

Antimikrobní působení vybraných potravinářských přídavných látek na bakterie

Miroslav Jaššo

Bakalářská práce
2022

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická
Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Miroslav Jaššo**
Osobní číslo: **T20883**
Studijní program: **B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin**
Specializace: **Technologie potravin**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Antimikrobní působení vybraných potravinářských přídatných látek na bakterie**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Potravinářské přídatné látky s antimikrobními účinky textendash charakterizace, vlastnosti, využití v potravinách.
2. Antimikrobní účinky vybraných potravinářských přídatných látek.

Praktická část:

1. Stanovení růstových křivek a minimální inhibiční koncentrace vybraných látek u grampozitivních a gramnegativních bakterií pomocí záznamníku růstu v podmínkách *in vitro*.

Vyhodnocení výsledků.

Formulace závěrů.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] Davidson, P. M., Sofos, J.N., Branen, A.L. Antimicrobials in food. 3rd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005, 706 s. ISBN 0-8247-4037-8.
- [2] Ferreira, J.P. et al. Effects of the components of two antimicrobial emulsions on food-borne pathogens. Food Control, 21: 227-230. 2010
- [3] Glass, K. et al. Inhibition of Clostridium botulinum in Model Reduced-Sodium Pasteurized Prepared Cheese Products. Journal of Food Protection, 80: 1478-1488. 2017
- [4] Ju, J. et al. The inhibitory effect of plant essential oils on foodborne pathogenic bacteria in food. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 59:3281-3292. 2019
- Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně

Vedoucí bakalářské práce: **prof. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

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

Termín odevzdání bakalářské práce: **20. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Robert Gál, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 25. února 2022

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – 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);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Polyfosforečnanové tavicí soli jsou dnes běžně používanou součástí tavených sýrů. V práci byl srovnán antimikrobní účinek nově vyvinuté polyfosforečnanové směsi Cremosal AB4 s komerčně již nějakou dobou dostupnou směsí JOHA HBS. Antimikrobní účinek byl testován na osmi grampozitivních kmenech náležících do rodů *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* a *Lactobacillus* a na jednom gramnegativním kmenu rodu *Escherichia*. V tekutém médiu bylo měření optické hustoty při vlnové délce $\lambda = 850$ nm testováno pět koncentrací z každé fosforečnanové tavicí soli: 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 % a 0,5 % (w/v). Výsledky ukazují, že obě polyfosforečnanové směsi inhibují všechny testované bakterie již při koncentraci 0,1 % (w/v) s výjimkou *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 a *Escherichia coli* CCM 3954. Cremosal AB4 má tedy stejně dobré antimikrobní účinky jako JOHA HBS, v případě *Enterococcus durans* CCDM 53 výsledky ukazují účinek ještě lepší.

Klíčová slova: tavený sýr, tavicí sůl, polyfosforečnany, JOHA, Cremosal AB4, inhibiční působení

ABSTRACT

Making of processed cheese relies on emulsifying salt mixtures containing polyphosphates these days. The antimicrobial effect of a new polyphosphate mixture Cremosal AB4 has been tested, comparing it to the JOHA HBS mixture that has been commercially available for several years. The effect has been observed *in vitro* on growth of eight gram-positive strains of the genera of *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* and *Lactobacillus* and on one gram-negative strain of the genus *Escherichia*. Five concentrations of the agents were tested - 0.1 %, 0.2 %, 0.3 %, 0.4 % and 0.5 % (w/v) and measured in wavelength 850 nm. The results show that both polyphosphates stop the growth of the selected bacteria at the lowest concentration (0.1 %) except of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141 and *Escherichia coli* CCM 3954. It was concluded that Cremosal AB4 has similar antimicrobial effect as JOHA HBS and showed even better effect in the case of *Enterococcus durans* CCDM 53.

Keywords: processed cheese, emulsifying agents, polyphosphates, JOHA, Cremosal AB4, inhibitory effect

Rád bych poděkoval prof. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D., za odborný a profesionální přístup k celému projektu a k mé práci. Její poznatky, odborné rady a připomínky při psaní této bakalářské práce obohatily mé znalosti, prohloubily můj zájem o problematiku a podržely mě v těžších fázích projektu.

Mé díky patří rovněž laborantkám pracujícím na mikrobiologii Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí FT UTB. Kdykoliv během testování byly ochotné pomoci prakticky s čímkoliv, čím jsem si nebyl sám jistý a také díky nim jsem se stal v laboratoři mnohem zručnější.

A za podporu během studia i vypracování práce patří poděkování také mé rodině a snoubence, bez kterých by byl tento úkol o poznání těžší.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 TAVENÉ SÝRY	12
1.1 HISTORIE VÝROBY	12
1.2 DEFINICE TAVENÝCH SÝRŮ V ČR	12
1.3 SUROVINOVÁ SKLADBA A VLIV SLOŽEK NA VLASTNOSTI TAVENÉHO SÝRA	13
1.3.1 Sýr	13
1.3.2 Mléčné složky	14
1.3.3 Stabilizátory	14
1.3.4 Látky upravující pH	15
1.3.5 Látky upravující organoleptické vlastnosti	15
1.4 TECHNOLOGIE TAVENÝCH SÝRŮ.....	16
1.4.1 Výběr surovin.....	16
1.4.2 Snížení velikosti částic sýra	16
1.4.3 Smíchání surovin do surovinové směsi.....	17
1.4.4 Tavení surovinové směsi.....	17
1.4.5 Homogenizace.....	18
1.4.6 Balení a chlazení výrobku.....	19
2 MIKROBIOLOGIE TAVENÝCH SÝRŮ	20
2.1 BAKTERIE TVOŘÍCÍ SPORY	20
2.2 JINÉ GRAMPOZITIVNÍ BAKTERIE.....	21
2.3 OSTATNÍ MIKROORGANISMY	22
2.4 VLIV SLOŽENÍ VÝROBKU A TECHNOLOGIÍ NA MIKROORGANISMY VE VÝROBKU	22
2.4.1 Tavicí teplota a teplota skladování.....	22
2.4.2 Vodní aktivita.....	23
2.4.3 pH výrobku.....	23
2.4.4 Obsah tuku	23
2.4.5 Tavicí soli.....	24
3 TAVICÍ SOLI	25
3.1 FOSFOREČNANY	25
3.2 CITRONANY.....	27
4 NOVÉ POSTUPY VE VÝROBĚ TAVENÝCH SÝRŮ	28
4.1 REDUKCE OBSAHU SODÍKU	28
4.2 REDUKCE OBSAHU TUKU A POUŽITÍ ROSTLINNÝCH NÁHRAD	28
4.3 FORTIFIKACE TAVENÝCH SÝRŮ	29
II PRAKTICKÁ ČÁST	30
5 CÍL PRÁCE	31

6	POUŽITÉ MATERIÁLY A ZAŘÍZENÍ	32
6.1	PŘÍSTROJE A POMŮCKY	32
6.2	BAKTERIÁLNÍ KMENY	32
6.3	KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	33
6.4	CHEMIKÁLIE.....	33
7	METODIKA	34
7.1	UCHOVÁVÁNÍ MIKROORGANISMŮ A PŘÍPRAVA SUSPENZE	34
7.2	PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ FOSFOREČNANOVÝCH SOLÍ	34
7.3	STANOVENÍ INHIBIČNÍCH ÚČINKŮ FOSFOREČNANOVÝCH SMĚSÍ.....	34
8	VÝSLEDKY A DISKUZE	36
8.1	VLIV POLYFOSFOREČNANOVÝCH SMĚSÍ NA <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	36
8.2	VLIV POLYFOSFOREČNANOVÝCH SMĚSÍ NA <i>CLOSTRIDIUM BUTYRICUM</i>	37
8.3	VLIV POLYFOSFOREČNANOVÝCH SMĚSÍ NA <i>CLOSTRIDIUM SPOROGENES</i>	38
8.4	VLIV POLYFOSFOREČNANOVÝCH SMĚSÍ NA <i>BACILLUS CEREUS</i>	38
8.5	VLIV POLYFOSFOREČNANOVÝCH SMĚSÍ NA <i>GEOBACILLUS</i> <i>STEAROTHERMOPHILUS</i>	39
8.6	VLIV POLYFOSFOREČNANOVÝCH SMĚSÍ NA <i>ENTEROCOCCUS DURANS</i>	40
8.7	VLIV POLYFOSFOREČNANOVÝCH SMĚSÍ NA <i>LACTOCOCCUS LACTIS</i> SUBSP. <i>LACTIS</i>	42
8.8	VLIV POLYFOSFOREČNANOVÝCH SMĚSÍ NA <i>LACTOBACILLUS HELVETICUS</i>	43
8.9	VLIV POLYFOSFOREČNANOVÝCH SMĚSÍ NA <i>ESCHERICHIA COLI</i>	44
8.10	SOUHRNNÁ DISKUSE.....	45
	ZÁVĚR	48
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	49
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	53
	SEZNAM OBRÁZKŮ	54
	SEZNAM TABULEK.....	55

ÚVOD

Tavené sýry se poprvé v historii objevují přibližně před stoletím. Vznikají jako nový způsob, jak prodloužit údržnost sýrů a dát jim nový tvar. V populaci se v průběhu desetiletí rychle uchytily a produkce se násobně zvyšuje.

Základní surovinovou skladbou tavených sýrů jsou přírodní (vyzrálé a čerstvé) sýry, složky mléka, stabilizátory, potravinářské přídatné látky upravující pH a ochucující látky.

Nedílnou součástí tavených sýrů jsou ovšem tavicí soli, které za vysoké teploty dávají vznik tavenině rozrušením kaseinových můstků. Díky nim sýr dostává plastickou formu, umožňují ho tvarovat, roztírat a mají vliv na jeho výslednou konzistenci.

Tak jako přírodní sýry a ingredience, i tavené sýry a tavené sýrové výrobky jsou náchylné k mikrobiální kontaminaci, ať už primární (vstup kontaminace ze suroviny), tak sekundární (vstup kontaminace v průběhu zpracování). I když běžně používané tavicí teploty ± 90 °C zneškodní většinu vegetativních buněk, je zde riziko přežití sporulátů, termofilních mikroorganismů nebo sekundární kontaminace po tavení.

Jedním ze způsobů, jak lze růst případných kontaminantů ve výrobku regulovat, je použití tavicích solí na bázi polyfosforečnanů, které mají prokázané antimikrobní účinky.

V praktické části je srovnána antimikrobní účinnost nově komerčně dostupné tavicí soli Cremosal AB4 s již několik let používanou komerční tavicí solí JOHA HBS. Cílem práce je zjistit, zda má Cremosal AB4 alespoň tak dobré antimikrobní vlastnosti jako JOHA HBS.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 TAVENÉ SÝRY

1.1 Historie výroby

Počátky tavených sýrů jsou datovány do prvních dekád 20. století, kdy ve Švýcarsku v roce 1911 Walter Gerber a Fritz Stettler vyrobili první tavený sýr z ementálu. Ementál prošel strouháním a s přidavkem citronanu sodného se jim za tepla podařilo vytvořit stejnorodou hmotu. Nezávisle od nich v USA se o totéž pokoušel James Lewis Kraft a v roce 1916 si nechal podobný výrobek patentovat, ovšem bez použití tavicích solí. První patent, který tavicí soli zahrnoval (jmenovitě fosforečnan sodný), byl vydán Georgovi Herbertovi Garstinovi v roce 1921 (Ustunol, 2009; Kraft, 1916; Garstin, 1921).

Původním důvodem pro výrobu takového typu výrobku byl zájem prodloužit údržnost sýrů a umožnit změnu textury a tvaru sýrových výrobků. Postupným vývojem v průběhu desetiletí si však tavené sýry jako takové vysloužily celosvětově první příčky v způsobu konzumace sýrů a zdaleka neslouží jenom k původním účelům – dnes jsou díky této technologii zpracování k dispozici řady výrobků, které se odlišují jak technologickými, výživovými, tak i senzorickými parametry. Z dalších výhod tavení sýrů je možno vyjmenovat vhodnost pro dětskou populaci, velice dobrý zdroj bílkovin, vápníku a dalších minerálních látek v porovnání s rostlinnou potravou, relativně nízkou výrobní cenu a všestranné použití během přípravy pokrmů včetně jejich dochucení (Guinee, 2011a).

1.2 Definice tavených sýrů v ČR

Vyhláška 397/2016 Sb. o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje definuje skupinu tavený sýr jako „sýr, který byl tepelně upraven tavením“. Dále vedle něj definuje skupiny „tavený sýrový výrobek“ a „tavený mléčný výrobek“ které jsou tepelně ošetřeny tavením. Tavený sýrový výrobek a tavený mléčný výrobek obsahují oba více než 5 % (w/w) laktózy a tavený sýrový výrobek musí obsahovat minimálně 50 % (w/w) sušiny. Výrobce je (mimo jiné) v těchto případech povinen uvést na výrobku název skupiny, obsah tuku nebo tuku v sušině, obsah sušiny a případné ochucující látky (Vyhláška 397/2016 Sb., 2020).

Podle technické normy ČSN 57 1300 Tavené sýry a tavené sýrové výrobky – Společná ustanovení je tavený sýr vyroben za přidavku tavicích solí, s nebo bez přidavku dalších přídatných látek při zachování obsahu laktózy maximálně 5 % (w/w). Tavenému sýrovému

výrobku vymezuje, že minimálně 51 % (w/w) sušiny pochází ze sýra (Vyhláška 397/2016 Sb., 2020; ČSN 57 1300, 2000).

1.3 Surovinová skladba a vliv složek na vlastnosti taveného sýra

Přehled povolených složek jiných, než sýry z výše uvedené vyhlášky vyjmenovává, které další komponenty je možno použít pro výrobu tavených sýrů a výrobků. V případě tavených a tavených roztíratelných sýrů se jedná o: máslo, máselný tuk, smetanu a máselný koncentrát (v případě, že tavený výrobek je pojmenován druhově pouze ke standardizaci obsahu tuku), jedlou sůl, bakteriální kultury, enzymy, koření, sezónní zeleninu a ostatní zdravotně nezávadné potraviny. Pokud výrobek není druhově pojmenován, lze využít i ostatní mléčné složky do stanoveného limitu obsahu laktózy. U tavených sýrových a tavených mléčných výrobků se povoluje (za předpokladu splnění požadavků pro danou skupinu) použití také ostatních mléčných složek a cukrů se sladícím účinkem (Vyhláška 397/2016 Sb., 2020).

