

Vliv složení binárních směsí fosforečnanových solí na růst mikroorganismů v tavených sýrech

Bc. Dora Jurčová

Diplomová práce
2011

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav biochemie a analýzy potravin
akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Dora JURČOVÁ**
Osobní číslo: **T09541**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Vliv složení binárních směsí fosforečnanových solí na růst mikroorganismů v tavených sýrech**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. V teoretické části zpracujte literární rešerši týkající se charakteristiky a složení tavených sýrů.
2. Dále se zabývejte antimikrobiálními vlivy fosforečnanových solí a vlivy působícími na jakost tavených sýrů a jejich mikrobiální kontaminaci.

II. Praktická část

1. V praktické části proveďte sledování dynamiky růstu vybraných bakterií v modelových vzorcích tavených sýrů v závislosti na typu přidaných látek.
2. Na základě teoretické části a výsledků praktické části zhodnoťte využitelnost aplikovaných látek pro zlepšení údržnosti tavených sýrů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] KARL F. EXNER, WENDY A. DURMAN nad ANNA A. RYZ-RODRRIGUEZ (1994). Contribution of composition, physicochemical characteristics and Polyphosphates to the microbial safety of pasteurized cheese spreads. Vol. 57., p. 295 ? 300.
- [2] BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L. & KRÁČMAR, S., 2009: Základní principy výroby tavených sýrů. Monografie, 69 s., Brno: MZLU.
- [3] MOLINS, R.A. (1999). CRC Press, Boca Raton. Phosphates in food, s. 261.
- [4] GREWOOD, D., SLAK, C., B., R., PEUTHERER J., F. a kol. (1999). Lékařská mikrobiologie ? Přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita laboratorní diagnostika a epidemiologie.
- [5] DAVIDSON, P. M., SOFOS, J. N. & BRANEN, A. L., 2005: Antimicrobials in Food. CRC Press, Boca Raton.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce:

25. února 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

20. května 2011

Ve Zlíně dne 21. března 2011



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 19.5.2011


.....

¹¹ 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 nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

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

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

¹² 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, uděje-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

¹³ 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). Dopírá-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 užit 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 výdětku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdětku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Fosforečnany jsou přídatné látky (aditiva), které se do potravin přidávají z technologických důvodů. Při výrobě tavených sýrů působí jako tavicí soli. V předložené diplomové práci byl sledován inhibiční efekt dvou kombinací fosforečnanových solí na vybrané druhy bakterií, způsobující kažení tavených sýrů. Pro danou práci byly použity binární směsi fosforečnanových solí, které se lišily typem a poměrem použitých tavicích solí. Antibakteriální působení fosforečnanových směsí bylo vyhodnoceno plotnovou metodou stanovením počtu živých bakterií. Zkoumáním bylo zjištěno, že bakterie jsou citlivější na fosforečnany, obsahující ve své molekule více fosforečnanových aniontů, tedy s rostoucím stupněm kondenzace rostl inhibiční účinek fosforečnanových tavicích solí. Zároveň bylo zjištěno, že v modelových vzorcích tavených sýrů mohou fosforečnany lépe potlačit růst grampozitivních bakterií než bakterií gramnegativních.

Klíčová slova: tavený sýr, fosforečnanové směsi, inhibiční účinek, chelatace, grampozitivní bakterie, gramnegativní bakterie.

ABSTRACT

Phosphates are food additives added to foods for technological reasons. In the present thesis the inhibitory effect of two combinations of phosphate salts was tested on selected bacterial species, causing spoilage of processed cheese. The binary mixtures of phosphate salts were used in this study. The salts used varied in type and the ratio of phosphates. Antibacterial activity of phosphate mixtures was evaluated by establishing the number of live bacteria. It was found that phosphates with lower number of phosphorus atoms were less effective than longer-chain phosphates. It was also found out that the model samples of processed cheese were better to decrease the growth of Gram-positive bacteria than Gram-negative bacteria.

Keywords: processed cheese, phosphate mixture, inhibitory effect, Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria.

Na tomto místě bych ráda poděkovala především své vedoucí diplomové práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za trpělivost, odbornou pomoc, cenné rady, inspiraci a diskuze při tvorbě a organizaci práce. Dále bych také ráda poděkovala všem, kteří mi umožnili diplomovou práci zrealizovat a zároveň také všem, kteří se na tvorbě práce podíleli. Rovněž děkuji svým rodičům za morální i finanční podporu při studiu. Děkuji také příteli za jeho velkou trpělivost a oporu.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA SÝRŮ	12
1.1 CHARAKTERISTIKA A SKLADBA TAVENÝCH SÝRŮ	13
1.1.1 Historie výroby tavených sýrů	13
1.1.2 Charakteristika tavených sýrů	15
1.1.3 Rozdělení tavených sýrů	15
1.1.4 Technologie výroby tavených sýrů	16
1.1.4.1 Sestavení a příprava výrobní směsi	16
1.1.4.2 Vlastní tavení	17
1.1.4.3 Balení a chlazení	18
2 FOSFOREČNANY	20
2.1 CHEMICKÁ STRUKTURA	20
2.2 VÝZNAM FOSFOREČNANŮ	21
2.3 TAVICÍ SOLI	21
2.3.1 Antibakteriální účinek tavicích solí	23
2.3.2 Kontaminující mikroflóra tavených sýrů	24
2.3.3 Působení fosforečnanových tavicích solí na grampozitivní a gramnegativní bakterie	25
3 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH DRUHŮ BAKTERIÍ	28
3.1 CHARAKTERISTIKA BAKTERIÍ TVOŘÍCÍCH SPORY	28
3.2 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA BAKTERIÍ TESTOVANÝCH V DIPLOMOVÉ PRÁCI	28
3.2.1 <i>Clostridium butyricum</i>	28
3.2.2 <i>Clostridium sporogenes</i>	29
3.2.3 <i>Bacillus cereus</i>	30
3.2.4 <i>Bacillus subtilis</i>	31
3.2.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	31
3.2.6 <i>Salmonella enterica</i>	32
II PRAKTICKÁ ČÁST	33
4 CÍLE PRÁCE	34
5 METODIKA	35
5.1 POUŽITÉ POMŮCKY A ZAŘÍZENÍ	35
5.2 VÝROBA TAVENÝCH SÝRŮ	35
5.3 MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR VZORKŮ	37
5.3.1 Testované kultury mikroorganismů	37
5.3.2 Příprava živných půd	37
5.3.3 Příprava bakteriálních suspenzí	38
5.3.4 Stanovení celkového počtu živých bakterií plotnovou metodou	39
5.3.5 Stanovení pH modelových vzorků taveného sýra	40
6 VÝSLEDKY A DISKUZE	41

6.1	VLIV SMĚSÍ FOSFOREČNANŮ NA RŮST <i>BACILLUS CEREUS</i> CCM 2010.....	42
6.2	VLIV SMĚSÍ FOSFOREČNANŮ NA RŮST <i>BACILLUS SUBTILIS</i> SUBSP. <i>SPIZIZENII</i> CCM 4062	45
6.3	VLIV SMĚSÍ FOSFOREČNANŮ NA RŮST <i>CLOSTRIDIUM SPOROGENES</i> CAPM 6329	47
6.4	VLIV SMĚSÍ FOSFOREČNANŮ NA RŮST <i>CLOSTRIDIUM BUTYRICUM</i> CAPM 6342	49
6.5	VLIV SMĚSÍ FOSFOREČNANŮ NA RŮST <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> SUBSP. <i>AUREUS</i> CCM 3953	51
6.6	VLIV SMĚSÍ FOSFOREČNANŮ NA RŮST <i>SALMONELLA ENTERICA</i> SUBSP. <i>ENTERICA</i> SER. <i>ENTERITIDIS</i> CCM 4420	54
	ZÁVĚR	58
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	59
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	67
	SEZNAM OBRÁZKŮ	68
	SEZNAM PŘÍLOH.....	69

ÚVOD

Tavené sýry se začaly vyrábět začátkem minulého století (poprvé v r. 1911), což umožňuje tyto výrobky označit jako nejmladší skupinu sýrů [1].

Vznik tavených sýrů je přičten obchodnímu zájmu Švýcarska, které na přelomu 19. a 20. století vyváželo své tvrdé sýry do zámoří. Sýry byly dopravovány lodí a kvůli nedostatečnému chlazení docházelo k výraznému zhoršení jakosti. Úkolem tedy bylo prodloužit jejich dobu použitelnosti. Tento úkol se v roce 1911 podařil splnit firmě Gerber tím, že přišla s výrobou tavených sýrů [2]. Základním krokem při výrobě tavených sýrů je správné sestavení vstupních surovin. Příslušné receptury jsou „výrobním tajemstvím“ a obvykle tvoří několik základních ingrediencí, kde největší podíl představují přírodní sýry (např. Eidam, Ementál, Čedar, Moravský blok, ...). Součástí receptury jsou i další suroviny, včetně tavicích solí. Na použitém druhu a množství příslušné tavicí soli závisí kvalita konečného výrobku. Tavicí sůl ovlivňuje zejména krémovitost, lesk a roztíratelnost hotového výrobku [3]. Podle chemického složení jsou tavicí soli kyselé nebo slabě alkalické soli organických nebo anorganických kyselin, které nejsou škodlivé pro lidský organismus [4]. Při výrobě tavených sýrů jsou používány především soli s vícetytnými anionty, jako jsou fosforečnany nebo citrany, které mají navázány monovalentní alkalický kov (nejčastěji sodík) [5].

Přidatné látky na bázi fosforečnanů jsou chemické látky, které hrají významnou roli při úpravě potravin. Obecně jsou často používány k úpravě textury potravin obsahujících bílkoviny nebo škrob. Jejich užitečnost je využívána zejména při stabilizaci různých mléčných a masných výrobků. Existuje více než 30 fosforečnanových solí používaných v potravinářských výrobcích, v nichž plní následující funkce: vyrovnání nebo stabilizace pH, acidifikace, alkalizace, chelatace nebo srážení kovů, tvorba komplexů s vysokomolekulárními organickými látkami (např. bílkovinami, pektinem, a škrobem), deflokulace, disperze, peptizace, emulgace, doplnění živin, antimikrobiální konzervace a kynutí [6].

V potravinách se můžeme setkat s fosforečnany s jednoduchou strukturou, zvané jako ortofosforečnany, další skupinou mohou být pyrofosforečnany (obsahující dvě fosforečnanové jednotky), trifosforečnany (obsahující tři fosforečnanové jednotky) nebo polyfosforečnany (obsahující více než tři jednotky fosforečnanu) [6].

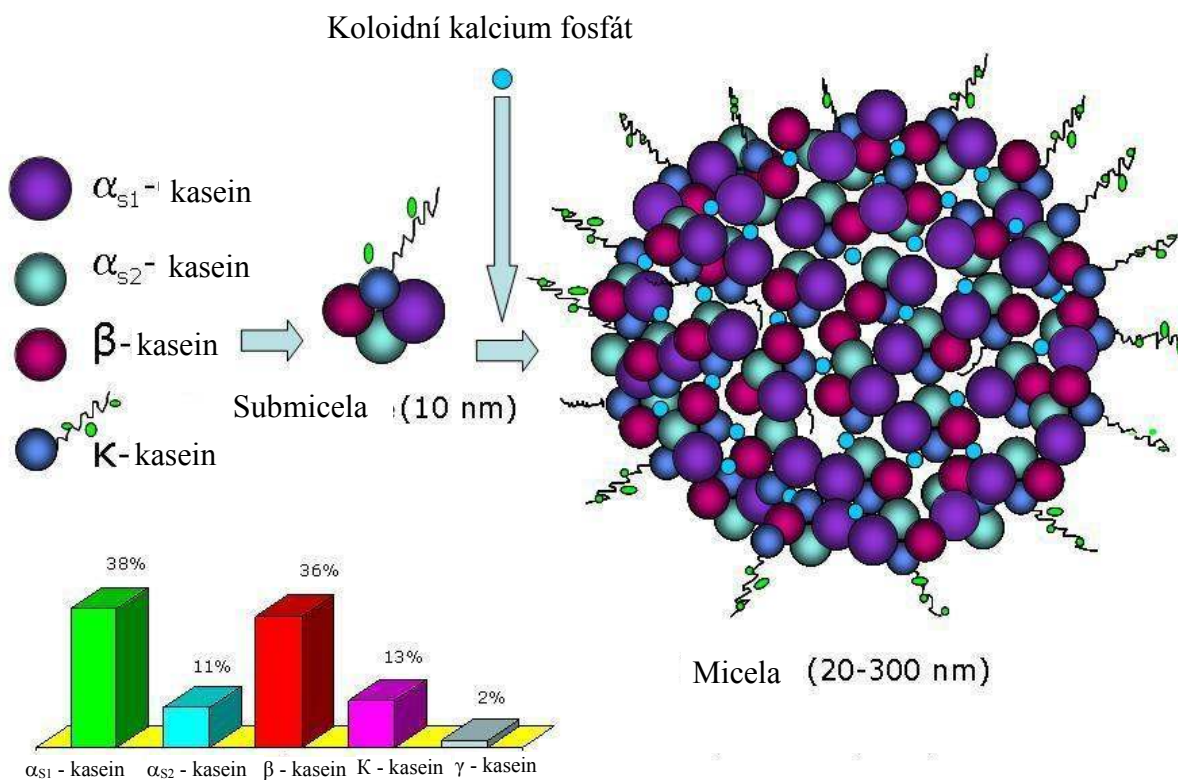
Polyfosforečnany způsobují chelataci kovových iontů, což lze považovat za důležitou roli v antimikrobiální aktivitě těchto látek [7].

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 OBECNÁ CHARAKTERISTIKA SÝRŮ

Sýr je obecný název pro skupinu fermentovaných mléčných potravinářských výrobků, vyráběných v široké škále příchutí a tvarů po celém světě. Přestože hlavním cílem výroby sýrů je zachování hlavních složek mléka, sýr byl vyvinut také proto, aby se stal významnou potravinou jak z hlediska nutriční kvality, tak i z hlediska výživy [8].

Sýr je produkt koagulace kaseinové bílkoviny mléka, jejíž následnou separací dochází k odstranění syrovátky od sýřeniny [9]. V mléce hospodářských zvířat tvoří kasein 80% podíl veškerých bílkovin (tj. průměrně kolem $2,6 \text{ g}$ z celkových $3,2 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ kravského mléka). Kasein vytváří v mléce mikroskopické částice, které jsou označovány jako micely. Kaseinové micely se skládají z podjednotek (submicel) různých kaseinů (α -s₁, α -s₂ a β). Tyto podjednotky drží pohromadě pomocí různých mechanismů, jako jsou fosforečnanovápenaté můstky nebo hydrofóbní interakce [10]. Na povrchu kaseinové micely se nachází κ -kasein, který je zodpovědný za stabilitu micely. Chrání ostatní frakce před srážením vápenatými ionty a při jeho porušení dochází k hydrolyze vedoucí k destabilizaci kaseinu [11].



Obrázek 1. Kaseinová micela [12]

Technologie výroby řady mléčných výrobků je založena právě na srážení této mléčné bílkoviny. Rozlišují se dva typy srážení. První z nich se označuje jako kyselé srážení, kdy pomocí kyselin dochází ke koagulaci kaseinu [13]. V druhém případě může být ke srážení využito syřidlo, nejčastěji enzym (chymozin z telecích žaludků), takové srážení se pak označuje jako sladké. Při výrobě většiny sýrů se využívá zejména sladké srážení [13].

Při obou typech srážení dochází na rozdílném principu k porušení stability kaseinových micel, a tím k jejich koagulaci. Z ekonomických a technologických důvodů se při výrobě tavených sýrů také někdy kasein používá jako náhrada části mléka [13].

Sýr je nejvíce různorodá skupina mléčných výrobků. Jsou-li mléčné výrobky řádně vyrobeny a skladovány, jsou biologicky, biochemicky, chemicky a fyzikálně stabilní, zatímco sýry jsou z hlediska biologického a biochemického výrobky dynamické. Celá výroba a zrání sýrů představuje pečlivě organizovanou sérii po sobě jdoucích operací a současně biochemických událostí, které pokud jsou synchronizované a vyvážené, vedou k produktům s vysoce žádoucí vůní a chutí, ale pokud jsou nevyvážené, výsledkem jsou výrobky bez vůně a aroma [8].

1.1 Charakteristika a skladba tavených sýrů

1.1.1 Historie výroby tavených sýrů

Tavené sýry tvoří nejmladší skupinu sýrů. Z hlediska jejich výroby byl významný počátek minulého století [1]. V roce 1911 švýcarská firma Gerber byla první na světě, které se podařilo vyrobit skutečný tavený sýr. Jako tavicí sůl byl použit citran sodný připravený za varu jako vodný roztok kyseliny citrónové a uhličitanu sodného [14]. V letošním roce je tomu tedy sto let, kdy byl vyroben první tavený sýr [2].

V roce 1917 začala s výrobou tavených sýrů firma Kraft v USA. Tato firma pochopila nezbytnost výměny vápenatých iontů v sýrové surovině za sodíkové ionty tavicích solí. Poprvé byl společně s citrany použit fosforečnan disodný, neboť bylo zjištěno, že výměnná iontová schopnost fosforečnanů předčí citrany [14].

O něco později se začaly tavené sýry vyrábět také ve Francii (1919) a v Německu (1923) [15]. Pro budoucí výrobu tavených sýrů byl významný rok 1929, kdy Benckieser z Ludwigshafenu nad Rýnem přihlásil v Německu patent zabývající se použitím polyfosforečnanů při výrobě tavených sýrů. Firma BK Giulini je nejvýznamnějším dodavatelem tavicích solí JOHA používaných na celém světě [14].



Obrázek 2. První tavený sýr [2]

Výroba tavených sýrů umožnila v první řadě prodloužit omezenou trvanlivost dozrálé sýrové suroviny, přinesla na trh bezpočet různých druhů výrobků a postupně se stala významným potravinářským oborem [14].

V Československu byl první tavený sýr vyroben firmou Bloch v Bosňanech pod značkou Simplon [2].



Obrázek 3. První tavený sýr vyrobený v ČR [2]

1.1.2 Charakteristika tavených sýrů

Tavené sýry jsou směsí různých přírodních sýrů, které jsou zahřívány za stálého míchání s vodou, chloridem sodným a tavicími solemi tak, aby došlo k roztavení složek a vytvořila se plastická, homogenní směs, která si zachová tyto vlastnosti i po ochlazení [16]. Po chemické stránce se proces skládá z peptonizace a částečného rozpouštění kaseinu, výsledkem čehož je změna kaseinátu vápenatého na kaseinát sodný. Schopnost solí rozpustit kasein závisí do značné míry na iontové výměně vápníku a chelatačních vlastnostech. Polyfosforečnany se středními a dlouhými řetězci patří mezi preferované činitele ve výrobě tavených sýrů [16]. Polyfosforečnany jsou látky vznikající kondenzací ortofosforečnanů. Jde o lineární produkty. Nejkratší řetězec je označován jako difosforečnan (dříve pyrofosforečnan), nejdelší hexametafosforečnan (grahamova sůl) [14]. Polyfosforečnany mají oproti ortofosforečnanům výhodu v tom, že významně ovlivňují konzistenci taveniny a finálního výrobku tak, že je možno vyrábět tavené sýry o roztíratelné konzistenci, čímž se zvýšila tržní poptávka po těchto produktech [14].

Tavené sýry jsou vyráběny tak, aby obsah sušiny byl minimálně 33 % (w/w) a obsah tuku minimálně 14 % (w/w). Základní chuťová varianta je čistě sýrová po použitých přírodních sýrech. Pasterizovaný tavený sýr musí obsahovat minimálně 51 % (w/w) sýra [17].

U ostatních chuťových variant je chuť, barva a konzistence ovlivněna charakterem použitých přísad. Trvanlivost výrobků je dána použitou teplotou při tavení. Tavené sýry jsou určeny k přímé konzumaci nebo se mohou používat na přípravu různých pomazánek a rychlého občerstvení [18].

Dobrý tavený sýr by měl mít hladkou, homogenní strukturu, jednotnou barvu a měl by být bez dutin, které se vytvářejí v důsledku tvorby plynu při kvašení [19].

K největším výrobcům tavených sýrů na českém trhu patří společnosti Bel Sýry Česko (Želetava), výrobky této společnosti tvoří asi 50% podíl na trhu (informace z roku 2008), dále TPK Hodonín a jihočeská Madeta [20].

1.1.3 Rozdělení tavených sýrů

Tavený sýr je definován podle vyhlášky č. 77/2003 Sb., v platném znění, kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje jako sýr, který byl tepelně upraven za přídavku tavicích solí [21].

Tato vyhláška (č. 77/2003 Sb.) také definuje rozdělení tavených sýrů podle obsahu tuku v sušině (TVS):

- na nízkotučný s obsahem tuku v sušině nejvýše 30 % hmotnostních,
- na vysokotučný s obsahem tuku v sušině nejméně 60 % hmotnostních [21].

Kodexové normy stanovují limit obsahu laktózy pro rozlišení tavených sýrů a tavených sýrových výrobků. Výrobky s obsahem laktózy do 5,0 % (w/w) jsou označovány jako tavené sýry. Výrobky s vyšším obsahem laktózy jsou označovány dle vyhlášky č. 77/2003 Sb. jako tavené sýrové výrobky [22].

1.1.4 Technologie výroby tavených sýrů

V současnosti je možné tavené sýry vyrábět kontinuálním či diskontinuálním procesem [23]. Diskontinuální postup zahrnuje následující kroky [24]:

- výběr složek a jejich přípravu (očištění, omytí, oškrábaní) na základě stanovené receptury,
- rozemletí,
- přidavek tavicích solí,
- tavení,
- formování a balení taveniny,
- chlazení a skladování výrobků.

1.1.4.1 Sestavení a příprava výrobní směsi

Nejobtížnějším úkolem při výrobě tavených sýrů je sestavení směsi (receptury) pro tavení. Správně sestavená směs je podmínkou pro dosažení dokonalé jakosti, jak z hlediska chemického, tak i z hlediska fyzikálního [25]. Jakostně dobrý tavený sýr se získá jen z chuťově a konzistenčně kvalitního přírodního sýra. Použitím tavicích solí lze zlepšit některé vlastnosti, ale nikdy nelze odstranit závažné vady suroviny [4].

Směs by měla být sestavena tak, aby finální tavený sýr měl [4]:

- předepsaný obsah sušiny a tuku v sušině,
- optimální pH a konzistenci,
- požadovanou chuť a vůni.

