

# **Vliv monolaurinu na růst sporulujících bakterií v tavených sýrech**

David Gergela

---

Bakalářská práce  
2011

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

akademický rok: 2010/2011

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: David GERGELA

Osobní číslo: T080227

Studijní program: B 2901 Chemie a technologie potravin

Studijní obor: Chemie a technologie potravin

Téma práce: Vliv monolaurinu na růst sporulujících bakterií v tavených sýrech

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

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

### II. Praktická část

1. Sledujte vliv monoacylglycerolu kyseliny laurové (monolaurinu) na růst sporulujících bakterií rodu *Bacillus* a *Clostridium* po inokulaci do vzorků tavených sýrů.
2. Popište vztah mezi růstem sporulujících bakterií a přítomností inhibičních látek.
3. Zhodnoťte využitelnost aplikovaného monolaurinu pro prodloužení údržnosti tavených sýrů.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] ABABOUC, L.H.; BOUQUARTACHA, F.; BUSTA, F.B. Inhibition of *Bacillus cereus* spores and vegetative cells by fatty acids and glyceryl monododecanoate. *Food Microbiology*. 1994, 11, s. 327–336.
- [2] BAUTISTA, D.A. ; DURISIN, M.D. ; RAZAVI-ROHANI, S.M., HILL, A.R., GRIFFITHS, M.W. Extending the shelf-life of cottage cheese using monolaurin. *Food Research International*. 1993, 26, s. 203–208.
- [3] BERESFORD, T.P., FITZSIMONS, N. A., BRENNAN, N. L., COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*. 2001, 11, s. 259–274.
- [4] BLACKBURN, C. W. Food spoilage microorganisms. Boca Raton: CRC Press, 2006. 712 s. ISBN 0-849-391563.
- [5] BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., KRÁČMAR, S.: Základní principy výroby tavených sýrů. *Folia Univ. Agric. et Silv. Mendel. Brun.*, 2009, Vol. II, No. 6, 70 s. ISBN 978-80-7375-336-8.
- [6] LYCKEN, L.; BORCH, E. . Characterization of *Clostridium* spp. isolated from spoiled processed cheese products. *Journal of Food Protection*. 2006, 69, 8, s. 1887–1891.

Vedoucí bakalářské práce:

**RNDr. Iva Doležalková**

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání bakalářské práce:

**11. února 2011**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**30. května 2011**

Ve Zlíně dne 12. dubna 2011



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



doc. Ing. Jan Hrabě, Ph.D.

*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: David Gergela

Obor: Chemie a 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 obhajoby <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 2.5.2011

David Gergela

---

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

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

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k 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.

<sup>2)</sup> zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

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

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

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

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

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

## ABSTRAKT

Cílem předkládané bakalářské práce je studium antimikrobiálních účinků monoacylglycerolu kyseliny laurové na sporulující mikroorganismy v tavených sýrech. Vzorky tavených sýrů byly zaočkovány kmeny *Bacillus cereus* CCM 2010, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062, *Clostridium sporogenes* CAPM 6329 a *Clostridium butyricum* CAPM 6342. Monoacylglycerol byl aplikován v koncentracích 0,1, 0,5 a 0,15 % w/w. Tavené sýry byly uchovávány při teplotě  $6 \pm 2$  °C a růst bakterií ve vzorcích tavených sýrů byl sledován po dobu 141 dní. Výsledky ukazují, že přidavek monolaurinu v koncentraci 0,01 a 0,05 % w/w nepůsobí inhibičně na růst sporulujících bakterií rodu *Bacillus* a *Clostridium*. Nejvyšší testovaná koncentrace 0,15 % w/w však vedla k částečné inhibici růstu, která byla pozorována téměř po celou dobu skladování.

Klíčová slova: monoacylglycerol kyseliny laurové, tavený sýr, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium butyricum*

## ABSTRACT

The aim of the bachelor thesis is to study antimicrobial effects of monolaurin on sporulating microorganisms in processed cheese. Processed cheese samples were inoculated with the following strains of microorganisms: *Bacillus cereus* CCM 2010, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062, *Clostridium sporogenes* CAPM 6329 and *Clostridium butyricum* CAPM 6342. Monoglyceride was applied at concentrations 0,1, 0,5 and 0,15 % w/w. Processed cheeses were stored at  $6 \pm 2$  °C and microbial growth was observed for 141 days. The results showed that application of monolaurin at concentrations 0,01 and 0,05 % w/w did not lead to growth inhibition of sporulating bacteria *Bacillus* sp. and *Clostridium* sp. The highest concentration tested (0,15 % w/w) reduced bacterial growth throughout the storage period.

Keywords: monolaurin, processed cheese, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium butyricum*

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval především vedoucí mé bakalářské práce RNDr. Ivě Doležákové za odbornou pomoc, cenné a hodnotné rady, neustálou ochotu a čas při řešení dané problematiky.

Rovněž bych chtěl poděkovat doc. RNDr. Leoně Buňkové Ph.D. za výpomoc a zaměstnancům Ústavu technologie a mikrobiologie za příjemné prostředí a vstřícný přístup během laboratorních výzkumů.

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

# OBSAH

ÚVOD .....	10
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>11</b>
<b>1 TAVENÉ SÝRY .....</b>	<b>12</b>
1.1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA TAVENÝCH SÝRŮ .....	12
1.2 ROZDĚLENÍ TAVENÝCH SÝRŮ .....	13
1.3 TAVICÍ SOLI A JEJICH VLASTNOSTI .....	13
1.3.1 Tavicí soli na bázi fosforečnanů .....	14
1.3.2 Tavicí soli na bázi citranů .....	14
1.4 VÝROBA TAVENÝCH SÝRŮ .....	15
1.4.1 Příprava směsi .....	15
1.4.2 Určení složení tavicích solí .....	15
1.4.3 Vlastní proces tavení .....	16
1.4.4 Balení taveniny, chlazení, skladování, expedice .....	16
<b>2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ MIKROFLÓRU TAVENÝCH SÝRŮ .....</b>	<b>17</b>
2.1 VNITŘNÍ FAKTORY .....	17
2.1.1 Vliv pH .....	17
2.1.2 Vliv vodní aktivity .....	18
2.1.3 Oxidoredukční potenciál .....	19
2.1.4 Vliv obsahu tuku .....	19
2.1.5 Vliv látek s emulgačními účinky a emulgátorů .....	20
2.1.6 Vliv ostatních faktorů a ingrediencí .....	20
<b>3 MIKROBIOLOGIE TAVENÝCH SÝRŮ .....</b>	<b>21</b>
3.1 ROD <i>BACILLUS</i> .....	21
3.1.1 <i>Bacillus cereus</i> .....	22
3.1.2 <i>Bacillus subtilis</i> .....	22
3.2 ROD <i>CLOSTRIDIUM</i> .....	23
3.2.1 <i>Clostridium sporogenes</i> .....	23
3.2.2 <i>Clostridium butyricum</i> .....	23
<b>4 MONOACYLGLYCEROLY .....</b>	<b>24</b>
4.1 VLASTNOSTI MONOACYLGLYCEROLŮ .....	25
4.2 VÝROBA MONOACYLGLYCEROLŮ .....	25
4.3 VYUŽITÍ MAG V POTRAVINÁŘSTVÍ .....	26
4.4 ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINKY MONOACYLGLYCEROLŮ .....	27
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>29</b>
<b>5 CÍL PRÁCE .....</b>	<b>30</b>
<b>6 MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>31</b>



6.1	MIKROORGANIZMY .....	31
6.2	MONOACYLGLYCEROL .....	31
6.3	KULTIVAČNÍ PŮDY A ROZTOKY .....	31
6.4	POUŽITÉ PŘÍSTROJE A LABORATORNÍ POMŮCKY .....	32
6.5	METODIKA .....	33
6.5.1	Výroba tavených sýrů .....	33
6.5.2	Stanovení celkového počtu mikroorganismů ve vzorku .....	34
6.5.3	Dekontaminace zařízení a použitého materiálu .....	35
<b>7</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>36</b>
7.1	VLIV MONOACYLGLYCEROLU KYSELINY LAUROVÉ NA RŮST <i>BACILLUS CEREUS</i> CCM 2010 .....	36
7.2	VLIV MONOACYLGLYCEROLU KYSELINY LAUROVÉ NA RŮST <i>BACILLUS SUBTILIS</i> SUBSP. <i>SPIZIZENII</i> CCM 4062 .....	37
7.3	VLIV MONOACYLGLYCEROLU KYSELINY LAUROVÉ NA RŮST <i>CLOSTRIDIUM BUTYRICUM</i> CAPM 6342 .....	38
7.4	VLIV MONOACYLGLYCEROLU KYSELINY LAUROVÉ NA RŮST <i>CLOSTRIDIUM SPOROGENES</i> CAPM 6329 .....	39
<b>8</b>	<b>DISKUZE .....</b>	<b>41</b>
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>43</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>44</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>51</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>52</b>

## ÚVOD

Výroba tavených sýrů se datuje od roku 1911, kdy švýcarská firma Gerber způsobem, který byl dokonce po určitou dobu zahalen tajemstvím, zpracovala přírodní sýry na trvanlivější formu vhodnou pro export. Předností tavených sýrů je jejich značná odolnost k mikrobiální kontaminaci, jejíž příčinou je záhřev surovin při procesu výroby, který je dostatečný pro usmrcení většiny vegetativních forem mikroorganismů. Tyto teploty však nejsou dostatečné pro inhibici sporulujících mikroorganismů, které jsou příčinou znehodnocení těchto produktů a navíc představují i zdravotní rizika pro spotřebitele.

Tavené sýry jsou oblíbenou potravinou zejména v Česku, kde jejich spotřeba dosahuje okolo 2,6 kg na obyvatele za rok, což je dvojnásobek spotřeby ve většině zemí světa. Ve světě se na tavené sýry zpracovává 10-12 % přírodních sýrů. V porovnání s přírodními sýry mají tavené sýry sice poněkud nižší výživovou hodnotu, v každém případě ale zůstávají významným zdrojem vápníku a nabízejí řadu zajímavých výhod: mají delší trvanlivost, dobře se roztírají, lze je libovolně ochucovat a levně vyrobit. Lze je zařadit do současného trendu „convenience food“.

Zajištění kvality a bezpečnosti tavených sýrů prostřednictvím látek, které by potlačily růst a množení sporulujících mikroorganismů, je tedy v zájmu jak spotřebitelů, tak i výrobců. Nalézt látku, která by vyhovovala všem požadavkům a byla by možná její aplikace v potravinách, je však nelehký úkol. Předkládaná bakalářská práce se snaží ověřit možnosti použití monoacylglycerolů pro tyto účely. Monoacylglyceroly jsou emulgátory, které podstatně ovlivňují konzistenci tavených sýrů, jsou hojně využívány v potravinářském průmyslu a jsou tedy považovány za látky bezpečné. Jejich důležitou vlastností jsou antimikrobiální účinky. Díky schopnosti potlačit růst nežádoucích mikroorganismů by monoacylglyceroly mohly přispět ke zvýšení trvanlivosti tavených sýrů a cílem této bakalářské práce je studium vlivu monoacylglycerolů na růst sporulujících bakterií v matrici taveného sýra.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 TAVENÉ SÝRY

## 1.1 Základní charakteristika tavených sýrů

Vyhláška ministerstva zemědělství České republiky č. 77/2003 Sb., v platném znění, definuje tavený sýr jako sýr, který byl tepelně upraven za přídavku tavicích solí [1].

Tavené sýry jsou vyráběny zahříváním směsi přírodních sýrů různého stupně zralosti za částečného podtlaku a stálého míchaní, dokud není dosažena homogenní hmota požadovaných vlastností. Složení směsi a charakter přidaných tavicích solí určuje vlastnosti výsledného produktu [2]. Základní surovinou pro výrobu tavených sýrů jsou přírodní sýry. V současné době se ale velmi často část základní suroviny nahrazuje nebo doplňuje potravinami mléčného (např. máslo, smetana, tvaroh, sušené odstředěné mléko, sušená syrovátka aj.) i nemléčného (např. voda, přísady ovlivňující chuť a barvu – masové složky, zelenina, houby aj.) původu [3]. Z potravin mléčného původu je jednou z nejrozšířenějších surovin tvaroh, jehož hlavním úkolem je zvýšení obsahu tukuprosté sušiny. Dále se tvaroh přidává do směsi obsahujících zralé přírodní sýry za účelem dodání intaktního kaseinu, což má významný vliv na konzistenci a stabilitu struktury taveného sýra. Pro zvýšení obsahu tuku se přidává máslo a v některých případech i smetana, díky níž se stává výrobek lahodnějším [4]. Tradiční surovinová skladba obsahuje zejména mléčné bílkoviny tzv. kaseiny, mléčný tuk, vodu, dále pak menší množství jiných látek (solí, kyseliny, zbytky laktózy aj.). Pro výrobu homogenního výrobku je důležité, aby se v systému nacházely látky s emulgující schopností – tzv. emulgátory [3].

