

VLIV PŘÍDAVKU KONZERVANTŮ NA MIKROBIÁLNÍ KVALITU KONTAMINOVANÝCH HYDROGELŮ

Jitka Peroutková, Markéta Borková, Alexandra Šalaková, Jan Drbohlav, Ladislav Bár

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke Dvoru 12a, 160 00 Praha 6

Effect of preservative addition on the microbial quality of contaminated hydrogels

Abstrakt

Hydrogely lze považovat za významný zdroj vláhy a výživy pro zemědělské plodiny. Jejich využití může být limitováno mikrobiální kontaminací v průběhu skladování. Záměrem této práce bylo vyzkoušet vliv přídavku konzervantů do hydrogelů na bázi karboxymethylcelulózy a kyselé syrovátky na umělou kontaminaci bakteriemi *Bacillus subtilis*, kvasinkami *Kluyveromyces marxianus* a plísněmi *Aspergillus brasiliensis*. Testován byl přírůstek tří konzervantů, a to kyseliny propionové, sorbanu draselného a thymolu. Přírůstek 1 % kys. propionové nebo 1 % sorbanu draselného do hydrogelu snížil počty plísní a kvasinek po týdnu skladování pod mez detekce. Thymol v koncentraci 0,05 % měl podobný účinek u kvasinek, v případě plísní bylo nutné koncentraci zdvojnásobit na 0,1 %. Na bakteriální kmen *B. subtilis* měl samotný hydrogel bez konzervantu mikrobiostatický až mikrobicidní účinek.

Klíčová slova: hydrogel, kyselé syrovátka, mikroorganismy, kvasinky, plísně, konzervanty

Abstract

Hydrogels can be considered a significant source of moisture and nutrients for agricultural crops. However, their use may be limited by microbial contamination during storage. The aim of this study was to test the effect of adding preservatives to hydrogels based on carboxy-

methyl cellulose and acid whey on artificial contamination with the bacterium *Bacillus subtilis*, the yeast *Kluyveromyces marxianus*, and the mold *Aspergillus brasiliensis*. The addition of three preservatives was tested: propionic acid, potassium sorbate, and thymol. The addition of 1% propionic acid or 1% potassium sorbate to the hydrogel reduced mold and yeast counts below the detection limit after one week. Thymol at a concentration of 0.05% had a similar effect on yeasts, but in the case of mold, the concentration had to be doubled to 0.1%. The hydrogel without preservatives exhibited a microbiostatic to microbicidal effect against the *B. subtilis* bacterial strain.

Key words: hydrogel, acid whey, microorganisms, yeasts, mold, preservatives

Úvod

Hydrogely používané v zemědělství mohou fungovat nejenom jako zdroj zadržené vody, ale díky jejich vlastnostem se nabízí obohacení hydrogelů o vhodné živiny, které se mohou postupně uvolňovat do půdy. Využití hydrogelů má velký potenciál v zemědělství zejména s nastupující klimatickou změnou. Limitujícím faktorem pro zmíněné uplatnění a správnou funkčnost hydrogelů je ovšem jejich mikrobiální čistota. Problematická je zejména přítomnost plísní, která narušuje strukturu hydrogelů a způsobuje jejich ztekucení. V našem výzkumu jsme zjistili, že přítomnost plísní na vyšších denzitách způsobuje degradaci hydrogelu a dochází až k jeho úplnému ztekucení (Borková a kol., 2023). Kritickou hodnotou je v tomto ohledu dosažení hodnoty 1×10^3 KTJ/g. Kromě plísní mohou hydrogely tvořit vhodné prostředí také pro růst bakterií a kvasinek.

Proto u hydrogelu vyvíjeného pro komerční aplikace je důležité mít pod kontrolou jeho stabilitu a v případě potřeby použít proti nežádoucím kontaminacím prostředky s konzervačním účinkem. Mezi takové běžné látky s konzervačním účinkem se řadí organické kyseliny a jejich soli a také rostlinné silice. Pro naše experimenty s hydrogelem na bázi kyselé syrovátky a karboxymethylcelulózy byly vybrány tři různé látky s konzervačním účinkem, a to kyselina propionová, sorban draselný a thymol.