Tavicí sůl se musí volit především podle stupně zralosti suroviny [4]. Obsah tavicích solí obvykle tvoří 2 – 3 % hmotnosti surovinové skladby [23].

Součástí surovinové skladby je také máslo, které přispívá ke zvýšení obsahu tuku. V některých provozech je za tímto účelem používána smetana, která výrobek vhodně a příjemně zjemní. Nezbytnou surovinou je také voda, která zejména upravuje obsah sušiny a samozřejmě tavicí soli, jejichž důsledkem je získání homogenní hmoty [24]. Složky jsou smíchány v příslušném poměru takovým způsobem, aby bylo dosaženo požadovaného finálního produktu [24].

Očištěný sýr je rozkrájen pomocí hydraulicky ovládaného nože. Rozkrájený sýr může být dále zjemněn na menší částice pomocí nerezových ocelových válců otáčejících se proti sobě. Rozmělněním je umožněn adekvátní příjem vlhkosti, dochází také ke zvýšení specifického povrchu sýra, čímž je pak dosažena požadovaná homogenita směsi. Jemně mletý sýr je dopraven přímo do tavicího kotle, kde je smíchán s tavicími solemi, vodou a dalšími přísadami [26].

1.1.4.2 Vlastní tavení

Tavení sýrů probíhá za podtlaku (0,04 – 0,05 MPa) v tavičkách, které mají parou vyhřívaný plášť i přímý vstřík páry. Součástí tavičky je také nůž, pomocí něhož dochází k intenzivnímu míchání taveniny [19]. Teplota tavení se pohybuje v rozmezí 80 – 95 °C a celková doba tavení je 4 – 15 minut. Pro sýry s roztíratelnou konzistencí je zapotřebí použít vyšších teplot a delší dobu tavení s intenzivnějším mícháním a vyžadují také vyšší přísadek tzv. nátavku, což je sýr z předchozího tavení [24].

Používané soli mají obvykle monovalentní kation (tj., sodík) a polyvalentní anion (např. fosforečnan). Zatímco soli nejsou samy o sobě emulgátory, s pomocí tepla podporují řadu fyzikálně-chemických změn v sýrové směsi, v jejichž důsledku dochází k rehydrataci nerozpustného para-kaseinu a jeho přeměně na aktivní emulgátor [26]. Úkolem tavicích solí v průběhu tavení je zajištění výměny Ca^{2+} iontů v tavenině za Na^+ (případně K^+) ionty solí [14]. Klíčovou vlastností solí při výrobě tavených sýrů je tedy odštěpení iontů vápníku z proteinové matrice přírodního sýra a jeho nahrazení monovalentními alkalickými kovy. Bez této vlastnosti by tradiční výroba tavených sýrů byla prakticky nemožná [5].

Pokud je pro výrobu použit kontinuální způsob, tavení směsi v tenké vrstvě probíhá v nerezových trubkách při teplotě 130 – 145 °C po dobu několika sekund. Díky vysoké teplotě

dochází u kontinuálního procesu k zajištění sterilačního efektu. U diskontinuálního procesu je dosažen pouze efekt pasterační [23].

1.1.4.3 Balení a chlazení

Horká tavenina je dopravena (případně přečerpána) do balících strojů, pomocí kterých je sýr ihned po výrobě balen, aby se zabránilo sekundární kontaminaci ze vzduchu [25]. Jednotlivé sýry se balí do hliníkové folie a vkládají do papírové krabičky [27].

Typy používaných obalů [27]:

- spotřebitelské balení (obrázek 4) – 140 g, 150 g, 180 g, 200 g a 1,4 kg (sýrové dorty),
- plastové kelímky uzavřené hliníkovým a převlečeným plastovým víčkem o hmotnosti 125 g, (obrázek 5)
- plastové kbelíky o hmotnosti 1 a 5 kg,
- plastová střívka uzavřená kovovými sponami o hmotnosti 200 g (obrázek 6).



Obrázek 4. Ukázka obalu tavených sýrů s nejdelší dobou minimální trvanlivosti [28]



Obrázek 5. Tavené sýry v obalu s dobou použitelnosti 45 dnů [29]



Obrázek 6. Ukázka tavených sýrů s nejkratší dobou minimální trvanlivosti [30]

Pro získání roztíratelné konzistence je také nutno sýry po zabalení co nejrychleji vychladit [24].

Tavené sýry se uchovávají v chladu při teplotách od 4 °C do 8 °C. Skladovací prostory musí být suché, dobře větratelné [27].

V roce 2009 byla podle Českého statistického úřadu spotřeba tavených sýrů na jednoho obyvatele v ČR 2,4 kg, což představuje cca 18 % z celkové spotřeby sýrů [31].

Potravinářskými odborníky je vysoká spotřeba tavených sýrů v Česku přisuzována zejména stravovacím zvyklostem a také je tato skutečnost podpořena tím, že tavené sýry patří k levnějším a snadno dostupným potravinám [20].

2 FOSFOREČNANY

2.1 Chemická struktura

Fosfor je po vápníku druhý nejvíce zastoupený stopový prvek v lidském těle. V těle průměrného člověka ho je asi 650 g. Nejvíce fosforu (asi 85 %) je koncentrováno v kostech a zubech, zbytek je rozdělen v krvi a dalších tkáních. Fosfor je díky svým schopnostem důležitý v mnoha případech, kdy např. působí jako ochrana pro buňky tím, že posiluje buněčný obal, jinde slouží jako doprovodná látka a napomáhá činnosti živin, hormonů a dalších chemických látek. Fosfor je také nezbytný pro vznik molekuly adenosintrifosfátu (ATP), která dodává energii všem tělesným buňkám [32].

Fosforečnany jsou přirozenou součástí téměř každé potravin, kterou konzumujeme. Díky svým schopnostem (pufrační schopnost, izolace kovových iontů, udržování vody, interakce s dlouhými řetězci proteinů), jsou široce používány jako potravinářské přídatné látky [33]. Fosforečnany jsou odvozeny od kyseliny trihydrogenfosforečné (H_3PO_4), vznikají neutralizací kyseliny alkalickými kovovými ionty, jako jsou sodík, draslík nebo vápník. Rozlišují se dvě skupiny fosforečnanů: jednoduché fosforečnany a kondenzované fosforečnany. Kondenzované fosforečnany mohou mít strukturu lineární, cyklickou nebo rozvětvenou [34].

Fosforečnanový iont (PO_4)³⁻ je charakterizován čtyřstěnnou strukturou, ve které je atom centrálního fosforu obklopen čtyřmi atomy kyslíku, které se vyskytují v rozích. Tato molekula má tři vyměnitelné vodíkové atomy, které umožňují vytvoření velkého množství kombinací vodíku a kovových kationtů. Tyto kombinace zahrnují ortofosforečnany s jedním zásaditým kovovým iontem a dvěma atomy vodíku či se dvěma zásaditými ionty a jedním vodíkem, nebo se můžeme setkat s ortofosforečnanem, který obsahuje tři ionty kovů [33].

Fosforečnany mohou tvořit struktury, které obsahují od jednoho do stovky či dokonce tisíce molekul fosfátu. Strukturálně nejjednodušším fosforečnanem je již zmiňovaný ortofosforečnan. Spojení dvou molekul ortofosforečnanu vzniká pyrofosforečnan. Další kondenzací můžeme získat trifosforečnan atd. [7]. Molekula fosforečnanu, která obsahuje tři a více fosforečnanových iontů, je označována jako polyfosforečnan [33].

V důsledku toho, že (PO_4)³⁻ skupina může sdílet až tři atomy kyslíku s třemi jinými (PO_4)³⁻ skupinami, může docházet ke vzniku lineárních i větvených struktur. Fosforečnan s rozvětveným řetězcem je nazýván ultrafosforečnanem. Pokud dojde k připojení polyfos-

forečnanových řetězců na sebe, dochází ke vzniku cyklických struktur, které jsou označovány jako metafosforečnany. Cyklické metafosforečnany nejsou běžně používány v potravinářském průmyslu, ačkoli trimetafosforečnan sodný je schválen pro modifikaci potravinářských škrobů. Polyfosforečnany, metafosforečnany a ultrafosforečnany vznikají z fosforečnanů jejich zahřátím a uvolněním vody. Z tohoto důvodu jsou nazývány jako skupina kondenzovaných fosforečnanů [33].

2.2 Význam fosforečnanů

Fosforečnan hraje důležitou roli nejen v lidském metabolickém systému, kde slouží k přenosu energie a přispívá k růstu kostí, ale tvoří také součást fosforečnanových sloučenin, které plní nespočet funkcí v potravinářském průmyslu. Tyto látky mohou pomoci zlepšit kvalitu zpracování mnoha potravin, včetně již zmiňovaných tavených sýrů, dále také masa, drůbeže a ryb [35].

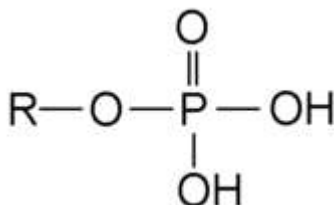
Některé z nich, a to zejména fosforečnany s dlouhým řetězcem (polyfosforečnany), mají určitý antimikrobiální účinek. Použití fosforečnanů v mléce a mléčných výrobcích patří mezi nejvýznamnější a nejstarší aplikace [35]. Kromě toho nacházejí také uplatnění jako kypřicí prostředky, regulátory kyselosti apod. Hlavní funkcí fosforečnanů přidávaných do potravin je jejich emulgační a disperzní schopnost. V masném průmyslu umožňuje použití fosforečnanů zlepšit vaznost vody a emulgační schopnosti masa. Další uplatnění mohou najít fosforečnany při výrobě dehydratovaných výrobků, jako jsou např. polévky, dále také při výrobě zmrzliny a mražených krémů, kolových nápojů, jemného trvanlivého pečiva a cukrářských výrobků, majonéz, moučkového cukru (fosforečnan vápenatý proti spékání) atd. [36].

2.3 Tavicí soli

Tavicí soli jsou označovány jako přídatné látky a ty jsou podle zákona č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích definovány jako látky, které se bez ohledu na jejich výživovou hodnotu zpravidla nepoužívají samostatně ani jako potravinu nebo jako charakteristická potravní přísada. Jsou do potravin přidávány při výrobě, balení, přepravě nebo skladování, čímž se samy stávají součástí konečného výrobku [37].

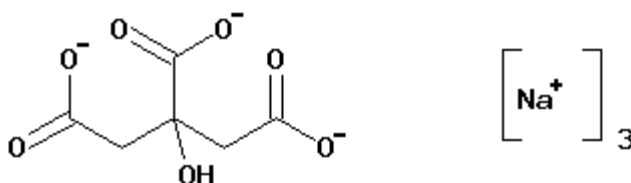
Ideální tavicí sůl pro výrobu tavených sýrů by měla obsahovat alkalický jednomocný kationt ve spojení s vícemocným aniontem. Tomuto požadavku nejlépe vyhovují již zmiňované sodné soli kyseliny fosforečné (obrázek 5) nebo citronové (obrázek 6) [4]. Pro výrobu

tavených sýrů se používají především sodné soli fosforečnanů, které mají schopnost vázat větší množství vápenatých iontů a jsou proto používány k výrobě tavených sýrů s roztíratelnou konzistencí [5] [38].



Obrázek 7. Struktura fosfátové skupiny [39]

Tavicí soli na bázi citranů jsou soli odvozené od trikarboxylové kyseliny citronové [23]. Citrany se vyznačují nízkou afinitou k vápenatým iontům, nezapojují se do tvorby síťové proteinové matrice, a proto jsou používány spíše k výrobě tvrdých lomivých tavených sýrů nebo jsou používány ve směsích s jinými tavicími solemi, jako jsou např. již zmiňované polyfosforečnany [23] [38]. Citran trisodný je nejčastější citranová sůl, se kterou se setkáváme při výrobě tavených sýrů. Používá se samostatně nebo v kombinaci s ostatními solemi [40].



Obrázek 8. Struktura citranu sodného [41]

Co se týče funkčních vlastností, bylo by možné z toho hlediska použít také draselné soli fosforečnanů, ale protože by mohly ve finálním výrobku způsobit hořkou příchuť, zpravidla se při výrobě tavených sýrů nepoužívají [5].

V minulosti byly při výrobě tavených sýrů prováděny různé pokusy utavení bez použití tavicích solí. Tyto pokusy však nevedly ke zdárným výsledkům. Bylo zjištěno, že bez použití látek s emulgačními vlastnostmi nelze tavený sýr vyrobit. Není totiž možné zahřívát přírodní sýr za účelem tepelného ošetření na teplotu 85 °C, aniž by nedošlo k jeho rozdělení na 3 fáze – vysráženou bílkovinu na dně, vodnou fázi ve střední vrstvě a oddělený volný tuk na povrchu [5].

Při výrobě tavených sýrů soli stabilizují mléčné disperze, zajišťují úpravu pH prostředí, čímž dochází především k ovlivnění přítomných proteinů [5].

Vazba kationtů je u fosforečnanů ovlivněna řadou faktorů. Mezi ovlivňující faktory patří např. teplota. S rostoucí teplotou schopnost vazby kationtů roste. Dále také vazbu kationtů ovlivňuje počet fosforečnanových jednotek v molekule. S rostoucím počtem atomů fosforu v molekule narůstá také jejich afinita ke kationtům. Během procesu tavení přispívají fosforečnany další vlastností, a to zvyšováním vaznosti vody přítomných proteinů. Tento jev se označuje jako tzv. krémování. Při krémování dochází k navazování polyvalentních aniontů na proteiny, čímž dochází ke zvyšování jejich hydrofilního charakteru a navázáním dodatečné vody roste viskozita taveniny – tavenina houstne [5].

V praxi je roztíratelné konzistence dosaženo při použití solí v rozsahu pH 6,0 – 6,3 [14].

Fosforečnanové soli lze přidávat do potravin pouze v omezeném množství a na základě jejich zdravotní nezávadnosti. Podmínky použití jsou stanoveny příslušnou vyhláškou [36]. Obsah používaných tavicích solí by měl představovat jen takové množství, aby bylo dosaženo požadovaného technologického účinku [6].

Vyhláška Ministerstva zdravotnictví (č. 4/2008 Sb.) uvádí, že nejvyšší množství fosforečnanů, které je povoleno přidávat do tavených sýrů a jejich analogů je $20\,000\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (vyjádřeno jako P_2O_5) [42]. Jejich nezávadnost je přesto předmětem mnoha diskuzí a dochází k opakovanému prověřování. Zvýšený příjem může vést např. k hyperaktivitě dětí nebo také k poruchám zažívání. Příjem fosforečnanů lze regulovat omezenou konzumací potravin, v nichž fosforečnany představují funkční složku [43].

V praxi je velmi důležité znát vlastnosti jednotlivých tavicích solí a jejich účinků, aby byl proveden jejich optimální výběr pro daný výrobek. Smyslem použití směsí tavicích solí ve vztahu k jednotlivým komponentám je posílení pozitivních a potlačení negativních vlastností [14]. Fosforečnany musí být, stejně jako ostatní přídatné látky vyskytující se v potravinách, označeny v údajích o složení potraviny uvedením názvu látky nebo jejího číselného kódu E (E 338: kyselina fosforečná, E 339 – 343: fosforečnany, E 450 – 452: polyfosforečnany) [36].

2.3.1 Antibakteriální účinek tavicích solí

V poslední době získaly fosforečnany uznání jako účinné antimikrobiální látky vhodné pro použití v potravinářských výrobcích [14]. Ve skutečnosti je antibakteriální účinek fosfo-

rečnanů chápán jako pozitivní vedlejší efekt jejich aplikace do potravin [44]. Antimikrobiální aktivita fosforečnanů je závislá na délce jejich řetězce. Na základě výsledků mnohých analýz lze říci, že řetězec s větším počtem fosforečnanových jednotek má vyšší inhibiční účinek než fosforečnany s kratšími řetězci [45].

Výsledky studií ukazují, že antibakteriální účinek polyfosforečnanů s dlouhým řetězcem může být přičten poškození buněčného obalu (buněčné stěny nebo buněčné membrány) [45]. K porušení integrity buněčné stěny dochází prostřednictvím chelatace divalentních kovů (především vápenatých a hořečnatých), v důsledku čehož také dochází ke ztrátě osmoregulace a porušení selektivní permeability membrány, čímž dochází ke snížení metabolických funkcí. Fosforečnanové soli mohou mít baktericidní a bakteriolytické účinky [33].

2.3.2 Kontaminující mikroflóra tavených sýrů

Základním postupem pro zamezení růstu škodlivé mikroflóry, která se do sýrů dostává z mléka nebo okolního prostředí, je zdokonalení regulace procesu mléčného kvašení. Toho lze dosáhnout tím, že se odstraní příčiny, které zpomalují rychlost množení mléčných bakterií při výrobě sýrů. Dále může být také regulace zdokonalena použitím zákysů složených z kmenů bakterií mléčného kvašení, které působí antagonisticky vůči mikroflóře, která je pro sýry škodlivá [46].

Změny tavených sýrů vyvolané kontaminujícími mikroorganismy jsou závislé na mnoha faktorech. Mezi tyto faktory patří především kvalita použitých surovin, druh sýra, který je na výrobu tavených sýrů použit, dále obsah sušiny, chloridu sodného, koncentrace použitých tavicích solí, pH, tepelné zpracování a v neposlední řadě dodržení hygienických podmínek při zpracování a také způsob skladování. Teplotní záhřev při výrobě tavených sýrů se pohybuje kolem teploty 80 °C, což je teplota, při které jsou usmrcovány vegetativní formy mikroorganismů, avšak nedojde k usmrcení bakteriálních spór, které zůstávají v životaschopném stavu a v závislosti na pH výrobku může být jejich germinace stimulována právě teplotním záhřevem. Růst mikroorganismů je také ovlivňována formou vazby vody v tavených sýrech. Pokud je dobře provedena emulgace a hydratace jsou vytvořeny nepříznivé podmínky pro růst mikroorganismů [23] [47].

Mezi nejčastější kontaminanty tavených sýrů patří bakterie rodu *Clostridium* [23]. Pokud jsou faktory, jako je pH, obsah soli a teplota, příznivé, dochází činností především mléč-

ných bakterií ke snížení redoxpotenciálu a tím je vytvářeno příznivé prostředí pro rozvoj anaerobních sporotvorných mikroorganismů [25].

Další potenciální kontaminující mikroflórou tavených sýrů ze skupiny grampozitivních bakterií jsou zástupci rodů *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Listeria* aj. [48].

2.3.3 Působení fosforečnanových tavicích solí na grampozitivní a gramnegativní bakterie

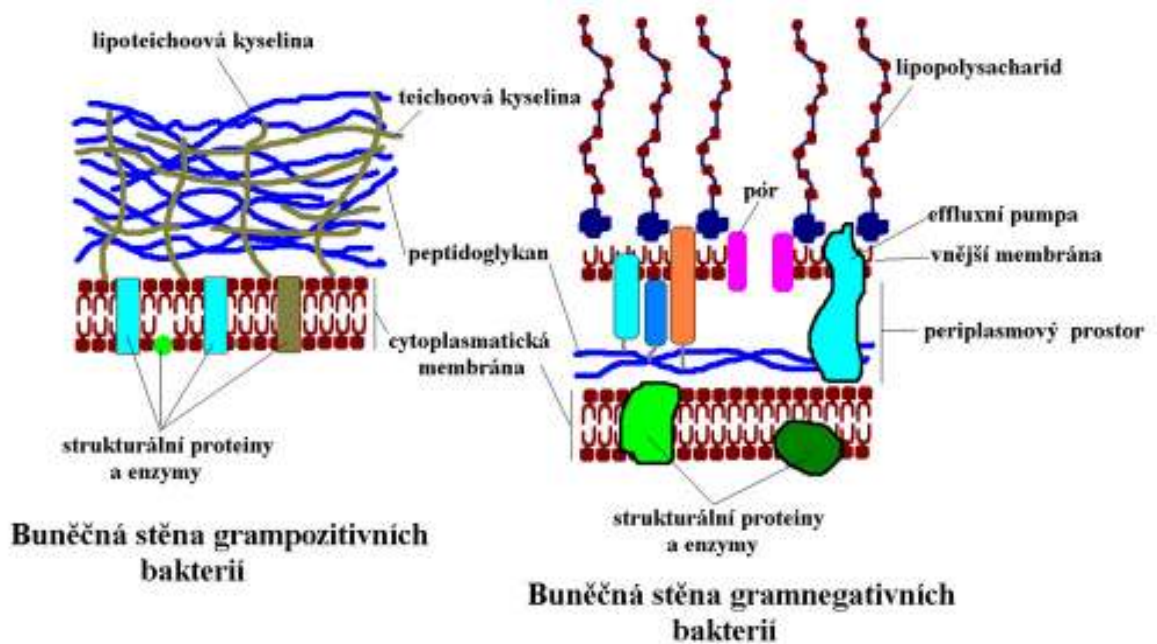
Inhibice bakteriálního růstu polyfosforečnany byla předmětem několika zkoumání, a obecně platí, že grampozitivní bakterie se zdají být citlivější na účinky fosforečnanů než gramnegativní bakterie [49].

Buněčná stěna obou typů bakterií obsahuje polymer peptidoglykan. Tento polymer je tvořen dlouhými řetězci aminocukrů propojenými tetrapeptidovými řetízky. Vytvořená síť chrání buňku před poškozením a následnou lyzí [44].

Buněčná stěna grampozitivních bakterií obsahuje více vrstev peptidoglykanu ve srovnání se buněčnou stěnou gramnegativních bakterií (obrázek 7), ale na rozdíl od gramnegativních bakterií postrádají vnější membránu, chránící bakterii v přítomnosti nepříznivých vnějších vlivů, které mohou buňku poškodit [50].

Grampozitivní bakterie mají navíc v buněčné stěně obsaženy lineární řetězce teichoových kyselin, které zpevňují peptidoglykanovou vrstvu a poskytují místo, do kterého je soustředěno působení polyfosforečnanové soli. U gramnegativních bakterií tyto lineární řetězce teichoových kyselin chybí [44] [51].