Emulgátory je možné obecně definovat jako látky snižující mezipovrchové napětí na rozhraní dvou nemísitelných kapalných fází (např. voda a olej), čímž umožňují vznik a stabilizaci emulze [5]. Tuto schopnost mají například kaseinové frakce (bílkoviny), které se nacházejí zejména v přírodních sýrech. Emulgující schopnost je zde však potlačena díky přítomnosti navázaného vápníku. Řešením této situace je přídavek tavicích solí, jejichž základní schopnost spočívá v odštěpení vápníku z proteinové matrice přírodních sýrů a nahrazení vápenatých iontů ionty sodnými [3].

## 1.2 Rozdělení tavených sýrů

Tavené sýry je možno dělit podle obsahu tuku v sušině. Vyhláška ministerstva zemědělství ČR č. 77/2003 Sb., v platném znění, rozeznává vysokotučné tavené sýry (s obsahem tuku v sušině nejméně 60 % hmotnostních) a nízkotučné tavené sýry (s obsahem tuku v sušině nejvýše 30 % hmotnostních) [1].

Podle povolených surovin a dalších parametrů lze tavené sýry rozdělit do čtyř skupin [6]:

- tepelně opracované sýry - povolenými surovinami jsou sýry, smetana, bezvodý mléčný tuk, voda, sůl, barviva, koření, aromata a inhibitory plísní
- tavené sýry - kromě surovin povolených pro tepelně opracované sýry jsou povoleny i tavicí soli a organické kyseliny pro úpravu pH
- výrobky z tavených sýrů - povoleny jsou suroviny jako u předchozích dvou skupin, navíc mohou být použity i další mléčné suroviny (mléko, odstředěné mléko, podmáslí, syrovátka)
- tavené sýrové pomazánky - kromě surovin povolených v tavených sýrech jsou povoleny i hydrokoloidy a sladící přísady

Kromě výše zmíněných skupin tavených sýrů existují ještě tzv. analogy nebo imitace tavených sýrů. Při jejich výrobě je mléčný tuk, mléčná bílkovina nebo obojí nahrazena nebilkovinnou složkou, zejména rostlinného původu [7]. K výrobě analogů jsou používány zejména kaseináty, bílkoviny jiného než mléčného původu, rostlinné oleje, tavicí soli, látky určené k aromatizaci aj. Hlavní předností tzv. analogů (imitací) tavených sýrů je snížení nákladů na výrobu a suroviny, což je využíváno především v kuchyních a provozovnách fast – food [4].

## 1.3 Tavicí soli a jejich vlastnosti

Tavicí soli jsou podle Vyhlášky Ministerstva zdravotnictví č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních činidel při výrobě potravin, látky měnící vlastnosti bílkovin při výrobě tavených sýrů za účelem zamezení oddělování tuku [8].

Tavicí soli se v mnoha případech označují jako emulgátory, ačkoliv nejde o emulgátory jako povrchově aktivní látky. Proto se spíše užívá názvu “emulgující činidla” [3].

Jako tavicí soli se nejčastěji používají sodné případně draselné soli fosforečných kyselin nebo kyseliny citrónové, které musí mít dobré pufrací schopnosti a upravit konečné pH taveného sýra na požadovanou hodnotu. Množství tavicích solí v konečném výrobku zpravidla nepřesahuje 3 % hmotnosti surovinové skladby [9].

### 1.3.1 Tavicí soli na bázi fosforečnanů

Fosforečnany jsou soli odvozené od kyseliny trihydrogenfosforečné ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). Soli, které obsahují jednu skupinu  $(\text{PO}_4)^{3-}$  označujeme jako ortofosforečnany. Dimer, nazývaný pyrofosforečnan vzniká ze dvou monomerů. Polymery s více než dvěma fosfory se nazývají polyfosforečnany. Vznik třídímenzionálních struktur je možný díky tomu, že každá  $(\text{PO}_4)^{3-}$  může sdílet až tři své atomy kyslíku s třemi jinými  $(\text{PO}_4)^{3-}$  skupinami. Přítomnost fosforečnanů v tavených sýrech ovlivňuje zejména vlastnosti přítomných bílkovin, a to buď prostřednictvím změny podmínek prostředí (změna pH, odštěpení kationtů) nebo prostřednictvím vazby fosforečnanů na proteiny. Nejdůležitější vlastností fosforečnanů z hlediska výroby tavených sýrů je jejich schopnost odštěpovat z prostředí a vázat na sebe monovalentní i polyvalentní kationty kovů [4]. Tento proces je však ovlivněn celou řadou faktorů, například typem kationtu (nižší schopnost vazby alkalických kovů oproti kovům alkalických zemin), teplotou, hodnotou pH a počtem fosforečnanových jednotek v molekule [10,11]. Další vlastností fosforečnanů je schopnost zvýšení vaznosti vody přítomných bílkovin, což se projevuje při procesu tavení. Viskozita taveniny roste vázáním dodatečného množství vody [4].

### 1.3.2 Tavicí soli na bázi citranů

Citrany jsou soli odvozené od kyseliny citronové. Jako tavicí soli se používají hlavně zejména trojsodné citrany. Citrany mono- a disodné způsobují silné okyselení směsi, což vede ke značné nestabilitě emulze a uvolnění vody. Obě látky se používají spíše pro korekci příliš vysokého pH taveniny. Citrany mají nízkou afinitu k vápenatým iontům a nízkou schopnost zvýšit hydrataci proteinů i emulzi tuku, vysoká je ovšem jejich pufrací schopnost. Citran trojsodný je používán především ve směsích s jinými tavicími solemi, zejména polyfosforečnany [3, 4].

## 1.4 Výroba tavených sýrů

Tavené sýry mohou být vyráběny dvěma způsoby, kontinuálně nebo diskontinuálně. Kontinuální proces zahrnuje tavení při teplotě 130 – 140° C po dobu 2 – 3 sekund v nerezových trubkách v tenké vrstvě. V zemích střední Evropy je však ve větší míře rozšířen diskontinuální způsob, který lze shrnout do těchto fází:

1. Příprava směsi
2. Určení složení tavicích solí
3. Vlastní proces tavení
4. Balení taveniny, chlazení, skladování, expedice [4]

### 1.4.1 Příprava směsi

Požadavky, jež jsou kladeny na výsledný tavený sýr, jsou určující pro návrh složení směsi pro tavení. Důležitou roli hraje hlavně obsah sušiny, tuku v sušině a vhodná konzistence finálního produktu [12]. Kvalita tavených sýrů, zejména chuť a aroma je podmíněna správným výběrem přírodního sýra. Nejdůležitější kritéria pro správný výběr jsou typ přírodního sýra, zralost, aroma, struktura a konzistence, pH a charakter přísad. Obecně lze říci, že pokud pro výrobu taveného sýra použijeme tvrdé či polotvrdé přírodní sýry, získáme tužší produkt než při použití plísňových sýrů. Přírodní sýry s mikrobiálními vadami (obsahující spory, patogenní bakterie, tvořící plyn) nesmí být zpracovávány [13, 14].

### 1.4.2 Určení složení tavicích solí

Volba tavicích solí spolu se správným stanovením jejich množství je klíčová pro kvalitu konečného produktu. Předávkování může být příčinou jiné než požadované konzistence výrobků, může vést k podpoře procesů jejich krystalizace, ale také k negativním změnám chuti taveného sýra (např. vznik hořké chuti díky předávkování fosfátovými solemi) [12].

Určení směsi tavicích solí je odvozeno od charakteru přírodních sýrů, doplňkových surovin, pH a požadovaných vlastností konečného výrobku. Také je třeba vzít v potaz konkrétní typ výrobku, balicí techniku, průběh chlazení aj [4].

### 1.4.3 Vlastní proces tavení

Při výrobě tavených sýrů je tavení tou nejdůležitější fází výrobního procesu. Důležitou roli hraje doba působení tavicí teploty, rychlost míchání a přítomnost tavicích solí [15].

Vlastní tavení se provádí v kotlích tavičky s obsahem 70 – 200 l. Kotle jsou přizpůsobeny k zahřívání pod tlakem, opatřeny pláštěm umožňujícím chlazení taveniny a míchadlem s regulací a armaturou. Při tavení dojde k zahřívání obvykle na 80 – 85° C (tzv. tavicí teplota) po dobu 4 – 6 minut při pomalém míchání [12, 16]. Směs je většinou ohřívána přímým vstřikem páry do tavené směsi a při sestavování surovinové skladby je nutné zohlednit tuto zkondenzovanou vodu [4].

### 1.4.4 Balení taveniny, chlazení, skladování, expedice

Horká tavenina se nalévá do formovacích a balících strojů, kde je automaticky zabalena. Tavené sýry by měly být baleny až poté, co jejich teplota klesne pod 65 až 70°C, aby nedošlo k poškození konzistence hotového sýra. Po zabalení se sýry opatřují etiketou, vkládají do kartónových krabic a vychladí. Proces chlazení je závislý na typu taveného sýra a ovlivňuje výslednou konzistenci sýrů (čím je pomalejší, tím tužší konzistence je dosažena) [9]. Skladování zabaleného taveného sýra po vychlazení probíhá při teplotě 4 – 8° C [12].



## 2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ MIKROFLÓRU TAVENÝCH SÝRŮ

Změny, jež vzniknou působením mikroorganismů uvnitř a na povrchu potravin, závisí převážně na jejich fyzikálních a chemických vlastnostech. Mezi vnitřní faktory ovlivňující mikrobiální jakost tavených sýrů patří aktivita vody ( $a_w$ ), koncentrace vodíkových iontů (pH), redoxní potenciál ( $E_h$ ), obsah tuku, přítomnost látek s emulgačními účinky a působení dalších faktorů a ingrediencí. Vnitřní faktory jsou určeny především technologickými procesy. Na vlastnosti a kvalitu tavených sýrů mají však významný vliv i podmínky uchovávání a skladování, tedy vnější faktory jako je teplota prostředí, relativní vlhkost vzduchu (% RV), složení atmosféry a doba skladování.

Vnitřní a vnější faktory ovlivňují charakter mikrobiálních změn, jejich rychlost a tedy i výslednou trvanlivost potravin. Důležitý je také počet a druhové zastoupení mikroorganismů [17, 18].

### 2.1 Vnitřní faktory

#### 2.1.1 Vliv pH

Nejlepší podmínky pro rozmnožování mikroorganismů jsou při pH 6,6 - 7,5 (kolem neutrálního bodu), pod pH 4,0 je schopna růstu pouze minimální část mikroorganismů. Bakterie jsou oproti plísním a kvasinkám mnohem méně tolerantní ke změnám pH, obzvláště citlivé jsou pak bakterie patogenní. Nepříznivé pH ovlivňuje především dva procesy probíhající v mikrobiální buňce - příjem živin a funkci enzymů [19]. Kyselost potravin je významným faktorem, který ovlivňuje růst mikroorganismů. Okyselení vede ke snížení rychlosti množení a u mikroorganismů rostoucích v prostředí mimo rozsah svého pH optima dochází ke značnému prodloužení lag-fáze [19, 20].

Z hlediska kyselosti prostředí a jeho vlivu na inhibici bakterií je třeba rozlišovat vliv nízké hodnoty pH a vliv kyseliny, kterou byla tato hodnota snížena. Bakterie jsou ve svém růstu inhibovány nejen nízkými hodnotami pH, ale také molekulami v kyselém prostředí nedisociovaných slabých organických kyselin [17]. Studie *in vitro* ukazují, že inhibiční účinky kyselin klesají v pořadí: octová > mléčná > citronová nebo HCl [21].

Tavené sýry mají pH mezi 5,6 - 6,0, což umožňuje růst mnoha mikroorganismů [4]. Minimální požadavek na pH pro proteolytické kmeny *Clostridium botulinum* za jinak ide-

álních podmínek je 4,6 až 4,8 a pro neproteolytické kmeny *Clostridium botulinum* je to 5,0 [21]. Anniballi a kol. studovali vliv pH na růst a produkci toxinu u neurotoxigenních kmenů *Clostridium butyricum*. Nejnižší hodnota pH, při které byl prokázán růst a produkce toxinu byla 5,0. Při pH 5,8 byla u všech kmenů zjištěna produkce toxinu už během prvních tří dnů kultivace [22].