ČSN 57 1300 dále doplňuje, že v případě tavených sýrů druhově pojmenovaných i nepojmenovaných nesmí překročit obsah nemléčných surovin 1/6 obsahu sušiny výrobku, dodávají jenom sensorickou jakost a nesmí se jednat o cukry (ČSN 57 1300, 2000).

1.3.1 Sýr

Základní surovinou pro výrobu tavených sýrů je přírodní sýr, který dodává finálnímu výrobku sensorickou i technologickou jakost. Obsah přírodního sýra v tavených sýrech dosahuje až 98 % (w/w) (Guinee, 2004). Z technologického hlediska je značnou výhodou možnost použití i sýrů, které by nemohly být prodány v tržní síti, zejména pro mechanické vady. Mikrobiologicky kontaminované sýry jsou k použití nevhodné, jelikož i když běžně používané tavicí teploty usmrtí vegetativní formy mikroorganismů, nejsou dostatečné pro usmrcení spor (například u sporulujících bakterií druhů *Bacillus*, *Clostridium* nebo plísní). Dále, během vzduchotěsného balení může použití takovýchto surovin napomáhat v rozvoji anaerobům. I v případě, že by finální výrobek nebyl kontaminován a všechny životaschopné formy mikroorganismů byly usmrceny, je zde riziko přítomnosti bakteriálních a mykotoxinů ve finálním výrobku (Buňka et al., 2009).

Z obecných zásad používání přírodních sýrů možno dodat, že vyzrálé sýry přidávají výslednému výrobku charakteristické sensorické rysy a činí tavený sýr měkčí, roztíratelnější, ale i rozpadovější. Přídavek nevyzrálých sýrů naopak pomáhá zejména texturním vlastnostem, sýr je hustší, poddajnější na krájení a gumovější. Nevýhodami jsou horší tavitelnost a riziko tvorby bublin vzduchu v tavenině z důvodu její vyšší viskozity. Z důvodů snížení nákladů na suroviny se v dnešních dobách výrobci uchylují zejména k použití nevyzrálých sýrů, mléčných i nemléčných složek, což má za následek snížení sensorické jakosti a kvality výrobku (Buňka et al., 2009; Guinee, 2011b).

1.3.2 Mléčné složky

Obsah produktů mléčné výroby můžeme rozdělit podle funkce, kterou má daná surovina plnit ve finálním výrobku – úprava tuku v sušině a úprava obsahu sušiny.

Co se týče úpravy tuku v sušině, často využívanými surovinami jsou máslo, máselný tuk zbavený vody, smetana a máselný koncentrát (Vyhláška 397/2016 Sb., 2020; ČSN 57 1300, 2000). Výsledné množství tuku v sušině v taveném sýru má klíčovou roli na jeho sensorické a technologické jakosti. Podle obsahu tuku v sušině lze také výrobek označit jako vysokotučný (s obsahem tuku v sušině alespoň 60 % w/w) a nízkotučný (do 30 % w/w). Tavené sýry s obsahem tuku v sušině mezi 30 a 60 % (w/w) se podle obsahu tuku neoznačují. Platí zde pravidlo, že čím vyšší je obsah tuku ve výrobku, tím je výrobek měkčí, roztíratelnější a má plnější chuť. (ČSN 57 1300, 2000; Buňka et al., 2009).

Mezi suroviny využívané pro úpravu množství sušiny patří v dnešní výrobě zejména sušené mléko, sušená syrovátka a kaseinové koncentráty nebo hydrolyzáty. Při udržení reologických parametrů levně zvyšují obsah sušiny v taveném sýru a umožňují její standardizaci za cenu snížení sensorické jakosti. Naopak, pro snížení obsahu sušiny, změkčení a zvýšení roztíratelnosti je možné přidat do taveného sýra vodu (Guinee, 2011).

1.3.3 Stabilizátory

Stabilizátory pomáhají lépe solubilizovat proteiny přítomné v tavenině a vytvoření potřebné proteinové matrix. Mezi tyto stabilizátory patří zejména tavicí soli na bázi fosforečnanů a citronanů. Princip působení tavicích solí je popsán níže v části 1.4.

Pokud je zapotřebí snížení obsahu sušiny a tuku ve finálním výrobku, nacházíme zde využití spektra hydrokoloidů, které umožní ve výrobku vázat vysoké množství vody bez narušení konzistence výrobku. Jedná se o přírodní a modifikované škroby, guarovou gumu, xanthany, karboxymethylcelulózu nebo karagenany (Guinee, 2011; Buňka et al., 2009).

1.3.4 Látky upravující pH

Pro vytvoření stabilní proteinové matrix je důležité, aby tavenina měla správné pH – jmenovitě mezi 5,6 až 6,0. Pokud se pH dostává postupně od optimálního rozmezí směrem dolů, přibližujeme se izoelektrickému bodu obsažených proteinů, zvyšují se jejich vzájemné interakce a dochází k agregaci. Ve výsledném produktu pak nalezneme agregáty proteinů, které narušují uniformitu taveniny, negativně ovlivňují její reologické parametry a přispívají k drobitosti sýra.

Pokud by pH od optimální hranice vzrostlo, vzdalujeme se od izoelektrického bodu přítomných proteinů, kvůli záporně nabitým iontům se snižují jejich vzájemné interakce a struktura nabývá na gelovitosti a měkké konzistenci. V případě vzdálení se od izoelektrického bodu dál nejsme schopni ze směsi surovin utavit homogenní taveninu, protože se proteinová matrix vytvoří pouze v omezené podobě (Guinee, 2011a; Buňka et al., 2009)

Pro úpravu pH se používají organické kyseliny – kyselina mléčná, octová, citronová, nebo fosforečná (Guinee, 2011a).

1.3.5 Látky upravující organoleptické vlastnosti

Úpravu organoleptických vlastností finálního výrobku dosáhneme přidáním kuchyňské soli, v případě taveného sýrového a taveného mléčného výrobku lze zvýšit sladkou chuť přidáním jednoduchých cukrů.

Ochucené tavené sýry mohou být vyráběny za pomoci koření, zeleniny, produktů masného průmyslu, nebo obecně za přídavku požadovaných potravin. Všechny tyto přidané potraviny musí splňovat požadavky na zdravotní nezávadnost a mohou být použity pouze v množství, které postačuje na to, aby výsledný výrobek nabyl charakteristickou chuť a vůni (Vyhláška 397/2016 Sb., 2020).

1.4 Technologie tavených sýrů

Výroba tavených sýrů a tavených výrobků pozůstává z několika důležitých kroků: (Guinee, 2011a):

1. výběr surovin
2. snížení velikosti částic sýra
3. smíchání všech surovin do surovinové směsi
4. tavení surovinové směsi
5. homogenizace (volitelný krok)
6. balení a chlazení výrobku

1.4.1 Výběr surovin

Výběru surovin pro konkrétní výrobek se věnovala podkapitola 1.3. Technologické parametry jsou ovlivněny zejména základní chemickou strukturou taveného výrobku – obsahem sušiny, obsahem tuku v sušině, obsahem dusíkatých látek a pH. Senzorická jakost je ovlivněna zejména typem použitých surovin – vyžralost přírodního sýra, podíl přírodního sýra v sušině výrobku, jakost vstupních surovin, obsah tuku ve výrobku a přídavky ochucujících složek (sůl, jednoduché cukry, nemléčné potraviny) (Guinee, 2011a; Guinee, 2011b; Buňka et al., 2009).

1.4.2 Snížení velikosti částic sýra

Sýr se před smícháním všech surovin do směsi očistí pomocí automatických škrabek (zábrana proti průniku případné povrchové kontaminace do produktu) a poté nařeže na menší části. Tyto putují do vysokorychlostního drtiče, kde je přírodní sýr rozsekán a nadrcen na dostatečně malé částice (pod 1 mm). Tímto se zvýší stejnorodost výsledné taveniny, velikost povrchu sýra a prostupnost vody do sýra. Vyšší velikost povrchu následně umožní rovnoměrnější průstup tepla do hmoty a zvýší rychlost tvoření proteinové matrix (Guinee, 2004).

1.4.3 Smíchání surovin do surovinové směsi

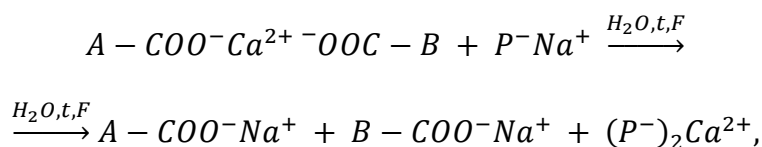
Provádí se v tzv. tavicím kotli, kde poté dochází k vlastnímu tavení surovinové směsi. Přídavek všech surovin do směsi a jejich předmíchání rovnoměrně roz distributes částice směsi a připraví je na rovnoměrné tavení. V této fázi je možno přidat i tzv. krém – taveninu z předchozí várky (anglicky rework), jejíž použitím je zvýšena stabilita struktury při krémování a zjemní konzistenci výsledného produktu (Guinee, 2004; Buňka et al., 2009).

1.4.4 Tavení surovinové směsi

Tavicí kotel je následně uzavřen a evakuován. Pomocí přímého vstříku páry (Buňka et al., 2009) je směs za neustálého míchání rychle zahřívána na tzv. tavicí teplotu. Tato teplota je v literatuře uváděna s relativně širokým rozmezím 75-120 °C, ovšem reálně využívané teploty v diskontinuálním způsobu výroby jsou okolo 90 °C (Guinee 2011a; Guinee 2004; Buňka et al., 2009). Pokud se tavený sýr vyrábí kontinuálním procesem, tavení probíhá v nerezových trubkách při teplotách 130-145 °C a kromě pasteračního má i sterilační efekt (Buňka et al., 2009).

Tato fáze výroby je klíčová pro vytvoření proteinové matrix, která probíhá z následujících kroků:

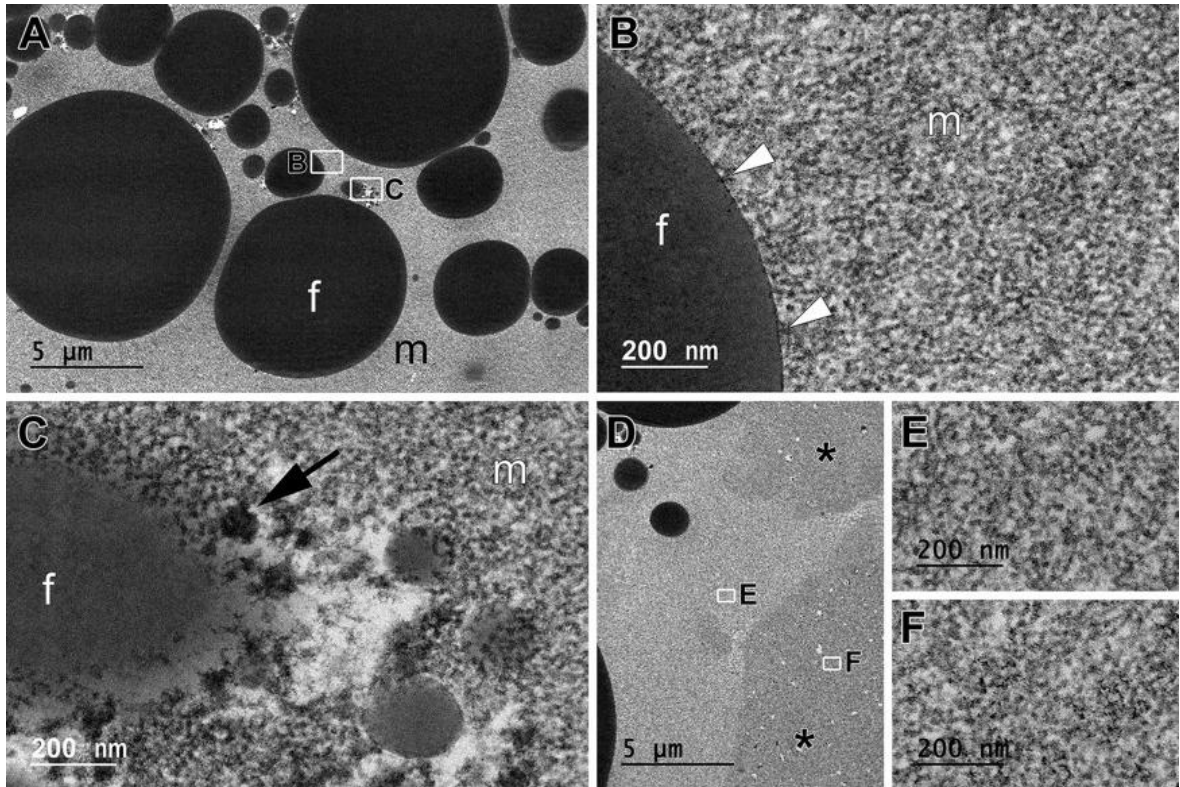
- Monovalentní kationty z tavicích solí vychytávají vápník z fosfoserinových můstků mezi kaseinem podle rovnice:



kde A a B značí zbytky kaseinu nebo jejich hydrolyzátů, P značí fosforečnanovou část tavicí soli, t značí působení tavicí teploty a F značí míchání (volně podle Guinee, 2004; Buňka et al., 2009).

- Díky vychytání vápenatých kationtů pomocí tavicí soli a nahrazení monovalentními kationty se přítomné zbytky kaseinu rozpustí v tavenině a můžou uplatnit své emulgační schopnosti (Guinee, 2011a; Buňka et al., 2009)

- Vysoká teplota rozpouští tukové kuličky v sýru a za současného míchání se snižuje jejich průměr. Vzniká hustá emulze o/v, kde proteiny slouží jako emulgátory (Guinee, 2011a).



Obrázek 1: TEM snímek vzorku taveného sýra (Vollmer et al., 2021)

Na obrázku 1 se nachází snímek z transmisního elektronového mikroskopu (TEM) vzorku taveného sýra po 15 minutách tavení. Jsou zde zformované tukové kuličky o průměrech cca 0,5-10 μm emulgované do proteinové matrix (1A). Na rozhraní (1B) mezi tukovou kuličkou (f) a kaseinovou matrix (m) můžeme pozorovat tenkou vrstvu kaseinu (šipky), která brání agregaci tukových kuliček. Můžeme ji pozorovat také v difundované podobě jako pronikání kaseinové matrix k tukové oblasti (1C). Na obrázku 1D můžeme pozorovat detail kaseinové matrix, s přiblížením (1E) a s přiblížením na oblast s vysokým výskytem elektronů (1F).

1.4.5 Homogenizace

Je volitelnou součástí výroby taveného sýra. Ihned po tavení můžeme hmotu homogenizovat pomocí vysokotlakového homogenizátoru, kterým docílíme snížení

velikostí tukových kuliček a jejich lepšímu rozptylu v rámci hmoty. Oba tyto faktory pak zvyšují stabilitu výsledného produktu v čase (Guinee, 2011a).

