsou v mikroskopu viditelné (viz Obr. č. 10, [47]) [1; 25; 33; 49; 52].



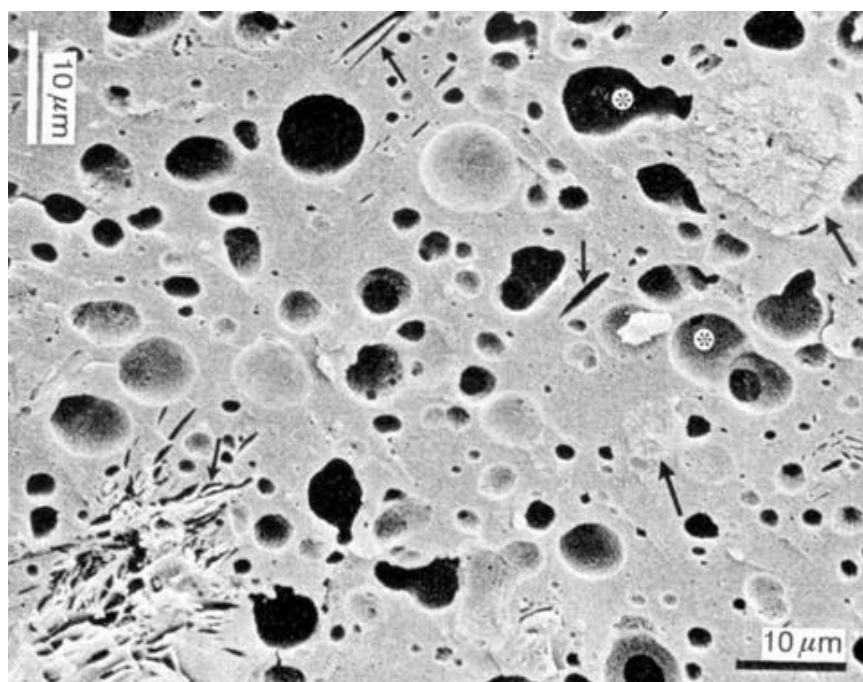
Obr. č. 10 *Struktura přírodního sýra zobrazená pomocí SEM. Tmavý pás označen šipkou je spoj mezi sýrovými zrny [47].*

Vlivem tepelného ošetření a mechanického namáhání během výroby taveného sýra se sýrová zrna rozpadají a rozhraní mezi nimi zaniká, dochází k hydrataci a dispergaci sítě z parakaseinátu vápenatého. Dochází také k oddělení tuku od proteinů, membrány tukových kuliček se rozpadají. Působením tavicích solí, vysoké teploty a intenzivního míchání se z relativně nerozpustných proteinů v přírodním sýru stanou proteiny rozpustné a vznikne homogenní a jemná struktura taveného sýra [60].

Při výrobě tavených sýrů se původní membrány tukových kuliček mohou rozpadat, případně je použita surovina, kde již tuk membrány nemá (například máslo či bezvodý mléčný tuk). Na povrchu kuliček se vytvoří membrány nové složené z proteinů sýra - parakaseinátů. Parakaseináty na povrchu tukových kuliček jsou připojeny k proteinové matici a vytváří se tak kontinuální gelová síť. Tukové kapénky mají kulovitý tvar, jejich velikost se pohybuje mezi 1 a 10 μm a jsou ukotveny ve spojitě proteinové matici. Průměrná velikost tukových kuliček je velmi různorodá, závisí na typu a koncentraci tavicích solí, stejně tak i na způsobu zpracování. Tavený sýr, jenž obsahuje větší tukové kuličky má jemnější a měkčí konzistenci, v porovnání se sýrem s malými tukovými kuličkami. Tuk a parakaseinát jsou v taveném sýru rozptýleny více homogenně, než v sýru přírodním a tukové kuličky podstatně méně splývají a jsou menší [52; 60]. Na mikrostrukturu tavených sýrů má vliv také stupeň zrání použitého přírodního sýra. V mladých sýrech s nízkým stupněm proteolýzy se vyskytují téměř nezměněné kaseiny, které se vyznačují vysokou emulzifikační kapacitou. Sýry s intenzivní proteolýzou jsou charakteristické rozpadem kaseinů, zmenšením délky jednotlivých kaseinových jednotek, což má za následek měkčí a jemnější výrobky [48]. Během výroby taveného sýra se do díla přidává voda k rozpuštění tavicích solí, k hydrataci proteinů a také kvůli úpravě některých vlastností výsledného produktu (jemnost, roztíratelnost, měkkost, tavitelnost). V mnoha studiích bylo zpozorováno, že se snižujícím se obsahem vody se zmenšuje velikost tukových kuliček a jejich počet se zvyšuje. Snižování velikosti kuliček (zvyšování styčné plochy) je vysvětleno použitím intenzivnějšího smykového namáhání, které je nezbytné při výrobě sýrů s nízkým obsahem vody [60]. Mikrostruktura je ovlivněna podmínkami při výrobě, především teplotou a dobou tavení. Během zahřívání na teplotu 70 - 75 $^{\circ}\text{C}$ se získává homogenní jemná hmota. Proces krémování, který vede ke změně viskozity, začíná při teplotě 80 - 90 $^{\circ}\text{C}$. Během chlazení dochází k interakcím mezi proteiny, vytváří se síťovitá struktura a zvyšuje se viskozita (pokračuje proces krémování) [48; 64]. Na začátku procesu tavení jsou proteiny ve formě jednotlivých částic, a jak tavicí proces pokračuje, proteiny začnou tvořit kom-

paktní síťovitou strukturu. S prodlužující se dobou zpracování se snižuje velikost tukových kuliček, tavenina se stává pevnější a elastičtější [52]. Pokud tavení trvá příliš dlouho, dochází

ke zhroucení síťovité struktury proteinů, což se projeví snížením viskozity, tzv. překrémováním [60]. Zvyšování teploty během výroby vede ke zmenšování tukových kuliček a výsledný produkt je tužší a viskóznější. Rychlost otáček míchadla při zpracování má také vliv na strukturu a texturu taveného sýra. Se zvyšující se rychlostí otáček se zvyšuje také viskozita a pevnost taveného sýra. Při použití vysokých otáček (1050 otáček za minutu) se v mikrostruktuře taveného sýra vytvoří velké množství malých tukových kuliček, které jsou v porovnání s taveným sýrem vyrobeným při nízkých otáčkách (450 otáček za minutu) distribuovány více homogenně [52]. Během chlazení tavených sýrů dochází k reakcím mezi dispergovanými proteiny, včetně proteinů tvořících obaly tukových kuliček, a vzniká tak rozvětvená, síťovitá struktura, ve které jsou rozptýleny emulgované tukové kuličky [64]. Hodnota pH má také podstatný vliv na reologii, texturu a mikrostrukturu tavených sýrů, jelikož ovlivňuje interakce mezi proteiny, hydrataci kaseinů a funkci tavicích solí. Nízké pH má obvykle za následek suchý, pevný a zrnitý tavený sýr se sklony k oddělování tuku. Při vysokých hodnotách pH ($\text{pH} > 6$) bývá tavený sýr velmi měkký, vlhký až tekoucí. Se zvyšováním pH se celistvost proteinové matrice zhoršuje a vede ke snižování interakcí mezi proteiny a proteinová síť se oslabuje [65]. V blokových, krájitelných tavených sýrech jsou proteinová vlákna delší (délka až 10 μm a šířka 20 nm) a mezi vlákny existuje mnohem více vazeb než v roztíratelných tavených sýrech, kde je matrice tvořena parakaseinovými agregáty (podlouhlé částice s průměrem 25 nm), které jsou více dispergovány a tvoří převážně samotné částice [47]. Krystaly tavicích solí se během procesu zpracování rozpouští, ale mohou se vyskytnout nerozpuštěné zbytky v podobě jehlic (viz Obr. č. 11), které mohou být ve výsledném produktu viditelné. V průběhu tavení se mohou tvořit i nerozpustné vápenaté soli fosforečnanů, které se objevují v podobě kulovitých krystalů [25]. Ke tvorbě krystalů přispívá nadbytek tavicích solí nebo laktózy, vysoký obsah vápníku v přírodním sýru, vysoká hodnota pH a také příliš dlouhá doba skladování [1; 25; 33; 52]. Mikrostruktura taveného sýra zobrazena skenovací elektronovou mikroskopií je znázorněná na Obr. č. 11. Na snímku jsou viditelné tukové kuličky (značené hvězdičkou), otisky krystalů tavicích solí (značené malou šipkou) a otisky krystalů fosforečnanu vápenatého (značené velkou šipkou) [25].



Obr. č. 11 *Struktura taveného sýra zobrazená pomocí SEM [25].*

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této práce bylo optimalizovat přípravu vzorků tavených sýrů pro skenovací elektronovou mikroskopii. Pro dosažení tohoto základního cíle byly stanoveny následující dílčí cíle:

- v rámci teoretické části zpracovat literární rešerši o daném tématu,
- připravit vzorky tavených sýrů chemickou a fyzikální cestou s lišícími se parametry přípravy,
- prohlédnout připravené vzorky elektronovou skenovací mikroskopii,
- popsat odlišnosti v jednotlivých metodách přípravy a vliv lišících se parametrů na strukturu vzorků tavených sýrů,
- provést dynamickou oscilační reometrii a porovnat její závěry s výsledky mikrostruktury tavených sýrů.

Nakonec byly charakterizovány silné a slabé stránky jednotlivých způsobů přípravy a možný vznik artefaktů, který mohl nastat během přípravy a prohlížení vzorků.

5 METODIKA PRÁCE

5.1 Experiment

V první části experimentu bylo pracováno na optimalizaci chemické fixace. Pro chemickou fixaci této části experimentu byly vyrobeny vzorky na Ústavu technologie potravin Fakulty technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně na zařízení Vorwerk Thermomix TM 31 (Vorwerk, Germany) se 40 % (w/w) sušiny a 40, 50 a 60 % (w/w) tuku v sušině (TVS). Tento typ zařízení pracuje s ohřevem prostřednictvím trnů ve spodní části (dnu) nádoby. Při výrobě byly jednotlivé suroviny (přírodní sýr, máslo, voda, tavicí soli) naváženy a nadávkovány do tavicího zařízení. Nejprve byl vložen přírodní sýr, ke kterému se po 1 minutě rozmělnění při 5 000 otáčkách za minutu přidaly ostatní ingredience. Vlastní tavicí proces probíhal do teploty 90 °C s výdrží jedné minuty. Poté byla tavenina nadávkována do plastových vaniček, které byly uzavřeny víčkem, zchlazeny na teplotu 6 ± 2 °C a při této udržovány. Po 14 dnech skladování při zmíněné teplotě byly z modelových tavených sýrů odebrány vzorky pro elektronovou mikroskopii a byly podrobeny chemické fixaci a následnému pozorování v mikroskopu Phenom pro G2 (Phenom World, Netherlands) na Ústavu fyziky a materiálového inženýrství Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. V průběhu první fáze experimentu byly optimalizovány jednotlivé kroky fixace a vysušení.

V druhé části experimentu byly vzorky modelových tavených sýrů vyráběny shodně s první částí experimentu na zařízení Vorwerk Thermomix TM 31 se 40 % (w/w) sušiny a 40, 50 a 60 % (w/w) TVS. Po 14 dnech skladování při 6 ± 2 °C byly vzorky podrobeny chemické fixaci a pozorovány v mikroskopu Vega II LMU (Tescan, Czech Republic) v Centru polymerních systémů Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně.

Ve třetí části experimentu byly vzorky tavených sýrů s obsahem 25 a 45 % (w/w) sušiny a 40 a 50 % (w/w) TVS (pro každý obsah sušiny oba obsahy TVS) vyráběny opět na Ústavu technologie potravin Fakulty technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Tentokrát na zařízení Stephan UMC 5 (Stephan Machinery GmbH, Hameln, Germany) s plášťovým ohřevem a za mírného podtlaku (tlak < 40 kPa). Po navážení a rozmělnění přírodního sýra byly do tavicího zařízení nadávkovány zbývající suroviny (máslo, voda, tavicí soli). Tavicí zařízení bylo uzavřeno a tavicí proces probíhal do teploty 86 °C s výdrží jedné minuty. Poté byla horká tavenina nalita do vaniček, uzavřena, vychlazena a skladována při 6 ± 2 °C po dobu 14 dní do provedení chemické analýzy (stanovení obsahu sušiny a měření pH), měření reologických vlastností a odběru vzorků pro elektronovou mikroskopii, která byla

prováděna na pracovišti Laboratoře elektronové mikroskopie Parazitologického ústavu pod Biologickým centrem AV ČR v Českých Budějovicích, kde byla prováděna klasická skenovací elektronová mikroskopie a kryo-skenovací elektronová mikroskopie pomocí mikroskopu Jeol JSM-7401F (Jeol, UK).

Při přípravě všech typů vzorků modelových tavených sýrů (z hlediska obsahu sušiny a tuku v sušině) chemickou cestou se měnily parametry fixace, odvodňování a sušení. Pomocí skalpelu nebo jiného vhodného laboratorního nářadí byl z taveného sýra odebrán vzorek velikosti cca 5 mm x 2 mm x 2 mm. Bylo důležité vzorek odebrat z vnitřní části hmoty sýra, nikoliv z povrchu, kde může být struktura narušena působením vzduchu apod. Všechny vzorky byly fixovány v 3% (v/v) roztoku glutaraldehydu v $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kakodylanovém pufru (připraven z 25% (v/v) vodného roztoku glutaraldehydu (Sigma-Aldrich, USA) a $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ vodného roztoku kakodylanu (Sigma-Aldrich, USA) s upraveným pH na hodnotu 5,8 odpovídající pH modelových vzorků) nejprve po dobu 24 hodin [6; 70], později již jen po dobu 16 hodin, jež byla pro fixaci vyhodnocena jako dostačující. pH bylo u kakodylanového pufru upravováno pomocí $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl. Po uplynutí doby primární fixace se od vzorku odstranil roztok glutaraldehydu a vzorek byl promyt $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ kakodylanovým pufrům o pH 5,8 třikrát po 15 minutách. Následně byly vzorky postfixovány v 2% (w/w) roztoku oxidu osmičelého (Sigma-Aldrich, USA) v kakodylanovém pufru, část vzorků po dobu 4 hodin [69] (A.1., značení v závorkách je shrnuto a schematicky uvedeno dále v metodice), zbytek 24 hodin [68] (A.2.). Po postfixaci tuku oxidem osmičelým byly vzorky opět promyty pufrům 3 krát po 15 minutách. Promyté fixované vzorky byly odvodněny pomocí roztoků etanolu (BC-Chemservis, Czech Republic) se zvyšující se koncentrací 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100% (v/v). V každém roztoku byl vzorek ponechán 15 minut. Vzorky ze 100% (v/v) etanolu byly zlomeny v tekutém dusíku. Polovina z těchto vzorků byla po odvodnění vložena na 15 minut do chloroformu (A.1.2., A.2.2.). Všechny vzorky se po odvodnění a po vymytí tuku chloroformem podrobily vysušení v přístroji pro sušení při kritickém bodu. Jelikož při přípravě vzorků A.2. došlo k poruše přístroje CPD (CPD2, Pelco, California), byla část těchto vzorků ponechána a vysušena na vzduchu (A.2.1.2.), část byla po dobu tří hodin do doby opravy přístroje CPD ve 100% (v/v) etanolu a poté vysušena pomocí metody kritického bodu oxidu uhličitého (A.2.1.1., A.2.2.1.). Z důvodu zjištění, zda by bylo možné uchovat vzorky přes noc v 70% (v/v) roztoku etanolu, aniž by došlo k jejich poškození, byla část vzorků fixovaných po dobu 4 hodin v roztoku oxidu osmičelého při odvodňování ponechána 17 hodin v 70% (v/v) roztoku

etanolu (A.1.1.2. a A.1.2.2.). Poté bylo dokončeno odvodnění koncentrační řadou etanolu až do 100% (v/v), u části z těchto vzorků byl aplikován chloroform a všechny vzorky byly vysušeny v zařízení CPD. Vzorky připravené chemickou metodou byly pokoveny zlatem v pokovovačce (Sputter Coater SCD 050, Bal-tec, Liechtenstein). Doba pokovení byla 98 s, což odpovídá tloušťce vrstvy cca 20 nm. Přehledný popis způsobu přípravy jednotlivých vzorků a měnících se parametrů přípravy je znázorněn v následujícím schématu.

A. Chemická fixace:

Všechny vzorky byly fixovány v 3% (v/v) roztoku GA po dobu 16 hodin

A.1. Postfixace v 2% (v/v) OsO₄ po dobu 4 hodin

A.1.1. Chloroform po odvodnění a zlomení vzorků neaplikován

A.1.1.1. Po odvodnění ihned vysušeny v CPD

A.1.1.2. Ponechány po dobu 17 hodin v 70% (v/v) etanolu, poté odvodněny a vysušeny v CPD

A.1.2. Vzorky po odvodnění a zlomení 15 minut v chloroformu

A.1.2.1. Po odvodnění (a aplikaci chloroformu) ihned vysušeny v CPD

A.1.2.2. Ponechány po dobu 17 hodin v 70% (v/v) etanolu, poté odvodněny a vysušeny v CPD

A.2. Postfixace v 2% (v/v) OsO₄ po dobu 24 hodin

A.2.1. Chloroform po odvodnění a zlomení vzorků neaplikován

A.2.1.1. Vzorky 3 hodiny ve 100% (v/v) etanolu, poté vysušeny v CPD

A.2.1.2. Vzorky po odvodnění ponechány k vysušení volně na vzduchu

A.2.2. Vzorky po odvodnění a zlomení 15 minut v chloroformu

A.2.2.1. Vzorky 3 hodiny ve 100% (v/v) etanolu, poté vysušeny v CPD

U přípravy fyzikální cestou se u jednotlivých vzorků měnily parametry sublimace a pokovení. Jednotlivé vzorky modelových tavených sýrů byly odebrány z balení podobně jako při chemické fixaci a naneseny na speciální držák pro zmrazení vzorků. Držák se vzorky byl přenesen do zařízení Alto Cryo 2500 (Gatan, UK), kde byly vzorky fixovány mrazem ponořením do ledové tříště vytvořené z kapalného dusíku. Poté byl vzorek přenesen a vložen do přípravné kryo-komory, připojené k elektronovému mikroskopu Jeol JSM-7401F, kde je udržováno vysoké vakuum a nízká teplota (- 135 °C). Zde byl vzorek zlomen pomocí připojeného skalpelu. Všechny vzorky modelových tavených sýrů byly připraveny

bez sublimace (B.1., schéma příprav je uvedeno dále v textu) a bez pokovení (B.1.1.) a posléze byly odebrány nové vzorky stejných modelových tavených sýrů, které rovněž nebyly sublimovány, ale byly pokoveny (B.1.2.) kombinací kovů paladia a platiny přímo v zařízení Alto Cryo 2500 a poté prohlíženy v mikroskopu při - 135 °C. Další vzorky vyrobených tavených sýrů byly podrobeny sublimaci. Sublimace byla nastavena na teplotu - 98 °C (B.2.), kdy po jejím dosažení následoval opětný pokles na - 135 °C. Další sublimace byla provedena při - 95 °C po dobu 3 minut (B.3.). Poté byla teplota vzorku opět snížena na prohlížečskou teplotu - 135 °C. V obou případech sublimace byly vzorky pokoveny palladiem a platinou. Přehled jednotlivých příprav vzorků pro kryo-elektronovou mikroskopii je přehledně uveden v následujícím schématu.