### 2.1.2 Vliv vodní aktivity

Voda představuje asi 80 % hmotnosti bakteriální buňky, část vody je zde vázána na různé buněčné struktury, volně přístupná voda slouží jako rozpouštědlo a prostředí pro biochemické reakce [23]. Molekuly vody mohou volně difundovat přes cytoplazmatickou membránu buněk. Aby tedy nedocházelo ke ztrátám vody z vnitřního prostředí, vyžadují buňky dostatečné množství dostupné vody ve vnějším prostředí [17]. Míra využitelnosti vody pro mikroorganismy se označuje jako **vodní aktivita** ( $a_w$ ) prostředí. Hodnota  $a_w$  je definována jako poměr parciálního tlaku vodní páry nad potravinou k parciálnímu tlaku vodní páry nad čistou vodou při stejné teplotě [18].

Se snižující se vodní aktivitou prostředí, počet mikrobiálních druhů schopných aktivního růstu klesá. Dochází ke snížení růstové rychlosti a velikosti populace, prodlužuje se délka trvání lag fáze. Rozmezí hodnot  $a_w$  vhodných pro růst je ovlivněno i dalšími fyzikálními a chemickými faktory a dostupností živin [24]. Obecně lze říci, že bakterie požadují pro svůj růst vyšší hodnoty vodní aktivity ( $a_w$ ) než mikromycety a kvasinky. Většina bakterií způsobujících kažení potravin není schopna růstu při  $a_w$  nižší než 0,91, zatímco mikromycety mohou znehodnotit i potraviny s  $a_w$  0,80 [19]. Gramnegativní bakterie jsou nejvíce náročné na vodní aktivitu [4].

Strategie využívaná mikroorganismy ke snížení negativního účinku nízké vodní aktivity je založena na intracelulární akumulaci některých rozpustných látek. U bakterií jsou to například  $K^+$  ionty, glutamát, glutamin, prolin, alanin, glycin, sacharóza nebo trehalolóza [19].

Pro většinu čerstvých potravin platí, že jejich hodnota vodní aktivity neklesá pod 0,99 [19]. U tavených sýrů je většinou vodní aktivita  $a_w$  v rozmezí hodnot 0,91 až 0,96 [21]. Tyto hodnoty mohou soužit jako prevence růstu některých mikroorganismů, například u *Clostridium botulinum* došlo při  $a_w$  0,965 ke zpomalení růstu a zpoždění produkce toxinu a

při  $a_w$  0,94 nebyla zjištěna tvorba toxinu ani růst těchto bakterií. Růst proteolytických kmenů *C. botulinum* je inhibován vodní aktivitou  $a_w < 0,935$  a u neproteolytických kmenů  $a_w < 0,970$  [25].

### 2.1.3 Oxidoredukční potenciál

Redoxní potenciál ( $E_h$ ) je dalším vnitřním faktorem, který má vliv na růst a metabolismus mikroorganismů. Odráží poměr mezi oxidovanými a redukovanými látkami v prostředí a pro jeho hodnotu jsou určující oxidačně redukční pochody v potravíně. Oxidační proces je definován odevzdáním elektronů a redukční jejich přijímáním [17]. Vliv redoxního potenciálu na metabolismus bakterií spočívá v regulaci funkce některých enzymů [23].

Aerobní bakterie vyžadují vysoké hodnoty  $E_h$ , fakultativně anaerobní bakterie tolerují pozitivní i negativní hodnoty  $E_h$ . Většina anaerobních bakterií (např. rod *Clostridium*) vyžaduje pro svůj růst nízké hodnoty  $E_h$ . Klostridia jako *C. perfringens*, *C. botulinum* jsou vůči vyšším hodnotám  $E_h$  tolerantní [18].

### 2.1.4 Vliv obsahu tuku

Dalším faktorem, který ovlivňuje mikrobiální jakost tavených sýrů je i obsah tuku. Nízkotučné sýry jsou pro mnohé mikroorganismy méně příznivým prostředím oproti sýrům s vyšším obsahem tuku. Ve studii Glassové a Johnsona byly zkoumány faktory ovlivňující bezpečnost tavených sýrů z hlediska kontaminace a produkce toxinu proteolytickými a neproteolytickými kmeny *C. botulinum*. Autoři zjistili, že vyšší obsah tuku byl spojen s rychlejší produkcí toxinu. Možným vysvětlením tohoto jevu je interakce lipidů s inhibičními látkami, které se v tavených sýrech vyskytují buď přirozeně nebo jsou do nich přidávány [26].

I další výzkumy dokázaly, že růst anaerobních bakterií byl snížen v prostředí tavených sýrů s nižším obsahem tuku ve srovnání s výrobky, kde nebyl redukován obsah tuku. Produkce botulotoxinu u sýrů nízkotučných nebo téměř bez tuku může být opožděna na rozdíl od sýrů plnotučných se stejným obsahem sušiny, NaCl, emulgátoru a pH [21, 27].

### 2.1.5 Vliv látek s emulgačními účinky a emulgátorů

Mezi nejhojněji používané látky s emulgačními účinky patří fosforečnany, polyfosforečnany, nebo citrany. Jako emulgátory se používají např. monoacylglyceroly, jejichž účinkům na mikroorganismy je věnována kapitola 4.4.

Antimikrobní účinky fosforečnanů jsou popisovány především u grampozitivních bakterií. Podstatou jejich inhibičního účinku je schopnost chelatace, tedy vazby kationtů, zejména vápenatých a hořečnatých. Cílem ataku polyfosforečnanů jsou enzymy, které jsou ve své aktivitě závislé na přísunu těchto kationtů. Přídavek fosforečnanů do média vede k lyzi rostoucích buněk a redukci počtu životaschopných buněk. Účinek polyfosforečnanů závisí i na fázi růstu bakterií, nejrychlejšího úbytku počtu buněk bylo dosaženo u bakterií v exponenciální fázi růstu, zatímco buňky ve stacionární fázi nebyly přítomností fosforečnanů významně ovlivněny [28]. Inhibiční efekt je závislý na délce řetězce fosforečnanů. Lepší inhibiční účinky mají fosforečnany s delšími řetězci než fosforečnany s krátkými řetězci. Působení polyfosforečnanů s dlouhým řetězcem spočívá ve vyšší afinitě k bivalentním iontům kovů. Přídavek polyvalentních iontů do kultivačního média oslabuje inhibiční efekt. Teplota, pH a počáteční populace mikroorganismů také ovlivňují inhibiční působení. U bakterií, jež tvoří spory, mají polyfosforečnany inhibiční vliv na klíčení spor. [4].

### 2.1.6 Vliv ostatních faktorů a ingrediencí

Mezi další látky, které mohou ovlivnit růst mikroorganismů v tavených sýrech, patří například nisin nebo lysozym. Nisin je polypeptid produkovaný určitými kmeny *Lactococcus lactis*, který působí inhibičně na grampozitivní bakterie. Nisin je rozpustný ve vodě a může se vázat na fosfolipidy bakteriální cytoplazmatické membrány a porušit její propustnost [4]. Gramnegativní bakterie jsou k působení nisinu rezistentní díky přítomnosti vnější membrány, která představuje bariéru pro průnik molekul nisinu až k cytoplazmatické membráně. Pokud však dojde k narušení této bariérové funkce vnější membrány, např. přidáním chelatačních činidel nebo osmotickým šokem, gramnegativní bakterie svou rezistenci k nisinu ztrácí [29, 30]. Kromě vegetativních buněk jsou nisinem ovlivněny i bakteriální endospory. Přestože jsou mnohem odolnější než vegetativní buňky, v přítomnosti nisinu ztrácí spory odolnost vůči teplotě a dochází k zablokování procesu germinace a přestavby spory na aktivní buňku [21].

### 3 MIKROBIOLOGIE TAVENÝCH SÝRŮ

Mikrobiologické změny jsou z hlediska svých možných důsledků nejvýznamnějšími změnami, ke kterým dochází během zpracování a skladování potravin. Vlivem činnosti mikroorganismů (bakterií, kvasinek, plísní) může dojít ke kontaminaci potravin toxickými zplodinami jejich metabolismu a tedy i k potenciálnímu ohrožení zdraví konzumenta. Mikroorganismy mohou dále spotřebovávat nutričně významné složky potravin, což vede ke snížení jejich nutriční hodnoty [31]. Působením mikroorganismů se mění i vlastnosti potravin, tzn. jejich konzistence, textura, vzhled, barva, chuť a vůně [18]. Mikrobiologická jakost konečného výrobku je ovlivněna převážně mikrobiologickou kvalitou použitých surovin, dodržováním hygienických podmínek v průběhu výroby, jakostí obalů a způsobem skladování. Pokud je postup výroby a skladování správně dodržen, vady tavených sýrů jsou omezeny na formy, které jsou způsobeny psychrotrofními mikroorganismy nebo mikroorganismy schopnými růst při nízkém množství kyslíku [19].

Mezi nejčastěji se vyskytující kontaminanty u tavených sýrů patří sporotvorné bakterie, mikromycety a mikroorganismy, které se do výrobku dostaly až po výrobě (sekundární kontaminanty) [32].

Sporulující bakterie jsou schopné vytvářet endospory, které slouží k dlouhodobému přežití nepříznivých podmínek. Spory tvoří zejména některé grampozitivní bakterie ze skupiny Firmicutes – modelové rody *Clostridium* a *Bacillus* [33].

Mezi sekundární kontaminanty patří např. *Staphylococcus aureus*, toxigenní stafylokok, který nepřežívá pasteraci, ale jeho toxin je termostabilní. Dalším kontaminantem může být *Listeria monocytogenes*, která bývá často izolována ze syrového mléka a kontaminuje i potrubí a chladírenská zařízení. Kromě grampozitivních patogenních bakterií mohou tavené sýry kontaminovat také gramnegativní patogeny, jako např. patogenní *Escherichia coli* a *Salmonella* sp., vyskytující se často v syrovém mléce. Mezi bakterie způsobující kažení tavených sýrů patří rody *Lactobacillus* a *Pseudomonas*. Z mikromycet nejčastěji zhoršují jakost tavených sýrů zástupci rodu *Penicillium* [4].

#### 3.1 Rod *Bacillus*

Buňky bakterií tohoto rodu mají bacilární tvar tyček s grampozitivní buněčnou stěnou. Jsou obligátně aerobní nebo fakultativně anaerobní. Pohybují se díky peritrichálním

bičičkům rozmístěným po celém povrchu buňky. Bakterie jsou heterotrofní, konkrétně chemorganotrofní (přijímají a oxidují pouze organické sloučeniny). Optimální teplota pro růst se pohybuje v rozmezí 15 - 55 °C [34]. Významnou vlastností rodu je schopnost tvorby endospor, které jsou značně odolné vůči nepříznivým vlivům prostředí (vysoké teploty, chemikálie, záření) [35]. Umístění spor v buňce může být centrální, paracentrální, subterminální, terminální či laterální. Sporulace neprobíhá bez přítomnosti kyslíku [36]. Většina druhů je biochemicky velmi aktivní a produkuje enzymy, které štěpí škrob, rostlinné pektiny nebo bílkoviny. Někteří zástupci produkují antibiotika [37].

Většina druhů rodu *Bacillus* je považována za nepatogenní, striktním patogenem je pouze původce anthraxu *Bacillus anthracis*. Známé jsou však alimentární onemocnění (enterotoxikózy) vyvolané toxiny produkovanými příslušníky rodu *Bacillus*, především pak druhy *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. pumilis* a *B. licheniformis* [36].

### 3.1.1 *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* je fakultativně anaerobní mikroorganismus s velkými vegetativními buňkami, většinou o rozměrech 1 x 3 – 5 µm. Roste v teplotním rozmezí 8 – 55°C, optimální teplota se pohybuje kolem 28 – 35 °C. Není výrazně tolerantní k nízkým hodnotám pH (min. 5,0 – 6,0 v závislosti na okyselení) nebo vodní aktivitě (min. 0,95). Poněvadž *Bacillus cereus* vytváří spory, je široce rozšířen v prostředí a tyto bakterie mohou být izolovány z půdy, vody a vegetace. Je také běžnou přechodnou součástí střevní flóry u lidí. Způsobuje dva druhy otrav z potravin. Průjmovou formu s dlouhou inkubací (projeví se do jednoho dne) a formu emetickou s inkubací krátkou (do šesti hodin) [38].