1.4.6 Balení a chlazení výrobku

Pro zachování údržnosti výrobku je výhodné plnit utavený sýr do obalů ještě za vysoké teploty (nad 60 °C). Využívá se plastových kelímků, zatavených tub, zatavených hliníkových obalů aj. Po zabalení je výhodné výrobek rychle zchladit, jelikož čím déle výrobek chladne, tím se stává tužší a méně roztíratelný. Při dlouhém chlazení je zde také riziko rozvoje sporulátů (Buňka et al., 2009).

2 MIKROBIOLOGIE TAVENÝCH SÝRŮ

Původ kontaminace tavených sýrů zahrnuje oblasti od produkce mléka až po výrobu konečného výrobku. Čím déle jsou meziprodukty výroby tavených sýrů skladovány, tím vyšší riziko nesou pro výsledný produkt (Oliveira et al., 2016).

Z mikrobiologického hlediska je velice významné, aby výsledný produkt neobsahoval žádné životaschopné formy mikroorganismů, nebo jejich množství musí být nezávažné pro zdraví spotřebitele. Vzhledem k používaným tavicím teplotám mezi 70-95 °C a rychlému ochlazení na skladovací teploty 4-8 °C dochází k usmrcení vegetativních buněk téměř všech známých bakterií, kvasinek a plísní. Nedochází ovšem k usmrcení spor, a proto je nutno se zaměřit zejména na sporulující mikroorganismy, jelikož hodnoty produktu (pH > 4,5, vodní aktivita $a_w > 0,85$) to umožňují (Guinee, 2004; Buňka et al., 2009; Buňková a Buňka, 2015). Použití vyšších tavicích teplot není vhodné, protože dochází ke snížení kvality taveného sýra (Lazárková et al., 2010).

2.1 Bakterie tvořící spory

Sporulující bakterie relevantní pro problematiku tavených sýrů zahrnují zejména (Buňka et al., 2009; Buňková a Buňka, 2015):

- Psychrofilní a psychrotrofní anaerobní bakterie rodu *Clostridium* (*C. estertheticum*, *C. gasigenes* nebo *C. algidicarnis*)
- Mezofilní bakterie s optimem růstu mezi 15 a 45 °C – anaerobní hnilobné bakterie s proteolytickou aktivitou (*C. sporogenes*, *C. putrefaciens*), acidotolerantní anaerobní bakterie máselného kvašení (*C. butyricum*, *C. tyrobutyricum* a *C. pasteurianum*) a fakultativní anaeroby (*Bacillus cereus*, *Nialia circulans*, *Paenibacillus macerans* a *Brevibacillus laterosporus*).
- Termofilní bakterie s optimální teplotou růstu nad 45 °C (*Weizmannia coagulans*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*)

V oblasti produkce mléka je možnost přenosu sporulátů, které může být použito do výroby zrajícího sýru. Toto zahrnuje striktní anaeroby rodu *Clostridium* i aerobní rod *Bacillus* a jemu podobné – obsah spor se na farmách v blízkosti produkce mléka pohybuje v koncentracích 10^5 – 10^6 CFU/g. Další možnou cestou kontaminace sporuláty je silážovaná

potrava dobytka (zejména *C. tyrobutyricum*), nebo jejich výkaly. V průběhu samotné výroby je možnost přenesení spor do výrobku skrz zpracované mléčné suroviny (sýry, sušené mléko, sušená syrovátka), nemléčné suroviny (koření – až 10^3 CFU/g, potraviny), nebo obalový materiál (Oliveira et al., 2016). Pokud klostridia nebo bacily a jím podobné rody kontaminují výsledný výrobek v dostatečném množství, spory vyklíčí ve vegetativní formy a způsobí kažení výrobku nebo i epidemie (Lücking et al., 2013).

Změny na výrobku v případě kontaminace klostridii zahrnují snížení pH výrobku (v důsledku produkce organických kyselin), produkci plynu, nežádoucího aroma (produkce těkavých kyselin) a strukturální změny (v důsledku proteolýzy). Z analýzy patogenního zástupce rodu *Clostridium* (*C. botulinum*) bylo zjištěno, že minimální pH a teplota pro růst jsou $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ a pH 4,7. Spory si uchovávají při skladování při $2\text{--}4\text{ }^{\circ}\text{C}$ životaschopnost po dobu dvou až pěti let při zachování produkce botulotoxinu (Buňka et al., 2009).

Kontaminace sporami rodu *Bacillus* zahrnují změny podobné „běžnému“ kažení potravin – nežádoucí aroma a změny ve struktuře. Důležitým faktorem je ovšem nebezpečí vzniku onemocnění gastrointestinálního traktu, které se projevují průjmy a zvraceními (Oliveira et al., 2016) a jsou způsobeny „skupinou *Bacillus cereus*“, která zahrnuje 8 kmenů schopných způsobit alimentární onemocnění: *Bacillus cereus*, *B. anthracis*, *B. cytotoxicus*, *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. toyonensis*, *B. thuringiensis* a *B. pseudomycoides* (EFSA, 2016).

2.2 Jiné grampozitivní bakterie

Vedle sporulujících bakterií, které jsou častějším rizikem pro kontaminaci kvůli jejich schopnosti přežít tavicí teploty, nelze zapomínat na jiné grampozitivní nesporeující bakterie. Mezi ně lze zařadit například *Staphylococcus aureus*, který je schopen se rozmnožovat při teplotě $7\text{ }^{\circ}\text{C}$ a pH 4,0 (Buňková a Buňka, 2015). Do produktu přechází sekundární kontaminací, pokud je hotová tavenina balena při teplotách nižších, než $60\text{--}70\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Buňka et al., 2009). I když nebyl pozorován nárůst, stafylokoky přežily v tavených sýrech 180 ($5\text{ }^{\circ}\text{C}$) a 270 dní ($22\text{ }^{\circ}\text{C}$) (Linton a Harper, 2008).

Dalším z patogenů způsobujících alimentární onemocnění je *Listeria monocytogenes*, kterou může být produkt kontaminován obdobně jako stafylokoky. V Evropské unii je povinností tuto hrozbu při každé výrobě vyhodnotit a doporučit pro daný produkt vhodné

skladovací podmínky (Martinez-Rios et al., 2019; Nařízení komise ES č. 2073/2005, 2020). Nebezpečí pro skupinu tavených sýrů spočívá v schopnosti některých kmenů tohoto druhu se úspěšně rozmnožovat i při teplotě 1 °C a pH 4,8 (Buňka et al., 2009).

2.3 Ostatní mikroorganismy

Vedle grampozitivních sporulujících a nesporulujících bakterií je zde potenciální nebezpečí kontaminace zástupci rodu *Salmonella*, patogenní *Escherichia coli* O157:H7, bakteriemi rodů *Lactobacillus* a *Pseudomonas* způsobujících jejich kažení, nebo mikromycetami rodů *Penicilium* a *Cladosporium* (Buňková a Buňka, 2015). Podmínky růstu a sledování tavených sýrů v čase jsou podrobně popsány ve studii (Linton a Harper, 2008).

2.4 Vliv složení výrobku a technologií na mikroorganismy ve výrobku

Výslednou mikroflóru výrobku lze ovlivnit několika způsoby. Mezi ně můžeme zařadit například tavicí teplotu, vodní aktivitu taveného sýra a jeho pH, obsah tuku a tavicích solí (Buňka et al., 2009).

2.4.1 Tavicí teplota a teplota skladování

Jak již bylo zmíněno výše, použitá tavicí teplota má zásadní vliv na životaschopnost mikroorganismů v hotovém výrobku. Pokud se jedná o vsádkovou výrobu, běžně používané tavicí teploty 70-95 °C postačí pouze k eliminaci vegetativních buněk mikroorganismů. Tyto výrobky je pak nutno skladovat v chladírenských teplotách a mají dobu skladování omezenou v řádech měsíců (Guinee, 2004). V případě, že to obal dovoluje, je možno takovéto výrobky sterilizovat v obalu, inaktivovat vyskytující se spory a podstatně navýšit dobu skladování (Lazárková et al., 2010).

Produkce tavených sýrů kontinuální metodou vyžaduje tavení v krátkém čase (sekundy) o vysoké teplotě (až do 145 °C), sterilační efekt takovéto metody ji pak při aseptickém naplnění výrobku do obalu mikrobiologicky staví na úroveň sýrů sterilizovaných v obalu (Buňka et al., 2009).

2.4.2 Vodní aktivita

Dostupnost vody je jedním z klíčových faktorů pro přežití a rozmnožování se mikroorganismů. Jakmile klesá pod určitou hranici, závislou na typu zkoumaného mikroorganismu, daný mikroorganismus ztrácí schopnost rozmnožovat se a následně nepřežívá. Mikroorganismy mají vyvinuté mechanismy pro ochranu před osmotickým stresem – například hromadění K^+ iontů, glutamátu, glutaminu, GABA aj. (Jay et al., 2005).

Vodní aktivita a_w tavených sýrů se pohybuje v rozmezí 0,91 až 0,96 (Buňková a Buňka, 2015). Tyto hodnoty většinou postačují k inhibici produkce botulotoxinu *C. botulinum* – studie (Glass a Doyle, 2013) ukazuje, že u hodnot pod 0,944 nebyl nalezen v produktu žádný botulotoxin, u hodnot nad 0,957 byl. Mezi těmito hodnotami záleželo na konkrétním složení výrobku – zejména obsahu sušiny, soli, pH výrobku a obsahu hydrogenufosforečnanu sodného.

2.4.3 pH výrobku

pH tavených sýrů se pohybuje v rozmezí 5,6 až 6,0. Tato slabě kyselá oblast není pro růst mnoha mikroorganismů překážkou, ovšem konečný antimikrobní účinek záleží na typu organických kyselin obsažených ve výrobku. Vhodnou přísadou se jeví kyselina mléčná, kterou je možno omezit produkci botulotoxinu. Její sodné a draselné soli ji zabraňují taktéž, ovšem bez snížení pH (Buňka et al., 2009).

2.4.4 Obsah tuku

Bylo prokázáno, že se snižujícím se obsahem tuku ve výrobku se snižuje produkce botulotoxinu, růst sporotvorných anaerobů a také snižuje aktivitu mnoha bakterií jako například rod *Salmonella* nebo *Listeria monocytogenes* (Buňková a Buňka, 2015). Pro tuto aktivitu existuje více teorií – tuk může tvořit ochrannou bariéru vůči antimikrobním látkám ve vodní fázi, nebo lipofilní část antimikrobních látek může interagovat spíše s tukem než s fosfolipidovou membránou bakterií. Rovněž snižuje účinnost více antimikrobních látek – monolaurinu, nisinu produkovaným například *Lactococcus lactis*, kyseliny sorbové nebo β -hydroxymáselné kyseliny (Buňka et al., 2009; Glass a Doyle, 2013).

2.4.5 Tavicí soli

Antimikrobní účinky tavicích solí jsou popsány převážně vůči grampozitivním mikroorganismům. Princip inhibice spočívá v jejich vlastnosti pevněji vázat polyvalentní kationty kovů (vápník, hořčík) než monovalentní. Váží se na teichoové kyseliny buněčné stěny bakterií, vytvářejí zde můstky a membránu jako celek destabilizují. V jiných případech bylo prokázáno, že vazbou divalentních iontů kovů blokuje vybrané nezbytné fyziologické procesy růstu. Ve výsledku tak vykazují baktericidní efekt, který roste s prodlužující se lineární délkou řetězce fosforečnanu. Navíc, fosforečnany s dlouhým řetězcem inhibují germinaci spor u sporotvorných bakterií. (Buňka et al., 2009).

Studie (Akhtar et al., 2008) zjistila, že testované polyfosforečnany snižují sporulaci *Clostridium perfringens* izolované z kontaminovaných potravin.

3 TAVICÍ SOLI

Tavicí soli tvoří funkčně zásadní skupinu ingrediencí tavených sýrů a tavených sýrových výrobků.

Nejčastěji využívané, komerčně dostupné tavicí soli jsou především směsi sodných solí kyseliny fosforečné a citronové (například JOHA[®] PZ6, JOHA[®] 189, JOHA[®] HBS nebo Solva[®] NZ 10), ovšem můžeme se v literatuře setkat i se solemi kyselin mléčné, jablečné a vinné, amonnými solemi a glukonolaktony (Guinee, 2011a; Martinez-Rios et al., 2019).

3.1 Fosforečnany

Fosforečnany jsou solemi kyseliny trihydrogenfosforečné H_3PO_3 a mají společnou $(PO_4)^-$ skupinu. Pokud má daná sůl pouze jednu fosforečnou skupinu, řadíme ji mezi ortofosforečnan (ortofosfát). Za správných podmínek (vysoká teplota) mohou ve vodném roztoku dvě takovéto skupiny odštěpit vodu a kondenzovat za vzniku polymeru. Takovýto polymer, tvořen dvěma $(PO_4)^-$ skupinami, nazýváme pyrofosforečnan (pyrofosfát). Pokud se této kondenzace účastní více fosforečných skupin, může vzniknout (podle podmínek) lineární polymer, který nazýváme polyfosforečnan (polyfosfát), nebo v případě kondenzace do kruhu metafosforečnan (metafosfát). Kondenzace může proběhnout také ve všech rovinách za vzniku 3D struktury, ultrafosforečnanu (ultrafosfátu) (Guinee, 2011a; Buňka et al., 2009).

V rámci Evropského společenství je použití těchto látek limitováno nařízením (Nařízení EP a Rady č. 1333/2008, 2021). Tabulka 1 uvádí seznam povolených fosforečnanových tavicích solí, jejich chemické vzorce a E-kódy.