B. Fyzikální fixace:

B.1. Bez sublimace

B.1.1. Nepokovené

B.1.2. Pokovené paladiem/platinou

B.2. Sublimované mžikově při - 98 °C a ihned zpět na - 135 °C, pokovené paladiem/platinou

B.3. Sublimované při - 95 °C po dobu 3 minut, pokovené paladiem/ platinou

5.2 Chemická analýza tavených sýrů

Všechny vyrobené modelové vzorky tavených sýrů byly po 14 dnech skladování při teplotě 6 ± 2 °C podrobeny chemické analýze. Byl stanovován obsah celkové sušiny tavených sýrů a jejich hodnoty pH. Obsah celkové sušiny do konstantní hmotnosti byl stanoven dle ČSN ISO 5534 [51].

Hodnoty pH tavených sýrů byly měřeny vpichovým pH metrem (pHSpear, Eutech instruments, Oakton, Malaysia) při pokojové teplotě. U každého vzorku taveného sýru bylo měřeno pH šestkrát a výsledek byl uveden jako aritmetický průměr se směrodatnou odchylkou.

5.3 Reologické měření

Viskoelastické vlastnosti tavených sýrů byly stanovovány dynamickou oscilační reometrií. Viskoelastické vlastnosti výrobků byly charakterizovány pomocí rotačního viskozimetru HAAKE RheoStress 1 (Thermo Scientific, Czech Republic) v geometrii deska-deska (průměr desky 35 mm, štěrbina 1 mm). Vzorky byly měřeny při teplotě $20,0 \pm 0,1$ °C. Měření bylo prováděno v oscilačním režimu v oblasti lineární viskoelastivity (amplituda smykového napětí 20 Pa). Elastický modul pružnosti G' a ztrátový modul pružnosti G'' byly vyhodnocovány v rozsahu frekvencí 0,01 až 100,0 Hz. Každý vzorek byl měřen nejméně čtyřikrát.

Sledované vlivy na texturu tavených sýrů byly vyhodnocovány také pomocí komplexního modulu pružnosti G^* vypočteného podle vzorce [53; 54]:

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

Pro popis změn v texturních vlastnostech potravin je rovněž využíván tzv. Winterův model kritického gelu, který bývá formulován následujícím způsobem [55; 56]:

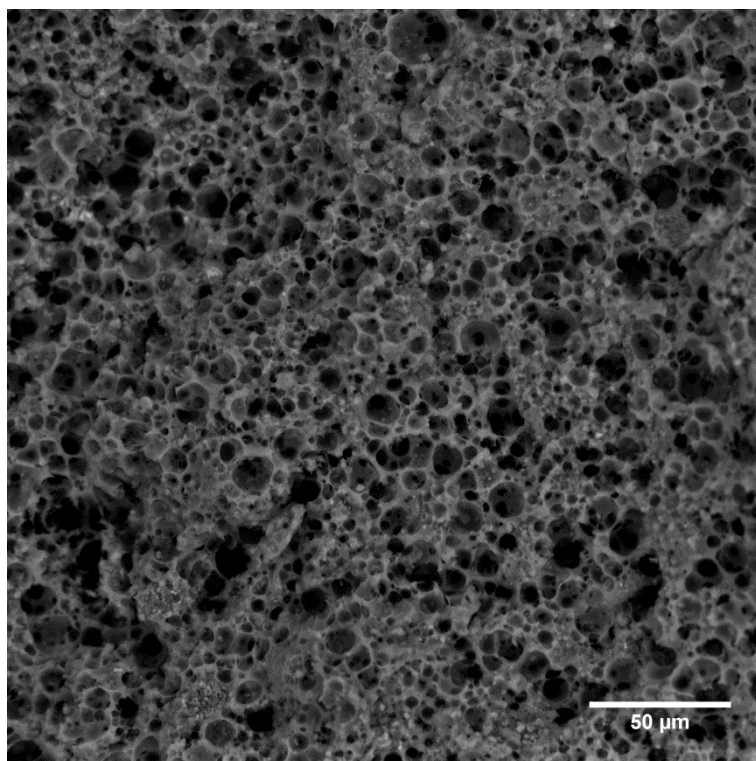
$$G^*(\omega) = A_F \omega^{1/z} \quad (3)$$

přičemž „ A_F “ je definováno jako pevnost gelu a „ z “ vyjadřuje počet strukturních jednotek vzájemně interagujících v trojrozměrné matici (anglicky „*interaction factor*“). Hodnoty A_F a z byly získány pomocí metody nejmenších čtverců v programu Microsoft® Office Excel (Microsoft Corporation, USA). Výsledky byly statisticky srovnány Wilcoxonovým testem na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ [57].

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Výsledky první části experimentu

V první části experimentu byly modelové vzorky tavených sýrů připravovány pouze chemickou cestou, základní postup chemické fixace byl zvolen dle Kalába [68]. V této části bylo cílem zjistit, zda došlo k dostatečnému vysušení vzorku. Byl tedy optimalizován postup sušení ke kritickému bodu na přístroji Leica EM CPD300 (Leica Mikrosysteme GmbH, Austria) na Ústavu technologie potravin Fakulty technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Zkoumány byly vlivy jednotlivých parametrů přístroje, především rychlosti výměny média v komoře přístroje a počet cyklů pro řádné nahrazení organického rozpouštědla (alkoholu) kapalným CO₂. Na základě pozorování v mikroskopu typu Phenom pro G2 (stolní rastrovací elektronový mikroskop, jehož výhodou je snadná obsluha v kombinaci s rychlostí prohlížení vzorků) se dalo říci, že vzorky připravené chemickou cestou byly vysušeny dostatečně a bylo tedy možno přistoupit k prohlížení preparátů v mikroskopech, které pracují za vysokého vakua a vyžadují dokonale vysušené vzorky, neboť v případě prohlížení vlhkých vzorků by mohlo dojít k poškození mikroskopu. V tomto typu mikroskopu byly vzorky pozorovány při maximálním zvětšení 5 000 krát (zvětšení tohoto mikroskopu dosahuje 100 000 krát), což by teoreticky pro vyhodnocení základní mikrostruktury tavených sýrů bylo dostačující, nicméně vzhledem k rozlišení 17 nm, které tento mikroskop umožňuje, nebylo možno pozorovat některé detaily [39]. Přestože tento mikroskop poskytuje možnost použití urychlovacího napětí 5, 10 a 15 kV, byly vzorky pozorovány pouze při 5 kV a 10 kV. Vyšší napětí (15 kV), které mikroskop Phenom pro G2 umožňuje, nebylo v naší práci využíváno, jelikož při vyšším napětí by docházelo k poškození pozorovaného vzorku nabíjením a následným roztékáním jeho struktury [35]. Je ovšem potřeba poznamenat, že prohlížené vzorky nebyly pokovené. Z výsledků první části experimentu vyplynulo, že vzorky byly dostatečně odvodněné a vysušené a bylo možno pokračovat ve studiu mikrostruktury s využitím jiného typu mikroskopu, který by poskytoval vyšší rozlišení i zvětšení. Ukázka snímku pořízeného v tomto mikroskopu při zvětšení 1 000 krát za použití detektoru zpětně odražených elektronů je zobrazena na Obr. č. 12.

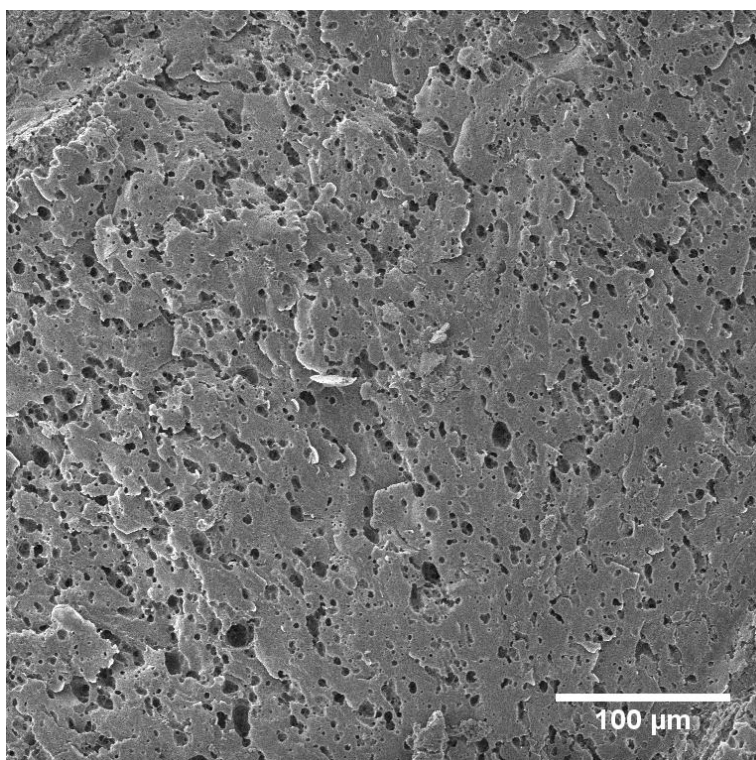


Obr. č. 12 Snímek chemicky fixovaného modelového vzorku taveného sýra se 40 % (w/w) sušinou a 60 % (w/w) TVS z mikroskopu typu Phenom pro G2, zvětšení 1 000 krát.

6.2 Výsledky druhé části experimentu

V druhé části experimentu se pracovalo na skenovacím elektronovém mikroskopu Vega II LMU, který je umístěn v Centru polymerních systémů Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Tento mikroskop teoreticky poskytuje zvětšení až 1 000 000 krát, rozlišení až 2,5 nm, pracuje s urychlovacím napětím v rozmezí hodnot 3 - 30 kV [40; 50]. Přes výše uvedené parametry přístroje (poskytující větší zvětšení i rozlišení, než dříve použitý mikroskop Phenom pro G2) se nepodařilo na tomto typu mikroskopu získat kvalitní snímky. Vzorky v tomto mikroskopu nebyly stabilní, a i přes pokovení docházelo při rastrování vzorku svazkem elektronů k rozsáhlým nabíjecím efektům a roztékání vzorku. Pro snížení nabíjecích efektů by bylo potřeba snížit urychlovací napětí, což s sebou nese negativum v podobě nižší rozlišovací schopnosti. Se zvyšujícím se urychlovacím napětím a prohlížecí vzdáleností totiž roste rozlišovací schopnost mikroskopu [6]. Maximální zvětšení při prohlížení bylo 10 000 krát, což by v případě kvalitních mikrofotografií bylo dostačující. Avšak kvůli výše zmíněným skutečnostem nebyly mikrofotografie při tomto zvětšení použitelné

pro publikaci. Snímky byly získávány při použití detektoru odražených elektronů a také v režimu zachycování signálu sekundárních elektronů. Snímek pořízený mikroskopem Vega II je na Obr. č. 13, kde je zobrazen lom vzorku taveného sýra při zvětšení 500 krát při použití detektoru sekundárních elektronů. Na snímku je viditelná hladká lomná plocha taveného sýra, po zlomení v tekutém dusíku fixovaného a odvodněného vzorku a po odstranění tuku chloroformem.



Obr. č. 13 *Snímek chemicky fixovaného modelového vzorku taveného sýra se 40 % (w/w) sušinou a 50 % (w/w) TVS z mikroskopu typu VEGA II LMU, zvětšení 500 krát.*

Z výsledků první a druhé části experimentu vyplynulo, že na Univerzitě Tomáše Bati ve Zlíně nebylo v době zpracování diplomové práce k prohlížení vzorků tavených sýrů potřebné vybavení s dostatečnými parametry (požadované zvětšení a rozlišení), pomocí nichž by bylo možno získat kvalitní snímky mikrostruktury tavených sýrů. Proto byla ve třetí části experimentu zahájena spolupráce s pracovištěm Laboratoře elektronové mikroskopie Parazitologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích, kde bylo pracováno

na skenovacím elektronovém mikroskopu JEOL JSM-7401F, který má zvětšení od 25 krát do 1 000 000 krát, rozlišení až 0,8 nm. Pracuje při napětí od 0,7 do 30 kV [41].

6.3 Výsledky třetí části experimentu

Ve třetí části experimentu byly vzorky tavených sýrů vyrobeny s rozdílnými obsahy sušiny a tuku v sušině. Utaveny byly modelové vzorky s obsahem 35 % (w/w) sušiny a 40 a 50 % (w/w) TVS a dále vzorky tavených sýrů obsahujících 45 % (w/w) sušiny a 40 a 50 % (w/w) TVS. Tedy pro každý obsah sušiny oba obsahy tuku v sušině. Tento postup byl zvolen, aby bylo možno lépe pozorovat a rozlišit faktory mající vliv na strukturu tavených sýrů a také z důvodu porovnání mikrostruktury jednotlivých vzorků s ohledem na jejich konzistenci a viskoelastické vlastnosti. Vzorky byly po výrobě skladovány při teplotě $6 \pm 2^\circ\text{C}$ po dobu 14 dní než byly podrobeny jednotlivých analýzám, tedy stanovení pH, obsahu sušiny, elektronové mikroskopii a reologickému měření. Pro elektronovou mikroskopii byly vzorky připravovány chemickou i fyzikální cestou se změnami vybraných parametrů, tak jak je ukazují schémata A a B v kapitole 5.1.

6.3.1 Chemická analýza

Naměřené hodnoty pH modelových vzorků tavených sýrů a celkový obsah sušiny stanovený dle ČSN ISO 5534 jsou pro všechny druhy vyrobených modelových vzorků tavených sýrů uvedeny v podobě aritmetického průměru a směrodatné odchylky v Tab. č. 1.

Tab. č. 1 *Naměřené hodnoty pH a celkové sušiny modelových vzorků tavených sýrů.*

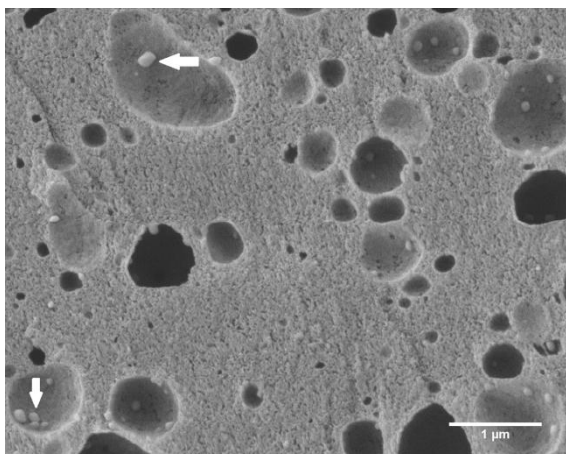
Obsah sušiny (% (w/w))	Obsah tuku v sušině (% (w/w))	pH vzorku (aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka)	Celková sušina (aritmetický průměr \pm směrodatná odchylka) [%]
35	40	$5,77 \pm 0,05$	$36,8 \pm 0,03$
35	50	$6,05 \pm 0,03$	$36,09 \pm 0,02$
45	40	$5,71 \pm 0,05$	$46,16 \pm 0,03$
45	50	$5,97 \pm 0,03$	$44,21 \pm 0,01$

6.3.2 Chemická fixace

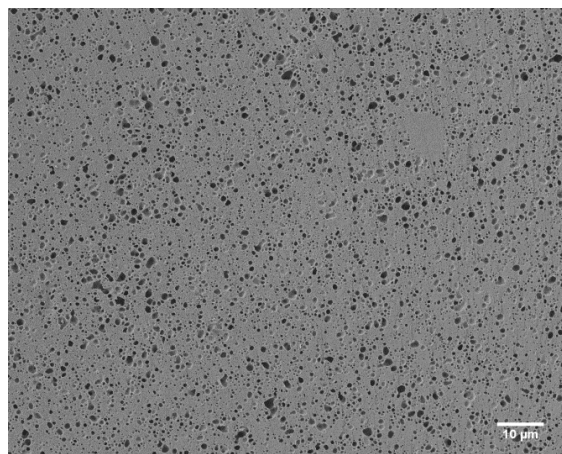
V literatuře je popisována primární fixace proteinové matrice pomocí roztoků glutaraldehydu v koncentracích 2,4 - 3,0% (v/v) v délce trvání od 16 do 24 hodin [6; 66; 70]. V této diplomové práci bylo zjištěno, že proteinová matrice ve struktuře taveného sýra byla dosta-

tečně fixována 3% (v/v) glutaraldehydem za 16 hodin. Vzhledem k zachování 16 hodinové fixace 3% (v/v) GA již nebude dále tento parametr zmiňován. Budou uváděny jen měnící se parametry po primární fixaci, tedy postfixace oxidem osmičelým a odvodňování, resp. sušení.

Před vyhodnocováním snímků je nutné vzít do úvahy fakt, že některé artefakty a poškození struktury nemusí být při malém zvětšení (1 000 krát a méně) snímku patrné. Proto je vhodné získat a vyhodnocovat snímky s vyšším zvětšením. Příkladem mohou být následující snímky ze skenovacího elektronového mikroskopu JEOL JSM-7401F (viz Obr. č. 14 a 15), kde jsou zobrazeny snímky vzorků se 45 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS, které byly postfixovány 4 h v roztoku OsO₄, odvodněny v rostoucí koncentrační řadě etanolu, zlomeny v tekutém dusíku, vymyty chloroformem a před vysušením v CPD ponechány po dobu 17 hodin v 70 % etanolu (A.1.2.2.). Na snímku získaném při zvětšení 20 000 krát (viz Obr. č. 14) jsou v prostorech vzniklých po tukových kuličkách viditelné artefakty v podobě částic zbytkového tuku (označené šipkami), který nebyl chloroformem odstraněn. Obdobné artefakty popsal ve své práci také Kaláb [35]. Pořídí-li se mikrofotografie na stejném místě mikroskopického preparátu při nižším zvětšení (např. 1 000 krát, viz Obr. č. 15), nelze již tento jev na snímcích pozorovat právě z důvodu nedostatečného zvětšení.