Mezi molekulami teichoových kyselin se vytvářejí pomocí divalentních kovových iontů příčné můstky a při jejich nedostatku může dojít k narušení integrity buněčné stěny [45] [49]. Předpokládá se tedy, že vápenaté ionty stabilizují strukturu buněčné stěny mikroorganismů a jejich chelatace může tuto strukturu destabilizovat a tím ovlivnit životaschopnost mikroorganismů. Teichoová kyselina tvoří hustou síť negativních nábojů na povrchu buněk grampozitivních mikroorganismů. Díky zápornému náboji na sebe váže mono- a divalentní kovové kationty, čímž se zmírní elektrostatická odpuzivá interakce mezi sousedními fosforečnany [52].

Obrázek 9. Buněčná stěna G^+ a G^- bakterií [53]

Knabel et. al. [54] se snažili vysvětlit rozdíl inhibičního působení polyfosforečnanů na růst grampozitivních a gramnegativních bakterií. Ze studie vyplývá, že rozdíl v inhibici je dán pravděpodobně různou strukturou buněčných stěn. Vzhledem k tomu, že buňka gramnegativních bakterií neobsahuje ve své stěně polymery teichoových kyselin, které jsou zodpovědné za zachování vysoké koncentrace kovových iontů a má více účinné systémy pro vazbu a transport těchto iontů přes buněčnou membránu, nemohou být polyfosforečnany tak úspěšné v chelataci iontů jako u grampozitivních bakterií. V důsledku toho se snižuje efektivnost polyfosforečnanů při potlačení růstu gramnegativních bakterií. Polyfosforečnany jsou schopny odstranit kovové ionty z buněčné membrány z důvodu jejich vyšší afinity ke kationtům kovů, čímž inhibují růst [54].

Kromě účinku na bakteriální buněčnou stěnu, vykazují také polyfosforečnany u grampozitivních bakterií tvořících spóry inhibiční účinek na jejich klíčení [5].

Na vybrané grampozitivní a gramnegativní bakterie (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* a *Bacillus subtilis*) byly zkoumány účinky tavicí soli, obsahující polyfosforečnany s různým kondenzačním stupněm. Inhibiční účinek soli byl testován v koncentračním rozmezí 0,1 – 0,5 % (w/v). Zjištěné skutečnosti ukazují, že antibakteriální efekt vykazovala prakticky jen sůl obsahující polyfosforečnany s nejvyšším kondenzačním stupněm, což potvrzuje již zmiňovanou teorii, čím delší je řetězec tím je účinek solí

silnější. Směs solí, která obsahovala polyfosforečnany s nižším kondenzačním stupněm, měla jen minimální inhibiční účinek [55].

Studie inhibičního účinku prováděné u bakterií jako jsou *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium pasteurianum* a *Clostridium botulinum* dokázaly, že růst těchto bakterií byl inhibován koncentrací polyfosforečnanů, která je běžně používána v potravinářském průmyslu [56].

Velmi málo jsou známy účinky fosforečnanů na růst plísní, ačkoli je znám důkaz, že fosforečnany mohou ovlivňovat v určitých fázích metabolismus plísní, jako je buněčná diferenciace, sporulace a produkce toxinů [49]. Někteří autoři zjistili, že růst plísní potlačují polyfosforečnany díky přítomnosti polymerů v buněčné stěně (např. chitinu a glykoproteinů), které se podílejí na příjmu kovů [33].

Inhibiční účinek fosforečnanů je ovlivňován faktory, jako jsou např. pH prostředí, teplota a primární výskyt mikroorganismů [45].

Ruby et al. [45] zjistili, že bakteriální úbytek působením polyfosforečnanů je významnější při vyšším pH. Tuto skutečnost také potvrzují Knabel et al. [54], kteří dokázali, že gram pozitivní bakterie jsou inhibovány především alkalickými polyfosforečnany. Zjistili, že použitím 1% polyfosforečnanů byla zcela inhibována plíseň *Aspergillus flavus* a testované gram pozitivní bakterie, zatímco u testovaných gramnegativních bakterií inhibice prokázána nebyla [54].

Někteří autoři popisují antimikrobiální účinky fosforečnanů také v drůbežích produktech. Prokázali, že namáčení kuřecích částí nebo jatečně upravených těl do chlazené vody obsahující fosforečnan způsobilo snížení počtu bakterií a tím prodloužení trvanlivosti těchto produktů [57].

Další studie také ukazují, že inhibiční účinek některých fosforečnanů (ultrafosforečnan sodný, hexametrafosforečnan sodný, pyrofosforečnan tetrasodný) se poněkud snížil v přítomnosti určité koncentrace kovů, jako jsou vápník, hořčík a železo. Tato skutečnost byla také potvrzena Changem a Lee [6], kteří uvádí, že citlivost bakterií na SHMP (hexametrafosforečnan sodný) byla podstatně snížena přítomností CaCl_2 , KCl , a MgSO_4 .

Více informací o antimikrobiální aktivitě by mohlo umožnit rozšíření používání fosforečnanů v potravinářském průmyslu [49].

3 CHARAKTERISTIKA VYBRANÝCH DRUHŮ BAKTERIÍ

3.1 Charakteristika bakterií tvořících spóry

Bakterie tvořící spóry patří mezi nejčastější kontaminanty tavených sýrů a proto je nutné věnovat jim dostatečnou pozornost [23] [25]. Jsou to heterogenní tyčinkovité grampozitivní bakterie. Bakteriální spóry jsou v podstatě 'klidová stádia' v životním cyklu těchto bakterií. Jejich vznik obecně vyplývá z úbytku určitých základních živin v prostředí. Spóry jsou tedy latentní struktury s centrálním 'jádre', které obsahuje buněčné genetické elementy společně s enzymy potřebné pro jejich vyklíčení. Jádro je chráněno od vnějšího prostředí tlustým bílkovinným obalem a kortexovou vrstvou. Bílkovinný obal spór je vysoce odolný vůči chemickému a radiačnímu poškození. Spóry jsou velmi odolné vůči prostředí, v němž jsou vegetativní buňky usmrcovány [58].

Mezi sporotvorné bakterie patří dva hlavní rody *Bacillus* a *Clostridium*. Tyto bakterie obsahují kromě několika závažných lidských patogenů, také patogeny zvířat a hmyzu. Jedná se o patogeny, které způsobují onemocnění jako např. antrax, botulismus, tetanus apod. [58].

Mnohé druhy z těchto rodů produkují silné extracelulární enzymy zodpovědné za degradaci bílkovin, sacharidů a tuků. Druhy rodu *Bacillus* jsou aerobní nebo fakultativně anaerobní a vytvářejí spóry pouze za aerobních podmínek, zatímco druhy rodu *Clostridium* jsou anaerobní a aerotolerantní a produkují spóry za podmínek anaerobních [58].

Podle růstových vlastností lze tyto bakterie rozdělit následovně [47]:

- termofilní bakterie – optimální teplota růstu je vyšší než 45 °C,
- mezofilní bakterie – optimální teplota růstu je v rozmezí 15 – 45 °C,
- psychrofilní a psychrotrofní bakterie – způsobují kažení potravin skladovaných při chladírenských teplotách.

3.2 Obecná charakteristika bakterií testovaných v diplomové práci

3.2.1 *Clostridium butyricum*

Klostridia způsobující kažení potravin se vyznačují především sacharolytickou a proteolytickou aktivitou, což způsobuje změnu pH výrobků (způsobeno produkcí organických ky-

selin), dále dochází ke vzniku plynů a nežádoucího aroma (v důsledku tvorby těkavých kyselin). Minimální teplota pro růst klostridií je 5 °C a minimální hodnota pH 4,7 [17].

Clostridium butyricum je anaerobní bakterie, která vyžaduje pro svůj růst absolutní nepřítomnost kyslíku. Tato bakterie produkuje kyselinu máselnou, která slouží jako indikátor přítomnosti sacharolytických klostridií. Kyselina máselná je nepříjemně páchnoucí látka, což je kromě zdravotního rizika také důvod, proč je jejich přítomnost v potravinářství velmi nežádoucí, především jsou obávanou kontaminací v sýraštví [51]. *C. butyricum* je bakterie rozšířená ve světě a může být izolována z lidí, zvířat, rostlin, půdy i mořských sedimentů [59].

Tato bakterie produkuje spóry, které mohou přežívat i v drsnějších podmínkách. Nejnižší pH, při kterém byl zaznamenán růst je 4,2 [60].

Právě přítomnost bakterií máselného kvašení a jejich spor v mléce jsou příčinou mnoha problémů při výrobě sýrů. Některé druhy bakterií rodu *Clostridium* jsou původci tzv. pozdního duření sýrů, což je jev, který je charakterizován tvorbou ok (dutin) v sýrech v důsledku vysoké produkce plynů a kyseliny máselné [61]. Kmeny *Clostridium butyricum*, které produkují botulotoxin typu E, byly spojovány s vypuknutí jídlem přenášeného botulismu [62]. Ve většině případů jsou botulinové neurotoxiny produkovány bakterií *C. botulinum*, ale občas je vylučovaný i bakterií *Clostridium butyricum* [59].

Botulismus jako neuroparalytická intoxikace, byla známa už před sto lety, často byla nacházena při konzumaci klobás. Požití botulinových toxinů vede k ochrnutí svalů způsobené uvolňováním acetylcholinu z nervové buňky přes neuromuskulární synapse. Počáteční příznaky požití kontaminovaných potravin se objevují mezi 12 a 36 hodin po požití, ale může také trvat až 10 dní i déle. Čím dříve se příznaky objeví, tím závažnější je intoxikace [58].

Časné příznaky jsou obecně nevolnost nebo zvracení, následované příznaky, jako je dvojitě vidění a rozšíření zornic, vada řeči, obtíže při polykání, atd. Tyto příznaky poté přecházejí do svalové koordinace a slabosti, únavy a respiračních potíží [58].

Toxická dávka pro člověka není známá, ale pro myši je nižší než 0,1 ng · kg⁻¹, což znamená, že botulotoxin patří mezi nejvíce toxické přírodní jedy [58].

3.2.2 *Clostridium sporogenes*

Clostridium sporogenes je grampozitivní, anaerobní bakterie se schopností vytvářet endospóry. Bylo prokázáno, že mnoho kmenů této bakterie obsahuje dva typy buněk, které překvapivě vykazují odlišné růstové návyky. Přes 99 % populace většiny kmenů jsou pohyb-

livé buňky, které se vyskytují jednotlivě nebo v krátkých řetězcích [63]. *Clostridium sporogenes* je významným kontaminantem mléčných výrobků včetně sýrů. Na rozdíl od jiných klostridií způsobuje tato bakterie lipolytické a proteolytické změny výrobků [58]. Tato bakterie se hojně vyskytuje v přírodě a také ve střevech lidí a zvířat. Spóry přetrvávají v půdě a oblastech, které podléhají znečištění lidskými nebo zvířecími fekáliemi [64].

3.2.3 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus je poměrně velká, pohyblivá, grampozitivní, fakultativně anaerobní, tyčinkovitá bakterie, která je široce rozšířena v životním prostředí. Vyskytuje se v půdě, ve vodě, na rostlinách a také v obilovinách, zejména v rýži [58] [65]. Spóry této bakterie mají oválný tvar a ve vegetativní buňce jsou uloženy subterminálně [66].

Generační doba organismu se pohybuje mezi 18 a 27 minutami. Růst byl prokázán v poměrně širokém rozsahu pH 4,9 – 9,3 a také toleruje koncentraci solí až 7,5 % [67]. *B. cereus* je mezofilní organismus s optimální teplotou pro růst 30 - 35 °C, některé kmeny jsou psychrotrofní a rostou při teplotách až do cca 5 °C. Tyto kmeny jsou většinou spojovány s kontaminací mléka a mléčných výrobků, v nichž způsobují organolepticky nepříjemné vlastnosti, jako je např. hořká, zatuchlá, žluklá, shnilá, trpká, ovocná příchut'. Horní hranice teploty pro klíčení spór je poněkud vyšší než pro vegetativní formy buněk. [23] [58].

Existuje několik druhů rodu *Bacillus* úzce fyziologicky souvisejících s *B. cereus*, jako např. *B. anthracis*, *B. thuringiensis* a *B. mycoides*. Rezistence spór vůči nepříznivým podmínkám prostředí a schopnosti produkovat řadu enzymů rozkládajících potraviny, jako jsou např. proteázy, amylázy, lecitináza umožňují přežití bakterie a její dobrý růst za různých podmínek, což je důvod vzniku vady u pasterizovaného mléka, označované jako 'fragmentární (malý) krém', který je důsledkem rozkladu lecitinu. Další vadou je sladké srážení mléka způsobené opět enzymem lecitinázou a fosfatázou [23] [58].

Kromě kažení potravin je *B. cereus* původcem potravinové intoxikace [23]. Alimentární intoxikace je způsobena pomnožením toxinogenního kmene a tvorbou toxinů v potravine nebo krmivu. Pokud zůstane potravina po uvaření uskladněna při pokojové teplotě, dochází k masivnímu pomnožení bakteriálních spór. Proto potravina musí být po uvaření rychle zchlazena, skladována při chladírenské teplotě a před požitím řádně prohřátá [66] [68].

B. cereus může vyvolat dva odlišné syndromy po konzumaci kontaminovaného jídla [69]. Prvním z nich je tzv. emetický (dávicí) syndrom, který způsobuje po 1 - 5 hodinách po

konzumaci kontaminovaného jídla nevolnost, zvracení a občas i průjem, příznaky se podobají otravám z jídla způsobené bakterií *Staphylococcus aureus* [58]. Druhý syndrom je označován jako diarhogenní (průjmový), u kterého se příznaky jako jsou bolest břicha a průjem začnou projevovat po 8 – 16 hodinách od zkonsumování kontaminované potravin [58]. *B. cereus* produkuje širokou škálu extracelulárních enzymů schopných hydrolyzy bílkovin, tuků, škrobu a další řady sacharidů. Organismus může tedy využít širokou škálu potravinářských surovin, podporujících růst této bakterie [58].

3.2.4 *Bacillus subtilis*

Buňky bakterie *Bacillus subtilis* jsou tyčinkovitého tvaru. *Bacillus subtilis* je aerobní grampozitivní bakterie přirozeně se nacházejí v půdě a v hnilých rostlinách. Vytváří endospóry a je jednou z nejvíce studovaných grampozitivních bakterií. *Bacillus subtilis* je široce používán pro genetický výzkum. Tato bakterie je považována za nepatogenní [70].

Po požití potravin kontaminované bakterií *Bacillus subtilis* dochází k rychlému nástupu příznaků (cca 2-3 hodiny), které se skládají z akutního zvracení, které je často následováno průjmem. Příznaky se podobají dávicímu syndromu způsobeného bakterií *B. cereus* [71].

B. subtilis je využíván v průmyslových aplikacích pro jeho schopnosti produkovat různé enzymy, jako jsou např. amylázy, čehož je využíváno v textilním i papírenském průmyslu. Také je schopen produkovat enzym proteázu, který se využívá pro výrobu pracích prostředků a také nachází uplatnění v kožedělném průmyslu [71]. *B. subtilis* také slouží k výrobě mnoha antibiotik, což je užitečné při léčbě bakteriálních infekcí kůže, drobných řezů a popálenin [71]. Tato bakterie je také používána jako fungicid na ochranu květin a okrasných semen a pro zemědělská osiva [70].

3.2.5 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je grampozitivní bakterie tvořící koky převážně uspořádané do shluků, ale mohou se vyskytovat jen v párech nebo i ojedinele. *S. aureus* tvoří na živném, mléčném nebo krevním agaru kolonie s hladkým lesklým povrchem [65]. *S. aureus* může růst v teplotním rozmezí 15 - 45 °C a v přítomnosti NaCl o koncentraci až 15 % [72].

Růst a množení bakterií *S. aureus* v potravinách představuje potenciální riziko pro zdraví spotřebitele, protože mnoho kmenů *S. aureus* produkuje enterotoxiny. Potravinu obyčejně spojené se stafylokokovou otravou z jídla spadají do všeobecných kategorií, jako je maso a

masné výrobky, saláty, pečivo plněné smetanou a mléčné výrobky. *S. aureus* je schopný produkovat velké množství extracelulárních enzymů, toxinů, a dalších látek [66].

Toxigenní *S. aureus* se vyskytují v syrovém mléce, ale po proběhnutí pasteurace dojde zpravidla k jeho usmrcení. Nicméně pasterační teplota nestačí ke zničení enterotoxinů této bakterie [17].

3.2.6 *Salmonella enterica*

Zástupci rodu *Salmonella* jsou fakultativně anaerobní, gramnegativní, rovné tyčinky, které obvykle obsahují peritrichální bičíky. Salmonely patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Tato bakterie je schopna růst v rozmezí teplot 5,2 – 46,2 °C a pH 3,8 – 9,5 [58]. Salmonely jsou citlivé na teplo, k jejich usmrcení stačí zahřátí na pasterační teplotu. Existuje více než 2000 sérotypů bakterií rodu *Salmonella* [73].

Salmonella enterica sérotyp Enteritidis se primárně vyskytuje v drůbežím mase a drůbežích produktech [66].

Většina salmonel je považována za lidské patogeny, ačkoli se liší ve vlastnostech a závažnosti onemocnění, které způsobují [74].

V posledních 20 letech se *S. Enteritidis* stala jednou z nejčastějších příčin otravy potravinami ve Spojených státech [75]. U osob infikovaných bakterií *S. Enteritidis* se obvykle objeví teplota, křeče v břiše a průjem, příznaky se objevují po 12 - 72 hodinách po požití kontaminované potraviny [75].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍLE PRÁCE

Cíle diplomové práce byly vymezeny následovně:

- v teoretické části zpracovat literární rešerši týkající se charakteristiky a složení tavených sýrů. Zabývat se antimikrobiálními vlivy fosforečnanových solí a vlivy působícími na jakost tavených sýrů a jejich mikrobiální kontaminaci,
- v praktické části provést sledování dynamiky růstu vybraných potravinářsky významných bakterií v modelových vzorcích tavených sýrů v závislosti na typu přidávaných tavicích fosforečnanových solí,
- na základě teoretické části a výsledků praktické části zhodnotit využitelnost aplikovaných látek pro zlepšení údržnosti tavených sýrů.

5 METODIKA

5.1 Použité pomůcky a zařízení

- Autokláv Systec 2540 EL
- Automatické mikropipety Biohit
- Biologický termostat Membert INE 600
- Horkovzdušná sušárna Memmert UNB 500,
- Chladnička Elektrolux
- Laboratorní předvážky KERN
- Laboratorní sklo
- Mikrovlná trouba Elektrolux
- pH-metr GRYF 208L, Česká republika
- Plastové kelímky
- Špičky pro automatické mikropipety
- Vorwerk Thermomix TM 21 blender cooker

5.2 Výroba tavených sýrů

Antibakteriální účinek binárních fosforečnanových směsí byl pozorován na růstu vybraných bakterií, které mohou způsobit kontaminaci tavených sýrů. K experimentu byly použity tři tavicí soli (DIDI, HEXA 68, HEXA 70), ze kterých byly připraveny dvě kombinace fosforečnanových směsí s různým poměrem tavicích solí. Všechny vyrobené modelové vzorky tavených sýrů obsahovaly 50 % (w/w) tuku v sušině.

Množství jednotlivých surovin bylo naváženo podle předem připravené surovinové skladby (příloha PI). Pro utavení vzorků bylo použito zařízení Vorwerk Thermomix 31 blender cooker. Tavení probíhalo při teplotě 92 °C s výdrží 1 minutu, přičemž celková doba tavení trvala po dobu 10 minut.

Suroviny, které byly použity pro výrobu modelových vzorků tavených sýrů:

- Eidamská cihla (Kromilk s.r.o, 30 % (w/w) TVS),
- čerstvé máslo,
- pitná voda,
- binární směs fosforečnanových směsí (získaných z Fosfa akciová společnost, Břeclav)
 - HEXA 68 a HEXA 70.....polyfosforečnany,
 - DIDIdihydrát hydrogenfosforečnanu (di)sodného ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Binární směsi obsahovaly fosforečnanové soli v následujících poměrech (w/w):

Kombinace I

I	DIDI:HEXA 68	2,5:0
II	DIDI:HEXA 68	2,1:0,4
III	DIDI:HEXA 68	1,7:0,8
IV	DIDI:HEXA 68	1,3:1,2

Kombinace II

V	DIDI:HEXA 70	2,5:0
VI	DIDI:HEXA 70	2,1:0,4
VII	DIDI:HEXA 70	1,7:0,8
VIII	DIDI:HEXA 70	1,3:1,2

V poslední fázi přípravy byly vzorky záměrně kontaminovány 3 ml připravených bakteriálních suspenzí (*Clostridium butyricum*, *Clostridium sporogenes*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica*), promíchány a získaná tavenina byla následně rozlévána do 16 připravených plastových kelímků. Naplněné kelímky byly pomocí žehličky opatrně uzavřeny přivařitelnými hliníkovými víčky.

Stejným způsobem byla uskutečněna i výroba vzorků, které sloužily jako negativní kontrola. U těchto kontrolních vzorků tavených sýrů, u nichž nebylo provedeno zočkování bakteriálními buňkami, nebyl očekáván žádný nárůst bakterií.

Po vychladnutí byly vzorky skladovány při teplotě 4 ± 2 °C.

5.3 Mikrobiologický rozbor vzorků

5.3.1 Testované kultury mikroorganismů

Pro testování antibakteriálního účinku binárních směsí fosforečnanových solí v modelových tavených sýrech byly vybrány bakterie, které mohou způsobovat kažení potravin, a nebo mohou být potenciálně nežádoucí při výrobě tavených sýrů.

- *Bacillus cereus* CCM 2010
- *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062
- *Clostridium butyricum* CAPM 6342
- *Clostridium sporogenes* CAPM 6329
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420
- *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953

Testované bakterie byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM) a ze Sbírký zoonozních mikroorganismů při Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v.v.i. v Brně (CAPM). Bakterie byly naočkovány do tekuté živné půdy (masopeptonový bujón v případě bakterií *Bacillus*, *Staphylococcus* a *Salmonella* a médium s thioglykolátem /FTM/ pro klostridia) a připravené inokulum buněk bylo následně naočkováno do připravené sýrové taveniny.

5.3.2 Příprava živných půd

Masopeptonový bujón byl použit pro přípravu bakteriálního inokula, které bylo následně použito pro vlastní experiment.

Masopeptonový bujón (MPB)

Pepton	5,0 g
NaCl	3,0 g
Masový výtažek	3,0 g
Destilovaná voda.....	1000 ml

Po navážení byly jednotlivé suroviny rozpuštěny v odpovídajícím množství destilované vody, poté byl obsah důkladně protřepán a následovala sterilace roztoku v autoklávu při 121 °C po dobu 30 minut.