Kyselina propionová v čisté formě je bezbarvá olejovitá kapalina s dráždivým zápachem, která je dobře

rozpustná ve vodě i v tucích. Konzervační účinky kyseliny propionové a jejích solí jsou dobře známé a využívány zejména v potravinářském a krmivářském průmyslu, kde například zabraňuje nitkovitosti chleba a využívá se ke konzervaci siláží. Možnosti jejího využití v těchto oblastech dokládá celá řada článků (Antone a kol., 2023; Coblenz a Bertram, 2012). Používání v zemědělské sféře není příliš rozšířené, ale vzhledem k účinným antifungálním vlastnostem kyseliny propionové se jedná o perspektivní záležitost. Rutenberg a kol. (2018) při jejím použití v enkapsulované formě na zrna pšenice zjistili dobrou antifungální aktivitu.

Sorban draselný je bílý krystalický prášek dobře rozpustný ve vodě, který je velmi účinný v potravinách, zejména proti plísním a kvasinkám. Běžně se využívá v potravinářství například při výrobě nealkoholických nápojů, sirupů, pekařských výrobků, majonéz a také v kosmetickém průmyslu. Nachází uplatnění i v zemědělských aplikacích, jako při ošetřování siláží, kde zvyšuje jejich aerobní stabilitu a zamezuje růstu plísní (Knicky a Spöndly, 2009; Bernardes a kol., 2014; Kung a kol., 2018). Vhodný je také jako potenciální fungicid proti plísňovým chorobám rostlin, jako je monilióza a botrytida (Nikolov a Ganchev, 2011; Feliziani a kol., 2014).

Thymol je chemická sloučenina isopropylmethylfenol a přirozená součást éterického oleje v různých specifických částech rostlin, především rostlin z čeledi hluchavkovitých, jako jsou tymián, mateřídouška nebo dobromysl. Z rostlinné silice se extrahuje jako bílá krystalická látka s velmi intenzivní vůní. Thymol má ze složek éterického oleje nejvyšší antimikrobiální a antifungicidní účinek (Marchese a kol., 2016). Díky těmto vlastnostem nachází uplatnění v medicíně, stomatologii, veterinární medicíně, kosmetice a stále více také v oblasti zemědělství v podobě konzervační látky k ošetření semen a následné ochraně rostlin před houbovými chorobami (Escobaras a kol., 2020; Shcherbakova a kol., 2021; Geransay a kol. 2015). Využití thymolu jako konzervační látky může představovat krok k omezení využití syntetických konzervantů.

Cílem našeho výzkumu bylo sledování vlivu výše vybraných konzervačních látek na mikroorganismy, kterými byly hydrogely uměle kontaminované. Jako kontaminující mikroorganismy byly vybrány zástupci bakterií (*B. subtilis*), kvasinek (*K. marxianus*) i plísní (*A. brasiliensis*). Tyto modelové kontaminanty pro testování zemědělských hydrogelů byly vybrány z důvodu své přirozené přítomnosti v půdním, případně mlékařském prostředí a schopnosti produkovat enzymy rozkládající organické polymery (Baron a kol., 2018; Moradi a kol., 2025; Reína-Posso a Gonzales-Zubiate, 2025).