Obr. č. 14 Snímek vzorku taveného sýra se 45 % (w/w) sušinou a 50% (w/w) TVS, 17 hodin v 70% (v/v) etanolu, zvětšení 20 000 krát.

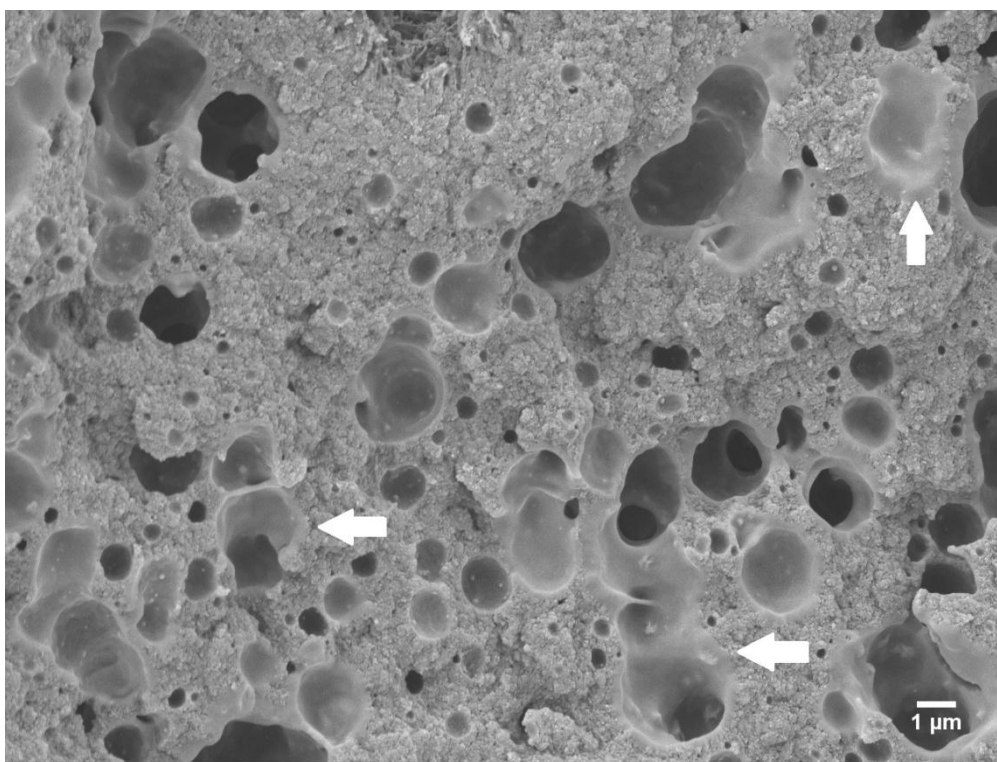


Obr. č. 15 Snímek vzorku taveného sýra se 45 % (w/w) sušinou a 50% (w/w) TVS, 17 hodin v 70% (v/v) etanolu, zvětšení 1 000 krát.

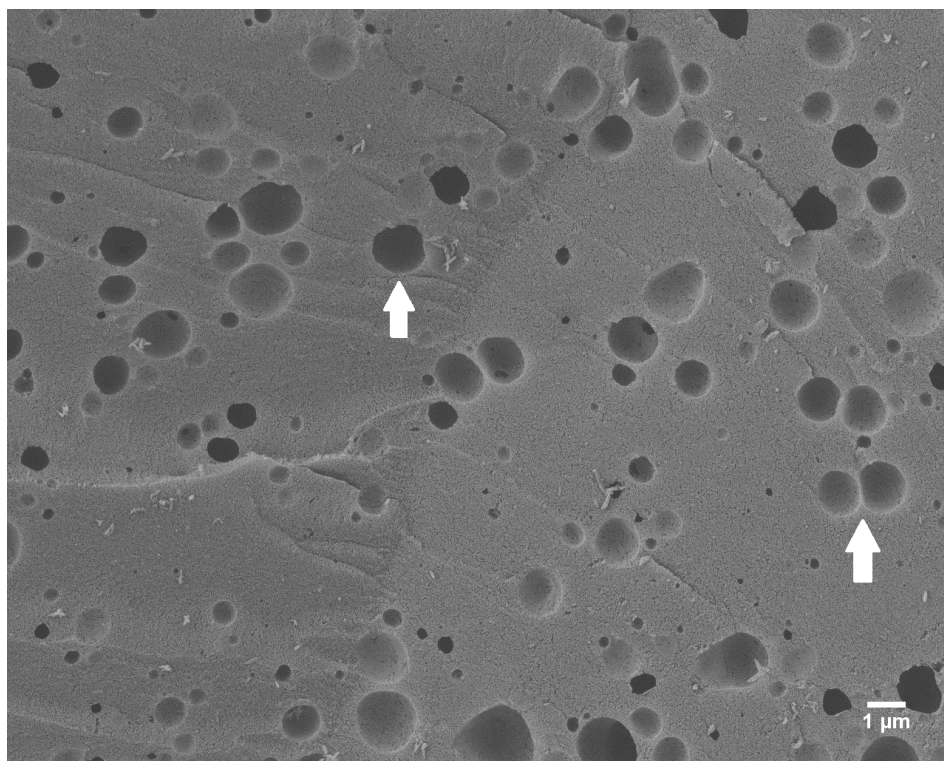
Nejprve budou popsány vzorky postfixované 4 hodiny v oxidu osmičelém (A.1.) s následnými variantami v odvodňování, resp. sušení vzorků. Při prohlížení vzorků postfixovaných 4 hodiny v oxidu osmičelém (A.1.) bylo zjištěno, že tukové kuličky nejsou dostatečně fixovány, a že většina tuku byla rozpuštěna. Rozsah změn tuku byl výraznější u vzorků s vyšším obsahem tuku v sušině. Pravděpodobně to bylo způsobeno tím, že oxid osmičelý je schopen fixovat pouze nenasycené mastné kyseliny v tucích [43]. Mléčný tuk však obsahuje přibližně 60 % nasycených mastných kyselin a nemůže být oxidem osmičelým dostatečně fixován [42]. Dalším faktorem může být v tomto případě nedostatečná doba setrvání vzorků v postfixačním činidle a tedy nedostatečné prosycení fixovaného vzorku. Tukové kuličky byly tedy vyplaveny organickými rozpouštědly při odvodňování či oxidem uhličitým při sušení při kritickém bodu [35]. U vzorků s vyšším obsahem sušiny a tedy s více proteiny ve studované matici, které se spolupodílejí na tvorbě obalů tukových kuliček, zůstaly v proteinové matici po přípravě vzorků zbytky obalů tukových kuliček (viz Obr. č. 19 a 20). O souvislosti obsahu sušiny, proteinů a tuku v sušině detailněji hovoří kapitola 5.4. Viskoelastické vlastnosti modelových tavených sýrů. Odstraněním tuku ze vzorku se změní jeho původní struktura, jelikož po tukových kuličkách zůstanou v proteinové matici prázdná místa [35]. Stabilní fixace mléčného tuku v taveném sýru může být dosažena použitím oxidu osmičelého v imidazolovém pufru, což prokázal Kaláb et al. při fixaci tukových kuliček v jogurtu [43]. Tato informace může sloužit jako

doporučení pro další zkoumání a optimalizaci chemické fixace tavených sýrů pro skenovací elektronovou mikroskopii.

Chloroform se při přípravě vzorků pro elektronovou mikroskopii aplikuje kvůli vyplavení nefixovaného tuku [2; 35]. Vzhledem k neschopnosti oxidu osmičelého dostatečně tuk v našich vzorcích zafixovat, byl tento většinou vyplaven organickými rozpouštědly během odvodnění. Mezi strukturou většiny vzorků připravených bez a s aplikací chloroformu není tedy na první pohled viditelný rozdíl, avšak u vzorků s nižší sušinou a vyšším obsahem tuku v sušině (35 % (w/w) v sušině a 50 % (w/w) TVS) je možné určité rozdíly vidět. U vzorků, které nebyly ponořeny do chloroformu (A.1.1., A.2.1.) zůstal v některých místech po tukových kuličkách rozteklý tuk (viz šipky na Obr. č. 16), který nebyl dostatečně fixován oxidem osmičelým [43]. Ve vzorcích ponořených po fixaci a odvodnění na 15 minut do chloroformu (A.1.2., A.2.2.) byla většina nefixovaného tuku chloroformem vyplavena (viz Obr. č. 17, bílé šipky).



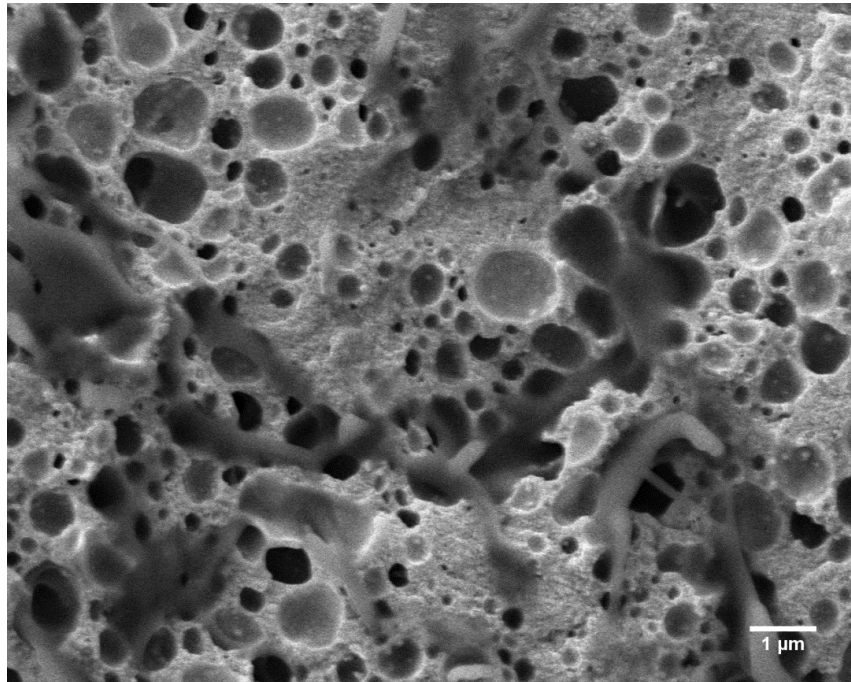
Obr. č. 16 Snímek vzorku taveného sýra s 35 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS, 4 h v OsO_4 , bez chloroformu, sušen v CPD, zvětšení 5 000 krát.



Obr. č. 17 Snímek vzorku taveného sýra s 45 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS, 4 h v OsO_4 , s chloroformem, sušen v CPD, zvětšení 5 000 krát.

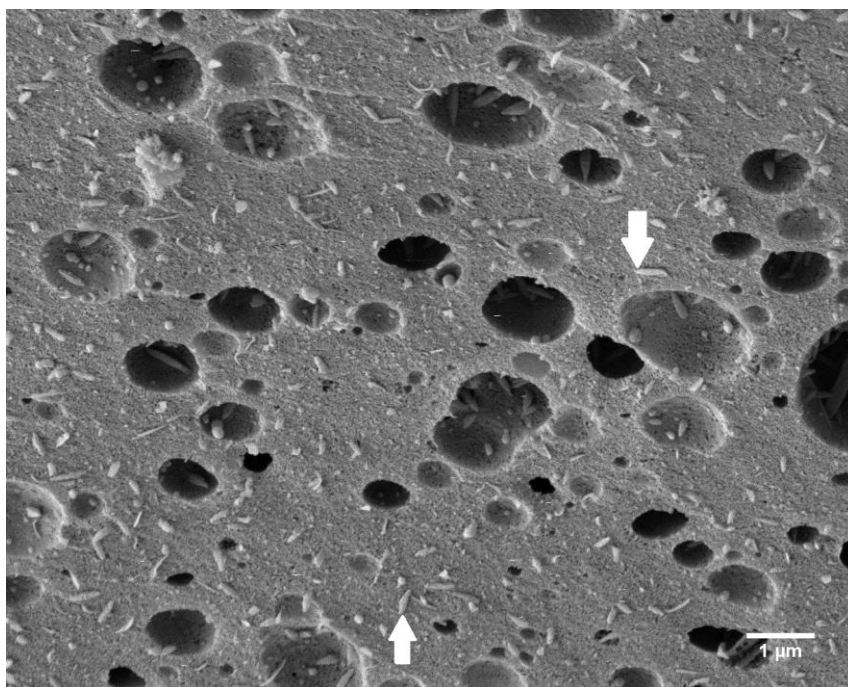
Zároveň s předchozím postupem byla část vzorků po fixaci a postfixaci v průběhu odvodňování ponechána přes noc v 70% (v/v) etanolu (A.1.1.2., A.1.2.2.). Tento postup je možný a relativně často využívaný (s ohledem na časovou náročnost chemické přípravy vzorků) u biologických vzorků, vzhledem k již zafixovaným buněčným strukturám [6]. Modelové vzorky obsahovaly vysoký podíl tuku, který byl během dlouhodobého setrvání v organickém rozpouštědle rozpuštěn, a tím byla narušena přirozená struktura matrice. Chloroformem (A.1.1.2.) byl tuk z proteinové matrice vymyt. U vzorků s vyšším obsahem tuku v sušině (50 % (w/w)) zůstaly v prázdných prostorech po tukových kuličkách zbytky v podobě malých částic tuku (viz Obr. č. 14, označení šipkami). Tento typ artefaktu popisuje ve své práci i M. Kaláb [35]. U vzorků, které nebyly ponořeny do chloroformu (A.1.2.2.), byl tuk rozteklý po celém objemu hmoty taveného sýra (viz Obr. č. 18). Obrázky č. 14 i 18 obsahují stejné procento sušiny 45 % (w/w) a tuku v sušině 50 % (w/w), aby byl lépe postřehnutelný rozdíl po dlouhodobé aplikaci 70% v/v etanolu. Po ní se tuk již nenachází ani v původních místech proteinové matrice, ale je rozptýlen nerovnoměrně v celé hmotě vzorku. Z uvedených mikrofotografií vyplývá doporučení neuchovávat vzorky tavených sýrů v průběhu chemické fixace v 70% (v/v) alkoholu, případně acetonu, ale

raději ve fixačním činidle GA nebo OsO_4 . Dalším podnětem pro následné experimenty by mohlo být zjištění vlivu uchování vzorku v roztoku pufru po fixaci oxidem osmičelým, neboť toto se rovněž v některých laboratorních zpracovávajících biologické vzorky provádí.

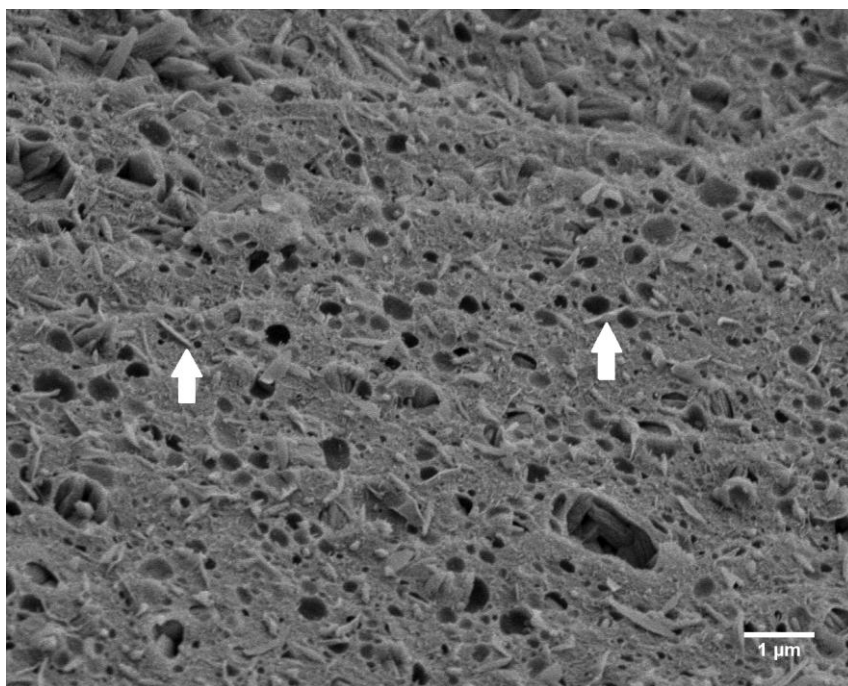


Obr. č. 18 Snímek vzorku taveného sýra s 45 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS, bez chloroformu, 17 hodin v 70% (v/v) etanolu, zvětšení 10 000 krát.

Ve struktuře vzorků tavených sýrů s nižším obsahem tuku v sušině (40 % (w/w)), jejichž tuk byl vymyt chloroformem (A.1.2.1.), jsou při vyšším zvětšení (10 000 krát) viditelné pravděpodobně zbytky obalů tukových kuliček (viz Obr. č. 19 a 20, bílé šipky). Tento jev se dá vysvětlit obsahem proteinů a tuku, jejichž poměr je u těchto vzorků 1:0,8 (viz kapitola 5.4.). Vyskytuje se zde nadbytek proteinů, které mohou lépe stabilizovat tukové kuličky v matici taveného sýra. Na snímku vzorku s vyšším obsahem sušiny (45 % (w/w), Obr. č. 20) je v porovnání se vzorkem s 35 % (w/w) obsahem sušiny (Obr. č. 19) viditelné větší množství těchto zbytků obalů (bílá šipky) v důsledku vyššího obsahu proteinů.