Plate Count Agar (PCA)

PCA je půda obsahující glukózu a kvasničný extrakt, je používána pro zjištění celkového počtu aerobních nebo fakultativně anaerobních bakterií v mléce, mase, masných produktech a ostatních potravinářských výrobcích [76] [77].

Plate Count Agar (HiMedia)..... 9,4 g

Destilovaná voda..... 400 ml

Pro přípravu živné půdy bylo PCA rozpuštěno v odpovídajícím množství destilované vody. Obsah byl důkladně rozmíchán a následně autoklávován při teplotě 121 °C po dobu 30 min.

Fluid thioglykollate medium (FTM)

Půda FTM je univerzální komplexní médium pro kultivaci a izolaci náročných anaerobních ale i některých aerobních mikroorganismů [78].

Fluid thioglykollate medium..... 11,9 g

Agar 4,5 g

Destilovaná voda..... 400 ml

Navážené suroviny byly důkladně rozpuštěny ve 400 ml destilované vody, vzniklý roztok byl sterilován v autoklávu po dobu 30 minut při teplotě 121 °C.

Fyziologický roztok

Chlorid sodný (LachNer)..... 8,5 g

Destilovaná voda..... 1000 ml

Chlorid sodný byl rozpuštěn v odpovídajícím množství destilované vody, poté následovala sterilace roztoku v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 30 minut.

5.3.3 Příprava bakteriálních suspenzí

Nejprve bylo připraveno inokulum, kterým byly zaočkovány testované modelové vzorky tavených sýrů. Bakterie byly z Petriho misky zaočkovány do tekutých médií (MPB nebo

FTM) a byly kultivovány při teplotě 30 °C po dobu 24 hodin (v případě klostridií anaerobně po dobu 48 hodin).

5.3.4 Stanovení celkového počtu živých bakterií plotnovou metodou

Mikrobiální rozbor připravených modelových vzorků taveného sýra byl prováděn v pravidelných časových intervalech. První mikrobiální analýza vzorků byla provedena již po 1 dnu od přípravy, následující analýzy byly prováděny po 6, 12, 21, 28, 33, 36, 41, 47, 64, 110 a 117 dnech od zaočkování vzorků. Ve stejných časových intervalech byla také provedena analýza připravených kontrolních vzorků (bez kontaminace bakteriální suspenzí). V každém odběrovém dnu bylo celkem analyzováno 6 kelímků téhož vzorku a každý vzorek byl kultivován na 6 Petriho miskách.

Po otevření analyzovaného vzorku bylo pomocí sterilní lžice odebráno 5 g vzorku, poté následovala jeho homogenizace. Homogenizace vzorku probíhala ve 45 ml fyziologického roztoku. Aby počet narostlých kolonií byl dostatečně přesný, bylo provedeno desítkové ředění, jehož principem je postupné ředění suspenze vždy na 10x nižší koncentraci čistým fyziologickým roztokem. Pro získání správných výsledků je nezbytné dobře zvolit ředění vzorku. Inokulum ve vhodném ředění bylo dokonale promícháno, následně pipetováno pomocí automatické pipety na sterilní Petriho misku a přelito příslušnou rozpuštěnou živnou půdou, vytemperovanou na $45 \pm 0,5$ °C v množství 18 ± 2 ml. Půda byla s inokulem dokonale promíchána krouživými pohyby. Po promíchání byly Petriho misky s půdou nechány v klidu až do úplného ztuhnutí. Poté byla provedena kultivace v termostatu (v případě klostridií v anaerostatu bez přístupu kyslíku a se 7 % CO₂) při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin (v případě kultivace klostridií 48 hodin). Celkové počty mikroorganismů byly přepočteny na 1 g vyrobeného vzorku ($CFU \cdot g^{-1}$).

Výpočet celkového počtu živých mikroorganismů pro dvě Petriho misky stejného ředění:

$$N = \frac{\sum \frac{c}{n}}{d \cdot V}$$

kde: N – počet mikroorganismů [$CFU \cdot g^{-1}$]; $\sum c$ – počet všech kolonie tvořících jednotek (příslušné skupiny mikroorganismů) na všech plotnách použitých pro výpočet; n – počet

ploten stejného ředění použitého pro výpočet; d – ředící faktor odpovídající prvnímu pro výpočet použitému ředění; V – objem inokula očkovaného na každou plotnu [ml]

Výpočet celkového počtu živých mikroorganismů pro dvě Petriho misky po sobě jdoucího ředění:

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

kde: N – počet mikroorganismů [CFU.g⁻¹]; $\sum c$ – počet všech kolonie tvořících jednotek (příslušné skupiny mikroorganismů) na všech plotnách použitých pro výpočet; n_1 – počet ploten prvního ředění použitého pro výpočet; n_2 – počet ploten druhého ředění použitého pro výpočet; d – ředící faktor odpovídající prvnímu pro výpočet použitému ředění; V – objem inokula očkovaného na každou plotnu [ml]

5.3.5 Stanovení pH modelových vzorků taveného sýra

Pomocí pH-metru byly změřeny hodnoty pH připravených vzorků taveného sýra. pH bylo zjišťováno pro každý poměr tavicích solí v testovaných binárních směsích. Měření bylo prováděno při laboratorní teplotě a každý vzorek taveného sýru (tj. každý kelímek) byl měřen alespoň na 3 různých místech.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Od prehistorických dob byly některé chemické látky pro jejich zvláštní funkce přidávány do potravin. Díky technologickému pokroku ve zpracování vzrostla rozmanitost potravinových výrobků, což vyvolalo zvýšení použití aditivních přípravků. Pro dosažení požadovaného efektu dnes existuje celá řada různých přísad záměrně přidávaných do potravin. Využití aditivních látek se v praxi ujalo, ale toto použití není bez diskuse. V podstatě existují tři typy konzervačních látek používaných v potravinách: antimikrobiální látky, antioxidanty a látky zabraňující hnědnutí [7]. Cílem této části práce bylo zhodnotit použití a účinek především antimikrobiálních látek, které byly v této práci testovány. Antimikrobiální látky se používají zejména jako ochrana proti mikrobiální kontaminaci. Tyto látky hrají důležitou roli v prodloužení trvanlivosti mnoha polotovarů i potravin určených k přímé konzumaci [7].

Praktická část diplomové práce byla zaměřena především na zkoumání antibakteriálního vlivu fosforečnanových látek získaných od výrobce Fosfa akciová společnost, které jsou v dnešní době hojně využívány při výrobě různých typů potravin. Fosforečnany v potravinách reagují zejména s jejich bílkovinnou nebo sacharidickou (převážně škroby) složkou a tím modifikují jejich vodní aktivitu [33].

V rámci předložené diplomové práce byly testovány binární směsi fosforečnanů, které lze při výrobě tavených sýrů použít jako tavicí soli. Směsi byly složeny z polyfosforečnanu (HEXA 68 nebo HEXA 70) a ortofosforečnanu (DIDI) a to tak, že tyto soli byly vždy testovány ve čtyřech vzájemných poměrech. V předcházející studii [44] bylo zjištěno, že v podmínkách *in vitro* působí inhibičně na grampozitivní bakterie polyfosforečnany, zatímco ortofosforečnan DIDI v podmínkách *in vitro* inhibiční účinky nevykazoval. Kromě délky fosforečnanového řetězce měla vliv na růst bakterií v podmínkách *in vitro* také hodnota pH prostředí (v alkalickém prostředí byly zjištěny inhibiční účinky fosforečnanů s kratším řetězcem; [44]).

Směsi fosforečnanů byly v této práci tedy voleny tak, aby se výsledné pH tavených sýrů (5,6 – 5,8) co nejvíce přibližovalo běžným výrobkům v obchodní síti a zamezilo se tak vlivu pH na růst testovaných bakterií v modelových vzorcích tavených sýrů. Zároveň, aby bylo možno vyrobit tavený sýr, který se má co nejvíce podobat běžnému výrobku, bylo nutno použít tavicí fosforečnanové soli. Za kontrolní vzorky (tj. za vzorky, u nichž nebyl

předpokládán inhibiční efekt fosforečnanů) lze tedy považovat modelové tavené sýry, které byly vyrobeny pouze s tavicí solí DIDI (tj. poměry solí DIDI : HEXA 68, resp. HEXA 70, 2,5:0). Fosforečnan DIDI sloužil rovněž k úpravě pH modelových tavených sýrů.

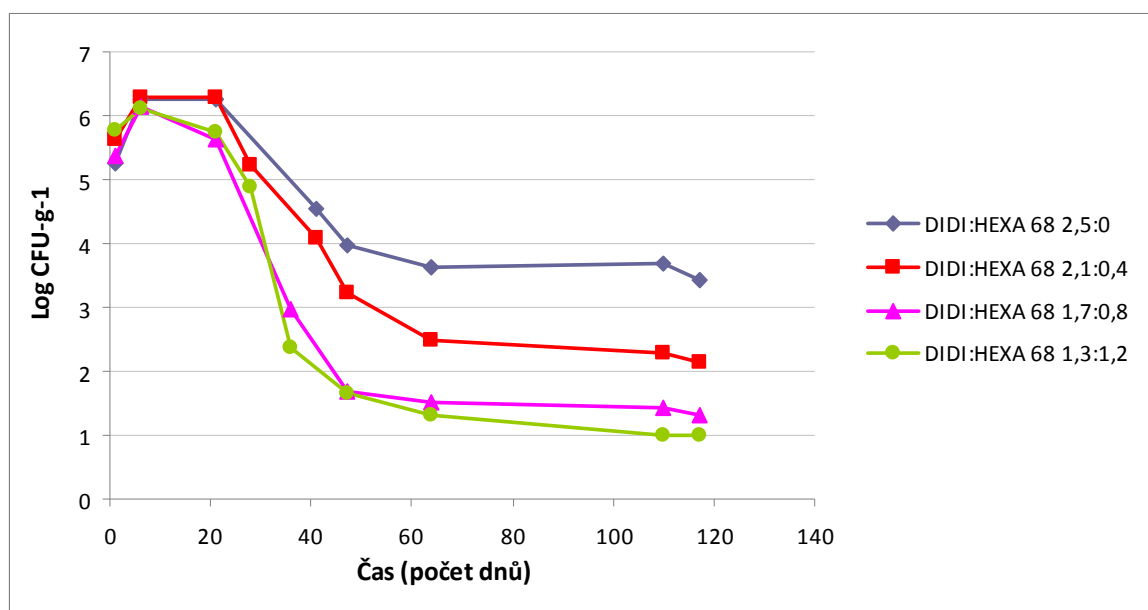
K experimentu byly zvoleny takové bakterie, které jsou řazeny mezi patogenní bakterie nebo které mohou způsobovat kažení potravin, zejména pak tavených sýrů. Za tímto účelem byly vybrány právě sporulující bakterie, které mohou přežít záhřev, který se používá při výrobě tavených sýrů. Rovněž bakterie rodu *Staphylococcus* mohou kontaminovat potravinářské (mlékárenské) provozy a dostat se tak do tavených sýrů jako sekundární kontaminanty. Jak již bylo zmíněno výše, bylo zjištěno, že v podmínkách *in vitro* mají polyfosforečnany inhibiční účinky zejména na grampozitivní bakterie [44]. Aby mohly být tyto inhibiční účinky ověřeny i v reálných potravinách, navíc v potravinách, při jejichž technologické výrobě se fosforečnany využívají, byly právě z tohoto důvodu testovány převážně grampozitivní bakterie. Pro srovnání inhibičního účinku fosforečnanů v potravinách byl navíc testován i vliv na gramnegativní bakterii rodu *Salmonella*.

6.1 Vliv směsí fosforečnanů na růst *Bacillus cereus* CCM 2010

Z obrázku 9 je patrné, že s postupem času a se zvyšujícím se množstvím fosforečnanové soli HEXA 68 v testované směsi, docházelo ke snižování počtu buněk bakterií *Bacillus cereus* CCM 2010 ve vyrobeném taveném sýru. Po 6 - 21 dnech od zaočkování bakteriální suspenze do vyrobeného taveného sýra nebyl sledován úbytek buněk testované bakterie, naopak bylo pozorováno jejich mírné zvýšení. Tento počáteční vzestup bakteriálních buněk lze vysvětlit tím, že bakterie se po zaočkování určitou dobu adaptovaly na nové prostředí (bujón vs. tavený sýr) a teprve po určité době se začal projevovat inhibiční vliv fosforečnanových solí.

Nárůst buněk byl sledován u všech poměrů fosforečnanových solí, které byly testovány. Nejvyšší však byl sledován u vzorků obsahujících pouze sůl DIDI nebo u vzorků obsahujících fosforečnanovou směs s malým množstvím (přibližně 13 % z celkového obsahu fosforečnanových solí) soli HEXA 68. Nejvyšší snížení počtu buněk (o cca 95 %) bylo ve srovnání s počátečním množstvím zaznamenáno po 36 dnech od zaočkování vzorku. O toto snížení se zasloužily směsi s nejvyšším obsahem soli HEXA 68 použité v experimentu. Z výsledků analýzy vzorků tavených sýrů skladovaných 117 dnů vyplývá, že pokles počtu

bakteriálních buněk ve vzorku byl u směsi obsahující fosforečnany DIDI i HEXA 68 výrazně vyšší ve srovnání se vzorky sýrů, které obsahovaly pouze samostatnou tavicí sůl DIDI. Tyto výsledky tak potvrzují teorii, že fosforečnanová sůl DIDI není používána pro její antibakteriální vlastnosti, ale především z důvodu úpravy pH finálního výrobku, snadnějšího utavení a získání vhodné konzistence tavených sýrů [44]. Můžeme se domnívat, že vyšší antimikrobiální aktivita polyfosforečnanu HEXA 68 (případně HEXA 70) je dána jejich složením, jedná se o polyfosforečnany s 15 – 20 fosforečnanovými jednotkami v řetězci (přesnější struktura bohužel není výrobcem definována). Směs s nejvyšším obsahem polyfosforečnanu HEXA 68 byla po celou dobu prováděné mikrobiologické analýzy účinnější v inhibici růstu *B. cereus* CCM 2010 než směs obsahující fosforečnanovou sůl HEXA 70 (obr. 10), která byla použita v druhé kombinaci testovaných binárních fosforečnanových směsí.

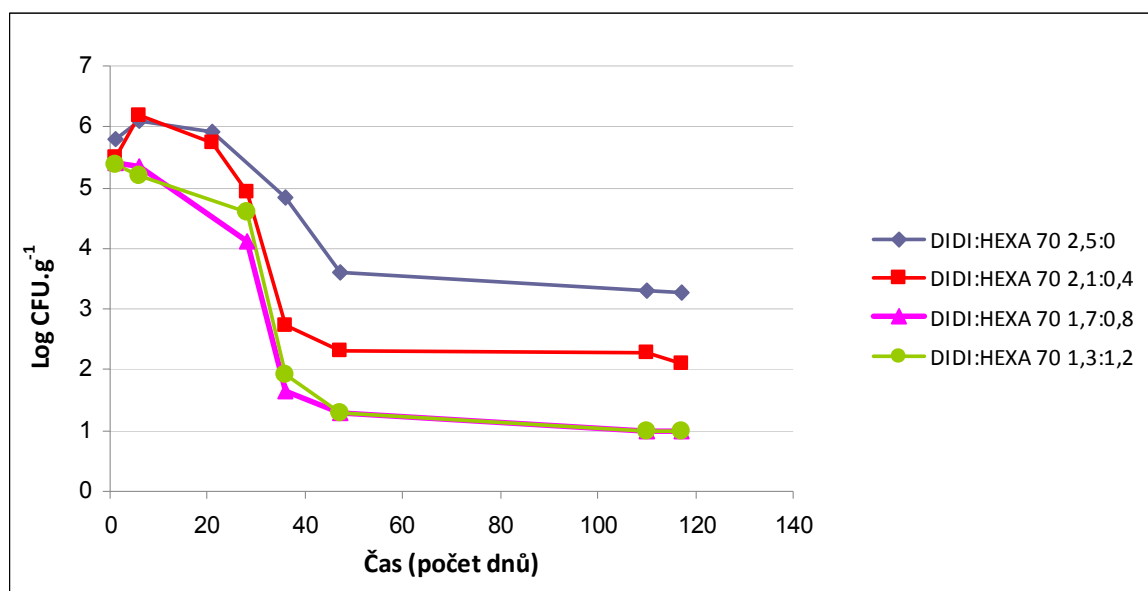


Obrázek 10. Vliv binárních směsí fosforečnanových solí v kombinaci I na růst *Bacillus cereus* CCM 2010

Výsledky z poslední provedené analýzy (tj. po 117 dnech skladování) jsou u obou použitých kombinací solí shodné. V obou případech byl pozorován pokles počtu buněk o 99 % ve srovnání s výsledky z první analýzy (tj. u vzorků druhý den po jejich výrobě).

Pokud porovnáme celkové účinky testovaných směsí fosforečnanových solí na bakterii *Bacillus cereus* CCM 2010, můžeme říci, že fosforečnanová směs obsahující polyfosforečnan

HEXA 68 byla v inhibici této bakterie úspěšnější než směs obsahující polyfosforečnan HEXA 70. Nicméně, inhibice *Bacillus cereus* CCM 2010 byla předpokládána u obou typů fosforečnanových směsí, protože jak již bylo zmiňováno, inhibiční účinek tavících solí roste se stupněm jejich kondenzace [45]. I když není složení soli HEXA 68 ani HEXA 70 přesně definováno, z výsledků se lze domnívat, že obsahují fosforečnany v takovém kondenzačním stupni, který umožňuje inhibici gram pozitivních bakterií. Delší řetězce fosforečnanových solí vykazují větší schopnost odlučovat divalentní kovové kationty, čímž je způsobeno narušení celistvosti stěn bakteriálních buněk či jejich membrán, což vede k úniku intracelulární nukleotidů a bílkovin [33]. Na tuto skutečnost poukazují i jiné studie, zkoumající vliv těchto solí na mikroorganismy [44].



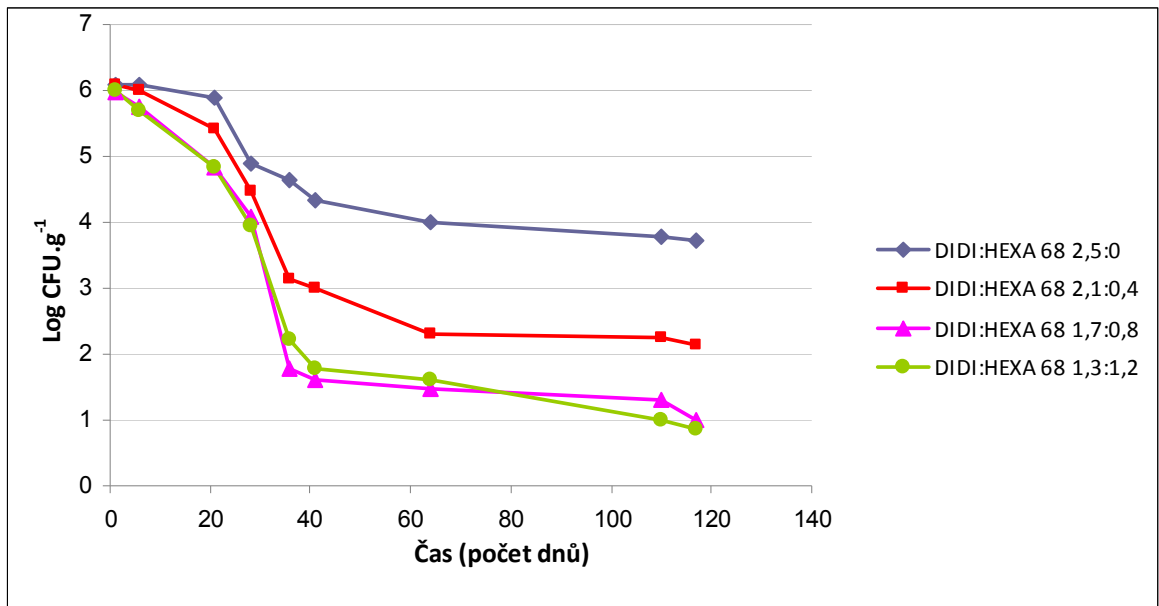
Obrázek 11. Vliv binárních směsí fosforečnanových solí v kombinaci II na růst *Bacillus cereus* CCM 2010

Z výsledků experimentu také vyplývá, že u kontrolních vzorků obsahujících pouze sůl DIDI nejsou patrné přílišné úbytky v počtu buněk *Bacillus cereus* CCM 2010, z čehož lze usuzovat, že tato sůl nevykazuje inhibici ani při nejvyšším aplikovaném množství. Tato skutečnost může být přisuzována faktu, že vzorky obsahující pouze sůl DIDI vykazovaly neutrální hodnoty pH, což potvrzuje to, že vyšší inhibiční aktivita fosforečnanů není podporována v takovém prostředí [33].