### 3.1.2 *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis*, známý také jako senný nebo trávnický bacil, je grampozitivní, kataláza pozitivní bakterie běžně se vyskytující v půdě. Má schopnost tvořit tvrdé, ochranné endospory, umožňující organismu snášet extrémní podmínky prostředí. Na rozdíl od několika dalších známých druhů, *Bacillus subtilis* byl v historii klasifikován jako obligátně aerobní, ačkoli nedávný výzkum ukázal, že to není zcela správně [39]. *Bacillus subtilis* není považován za lidský patogen. Může kontaminovat potraviny, ale jen zřídka způsobí otravu jídlem. Přežívá extrémní teploty při vaření. Endospory *Bacillus subtilis* jsou odolné vůči faktorům

životního prostředí, jako jsou teplo, kyseliny a soli, a mohou přetrvávat v životním prostředí dlouhou dobu. *Bacillus subtilis* je mikroorganismus vysoce přístupný ke genetické manipulaci, a díky tomu je modelovým organismem pro laboratorní studie, zejména pro studium sporulace [40].

## 3.2 Rod *Clostridium*

Grampozitivní, obligátně anaerobní bakterie. Klostridiální endospory buňku rozšiřují. Vyskytují se ve vodě, v půdě, v potravinách i v zaživačím ústrojí zvířat. Některé druhy jsou pro člověka patogenní, jiné se využívají v průmyslu [37]. Jedná se o rovné nebo mírně zakřivené tyčinky, uspořádané jednotlivě, ve dvojicích nebo krátkých řetězcích [41]. Z hlediska kontaminace potravin je významná sacharolytická a proteolytická činnost klostridií, dále tvorba plynu ( $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2$ ) při anaerobní oxidaci sacharidů. Tvorba plynu je nežádoucí zejména v sýrařství, kdy může být příčinou tzv. duření sýrů. Bakterie rodu *Clostridium* jsou dále nežádoucí pro tvorbu nepříjemně páchnoucích sloučenin, především kyseliny máselné [42].

### 3.2.1 *Clostridium sporogenes*

*Clostridium sporogenes* se vyskytuje v půdě, mořských a jezerních sedimentech, konzervovaném mase a stolici zvířat i člověka. V masném průmyslu způsobuje vady masa a také masových konzerv, např. hnití. Některé kmeny jsou spojovány s onemocněním člověka (botulismus) díky produkci neurotoxinů. *C. butyricum* se vyznačuje značnou odolností vůči nepříznivým vlivům prostředí, odolává působení teploty 80 °C po dobu 30 minut a 90 °C po dobu 10 minut [42, 43].

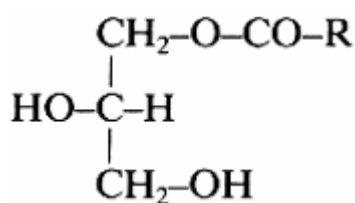
### 3.2.2 *Clostridium butyricum*

*Clostridium butyricum* je známo díky své vysoké odolnosti vůči nežádoucím podmínkám životního prostředí. Odolává teplotě 80 °C po dobu 30 minut a 90 °C po dobu 10 minut. Vyskytuje se v půdě, sladkovodních a mořských sedimentech a ve stolici zvířat i člověka. *Cl. butyricum* se využívá při výrobě kyseliny máselné [43].

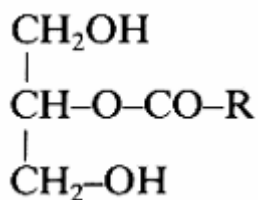
## 4 MONOACYLGLYCEROLY

Monoacylglyceroly (MAG) jsou parciálními estery vyšších mastných kyselin a trojsytného alkoholu glycerolu. Dle počtu esterově vázaných mastných kyselin rozlišujeme monoacylglyceroly (jedna mastná kyselina), diacylglyceroly (dvě mastné kyseliny) a triacylglyceroly (tři mastné kyseliny) [44, 45]. Z potravinářského hlediska patří MAG mezi nejvýznamnější skupinu lipidů. Vznikají substitucí vodíku jedné hydroxylové skupiny glycerolu zbytkem (acylem) mastné kyseliny. Mohou existovat ve třech stereochemických formách [44, 46]:

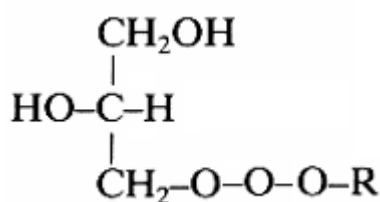
*sn*-1-monoacylglycerol



*sn*-2-monoacylglycerol



*sn*-3-monoacylglycerol



Obr. 1- Izomery monoacylglycerolu [47]

Normálně izomery *sn*-1 a *sn*-3 nejsou od sebe odlišitelné a jsou označovány jako  $\alpha$ -monoacylglyceroly, pro *sn*-2 izomery se používá označení  $\beta$ -monoacylglyceroly. [44, 45].



## 4.1 Vlastnosti monoacylglycerolů

Fyzikální a chemické vlastnosti acylglycerolů jsou určeny především počtem a typem mastných kyselin navázaných ve formě acylu. Povaha uhlíkového řetězce ovlivňuje například teplotu tání monoacylglycerolů. Bod tání se zvyšuje s rostoucím počtem atomů uhlíku v molekule, se zvyšující se nenasyceností mastných kyselin bod tání klesá. Teplota tání u mastných kyselin a acylglycerolů stoupá v následujícím pořadí:  $MK < TAG < DAG < MAG$ . MAG jsou poměrně málo polární, rozpustné v alkoholu, nerozpustné v petroletheru, narozdíl od TAG, které rozpustné v alkoholu nejsou, ale v petroletheru ano [46].

Monoacylglyceroly patří mezi povrchově aktivní látky díky struktuře své molekuly,, která je tvořena polární (hydrofilní) a nepolární (lipofilní) částí. Na rozhraní dvou fází jsou MAG orientovány tak, že hydrofobní konce molekul, tvořené mastnými kyselinami, směřují do hydrofobní fáze, zatímco do vodné fáze směřují hydrofilní části molekuly MAG. Tímto způsobem je vytvořen orientovaný molekulární film, který brání zpětnému spojování dispergované fáze a tím umožňuje zvyšovat stabilitu emulzí [48].

Výhodou monoacylglycerolů je fakt, že jsou to látky bezpečné bez negativních účinků na lidský organizmus. Vyskytují se přirozeně v mléčném tuku spolu s dalšími látkami, jako jsou například triacylglyceroly (TAG), fosfoglyceridy a sfingolipidy a rozsáhlé spektrum nasyčených (kyselina máselná, kapronová, kaprylová, kaprinová, laurová palmitová) a nenasycených (kyselina olejová, linolová ) mastných kyselin. TAG, představující eminentní složku mléčného tuku, jsou žaludečními lipázami rozloženy na mastné kyseliny a monoacylglyceroly. MAG a MK se vyznačují oproti TAG a DAG i antimikrobiálními vlastnostmi [49].

## 4.2 Výroba monoacylglycerolů

Monoacylglyceroly mohou být vyrobeny následujícími způsoby:

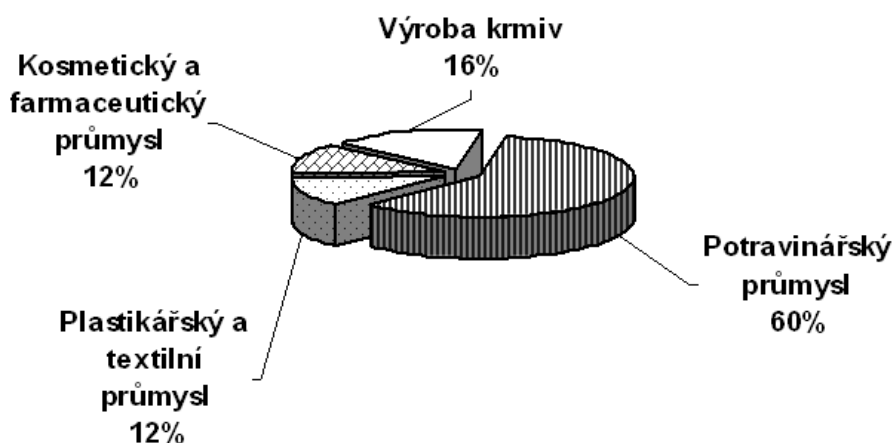
- Esterifikace MK s glycerolem
- Interesterifikace - acidolýza
  - alkoholýza (glycerolýza)
  - transesterifikace esterů vyšších MK s glycerolem
- Hydrolyza tuků a olejů

- Adice mastných kyselin na glycidol

V průmyslovém měřítku je pro výrobu monoacylglycerolů nejčastěji využívána glycerolýza přírodních tuků a olejů, přímá esterifikace mastných kyselin s glycerolem a hydrolýza [50]

### 4.3 Využití MAG v potravinářství

Monoacylglyceroly mají povahu povrchově aktivních látek, díky čemuž patří mezi nejrozšířenější emulgátory v potravinářském, kosmetickém, plastikářském, farmaceutickém a textilním průmyslu [45].



Obr. 2 – Využití MAG v průmyslu [50]

Hlavní oblastí využití MAG je potravinářský průmysl (Obr. 2). MAG se uplatňují jako emulgační činidla při výrobě emulgovaných tuků, při technologickém zpracování margarínů, a mražených smetanových krémů. Monoacylglyceroly se dále používají v pečárenském průmyslu a při výrobě těstovin. Studie prokázaly, že monoacylglyceroly jsou schopny zlepšit vlastnosti těsta a finálního výrobku a prodloužit čerstvost pečiva. Tyto látky jsou také schopny zvětšovat objem, stabilitu a snižovat lepivost při výrobě bramborové kaše a cukrovinek. Dokonce bylo popsáno i použití monoacylglycerolů v souvislosti s masnými výrobky (tepelně opracovanými i neopracovanými). V neposlední řadě se MAG využívají i u nízkotučných produktů a instatních pokrmů [51].

#### 4.4 Antimikrobiální účinky monoacylglycerolů

Antibakteriální působení mastných kyselin a jejich solí jsou známé již více než 4000 let. Teprve v nedávné době se výzkumy prokázaly, že antibakteriální vliv některých monoacylglycerolů je větší než u samostatných mastných kyselin. [52] Monoacylglyceroly tedy díky charakteru své molekuly mohou působit proti množení a růstu mikroorganismů. Těmito látkami může být inhibován růst gram pozitivních a gram negativních bakterií, sporulujících bakterií, kvasinek a plísní, dokonce i některých obalených virů [53, 54, 55]. Přestože přesný mechanismus účinku není znám, obecně lze říci, že na rozdíl od antibiotik mají mastné kyseliny a jejich estery několik odlišných mechanismů působení. Hlavní cíl jejich působení je cytoplazmatická membrána buněk, kde MAG způsobují deformace buněčné membrány a následně dojde k porušení její polopropustnosti. Další hypotéza předpokládá pronikání mastných kyselin s krátkým a středně dlouhým řetězcem do bakteriálních buněk v nedisociované formě s následnou disociací v intracelulárním prostředí a důsledkem je okyselení buněčného obsahu, což může vést k inhibici životně důležitých enzymů. [56]. Rozdílná účinnost jednotlivých monoacylglycerolů je odvozena od vlastností a charakteru jejich mastných kyselin. Významná je zejména délka uhlíkatého řetězce a poloha a počet nenasyčených vazeb mastných kyselin. S rostoucí délkou řetězce mastné kyseliny klesá inhibiční účinek. Aktivita monoacylglycerolů také závisí na druhu izomeru. Byla zjištěna vyšší antimikrobní aktivita u izomeru *sn*-1 než u izomeru *sn*-2 monoacylglycerolu kyseliny laurové. Zvýšená teplota nebo přítomnost kyselin a chelatačních činidel má také vliv na větší inhibiční aktivitu monoacylglycerolů [57].