Tabulka 1: Seznam povolených tavicích solí na bázi fosforečnanů (Nařízení EP a Rady č. 1333/2008, 2021)

Skupina	Látka	Vzorec	E-kód
Ortofosforečnany	Fosforečnan sodný	Na_3PO_4	E339
	Hydrogenfosforečnan sodný	NaH_2PO_4	
	Dihydrogenfosforečnan sodný	Na_2HPO_4	
	Fosforečnan draselný	K_3PO_4	E340
	Hydrogenfosforečnan draselný	KH_2PO_4	
	Dihydrogenfosforečnan draselný	K_2HPO_4	
Pyrofosforečnany	Difosforečnan sodný	$\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$	E450
	Dihydrogendifosforečnan sodný	$\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$	
	Difosforečnan draselný	$\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$	
	Dihydrogendifosforečnan draselný	$\text{K}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$	
Trifosforečnany	Trifosforečnan sodný	$\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_{10}$	E451
	Trifosforečnan draselný	$\text{K}_3\text{P}_3\text{O}_{10}$	
Polyfosforečnany	Polyfosforečnan sodný	$(\text{NaPO}_3)_n$	E452
	Polyfosforečnan draselný	$(\text{KPO}_3)_n$	

Důležitou schopností fosforečnanů je úprava pH ve výsledném výrobku. Vzhledem k tomu, že ideální pH tavených sýrů se pohybuje v úzkém rozmezí mezi 5,6 – 6,0 (viz. kapitola 1), tak i menší odchylka od tohoto rozmezí znamená zhoršení jakosti výrobku. Různé fosforečnany mají ve svých roztocích rozličné pH, a proto se do výsledné směsi tavicích solí volí komponenty tak, aby kromě jiných funkcí směs zabezpečila jeho optimální hodnotu. Do jisté míry se také chovají jako pufr (Buňka et al., 2009).

Fosforečnany jakožto tavicí soli mají také schopnost odštěpovat z prostředí a vázat na sebe mono-, i polyvalentní kationty kovů. Tato schopnost z nich dělá nepostradatelné suroviny pro použití v tradiční výrobě tavených sýrů. Vazba kationtů je ovlivněna více faktory, zejména (Guinee, 2011a; Buňka et al., 2009)

- Konkrétním kationtem – tavicí soli mají vyšší schopnost vázat polyvalentní ionty (Ca^{2+} , Mg^{2+}), než monovalentní (Na^+ , K^+)
- Teplotou – s vyšší teplotou se rovnováha reakce posouvá dále na stranu vazby s polyvalentním kationtem
- Délkou řetězce – čím vyšší je počet atomů fosforu v molekule, tím afinita ke kationtům (a reaktivita) obecně roste

3.2 Citronany

Citronanové tavicí soli jsou odvozeny od kyseliny citronové. Reálně se využívají trisodné citronany vzhledem k faktu, že mono- a disodné soli příliš snižují pH a potažmo snižují stabilitu emulze. Výsledkem pak často bývá uvolnění vody. Jejich vlastnosti jsou podobné ortofosforečnanům – mají slabou afinitu k polyvalentním kationtům (přesto vyšší, než k monovalentním) a nízkou schopnost solubilizovat proteiny. Vyznačují se ovšem vysokou pufrovací kapacitou. V praxi je můžeme najít ve směsích s fosforečnanovými tavicími solemi, především aplikovaných do bločků a plátků (Guinee, 2011a).

4 NOVÉ POSTUPY VE VÝROBĚ TAVENÝCH SÝRŮ

Technologie výroby tavených sýrů a tavených sýrových výrobků se jakožto jedno z mladších odvětví nadále vyvíjí, aby splnilo požadavky moderní doby. Vývoj se v posledním desetiletí zaměřuje například na redukci obsahu sodíku, tuků (a použití rostlinných náhrad za mléčný tuk), nebo fortifikaci různými probiotiky, prebiotiky a vitaminy (Talbot-Walsh et al., 2018).

4.1 Redukce obsahu sodíku

Vzhledem k rostoucímu trendu kardiovaskulárních onemocnění se v populaci doporučuje obecně snížit příjem sodíku. Tavené sýry obsahují jak chlorid sodný, tak 2-3 % tavicích solí na bázi sodných fosforečnanů, a tedy jsou bohatým zdrojem sodíku (Talbot-Walsh et al., 2018).

Snížit obsah sodíku ovšem není jednoduché – snížení chloridu sodného vede k snížení stability produktu, snížení dávkování tavicích solí zase zhoršuje homogenizaci tuku v produktu (Talbot-Walsh et al., 2018). Řešením se zdá být do jisté míry náhrada tavicích solí na bázi sodíku draslíkem (Buňka et al., 2012; Nogueira et al., 2018). Při použití draselných solí se ovšem zvyšuje hořkost produktu, a tudíž klesá jeho kvalita (Nogueira et al., 2018).

Řešením tohoto problému může být kombinace tavicích solí na bázi sodíku a draslíku (Talbot-Walsh et al., 2018) nebo použití tzv. „blokátorů hořkosti“ – argininu, kvasničného extraktu a hydrolyzátů ze zeleniny (Ferrão et al., 2018; Khetra et al., 2016).

4.2 Redukce obsahu tuku a použití rostlinných náhrad

Snížení obsahu tuku má v tavených sýrech, a hlavně v tavených sýrových výrobcích řadu výhod – snižuje cenu produktu a energetickou nálož těchto výrobků (Talbot-Walsh et al., 2018). Bylo ovšem zjištěno (Johnson et al., 2009), že chuť a textura výrobku je ovlivněna, pokud se obsah tuku ve výrobku sníží o více než 50 %. Tímto způsobem tedy nelze jednoduše tuk ze surovinové skladby odstranit.

Jedním ze způsobů, jak snížit výrobní náklady a snížit obsah cholesterolu v tavených sýrových výrobcích, je zaměnit mléčný tuk za rostlinný (Cunha et al., 2012; Rinaldoni et al.,

2014). Nová studie (Ramel a Marangoni, 2018) ukázala, že 49 % náhrada mléčného tuku za řepkový s přidavkem 5 % ovesného proteinu zachovala technologické parametry vyrobeného výrobku. Tato studie ukazuje potenciál do budoucna pro použití rostlinných náhrad tuku bez obětování technologických parametrů produktu (Talbot-Walsh et al., 2018).

4.3 Fortifikace tavených sýrů

Fortifikace tavených sýrů a tavených sýrových výrobků se stala oblíbeným způsobem výrobců, jak zvýšit zájem zákazníků o své výrobky. Fortifikace se zabývají zejména probiotiky, prebiotiky, vitaminy a jinými makronutrienty (Talbot-Walsh et al., 2018).

První úspěšnou fortifikací probiotické kultury za použití spor rodu *Bacillus* provedli (Ehsannia a Sanjabi, 2016). Jak je již popsáno v kapitole 2, grampozitivní spory lehce přežívají tavicí teploty a poté se vyskytují ve finálním výrobku. Po 60denním skladování byla ve výrobku zjištěna koncentrace bakterií více než 10^6 CFU/g a tudíž splňuje požadavky na označení jako probiotický výrobek. Analýzou konkrétních druhů rodu *Bacillus* v tavených sýrech „requeijão cremoso“ se zabývá například studie (Soares et al., 2019).

Jiným způsobem než použití živé probiotické kultury, je zakomponování prebiotik, která slouží jako zdroj živin pro mikroflóru lidského trávicího ústrojí, jako jsou například rody *Lactobacillus* nebo *Bifidobacterium* (Ferrão et al., 2016). K tomuto lze využít ze skupiny hydrokoloidů například inulin, galaktooligosacharidy, nebo xylooligosacharidy a zároveň tak částečně nahradit obsah tuku ve výrobku (Ferrão et al., 2018; El-Assar et al., 2018; Belsito et al., 2017).

Další variantou, jak zvýšit zájem o výrobky, nahradit látky ztracené tepelnou úpravou nebo zvýšit variabilitu nutrientů v tavených sýrech a tavených sýrových výrobcích, je fortifikace vitaminy (Talbot-Walsh et al., 2018). Vitaminy rozpustné v tucích (A, D, E) jsou dobře tepelně stabilní a po jejich přidání do surovinové směsi se dostávají do produktu v doporučených koncentracích (Hrncirik, 2010; Johnson et al., 2005).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Pro účely vypracování práce byl cíl vymezen následovně:

- Srovnat v podmínkách *in vitro* inhibiční účinky polyfosforečnanových směsí Cremosal AB4 a JOHA HBS vůči osmi grampozitivním bakteriím a pro srovnání vůči jedné gramnegativní bakterii.
- Antimikrobní účinky obou polyfosforečnanových směsí testovat u všech bakterií v pěti různých koncentracích.

6 POUŽITÉ MATERIÁLY A ZAŘÍZENÍ

6.1 Přístroje a pomůcky

- Osobní bioreaktor Biosan RTS-1C
- 50 ml zkumavky TubeSpin®
- Automatické mikropipety Biohit, Nichyrio
- Anaerocult® A
- Zásobní lahev CO₂ s příslušenstvím
- Autokláv Systec 2540EL
- Biologický termostat Memmert INE 600
- FlowBox Clean Air
- Densi-la-meter
- Vortex Mixer Labnet
- Ostatní běžné pomůcky a vybavení mikrobiologické laboratoře (předvážky, analytické váhy, lednice, laboratorní sklo, bakteriologické kličky, plastové zkumavky, stojany na zkumavky, špičky pro automatické pipety)

6.2 Bakteriální kmeny

V bakalářské práci bylo použito devět bakteriálních kmenů, které pocházejí ze Sbírký mlékárenských mikroorganismů Laktoflora® při Výzkumném ústavu mlékárenském (CCDM), z České sbírky mikroorganismů (CCM) a ze Sbírký zoopatogenních mikroorganismů při Výzkumném ústavu veterinárního lékařství (CAPM).

- *Staphylococcus aureus subsp. aureus* CCM 3953
- *Clostridium butyricum* CAPM 6342
- *Clostridium sporogenes* CAPM 6329
- *Bacillus cereus* CCM 2010
- *Geobacillus stearothermophilus* CCM 2062

- *Enterococcus durans* CCDM 53
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141
- *Lactobacillus helveticus* CCDM 142
- *Escherichia coli* CCM 3954

6.3 Kultivační média

- Masopeptonový agar (MPA)
- Masopeptonový bujon (MPB)
- MRS agar (de Man, Rogosa and Sharpe agar)
- MRS bujon (de Man, Rogosa and Sharpe broth)
- Reinforced clostridial agar (RCA)
- Reinforced clostridial broth (RCB)
- Mueller-Hinton broth

Všechna kultivační média byla získána z HiMedia (Bombai, Indie).

6.4 Chemikálie

- Cremosal AB4 (Fosfa a.s., Břeclav) – tavicí sůl na polyfosforečnanové bázi
- JOHA HBS (BK Giulini GmbH, Ladenburg) – tavicí sůl na polyfosforečnanové bázi
- Kyselina askorbová

7 METODIKA

7.1 Uchovávání mikroorganismů a příprava suspenze

Mikroorganismy byly uchovávány na miskách s MPA (*S. aureus*, *B. cereus*, *G. stearothermophilus*, *E. coli*), MRS agaru (*Ent. durans*, *L. lactis subsp. lactis*, *Lactobacillus helveticus*) a RCA v případě obou klostridií. Pro přípravu bakteriální suspenze k očkování bylo použito MPB, MRS broth a RCB. Daný kmen byl kultivován po dobu 24 hodin při teplotě 30 ± 1 °C (*G. stearothermophilus* při 55 °C) za aerobních podmínek, klostridia a *Lactobacillus helveticus* za anaerobních podmínek (pomocí vyvíječe anaerobního prostředí).

7.2 Příprava zásobních roztoků fosforečnanových solí

Zásobní roztoky polyfosforečnanových směsí byly připraveny o koncentraci 10 % (přepočteno na obsah P₂O₅) rozpuštěním příslušné navážky v destilované vodě. Sterilizace proběhla filtrací "za studena" s filtrem o porozitě 0,22 μm. Uchovávání zásobních roztoků probíhalo v uzavřených nádobách v temnu při pokojové teplotě. Maximální doba uchovávání byla jeden týden.

7.3 Stanovení inhibičních účinků fosforečnanových směsí

Pro sledování inhibičních účinků polyfosforečnanových směsí bylo vybráno osm gram pozitivních bakterií a pro srovnání jedna gram negativní. Stanovení citlivosti probíhalo při pěti koncentracích každé ze směsí (0,1 %; 0,2 %; 0,3 %; 0,4 % a 0,5 % w/v, přepočteno na obsah P₂O₅). Odpovídající množství zásobních roztoků bylo pipetováno přímo do sterilních 50 ml zkumavek TubeSpin® a doplněno sterilním bujonem do celkového objemu 30 ml (Mueller-Hinton broth pro *S. aureus*, *B. cereus*, *G. stearothermophilus*, *Ent. durans* a *E. coli*, RCB pro klostridie a MRS broth pro *L. lactis subsp. lactis* a *Lactobacillus helveticus*).

Bakteriální suspenze byla standardizována na hodnotu McFarland 0,5. V případě bakterií *G. stearothermophilus*, *C. butyricum*, *C. sporogenes* a *Lbc. helveticus* byla suspenze standardizována na hodnotu 1,0 z důvodu, že při standardizaci na hodnotu 0,5 byla optická hustota příliš nízká vzhledem k velikosti buněk a citlivosti přístroje. Po standardizaci bylo do připravených zkumavek očkováno 100 μl homogenizované suspenze sledované bakterie.

Paralelně byla každá koncentrace očkována do dvou zkumavek, pro sledování neinhibovaného růstu byla kultivována i pozitivní kontrola – místo adekvátního množství

připraveného zásobního roztoku polyfosforečnanové soli byla pipetována sterilní destilovaná voda. Pro stanovení případné kontaminace kultivačního bujonu, respektive pro kontrolu aseptické práce, byla paralelně kultivována negativní kontrola, kdy zkumavky obsahovaly odpovídající množství polyfosforečnanové směsi a byly doplněny do objemu 30 ml příslušným bujonem, aniž by byly zaočkovány bakteriální suspenzí.

Před vlastní kultivací a po ní byl vždy odebrán vzorek o objemu 1 ml. Tento vzorek byl vyředěn desítkovou řadou a v objemu 100 μ l očkovan na Petriho misky a byl stanoven počet mikroorganismů (jako CFU/ml). Použité kultivační půdy byly shodné s půdami, na kterých se mikroorganismy uchovávaly (viz. kapitola 7.1).

Vlastní kultivace a záznam růstu probíhala na přístroji Biosan RTS-1C. Tento záznamník růstu měří v nastavených časových intervalech hustotu buněčné suspenze při vlnové délce $\lambda = 850$ nm (v grafech zaznamenáváno jako OD). Fakultativně anaerobní a mikroaerofilní bakterie byly kultivovány ve zkumavkách s membránou propustnou pro plyny, klostridie byly kultivovány v hermeticky uzavřených zkumavkách. Pro podporu růstu anaerobních bakterií (klostridií) byl do vzorku přidán sterilní roztok kyseliny askorbové (na výslednou koncentraci 0,025 %) jako antioxidant a před hermetickým uzavřením zkumavky byla atmosféra ze zásobní lahve sterilně vyměněna za CO₂. Nastavení parametrů kultivace je popsáno níže v tabulce 2.