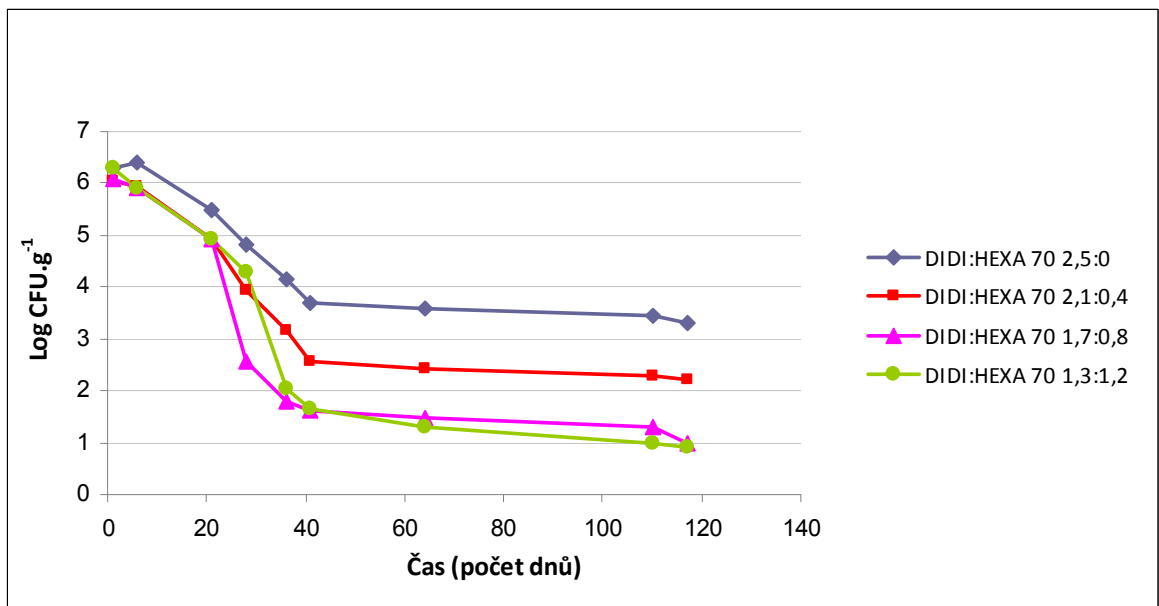
Pozvolný úbytek prakticky všech testovaných bakterií (nejen *B. cereus* CCM 2010) v kontrolních vzorcích obsahujících pouze fosforečnan DIDI je pravděpodobně dán tím, že bakterie nedokážou v matrici tavených sýrů přežít neomezenou dobu. Linton a Harper [79] zjistili, že bakterie patřící mezi potravinářské patogeny jsou schopny v tavených sýrech přežít při teplotě 5 °C v rozmezí 14 až 182 dnů, přičemž po celou dobu skladování se jejich počty snižovaly. V téže studii bylo rovněž zjištěno, že bakterie kontaminující potraviny jsou schopny přežít v tavených sýrech při chladírenské teplotě déle, nicméně od cca 70. dne jejich skladování došlo k jejich výraznější redukci [79].

6.2 Vliv směsí fosforečnanů na růst *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062

Z výsledků zaznamenaných na obrázku 11 lze vyčíst, že již po šesti dnech od zaočkování vzorků modelových tavených sýrů připravenou bakteriální suspenzí, došlo k mírnému snížení počtu buněk. Tento pokles byl zaznamenán pouze u vzorků, na jejichž výrobu byla použita směs s vyšším obsahem soli HEXA 68. Můžeme tedy říci, že s prodlužující se dobou skladování výrobků, se projevila inhibiční aktivita fosforečnanových směsí obsahujících větší množství polyfosforečnanu HEXA 68 na bakterie *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062 ve srovnání se směsí s nižším obsahem nebo úplnou absencí této soli. U vzorků, které byly utaveny s druhou kombinací tavicích solí, je možné pozorovat, že počet bakteriálních buněk byl zejména v cca 1/3 mikrobiálního rozboru (tj. po 28 dnech od výroby vzorků) větší než u vzorků s první kombinací solí (obrázek 12). Po této době byl počet bakteriálních buněk řádově shodný u obou kombinací fosforečnanových směsí. U obou testovaných kombinací fosforečnanových tavicích směsí můžeme sledovat výraznější pokles počtu bakteriálních buněk po jednom měsíci od přípravy a zaočkování vzorků testovnými bakteriemi. Po této době se však počet buněk snižoval opět pomalejším tempem.



Obrázek 12. Vliv binárních směsí fosforečnanových solí v kombinaci I na růst *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062



Obrázek 13 Vliv binárních směsí fosforečnanových solí v kombinaci II na růst *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062

Některé studie potvrzují, že fosforečnanová sůl HEXA 68 je schopna vykazovat inhibiční aktivitu na bakterie rodu *Bacillus* při koncentraci 0,4 % [44]. Z výsledků analýzy vzorků tavených sýrů zaočkovaných bakterií *B. subtilis* CCM 4062 skladovaných při chladírenské

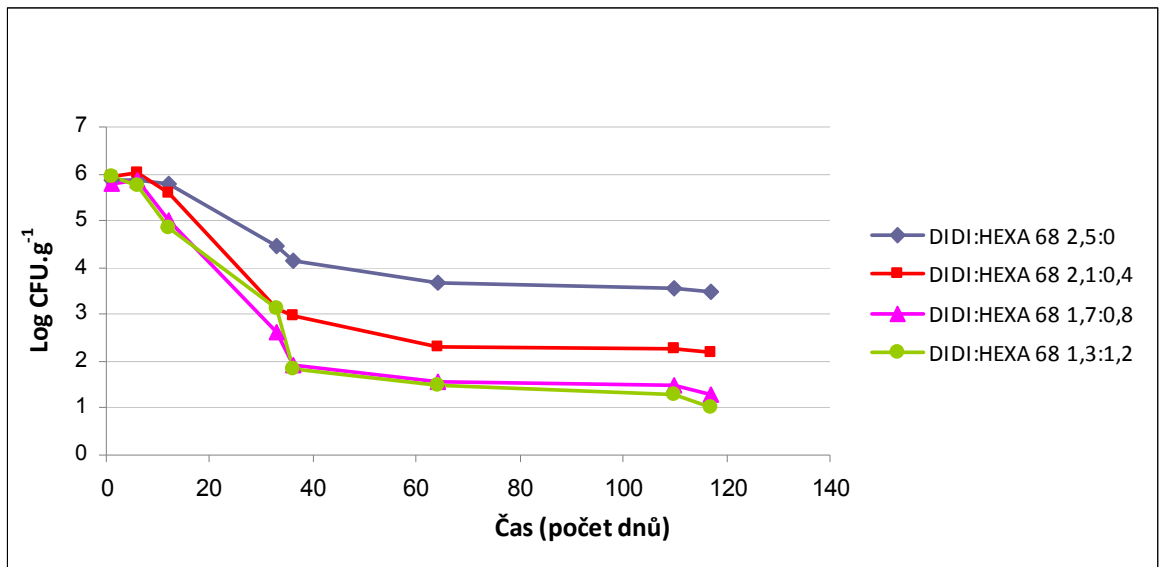
teplotě po dobu 117 dnů je patrné, že fosforečnanová sůl HEXA 70 působila na testovanou bakterii méně inhibičně než HEXA 68. Informace z použitých zdrojů udávají, že *B. subtilis* CCM 4062 není v podmínkách *in vitro* schopen růstu v prostředí s 2% koncentrací soli HEXA 68 a tato sůl již při koncentraci 0,4 % způsobovala prodloužení generační doby i doby lag fáze této bakterie. Stejně jako u *B. cereus* CCM 2010 nezpůsobila v podmínkách *in vitro* fosforečnanová sůl DIDI výrazné snížení počtu buněk *B. subtilis* subsp. *spizizenii* CCM 4062. Pouze 1% a 2% koncentrace této soli vyvolala u bakterií rodu *Bacillus* mírné prodloužení lag fáze [44].

6.3 Vliv směsí fosforečnanů na růst *Clostridium sporogenes* CAPM 6329

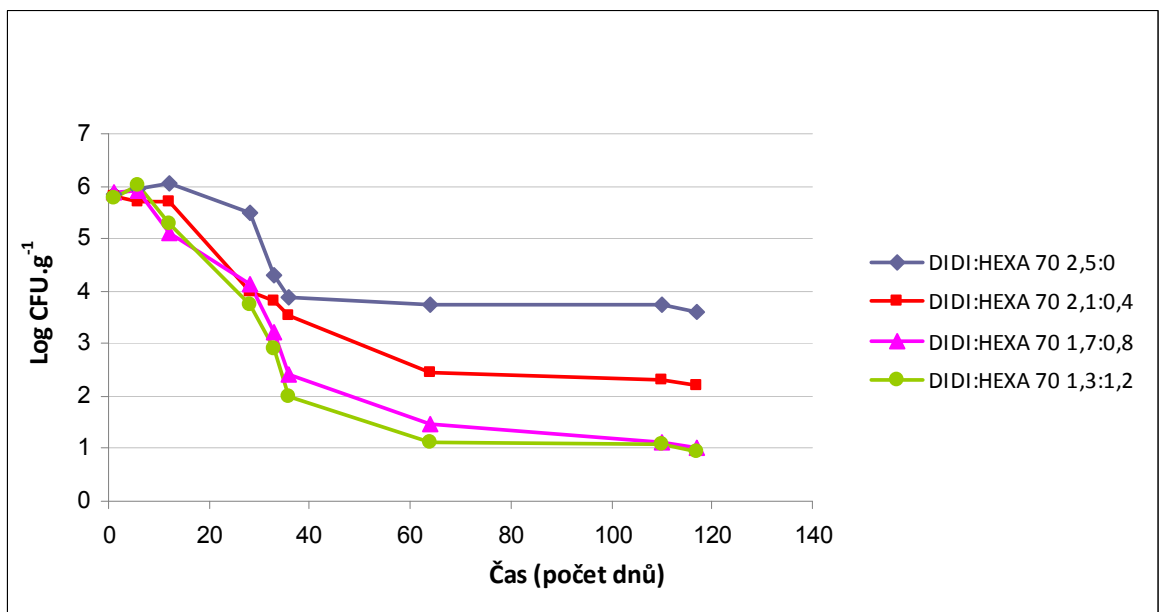
U první kombinace solí můžeme sledovat, že k výraznějším antibakteriálním projevům došlo až po 12 dnech od zaočkování vzorků bakteriální suspenzí. Tyto projevy byly pozorovány pouze u směsi obsahujících vyšší množství soli HEXA 68, což znamená, že tato sůl tvořila přibližně 27 % nebo 42 % obsahu testované fosforečnanové směsi.

Z obrázku 13 lze pozorovat, že k výraznému poklesu růstu buněk bakterie *Clostridium sporogenes* CAPM 6329 došlo po měsíčním skladování zaočkovaných vzorků. Ve srovnání s výsledky mikrobiologické analýzy vzorků druhý den po výrobě došlo po této době až k 99% snížení počtu buněk. Toto snížení bylo sledováno u vzorků, pro jejichž výrobu byla použita fosforečnanová směs s nejvyšším testovaným množstvím (cca 42 %) polyfosforečnanu HEXA 68. Směs se stejným množstvím polyfosforečnanu HEXA 70 vykazovala řádově stejný pokles bakteriálních buněk *C. sporogenes* CAPM 6329 jako první kombinace solí, ale z výsledků je patrné, že vzorky tavených sýrů s kombinací solí obsahující polyfosforečnan HEXA 70 obsahovaly vyšší počet buněk. Z těchto výsledků lze usuzovat, že sůl HEXA 68 má přece jen větší inhibiční účinky na bakterii *C. sporogenes* CAPM 6329 než sůl HEXA 70.

Viditelnější pokles růstu bakterie *C. sporogenes* CAPM 6329 v přítomnosti směsi se solí HEXA 70 je možné pozorovat až po 28 dnech (obrázek 14) po výrobě modelových vzorků tavených sýrů, kdy se počet buněk snížil o jeden řád (srovnáno s první analýzou). Po provedení poslední analýzy, která byla vyhodnocena téměř po čtyřech měsících po zaočkování vzorků, byl zjištěn u obou kombinací fosforečnanových směsí úbytek buněk celkem o 5 řádů ve srovnání s prvním mikrobiálním rozbohem.



Obrázek 14. Vliv binárních směsí fosforečnanových solí v kombinaci I na růst *Clostridium sporogenes* CAPM 6329



Obrázek 15. Vliv binárních směsí fosforečnanových solí v kombinaci II na růst *Clostridium sporogenes* CAPM 6329

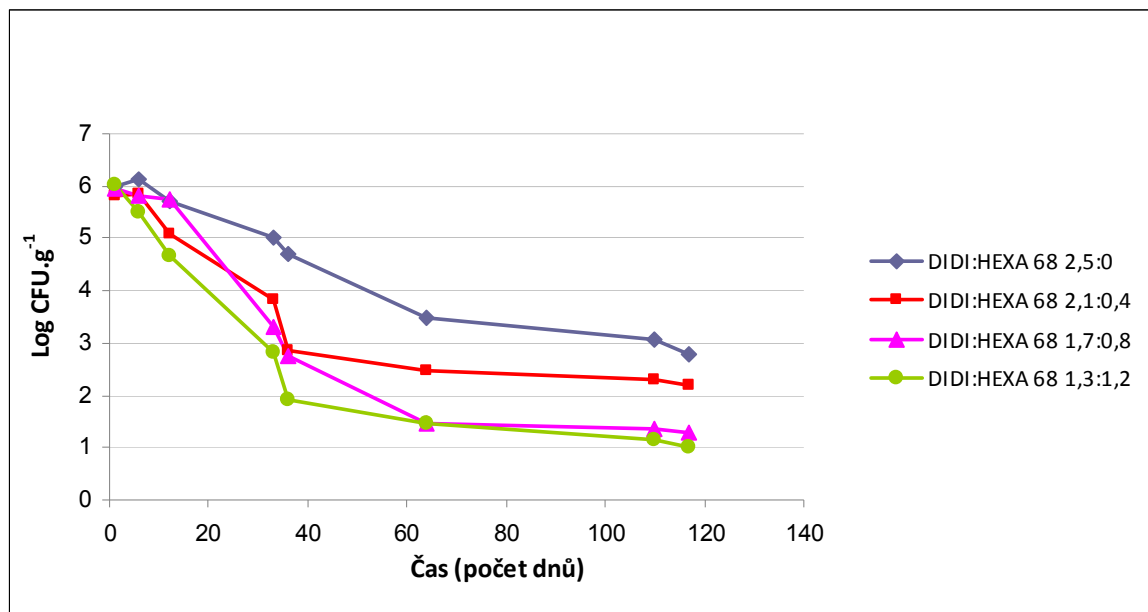
U bakterie *Clostridium sporogenes* CAPM 6329 bylo potvrzeno, že s rostoucím obsahem polyfosforečnanů HEXA 68 nebo HEXA 70 docházelo k tomu, že se prostředí stávalo nevhodné pro růst buněk. Z průběhu experimentu je zcela jasné, že vyšší inhibiční efekt byl

vykazován polyfosforečnanem HEXA 68 než polyfosforečnanem HEXA 70, což potvrzuje také poslední analýza, která byla provedena po téměř čtyřměsíčním uskladnění tavených sýrů zaočkovaných touto bakterií. U vzorků se solí HEXA 70 je možné pozorovat po 110 dnech od zaočkování vzorků snížení růstu buněk o 4 řády. Vzorky se solí HEXA 68 vykazovaly stejný pokles již po 36 dnech od záměrné kontaminace vzorků.

6.4 Vliv směsí fosforečnanů na růst *Clostridium butyricum* CAPM 6342

Druhá testovaná bakterie rodu *Clostridium*, *Clostridium butyricum* CAPM 6342, je bakterií, která je obávaným kontaminantem především v sýrařském průmyslu, protože může způsobovat nežádoucí duření tavených sýrů. Tato vada může vzniknout z toho důvodu, že působením bakterie *Clostridium butyricum* dojde k rozkladu matrice sýrů (zejména laktózy a mléčnanů), což může být doprovázeno produkcí nežádoucích plynů [5]. Příznivé výsledky proti duření tavených sýrů přinesli Berridge a Hawley [5] použitím sušeného preparátu antibiotika nisinu, který původce duření inhiboval.

Z výsledků (obrázek 15) testování inhibiční aktivity binárních fosforečnanových směsí na růst bakterie *Clostridium butyricum* CAPM 6342 je patrné, že byl zaznamenán pokles v počtu buněk již po šestém dnu od zaočkování modelových vzorků tavených sýrů. Počet buněk se po této době snížil přibližně o 70 %. Tento inhibiční efekt byl pozorován opět u fosforečnanové směsi, jejíž 42% obsah tvořil polyfosforečnan HEXA 68. Z obrázku 15 je také patrné, že výraznější inhibiční aktivita fosforečnanových směsí se začala projevovat až po delším skladování (33 dnů) vyrobených tavených sýrů. Po provedení posledního mikrobiologického rozboru (tj. po 117 dnech), bylo zjištěno, že nejvíce inhibující fosforečnanová směs, kterou byla směs DIDI:HEXA 68 v poměru 1.3:1.2 snížila počet bakteriálních buněk téměř o 100 %, konkrétně o 99,99 %. Velmi obdobného výsledku bylo dosaženo i se směsí DIDI:HEXA 70 v poměru 1,3:1,2.

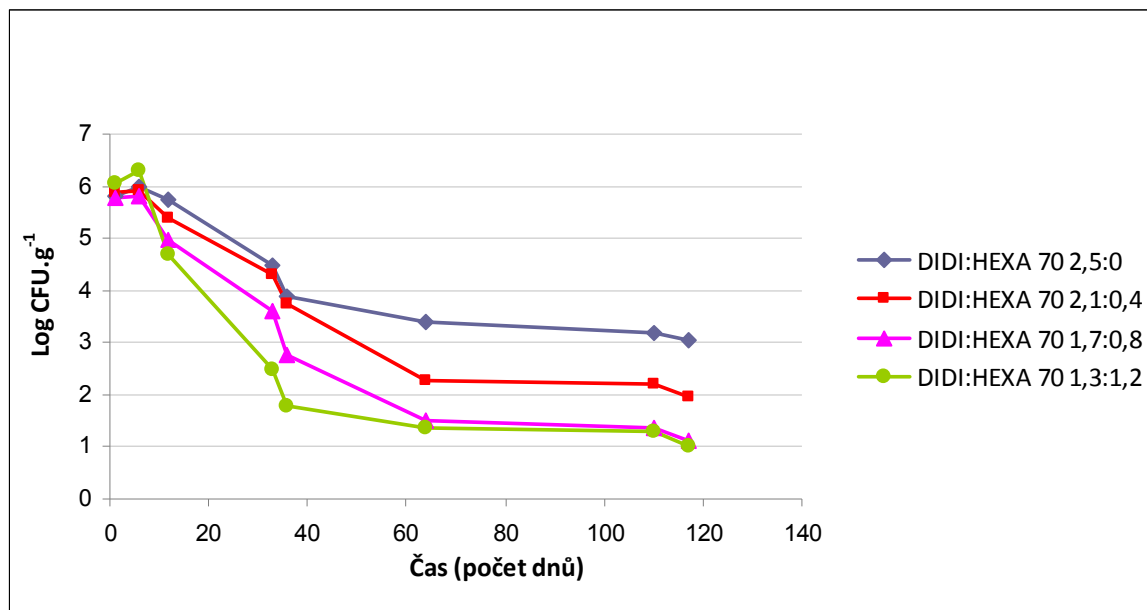


Obrázek 16. Vliv binárních směsí fosforečnanových solí v kombinaci I na růst *Clostridium butyricum* CAPM 6342

U vzorků, které byly vyrobeny s absencí polyfosforečnanu HEXA 68 nebo HEXA 70, a které obsahovaly pouze sůl DIDI, klesl bakteriální růst pouze o 3 řády. Z výsledků, které jsou znázorněny na obrázku 16 vyplývá, že kombinace tavicích solí, ve které byl polyfosforečnan HEXA 68 nahrazen polyfosforečnanem HEXA 70, nevykazovala účinnější inhibiční aktivitu na bakterii *C. butyricum* CAPM 6342. Výsledky zaznamenané na obrázku 15 jsou téměř shodné s výsledky, které znázorňuje obrázek 16.

U bakterie *C. butyricum* CAPM 6342 není možné zcela jasně určit, která z použitých směsí fosforečnanových solí inhibovala více růst této bakterie. Složení obou polyfosforečnanů není přesně známo, nemůžeme tedy říct, který z nich má delší řetězec nebo zda neobsahuje i jiné složky a tudíž není možné zdůvodnit odlišnost inhibičních účinků těchto solí.

Po porovnání výsledků růstu testovaných bakterií rodu *Clostridium* v tavených sýrech obsahujících polyfosforečnan, je zřejmé, že *C. butyricum* CAPM 6342 byla citlivější na přítomnost polyfosforečnanu HEXA 68 než *C. sporogenes* CAPM 6329. Loessner et al. [80] zkoumali v tavených sýrových pomazánkách účinky polyfosforečnanů na růst a vývoj bakterie *Clostridium tyrobutyricum*, jejíž spóry také mohou vyvolat máselné kvašení a následně i duření sýrových výrobků. Z jejich výsledků vyplývá, že za normálních podmínek může 0,5% fosforečnan sodný sloužit jako kontrola růstu bakterie *C. tyrobutyricum* a již 1% koncentrace tohoto fosforečnanu zcela inhibuje růst této bakterie.



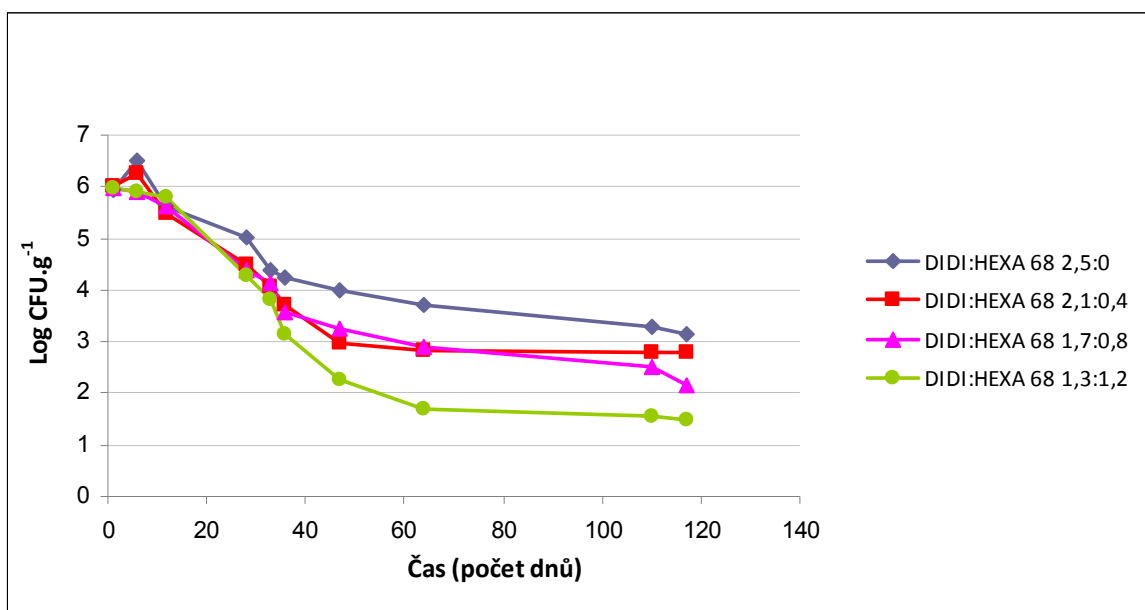
Obrázek 17. Vliv binárních směsí fosforečnanových solí v kombinaci II na růst *Clostridium butyricum* CAPM 6342

Studie některých autorů také uvádějí, že inhibice enzymů, která je podporována přítomností fosforečnanů, může být zodpovědná za jejich antimikrobiální aktivitu. Wagner a Busta [81] zjistili, že difosforečnan sodný (SAPP) v kultivačním médiu potlačil tvorbu i činnost proteázy, která je zodpovědná za aktivaci botulotoxinu, což se následně projevilo zpožděnou produkcí tohoto toxinu v mase zaočkovaném bakterií *Clostridium botulinum* [81]. Tuto skutečnost také potvrdil Tarr [82], který ve své práci uvádí, že přítomnost SAPP v rybí svalovině potlačila produkci enzymu 5'-nukleotidázy, který způsobuje hydrolýzu adenosinmonofosfátu (AMP) na adenosin a molekulu fosfátu.