Studiem antimikrobních vlastností MAG C<sub>10:0</sub> (MAG kyseliny kaprinové) bylo zjištěno potlačení či úplné zastavení růstu gram pozitivních bakterií, kvasinek a také vláknitých hub s výjimkou *Mucor racemosus*. U gram negativních bakterií, konkrétně u rodu *Klebsiella pneumoniae* a *Acinetobacter lwoffii* dochází k inhibici růstu již při nízkých koncentracích monokaprinu 100 mg/l. Mezi gram negativní bakterie, které se ukázaly odolnými vůči účinkům monokaprinu, patří *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*, u nichž nebyla zaznamenána změna růstu ani v nejvyšší testované koncentraci 1000 mg/l [54]. Antimikrobiální aktivita MAG C<sub>11:0</sub> (MAG kyseliny undekanové) a MAG C<sub>11:1</sub> (MAG kyseliny undecenové) byly také zkoumány. Obě tyto látky inhibují růst gram pozitivních koků, např. *Staphylococcus aureus* a spory *Bacillus cereus*. Gram negativní bakterie ukázaly naopak značnou odolnost k MAG C<sub>11:0</sub> a výraznou toleranci k MAG C<sub>11:1</sub>. Houby rodu *Alternaria*, *Clado-*

*sporium* a *Trichothecium* byly zcela inhibovány použitím MAG C<sub>11:1</sub> o koncentraci vyšší než 750 mg/l. Růst *Aspergillus niger*, *Mucor racemosus*, *Phoma*, *Scopulariopsis* a *Trichoderma* nebyl zcela inhibován, ale významně omezen. Lze tedy říci, že MAG C<sub>11:1</sub> byl ve svém působení na růst mikroorganismů účinnější než MAG C<sub>11:0</sub> [58]. Ve srovnání MAG C<sub>12:0</sub> (MAG kyseliny laurové) s monokaprinem byly dokázány lepší antimikrobiální účinky monolaurinu pouze u gram pozitivních bakterií, jako jsou *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* a také u gram negativní bakterie *Acinetobacter lwoffii*, zatímco u dalších gram negativních druhů a u kvasinek nebyly zjištěny žádné inhibiční účinky. Testování MAG C<sub>12:0</sub> bylo provedeno i proti vláknitým houbám, kdy byl zjištěn snížený růst *Penicillium ochrochloron* a *Alternaria alternata* v koncentraci od 400 do 750 mg/l monolaurinu, a také byla zjištěna snížená schopnost spolurace u *Aspergillus niger* a *Mucor racemosus* v koncentracích monolaurinu od 300 do 750 mg/l [54].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 CÍL PRÁCE

Cíle bakalářské práce byly stanoveny následovně:

- v teoretické části zpracovat literární rešerši zaměřenou na charakteristiku tavených sýrů, jejich výrobu, složení a základní vlastnosti,
- popsat mikroorganismy, které mohou tyto produkty kontaminovat a dále faktory ovlivňující růst a množení mikroorganismů v tavených sýrech,
- v praktické části sledovat působení monoacylglycerolu kyseliny laurové (monolaurinu) na růst sporulujících bakterií rodu *Bacillus* a *Clostridium* po inokulaci do vzorků tavených sýrů,
- na základě poznatků z teoretické části a výsledků části praktické zhodnotit využitelnost aplikovaného monolaurinu pro prodloužení údržnosti tavených sýrů.

## 6 MATERIÁL A METODY

### 6.1 Mikroorganismy

Pro sledování antibakteriálních účinků monoacylglycerolů v tavených sýrech byly zvoleny následující mikroorganismy:

- *Bacillus cereus* CCM 2010,
- *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062,
- *Clostridium sporogenes* CAPM 6329,
- *Clostridium butyricum* CAPM 6342.

Bakterie rodu *Bacillus* byly získány z České sbírky mikroorganismů. Bakterie rodu *Clostridium* byly získány ze Sbírký zoopatogenních mikroorganismů při Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně.

### 6.2 Monoacylglycerol

Pro studium antibakteriálních účinků v tavených sýrech byl zvolen monoacylglycerol kyseliny laurové (MAG C<sub>12:0</sub>), který byl poskytnut zaměstnanci Ústavu technologie tuků, tenzidů a kosmetiky. MAG C<sub>12:0</sub> byl vyroben adicí mastné kyseliny na glycidol za katalýzy Chromium (III) acetát hydroxidu.

### 6.3 Kultivační půdy a roztoky

Pro růst bakterií rodu *Bacillus* byla použita kultivační půda **Plate-Count Agar (PCA)**.

Složení:

- Plate-Count Agar ..... 9,32 g
- destilovaná voda..... 400 ml

Pro růst bakterií *Clostridium* byla použita kultivační půda **Reinforced Clostridial Broth (RCB)**.

Složení:

- Reinforced Clostridial Broth.. 15,2 g

- Agar..... 6,0 g
- destilovaná voda..... 400 ml

Příprava živných půd probíhala smícháním jednotlivých složek, typických pro každý druh půdy, se 400 ml destilované vody, protřepáním a sterilizací v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 30 minut.

### **Fyziologický roztok**

Složení:

- NaCl..... 8 g
- destilovaná voda..... 1000 ml

Fyziologický roztok byl připraven navážením 8 g NaCl do odměrné baňky o objemu 1000 ml a doplněn destilovanou vodou po rysku. Fyziologický roztok byl autoklávován při teplotě 121 °C po dobu 30 min.

## **6.4 Použité přístroje a laboratorní pomůcky**

- Vorwerk Thermomix TM 31
- Homogenizátor Stomacher
- Autokláv Systec 2540EL
- Laboratorní předvážky KERN
- Biologický termostat Membert INE 600
- Chladnička Electrolux
- Mikroteinové sáčky k homogenizaci
- Lžíce
- Plynový kahan
- Petriho misky
- Zkumavky a stojan na zkumavky
- Automatické pipety 0,5 ml a 1 ml



- Láhve 400 ml a 1000 ml
- Odměrka 50 ml

## 6.5 Metodika

### 6.5.1 Výroba tavených sýrů

Při výrobě tavených sýrů bylo použito následujících surovin:

- eidamská cihla 30 % w/w tuku v sušině,
- čerstvé máslo,
- pitná voda,
- tavicí soli:
  - PYRO - difosforečnan sodný ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ )
  - KPS - dihydrogendifosforečnan sodný ( $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$ )
  - DIDI - hydrogenfosforečnan disodný dihydrát ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )
- monoacylglycerol kyseliny laurové (MAG C<sub>12:0</sub>)

Navážka jednotlivých surovin pro výrobu tavených sýrů je uvedena v tabulkách 1 a 2. Konečný produkt byl vyroben na zařízení Vorwerk Thermomix TM 31. Směs surovin byla za stálého míchání zahřívána na teplotu tavení 91 °C, která byla udržována po dobu 1 minuty. Poté byla tavenina zaočkována 5 ml suspenze buněk *Bacillus cereus* CCM 2010, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062, *Clostridium sporogenes* CAPM 6329 nebo *Clostridium butyricum* CAPM 6342 a vše bylo důkladně promícháno. Vzniklá tavenina byla ihned nalita do 16 plastových kelímků a uzavřena zažehlením hliníkového víčka. Vzorky zchlazené při pokojové teplotě byly následně skladovány v lednici při teplotě  $6 \pm 2$  °C.

Tab. 1 – Koncentrace a množství MAG v modelových vzorcích tavených sýrů

Koncentrace MAG C <sub>12:0</sub> (%)	Množství MAG C <sub>12:0</sub> (g)
0,01	0,111
0,05	0,553
0,15	1,658

Tab. 2 – Surovinová skladba modelových vzorků tavených sýrů

Složka	Množství (g)
eidamská cihla 30%	550
máslo	170
DIDI	21
KPS	6
PYRO	3
tavicí soli celkem	30
voda	355

### 6.5.2 Stanovení celkového počtu mikroorganismů ve vzorku

Tavené sýry byly skladovány po dobu 141 dní při teplotě  $6 \pm 2$  °C. Vzorky pro stanovení počtu mikroorganismů byly odebírány po 5, 13, 27, 41, 56, 78, 113 a 141 dnech skladování, přičemž pro každou analýzu byly odebrány dva vzorky z každé série. Ve zkoumaných vzorcích byl zjišťován celkový počet bakterií rodů *Bacillus* a *Clostridium* pomocí plotnové metody.

Analýza vzorku probíhala za aseptických podmínek. Z každého plastového kelímku s taveninou bylo naváženo 5 g vzorku do mikrotenového sáčku, přidáno 45 ml fyziologického roztoku a homogenizováno přibližně 2 minuty ve Stomacheru. Po homogenizaci bylo odebráno 0,5 ml vzorku a promícháno s 4,5 ml sterilního fyziologického roztoku. Podle množství ředění bylo vždy odebráno 0,5 ml z předchozího vzorku a přidáno do další zkumavky s fyziologickým roztokem. Z nejhodnějšího ředění byl odebrán 1 ml inokula na Petriho misku a přelit 16 – 20 ml příslušné živné půdy. Z každého vzorku byly očkované dvě

po sobě jdoucí ředění. Po utužení byly misky kultivovány v termostatu při teplotě 37°C po dobu 48 hodin (rod *Bacillus*) a v anaerostatu (bez přístupu kyslíku) při teplotě 37°C po dobu 24 hodin (rod *Clostridium*). Po uplynutí potřebné doby kultivace byly narostlé kolonie počítány a přepočteny na CFU.g<sup>-1</sup> dle vzorce:

$$\frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0,1n_2)d} \quad [59]$$

### 6.5.3 Dekontaminace zařízení a použitého materiálu

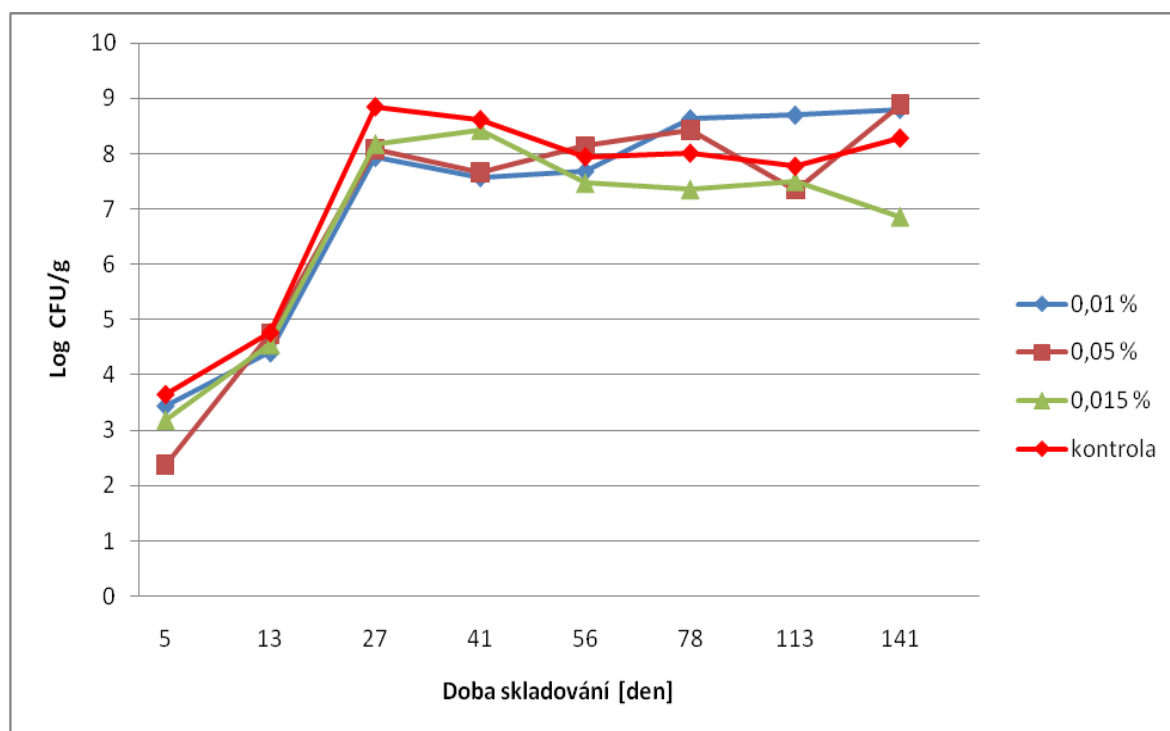
Při výrobě tavených sýrů bylo mezi jednotlivými tavbami dekontaminováno zařízení Vorwerk Thermomix TM 31 pomocí 10 % roztoku SAVA. Tavené sýry byly po odebrání vzorku pro mikrobiologickou analýzu dekontaminovány v autoklávu při teplotě 132 °C po dobu 20 minut. Živné půdy po kultivaci a odečtu výsledků byly sterilizovány při teplotě 132 °C po dobu 20 minut.