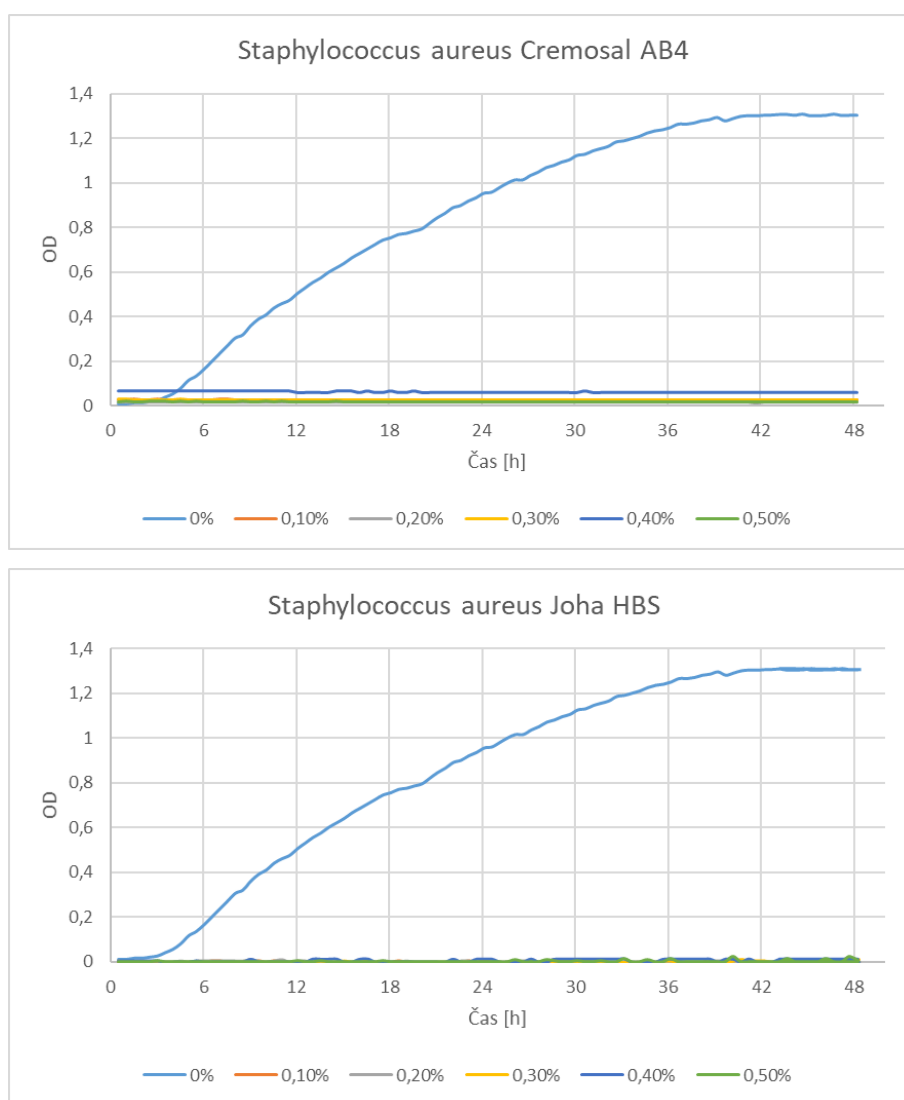
Tabulka 2: Parametry kultivace v osobním bioreaktoru RTS-1C

	Fakultativně anaerobní MO (Mueller-Hinton Broth)	Anaerobní nebo mikroaerofilní MO (klostridia, mléčné bakterie)
Rychlost otáček (RPM)	500	0
Frekvence reverzních otáček (s ⁻¹)	1	0
Teplota (°C)	30*	30
Objem vzorku (ml)	30	30
Frekvence měření (min)	30	30
*teplota inkubace <i>G. stearothermophilus</i> 55 °C		

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

8.1 Vliv polyfosforečnanových směsí na *Staphylococcus aureus*

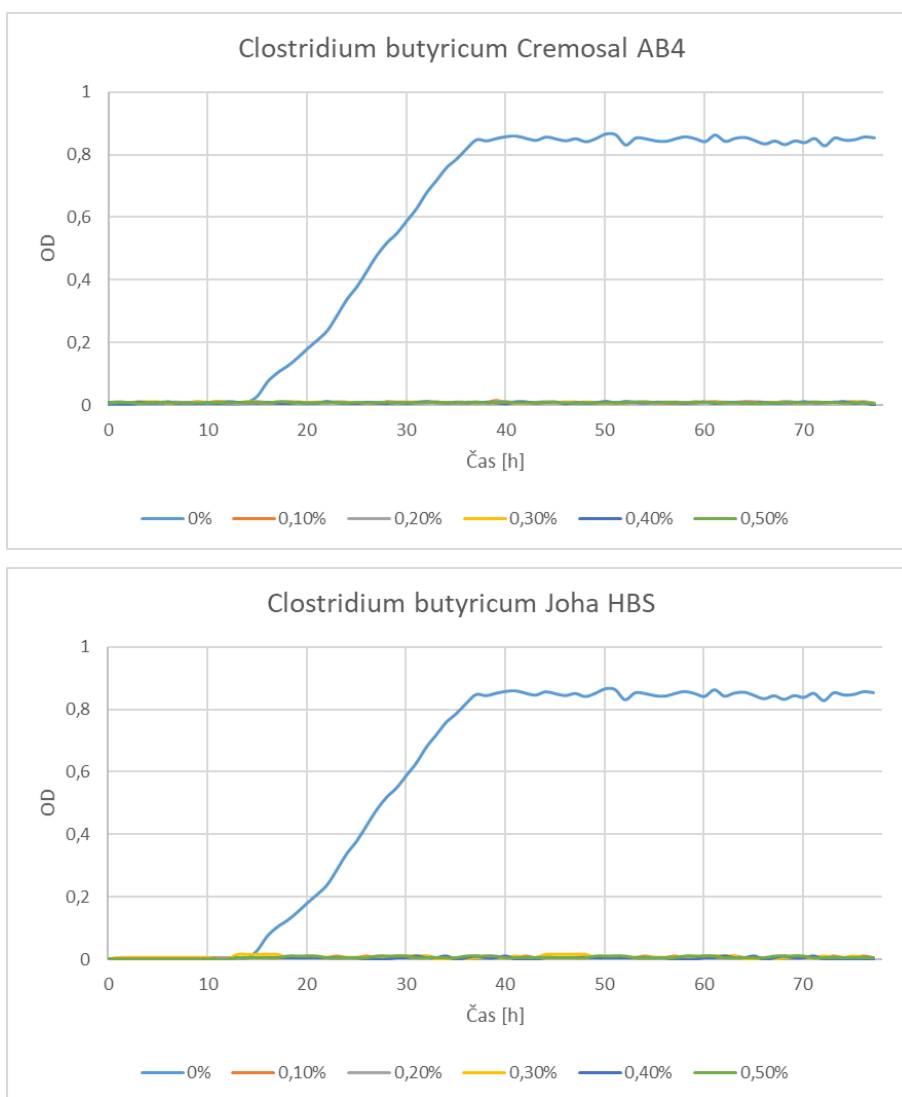
Staphylococcus aureus je grampozitivní, patogenní, nesporulující bakterie, která může kontaminovat tavené sýry převážně formou sekundární kontaminace (například přenos z kůže pracovníka). Na obrázku 2 lze vidět inhibiční efekt polyfosforečnanových testovaných solí na testovaný kmen *S. aureus* subsp. *aureus* CCM 3953. Před kultivací bylo zjištěno ve vzorcích $2,3-4,2 \cdot 10^3$ CFU/ml, v kontrolním bujónu ve stacionární fázi bylo naměřeno $5,1 \cdot 10^8$ CFU/ml. V případě přítomnosti obou testovaných solí byl obsah buněk bakterie limitován pod 10 CFU/ml.



Obrázek 2: Vliv testovaných fosforečnanových směsí na růst *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953

8.2 Vliv polyfosforečnanových směsí na *Clostridium butyricum*

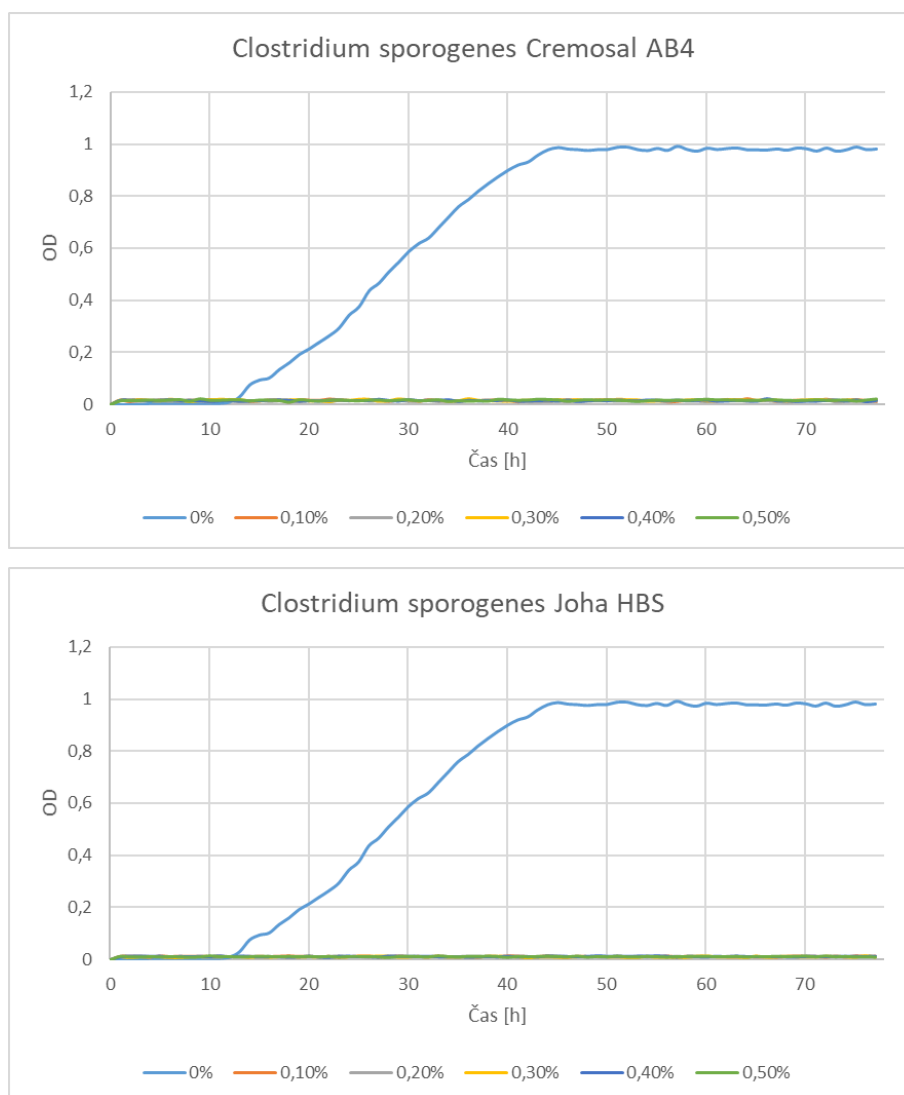
Clostridium butyricum je anaerobní sporulát, který je běžným kontaminantem přírodních sýrů (přispívá například k duření) (Buňka et al., 2009) a tudíž může přecházet i do sýrů tavených. Jak je uvedeno v podkapitole 2.4.5, polyfosforečnanové tavicí soli mají účinek i na sporulující bakterie, jejichž spory přežívají i tavicí teploty. Z obrázku 3 je patrné, že *C. butyricum* CAPM 6342 bylo plně inhibováno i koncentrací 0,1 % (w/v) v případě obou solí (< 10 CFU/ml). Před kultivací bylo zjištěno $2,8-3,7 \cdot 10^3$ CFU/ml, ve stacionární fázi kontroly bylo zjištěno $8,7 \cdot 10^7$ CFU/ml.



Obrázek 3: Vliv testovaných fosforečnanových směsí na růst *Clostridium butyricum* CAPM 6342

8.3 Vliv polyfosforečnanových směsí na *Clostridium sporogenes*

Clostridium sporogenes CAPM 6329 bylo testováno ze stejných důvodů jako *C. butyricum*. Jako v případě výše, *C. sporogenes* bylo inhibováno i nejnižší koncentrací tavící soli v obou případech (< 10 CFU/ml). Po zaočkování bylo naměřeno $2,8-3,7 \cdot 10^3$ CFU/ml, kontrola měla ve stacionární fázi $3,4 \cdot 10^8$ CFU/ml. Grafy z testování *C. sporogenes* se nachází na obrázku 4.