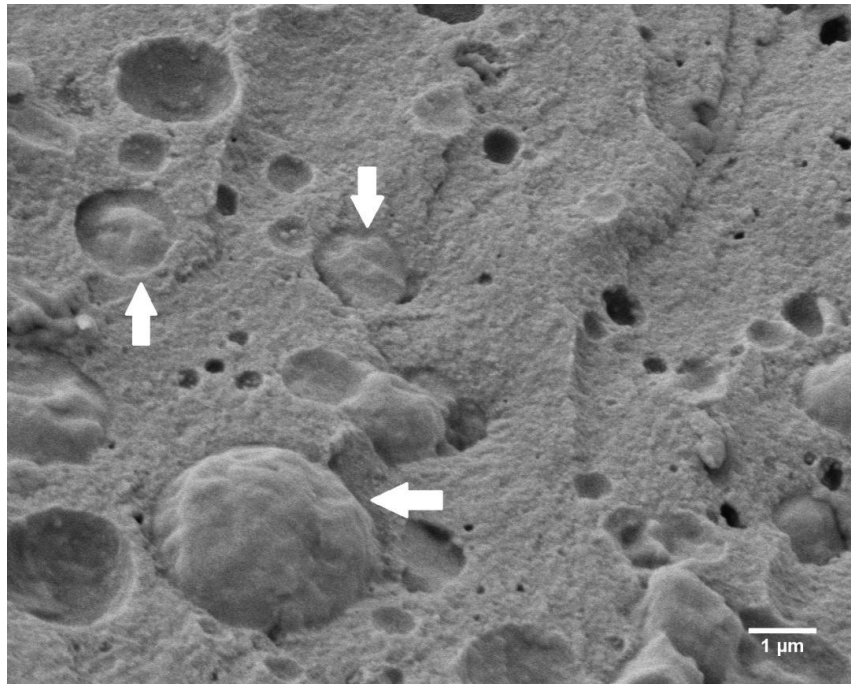


Obr. č. 19 Snímek vzorku taveného sýra s 35 % (w/w) sušiny a 40 % (w/w) TVS, v chloroformu, 17 hodin v 70% (v/v) etanolu, zvětšení 10 000 krát.

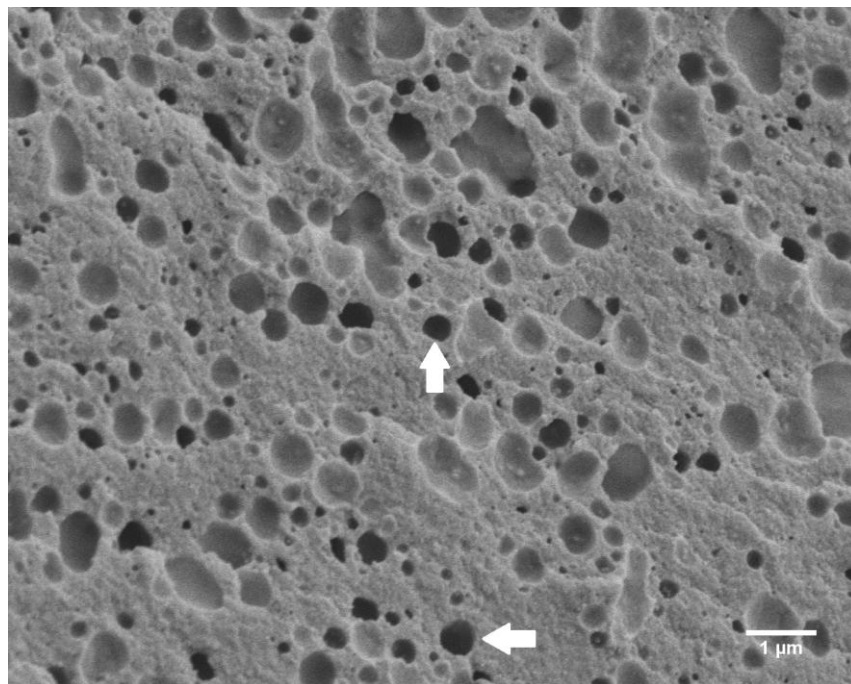


Obr. č. 20 Snímek vzorku taveného sýra s 45 % (w/w) sušiny a 40 % (w/w) TVS, v chloroformu, 17 hodin v 70% (v/v) etanolu, zvětšení 10 000 krát.

V další části experimentu byly vzorky z důvodu nedostatečné 4 hodinové fixace v oxidu osmičelém postfixovány 24 hodin (A.2.). V průběhu přípravy vzorků však došlo k poškození CPD a tak byl postup mírně modifikován a vzorky byly rozděleny a část nechána sušit 24 hodin na vzduchu a část ponechána 3 hodiny (do opravy CPD) ve 100% (v/v) etanolu (A.2.1.1. a A.2.2.1.). Na snímcích vzorků postfixovaných v oxidu osmičelém 24 hodin (A.2.1.2.) a sušených 24 hodin na vzduchu je patrné poškození struktury zejména na povrchu vzorku. Deformace tukových kuliček je dobře viditelná zejména u vzorků s nižším obsahem sušiny a vyšším obsahem tuku v sušině (35 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS, Obr. č. 21, označení šipkami). Z uvedeného vyplývá, že po 24 hodinové postfixaci oxidem osmičelým při teplotě 4 °C došlo u vzorků tavených sýrů s obsahem 35 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) tuku v sušině k fixaci tukových kuliček, které byl následným sušením na vzduchu deformovány. Avšak u vzorků s vyšším obsahem sušiny (45 % (w/w) sušiny a 40 a 50 % (w/w) TVS) tukové kuličky fixovány nebyly a byly z proteinové matrice vyplaveny (viz Obr. č. 22, prázdná místa po tukových kuličkách označeny bílými šipkami). Toto se dá vysvětlit jednak neschopností oxidu osmičelého fixovat nasycené mastné kyseliny a také vyšší hustotou proteinové matrice taveného sýra s vyšším obsahem sušiny, která zhoršuje prostupnost fixačního činidla do vzorku.

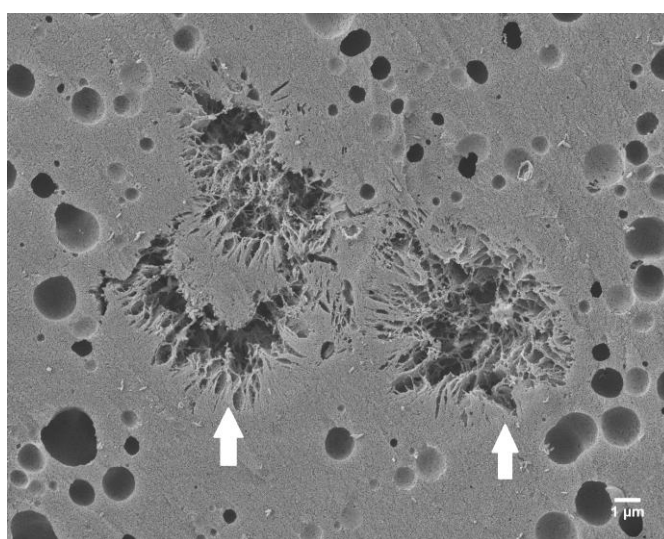


Obr. č. 21 Snímek vzorku taveného sýra s 35 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS, 24 h v OsO_4 , bez chloroformu, vysušeny na vzduchu, zvětšení 10 000 krát.



Obr. č. 22 Snímek vzorku taveného sýra s 45 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS, 24 h v OsO_4 , bez chloroformu, vysušeny na vzduchu, zvětšení 10 000 krát.

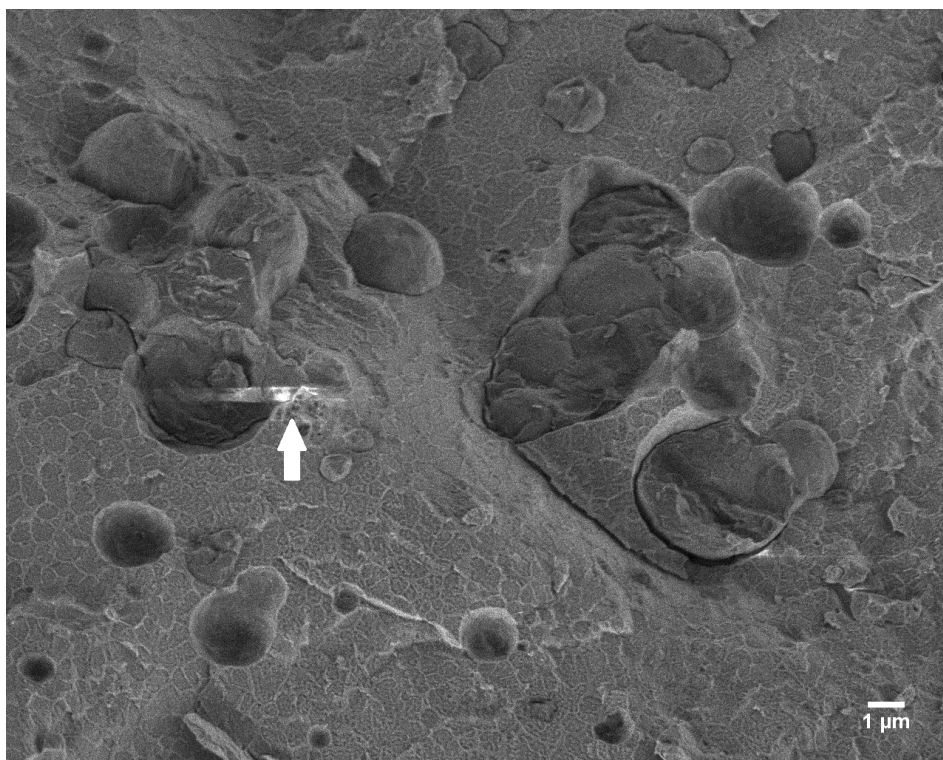
Při zaměření na velikost tukových kuliček v závislosti na obsahu sušiny a tuku v sušině, lze ze snímků (viz Obr. č. 37 - 40) vyvodit následující závěry. Tavený sýr s nižším obsahem sušiny (např. 35 % (w/w) sušiny a 50% (w/w) TVS, viz Obr. č. 38) má větší tukové kuličky než tavený sýr s vyšším obsahem sušiny a stejným obsahem tuku v sušině (např. 45 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS, viz Obr. č. 40). Dle velikosti tukových kuliček lze sestupně seřadit vzorky tavených sýrů následovně: Největší kuličky tuku obsahuje tavený sýr 35 % (w/w) v sušině a 50 % (w/w) TVS, následují sýry 35 % (w/w) v sušině a 40 % (w/w) TVS, 45 % (w/w) v sušině a 50 % (w/w) TVS a nejmenší kuličky má sýr 45 % (w/w) v sušině a 40% (w/w) TVS. Velikost tukových kuliček souvisí s intenzitou namáhání hmoty během výroby taveného sýra. Tavenina s nižším obsahem vody (s vyšším obsahem sušiny) má vyšší viskozitu a proto je nutné použít při míchání a výrobním procesu větší výkon [1]. Čím více je tavenina namáhána, tím se velikost tukových kuliček zmenšuje. Podobný vztah platí i pro obsah tuku v sušině. Tavený sýr s vyšším obsahem tuku a stejným obsahem sušiny je méně viskózní, protože obsahuje větší tukové kuličky [1; 52]. Tyto výsledky jsou podpořeny a korelují se zjištěním reologického měření modelových vzorků tavených sýrů, jehož vyhodnocení je uvedeno v kapitole 5. 4., kde jsou přiloženy i snímky jednotlivých druhů sýrů dle obsahu sušiny a tuku v sušině. V některých vzorcích byly viditelné krystaly nerozpuštěných tavicích solí [25] (viz Obrázek č. 23, krystaly tavicích solí označeny šipkou).



Obr. č. 23 Snímek vzorku taveného sýra s 45 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS, 4 h v OsO_4 , s chloroformem, zvětšení 5 000 krát.

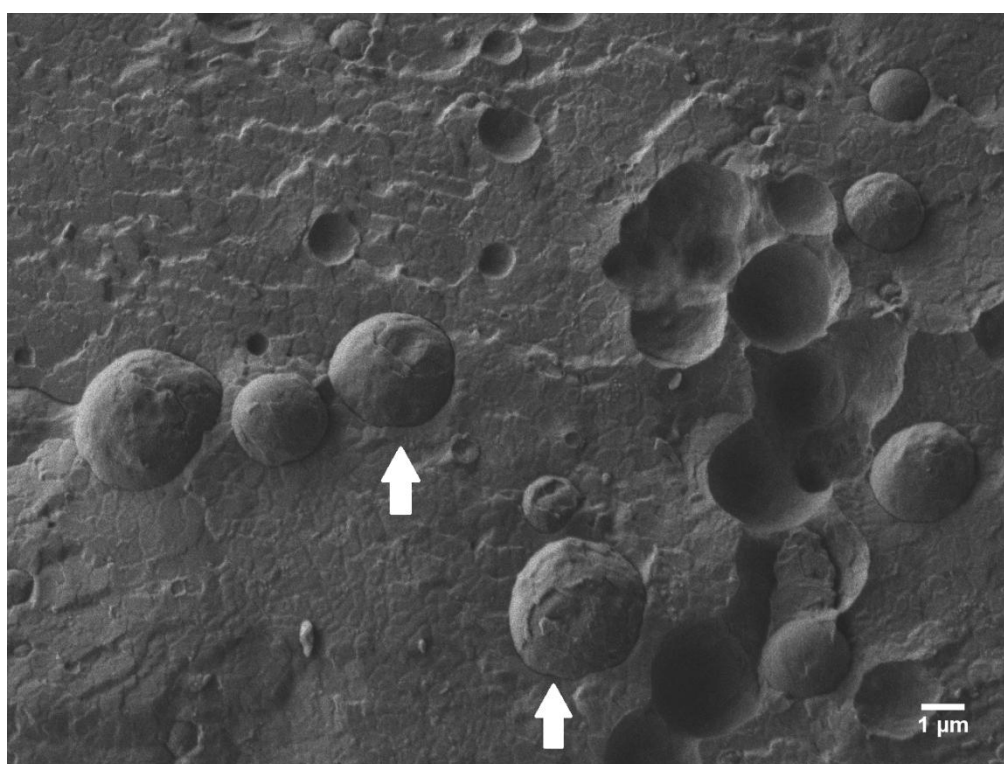
6.3.3 Fyzikální fixace

Vzorky, jež byly připraveny mrazovou metodou, byly pozorovány nepokovené i pokovené. Nepokovené vzorky (B.1.1.) se při prohlížení rychle nabíjely, jelikož nebyly vodivé (v průběhu prohlížení nebyl dostatečně odváděn náboj vznikající na povrchu vzorku). Při nabíjení vzorku vznikaly artefakty (světlé místa, viz Obr. č. 24, označení šipkou), které způsobilo vypálení vzorku proudem elektronů [35]. Tyto artefakty vznikají při pozorování poměrně často a někteří autoři je ve svých pracích uvádějí (např. Han et al. [71]). Z výše uvedeného lze v obecnější rovině konstatovat závěr, že je vhodné mrazově připravené vzorky před pozorováním v elektronovém mikroskopu v kryo-režimu pokovit, ale je nutné najít vhodnou vrstvu nanášeného kovu s ohledem na možné zakrytí detailů struktury [8]. Dále je nutno myslet na skutečnost, že i při pokovování mohou vzniknout jisté artefakty [35]. Jako důkaz je přiložen Obr. č. 26, kde jsou viditelné artefakty ve formě cizích částic (viz bílé šipky), které ulpěly na povrchu vzorku při pokovení, zřejmě v důsledku znečištění pokovovacího zařízení.



Obr. č. 24 Snímek vzorku taveného sýra se 35 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS, fyzikálně fixován, bez sublimace, nepokoven, zvětšení 5 000 krát.

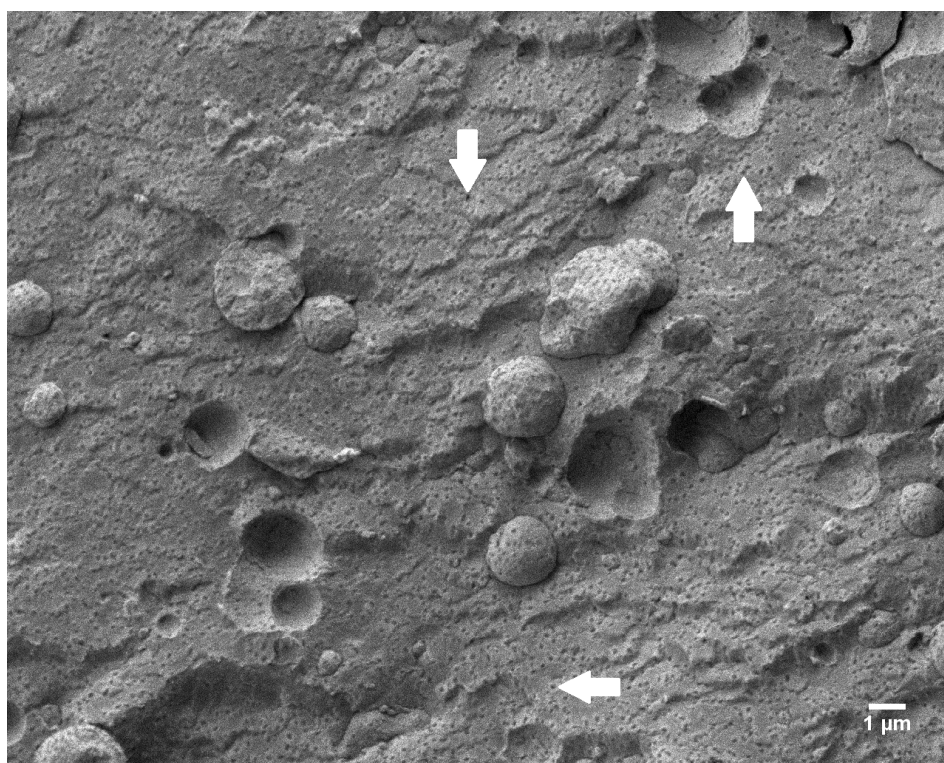
Z našeho pozorování je ale také možno říci, že po nanesení vrstvy kovu nebyla pozorována změna struktury tavených sýrů, a že z hlediska efektu nabíjení závisí na době prohlížení, resp. setrvání preparátu v proudu elektronů. Pokud se tedy vzorky prohlédly dostatečně rychle (avšak kvalitně), nedocházelo při nižších zvětšeních (někdy ani při větších zvětšeních) k nabíjecím efektům. Proto bychom pro další zkoumání struktury doporučili prohlížet vzorky v kryo-režimu i nepokovené (viz Obr. č. 25). Na Obr. č. 25 jsou hezky viditelné tukové kuličky v matrici taveného sýra (viz bílé šipky).