## 7 VÝSLEDKY

V experimentální části práce byly tavené sýry zaočkovány sporujícími bakteriemi *Bacillus cereus* CCM 2010, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062, *Clostridium sporogenes* CAPM 6329 a *Clostridium butyricum* CAPM 6342. Růst těchto bakterií ve vzorcích sýra s obsahem monoacylglycerolu kyseliny laurové ve třech různých koncentracích byl sledován po dobu několika měsíců. Srovnáním s kontrolními vzorky bez přídavku monoacylglycerolu bylo hodnoceno případné inhibiční působení této látky na růst zvolených mikroorganismů.

### 7.1 Vliv monoacylglycerolu kyseliny laurové na růst *Bacillus cereus* CCM 2010

Obrázek 3 znázorňuje účinek monoacylglycerolu kyseliny laurové na růst *Bacillus cereus* ve vzorcích tavených sýrů. Výsledky jsou vyjádřeny jako závislost logaritmu CFU/g na době skladování.



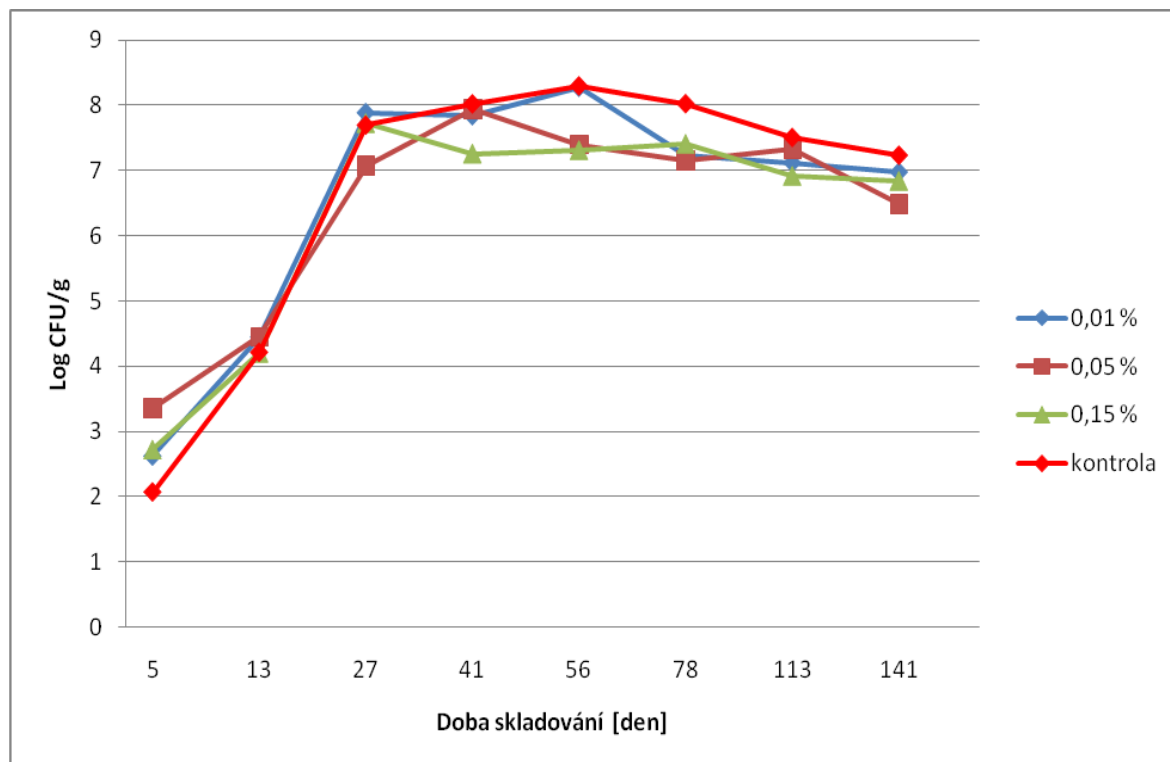
Obr. 3 - Vliv MAG C<sub>12:0</sub> na růst *B. cereus*

U kontrolního vzorku bez přídavku MAG byl pozorován postupný nárůst počtu buněk během prvních 27 dnů skladování, 27. dne bylo dosaženo maximální hodnoty 8,9 log CFU/g. Do 56. dne klesala tato hodnota až na 8,2 log CFU/g, a poté byla konstatní pouze se zanedbatelnými odchylkami až do doby odběru posledního vzorku taveného sýra, čili do

141. dne, kdy došlo k mírnému zvýšení počtu buněk. U nejnižší testované koncentrace MAG C<sub>12:0</sub> se během prvního měsíce skladování zvyšoval počet mikroorganismů z 3,5 log CFU/g na 8 log CFU/g. Mírný inhibiční účinek byl prokázán do 60. dne skladování, od této doby se počty mikroorganismů nacházely nad hodnotou, zjištěnou u kontrolního vzorku, kdy dosáhly 8,6 log CFU/g a tuto hodnotu si držely až do doby posledního odběru. Ve vzorcích obsahujících MAG C<sub>12:0</sub> o koncentraci 0,05% byly zaznamenány velmi podobné trendy jako v případě nižší testované koncentrace a lze opět hovořit o mírné inhibici růstu bakterií do 50. dne. Nejvyšší testovaná koncentrace MAG C<sub>12:0</sub> se vyznačovala nejvyšším antibakteriálním účinkem na *Bacillus cereus*. Po celou dobu skladování byl celkový počet buněk nižší než v kontrolním vzorku. Počáteční hodnota 3,1 log CFU/g stoupala během prvních 42 dní na 8,35 log CFU/g. Poté klesla na 7,45 log CFU/g a kolem této hodnoty kolísala do 113. dne skladování. Rozdíl mezi počtem buněk v kontrolním vzorku a ve vzorku s přídavkem 0,15 % MAG C<sub>12:0</sub> činil po 141 dnech skladování téměř 1,3 log CFU/g.

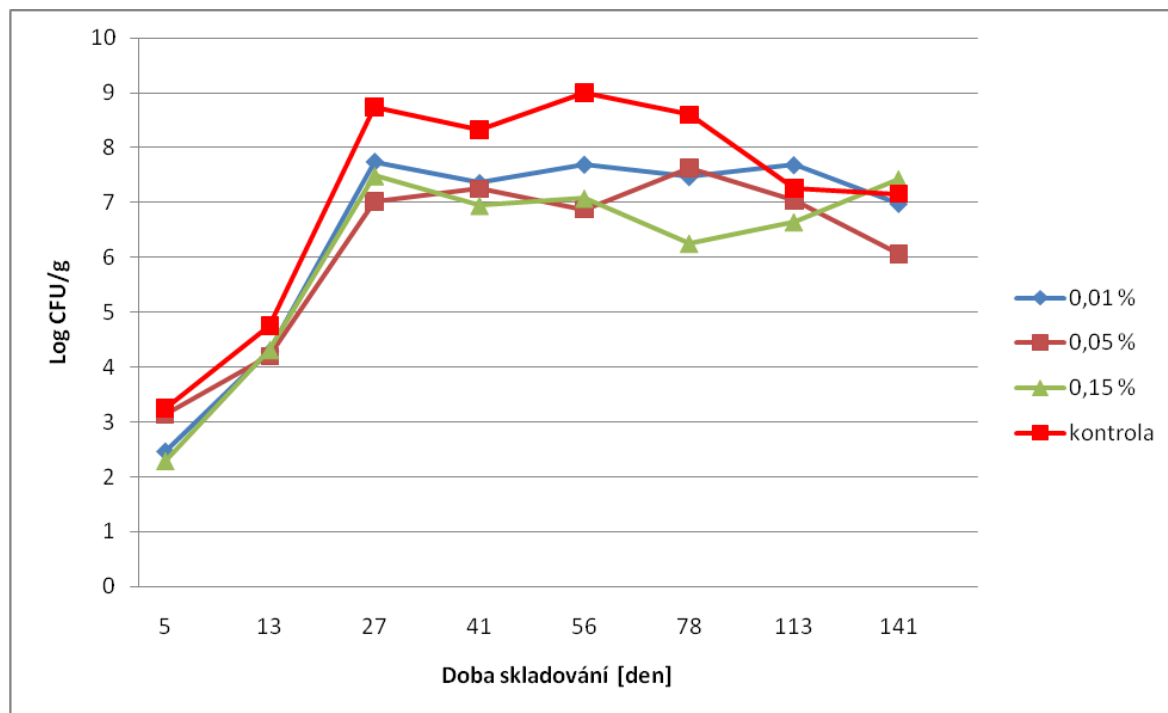
## **7.2 Vliv monoacylglycerolu kyseliny laurové na růst *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062**

Účinky monolaurinu na *Bacillus subtilis* jsou znázorněny na obrázku 4. U kontrolního vzorku bez přídavku MAG C<sub>12:0</sub> byla počáteční hodnota 2,05 log CFU/g a stoupala následujících 51 dní na maximální dosaženou hodnotu 7,75 log CFU/g. V dalších týdnech skladování se počet mikroorganismů v kontrolním vzorku mírně snižoval. Vzorky, obsahující MAG C<sub>12:0</sub> o koncentraci 0,01 % w/w, obsahovaly při počátečním rozboru 2,6 log CFU/g bakterií a následně tyto počty stoupaly až na hodnotu 7,9 log CFU/g v 27. dni skladování a toto množství se udrželo až do 41. dne. Během následujících dvou týdnů se počet bakterií ještě zvýšil na 8,2 log CFU/g. V závěru skladovací doby se počty mikroorganismů nacházely v rozmezí hodnot 7,1 – 7 log CFU/g. U vzorků s MAG C<sub>12:0</sub> o koncentraci 0,05 % w/w bylo dosaženo nejvyššího počtu buněk 7,9 log CFU/g ve 41. dni skladování. V dalších týdnech byl počet buněk *Bacillus subtilis* téměř o jeden řád nižší než v kontrolním vzorku bez MAG. U nejvyšší koncentrace MAG C<sub>12:0</sub> stoupaly hodnoty buněk od 2,6 log CFU/g do 7,75 log CFU/g během prvních 22 dní. Následně klesly počty mikroorganismů na 7,25 log CFU/g a v rozmezí ± 0,5 log CFU/g se pohybovaly tyto hodnoty až do posledního rozboru. Od 27. dne byl počet mikroorganismů přibližně o jeden řád nižší než v kontrolním vzorku.