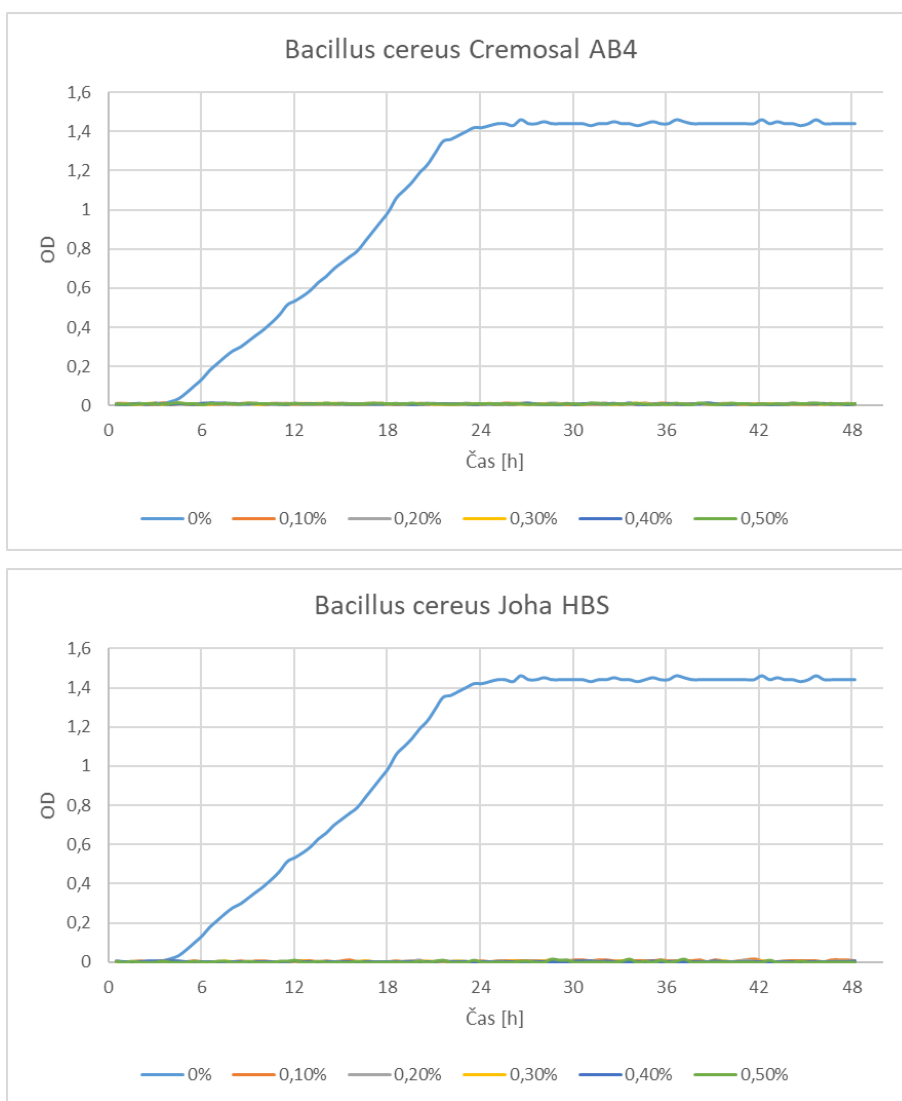


Obrázek 4: Vliv testovaných fosforečnanových směsí na růst *Clostridium sporogenes* CAPM 6329

8.4 Vliv polyfosforečnanových směsí na *Bacillus cereus*

Bacillus cereus je zástupcem aerobních grampozitivních sporulátů. Podobně jako u klostridií, běžné tavící teploty nedokáží eliminovat spory, a proto je vhodné testovat i

aerobního zástupce. Tento *Bacillus* je rovněž typickým kontaminantem přírodních, a tudíž i tavených sýrů. Z obrázku 5 je patrné, že *Bacillus cereus* CCM 2100 byl úplně inhibován použitím už 0,1 % (w/v) koncentrace obou testovaných solí. Ihned po zaočkování byla v bujónech zjištěna koncentrace $3,8-4,6 \cdot 10^3$ CFU/ml, ve stacionární fázi u kontrolního vzorku bez přídavku polyfosforečnanových směsí $6,5 \cdot 10^8$ CFU/ml. Testované fosforečnanové soli inhibovaly růst výše zmíněného kmene, na agarových plotnách nebyla zaznamenána přítomnost kolonií (< 10 CFU/ml).

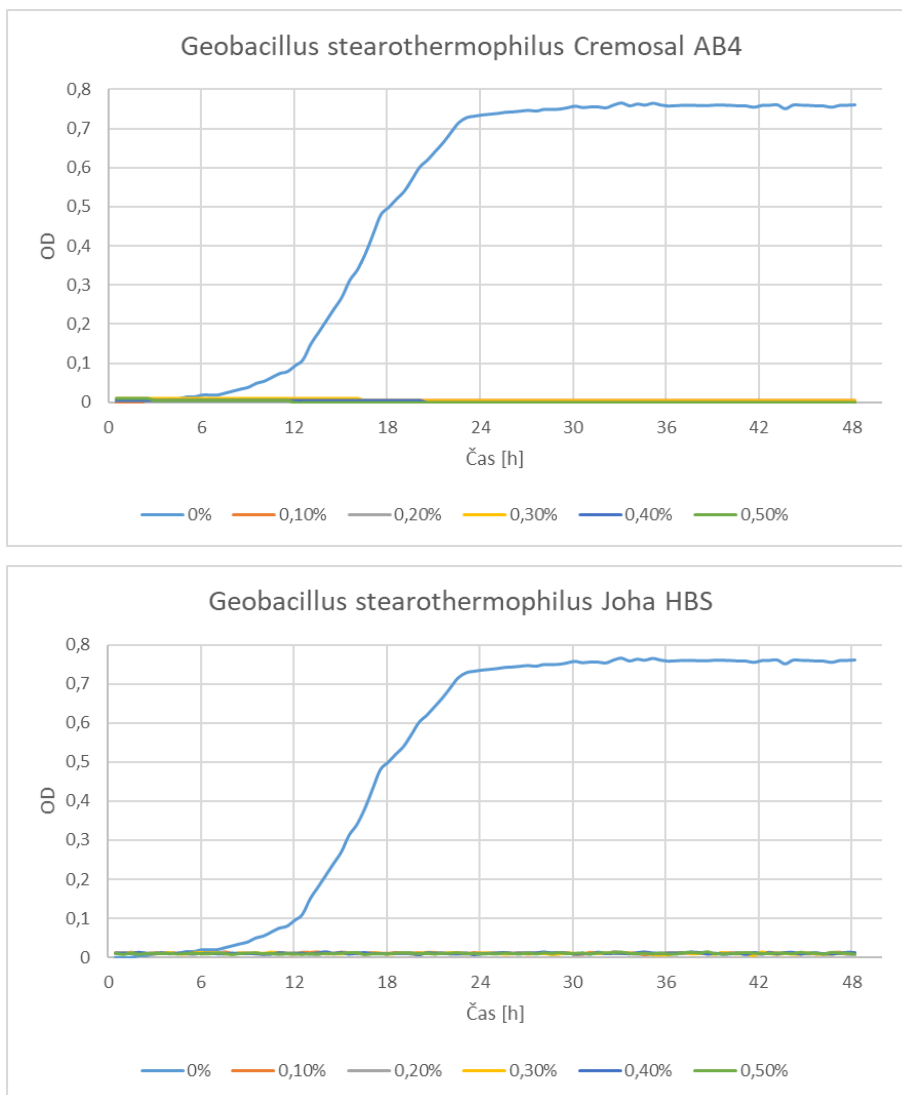


Obrázek 5: Vliv testovaných fosforečnanových směsí na růst *Bacillus cereus* CCM 2100

8.5 Vliv polyfosforečnanových směsí na *Geobacillus stearothermophilus*

Geobacillus stearothermophilus je dalším zástupcem aerobních sporulujících bakterií. Hlavním rozdílem mezi tímto mikroorganismem a *Bacillus cereus* je to, že *G.*

Geobacillus stearothermophilus je termofilní bakterií a má tak schopnost přežívat extrémní teploty – proto se také využívá jako referenční mikroorganismus na posouzení sterilační účinnosti (Rutala et al., 2019). Obdobně, jako v dalších případech vybraných sporulujících bakterií, i *G. stearothermophilus* CCM 2062 byl úplně inhibován (< 10 CFU/ml) i nejnižší koncentrací obou testovaných polyfosforečnanových směsí. V případě odběru vzorku před kultivací bylo zjištěno $2,1-3,0 \cdot 10^3$ CFU/ml, po kultivaci $9,2 \cdot 10^7$ CFU/ml, jak ukazuje obrázek 6.

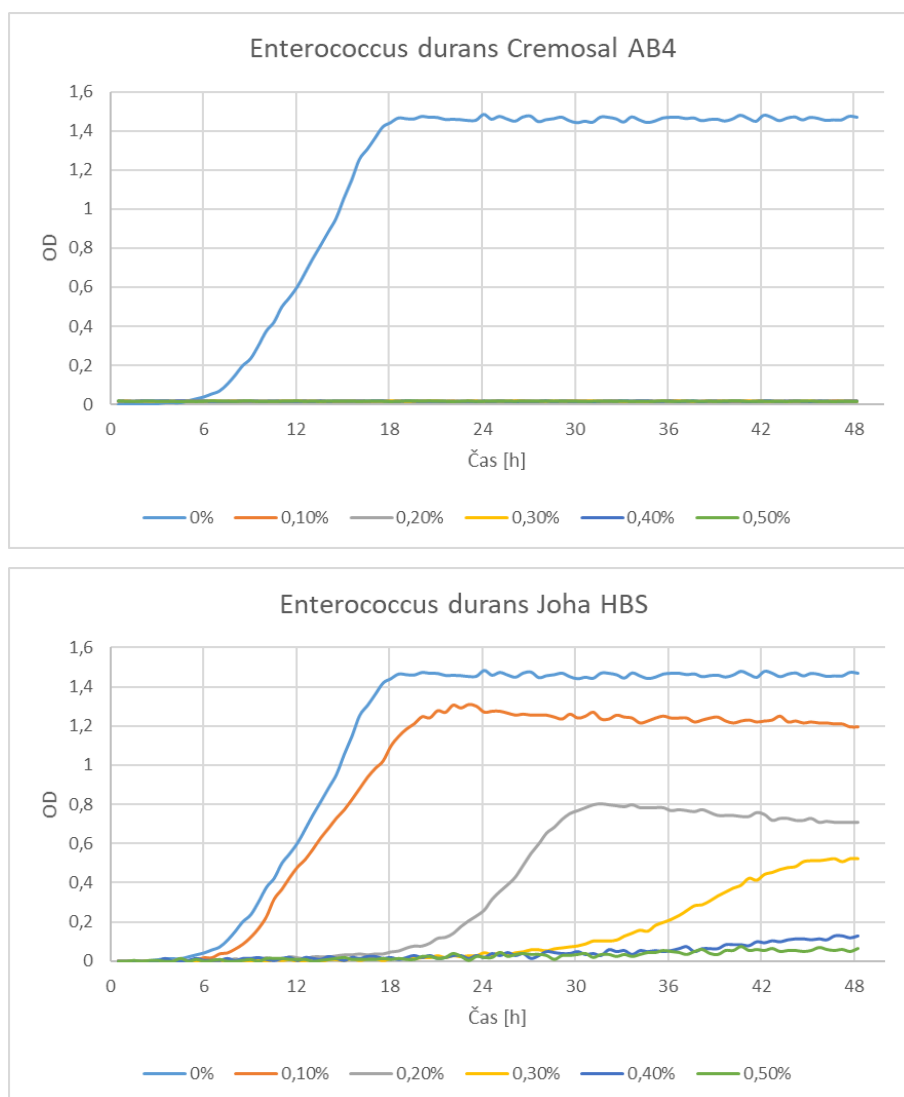


Obrázek 6: Vliv testovaných fosforečnanových směsí na růst *Geobacillus stearothermophilus* CCM 2062.

8.6 Vliv polyfosforečnanových směsí na *Enterococcus durans*

Enterococcus durans je grampozitivní nesporeující bakterie mléčného kvašení, která vykazuje vyšší odolnost vůči vyšším teplotám než jiné nesporeující bakterie. V přírodních

sýrech se může vyskytovat jako nezákyslová bakterie mléčného kvašení (Engels a Düsterhöft, 2022). Zbytková množství mikroorganismů a jejich metabolismus mohou zhoršovat jakost tavených sýrů. Jak ukazuje obrázek 7, působení dvou polyfosforečnanových směsí se v případě *Ent. durans* CCDM 53 lišilo.



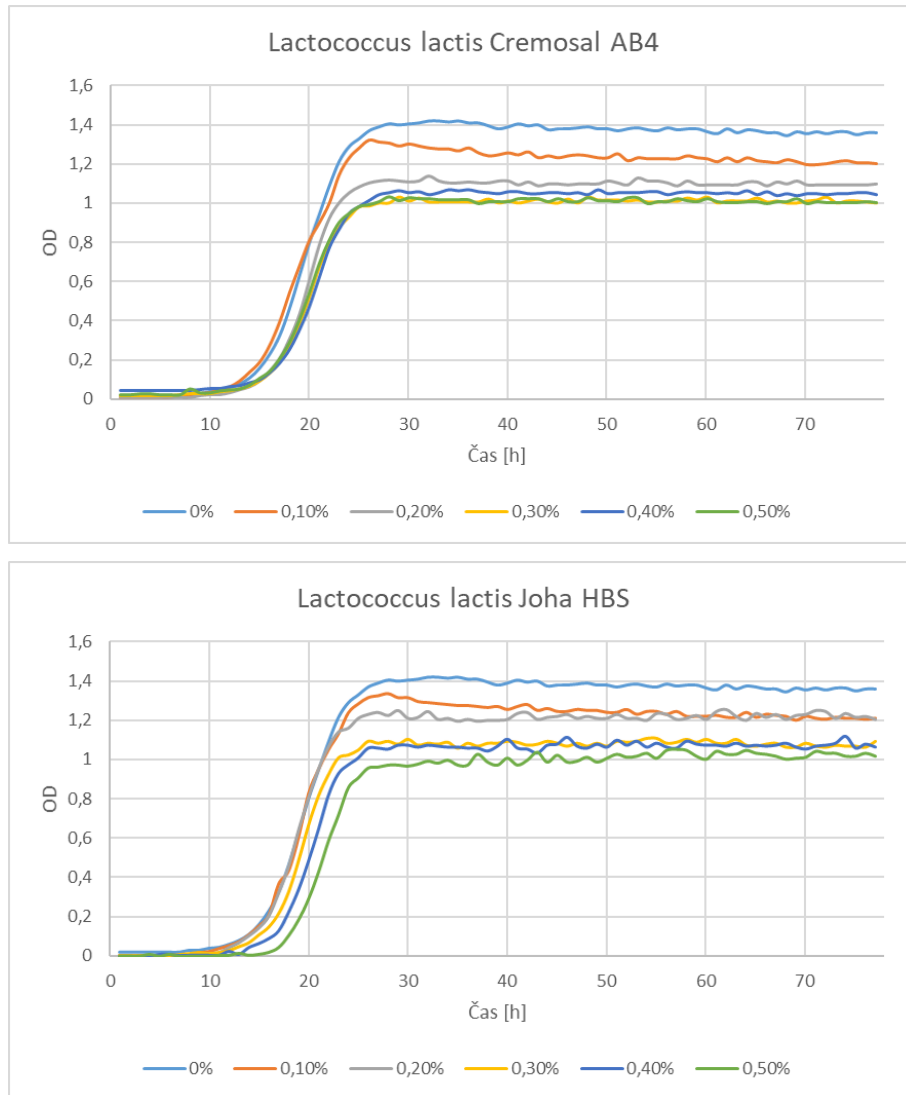
Obrázek 7: Vliv testovaných fosforečnanových směsí na růst *Ent. durans* CCDM 53

Cremsosal AB4 inhiboval růst při všech testovaných koncentracích, JOHA HBS pouze při dvou nejvyšších – 0,4 % a 0,5 % (w/v), při ostatních tří koncentracích se prodlužovala lag fáze růstu. Na začátku kultivace bylo v bujónech zjištěno $2,3-2,7 \cdot 10^3$ CFU/ml, ve stacionární fázi u pozitivní kontroly $7,9 \cdot 10^8$ CFU/ml. V případě všech pěti testovaných koncentrací směsi Cremsosal AB4 bylo naměřeno < 10 CFU/ml. Při koncentraci 0,1 % (w/v) směsi JOHA HBS došlo ke snížení počtu buněk přibližně o řád ($6,5 \cdot 10^7$ CFU/ml). Použití vyšších koncentrací dále snižovalo počet buněk - $9,6 \cdot 10^5$ CFU/ml po aplikaci 0,2 % (w/v)

a $5,7 \cdot 10^4$ CFU/ml po aplikaci 0,3 % (w/v). Při aplikaci 0,4 % a 0,5 % směsi JOHA HBS nebyl detekován žádný růst buněk (< 10 CFU/ml). Jak již bylo zmíněno výše a je patrné z obrázku 7, Cremosal AB4 při všech koncentracích růst zastavil (< 10 CFU/ml).