Materiál a metodika

Materiál:

Základní složky použité pro výrobu hydrogelů:

- kyselá syrovátka (Bohušovická mlékárna a.s.; pH 4,57; sušina 5,68 %)

- karboxymethylcelulóza sodná sůl (Blanose, TM cellulose gum purified sodium carboxymethylcellulose, Ashland) dále uváděna jako CMC
- kyselina citrónová bezvodá p.a. (Penta) dále uváděna jako CA
- močovina p.a. (Penta s.r.o.)
- konzervační látky
 - kyselina propionová min. 99,5% (Carl Roth) dále uváděna jako KP
 - sorban draselný p.a. (Lach: Ner) dále uváděn jako S
 - thymol min 99% (Carl Roth) dále uváděn jako T

Mikroorganismy použité k umělé kontaminaci hydrogelů a jejich denzita:

- *Bacillus subtilis* CCM 1999 ve formě želatinového disku
- *Aspergillus brasiliensis* CCM 8222 ve formě želatinového disku
- *Kluyveromyces marxianus* CCDM 259 Laktoflora® nakultivovaná na malt agaru

Před použitím byla ověřena denzita výchozích kmenů. Denzita byla zjištěna rozpuštěním disku v 9 ml fyziologického roztoku, suspenze kvasinek byla získána oplachem fyziologickým roztokem z nakultivované Petriho misky. Zjištěný počet mikroorganismů ve výchozí suspenzi byl pro *B. subtilis* 10^6 KTJ/ml, pro *A. brasiliensis* 10^4 KTJ/ml a pro *K. marxianus* 10^8 KTJ/ml. Na základě zjištěných hodnot bylo dávkováno adekvátní množství suspenze mikroorganismů tak, aby při výrobě byla dosažena denzita mikroorganismů v hydrogelu v rozsahu 10^3 až 10^4 KTJ/g. Kmeny byly do hydrogelů dávkovány v tekuté formě, v případě disků byla vytvořena suspenze jejich rozpuštěním ve fyziologickém roztoku.

Stanovení počtů mikroorganismů:

Stanovení počtů *B. subtilis*, *A. brasiliensis* a *K. marxianus* bylo provedeno metodami a kultivačními podmínkami uvedenými v tabulce 1.

Tab. 1 Metoda stanovení a kultivační podmínky stanovení mikroorganismů

stanovení	metoda stanovení
<i>B. subtilis</i>	GTK agar 30 °C/3 dny (ČSN EN ISO 4833-1)
<i>A. brasiliensis</i>	GKCH agar 25 °C/5 dnů (ČSN ISO 6611)
<i>K. marxianus</i>	GKCH agar 25 °C/5 dnů (ČSN ISO 6611)

Mikrobiologická čistota hydrogelů byla posouzena stanovením celkových počtů mikroorganismů (CPM) dle ČSN EN ISO 4833-1 a stanovením počtu kvasinek a plísní dle ČSN ISO 6611.

Výroba hydrogelu:

Pomocí robotu Thermomix (Vorwerk) byla smíchána kyselá syrovátka s karboxymethylcelulózou a důkladně míchána při 30 °C po dobu 3 hod. Poté bylo do substrátu přidáno síťovací činidlo, tj. kyselina citrónová

Tab. 2 Dávkování konzervantů do hydrogelu, vybraná koncentrace pro umělou kontaminaci mikroorganismů a vliv konzervantů na konzistenci a vzhled hydrogelu

konzervant	forma dávkování	výsledné množství v hydrogelu %	vybraná koncentrace pro kontaminaci %	vliv na konzistenci a vzhled
kyselina propionová	tekutá (neředěný konzervační prostředek)	0,50	–	bez změn
		1,00	KP	bez změn
		2,00	–	bez změn
sorban draselný	sypká	0,25	–	bez změn
		0,50	–	bez změn
		1,00	S	bez změn
thymol	připraveno z 10% líhového roztoku	0,005	–	bez změn
		0,05	T	bez změn
		0,1	2T	bez změn

Pozn.: Po dvou týdnech skladování při laboratorní teplotě 20–25 °C bez výrazných změn