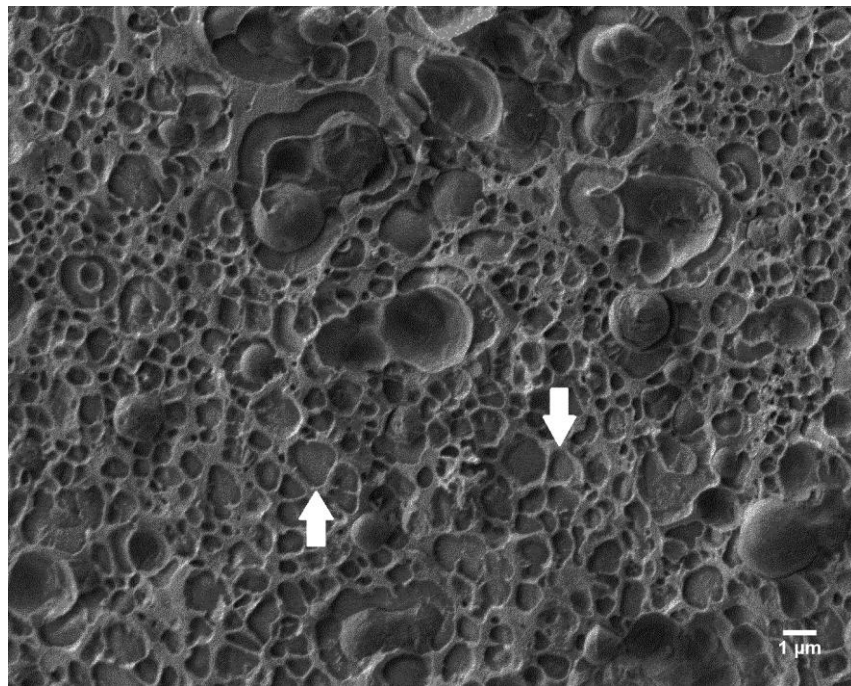
Obr. č. 25 Snímek vzorku taveného sýra se 35 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS, bez sublimace, nepokoven, zvětšení 5 000 krát.

Kromě pokovení byl také sledován faktor sublimace. Při používané metodě fyzikální fixace vzorku dochází především na jeho povrchu ke vzniku artefaktů v podobě krystalů ledu, které se však mohou tvořit (dle typu vzorku) v celé jeho hmotě. Tyto jevy je třeba při prohlížení eliminovat, k čemuž se využívá metoda sublimace [6]. Vzorky byly pozorovány bez předchozí sublimace (B.1., viz Obr. č. 25 a 26), po sublimaci na $-98\text{ }^{\circ}\text{C}$, po jejímž dosažení následovalo okamžité snížení teploty na $-135\text{ }^{\circ}\text{C}$ (B.2., viz Obr. č. 27 a 28) a po sublimaci při $-95\text{ }^{\circ}\text{C}$ s dobou trvání 3 minuty (B.3., viz Obr. č. 29 a 30).

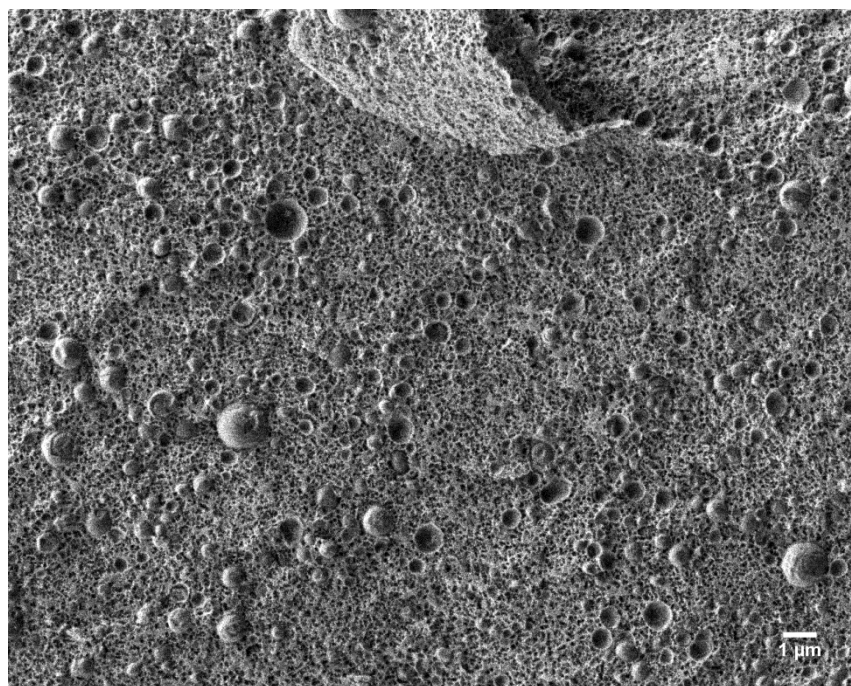
Ze získaných snímků lze vypožorovat, jaký má sublimace vliv na odpaření vody z povrchu vzorků. U vzorků, které nebyly podrobeny sublimaci, nebylo na začátku prohlížení viditelné sublimační poškození (viz Obr. č 25 a 26). S ohledem na skutečnost, že modelové vzorky obsahovaly 35 a 45 % (w/w) sušiny, resp. 65 % (w/w) a 55 % (w/w) vody, došlo i po mírné sublimaci při - 98 °C a zpět na teplotu prohlížení - 135 °C k poškození struktury vzorku taveného sýra. Při tomto sublimačním režimu začínalo být poškození proteinové matrice již poměrně výrazně viditelné. Na Obr. č. 27 a 28 jsou uvedeny snímky tavených sýrů s obsahem 35 % (w/w), resp. 45 % (w/w) sušiny se stejným obsahem tuku v sušině 40 % (w/w). Z obrázků je viditelné výraznější poškození u vzorků s nižším obsahem sušiny (Obr. 27, bílé šipky značí poškození), kde výrazněji vystupovaly krysty proteinové matrice, mezi kterými se objevovaly „prohlubně“, tedy pravděpodobně místa po sublimaci vody, které bylo v tomto vzorku více než ve vzorku s 45 % (w/w) sušiny (viz Obr. 28).



Obr. č. 26 Snímek vzorku taveného sýra s 35 % (w/w) sušiny a 40 % (w/w) TVS, fyzikálně fixován, pokoven, bez sublimace, zvětšení 5 000 krát.

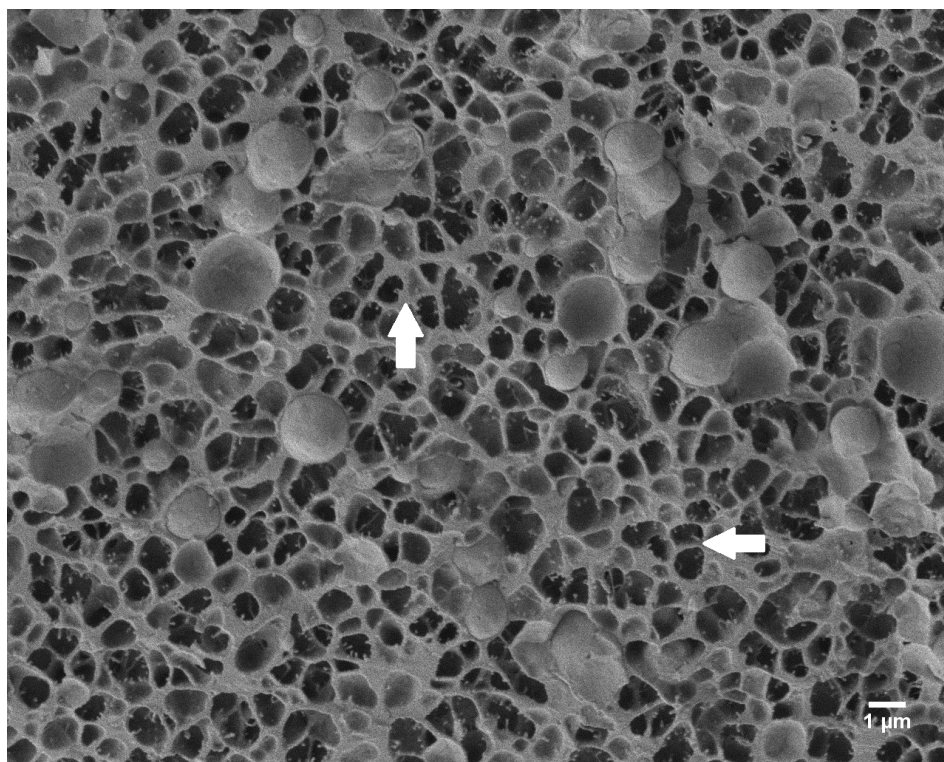


Obr. č. 27 Snímek vzorku taveného sýra s 35 % (w/w) sušiny a 40 % (w/w) TVS, fyzikálně fixován, pokoven, sublimován při - 98 °C a ihned zpět, zvětšení 5 000 krát.

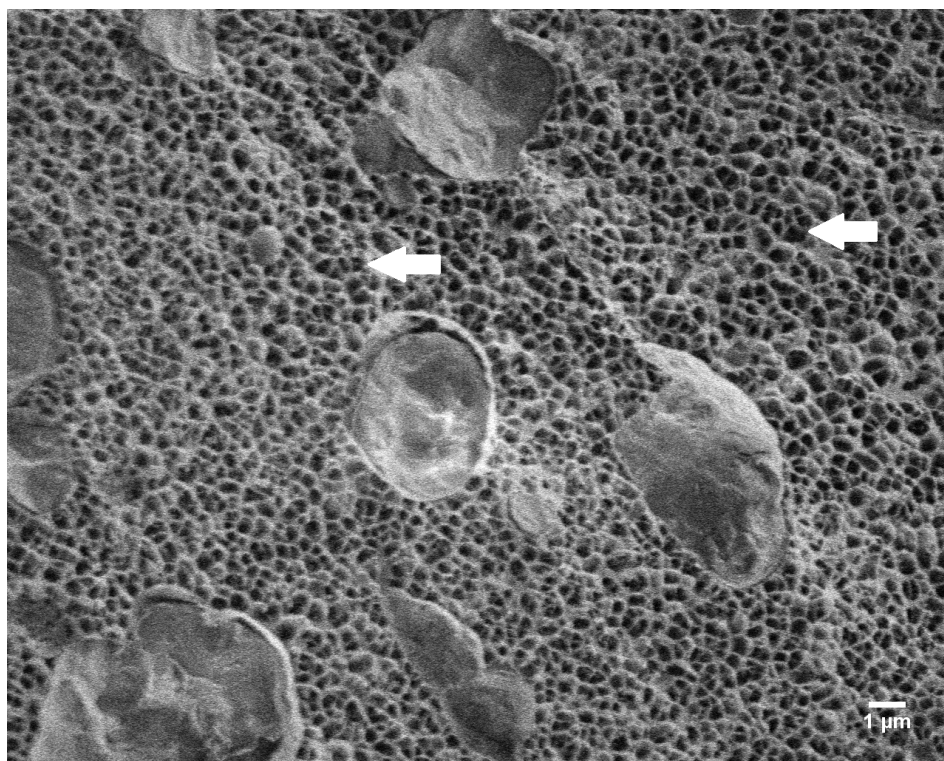


Obr. č. 28 Snímek vzorku taveného sýra s 45 % (w/w) sušiny a 40 % (w/w) TVS, fyzikálně fixován, pokoven, sublimován při - 98 °C a ihned zpět, zvětšení 5 000 krát.

U vzorků připravovaných dle schématu B.3. došlo během 3 minutové sublimace při $-95\text{ }^{\circ}\text{C}$ k ještě výraznějšímu sublimačnímu poškození, kdy ve struktuře vznikala prázdná místa po odparu vody a proteinová síť se ještě více zvýraznila, což je dobře viditelné na vzorku obsahujícím 35 % (w/w) sušiny a 40 % (w/w) tuku v sušině (Obr. č. 29, bílé šipky značí poškození). Na průběh sublimace a sublimační poškození struktury vzorků tavených sýrů má vliv nejen jejich procentuální obsah sušiny, jak bylo zmíněno výše, kdy vzorek taveného sýra, který má nižší sušinu (35 % (w/w)), je k poškození při sublimaci více náchylný (Obr. č. 27 a 29), ale také obsah tuku. Obdobně jako se zvyšujícím se obsahem vody platí, že se zvyšujícím se obsahem tuku je vzorek více náchylný k sublimačnímu poškození (viz Obr. č. 30, bílé šipky značí poškození).

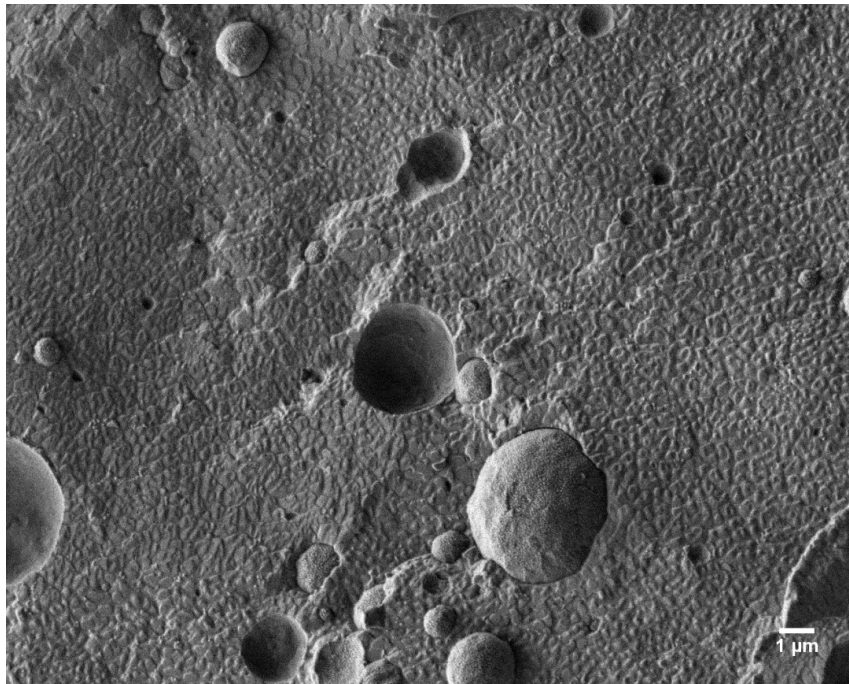


Obr. č. 29 Snímek vzorku taveného sýra s 35 % (w/w) sušiny a 40 % (w/w) TVS, fyzikálně fixován, pokoven, sublimován při $-95\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 3 minut, zvětšení 5 000 krát.

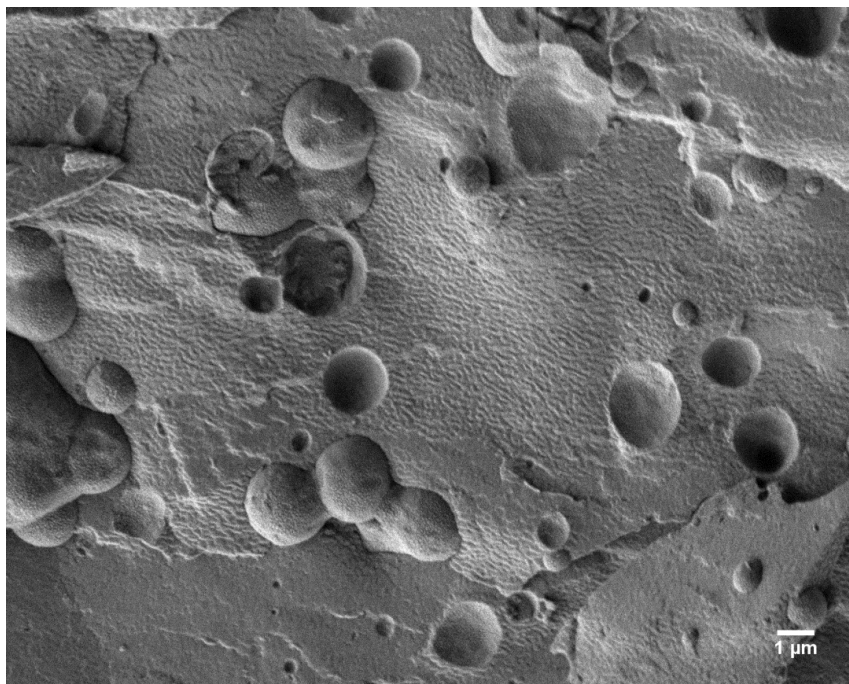


Obr. č. 30 Snímek vzorku taveného sýra s 35 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS, fyzikálně fixován, pokoven, sublimován při - 95 °C po dobu 3 minut, zvětšení 5 000 krát.

Kromě výše zmíněné řízené sublimace je třeba si uvědomit, že vzorky v průběhu prohlížení a snímání v elektronovém mikroskopu také sublimují. Důkazem jsou mikrofotografie, z nichž Obr. č. 25 byl pořízen na začátku doby prohlížení a Obr. č. 31 na konci prohlížení po 90 minutách. Na snímcích získaných po 90 minutách setrvání preparátu v mikroskopu při - 135 °C je již patrné mírné sublimační poškození v podobě zvrásnění povrchu vzorku. Obdobné, ale ne tak nápadné bylo sublimační poškození i po 30 minutách prohlížení (Obr. č. 32), což dokazuje, že k poškození vzorku diskutovaného výše mohlo dojít dříve, než po 90 minutách prohlížení. Proto by závěrem této kapitoly mohlo být doporučení prohlížet tavené sýry v kryo-režimu při - 145 °C, kdy by byla sublimace ještě menší, a tudíž by nezanechala na vzorku tak viditelné stopy poškození.



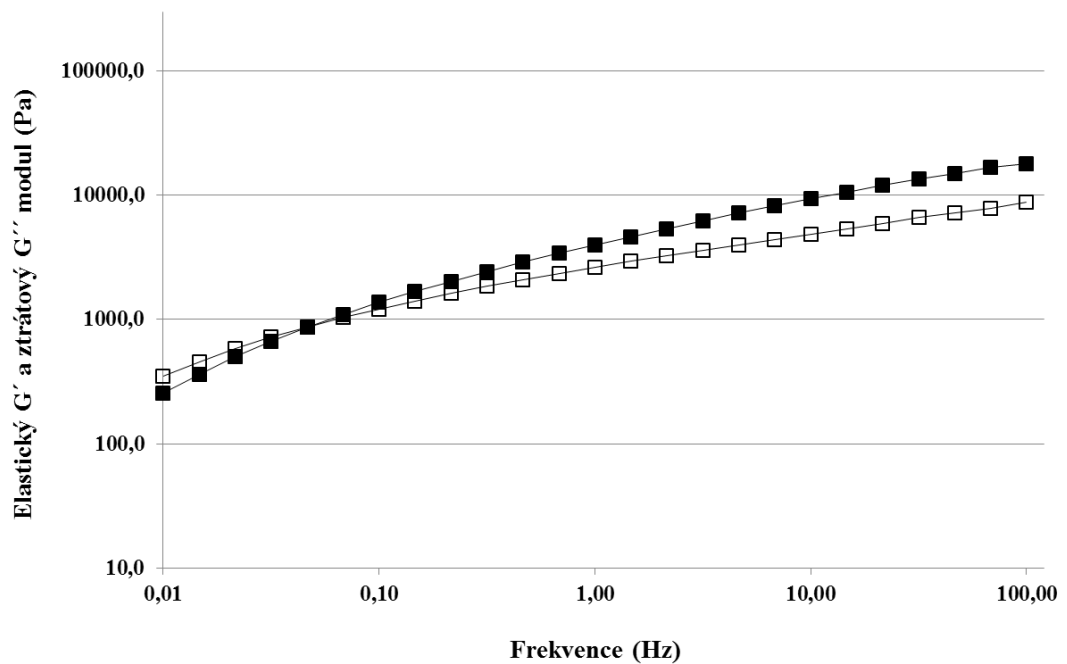
Obr. č. 31 Snímek vzorku taveného sýra s 35 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS, fyzikálně fixován, nepokoven, nesublimován, prohlížen 90 minut v mikroskopu, zvětšení 5 000 krát.