8.7 Vliv polyfosforečnanových směsí na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

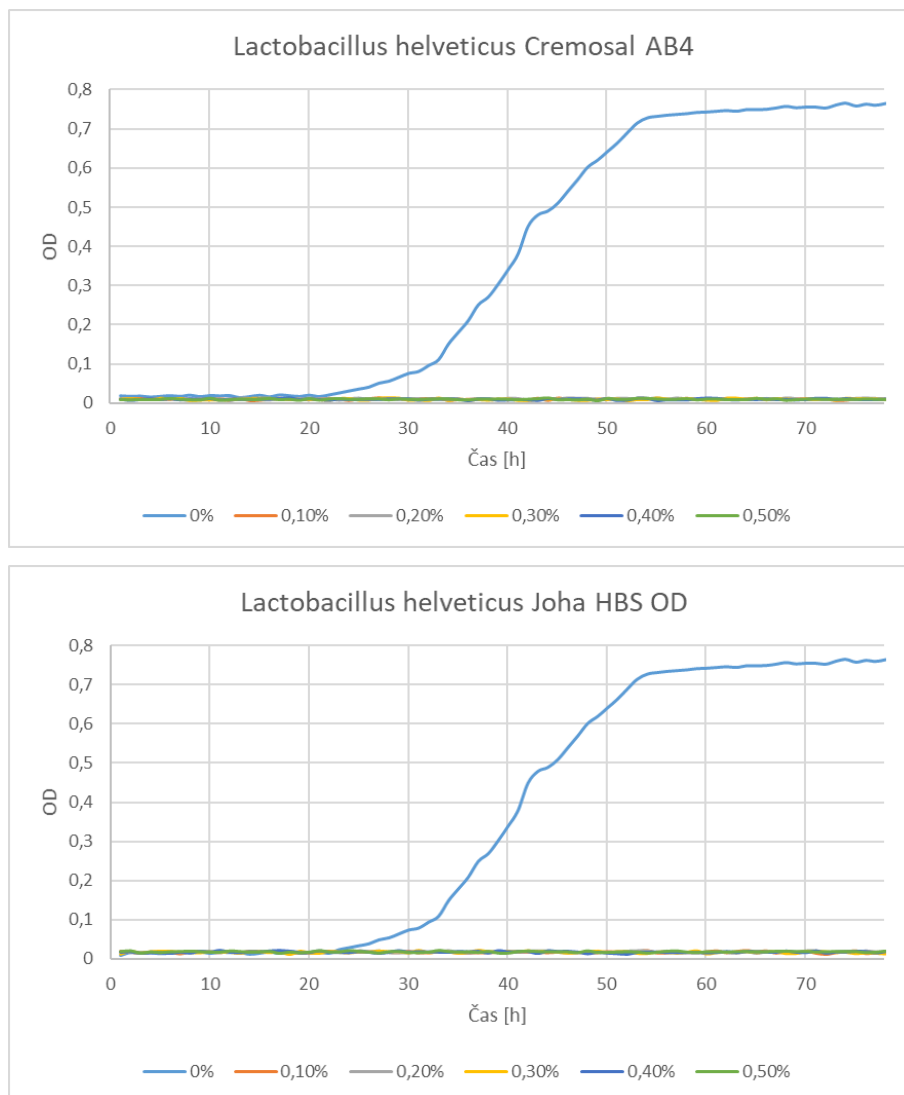
Jako zástupce starterové kultury (používané například při výrobě sýrů holandského typu) byl použit *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Engels a Düsterhöft, 2022). Jedná se o nepatogenní grampozitivní bakterii, která nezpůsobuje kažení tavených sýrů. Na obrázku 8 je shrnutý vliv testovaných tavicích solí na *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 141. Ani jedna z testovaných látek růst tohoto mikroorganismu výrazně neinhibovala, se zvyšující se koncentrací docházelo pouze k postupnému prodlužování lag fáze. Na počátku kultivace bylo zjištěno $3,4-4,0 \cdot 10^3$ CFU/ml, ve stacionární fázi u pozitivní kontroly následně $7,8 \cdot 10^8$ CFU/ml. Je nutné zmínit, že se zvyšující se koncentrací polyfosforečnanu docházelo mírně k poklesu počtu buněk, při aplikaci 0,5 % (w/v) obou solí se pohyboval počet buněk přibližně o dva řády níže, než v případě kontroly (naměřená hodnota $6,4-8,5 \cdot 10^6$ CFU/ml).



Obrázek 8: Vliv testovaných fosforečnanových směsí na růst *L. lactis* CCDM 141

8.8 Vliv polyfosforečnanových směsí na *Lactobacillus helveticus*

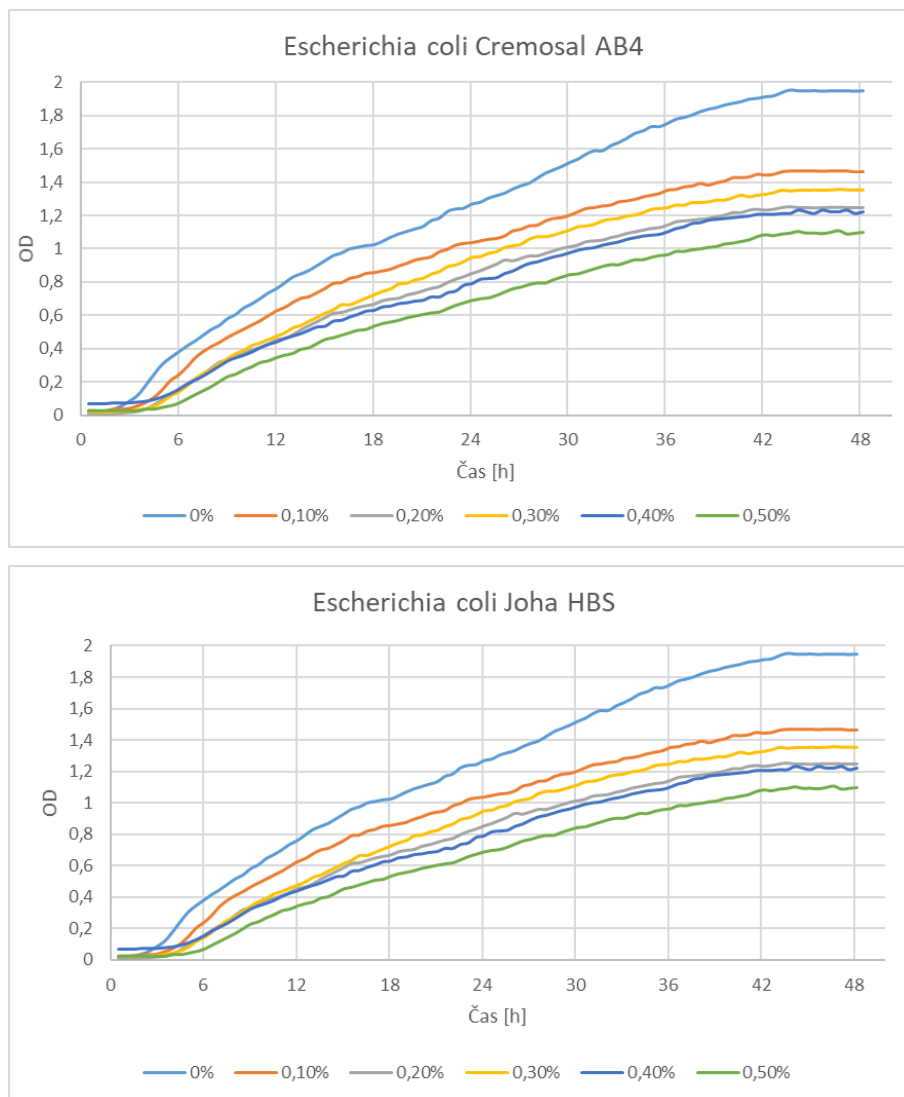
Dalším zástupcem přítomným ve startérových kulturách, tentokrát u přírodních sýrů švýcarského typu nebo parmezánu je *Lactobacillus helveticus* (Engels a Düsterhöft, 2022). V případě všech koncentrací obou solí byl růst *Lactobacillus helveticus* CCDM 142 inhibován (< 10 CFU/ml). Po zaočkování byla naměřena hodnota $3,1-4,3 \cdot 10^3$ CFU/ml a ve stacionární fázi kontroly $9,5 \cdot 10^7$ CFU/ml. Inhibiční působení směsí dokládá obrázek 9.



Obrázek 9: Vliv testovaných fosforečnanových směsí na růst *Lactobacillus helveticus* CCDM 142

8.9 Vliv polyfosforečnanových směsí na *Escherichia coli*

Poslední testovanou bakterií byla gramnegativní *Escherichia coli* CCM 3954. Do práce byla zařazena jako kontrola absence jiných inhibičních faktorů, jelikož z literatury (Buňka et al., 2009) je známý zanedbatelný vliv polyfosforečnanů na gramnegativní bakterie. Výsledky působení polyfosforečnanových směsí jsou znázorněny na obrázku 10. Před kultivací byla naměřena hodnota $2,2-3,2 \cdot 10^3$ CFU/ml, ve stacionární fázi pozitivní kontroly byl v bujónu zjištěn obsah buněk $6,9 \cdot 10^9$ CFU/ml. Se zvyšující se koncentrací obou směsí docházelo k mírnému snižování počtu buněk, při nejvyšší koncentraci přibližně stokrát ($5,2-7,5 \cdot 10^7$ CFU/ml).



Obrázek 10: Vliv testovaných fosforečnanových směsí na růst *Escherichia coli* CCM 3954

8.10 Souhrnná diskuse

Cílem bakalářské práce bylo za pomoci kultivace v bujonu a měření optické denzity v near-IR spektru (850 nm) srovnat inhibiční účinek polyfosforečnanových tavicích solí Cremosal AB4 vyvinutých ve firmě Fosfa a.s. Břeclav a komerčně dostupné JOHA HBS, u níž již byly v několika studiích potvrzeny antimikrobní účinky (Lorencová et al., 2012). Bylo vybráno osm grampozitivních kmenů náležících do rodů *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Geobacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* a *Lactobacillus* a jeden gramnegativní – *Escherichia*.

Bylo ověřeno, že antimikrobní účinek polyfosforečnanů je výrazný na grampozitivní sporulující i nesporulující bakterie – Lorencová et al. (2012) zkoumala účinek fosforečnanů

a polyfosforečnanů na bakterie způsobující alimentární onemocnění s výsledkem, že nejlepší inhibiční účinek na grampozitivní bakterie poskytují polyfosforečnany. K podobným výsledkům dospěli i Borch a Lycken (2007).

Účinek na gramnegativní bakterie nebývá v literatuře často popisován (Buňka et al., 2009). Výsledky dokazují, že inhibiční efekt testovaných směsí na gramnegativní bakterie je malý, shoduje se se výsledky uvedené ve studii Lorencové et al. (2012).

Tabulka 3 shrnuje minimální inhibiční koncentrace jednotlivých testovaných polyfosforečnanových solí, při kterých nebyl sledován růst dané bakterie.

Tabulka 3: Minimální inhibiční koncentrace testovaných solí

Sledovaný MO	CreMosal AB4 (% w/v)	JOHA HBS (% w/v)
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953	0,1	0,1
<i>Clostridium butyricum</i> CAMP 6342	0,1	0,1
<i>Clostridium sporogenes</i> CAPM 6329	0,1	0,1
<i>Bacillus cereus</i> CCM 2010	0,1	0,1
<i>Geobacillus stearothermophilus</i> CCM 2062	0,1	0,1
<i>Enterococcus durans</i> CCDM 53	0,1	0,4
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> CCDM 141	nestanoveno	nestanoveno
<i>Lactobacillus helveticus</i> CCDM 142	0,1	0,1
<i>Escherichia coli</i> CCM 3954	nestanoveno	nestanoveno

V případě druhu *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nebyla stanovena minimální inhibiční koncentrace, jelikož při všech testovaných koncentracích došlo k nárůstu této bakterie. Publikace Lerayer et al. (1996) studovala inhibici bakteriofágů, kdy byl použit kmen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* jako starterová kultura a polyfosforečnany na úpravu pH. Bakterie rovněž nebyly inhibovány použitou koncentrací polyfosforečnanů 0,5 %.

U gramnegativní *Escherichia coli* nebyla stanovena minimální inhibiční koncentrace z rovnakého důvodu – bakterie rostla při všech testovaných koncentracích. K podobným

výsledkům také došla studie Tenderis et al. (2020) která zkoumala vliv mléčnanů a fosforečnanů s různou lineární délkou na *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* a *Salmonella* Typhimurium v tepelně upraveném mletém hovězím mase, u *E. coli* byl zaznamenán nárůst při 10 °C. V teplotním optimu *E. coli* lze proto očekávat nárůst vyšší.

Antimikrobiní působení nově vyvinuté polyfosforečnanové směsi Cremosal AB4 využívané jako součást tavicích solí při výrobě tavených sýrů bylo sledováno v podmínkách *in vitro*, které se bohužel mohou od reálných situací a potravin lišit. Zjištěné výsledky bude proto potřeba ověřit přidavkem polyfosforečnanové soli Cremosal AB4 do modelově vytvořených tavených sýrů (za dodržení technologického procesu výroby), které by byly poté sekundárně kontaminovány zaočkováním vybranými mikroorganismy. Následně by bylo dobré sledovat vývoj mikroorganismů v těchto modelových výrobcích za podobných podmínek, jako tomu bylo v tomto experimentu, zejména testované koncentrace polyfosforečnanových směsí, skladovací podmínky – teplota a doba odpovídající délce kultivace. Navíc bude potřeba ověřit, zda skutečně v potravině s přidavkem této testované tavicí soli, resp. zaočkovaných modelových vzorcích tavených sýrů, nedošlo k pomnožení nežádoucích mikroorganismů i během delšího skladování do uplynutí minimální doby trvanlivosti taveného sýra. Pokud by došlo k potvrzení a ověření těchto výsledků, bude možné pokračovat v další fázi výzkumu, kdy bude možné přidávat polyfosforečnanovou směs Cremosal AB4 do potravin přímo v potravinářských provozech s cílem co nejvíce redukovat riziko výskytu nežádoucích mikroorganismů v tavených sýrech.