Tab. 3 Kombinace kmenů a konzervantů v hydrogelu

označ. vzorku	popis vzorku
BS-KP	hydrogel s 1% kyseliny propionové a kmenem <i>Bacillus subtilis</i>
BS-S	hydrogel s 1% sorbanu draselného a kmenem <i>Bacillus subtilis</i>
BS-T	hydrogel s 0,05 % thymolu a kmenem <i>Bacillus subtilis</i>
BS	hydrogel bez konzervantu s kmenem <i>Bacillus subtilis</i>
KM-KP	hydrogel s 1% kyseliny propionové a kmenem <i>Kluyveromyces marxianus</i>
KM-S	hydrogel s 1% sorbanu draselného a kmenem <i>Kluyveromyces marxianus</i>
KM-T	hydrogel s 0,05 % thymolu a kmenem <i>Kluyveromyces marxianus</i>
KM	hydrogel bez konzervantu s kmenem <i>Kluyveromyces marxianus</i>
AB-KP	hydrogel s 1% kyseliny propionové a kmenem <i>Aspergillus brasiliensis</i>
AB-S	hydrogel s 1% sorbanu draselného a kmenem <i>Aspergillus brasiliensis</i>
AB-T	hydrogel s 0,05 % thymolu a kmenem <i>Aspergillus brasiliensis</i>
AB-2T	hydrogel s 0,1 % thymolu a kmenem <i>Aspergillus brasiliensis</i>
AB	hydrogel bez konzervantu s kmenem <i>Aspergillus brasiliensis</i>
KP	hydrogel s 1% kyseliny propionové
S	hydrogel s 1% sorbanu draselného
T	hydrogel s 0,05 % thymolu

s močovinou (přídavek 3 g CA a 2 g M na 100 g gelu, pH základního hydrogelu 3,32) a gel byl intenzivně míchán po dobu 10 min. Gel byl ponechán 24 hod v termostatu při 30 °C.

Do připraveného základního hydrogelu o složení 92 % kys. syrovátky, 3 % CMC, 3 % CA a 2 % močoviny byly přidány konzervační látky ve formě uvedené v tabulce 2. Koncentrace konzervačních přípravků (tab. 2) pro kyselinu propionovou a sorban draselný byly nastaveny dle potravinářské legislativy, tj. NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 1129/2011, dávky thymolu byly zvoleny dle Marchese a kol. (2016). Gel byl opět 10 minut míchán. Takto připravené hydrogely byly rozplněny po 50 ml do vzorkovnic a ponechány 24 hodin v termostatu při 30 °C. Po 24 hodinách byly do vzorkovnic nadávkovány a důkladně rozmíchány kontaminující mikroorganismy.

Skladování:

Testován byl vliv tří konzervačních látek ve vybraných koncentracích (tab. 2) na tři kmeny mikroorganismů. Současně byla realizovaná kontrola růstu mikroorganismů v kontaminovaném hydrogelu bez přídavku konzervační látky. Sledována byla i mikrobiální čistota nekontamino-

vaných hydrogelů obsahujících pouze konzervační látky, a to z důvodu vyloučení vlivu potenciální kontaminace mikroorganismy z prostředí v průběhu výroby/skladování. Tab. 3 popisuje testované kombinace. Všechny vzorky byly připraveny dvakrát pro paralelní stanovení (označeno jako 1 a 2). Hydrogely byly skladovány při pokojové teplotě týden, měsíc, 3 měsíce a 6 měsíců od výroby a stanoveny byly počty mikroorganismů na příslušné živné půdě (tab. 1).

Výsledky a diskuse

Na začátku experimentu při výběru vhodné koncentrace konzervantu byl hodnocen vliv různých dávek konzervačních látek na konzistenci a vzhled hydrogelu. Všechny hydrogely s konzervanty byly po 2 týdnech skladování při teplotě 20–25 °C bez výrazných změn, tj. byly kompaktní, pružné a bez uvolňování tekutiny (tab. 2). Pro vlastní pokus byly vybrány následující koncentrace konzervačních látek v hydrogelu: 1 % sorbanu draselného, 1 % kyseliny propionové a 0,05 % thymolu. Testovány byly umělé kontaminace kmeny *Bacillus subtilis* CCM 1999, *Aspergillus brasiliensis* CCM 8222, *Kluyveromyces marxianus* CCDM 259.