6.5 Vliv směsí fosforečnanů na růst *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953

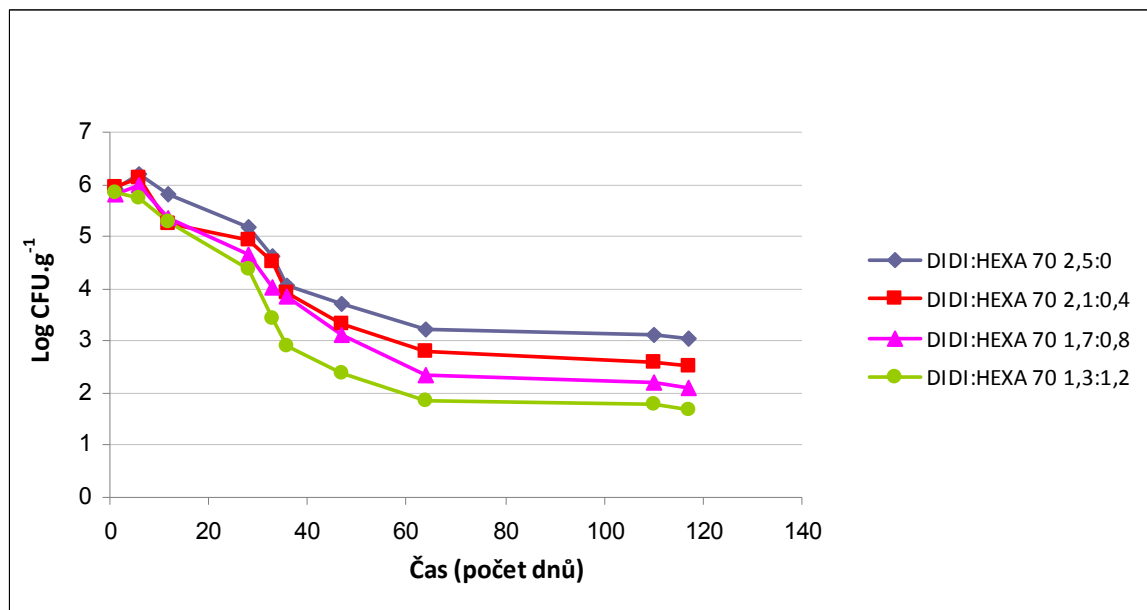
Mírná citlivost bakterie *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953 byla prokázána po 12 dnech skladování vzorků tavených sýrů záměrně zaočkovaných touto bakterií. Výsledky z předchozích analýz (po 1, respektive 6 dnech skladování) ukázaly, že počet buněk do této doby naopak mírně vzrostl. Zvýšený počet buněk bylo možné pozorovat u výrobků, které byly vyrobeny pomocí fosforečnanové směsi bez přídavku soli HEXA 68 (případně HEXA 70) nebo přídavek polyfosforečnanů byl tak malý, že po této době se inhibiční akti-

vita nestačila projevít. Po srovnání inhibičních účinků polyfosforečnanů HEXA 68 a HEXA 70 lze tvrdit, že bakterie *S. aureus* CCM 3953 byla více citlivá na sůl HEXA 68, i když její antibakteriální aktivita nebyla o mnoho výraznější než inhibiční aktivita soli HEXA 70.



Obrázek 18. Vliv binárních směsí fosforečnanových solí v kombinaci I na růst *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953

U obou testovaných kombinací solí (ve všech poměrech) se počet buněk výrazněji snižoval pouze po dobu dvou měsíců, od této doby klesal počet buněk jen velmi nepatrně. Z výsledků poslední analýzy vzorků sýrů skladovaných 117 dnů, které graficky znázorňuje obrázek 17, vyplývá, že fosforečnanová směs, která obsahovala 42 % polyfosforečnanu HEXA 68 snížila počet buněk bakterie *S. aureus* CCM 3953 celkem o 4 řády. Inhibiční aktivita polyfosforečnanu HEXA 70 nebyla příliš odlišná (obrázek 18) oproti soli HEXA 68. U vzorků obsahující pouze sůl DIDI došlo po téměř čtyřměsíčním skladování k poklesu růstu pouze o 2 řády.



Obrázek 19. Vliv binárních směsí fosforečnanových solí v kombinaci II na růst *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953

Stejně jako u testovaných bakterií rodu *Bacillus* nebo *Clostridium* byl počet buněk bakterie *S. aureus* CCM 3953 výrazněji snížen kombinací solí obsahující polyfosforečnan HEXA 68. Z dřívějšího experimentu, který byl proveden pro zjištění antibakteriálních vlastností tavicích solí vyplývá, že sůl HEXA 68 zabraňovala v podmínkách *in vitro* růstu bakterie *Staphylococcus aureus* CCM 3953 již při koncentraci 0,5 %. Koncentrace nižší (0,4 % w/v) měla za následek prodloužení doby lag fáze testované bakterie [44].

Polyfosforečnan HEXA 70 vykazoval nižší antibakteriální vlastnosti na testovaný *S. aureus* CCM 3953. Podle Lorencové [44] v podmínkách *in vitro* působila na *S. aureus* CCM 3953 inhibičně až 2% koncentrace polyfosforečnanu HEXA 70. Při nižších koncentracích došlo „pouze“ k prodloužení lag fáze této bakterie. Sůl DIDI opět nevykazovala zřetelný pokles v počtu buněk testovaných stafylokoků.

Z použitých zdrojů a z výsledků provedeného experimentu se lze domnívat, že pH prostředí výrazně ovlivňuje inhibiční působení tavicích solí na bakterie [33].

Knabel et al. [54] konstatují, že v přítomnosti 1% difosforečnanu sodného (SAPP) došlo ke snížení pH prostředí na hodnotu 5,5, při tomto mírně kyselém pH byla pozorována významná inhibice bakterie *S. aureus*. Nicméně, v prostředí o pH 6,0 (bližšímu neutrální hodnotě), neprojevoval aplikovaný difosforečnan inhibiční vlastnosti na tuto bakterii. Na

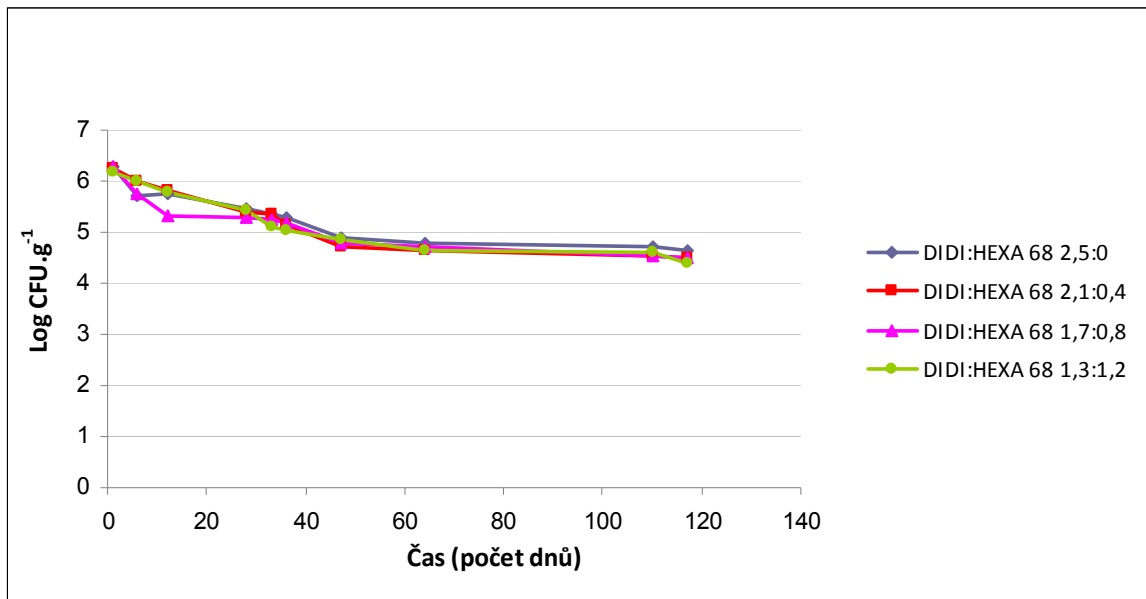
druhou stranu, autoři v této práci také tvrdí, že prostředí s výrazně alkalickým pH (pH ~ 8) podporuje antimikrobiální účinnost fosforečnanových solí [54].

V našem experimentu se pH modelových vzorků tavených sýrů s polyfosforečnanu HEXA 68 a HEXA 70 pohybovalo v mírně kyselých hodnotách (pH ~ 5,65), zatímco pH vzorků s fosforečnanem DIDI ukazovalo na mírně vyšší hodnoty, což může být jedním z důvodů, proč u těchto vzorků nedošlo k výrazné inhibici růstu testovaných bakterií.

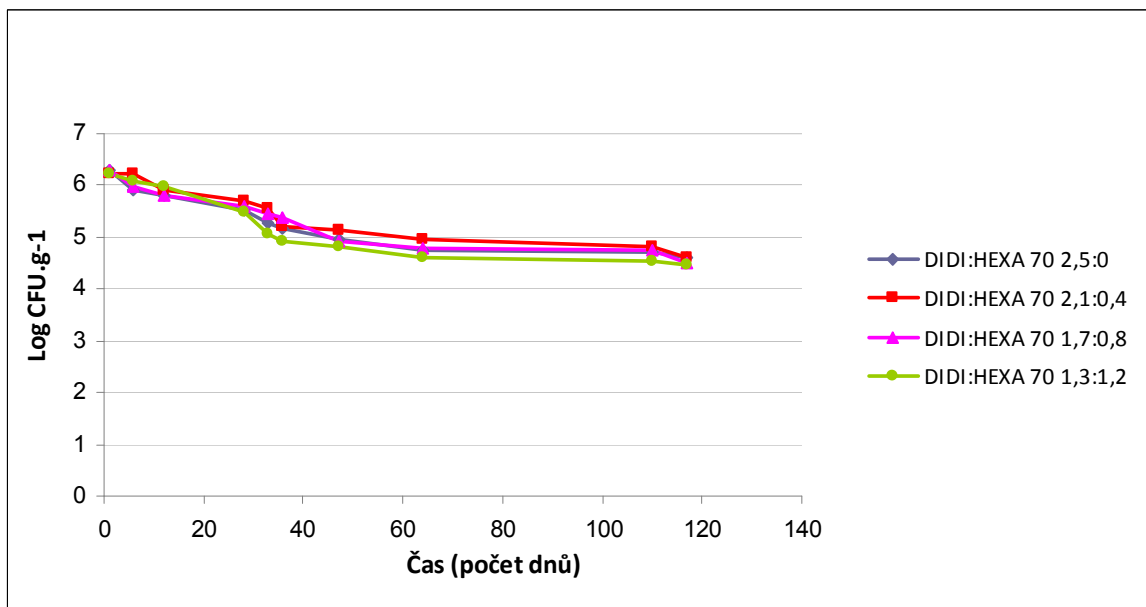
Zkoumání, které provedli Lee et al. [7], ukazuje, že růst bakterie *S. aureus* v prostředí, do něhož byly přidány vápenaté a hořečnaté ionty nebyl inhibičně ovlivněn přítomností ultrafosforečnanu ani přítomností hexametrafosforečnanu sodného (SHMP). Také v přítomnosti železa a aplikovaného pyrofosforečnanu tetrasodného (TSPP) nebylo vytvořeno prostředí, které by působilo inhibičně na tuto bakterii [7].

6.6 Vliv směsí fosforečnanů na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

Jak je patrné z graficky znázorněných výsledků (obrázek 19 a 20), bakterie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420 byla nejméně citlivá na testované fosforečnanové směsi. V průběhu přibližně čtyř měsíců od zaočkování bakteriální suspenze do vyrobených tavených sýrů, nebyl prokázán ani u jednoho ze zkoumaných poměrů fosforečnanových solí výraznější inhibiční účinek. Zkoumáním bylo zjištěno, že všechny testované soli vykazovaly téměř shodné inhibiční účinky na růst bakterie *Salmonella* Enteritidis CCM 4420. Výraznější inhibice této bakterie nebyla pozorována ani u vzorků obsahujících fosforečnanovou směs s nejvyšším testovaným množstvím polyfosforečnanu HEXA 68 (případně HEXA 70), který jevil nejvyšší inhibiční účinky u předchozích testovaných gram pozitivních bakterií. Po uplynutí téměř čtyř měsíců od zaočkování vzorků sýra, došlo v přítomnosti nejvíce inhibující fosforečnanové směsi, obsahující soli DIDI a HEXA 68 v poměru 1,3:1,2 k úbytku v počtu buněk bakterie *Salmonella* Enteritidis CCM 4420 pouze o 2 řády. U vzorků s nejvyšším obsahem polyfosforečnanu HEXA 70, byl konečný počet buněk ještě o 15 % vyšší než u stejných vzorků se solí HEXA 68.



Obrázek 20. Vliv binárních směsí fosforečnanových solí v kombinaci I na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420



Obrázek 21. Vliv binárních směsí fosforečnanových solí v kombinaci II na růst *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420

Poslední testovaná bakterie, *S. Enteritidis* CCM 4420, byla nejméně citlivá na směsi fosforečnanových solí použitých v tomto experimentu k výrobě modelových tavených sýrů.

Výsledky této studie se také shodují se zkoumáním Lorencové [44], která ve své práci uvádí, že *S. Enteritidis* CCM 4420 nebyla v podmínkách *in vitro* usmrcena ani 2% koncentrací polyfosforečnanových solí (HEXA 68 nebo HEXA 70). Tímto byly potvrzeny také výsledky jiných autorů, kteří uvádějí, že gramnegativní bakterie nepodléhají antibakteriální aktivitě fosforečnanových tavicích solí [49].

Přítomnost Fe^{3+} iontů podpořila inhibiční aktivitu fosforečnanů vůči růstu bakterie *Salmonella* Typhimurium. Tato skutečnost je patrná z výsledků studie, která byla provedena autory Knabel et. al. [54]. Autoři se domnívali, že vznik komplexu polyfosforečnan-železo způsobil zablokování sideroforů (receptory vážící a přenášející železo) na povrchu buněk této bakterie, což znemožnilo přenos železa, který je důležitý pro růst a metabolismus bakterie *Salmonella* Typhimurium [54] [83].

Účinky polyfosforečnanů na mikroorganismy, které se nacházejí v potravinách, závisí na různých faktorech, které ovlivňují jejich činnost. Jedná se o faktory jako je druh použitého fosforečnanu a jeho koncentrace, pH, druh substrátu, tepelné zpracování, typ a úroveň mikrobiální kontaminace a samozřejmě také teplota skladování [33].

Výsledky předložené práce ukazují na pokles počtu buněk u všech testovaných grampozitivních bakterií vždy s prodlužující se dobou skladování a se zvyšující se koncentrací použitých polyfosforečnanů. Při použití nejvyšších testovaných koncentrací solí HEXA došlo k poklesu v počtu buněk o cca 4 – 5 řádů. Výsledky rovněž ukazují, že nejvíce citlivou bakterií vůči testovaným binárním fosforečnanovým směsím byla bakterie *B. subtilis* CCM 4062. Na tuto bakterii vykazovala nejvyšší inhibiční aktivitu směs obsahující sůl HEXA 68.

Ze všech testovaných bakterií byla nejméně inhibována *S. Enteritidis* CCM 4420. Jak už bylo uvedeno, gramnegativní bakterie nemají ve své buněčné stěně řetězce teichoových kyselin, které jsou zodpovědné za zachování vysoké koncentrace kovových iontů, proto nemohou být polyfosforečnany tak úspěšné v chelataci iontů, která je jedním z důvodů jejich antibakteriální aktivity [51].

Kombinace polyfosforečnanů a jiných konzervačních látek může vyvolat synergistický efekt v inhibici některých mikroorganismů [33]. Autoři studií uvádí, že u některých potravin (jablečná šťáva, vaječný bílek, rybí filety) spolupůsobení SHMP a konzervačních látek jako jsou sorbát, benzoan a propionát vyvolalo antifungicidní aktivitu [7].

Rajkowski et al. [7] hodnotili také antimikrobiální účinek SHMP (v koncentraci 0,5 a 1,0 %) v kombinaci s NaCl. Zkoumání bylo provedeno v UHT ošetřeném mléce, které bylo zaočkováno bakterií *Staphylococcus aureus*. Výsledky této studie ukazují, že NaCl nepodporuje inhibiční aktivitu SHMP. Toto zjištění bylo přičítáno přítomnosti vápníku a hořčíku v mléce. Jak už bylo několikrát zmiňováno, nadměrné množství těchto iontů inhibiční aktivitu fosforečnanů snižují.

Fosforečnany také nacházejí uplatnění při zpracování celé řady jiných potravin, jako je např. maso, drůbež, mořské plody atd. V těchto potravinách jsou používány především kvůli jejich pufrační schopnosti, dále také ovlivňují rozpustnost látek, mají schopnost vázat vodu a v neposlední řadě slouží fosforečnany také jako emulgátory, stabilizátory a zabráňují oxidaci [7].

Hlavní důvod, proč jsou fosforečnany přidávány do masných výrobků, je to, že zvyšují vaznost vody a snižují hmotnostní ztráty během tepelného zpracování. Fosforečnany nejen zlepšují křehkost a šťavnatost těchto výrobků, ale zpomalují i oxidaci lipidů. Fosforečnany by ale neměly být používány při výrobě trvanlivých masných výrobků, protože zabráňují vysoušení a snižování vodní aktivity, což je v procesu jejich výroby důležité, neboť tím je prodloužena jejich údržnost [84]. Fosforečnany nacházejí využití při výrobě celé řady výrobků [7]. Obecně platí, že citlivost mikroorganismů na přítomnost polyfosforečnanů se liší s jejich druhem.

ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na zkoumání inhibičních účinků binárních směsí fosforečnanových solí na vybrané druhy bakteriálních buněk. Na základě získaných výsledků lze formulovat následující závěry:

- směsi s rostoucím obsahem fosforečnanů ve vyšším kondenzačním stupni měly v podmínkách modelových vzorků tavených sýrů lepší inhibiční účinky na růst testovaných grampozitivních bakterií než směsi s nižší koncentrací polyfosforečnanů,
- během 117denního chladírenského skladování tavených sýrů zaočkovaných mikroorganismy došlo vlivem působení polyfosforečnanů (HEXA 68 nebo HEXA 70) v koncentraci 0,8 %, respektive 1,2 % (w/w), k poklesu počtu grampozitivních bakterií až o 5 řádů,
- směsi s minimálním obsahem polyfosforečnanových nebo s jejich absencí se projeví jako méně účinné,
- grampozitivní bakterie byly výrazně citlivější k přítomnosti polyfosforečnanových solí než testované gramnegativní bakterie.
- nejvíce byl inhibován růst bakterie *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* a nejméně byla na přítomnost směsí tavicích solí citlivá bakterie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis,
- z výsledků lze konstatovat, že z testovaných polyfosforečnanů (HEXA 68 nebo HEXA 70) vykazoval v tavených sýrech lepší inhibiční účinky na růst nežádoucích grampozitivních bakterií polyfosforečnan HEXA 68.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] DOSTÁLOVÁ J., ČURDA, L. *Význam tavených sýrů ve výživě* [online]. [cit. 15.2. 2011]. Dostupný z WWW: <<http://www.fzv.cz/pro-media/tiskove-materialy/starsi-tiskove-materialy/vyznam-tavenych-syru-ve-vyzive/154-vyznam-tavenych-syru-ve-vyzive.aspx>>
- [2] *Firma Gerber - vynálezce tavených sýrů* [online]. [cit. 15.2. 2011]. Dostupný z WWW: <<http://www.laktoscollection.cz/view.php?navez=firma-gerber-vynalezce-tavenych-syru&cisloclanku=2011020001>>
- [3] *Výroba* [online]. [cit. 1.2. 2011]. Dostupný z WWW: <<http://www.salix-syry.cz/2839/vyroba-syru/>>
- [4] KNĚZ, V., *Výroba sýrů*. 2. vydání, Státní nakladatelství technické literatury, Praha 1960.
- [5] BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., Úloha tavicích solí při výrobě tavených sýrů, *Potravinářská revue* č. 1/2009, 13 s.
- [6] AITKEN, A., *Polyphosphates in Fish Processing*, Ministry of agriculture, fisheries and food, TORRY RESEARCH STATION FAO, SIFAR 2001. Dostupný z WWW: <<http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5909E/x5909e01.htm#What%20are%20polyphosphates>>
- [7] BRANEN, A., DAVIDSON, P.M., SALMINEM, S., THORNGATE, J.H., *Food Additives*, New York 2002. ISBN: 0-8247-9343-9.
- [8] FOX, P.F., MCSWEENEY, P.L.H., COGAN, T.M., GUINEE, P. *Cheese. Chemistry Physics and Microbiology. Third edition – Vol. 1: General Aspects*. ISBN 0-1226-3652-X.
- [9] ICMSF. *Microorganisms in food*, 2nd edition. Kluwer Academic & Plenum Publishers, New York, 2005. ISBN: 0-306-48675-X.
- [10] *Milk Protein* – Cornell University [online]. [cit. 2.2. 2011]. Dostupný z WWW: <<http://www.milkfacts.info/Milk%20Composition/protein.htm>>
- [11] K-casein B [online]. [cit. 2.2. 2011]. Dostupný z WWW: <<http://www.testkappa.com/Inglese/K-casein%20B/What%20is%20casein.htm>>

- [12] *Kolloidaless Kalyiumphosphat* [online]. [cit. 2.2. 2011]. Dostupný z WWW: <http://www.testkappa.com/Tedesco/Immagini/Micella_caseina_TED_GRN.JPG>
- [13] *Kasein - Bezpečnost potravin* [online]. [cit. 12.4. 2011]. Dostupný z WWW: <<http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92329>>
- [14] FORMAN, L. a kol. *Mlékárenská technologie II*, VŠCHT Praha 1996, 1. vydání. ISBN 80-7080-214-6.
- [15] *Zajímavosti* [online]. [cit. 15.2. 2011]. Dostupný z WWW: <<http://www.salix-syry.cz/2841/zajimavosti>>
- [16] MOLINS, R.A. *Phosphates in food*, CRC Press, Boca Raton. s. 261, 1999.
- [17] GLASS, K., DOYLE, M.E. *Safety of Processed Cheese*. Food Research Institute, UW / Madison, 2005.
- [18] *Charakteristiky jednotlivých skupin výrobků – mlékárna Kroměříž* [online]. [cit. 12.3. 2011]. Dostupný z WWW: <<http://www.kromilk.cz/cz/kromilk-mlekarna-syry-vyroba-produkce.html>>
- [19] CARÍĆ, M., KALÁB, M. Processed Cheese Products. In Fox, P.H. (Ed.) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, vol. 2, Major Cheese Groups*. 2nd ed. London and New York: Elsevier Applied Science, 1997. s. 467 – 505
- [20] *Češi snědí nejvíce tavených sýrů na světě – Novinky.cz* [online]. [cit. 8.3. 2011]. Dostupný z WWW: <<http://www.novinky.cz/ekonomika/180464-cesi-snedi-nejvice-tavenych-syru-na-svete.html>>
- [21] Vyhláška č. 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje.
- [22] *Codex alimentarius a tavené sýry* [online]. [cit. 14.2. 2011]. Dostupný z WWW: <<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=0&typ=1&val=93723&ids=0&cmo=6&cye=2009>>
- [23] BUŇKA, F. BUŇKOVÁ, L. & KRÁČMAR, S., 2009: *Základní principy výroby tavených sýrů*. Monografie, 69 s., Brno: MZLU
- [24] KADLEC, P. *Technologie potravin II.*, VŠCHT Praha, 2008. ISBN 978-80-7080-510
- [25] BOHÁČ, V. *Výroba tavených sýrů*, Praha 1664, 04-822-64.