ZÁVĚR

Bakalářská práce se zabývala srovnáním antimikrobního účinku dvou polyfosforečnanových solí (Cremosal AB4 a JOHA HBS) v podmínkách *in vitro*. Na základě získaných výsledků lze konstatovat následovné:

- Inhibiční působení polyfosforečnanových solí na grampozitivní bakterie v podmínkách *in vitro* bylo prokázáno.
- Existuje závislost mezi koncentrací polyfosforečnanové směsi a inhibičním účinkem na grampozitivní bakterie.
- Citlivost k polyfosforečnanovým směsím je ovlivněna druhovou příslušností bakterie.
- Účinky směsi Cremosal AB4 vůči sledovaným mikroorganismům jsou shodné se směsí JOHA HBS, v případě *Enterococcus durans* CCDM 53 vykazuje směs Cremosal AB4 působení lepší, protože inhibuje růst tohoto mikroorganismu při nižší koncentraci.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AKHTAR, S., PAREDES-SABJA, D. & SARKER, M., 2008: Inhibitory effects of polyphosphates on *Clostridium perfringens* growth, sporulation and spore outgrowth. *Food Microbiology*, 25, pp.802-808. ISSN 0740-0020.

Belsito, P., Ferreira, M., Cappato, L., Cavalcanti, R., Vidal, V., Pimentel, T., Esmerino, E., Balthazar, C., Neto, R., Tavares, M., Zacarchenco, P., Freitas, M., Silva, M., Raices, R., Pastore, G., Pollonio, M. and Cruz, A., 2017. Manufacture of Requeijão cremoso processed cheese with galactooligosaccharide. *Carbohydrate Polymers*, 174, pp.869-875. ISSN 0144-8617

BORCH, E. & LYCKEN, L., 2007: Influence of long chain polyphosphate and heat treatment on *Clostridium cochearium* and *Clostridium sporogenes* isolated from processed cheese spread. *Journal of Food Protection*, 70, 744-747. ISSN 0362-028X.

Buňka, F., Doudová, L., Weiserová, E., Kuchař, D., Michálek, J., Slavíková, Š. and Kráčmar, S., 2012. The effect of different ternary mixtures of sodium phosphates on hardness of processed cheese spreads. *International Journal of Food Science Technology*, 47(10), pp.2063-2071. ISSN 1365-2621

Buňková, L. and Buňka, F., 2015. Microflora of processed cheese and the factors affecting it. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(11), pp.2392-2403. ISSN 1549-7852

Buňka, F., Buňková, L. and Kráčmar, S., 2009. *Základní principy výroby tavených sýrů*. Brno: FOLIA. ISBN 978-8-07-375336-8

Česká technická norma ČSN 57 1300. Tavené sýry a tavené sýrové výrobky – Společná ustanovení, 2000. Česká agentura pro standardizaci, Praha.

Cunha, C., Grimaldi, R., Alcântara, M. and Viotto, W., 2012. Effect of the type of fat on rheology, functional properties and sensory acceptance of spreadable cheese analogue. *International Journal of Dairy Technology*, 66(1), pp.54-62. ISSN 1471-0307

EFSA Journal, 2016. Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. 14(7). ISSN: 1831-4732

Ehsannia, S. and Sanjabi, M., 2016. Physicochemical, microbiological and spoilage analysis of probiotic processed cheese analogues with reduced emulsifying salts during refrigerated storage. *Journal of Food Science and Technology*, 53(2), pp.996-1003. ISSN 0975-8402

El-Assar, M., Abou-Dawoo, S., Sakr, S. and Younis, N., 2018. Low-fat Processed Cheese Spread with Added Inulin: Its Physicochemical, Rheological and Sensory Characteristics. *International Journal of Dairy Science*, 14(1), pp.12-20. ISSN 1811-9751

Engels, W. and Düsterhöft, E., 2022. Starter Cultures for Cheese Manufacture. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, pp.352-357. ISBN 978-0-12-818767-8

Ferrão, L., Ferreira, M., Cavalcanti, R., Carvalho, A., Pimentel, T., Silva, H., Silva, R., Esmerino, E., Neto, R., Tavares, M., Freitas, M., Menezes, J., Cabral, L., Moraes, J., Silva, M., Mathias, S., Raices, R., Pastore, G. and Cruz, A., 2018. The xylooligosaccharide addition and sodium reduction in requeijão cremoso processed cheese. *Food Research International*, 107, pp.137-147. ISSN 0963-9969

Ferrão, L., Silva, E., Silva, H., Silva, R., Mollakhalili, N., Granato, D., Freitas, M., Silva, M., Raices, R., Padilha, M., Zacarchenco, P., Barbosa, M., Mortazavian, A. and Cruz, A., 2016. Strategies to develop healthier processed cheeses: Reduction of sodium and fat contents and use of prebiotics. *Food Research International*, 86, pp.93-102. ISSN 0963-9969

Garstin, G., 1921. Cheese and process for sterilizing same. United States Patent and Trademark Office. Serial No. 418,320. Dostupné z <https://pdfpiw.uspto.gov/.piw?Docid=01368624>

Glass, K., and Doyle, M. E., 2013. Safety of processed cheese. Food Research Institute, University of Wisconsin. Dostupné z https://fri.wisc.edu/files/Briefs_File/ProcCheese_May2005_v2.pdf.

Guinee, T.P., Carić, M. and Kaláb, M., 2004. Pasteurized Processed Cheese and Substitute/Imitation Cheese Products. In: *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, volume 2. London u.a.: Elsevier Applied Science, pp. 349–394. ISBN 978-0-12-263653-0

Guinee, T., 2011a. Cheese | Pasteurized Processed Cheese Products. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, pp.805-813. ISBN 978-0-12-374407-4

Guinee, T., 2011b. Cheese | Cheese as a Food Ingredient. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, pp.822-832. ISBN 978-0-12-374407-4

Hrnčirik, K., 2010. Stability of fat-soluble vitamins and PUFA in simulated shallow-frying. *Lipid Technology*, 22(5), pp.107-109. ISSN 1863-5377

Jay, J., Golden, D. and Loessner, M., 2005. *Modern Food Microbiology*. 7th ed. New York. ISBN 0387231803

Johnson, J., Mistry, V., Vukovich, M., Hogie-Lorenzen, T., Hollis, B. and Specker, B., 2005. Bioavailability of Vitamin D from Fortified Process Cheese and Effects on Vitamin D Status in the Elderly. *Journal of Dairy Science*, 88(7), pp.2295-2301. ISSN 0022-0302

Johnson, M., Kapoor, R., McMahon, D., McCoy, D. and Narasimmon, R., 2009. Reduction of Sodium and Fat Levels in Natural and Processed Cheeses: Scientific and Technological Aspects. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(3), pp.252-268. ISSN 1541-4337

Khetra, Y., Kanawjia, S. and Puri, R., 2016. Selection and optimization of salt replacer, flavour enhancer and bitter blocker for manufacturing low sodium Cheddar cheese using response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology*, 72, pp.99-106. ISSN 2689-1816

Kraft, J., 1916. Process of sterilizing cheese and an improved product produced by such process. United States Patent and Trademark Office. Serial No. 86,764. Dostupné z <https://pdfpiw.uspto.gov/.piw?Docid=01186524>

LAZÁRKOVÁ, Z., BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., HOLÁŇ, F., KRÁČMAR, S. and HRABĚ, J., 2010. The effect of different heat sterilization regimes on the quality of canned processed cheese. *Journal of Food Process Engineering*, 34(6), pp.1860-1878. ISSN 1745-4530

Lazárková, Z., Buňka, F., Buňková, L., Valášek, P., Kráčmar, S. and Hrabě, J., 2010. Application of different sterilising modes and the effects on processed cheese quality. *Czech Journal of Food Sciences*, 28(No. 3), pp.168-176. ISSN: 1805-9317

Lerayer, A., van Dender, A., Moreno, I., Mori, E. and Parada, J., 1996. Evaluation of a phage-inhibitory medium for *Lactococcus* starters in pilot cheese manufacture. *International Dairy Journal*, 6(5), pp.529-535. ISSN: 0958-6946

Linton, R.H. and Harper, N., 2008. Survival and growth of foodborne microorganisms in processed and individually wrapped cheese slices. *Journal of Environmental Health*, 70(7):31-7, 51. ISSN 0022-0892

Lorencová, E., Vltavská, P., Budinský, P. and Koutný, M., 2012. Antibacterial effect of phosphates and polyphosphates with different chain length. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 47(14), pp.2241-2245. ISSN 0022-0892

Lücking, G., Stoeckel, M., Atamer, Z., Hinrichs, J. and Ehling-Schulz, M., 2013. Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 166(2), pp.270-279. ISSN 0168-1605

Martinez-Rios, V., Jørgensen, M., Koukou, I., Gkogka, E. and Dalgaard, P., 2019. Growth and growth boundary model with terms for melting salts to predict growth responses of *Listeria monocytogenes* in spreadable processed cheese. *Food Microbiology*, 84, p.103255. ISSN: 0740-0020

Nariadení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 ze dne 16. prosince 2008 o potravinářských přídatných látkách, 2021, Evropský parlament a Rada, Brusel. Dostupné z <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A02008R1333-20210808>

Nariadení komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny, 2020. Komise Evropských Společenství, Brusel. Dostupné z <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:32005R2073>

Nogueira, E., Costa-Lima, B., Torres, F., Regazone, A., Melo, L., Franco, R. and Cortez, M., 2018. Effect of potassium-based emulsifying salts on the sensory and physicochemical parameters of low-sodium spreadable processed cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 71(3), pp.717-722. ISSN 1471-0307

Oliveira, R., Margalho, L., Nascimento, J., Costa, L., Portela, J., Cruz, A. and Sant'Ana, A., 2016. Processed cheese contamination by spore-forming bacteria: A review of sources,

routes, fate during processing and control. *Trends in Food Science & Technology*, 57, pp.11-19. ISSN 0924-2244

Ramel, P. and Marangoni, A., 2018. Processed cheese as a polymer matrix composite: A particle toolkit for the replacement of milk fat with canola oil in processed cheese. *Food Research International*, 107, pp.110-118. ISSN 0963-9969

Rinaldoni, A., Palatnik, D., Zaritzky, N. and Campderrós, M., 2014. Soft cheese-like product development enriched with soy protein concentrates. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), pp.139-147. ISSN 2689-1816

Rutala, W. A. et al., 2019. *Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities*, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta. Dostupné z <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/pdf/guidelines/disinfection-guidelines-H.pdf>.

Soares, M., Almada, C., Almada, C., Martinez, R., Pereira, E., Balthazar, C., Cruz, A., Ranadheera, C. and Sant'Ana, A., 2019. Behavior of different *Bacillus* strains with claimed probiotic properties throughout processed cheese (“requeijão cremoso”) manufacturing and storage. *International Journal of Food Microbiology*, 307, p.108288. ISSN 0168-1605

Talbot-Walsh, G., Kannar, D. and Selomulya, C., 2018. A review on technological parameters and recent advances in the fortification of processed cheese. *Trends in Food Science & Technology*, 81, pp.193-202. ISSN 0924-2244

Tenderis, B., Kılıç, B., Yalçın, H. and Şimşek, A., 2020. Impact of sodium lactate, encapsulated or unencapsulated polyphosphates and their combinations on *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* growth in cooked ground beef. *International Journal of Food Microbiology*, 321, p.108560. ISSN: 0168-1605

Ustunol, Z., 2009. Processed Cheese: What is that Stuff Anyway? *Michigan Dairy Review*, 14(2).

Vollmer, A., Kieferle, I., Youssef, N. and Kulozik, U., 2021. Mechanisms of structure formation underlying the creaming reaction in a processed cheese model system as revealed by light and transmission electron microscopy. *Journal of Dairy Science*, 104(9), pp.9505-9520. ISSN 0022-0302

Vyhláška 397/2016 Sb. o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje, 2020. Ministerstvo zemědělství, Praha. Dostupné z <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2016-397>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CAPM	Sbírka zoopatogenních mikroorganismů při Výzkumném ústavu veterinárního lékařství
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
CCDM	Sbírka mlékárenských mikroorganismů Laktoflora® při Výzkumném ústavu mlékárenském
MO	mikroorganismus, mikroorganismy
MPA	masopeptonový agar
MPB	masopeptonový bujon
OD	hustota buněčné suspenze, optická denzita
RCA	reinforced clostridial agar
RCB	reinforced clostridial broth
RPM	rychlost otáček
TEM	transmisní elektronový mikroskop

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: TEM snímek vzorku taveného sýra (Vollmer et al., 2021).....	18
Obrázek 2: Vliv testovaných fosforečnanových směsí na růst <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953.....	36
Obrázek 3: Vliv testovaných fosforečnanových směsí na růst <i>Clostridium butyricum</i> CAPM 6342	37
Obrázek 4: Vliv testovaných fosforečnanových směsí na růst <i>Clostridium sporogenes</i> CAPM 6329	38
Obrázek 5: Vliv testovaných fosforečnanových směsí na růst <i>Bacillus cereus</i> CCM 201039	
Obrázek 6: Vliv testovaných fosforečnanových směsí na růst <i>Geobacillus stearothermophilus</i> CCM 2062.	40
Obrázek 7: Vliv testovaných fosforečnanových směsí na růst <i>Ent, durans</i> CCDM 53.....	41
Obrázek 8: Vliv testovaných fosforečnanových směsí na růst <i>L. lactis</i> CCDM 141	43
Obrázek 9: Vliv testovaných fosforečnanových směsí na růst <i>Lactobacillus helveticus</i> CCDM 142.....	44
Obrázek 10: Vliv testovaných fosforečnanových směsí na růst <i>Escherichia coli</i> CCM 3954	45

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Seznam povolených tavicích solí na bázi fosforečnanů (Nařízení EP a Rady č. 1333/2008, 2021)	26
Tabulka 2: Parametry kultivace v osobním bioreaktoru RTS-1C.....	35
Tabulka 3: Minimální inhibiční koncentrace testovaných solí.....	46