Obr. 4 - Vliv MAG C<sub>12:0</sub> na růst *B. subtilis*

### 7.3 Vliv monoacylglycerolu kyseliny laurové na růst *Clostridium butyricum* CAPM 6342

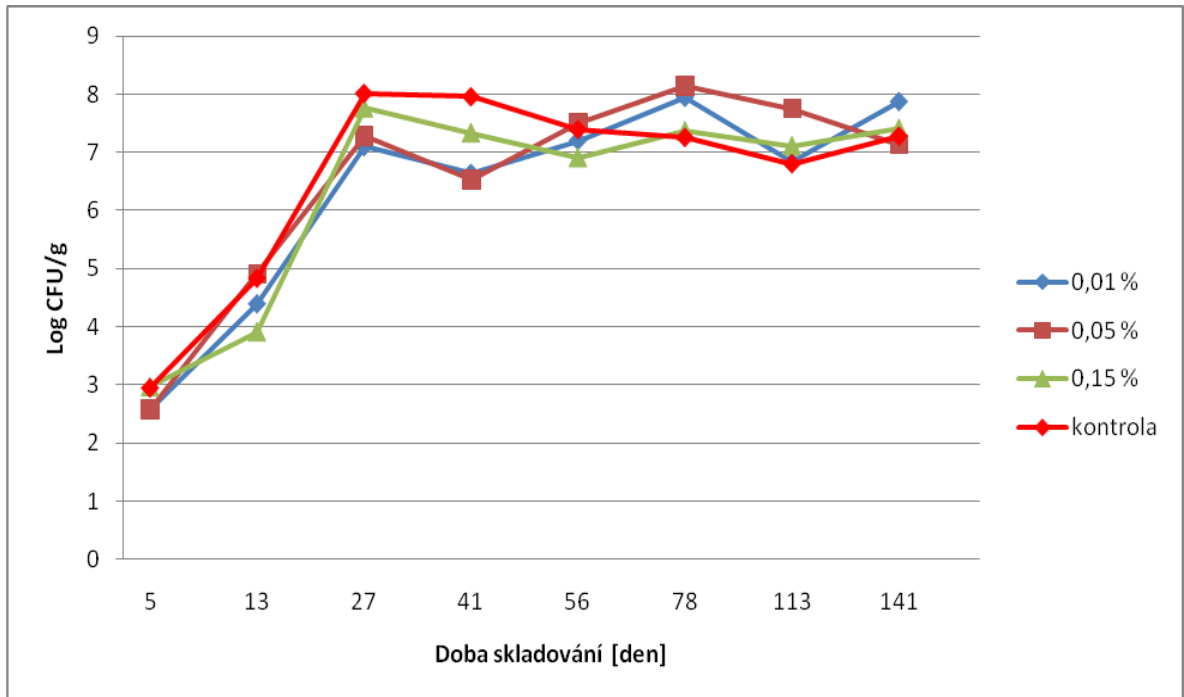
Závislost míry růstu bakterií *Clostridium butyricum* na době skladování je zobrazena na obrázku 5. Od 5. do 27. dne skladování byl pozorován rychlý nárůst mikroorganismů z hodnoty 3,15 log CFU/g na 8,8 log CFU/g. Tato hodnota byla udržována pouze s mírnými poklesy nebo zvýšením až do 78. dne skladování. Konečné počty kontaminujících buněk poklesly na 7,1 log CFU/g. U vzorků obsahující MAG C<sub>12:0</sub> v nejnižší koncentraci byl pozorován nárůst z hodnoty 2,5 log CFU/g na 7,8 log CFU/g ve 27. dni. Počty mikroorganismů se nadále vyskytovaly v rozmezí hodnot 7,8 – 7 log CFU/g a v období mezi 27. a 78. dnem byly sníženy oproti kontrole o přibližně jeden řád. Ve vzorcích s MAG C<sub>12:0</sub> o koncentraci 0,05 % w/w byla maximální hodnota dosažena v 78. dni skladování. Následně došlo k poklesu počtu mikroorganismů až na 6,05 log CFU/g při konečném odběru. U posledního ze zkoumaných vzorků s MAG C<sub>12:0</sub> s nejvyšší koncentrací byla zaznamenána částečná inhibice růstu klostridií, která trvala téměř celou dobu skladování. V období mezi 27. a 78. dnem byl celkový počet buněk o 1,5 až 2 řády nižší než v kontrolních vzorcích.

Obr. 5 - Vliv MAG C<sub>12:0</sub> na růst *C. butyricum*

#### 7.4 Vliv monoacylglycerolu kyseliny laurové na růst *Clostridium sporogenes* CAPM 6329

Působení monolaurinu na bakterie druhu *Clostridium sporogenes* je znázorněno na obrázku 6. Počty mikroorganismů v kontrolních vzorcích bez přídavku monolaurinu se téměř lineárně zvyšovaly do 27. dne skladování od 2,95 log CFU/g do 8 log CFU/g, Tato hodnota byla stejná následujících 14 dní, poté nastal pokles na až na hodnotu 6,9 log CFU/g ve 113 dni. Konečný rozbor ukázal 6,25 log CFU/g bakterií ve zkoumaném vzorku taveného sýra. Vzorky, které obsahovaly MAG C<sub>12:0</sub> o koncentraci 0,01 % w/w a 0,05 % w/w se až do 78 dne skladování v nárůstu buněk vzájemně téměř nelišily. Začáteční množství bylo 2,6 log CFU/g a zvyšovalo se s mírnými rozdíly na stejnou hodnotu, a to 7,15 log CFU/g. Poté došlo k poklesu na 6,55 log CFU/g a po následném vzrůstu byl maximální počet buněk u obou koncentrací 8 log CFU/g. V druhé polovině skladovací doby došlo u vzorků s koncentrací 0,01 % w/w k náhlému poklesu na 6,9 log CFU/g a konečný počet mikroorganismů byl o řád vyšší. Kdežto u vzorků s koncentrací 0,05 % w/w nastal mírnější postupný pokles až na hodnotu 7,1 log CFU/g. Vzorky s MAG C<sub>12:0</sub> s nejvyšší koncentrací ukázaly počáteční hodnotu 2,95 log CFU/g, která vystoupala na hodnotu 7,7 log CFU/g po 27 dnech skladování. Následné počty mikroorganismů se vyskytovaly v rozmezí hodnot 6,9 –

7,3 log CFU/g. Mírná inhibice růstu byla pozorována u všech koncentrací monolaurinu do 56. dne, při následujících analýzách byl počet buněk ve vzorcích s MAG shodný nebo dokonce vyšší než ve vzorcích kontrolních.



Obr. 6 - Vliv MAG C<sub>12:0</sub> na růst *C. sporogenes*



## 8 DISKUZE

Cílem práce bylo vyhodnocení antimikrobiálních účinků monoacylglycerolu kyseliny laurové na růst grampozitivních sporulujících bakterií v tavených sýrech. Pro experimentální část práce byly vybrány dva zástupci rodu *Bacillus* a dva druhy rodu *Clostridium*. Modelové vzorky tavených sýrů byly obohaceny přidavkem monoacylglycerolu kyseliny laurové ve třech různých koncentracích 0,1, 0,5 a 0,15 % w/w.

Tavené sýry se tepelně ošetřují zahřátím na tavicí teplotu, která obvykle bývá v rozmezí 80 – 85 °C. Tato teplota působí mikrobicidně na většinu vegetativních forem bakterií, kvasinek a plísní, včetně patogenních a podmíněně patogenních zástupců. Sporulující bakterie však tyto teploty přežívají, vyšší teploty dokonce mohou být příznivé pro germinaci spor a množení těchto mikroorganismů [14].

Antimikrobiální působení MAG je podmíněno typem mastné kyseliny, která je na glycerol vázána a jednotlivé monoacylglyceroly se tedy ve svých inhibičních účincích na růst mikroorganismů významně liší. Vlivem MAG C<sub>10:0</sub> a MAG C<sub>12:0</sub> na růst *Bacillus subtilis* se zabývali například Růžička a kol. [54]. Minimální inhibiční koncentrace MAG C<sub>12:0</sub> byla 20 mg/l, zatímco u MAG C<sub>10:0</sub> bylo stejného účinku dosaženo až při koncentraci pětinasobně vyšší. Inhibiční působení MAG kyseliny laurové na zástupce rodu *Bacillus* potvrzují i další studie [60, 61]. Antimikrobiálními vlastnostmi monolaurinu se zabývali také Chaibi a kol., kteří zjistili inhibici vegetativních forem a spor *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* a *Clostridium sporogenes* [62].

Využití monoacylglycerolů v potravinách by kromě inhibičního účinku na mikroorganismy mohlo být prospěšné i pro některé vlastnosti výrobku. Aplikací monoacylglycerolů v tavených sýrech (monokaprylinu, monokaprinu, monolaurinu, monopalmitinu a monostearinu) se zabývali např. Buňka a kol., z jejichž výzkumů vyplynulo, že přidavkem monoacylglycerolů do matrice taveného sýra lze ovlivnit jeho reologické vlastnosti [63].

Výsledky experimentální části bakalářské práce ukázaly, že antimikrobiální účinky monolaurinu vůči *Bacillus cereus* byly velmi slabé. Do 27. dne skladování nebyl pozorován významný rozdíl v počtu mikroorganismů mezi kontrolními vzorky a vzorky obsahujícími tento MAG. V době mezi 27. a 56. dnem došlo ke snížení hodnoty CFU/g přibližně o jeden řád. Další dny již docházelo ve vzorcích s MAG spíše ke stimulaci růstu bakterií nad hodnotu zjištěnou u kontrolního vzorku.

U vzorků zaočkovaných *Bacillus subtilis* byla zaznamenána vyšší citlivost k působení monolaurinu než u *B. cereus*. Přesto však nelze hovořit o výrazném inhibičním účinku. Ani nejvyšší testovaná koncentrace 0,15 % w/w nedokázala růst mikroorganismů v tavených sýrech zastavit, přesto však byl počet bakterií ve srovnání s kontrolním vzorkem o jeden řád nižší, a to od 13. dne až do konce skladovací doby.

Zdá se tedy, že monolaurin má značné inhibiční účinky na *Bacillus* sp. v podmínkách *in vitro* [54, 64], v tavených sýrech je ale jeho aktivita potlačena patrně některou ze složek potraviny.

Ve vzorcích kontaminovaných kmenem *Clostridium butyricum* působil MAG C<sub>12:0</sub> inhibičně ve všech koncentracích až do 113. dne skladování. U koncentrace 0,01 % w/w bylo prokázáno snížení počtu mikroorganismů až o jeden řád do 78. dne skladování ve srovnání s kontrolním vzorkem. Poté došlo k mírnému nárůstu a konečná hodnota byla téměř shodná jako u kontroly. Nejvyšší inhibiční vliv u vzorků s koncentrací 0,05 % w/w byl zjištěn 56. den a odpovídal snížení více než o dva řády oproti kontrole. Nejvyšší koncentrace monolaurinu působila inhibičně téměř po celou dobu skladování, pouze konečný rozbor prokázal minimální zvýšení nad kontrolu. Nejvyšší inhibice byla po 78. dnech skladování, a činila snížení o dva a půl řádu. *Clostridium butyricum* bylo ze studovaných sporulujících bakterií nejcitlivější vůči přítomnosti monolaurinu a lze hovořit o částečné inhibici růstu, která trvala přibližně čtyři měsíce skladování.

Experiment ve vzorcích s kontaminací *Clostridium sporogenes* prokázal ve všech koncentracích skoro totožný průběh jako v kontrolním vzorku až do 27. dne. První dvě koncentrace působily inhibičně v následujících 28 dnech, kdy byl počet mikroorganismů snížen až o jeden a půl řádu. Následně docházelo u těchto dvou koncentrací spíše ke stimulaci růstu, čili hodnoty se nacházely nad hranicí kontroly. Inhibice růstu byla tedy u těchto koncentrací MAG pouze dočasná. Ani u nejvyšší koncentrace 0,15 % w/w nebyla prokázána výraznější inhibice růstu *Clostridium sporogenes* ve vzorcích tavených sýrů.

Obecně lze říci, že monolaurin v koncentraci do 0,15 % w/w ovlivňuje růst sporulujících bakterií v tavených sýrech a nejvyšší testovaná koncentrace dokáže zpomalit množení těchto mikroorganismů. Účinnost monoacylglycerolu kyseliny laurové však není dostatečná a bylo by třeba ji podpořit přidavkem jiné antimikrobně působící látky.

## ZÁVĚR

Experimentální část zahrnovala sledování růstu sporotvorných grampozitivních mikroorganismů *Bacillus cereus* CCM 2010, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062, *Clostridium sporogenes* CAPM 6329, *Clostridium butyricum* CAPM 6342 v prostředí tavených sýrů. Těmito kmeny byly zaočkovány vzorky tavených sýrů, do kterých byl přidán monoacylglycerol kyseliny laurové a byly studovány případné inhibiční účinky této látky na růst sporulujících bakterií. Výsledky experimentů lze shrnout následovně:

- inhibiční účinky monolaurinu na růst sporulujících bakterií v tavených sýrech rostou se zvyšující se koncentrací této látky,
- přídavek monolaurinu v koncentraci 0,01 a 0,05 % w/w vykazoval velmi slabé antimikrobiální účinky,
- koncentrace 0,15 % w/w měla nejsilnější antimikrobiální vliv na studované sporulující bakterie, přesto však přídavek MAG kyseliny laurové do tavených sýrů nevedl ke kompletní inhibici růstu a bylo zaznamenáno pouze snížení počtu buněk,
- *Bacillus subtilis* a *Clostridium butyricum* byly k MAG kyseliny laurové značně odolné,
- nejcitlivějším mikroorganizmem bylo *Clostridium butyricum*, kdy v 78. dni skladování byl celkový počet bakterií o dva a půl řádu nižší než u kontrolního vzorku bez MAG C<sub>12:0</sub>.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] 77/2003 Sb. *Vyhláška, kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje*. Česká republika : Ministerstvo zemědělství, 2004. 24 s.
- [2] EARLY, R, et al. *The technology of dairy products*. 2. vyd. London : Blackie Academic & Professional, 1998. 522 s. ISBN 0-7514-0166-8.
- [3] BUŇKA, F; BUŇKOVÁ, L. Úloha tavicích solí při výrobě tavených sýrů. *Potravinářská revue*. 2009, 6, 1, s. 13-16.
- [4] BUŇKA, F; BUŇKOVÁ, L; KRÁČMAR, S. *Základní principy výroby tavených sýrů* Brno : MZLU,2009. 69 s.
- [5] POKORNÝ, J; DUBSKÁ, L. *Technologie tuků*. Praha : SNTL , 1986. 452 s.
- [6] FOX, P. F., et al. *Fundamentals of cheese science*. 1st ed. Gaithersburg : Aspen Publishers, 2000. 587 s. ISBN 0-8342-1260-9.
- [7] FOX, P. F., et al. *Fundamentals of cheese science*. 1st ed. Gaithersburg : Aspen Publishers, 2000. 587 s. ISBN 0-8342-1260-9.
- [8] 4/2008 Sb. *Vyhláška, kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních činidel při výrobě potravin, v platném znění*. Česká republika : Ministerstvo zemědělství, 2008. 344 s.
- [9] GAJDŮŠEK, S. *Mlékařství II*. 1. vyd. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita , 1998. 135 s. ISBN 80-7157-342-6.
- [10] MIZUNO, R; LUCEY, J. A. Effects of emulsifying salts on turbidity and calcium-phosphate-protein interactions in casein micelles. *Journal of Dairy Science*. 2005, 88, s. 3070–3078.
- [11] MIZUNO, R; LUCEY, J. A. Properties of milk protein gels formed by phosphates. *Journal of Dairy Science*. 2007, 90, s. 4524–4531.
- [12] BUŇKA, F; HRABĚ, J. Tavené sýry. *Potravinářská revue*. 2006, 4, s. 13-16.
- [13] HUI, H. *Handbook of Food Science, Technology and Engineering* . USA : Taylor & Francis Group, 2006. 151 s. ISBN 978-0-8493-9849-0.