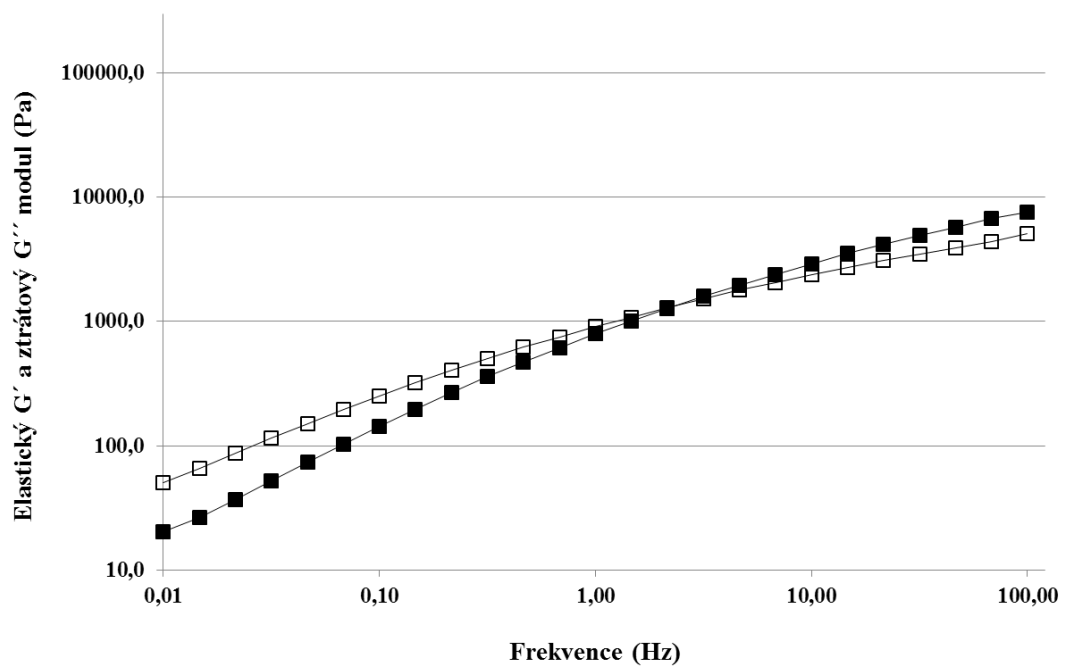
Obr. č. 32 Snímek vzorku taveného sýra s 45 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS, fyzikálně fixován, nepokoven, nesublimován, prohlížen 30 minut v mikroskopu, zvětšení 5 000 krát.

6.4 Viskoelastické vlastnosti modelových tavených sýrů

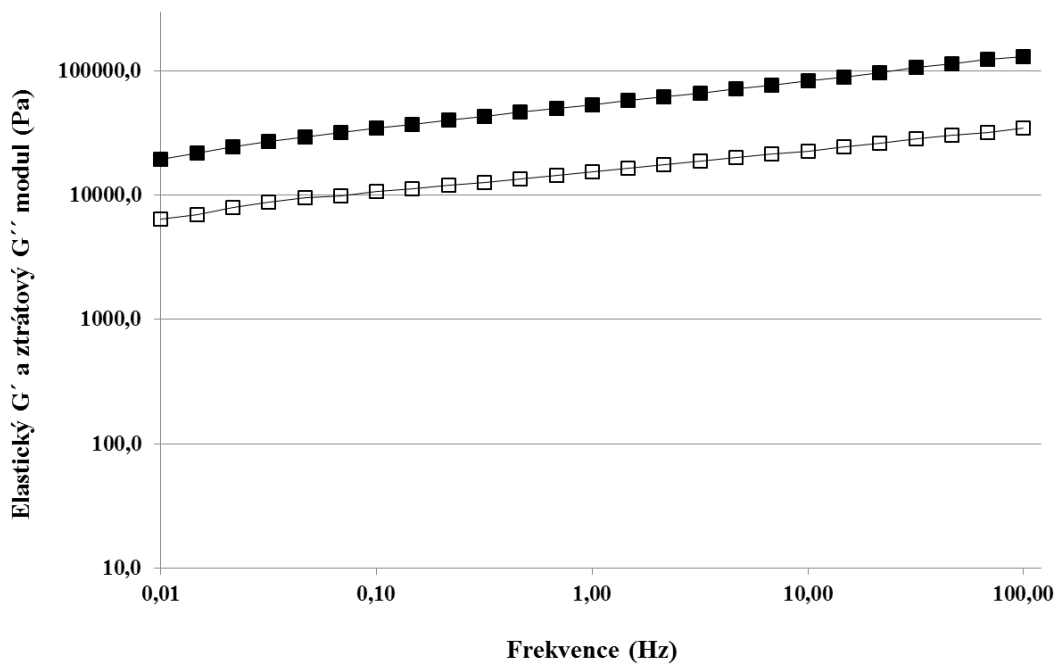
U modelových tavených sýrů s 35% a 45% (w/w) obsahem sušiny a 40% a 50% (w/w) obsahem TVS byly stanovovány jejich viskoelastické vlastnosti, a to z důvodu objasnění vlivu rozdílné mikrostruktury modelových vzorků s různým obsahem sušiny a tuku v sušině na konzistenci těchto produktů. Hodnoty elastického (G') a ztrátového (G'') modulu pružnosti modelových tavených sýrů jsou pro rozsahy frekvencí 0,01 – 100,00 Hz uvedeny na obrázcích (viz Obr. č. 33 - 36). Z uvedených grafů vyplynulo, že hodnoty elastického a ztrátového modulu pružnosti (pro jednotlivé frekvence) jsou signifikantně ($P < 0,05$) vyšší u produktů s vyšším obsahem sušiny (viz Obr. č. 35 a 36) ve srovnání s výrobky s nižším obsahem sušiny (viz Obr. č. 33 a 34). Dále je možné vyzorovat, že produkty s vyšším obsahem tuku v sušině (viz Obr. č. 34 a 36) mají významně nižší hodnoty elastického i ztrátového modulu pružnosti ve srovnání s výrobky s nižším obsahem tuku v sušině (viz Obr. č. 33 a 35; $P < 0,05$). U produktů s vyšším obsahem sušiny (viz Obr. 35 a 36; 45 % (w/w), bez ohledu na obsah tuku v sušině) byly v celém testovaném frekvenčním rozsahu hodnoty elastického modulu G' vyšší než hodnoty ztrátového modulu G'' . Z toho vyplývá, že vzniklý gel vykazoval výraznější podíl elastické (zásobní) složky G' ve srovnání se složkou ztrátovou G'' , což je typické například pro hustě provázané biopolymerní systémy [58]. Naopak u tavených sýrů s nižším obsahem sušiny (viz Obr. č. 33 a 34; 35 % (w/w) v sušině, bez ohledu na obsah tuku v sušině) byly u nižších frekvencí pozorovány vyšší hodnoty ztrátového modulu G'' ve srovnání s hodnotami elastického modulu G' . Jsou-li hodnoty $G'' > G'$ (při určitých, v tomto případě nižších, frekvencích), předpokládá se, že intermolekulární vazby v proteinové síti výrobku mají dostatečný čas k oslabení v průběhu oscilačního cyklu. Teprve s rostoucí frekvencí bylo zaznamenáno protnutí obou křivek a hodnoty elastického modulu G' byly vyšší než hodnoty ztrátového modulu. Při vyšších frekvencích však již není dostatek času k dostatečnému oslabení intermolekulárních vazeb a tavený sýr se chová více jako pevná látka ($G'' < G'$) [58]. Průsečík obou křivek (G' a G'') byl pozorován u vyšších frekvencí u taveného sýra s vyšším obsahem tuku v sušině. Z těchto poznatků vyplývá, že vyšší obsah sušiny a nižší obsah tuku v sušině vede k získání pevnějšího gelu a tím k produktu s tužší a méně roztíratelnou konzistencí.



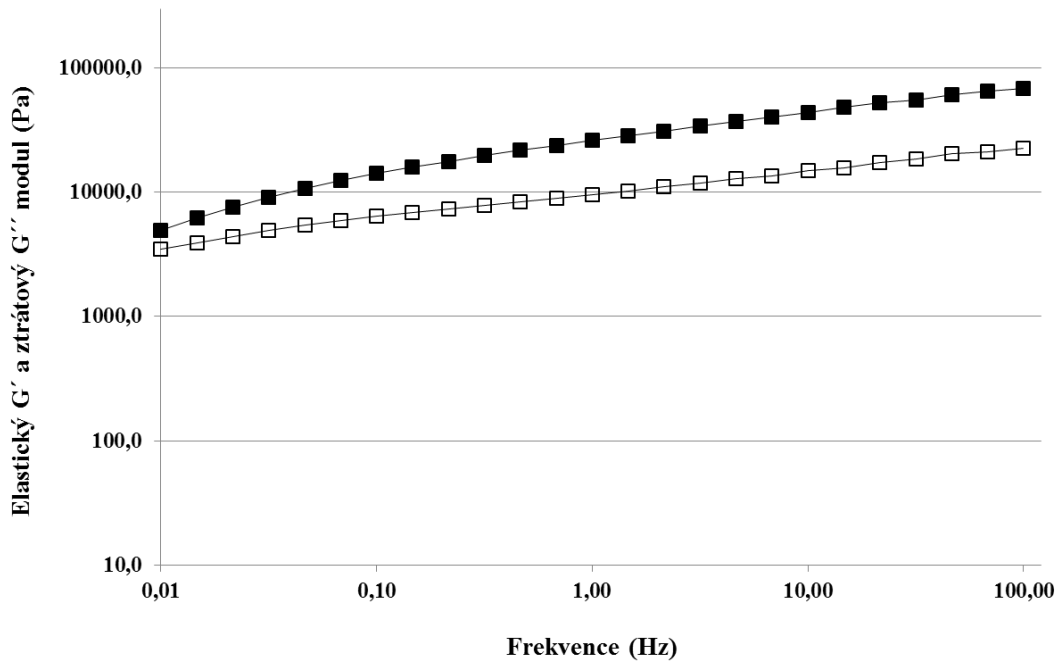
Obr. č. 33 *Elastický (G' ; plné symboly) a ztrátový (G'' ; prázdné symboly) modul modelových tavených sýrů s 35 % (w/w) obsahu sušiny a 40 % (w/w) obsahu tuku v sušině.*



Obr. č. 34 *Elastický (G' ; plné symboly) a ztrátový (G'' ; prázdné symboly) modul modelových tavených sýrů s 35 % (w/w) obsahu sušiny a 50 % (w/w) obsahu tuku v sušině.*



Obr. č. 35 *Elastický (G' ; plné symboly) a ztrátový (G'' ; prázdné symboly) modul modelových tavených sýrů s 45 % (w/w) obsahu sušiny a 40 % (w/w) obsahu tuku v sušiny.*



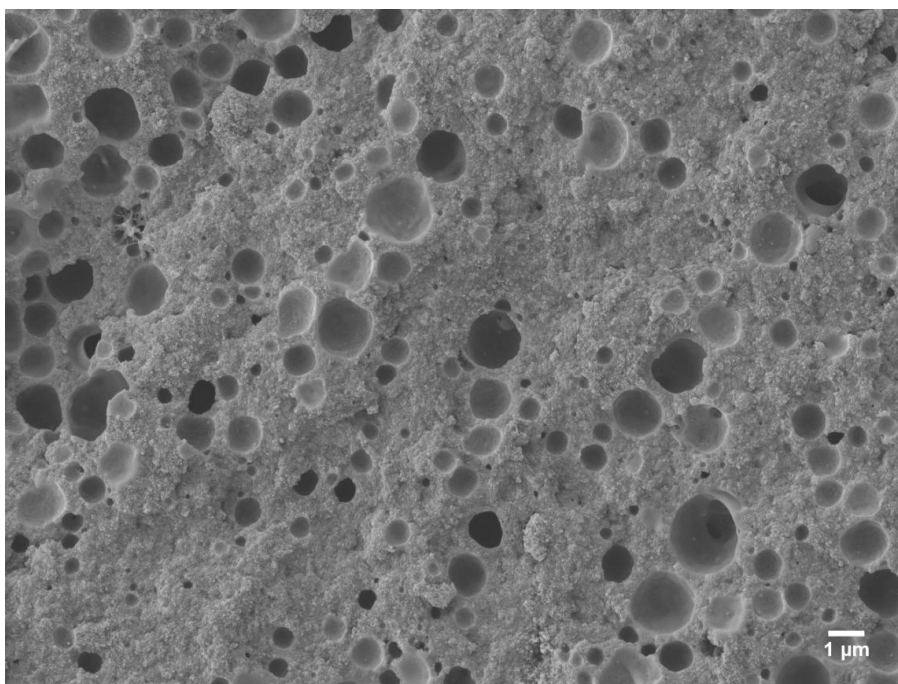
Obr. č. 36 *Elastický (G' ; plné symboly) a ztrátový (G'' ; prázdné symboly) modul modelových tavených sýrů s 45 % (w/w) obsahu sušiny a 50 % (w/w) obsahu tuku v sušiny.*

Tento závěr lze podpořit i vypočtenými hodnotami parametrů A_F a z (Tab. č. 2). Se zvyšujícím se obsahem sušiny a se snižujícím se obsahem tuku v sušině signifikantně rostla pevnost gelu A_F modelových tavených sýrů ($P < 0,05$) a zároveň rostl parametr z ($P < 0,05$), který vypovídá o počtu strukturních jednotek vzájemně interagujících v proteinové síti, resp. o počtu intermolekulárních vazeb mezi bílkoviny. Zvyšující se pevnost gelu tak byla dána zvyšujícím se počtem interakcí ve studovaném trojrozměrném systému [58; 59].

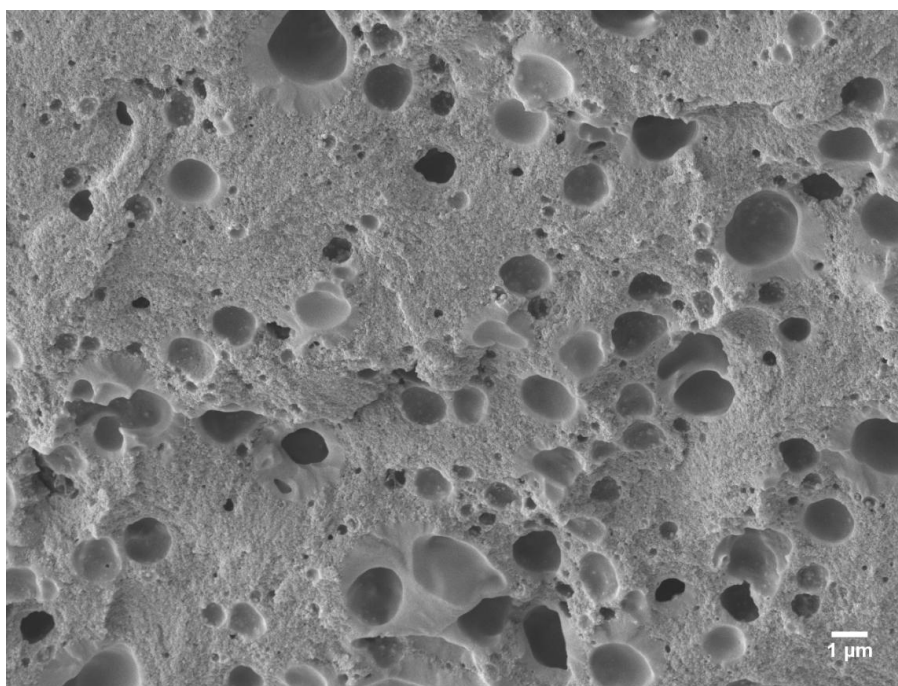
Tab. č. 2 Hodnoty pevnosti gelu (A_F ; $\text{Pa}\cdot\text{s}^{1/z}$) a interakčního faktoru (z ; -) modelových tavených sýrů.