- [26] MACKŮ, I. *Viskoelastické a senzorické vlastnosti tavených sýrů a přidavkem pektinu*. Disertační práce, Zlín 2009.
- [27] *Tavené sýry* – Madeta [online]. [cit. 16.2. 2011]. Dostupný na WWW: <http://www.madeta.cz/assets/files/Skola_syru/6.7.charakteristika_syru_madety_taveny_syry.pdf>
- [28] *Tavený sýr Veselá kráva* [online]. [cit. 17.2. 2011]. Dostupný na WWW: <<http://www.akcniceny.cz/detail/taveny-syr-vesela-krava-694079/>>
- [29] *Naše produkty* – Madeta [online]. [cit. 17.2. 2011]. Dostupný na WWW: <<http://www.madeta.cz/cs/produkty-a-sluzby/nase-produkty?c=409&p=13642>>
- [30] *Tavené sýry* [online]. [cit. 17.2. 2011]. Dostupný na WWW: <<http://www.levmilk.sk/index.php?page=2297>> Nutriční význam sýrů
- [31] *Spotřeba potravin a nealkoholických nápojů (na obyvatele za rok)* [online]. [cit. 14.2. 2011]. Dostupný na WWW: <[http://www.czso.cz/csu/2010edicniplan.nsf/t/EA0049D17E/\\$File/30041001.pdf](http://www.czso.cz/csu/2010edicniplan.nsf/t/EA0049D17E/$File/30041001.pdf)>
- [32] *Fosfor* – Beltina [online]. [cit. 1.4. 2011]. Dostupný na WWW: <<http://www.beltina.cz/mineral/fosfor/>>
- [33] NAIDU, A. *Natural Food Antimicrobial Systeme*, Library of Congress Cataloging-Publication Data 2000, 725-739 s., ISBN 0-8493-2047-X
- [34] *Chemie a technologie sloučenin fosforu* [online]. [cit. 25.4. 2011]. Dostupný na WWW: <http://fzp.ujep.cz/ktv/uc_texty/pt1/Chemie_a_technologie_sloucenin_fosforu.pdf>
- [35] NOVÁKOVÁ, A. *Antimicrobial Effects of Linear polyphosphates for Chosen Microorganism*. Diplomová práce, Zlín 2008.
- [36] WINKLEROVÁ, D. *Přidatné látky v potravinách*, 2008. [online]. [cit. 25.12. 2010]. Dostupný na WWW: <<http://www.szu.cz/tema/bezpecnost-potravin/pridatne-latky-v-potravinach-1>>
- [37] Sbíрка zákonů - Zákon č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění a některých souvisejících zákonů.
- [38] KUČERA, J. *Význam mléka a mléčných výrobků ve výživě*. Bakalářská práce, Masarykova univerzita Brno 2008.

- [39] *Fosfát* [online]. [cit. 2.5. 2011]. Dostupný na WWW: <http://fosfat.navajo.cz/>
- [40] GUINEE, T.P., CARIĆ, M., KALÁB, M. *Pasteurized Processed Cheese and Substitute/Imitation Cheese Products*. In Fox, P.F. (Ed.) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. vol. 2, 3rd ed. Elsevier Applied Science, London and New York, 2004. p. 349-394. ISBN 0-1226-3653-8.
- [41] Citrát sodný dihydrát [online]. [cit. 2.5. 2011]. Dostupný na WWW: <http://www.merck-chemicals.com/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/Merck-CZ-Site/cs_CZ/-/EUR/ViewPDF-Print.pdf;sid=nS9WJyaGMELiJ2s7FkVEcI5GTizTOO6SWgBoAIIHuB-71jaanvarHw-BvNtPY6BQVVGEM-GpTizTOPWFGDBo-AIIH?RenderPageType=ProductDetail&CatalogCategoryID=tbSb.s1L7zYAAAEWEeEfVh-TI&ProductUUID=_B.b.s1O8fMAAAEYJzx.Rla4&PortalCatalogUUID=t02b.s1LX0MAAAEWc9UfVhTI>
- [42] Vyhláška č. 4/2008 Sb., kterou se stanoví druhy a podmínky použití přídatných látek a extrakčních rozpouštědel při výrobě potravin.
- [43] *Fosfáty – Bezpečnost potravin* [online]. [cit. 15.12. 2010]. Dostupný na WWW: <<http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92369>>
- [44] LORENCOVÁ, E. *Vliv fosforečnanů na růst vybraných potravinářsky významných bakterií*. Diplomová práce, Zlín 2010, s. 99.
- [45] LEE, M.R., HARTMAN, P.A., STAHR, H.M., OLSON D.G., WILLIAMS F.D. Antibacterial mechanism of long-chain polyphosphates in *Staphylococcus aureus*. *Journal of food protection*, vol. 57, No. 4. Pages 289 – 294, April 1994.
- [46] TEPLÝ, M., MAYERA, A. *Technologie mléčných výrobků*, vydalo SNTL – Nakladatelství technické literatury, počet stran 371, Praha 1981.
- [47] BUŇKA, F., BUŇKOVÁ, L., DOLEŽÁLKOVÁ, I. Mikrobiologie tavených sýrů. *Mlékařské listy* č. 120, 2010.
- [48] LEE M.R., HARTMAN P.A., STAHR H.M., OLSON D.G., WILLIAMS F.D. Antibacterial mechanism of long-chain polyphosphates in *Staphylococcus aureus*. *Journal of food protection*, vol. 57 No. 4. Pages 289 – 294, April 1994.

- [49] SUÁREZ V.B., FRISÓN L., BASÍLIKO M.Z., RIVERA M., REINHEIMER J.A. *Inhibitory activity of phosphate on molds isolated from foods and food processing plants*. Journal of food protection, vol. 68, No. 11, 2005, pages 2475 – 2479.
- [50] *Gram-Positive Versus Gram-Negative Bacterial Cell Walls* [online]. [cit. 5.3. 2011]. Dostupný na WWW: <<http://www.thebrightesthub.com/difference-between-gram-positive-and-gram-negative-bacterial-cell-walls/>>
- [51] ČECHOVÁ, L., JANALÍKOVÁ, M. *Obecná mikrobiologie*. 1. vyd. Zlín: UTB, 2007. ISBN 978 – 80 – 7318 – 516 – 9.
- [52] SWOBODA, J., CAMPBELL, J., MEREDITH, T., WALKER, S., Wall Teichoic Acid Function, Biosynthesis and Inhibition, *ChemBioChem* 2010, vol. 11, 35-45 s. [online]. [cit. 11.3. 2011]. Dostupný na WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2798926/>>
- [53] *Buněčná stěna gramnegativních a grampozitivních bakterií* [online]. [cit. 21.4. 2011]. Dostupný na WWW: <http://www.betalaktamazy.cz/file.php/1/Bunecnastena/bunecna_stena.jpg>
- [54] KNABEL, S.J., WALKER, H.W, HARTMAN, P.A. Inhibition of *Aspergillus flavus* and selected gram-pozitive bacteria by chelation of essential metal cations by polyphosphates. *Journal of food protection*, vol. 54, No. 5, Pages 360 – 365, May 1991.
- [55] BUŇKOVÁ, L., PLEVA, P., BUŇKA, F., VALÁŠEK, P., KRÁČMAR, S. Anti-bacterial effects of commercially available phosphates on selected microorganisms. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* 56: 19-24. 2008.
- [56] AKHTAR, S., PAREDES-SABJA, D., SARKER, M.R. *Inhibitory effects of polyphosphates on Clostridium perfringens growth, sporulation and spore outgrowth*, Food microbiology 25 (2008) 802 – 808.
- [57] MOLINS R.A., KRAFT A.A., AND OLSON D.G. *Effect of phosphates on bacterial growth in refrigerated uncooked bratwurst*. Journal of food science, Vol. 50, 1985.

- [58] BLACKBURN, C.W., MCCLURE, P.J. *Foodborne pathogens Hazards, risk analysis and kontrol: Characteristics of spore-forming bacteria*, CRC Press, Boca Raton, 2002, ISBN 0-8493-1213-2
- [59] TSUKAMOTO, K., MUKAMOTO, M., KOHDA, T., IHARA, H., WANG, X., MAEGAWA, T., NAKAMURA, S., KARASAWA, T., KOZAKI, S. *Characterization of Clostridium butyricum neurotoxin associated with food-borne botulism*, Microbial Pathogenesis 2002; 33: p. 177 – 184 [online]. [cit. 6.4. 2011], Dostupný na WWW: <<http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/epid/accomplishment/paper/Tsuka1.pdf>>
- [60] PAWSEY, R.K. *Case Studies in Food Mikrobiology for Food Safety and Quality*. ISBN 0-85404-626-7, 0 The Royal Society of Chemistry 2002
- [61] ÜRGEOVÁ, B., ŠPANOVÁ, A., RITTICH, B. *Aplikace PCR metod pro identifikaci klostridií*. s. 258 – 262. ISBN 978-80-8105-129-6. [online]. [cit. 6.4. 2011], Dostupný na WWW: <https://www.vutbr.cz/vyzkum-a-vyvoj/publikace?action=detail&pub_id=84180&str=2762>
- [62] ANNIBALLI, F., FENICIA, L., FRANCIOSA, G., Aureli P. *Influence of pH and Temperature on the Growth of and Toxin Production by Neurotoxicogenic Strains of Clostridium butyricum Type E*. Journal of Food Protection, vol. 65, number 8, 2002, pp. 1267-1270.
- [63] BETZ, J.V. *Sheathed Cells in Cultures of Clostridium sporogenes*, Journal of bacteriology, vol. 103, No. 3, 1970, p. 814 – 825. [online]. [cit. 6.4. 2011], Dostupný na WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC248162/?page=1>>
- [64] KUNKEL, D., *Clostridium sporogenes*, 2009, . [online]. [cit. 12.3. 2011], Dostupný na WWW: <http://www.ciriscience.org/ph_157-Clostridium_sporogenes_Copyright_Dennis_Kunkel_Microscopy>
- [65] GREWOOD, D., SLAK, C.B.R., PEUTHERER, J.F. a kol. *Lékařská mikrobiologie – Přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*, Vydal Grada Publishing, spol. s. r. o., Praha 7, 1999, vyd. První.
- [66] *Grampozitivní tyčinky a koky tvořící endospory* - Fakulta veterinárního lékařství Veterinární a farmaceutická univerzita Brno [online]. [cit. 10.3. 2011], Dostupný na WWW:

<http://fv1.vfu.cz/export/sites/fv1/sekce_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie/Gx_ty_cinky.pdf>

- [67] MILIOTIS, M.D., BIER, J.W. *International handbook of foodborne pathogenes*. ISBN: 0-8247-0685-4, New York 2003
- [68] *Bacillus cereus* [online]. [cit. 10.3. 2011], Dostupný na WWW: <<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?prn=1&baf=0&nid=11325&doctype=ART&docid=1000167&chnum=2&inqResults=11357>>
- [69] *Bacillus cereus* [online]. [cit. 10.3. 2011], Dostupný na WWW: <<http://www.microbiologybytes.com/video/Bcereus.html>>
- [70] *Bacteria Genomes - Bacillus Subtilis* [online]. [cit. 9.3. 2011], Dostupný na WWW: <http://www.ebi.ac.uk/2can/genomes/bacteria/Bacillus_subtilis.html>
- [71] *Bacillus subtilis* [online]. [cit. 8.3. 2011], Dostupný na WWW: <<http://www.probiotic.org/bacillus-subtilis.htm>>
- [72] KENNETH, T. *Staphylococcus aureus and Staphylococcal Dinase*, 2011 [online]. [cit. 9.3. 2011], Dostupný na WWW: <<http://textbookofbacteriology.net/staph.html>>
- [73] GARBER, L., SMELTYER, M., FEDORKA-CRAY, P., LADELY, S., KATHLEEN, F. *Salmonella enterica Serotype enteritidis in Table Egg Layer House Environments and in Mice in U.S. Layer Houses and Associated Risk Factors*, *Avian disease* 47:134–142, 2003 [online]. [cit. 11.3. 2011], Dostupný na WWW: <<http://ddr.nal.usda.gov/bitstream/10113/22928/1/IND44149249.pdf>>
- [74] ADAMS, M.R., MOSS, M.O. *Food Mikrobiology*. The Royal Society of Chemistry, 2008, ISBN 978-0-85404-284-5
- [75] *What are Salmonella?* [online]. [cit. 11.3. 2011], Dostupný na WWW: <<http://www.salmonella.org/info.html>>
- [76] *Plate Count Agar Plates* [online]. [cit. 16.3. 2011], Dostupný na WWW: <<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Fluka/Datasheet/00464dat.Par.0001.File.tmp/00464dat.pdf>>
- [77] *Plate count agar - Biokar Diagnostics* [online]. [cit. 16.3. 2011], Dostupný na WWW:

<[http://www.solabia.com/solabia/productsDiagnostic.nsf/0/5F49F476B0956812C12574C700313A31/\\$file/TDS_BK144_BM015_033_v8.pdf](http://www.solabia.com/solabia/productsDiagnostic.nsf/0/5F49F476B0956812C12574C700313A31/$file/TDS_BK144_BM015_033_v8.pdf)>

- [78] *Fluid thioglycollate medium* – Heipha diagnostika [online]. [cit. 16.3. 2011], Dostupný na WWW: http://it.heipha.eu/files/product/it/en-510100d-2-e-0708_Thioglycollate_EP.pdf
- [79] LINTON, H.R., HAPER, N. Survival and growth of foodborne microorganisms in processed and individually wrapped cheese slices. *Journal of Environmental Health* 70(7), 31-37, 2008
- [80] LOESSNER, M.J, MAIER, S.K., SCHIWEK, P., SCHERER, S. Long-chain polyphosphates inhibit growth of *Clostridium tyrobutyricum* in processed cheese spreads. *Journal of food protection*, vol. 60, No. 5, Pages 493 – 498, 1997.
- [81] WAGNER, M.K., BUSTA, F.F. Inhibition of *Clostridium botulinum* 52A toxicity and protease activity by sodium acid pyrophosphate in media systems. *Appl. Environ. Microbiol*, vol. 50, pages 16 - 20, 1985.
- [82] TARR, H.L.A., GARDNER, L.J., INGRAM, P. Pacific cod muscle 5' nucleotidase. *J. Food Sci*, vol. 34, pages 637 – 640, 1969.
- [83] *Siderofory* [online]. [cit. 29.4. 2011], Dostupný na WWW: <<http://lekarske.slovniky.cz/lexikon-pojem/siderofory-1>>
- [84] HVÍZDALOVÁ, I., *Plísňe a potraviny*, 2006 [online]. [cit. 29.4. 2011], Dostupný na WWW: <<http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=13&typ=1&val=45526&ids=3877>>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ATP	adenosintrifosfát
E 338	kyselina fosforečná
E 339 – 343	ortofosforečnany,
E 450 – 452	polyfosforečnany
G+	grampozitivní bakterie
G-	gramnegativní bakterie
SHMP	hexametafosforečnan sodný
TVS	tuku v sušině
DIDI	dihydrát hydrogenfosforečnanu disodného
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
MPB	Masopeptonový bujón
PCA	Plate Count Agar
FTM	Fluid thioglykollate medium
CFU	kolonie tvořící jednotky
SAPP	difosforečnan sodný
TSP	pyrofosforečnan tetrasodný
AMP	adenosinmonofosfátu
UHT	ultra-high temperature

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Kaseinová micela [12].....	12
Obrázek 2. První tavený sýr [2].....	14
Obrázek 3. První tavený sýr vyrobený v ČR [2].....	14
Obrázek 4. Ukázka obalu tavených sýrů s nejdelší dobou minimální trvanlivosti [28]	18
Obrázek 5. Tavené sýry v obalu s dobou použitelnosti 45 dnů [29]	18
Obrázek 6. Ukázka tavených sýrů s nejkratší dobou minimální trvanlivosti [30].....	19
Obrázek 7. Struktura fosfátové skupiny [39].....	22
Obrázek 8. Struktura citranu sodného [41].....	22
Obrázek 9. Buněčná stěna G ⁺ a G ⁻ bakterií [53].....	26
Obrázek 10. Vliv binárních směsí fosforečnanových solí v kombinaci I na růst <i>Bacillus cereus</i> CCM 2010.....	43
Obrázek 11. Vliv binárních směsí fosforečnanových solí v kombinaci II na růst.....	44
Obrázek 12. Vliv binárních směsí fosforečnanových solí v kombinaci I na růst <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> CCM 4062	46
Obrázek 13 Vliv binárních směsí fosforečnanových solí v kombinaci II na růst <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> CCM 4062	46
Obrázek 14. Vliv binárních směsí fosforečnanových solí v kombinaci I na růst <i>Clostridium sporogenes</i> CAPM 6329	48
Obrázek 15. Vliv binárních směsí fosforečnanových solí v kombinaci II na růst <i>Clostridium sporogenes</i> CAPM 6329	48
Obrázek 16. Vliv binárních směsí fosforečnanových solí v kombinaci I na růst <i>Clostridium butyricum</i> CAPM 6342	50
Obrázek 17. Vliv binárních směsí fosforečnanových solí v kombinaci II na růst <i>Clostridium butyricum</i> CAPM 6342	51
Obrázek 18. Vliv binárních směsí fosforečnanových solí v kombinaci I na růst <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953	52
Obrázek 19. Vliv binárních směsí fosforečnanových solí v kombinaci II na růst <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> CCM 3953	53
Obrázek 20. Vliv binárních směsí fosforečnanových solí v kombinaci I na růst <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Enteritidis CCM 4420	55
Obrázek 21. Vliv binárních směsí fosforečnanových solí v kombinaci II na růst <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Enteritidis CCM 4420	55

SEZNAM PŘÍLOH

PŘÍLOHA PI: SUROVINOVÁ SKLADBA

PŘÍLOHA PII: ČLÁNEK V ODBORNÉM RECENZOVANÉM ČASOPISE

PŘÍLOHA P I: SUROVINOVÁ SKLADBA

Příloha PI A: Surovinová skladba pro 50% TVS na 1100 g DIDI:HEXA 2,5:0

Pořadové číslo	Surovina	Množství [kg]	Obsah sušiny [%]	Obsah tuku [%]	Sušinové jednotky	Tukové jednotky
1	Eidamská cihla 30%	0,5500	50,00	15,00	27,500	8,250
2	Tuk	0,1700	82,00	82,00	13,940	13,940
3	Tavicí sůl (DIDI + HEXA)	0,0344	95,00	0,00	3,266	0,000
4	Pitná voda	0,3550	0,00	0,00	0,000	0,000
Součet		1,109			44,706	22,190

Příloha PI B: Surovinová skladba pro 50% TVS na 1100 g DIDI:HEXA 2,1:0,4

Pořadové číslo	Surovina	Množství [kg]	Obsah sušiny [%]	Obsah tuku [%]	Sušinové jednotky	Tukové jednotky
1	Eidamská cihla 30%	0,5500	50,00	15,00	27,500	8,250
2	Tuk	0,1700	82,00	82,00	13,940	13,940
3	Tavicí sůl (DIDI + HEXA)	0,0333	95,00	0,00	3,161	0,000
4	Pitná voda	0,3550	0,00	0,00	0,000	0,000
Součet		1,108			44,601	22,190

Příloha PI C: Surovinová skladba pro 50% TVS na 1100 g DIDI:HEXA 1,7:0,8

Pořadové číslo	Surovina	Množství [kg]	Obsah sušiny [%]	Obsah tuku [%]	Sušinové jednotky	Tukové jednotky
1	Eidamská cihla 30%	0,5500	50,00	15,00	27,500	8,250
2	Tuk	0,1700	82,00	82,00	13,940	13,940
3	Tavicí sůl (DIDI + HEXA)	0,0322	95,00	0,00	3,057	0,000
4	Pitná voda	0,3550	0,00	0,00	0,000	0,000
Součet		1,107			44,497	22,190

Příloha PI D: Surovinová skladba pro 50% TVS na 1100 g DIDI:HEXA 1,3:1,2

Pořadové číslo	Surovina	Množství [kg]	Obsah sušiny [%]	Obsah tuku [%]	Sušinové jednotky	Tukové jednotky
1	Eidamská cihla 30%	0,5500	50,00	15,00	27,500	8,250
2	Tuk	0,1700	82,00	82,00	13,940	13,940
3	Tavicí sůl (DIDI + HEXA)	0,0311	95,00	0,00	2,952	0,000
4	Pitná voda	0,3550	0,00	0,00	0,000	0,000
Součet		1,106			44,392	22,190

EFFECT OF SODIUM PHOSPHATES ON SELECTED FOOD GRADE BACTERIA

Leona Buňková, Eva Lorencová, Dora Jurčová, František Buňka, Stanislav Kráčmar

ABSTRACT

The aim of this study was to examine the inhibitory effect *in vitro* of selected sodium phosphates (under the corporate names Hexa 68, Hexa 70, Trikrystal, FST, Pyro 52, KPS, Didi) on selected gram-positive and gram-negative bacteria. Seven different concentrations of each phosphate were used. Sensitivity of the bacterial strains to phosphates was observed in broth supplemented with salts. *In vitro* was showed a negative effect of various phosphates on growth of selected gram-positive bacteria. Orthophosphates and diphosphates (pyrophosphates) did not have significant inhibitory effect on tested bacteria at neutral pH. With the exception of phosphate Trikrystal has not been found *in vitro* significant inhibitory effects on gram-negative bacteria.