- [14] GUINEE, T. P., CARIĆ, M., KALÁB, M. Pasteurized Processed Cheese and Substitute/Imitation Cheese Products. In Fox, P.H. (Ed.) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. vol. 2, Major Cheese Groups*. 3rd ed. London and New York: Elsevier Applied Science, 2004. s. 349 – 394. ISBN 0-1226-3653-8.
- [15] LUKÁŠOVÁ, J. *Hygiena a technologie mléčných výrobků*. 1. vyd. Brno : Veterinární a farmaceutická univerzita, 2011. 180 s. ISBN 80-7305-415-9.
- [16] HRABĚ, J; VALÁŠEK, P; BŘEZINA, P. *Technologie výroby potravin živočišného původu : Mléčné výrobky*. Zlín : UTB , 2006. 173 s.
- [17] *Potravinářská mikrobiologie II - Vnější faktory a jejich vliv na jakost potravin*. Distanční text, 2007.
- [18] GÖRNER, F.; VALÍK, L. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. Bratislava : Malé centrum, 2004. 528 s.
- [19] JAY, J, et al. *Modern Food Microbiology*. 5th ed. Aspen : Gaithersburg, 2005. 55 s.
- [20] *Principy konzervace potravin* [online]. Praha : 2009 [cit. 2011-05-24]. Faktory ovlivňující růst organismů. Dostupné z WWW:  
<[http://vscht.cz/ktk/www\\_324/studium/konzervace/konzervace.html](http://vscht.cz/ktk/www_324/studium/konzervace/konzervace.html)>.
- [21] GLASS, K.; DOYLE, M. E. . Safety of processed cheese. *Food Research Institute*. 2005, 19, 4, s.
- [22] ANNIBALLI, F, et al. Influence of pH and Temperature on the Growth of and Toxin Production by Neurotoxigenic Strains of Clostridium butyricum Type E. *Journal of Food Protection*. 2002, 65, s. 1267-1270.
- [23] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. vyd. Brno : Neptun, 2005. 351 s.
- [24] ADAMS, M. R.; MOOS, M. O. *Food Microbiology*. 3rd ed. UK : Cambridge, 2008. - s.
- [25] BRIOZZO, J, et al. Clostridium botulinum Type A growth and toxin production in media and processed cheese spread. . *Applied and Environmental Microbiology*. 1983, 45, 3, s. 1150-1152.

- [26] GLASS, K.; JOHNSON, E. A. Factors that contribute to the botulinal safety of reduced-fat and fat-free process cheese products. *Journal of Food Protection*. 2004, 67, 8, s. 1687-1693.
- [27] GLASS, K.; JOHNSON, E. A. Antagonistic effect of fat on the antibotulinal activity of food preservatives and fatty acids. *Food Microbiology*. 2004, 21, s. 675-682.
- [28] MAIER, S. K.; SCHERER, S.; LOESSNER, M. J. . Long-chain polyphosphate causes cell lysis and inhibits *Bacillus subtilis* septum formation, which is dependent on divalent cations. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, 9, 65, s. 3942-3949.
- [29] Delves-Broughton, J. Nisin as a food preservative. *Food Australia*, 2005, 57, p. 525-527.
- [30] STEVENS, K. A., et al. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1991, 57, s. 6313-3615.
- [31] *Principy konzervace potravin* [online]. Praha : 2009 [cit. 2011-05-24]. Mikrobiologické změny. Dostupné z WWW:  
[http://www.vscht.cz/ktk/www\\_324/studium/konzervace/konzervace.html](http://www.vscht.cz/ktk/www_324/studium/konzervace/konzervace.html)
- [32] BLACKBURN, C. W. *Food spoilage microorganism*. Boca Raton : CRC, 2006. 712 s. ISBN 0-8493-9156-3.
- [33] KAPRÁLEK, F. *Fyziologie bakterií*. 1. vyd. Praha : Státní pedagogické nakladatelství, 1986. 602 s.
- [34] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. Brno : Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 80-902896-6-5.
- [35] ROSYPAL, S. *Obecná bakteriologie*. Praha : SPN, 1981. 750 s.
- [36] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno : Neptun, 2003. 495 s. ISBN 80-902896-65.
- [37] SAMUEL, B. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston : University of Texas Medical Branch, 1996. ISBN 0-9631172-1-1.

- [38] ADAMS, M. R.; MOOS, M. O. *Food microbiology*. Cambridge : Royal Society of Chemistry, 1995. 398 s.
- [39] MADIGAN, M; MARTINKO, J. *Brock Biology of Microorganisms* . 11th ed. USA : Prentice Hall, 2005. 992 s. ISBN 0-13-144329-1.
- [40] RYAN , K. J.; RAY, C. G. *Sherris Medical Microbiology* . 4th ed. USA : McGraw Hill, 2004. 992 s. ISBN 0-8385-8529-9.
- [41] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot* . 1. vyd. Brno : Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN 978-80-210-4207-0
- [42] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 1. vyd. Praha : Academia, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [43] BALOWS, A., et al. *The Prokaryotes : A handbook on the biology of bacteria: ecology, physiology, isolation, identification, application*. 2nd ed. New York : Springer Verlag, 1992. 4942 s.
- [44] CHRISTIE , W. W.; HAN, X. *Lipid Analysis : Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis*. 4th ed. Bridgewater : Oily Press, 2010. 446 s. ISBN 0-9552-5124-9.
- [45] VELÍŠEK, J, et al. *Chemie potravin*. 1. vyd. Tábor : OSSIS, 1999. 328 s. ISBN 8-0902-3913-7.
- [46] POKORNÝ J. a kol., 1986: *Technologie tuků*. 1. vyd. Praha: SNTL.
- [47] CHRISTIE , W. W.; HAN, X. *Lipid Analysis : Isolation, Separation, Identification and Lipidomic Analysis*. 4th ed. UK : Oily Press, 2010. 446 s.
- [48] HASENHUETTL, G. L.; HARTEL, R. W. *Food Emulsifiers and Their Applications*. New York : Springer, 2008. 433 s. ISBN 0-3877-5283-8.
- [49] SPRONG, R. C.; HULSTEIN, Marco F. E.; MEER, R. Van der. Bactericidal activities of milk lipids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001, 45, 4, s. 1298 - 1301.
- [50] MOULOINGUI, Z, et al. Pure  $\alpha$ - monoglycerides for industrial applications . *Agro Food Ind. Hi-Tech*. 1998, 4, s. 10-14.

- [51] BUŇKA, F; BUŇKOVÁ, L; KRÁČMAR, S. Vybrané hydrokoloidy a emulgátory ve výrobě tavených sýrů. *Acta fytotechnica et zootechnica* . 2009, mimořádné číslo, s. 69-78.
- [52] SUN, C. Q., et al. The antimicrobial properties of milkfat after partial hydrolysis by calf pregastric lipase. *Chemico-Biological Interactions*. 2002, 140, 2, s. 185 – 198.
- [53] ALTIERY, C. et al. Antifungal activity of fatty acids and their monoglycerides against *Fusarium* spp. in a laboratory medium. *International Journal of Food Science & Technology*. 2009, 2, 44, s. 359–366.
- [54] RŮŽIČKA, J, et al. Antimicrobial effect of 1- monoacylglycerols prepared by catalytic reaction of glycidol with fatty acids. *EUROPEAN FOOD RESEARCH AND TECHNOLOGY*. 2003, 217, s. 329 – 331.
- [55] CHAIBI, A., et al. Effect of monoglycerides on the thermal inactivation kinetics of *Bacillus cereus* . *Food Microbiology*. 1998, 15, s. 527-237.
- [56] BERÁNKOVÁ, J. Inhibiční působení 1-monoacylglycerolů. *Potravinářská revue* . 2010, 7, s. 82-85.
- [57] BERGSSON, G., et al. In vitro inactivation of *Chlamydia trachomatis* by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* . 1998, 42, s. 2290-2294.
- [58] DOLEŽALOVÁ, M, et al. Antimicrobial properties of 1-monoacylglycerols prepared from undecanoic acid . *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2010, 112, s. 1106–1114.
- [59] LUKÁŠOVÁ, J., et al. *Mikrobiologie potravin : Praktická cvičení*. 1. vyd. Brno : Ediční středisko VFU, 1997. 55 s.
- [60] COTTON, L. N., MARSHALL, D.L., Monolaurin preparation method affects activity against vegetative cells of *Bacillus cereus*, *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 1997, vol. 30, p. 830-833.
- [61] DOLEŽÁLKOVÁ, I., Účinky vybraných monoacylglycerolů na růst bakterií a mikroskopických vláknitých hub, Rigorózní práce, Brno, 2010



- [62] CHAIBI, A.; ABABOUCHE, L. H.; BUSTA, F. F. Inhibition of bacterial spores and vegetative cells by glycerides. *Journal of Food Protection*. 1996, 59, s. 716-722.
- [63] BUŇKA, F., et al. Effect of 1 – monoglycerides on viscoelastic properties of processed cheese. *International Journal of Food Properties*. 2007, 10, 4, s. 819 – 828. ISSN 1094–2912.
- [64] BUŇKOVÁ, L., et al. Comparison of antibacterial effect of seven 1-monoglycerides on food-borne pathogens or spoilage bacteria : Discussion. *ACTA VET*. 2011, 80, s. 37-39.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

CFU/g	kolonie tvořících jednotek na gram
DAG	diacylglycerol
DIDI	hydrogenfosforečnan disodný dihydrát.
KPS	dihydrogenfosforečnan sodný
MAG	monoacylglycerol
MAG C <sub>10:0</sub>	monoacylglycerol kyseliny kaprinové
MAG C <sub>11:0</sub>	monoacylglycerol kyseliny undekanové
MAG C <sub>11:1</sub>	monoacylglycerol kyseliny undecenové
MAG C <sub>12:0</sub>	monoacylglycerol kyseliny dodekanové (laurové)
MK	mastná kyselina
PCA	Plate – Count agar
PYRO	difosforečnan sodný
RCB	Reinforced Clostridial Broth
TAG	triacylglycerol

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1 - Izomery monoaclyglycerolu .....	24
Obr. 2 – Využití MAG v průmyslu .....	26
Obr. 3 - Vliv MAG C <sub>12:0</sub> na růst <i>B. cereus</i> .....	36
Obr. 4 - Vliv MAG C <sub>12:0</sub> na růst <i>B. subtilis</i> .....	38
Obr. 5 - Vliv MAG C <sub>12:0</sub> na růst <i>C. butyricum</i> .....	39
Obr. 6 - Vliv MAG C <sub>12:0</sub> na růst <i>C. sporogenes</i> .....	40

**SEZNAM TABULEK**

Tab. 1 – Koncentrace a množství MAG v modelových vzorcích tavených sýrů.....	34
Tab. 2 – Surovinová skladba modelových vzorků tavených sýrů.....	34