Obsah sušiny (% (w/w))	Obsah tuku v sušině (% (w/w))	A_F ($\text{Pa}\cdot\text{s}^{1/z}$)	z (-)
35	40	$4719,2 \pm 221,8$	$3,01 \pm 0,16$
35	50	$1286,5 \pm 79,7$	$2,26 \pm 0,06$
45	40	$55629,1 \pm 3390,6$	$5,14 \pm 0,22$
45	50	$26944,3 \pm 849,6$	$4,39 \pm 0,19$

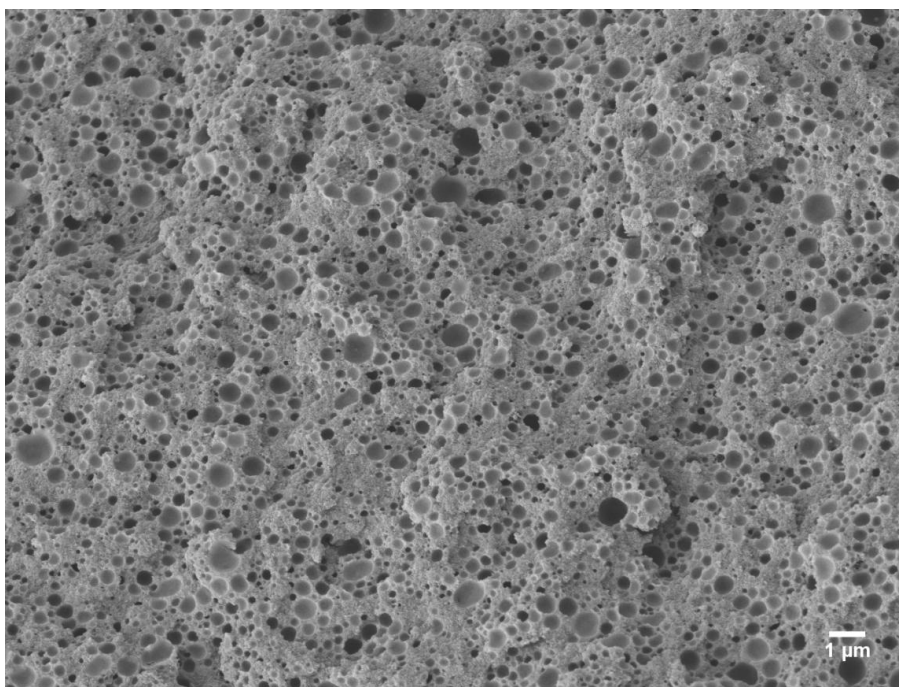
Rozdílnost konzistence tavených sýrů, resp. jejich viskoelastických vlastností, v důsledku lišícího se obsahu sušiny a tuku v sušině lze velmi dobře vysvětlit studiem mikrostruktury těchto modelových vzorků. Ze snímků vzorků chemicky fixovaných, 4 h v OsO_4 , bez chloroformu (viz Obr. č. 37 - 40) jednoznačně vyplynulo, že s rostoucím obsahem tuku v sušině (při konstantním obsahu sušiny) se počet tukových kuliček snižuje a roste jejich průměr. Velikost tukových kuliček je faktorem, který může podstatně ovlivnit konzistenci tavených sýrů. S narůstajícím obsahem tuku v sušině (při konstantním obsahu sušiny) klesá relativní množství bílkovin v systému. U studovaných modelových tavených sýrů lze analýzou jejich surovinové skladby uvést, že poměr bílkovin a tuku byl u výrobků s 40 % (w/w) obsahu TVS $\sim 1,0:0,8$ a v případě produktů s 50 % (w/w) obsahu TVS $\sim 1,0:1,3$. Vzhledem k faktu, že bílkoviny (kaseiny) jsou hlavním emulgátorem v této síti, pak jejich nižší relativní množství způsobí nižší stupeň emulgace tuku, který se projeví zvětšením průměru tukových kuliček. Větší tukové kuličky v mnohem větším měřítku poruší kontinuum proteinové matrice ve srovnání s větším počtem menších tukových kuliček [52; 60]. Na nižší pevnost gelu u výrobků s vyšším obsahem tuku v sušině ukazují i hodnoty A_F těchto produktů, které jsou prezentovány výše.



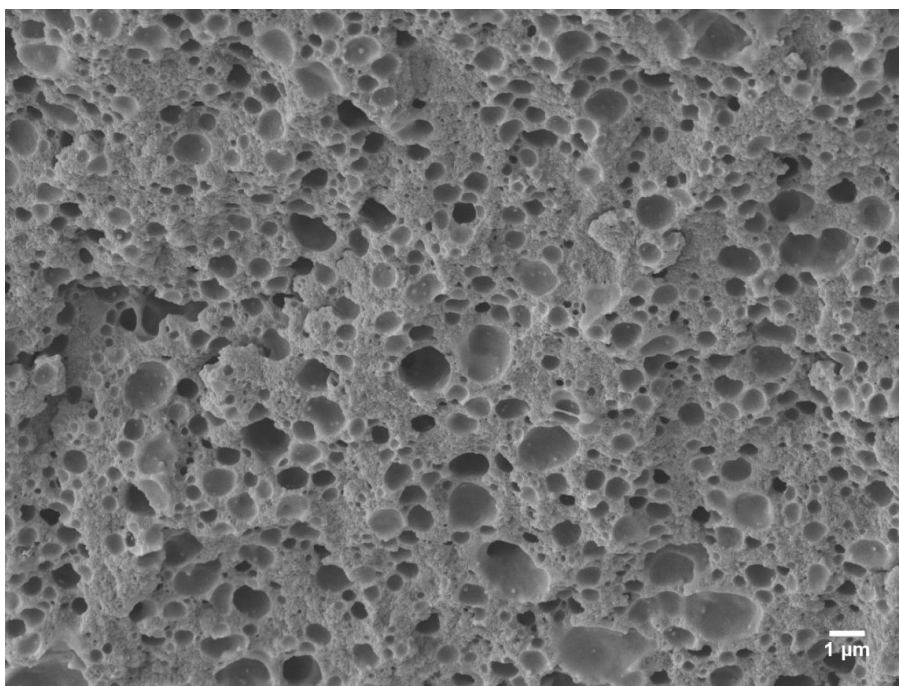
Obr. č. 37 SEM snímek vzorku taveného sýra (35 % (w/w) sušiny a 40 % (w/w) TVS), 4 hodiny v OsO_4 , bez chloroformu, zvětšení 5 000 krát.



Obr. č. 38 SEM snímek vzorku taveného sýra (35 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS), 24 hodin v OsO_4 , bez chloroformu, zvětšení 5 000 krát.



Obr. č. 39 SEM snímek vzorku taveného sýra (45 % (w/w) sušiny a 40 % (w/w) TVS), 4 hodiny v OsO_4 , bez chloroformu, zvětšení 5 000 krát.



Obr. č. 40 SEM snímek vzorku taveného sýra (45 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS), 4 hodiny v OsO_4 , bez chloroformu, zvětšení 5 000 krát.

Obrázky (viz Obr. č. 37 - 40) také vypovídají o klesajícím průměru a rostoucím počtu tukových kuliček v případě zvýšení obsahu sušiny výrobku (při konstantním obsahu tuku v sušině). Opět lze říci, že menší tukové kuličky v mnohem menším měřítku poruší kontinuum proteinové matrice ve srovnání s menším počtem velkých tukových kuliček (při konstantním obsahu tuku v sušině) a tím se tavený sýr jeví jako pevnější a hůře roztíratelný [60; 61]. Při konstantním obsahu tuku v sušině dochází při zvyšování obsahu sušiny (v daném případě při absenci přísady jiných složek, než přírodní sýry) k navýšení množství přítomných proteinů, které zvyšují emulgační schopnost systému, což se projevilo zmenšením průměru tukových kuliček. Navíc lze předpokládat, že větší počet strukturních jednotek kaseinů rovněž vytvoří hustší proteinovou síť a zvýší se počet interakcí mezi jednotlivými řetězci proteinů. Tento předpoklad lze jednoznačně podpořit zjištěnými hodnotami pevnosti gelu A_F a interakčním faktorem z studovaných tavených sýrů (viz výše). Oprávněnost závěrů této práce lze podpořit i některými, dosud publikovanými pracemi (například [52]; [62] aj.), které rovněž uvádí, že se zvyšujícím se obsahem sušiny a snižujícím se obsahem tuku v sušině roste tuhost tavených sýrů.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat přípravu vzorků tavených sýrů pro skenovací elektronovou mikroskopii chemickou i fyzikální cestou a popsat vliv lišících se parametrů přípravy na strukturu vzorků. U modelových vzorků tavených sýrů byla provedena chemická a reologická analýza.

Ze snímků vzorků připravených chemickou fixací je zřejmé, že fixace proteinů 3% (v/v) roztokem glutaraldehydu v kakodylanovém pufru po dobu 16 hodin je dostačující. Lze konstatovat, že 4 hodinová fixace 2% (v/v) roztokem oxidu osmičelého je pro fixaci tuků nedostatečná, jelikož v některých případech činidlo neprostoupilo až do středu vzorku. Bylo zjištěno, že vodný roztok oxidu osmičelého není ve všech typech zkoumaných modelových vzorků schopen dostatečně fixovat tukové kuličky z několika různých důvodů. Jedním z nich by mohl být obsah nasycených mastných kyselin, což by odporovalo závěru pozorování tukových kuliček (byť deformovaných) po aplikaci OsO_4 po dobu 24 hodin s následným odvodněním a sušením na vzduchu. Dalším důvodem by mohl být obtížnější prostup vodného roztoku oxidu osmičelého přes hustší proteinovou matici tavených sýrů s vyšším obsahem sušiny.

Porovnáním metod sušení bylo konstatováno, že vzorky tavených sýrů při sušení volně na vzduchu podléhají poškození struktury. Nejvíce byla porušena povrchová struktura, která však v práci není ukázána. Nicméně na lomu vzorků se deformita struktury projevila obzvláště výrazně na tukových kuličkách. Nejvhodnější metodou sušení vzorků je metoda kritického bodu.

Příprava tavených sýrů pro skenovací elektronovou mikroskopii chemickou cestou je časově náročná (trvá až několik dnů), poskytuje více možností poškození přirozené struktury vzorku (při fixaci, promývání, odvodnění, manipulaci se vzorkem, sušení) a vzniku artefaktů. Pokud se dodrží správné postupy přípravy a sušení a se vzorky se zachází velmi opatrně, je možné získat při prohlížení ve skenovacím elektronovém mikroskopu s kvalitními parametry uspokojující výsledky a informace o přirozené mikrostruktúře taveného sýra.

Metody fyzikální fixace byly do této práce zahrnuty z důvodu zachycení co možná nejvěrnější struktury vyrobených modelových vzorků tavených sýrů, která by nebyla narušena chemickou fixací a manipulací se vzorkem, a aby bylo možno následně obě metody přípravy vzorků porovnat.

Pokovené vzorky, které byly připravené fyzikální fixací, se při prohlížení nenabíjely tak rychle, jako nepokovené. Avšak pokovovací zařízení způsobilo na povrchu vzorku znečištění. Přestože není toto poškození standardní situací, doporučujeme prohlížet vzorky nepokovené, s přihlédnutím na rychlost prohlížení.

Při kryo-fixaci bylo zjištěno, že vzorky tavených sýrů podléhají velkým sublimačním změnám. Z tohoto důvodu není úplně vhodné vzorky tavených sýrů podrobovat sublimaci, jelikož se nepodařilo najít vhodnou kombinaci teploty a doby trvání sublimace, při které by vlivem odparu vody ze vzorku nedošlo k tvorbě artefaktů ve struktuře vzorku. Opět je nutné pracovat rychle, neboť i v nesublímovaných vzorcích dochází při prohlížení k sublimaci ledu z povrchu, která je po určité době viditelná a tvoří tak nechtěné artefakty. Při dalším snížení prohlížecí teploty na $-145\text{ }^{\circ}\text{C}$ by sublimační poškození mohlo být ještě menší.

Fyzikální příprava vzorků (kryo-fixace) je velmi rychlá metoda. Vzorek není tolik namáhán, jako při chemické přípravě a je zde menší riziko vzniku artefaktů, které mohou nastat zejména při sublimaci vody z povrchu vzorku, dále z důvodu nabíjení vzorku a kvůli nesprávnému pokovení, při kterém může dojít ke znečištění povrchu vzorku nečistotami z pokovovacího zařízení.

Z měření viskoelastických vlastností vyplynulo, že nejtuhší a nejméně roztíratelnou konzistenci má tavený sýr s nejvyšším obsahem sušiny a nejnižším obsahem TVS (v našem případě vzorek s 45% (w/w) sušiny a 40% (w/w) TVS). Naopak nejméně tuhý a nejlépe roztíratelný je vzorek s nejnižší sušinou a nejvyšším obsahem TVS (v našem případě vzorek s 35% (w/w) sušiny a 50% (w/w) TVS). Výsledky měření viskoelastických vlastností vzorků tavených sýrů korelují s hodnocením jejich mikrostruktury. Ze získaných snímků je zřejmé, že větší tukové kuličky obsahuje sýr s vyšším obsahem tuku v sušině (při stejném obsahu sušiny). Roste-li obsah tuku v sušině, roste i velikost tukových kuliček v matici. Tavené sýry s vyšším obsahem sušiny obsahují menší tukové kuličky z důvodu většího namáhání při výrobě a také z důvodu vyššího obsahu proteinů podílejících se na emulgaci a tvorbě nových obalů tukových kuliček. A právě velikost tukových kuliček ovlivňuje konzistenci tavených sýrů. Velké tukové kuličky porušují kontinuum proteinové matrice, která je poté méně pevná.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] TAMINE, A. *Structure of Dairy Products*. 2007. 288 pp. ISBN-13: 978-1-4051-2975-6.
- [2] KALÁB, M. *Food microscopy*. Food microscopy: Foods under the microscope [online]. 2013 [cit. 2014-10-24]. Dostupné z: <http://www.magma.ca/~scimat/foodmicr.htm>
- [3] NEBESÁŘOVÁ, J., M. VANCOVÁ a M. NEBESÁŘ. Elektronová mikroskopie pro biology. *Elektronová mikroskopie pro biology* [online]. 2001 [cit. 2015-02-24]. Dostupné z: <http://www.paru.cas.cz/lem/book/Podkap/autori.html>.
- [4] GOLDSTEIN, J. *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. 3rd ed. New York: Springer, 2003, xix, 690 s., [6] s. obr. příl. ISBN 0-306-47292-9.
- [5] SMITH, J. A. Scanning Electron Microscopy. *Physics Education*. 1982, vol. 17, no. 3 s. 111-114. ISSN:0031-9120.
- [6] VISWANATHAN, P. *Electron microscopy*. Chennai: MJP Publishers. 2011. 532 p. ISBN 978-81-8094-075-0.
- [7] MORRIS, V. J. a K. GROVES. *Food Microstructures: Microscopy, measurement and modelling*. Woodhead Publishing Limited. 2013. 438 p. ISBN 978-0-85709-525-1.
- [8] BOZZOLA, J. J a L. D. RUSSELL. *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*. 2nd ed. Sudbury, Mass.: Jones and Bartlett, c1999, xxiii, 670 p. ISBN 0763701920.
- [9] GOODHEW, P. J, F. HUMPHREYS a R. BEANLAND. *Electron microscopy and analysis*. 3rd ed. New York: Taylor & Francis, 2001, x, 251 p. ISBN 0748409688.
- [10] KHURSHEED, A. *Scanning electron microscope optics and spectrometers*. Singapore: World Scientific, 2011. ISBN 9789812836670.
- [11] ALLEN, Edited by Terence D. *Introduction to electron microscopy for biologists*. 1st ed. London: Elsevier, 2008. ISBN 9780080888163.
- [12] LYMAN, CH., E. *Scanning electron microscopy, X-ray microanalysis, and analytical electron microscopy: a laboratory workbook*. New York: Plenum Press, c1990, xi, 407 p. ISBN 0306435918.

- [13] OFFICE FOR LEARNING AND TEACHING. *MyScope: training for advanced research* [online]. 2013, 2014 [cit. 2015-02-16]. Dostupné z: <http://www.ammr.org.au/myscope/>.
- [14] Cryo- SEM. TESCAN ORSAY HOLDING. *Tescan: Performance in Nanospace* [online]. 2012 [cit. 2015-02-16]. Dostupné z: <http://www.tescan.com/cz> .
- [15] MAUNSBACH, A. B. a B. A. AFZELIUS. *Biomedical electron microscopy: illustrated methods and interpretations*. [1st ed.]. San Diego: Academic Press, 1999, xv, 548 s., il. ISBN 0124806104.
- [16] WATT, I., M. *The principles and practice of electron microscopy*. 2nd ed. New York: Cambridge University Press, 1997, x, 484 p. ISBN 0521435919.
- [17] PAWLEY, J. *Handbook of biological confocal microscopy*. 3rd ed. New York, NY: Springer, 2006. ISBN 9780387455242.
- [18] JOHN D. BANCROFT, [edited by] John D. Marilyn Gamble. *Theory and practice of histological techniques*. 6th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2008. ISBN 0443102791.
- [19] DYKSTRA, M. J. a L. E. REUSS. *Biological electron microscopy: theory, techniques, and troubleshooting*. 2nd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, c2003, xviii, 534 p. ISBN 0306477491.
- [20] CASTEJÓN, O., J. *Scanning electron microscopy of cerebellar cortex*. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, c2003, xvii, 135 p. ISBN 0306477114.
- [21] DYKSTRA, M. J. *A manual of applied techniques for biological electron microscopy*. New York: Plenum, c1993, xiii, 257 p. ISBN 0306444496.
- [22] MÜLLER-REICHERT, Edited by Thomas. *Electron microscopy of model systems*. 1st ed. Amsterdam: Academic Press/Elsevier, 2010. ISBN 0123810086.
- [23] Glutaraldehyde solution. SIGMA- ALDRICH. *Sigma- Aldrich* [online]. 2015 [cit. 2015-02-17]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/g5882?lang=en®ion=CZ>
- [24] ZHOU, W. a Z. L. WANG. *Scanning microscopy for nanotechnology: techniques and applications*. New York: Springer, 2007, xiv, 522 p., [12] p. of plates. ISBN 0387333258.

- [25] KALÁB, M. *Practical aspects of electron microscopy in dairy research*. 12. vyd. Chicago: Scanning Microscopy International, 1993, 95- 114.
- [26] JAMES, B. *Advances in "wet" Electron Microscopy Techniques and Their Application to the Study of Food Structure*. Trends in Food Science & Technology. 2009, vol. 20, no. 3 s. 114-124. ISSN:0924-2244.
- [27] TAMIME, A. Y. *Processed cheese and analogues*. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011. ISBN 1444341839.
- [28] FORET, Z. *Návrh koncepce a vývoj jednocelového rastrovacího elektronového mikroskopu* [online]. Brno, 2010 [cit. 2015-02-25]. Dostupné z: <https://dspace.vutbr.cz/handle/11012/8259>. Doktorská práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [29] Přejechod P- N. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2014 [cit. 2015-02-27]. Dostupné z: http://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=P%C5%99echod_P-N&oldid=11862297
- [30] BATT, C. A. *Encyclopedia of food microbiology* [online]. 2nd edition. Academic Press, 1999 [cit. 2015-02-28]. ISBN 01-238-4733-8. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=1b1CAgAAQBAJ&pg=RA1-PA657&dq=Encyclopedia+of+Food+Microbiology&hl=cs&sa=X&ei=mtHxVNi3G4PoywPI5YGgBg&ved=0CB8Q6AEwAA#v=onepage&q=Encyclopedia%20of%20Food%20Microbiology&f=false>
- [31] FOX, P. *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg, MD: Aspen Pub., 2000, ix, 587 p. ISBN 0834212609.
- [32] HUI, Y. *Handbook of food science, technology, and engineering*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006, 4 v. Food science and technology (Taylor & Francis), 148. ISBN 08493984954.
- [33] FOX, P. P. *Cheese, chemistry, physics and microbiology*. 3rd ed. Burlington: Elsevier, 2004. ISBN 00-805-0093-5.
- [34] SPREER, E. a A. MIXA. *Milk and dairy product technology*. New York: M. Dekker, c1998, vii, 483 p. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 84. ISBN 0824700945.
- [35] KALÁB, M. *Artefacts in Conventional Scanning Electron Microscopy of some Milk Products*. 3. vyd. Chicago: SEM Inc., 1984, 95- 111. ISBN 606660507.