Keywords: gram-positive bacteria, gram-negative bacteria, sodium phosphate, antimicrobial effect

ÚVOD

Antimikrobní účinek fosforečnanů je chápán jako pozitivní vedlejší efekt aplikace těchto solí v potravinách. Inhibiční účinky fosforečnanů jsou popisovány především u gram pozitivních bakterií, některých mikromycet a kvasinek (Buňková et al., 2008; Knabel et al., 1991; Loessner et al., 1997). U gram pozitivních bakterií je inhibiční efekt závislý na délce řetězce (kondenzačním stupni) fosforečnanů. Fosforečnany s delšími řetězci mají lepší inhibiční účinky než fosforečnany s kratšími řetězci (Buňková et al., 2008; Maier et al., 1999; Loessner et al., 1997). Uvedená skutečnost souvisí se strukturou buněčné stěny a schopnosti zvláště polyfosforečnanů vyvazovat dvojmocné kationty (vápenaté a hořečnaté) (Maier et al., 1999; Buňka a Buňková, 2009). Antibakteriální efekt je dán hlavně porušením integrity buněčné stěny, přičemž zároveň dochází ke ztrátě osmoregulace a porušení selektivní permeability cytoplazmatické membrány. Toto působení v konečném důsledku znamená snížení metabolických funkcí vyplývajících z úniku substrátů. Fosforečnanové soli mohou rovněž znemožnit klíčení spor nebo negativně ovlivnit tvar a tvorbu septa při dělení buněk (např. u *Bacillus cereus*) (Matsuoka et al., 1995; Molins, 1991). Antimikrobní účinek fosforečnanů je do značné míry ovlivněn pH. Změna pH, která je indukována přidávkou fosforečnanů, může hrát roli při uplatnění sekvestrační schopnosti.

S rostoucím pH roste i tvorba komplexů. Fosforečnany, které vykazovaly alkalickou reakci v kultivačním médiu, mají vyšší inhibiční kapacitu. Nízká pH totiž způsobují protonizaci vazebných míst, čímž dochází ke znatelnému poklesu žádaného sekvestračního účinku (Molins, 1991; Knabel et al., 1991). Inhibiční účinek fosforečnanů může být znehodnocen působením zářevu, který vyvolává jejich hydrolyzu. Rovněž některé bakterie disponují enzymy, které jsou schopny rozkládat fosforečnanové soli (Molins, 1991). Syrové, tepelně neupravené, potraviny disponují aktivní fosfatázou schopnou štěpit polyfosforečnany na nižší jednotky a zbavovat je tak sekvestračních účinků. Zářevem dochází k její inaktivaci. Proto je pro zachování a maximalizaci inhibičního účinku fosforečnanových solí doporučován ihned po jejich přidání do potravinového výrobku tepelný zářev (Knabel et al., 1991).

Kromě sledování vlivu polyfosforečnanů na růst mikroorganismů v laboratorních podmínkách byly také studovány jejich účinky na mikroorganismy v reálných potravinách. Molins et al. (1985) zjistili, že přidávek fosforečnanů může snížit počet bakterií *Clostridium sporogenes* na skladovaných masných výrobcích. V literatuře jsou rovněž popisovány inhibiční účinky polyfosforečnanů na bakterie, které mohou způsobit kažení mléčných potravin, zejména roziratelých sýrových výrobků. Přidávek polyfosforečnanů u těchto výrobků může zpomalit nebo zabránit růstu nežádoucích bakterií tvořících spory (zejména klostridií), které se mohou podílet na kažení těchto výrobků tvorbou plynu, kyseliny máselné nebo produkci toxinů (Borch a Lycken, 2007; Briozzo et al., 1983; Eckner et al., 1994; Loessner et al., 1997; Varga, 2005).

Cílem práce bylo v podmínkách *in vitro* popsat inhibiční vliv sedmi fosforečnanů v různém kondenzačním stupni na vybrané potravinářsky významné bakterie.

MATERIÁL A METODY

Pro dosažení cílů této práce byly využity následující kmeny bakterií získané z České sbírky mikroorganismů: *Bacillus cereus* CCM 2010, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* CCM 2216, *Citrobacter freundii* CCM 7187, *Enterococcus faecalis* CCM 4224, *Escherichia coli* CCM 3954, *Micrococcus luteus* CCM 732, *Proteus mirabilis* CCM 7188, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis CCM 4420, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CCM 3953. Pro přípravu bakteriální suspenze pro inokulaci k vlastním stanovení inhibičních účinků daných fosforečnanových solí bylo použito masoseptonového bujónu (MPB). Kultivace probíhala při 30 ± 1 °C po dobu 24 hodin.

Za účelem zjištění inhibičních účinků 7 fosforečnanových solí (polyfosforečnany Hexa 68 a Hexa 70, tripolyfosforečnan FST, pyrofosforečnany Pyro 52 a KPS, ortofosforečnany Didi a Trikrystal) byly připraveny jejich 10% (w/v) roztoky, které byly vysterilizovány filtrací. Fosforečnanové soli byly získány z Fosfa a.s., Břeclav-Postorná.

Pro zjištění senzitivity jednotlivých bakteriálních kmenů bylo využito devíti koncentrací každé soli (0,1; 0,2; 0,3;

potravinářstvo

0,4; 0,5; 0,6; 0,75; 1,0; 2,0% w/v). Připravená kultivační média s různou koncentrací fosforečnanů byla dávkována v množství 200 µl do mikrotitrační desičky a zaočkována 5 µl suspenze bakterií. Jako pozitivní kontrola posloužilo kultivační médium bez fosforečnanů, negativní kontrola byla tvořena pouze připravenými MPB s fosforečnany bez bakteriální suspenze.

Testované bakterie byly kultivovány při pokojové teplotě (25 ± 1 °C) za protřepávání po dobu 24 hodin. Bakteriální nárůst, resp. změna optické hustoty, byla měřena na přístroji TECAN Sunrise TW/TC při vlnové délce 600 nm ve 30 minutových intervalech. Z naměřených hodnot optické hustoty byl vypočítán průměr a poté byly sestrojeny růstové křivky (závislost optické hustoty na čase). Sestrojené křivky byly využity ke zjišťování růstových konstant.

VÝSLEDKY A DISKUSE

V experimentu byly provedeny testy na sledování inhibičních účinků sedmi fosforečnanových soli v podmínkách *in vitro* u pěti gram pozitivních (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *M. luteus* a *E. faecalis*) a pěti gram negativních bakterií (*E. coli*, *S. enterica*, *P. mirabilis*, *C. freundii* a *P. aeruginosa*) a to tak, že byl sledován jejich růst po dobu 24 hodin. Testované gram pozitivní a gram negativní bakterie byly vybrány tak, aby zahrnovaly bakterie, které mohou být kontaminanty potravinářských provozů a potravin, popř. bakterie, které mohou způsobovat onemocnění z potravin.

Pokud porovnáme účinky jednotlivých fosforečnanů na *B. cereus* CCM 2010 a *B. subtilis* CCM 2216, je zřejmé, že nejvyšší inhibiční efekt měly soli Hexa 68 a Hexa 70. Důvodem je pravděpodobně vysoký stupeň kondenzace těchto soli. Delší řetězec fosforečnanových soli disponuje zesílenou schopností vyvažovat divalentní kationty kovů a narušit tak integritu buněčných stěn či membrán nebo zasáhnout do metabolismu bakterií (Mollins, 1991). *M. luteus* CCM 732 se jevil jako velmi citlivý na přítomnost polyfosforečnanů Hexa 68 a Hexa

70, kdy již od 0,3% koncentrace byl spolehlivě znemožněn jakýkoliv nárůst. Stejného účinku bylo dosaženo i u soli Pyro 52 (od 0,4 %). Soli Hexa 68, Pyro 52 a Trikrystal od 0,5% obsahu vytvořily nevhodné podmínky pro rozvoj *S. aureus* CCM 3953 (obr. 1). FST znemožnil dělení bakterie při koncentracích 0,75 % a vyšších. Výsledky pyrofosforečnanu se shodují s jedním ze zdrojů, kdy se MIC *S. aureus* pohybuje okolo 0,5 % (Matsuoka et al., 1995).

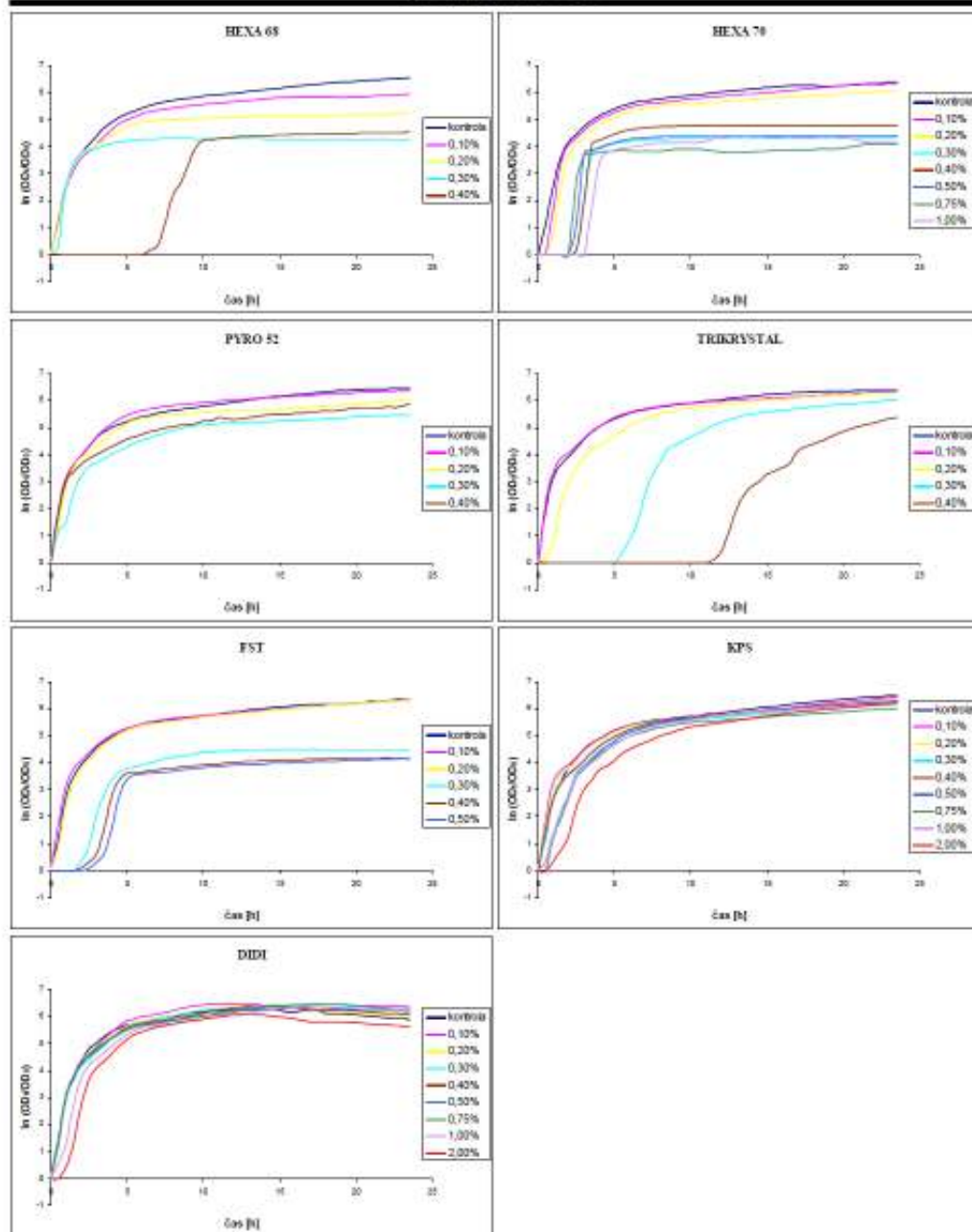
V tabulce 1 jsou shrnuty inhibiční účinky testovaných fosforečnanů na vybrané gram pozitivní a gram negativní bakterie. Výsledky jsou vyjádřeny ve formě minimálních inhibičních koncentrací (MIC), tj. nejnižších koncentrací, které zcela zastavily růst testovaných bakterií.

Sůl Trikrystal svou přítomností posouvala pH kultivačního prostředí do silně alkalické oblasti (pH ~ 11). Ze všech fosforečnanů působila v podmínkách *in vitro* nejvíce inhibičně, a to na 9 z 10 testovaných bakterií. Vliv změny pH v souvislosti s působením alkalického fosforečnanu byl již zkoumán u bakterie *Salmonella* Enteritidis, kdy byl zaznamenán vysoký účinek dané soli od 1,5% obsahu v kultivačním prostředí (Sampathkumar et al. 2003). Nicméně v potravinách lze tuto sůl použít až po následné úpravě pH a lze tedy očekávat výraznější snížení inhibičních účinků. Tuto hypotézu potvrzují i antimikrobní účinky soli Didi, která je stejně jako Trikrystal ortofosforečnan. Po přidavku soli Didi do kultivačního média se pH pohybovalo v rozsahu neutrálních hodnot a tato sůl tak nezpůsobila striktní inhibici ani při nejvyšším aplikovaném množství. Lze se tedy domnívat, že neutrální či mírně zásadité pH (okolo pH 7,5) nepodporí tolik komplexotvornou schopnost fosforečnanů jako silně alkalické prostředí a inhibiční efekt daného fosforečnanu. Obdobné pH jako Didi vytvářela v kultivačním médiu i sůl FST. FST má však delší řetězec, který mohl u většiny gram pozitivních bakterií způsobit podstatně vyšší inhibiční než u fosforečnanu tvořeného jednou monomerní jednotkou.

Tabulka 1: Minimální inhibiční koncentrace fosforečnanových soli u testovaných gram pozitivních a gram negativních bakterií

Sledovaná bakterie	MIC pro danou sůl [%]						
	HEXA 68	HEXA 70	PYRO 52	TRI KRYSTAL	FST	KPS	DIDI
<i>Micrococcus luteus</i>	0,20%	0,40%	0,40%	0,50%	0,30%	>2,00%	>2,00%
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,50%	1,0%	0,50%	0,50%	0,75%	>2,00%	>2,00%
<i>Enterococcus faecalis</i>	2,00%	>2,00%	2,00%	1,00%	2,00%	2,00%	>2,00%
<i>Bacillus cereus</i>	0,40%	0,30%	2,00%	>2,00%	2,00%	>2,00%	>2,00%
<i>Bacillus subtilis</i>	0,50%	0,50%	2,00%	2,00%	>2,00%	>2,00%	>2,00%
<i>Escherichia coli</i>	>2,00%	2,00%	2,00%	0,30%	>2,00%	>2,00%	>2,00%
<i>Salmonella enterica</i>	>2,00%	>2,00%	2,00%	0,30%	>2,00%	>2,00%	>2,00%
<i>Proteus mirabilis</i>	>2,00%	>2,00%	>2,00%	0,40%	>2,00%	>2,00%	>2,00%
<i>Citrobacter freundii</i>	>2,00%	>2,00%	>2,00%	0,75%	>2,00%	>2,00%	>2,00%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>2,00%	>2,00%	>2,00%	0,50%	>2,00%	>2,00%	>2,00%

potravinářstvo



Obrázek 1: Vliv testovaných fosforečnanových solí na růst *Staphylococcus aureus* CCM 3953

Soli Didi a KPS u podstatné většiny testovaných grampozitivních i gramnegativních bakterií nezpůsobily žádný významnější pokles růstu. Výjimkou byl *E. faecalis* CCM 4224, kdy 2% koncentrace KPS v růstovém prostředí zabránila jakémukoliv projevu mikrobiální aktivity této bakterie. U ostatních sledovaných grampozitivních bakterií došlo při této nejvyšší koncentraci k prodloužení doby lag fáze a snížení maximální hodnoty růstu. Důvodem je zřejmě pH, kdy

alkalické hodnoty kultivačního prostředí významně zvyšují komplexotvornou schopnost fosforečnanů (Molins, 1991; Knabel et al., 1991). Polyfosforečnany Hexa 68 a Hexa 70 velmi často efektivně potlačovaly růst u vybraných grampozitivních bakterií při koncentracích do 1%. Většina sledovaných gramnegativních bakterií významněji reagovala na přítomnost těchto solí až při nejvyšších zkoumaných koncentracích (2%), a to většinou pouze zpomalením růstu, úplně inhibice dosaženo nebylo.

Je nutné podotknout, že vyvozené závěry platí pro modelové podmínky *in vitro*. Zvláště pH potravin, do kterých jsou fosforečnany přidávány, může významně ovlivnit antimikrobiální působení fosforečnanů.

ZÁVĚR

V podmínkách *in vitro* bylo prokázáno negativní působení sledovaných fosforečnanů v různém kondenzačním stupni na růstové chování vybraných bakterií. Výjimkou byly soli KPS a DIDI, které se projeví jako nejméně účinné. Výrazně citlivější k přítomnosti fosforečnanových solí byly gram pozitivní bakterie. Inhibiční působení fosforečnanových solí nespočívá jen v délce fetéžce, ale závisí také na pH.

LITERATURA

BORCH, E., LYCKEN, L. 2007. Influence of long-chain polyphosphate and heat treatment on *Clostridium cochlearium* and *Clostridium sporogenes* isolated from processed cheese spread. In *Journal of Food Protection*, vol. 70, 2007, p. 744-747.

BRIOZZO, J., DE LAGARDE, E. A., CHIRIFE, J., PARADA, J. L. 1983. *Clostridium botulinum* type A growth and toxin production in media and process cheese spread. In *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 45, 1983, p. 1150-1152.

BUNKA, F., BUNKOVÁ, L. 2009. Úloha tavících solí při výrobě tavených sýrů. In *Potravinářská revue*, vol. 4, 2009, no. 1, p. 13-16.

BUNKOVÁ, L., PLEVÁ, P., BUNKA, F., VALÁŠEK, P., KRÁČMAR, S. 2008. Antibacterial effects of commercially available phosphates on selected microorganisms. In *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, vol. 56, 2008, p. 19-24.

ECKNER, K. F., DUSTMAN, W. A., RYSRODRIGUEZ, A. A. 1994. Contribution of composition, physicochemical characteristics and polyphosphates to the microbial safety of pasteurized cheese spreads. In *Journal of Food Protection*, vol. 57, 1994, p. 295-300.

KNABEL, S., WALKER, H., HARTMAN, P. 1991. Inhibition of *Aspergillus flavus* and selected Gram-positive bacteria by chelation of essential metal cations by polyphosphates. In *Journal of Food Protection*, vol. 54, 1991, p. 360-365.

LOESSNER, M. J., MAIER, S. K., SCHIWEK, P., SCHERER, S. 1997. Long-chain polyphosphates inhibit growth of *Clostridium tyrobutyricum* in processed cheese spreads. In *Journal of Food Protection*, vol. 60, 1997, p. 493-498.

MAIER, S., SCHERER, S., LOESSNER, M. 1999. Long-chain polyphosphate cause cell lysis and inhibits *Bacillus*

cereus septum formation, which is dependent on divalent cations. In *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, 1999, no. 9, p. 3942-3949.

MATSUOKA, A., TSUTSUMI, M., WATANABE, F. 1995. Inhibitory effect of hexameta-phosphate on the growth of *Staphylococcus aureus*. In *Journal of the Food Hygienic Society of Japan*, vol. 5, 1995, p. 588-594.

MOLINS, R. 1991. *Phosphates in Food*. CRC Press, Inc.

MOLINS, R. A., KRAFT, A. A., WALKER, H. W., OLSON, D. G. 1985. Effect of poly- and pyrophosphates on the natural bacterial flora and inoculated *Clostridium sporogenes* PA 3679 in cooked vacuum packaged bratwurst. In *Journal of Food Science*, vol. 50, 1985, p. 876-880.

SAMPATHKUMAR, B., KHACHATOURIANS, G., KORBER, R. 2003. High pH during trisodium phosphate treatment causes membrane damage and destruction of *Salmonella enterica* ser. Enteritidis. In *Food & Nutrition Press*, vol. 69, 2003, no.1, p. 122-129.

VARGA, L. 2005. Use a long-chain polyphosphate mixture for shelf-life extension of processed cheese spreads. In *Acta Alimentaria*, vol. 34, 2005, p. 493-498.

Acknowledgments:

This study was supported by project MSM7088352101.

Contact address:

Leona Buňková, Department of Fat, Tenside and Cosmetics Technology, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlin, nám. T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlin, Czech Republic, Tel: 00420 576 031 232, E-mail: bunkova@ft.utb.cz

Eva Lorencová, Department of Fat, Tenside and Cosmetics Technology, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlin, nám. T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlin, Czech Republic, E-mail: lorkal@seznam.cz

František Buňka, Department of Food Technology and Microbiology, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlin, nám. T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlin, Czech Republic, E-mail: bunka@ft.utb.cz

Dora Jurčová, Department of Food Technology and Microbiology, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlin, nám. T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlin, Czech Republic, E-mail: d.jurcova@centrum.cz

Stanislav Kráčmar, Department of Food Biochemistry and Analysis, Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlin, nám. T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlin, Czech Republic, E-mail: kracmar@ft.utb.cz