- [36] LEICA MICROSYSTEMS. *Application Booklet: Leica EM CP300 Automated Critical Point Dryer*. 2012. ISBN 167180042.
- [37] MISTRY, V., A. N. HASSAN a M. R. ACHARYA. Microstructure of pasteurized process cheese manufactured from vacuum condensed and ultrafiltered milk. *Le Lait*. 2006, vol. 86, issue 6, s. 453-459. DOI: 10.1051/lait:2006018.
- [38] ONG, L., R. R. DAGASTINE, S. E. KENTISH a S. L. GRAS. Microstructure of milk gel and cheese curd observed using cryo scanning electron microscopy and confocal microscopy. *LWT - Food Science and Technology*. 2011, vol. 44, issue 5, s. 1291-1302. DOI: 10.1016/j.lwt.2010.12.026.
- [39] Phenom Pro. PHENOMWORLD. *Phenom- World* [online]. 2015 [cit. 2015-03-13]. Dostupné z: <http://www.phenom-world.com/microscopes/phenom-pro>.
- [40] Vega 3 LM. TESCAN ORSAY HOLDING. *Tescan: Performance in nanospace* [online]. 2012 [cit. 2015-03-13]. Dostupné z: <http://www.tescan.com/en/products/vega-sem/vega3-lm>.
- [41] MiNALab. MINALAB. *Scanning Electron Microscopy (SEM): Jeol JSM-7401F* [online]. 2013 [cit. 2015-03-13]. Dostupné z: <https://minalab.fbk.eu/scanning-electron-microscopy-sem>.
- [42] MILLER, G. D, J. K. JARVIS. *Handbook of dairy foods and nutrition*. 2nd ed. Boca Raton, Fla: CRC Press, 2000. ISBN 1420050184.
- [43] KALÁB, M. Milk gel structure. XIV. Fixation of fat globules in whole milk yoghurt for electron microscopy. *Milchwissenschaft. Milk science international*. 1984, roč. 39, č. 6.
- [44] ANGERMÜLLER, S. a H. D. FAHIMI. Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. *The Histochemical Journal*. 1982, vol. 14, issue 5, s. 823-835. DOI: 10.1007/bf01033631.
- [45] Formaldehyde solution. SIGMA- ALDRICH. *Sigma- Aldrich* [online]. 2015 [cit. 2015-02-17]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/252549?lang=en®ion=CZ>.
- [46] Česká republika. Vyhláška 77/2003, kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy, jedlé tuky a oleje. In: *Sbírka zákonů*. 2003.

- [47] CARIĆ, M., M. GANTAR a M. KALÁB. Effect of emulsifying agents on the microstructure and other characteristics of process cheese – a review. *Food microstructure*. 1985, vol. 4, p. 297 – 312.
- [48] CARIĆ, M. a M. KALÁB. *Processed cheese products*. In Fox, P.H. (Ed.) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 2, Major cheese Gross, 2nd ed. London and New York: Elsevier Applied Science, 1997. P. 467- 505.
- [49] SILVA, R., V. MINIM, M. VIDIGAL, A. SILVA, A. A. SIMIQUELI a L. A. MINIM. Sensory and Instrumental Consistency of Processed Cheeses. *Journal of Food Research*. 2012, vol. 1, no. 3204. ISSN:1927-0887.
- [50] Mikroskopy VEGA SEM. *Uni-export instruments Polska: Aparatura naukowo-badawcza i kontrolno-pomiarowa* [online]. 2014 [cit. 2015-04-14]. Dostupné z: <http://www.uni-export.com.pl/skaningowe-mikroskopy-elektronowe/mikroskopy-vega-sem>.
- [51] ANONYM. ČSN ISO 5534, Sýry a tavené sýry – Stanovení obsahu celkové sušiny (Referenční metoda). Praha: Český normalizační institut.
- [52] KAPOOR, R. a L. E. METZGER. Process Cheese: Scientific and technological aspects – A review. Comprehensive review in *Food Science and Food Safety*. 2008, vol. 7, p. 194- 214.
- [53] PISKA, I. a J. ŠTĚTINA (2004). Influence of cheese ripening and rate of cooling of the processed cheese mixture on rheological properties of processed cheese. *Journal of Food Engineering*, 61, 551–555.
- [54] BENNETT, R. J., D. TRIVEDI, Y. HEMAR, D. C. W. REID, D. ILLINGWORTH a S. K. LEE (2006). The effect of starch addition on the rheological and microstructural properties of model processed cheese. *The Australian Journal of Dairy Technology*, 61, 157–159.
- [55] WINTER, H. H. a F. CHAMBON (1986). Analysis of linear viscoelasticity of a crosslinking polymer at the gel point. *Journal of Rheology*, 30, 367–382.
- [56] MARTÍNEZ-RUVALCABA, A., E. CHORNET a D. RODRIGUE (2007). Viscoelastic properties of dispersed chitosan/xanthan hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, 67, 586–595.

- [57] KRÍŽ, O., F. BUŇKA a J. HRABĚ. *Senzorická analýza potravin II. Statistické metody* [skripta]. 1. vyd. Zlín: UTB, 2007, 127 s. ISBN 978-80-7318-494-0.
- [58] CUNHA, C. R., R. GRIMALDI, M. R. ALCANTARA a W. H. VIOTTO (2013). Effect of the type of fat on rheology, functional properties and sensory acceptance of spreadable cheese analogue. *International Journal of Dairy Technology*, 66, 1, 54 – 62.
- [59] MACKŮ, I., F. BUŇKA, V. PAVLÍNEK, P. LECIÁNOVÁ a J. HRABĚ. The effect of pectin concentration on viscoelastic and sensory properties of processed cheese. *International Journal of Food Science and Technology*, 2008, 43, 1663 – 1670.
- [60] LEE, S. K., R. J. BUWALDA, S. R. EUSTON, E. A. FOEGEDING a A. B. MCKENA (2003). Changes in the rheology and microstructure of processed cheese during cooking. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 36, 339–345.
- [61] NORONHA, N., E. D. O'RIORDAN a M. O'SULLIVAN (2008). Influence of processing parameters on the texture and microstructure of imitation cheese. *European Food Research and Technology*, 226, 385–396.
- [62] GUINEE, T. P., M. CARIĆ a M. KALÁB (2004). Pasteurized processed cheese and substitute/imitation cheese products. In Fox, P.F. (ed), *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Volume 2: Major cheese groups*. 3. ed. London: Elsevier Applied Science, 349–394.
- [63] BUŇKA, F., L. BUŇKOVÁ a S. KRÁČMAR. *Základní principy výroby tavených sýrů: Basic principles of processed cheese production : monografie*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2009, 70 s. Folia Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis. ISBN 978-80-7375-336-8.
- [64] FOX, P. F., T. P. O'CONNOR, P. L. H. McSWEENEY, T. P. GUINEE a N. M. O'BRIEN. (1996) Cheese: Physical, Biochemical, and Nutritional Aspects. *Advances in Food and Nutrition Research vol. 39*, (ed. S. L. Taylor), pp. 163-276, Academic Press, San Diego.
- [65] GUPTA, S. K., C. KARAHADIAN a R. C. LINDSAY. (1984) Effect of Emulsifier Salts on Textural and Flavor Properties of Processed Cheeses. *Journal of Dairy Science*, 67, 764-778.
- [66] SVELLO, P.A., C. A. ERNSTROM a M. KALAB. Microstructure and Meltability of Model Process Cheese Made with Rennet and Acid Casein. *Dairy Foods Research papers*. 1989, vol. 72, pp. 1-11.

- [67] MARCHESSEAU, S., E. GASTALDI, A. LAGAUDE a J. L. CUQ. Influence of pH on properties Interactions and Microstructure of Process Cheese. *Journal Dairy Science*. 1997, vol. 80, pp. 1483-1489.
- [68] KALÁB, M. a W. H. MODLER. Milk gel structure. XV. Electron microscopy of whey protein-based Cream cheese spread. *Milchwissenschaft*. 1985, pp. 193-196. ISSN-0026-3788
- [69] KALÁB, M., W. H. MODLER, M. CARIĆ a S. MALENOVIĆ. Structure, meltability, and firmness of processes cheese containing white cheese. *Food Structure*. 1991, vol. 10, pp. 193-201.
- [70] AWAD, R. A., L. B. ABDEL-HAMID, S. A. EL-SHABRAWY A R. K. SINGH. Texture and microstructure of block type processed cheese with formulated emulsifying salt mixtures. *Lebensmittel-wissenschaft und Technologie*. 2002, vol. 35, no. 1, p. 54-61.
- [71] HAN, J., M. BRITTEN, D. ST-GELAIS, C. P. CHAMPAGNE, P. FUSTIER, S.SALMIERI a M. LACROIX. Effect of polyphenolic ingredients on physical characteristics of cheese. *Food Research International*. 2011, vol. 44, issue 1, s. 494-497.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

SEM	Skenovací (rastrovací) elektronový mikroskop
TEM	Transmisní (prozařovací) elektronový mikroskop
STEM	Skenovací transmisní elektronový mikroskop
3D	Trojrozměrný
2D	Dvourozměrný
nm	Nanometr, jednotka délky
μm	Mikrometr, jednotka délky
Pa	Pascal, jednotka tlaku
eV	Elektronvolt, jednotka práce a energie
CRT	Cathode Ray Tube, katodová trubice
BSE	Backscattered electrons, zpětně odražené elektrony
SE	Secondary electrons, sekundární elektrony
RTG	Rentgenové záření
WD	Working distance, pracovní vzdálenost
Kryo- SEM	Kryo skenovací elektronová mikroskopie
NaCl	Chlorid sodný
HCl	Kyselina chlorovodíková
GA	Glutaraldehyd
OsO ₄	Oxid osmičelý
OsO ₂	Oxid osmičitý
CPD	Critical point drying, sušení ke kritickému bodu
CO ₂	Oxid uhličitý
°C	Stupeň Celsia, jednotka teploty
HDMS	1, 1, 1, 3, 3, 3-hexametyldisilazan

LaB ₆	Hexaborid lanthanu
Na ⁺	Sodný kation
DNA	Deoxyribonukleová kyselina, nositel genetické informace
UHT	Ultra high temperature, tepelné ošetření ultra vysokou teplotou
s	Sekunda, jednotka času
Obr.	Obrázek
Tab.	Tabulka
V ₁ ; V ₂	Objemy
c ₁ ; c ₂	Koncentrace
m ₁ ; m ₂	Hmotnosti
w ₁ ; w ₂	Hmotnostní procento
UTB	Univerzita Tomáše Bati
TVS	Tuk v sušině
HCl	Kyselina chlorovodíková
min	Minuty, jednotka času
P	Hladina pravděpodobnosti

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. č. 1 Porovnání konstrukce jednotlivých typů mikroskopů [3].	15
Obr. č. 2 Ukázka LaB_6 krystalu (vlevo) a wolframového vlákna (vpravo) [28].	16
Obr. č. 3 Schéma zdroje elektronů [24].	17
Obr. č. 4 Signály vznikající v různých hloubkách vzorku [6].	20
Obr. č. 5 Skenovací elektronový mikroskop JEOL JSM-7401F [3].	22
Obr. č. 6 Strukturní vzorec glutaraldehydu [23].	25
Obr. č. 7 Strukturní vzorec formaldehydu [45].	25
Obr. č. 8 Interakce oxidu osmičelého s dvojnou vazbou v mastné kyselině lipidu za vzniku monoesteru [19].	26
Obr. č. 9 Chemické reakce tavicích solí a proteinů během výroby tavených sýrů (A-anion fosforečnanu, polyfosforečnanu, citronanu apod.) [33].	35
Obr. č. 10 Struktura přírodního sýra zobrazená pomocí SEM. Tmavý pás označen šipkou je spoj mezi sýrovými zrny [47].	37
Obr. č. 11 Struktura taveného sýra zobrazená pomocí SEM [25].	40
Obr. č. 12 Snímek chemicky fixovaného modelového vzorku taveného sýra se 40 % (w/w) sušinou a 60 % (w/w) TVS z mikroskopu typu Phenom pro G2, zvětšení 1 000 krát.	49
Obr. č. 13 Snímek chemicky fixovaného modelového vzorku taveného sýra se 40 % (w/w) sušinou a 50 % (w/w) TVS z mikroskopu typu VEGA II LMU, zvětšení 500 krát.	50
Obr. č. 14 Snímek vzorku taveného sýra se 45 % (w/w) sušinou a 50% (w/w) TVS, 17 hodin v 70% (v/v) etanolu, zvětšení 20 000 krát.	53
Obr. č. 15 Snímek vzorku taveného sýra se 45 % (w/w) sušinou a 50% (w/w) TVS, 17 hodin v 70% (v/v) etanolu, zvětšení 1 000 krát.	53
Obr. č. 16 Snímek vzorku taveného sýra s 35 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS, 4 h v OsO_4 , bez chloroformu, sušen v CPD, zvětšení 5 000 krát.	54
Obr. č. 17 Snímek vzorku taveného sýra s 45 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS, 4 h v OsO_4 , s chloroformem, sušen v CPD, zvětšení 5 000 krát.	55
Obr. č. 18 Snímek vzorku taveného sýra s 45 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS, bez chloroformu, 17 hodin v 70% (v/v) etanolu, zvětšení 10 000 krát.	56
Obr. č. 19 Snímek vzorku taveného sýra s 35 % (w/w) sušiny a 40 % (w/w) TVS, v chloroformu, 17 hodin v 70% (v/v) etanolu, zvětšení 10 000 krát.	57

Obr. č. 20 Snímek vzorku taveného sýra s 45 % (w/w) sušiny a 40 % (w/w) TVS, v chloroformu, 17 hodin v 70% (v/v) etanolu, zvětšení 10 000 krát.....	57
Obr. č. 21 Snímek vzorku taveného sýra s 35 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS, 24 h v OsO ₄ , bez chloroformu, vysušeny na vzduchu, zvětšení 10 000 krát.	59
Obr. č. 22 Snímek vzorku taveného sýra s 45 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS, 24 h v OsO ₄ , bez chloroformu, vysušeny na vzduchu, zvětšení 10 000 krát.	59
Obr. č. 23 Snímek vzorku taveného sýra s 45 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS, 4 h v OsO ₄ , s chloroformem, zvětšení 5 000 krát.	60
Obr. č. 24 Snímek vzorku taveného sýra se 35 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS, fyzikálně fixován, bez sublimace, nepokoven, zvětšení 5 000 krát.	61
Obr. č. 25 Snímek vzorku taveného sýra se 35 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS, bez sublimace, nepokoven, zvětšení 5 000 krát.....	62
Obr. č. 26 Snímek vzorku taveného sýra s 35 % (w/w) sušiny a 40 % (w/w) TVS, fyzikálně fixován, pokoven, bez sublimace, zvětšení 5 000 krát.	63
Obr. č. 27 Snímek vzorku taveného sýra s 35 % (w/w) sušiny a 40 % (w/w) TVS, fyzikálně fixován, pokoven, sublimován při - 98 °C a ihned zpět, zvětšení 5 000 krát.....	64
Obr. č. 28 Snímek vzorku taveného sýra s 45 % (w/w) sušiny a 40 % (w/w) TVS, fyzikálně fixován, pokoven, sublimován při - 98 °C a ihned zpět, zvětšení 5 000 krát.....	64
Obr. č. 29 Snímek vzorku taveného sýra s 35 % (w/w) sušiny a 40 % (w/w) TVS, fyzikálně fixován, pokoven, sublimován při - 95 °C po dobu 3 minut, zvětšení 5 000 krát.....	65
Obr. č. 30 Snímek vzorku taveného sýra s 35 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS, fyzikálně fixován, pokoven, sublimován při - 95 °C po dobu 3 minut, zvětšení 5 000 krát.....	66
Obr. č. 31 Snímek vzorku taveného sýra s 35 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS, fyzikálně fixován, nepokoven, nesublimován, prohlížen 90 minut v mikroskopu, zvětšení 5 000 krát.	67
Obr. č. 32 Snímek vzorku taveného sýra s 45 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS, fyzikálně fixován, nepokoven, nesublimován, prohlížen 30 minut v mikroskopu, zvětšení 5 000 krát.	67

- Obr. č. 33 *Elastický (G' ; plné symboly) a ztrátový (G'' ; prázdné symboly) modul modelových tavených sýrů s 35 % (w/w) obsahu sušiny a 40 % (w/w) obsahu tuku v sušině. 69*
- Obr. č. 34 *Elastický (G' ; plné symboly) a ztrátový (G'' ; prázdné symboly) modul modelových tavených sýrů s 35 % (w/w) obsahu sušiny a 50 % (w/w) obsahu tuku v sušině. 69*
- Obr. č. 36 *Elastický (G' ; plné symboly) a ztrátový (G'' ; prázdné symboly) modul modelových tavených sýrů s 45 % (w/w) obsahu sušiny a 50 % (w/w) obsahu tuku v sušině. 70*
- Obr. č. 35 *Elastický (G' ; plné symboly) a ztrátový (G'' ; prázdné symboly) modul modelových tavených sýrů s 45 % (w/w) obsahu sušiny a 40 % (w/w) obsahu tuku v sušině. 70*
- Obr. č. 37 *SEM snímek vzorku taveného sýra (35 % (w/w) sušiny a 40 % (w/w) TVS), 4 hodiny v OsO_4 , bez chloroformu, zvětšení 5 000 krát. 72*
- Obr. č. 38 *SEM snímek vzorku taveného sýra (35 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS), 24 hodin v OsO_4 , bez chloroformu, zvětšení 5 000 krát. 72*
- Obr. č. 39 *SEM snímek vzorku taveného sýra (45 % (w/w) sušiny a 40 % (w/w) TVS), 4 hodiny v OsO_4 , bez chloroformu, zvětšení 5 000 krát. 73*
- Obr. č. 40 *SEM snímek vzorku taveného sýra (45 % (w/w) sušiny a 50 % (w/w) TVS), 4 hodiny v OsO_4 , bez chloroformu, zvětšení 5 000 krát. 73*

SEZNAM TABULEK

Tab. č. 1 <i>Naměřené hodnoty pH a celkové sušiny modelových vzorků tavených sýrů.</i>	51
Tab. č. 2 <i>Hodnoty pevnosti gelu ($A_F; Pa \cdot s^{1/z}$) a interakčního faktoru ($z; -$) modelových tavených sýrů.</i>	71