Po celou dobu skladování kontaminovaných hydrogelů byla navíc sledována mikrobiologická čistota hydrogelů vyrobených s přídavkem konzervantů, ale bez umělé kontaminace mikroorganismy. Jednalo se o vzorky hydrogelů, které byly následně pro experiment uměle kontaminovány, a tímto krokem byla sledována jejich

Tab. 4 Čistota hydrogelů s konzervanty v průběhu skladování – CPM, plísňe a kvasinky

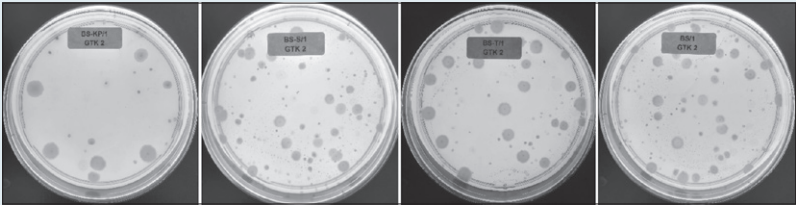
varianta	CPM (log KTJ/g)			
	1. týden	1. měsíc	3. měsíc	6. měsíc
KP	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
S	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
T	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
varianta	kvasinky (log KTJ/g)			
	1. týden	1. měsíc	3. měsíc	6. měsíc
KP	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
S	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
T	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
varianta	plísňe (log KTJ/g)			
	1. týden	1. měsíc	3. měsíc	6. měsíc
KP	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
S	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
T	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

Pozn.: Výsledek je ze dvou paralelních stanovení.

Tab. 5 Počty bakterie *B. subtilis* v průběhu skladování

varianta	<i>B. subtilis</i> (log KTJ/g)			
	1. týden	1. měsíc	3. měsíc	6. měsíc
BS-KP	3,43 ± 0,11	2,83 ± 0,03	< LOQ	< LOQ
BS-S	4,08 ± 0,00	3,75 ± 0,21	3,28 ± 0,37	< LOQ
BS-T	3,99 ± 0,01	3,62 ± 0,03	1,52 ± 0,52	< LOQ
BS	4,07 ± 0,07	4,14 ± 0,22	1,94 ± 0,20	< LOQ

Pozn.: Výsledky jsou průměrem ze dvou stanovení ± směrodatná odchylka
< LOQ hodnota pod limitem detekce



Obr. 1 Výskyt *B. subtilis* v hydrogelech s různými konzervanty po týdnu skladování (zleva kyselina propionová, sorban draselný, thymol, kontrola bez konzervantu)

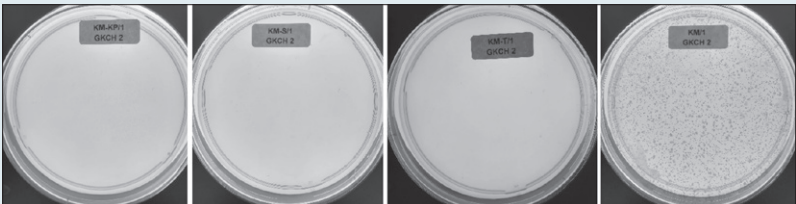
mikrobiologická čistota. Sledovány byly celkové počty mikroorganismů, počty kvasinek a plísní. Přítomnost těchto mikroorganismů nebyla detekována (tab. 4), čímž bylo potvrzeno, že výroba hydrogelů probíhala za aseptických podmínek a v průběhu jejich skladování nedošlo k nežádoucí kontaminaci divokými druhy mikroorganismů.

Při umělé kontaminaci hydrogelu kmenem *B. subtilis* bylo zjištěno, že samotný hydrogel bez konzervační látky má mikrobistatický až mikrobicidní vliv na daný kmen. Počty *B. subtilis* v průběhu skladování stagnují a po delším skladování významně klesají (vzorek BS, tab. 5). Je zřejmé, že kyselý a silně viskózní hydrogel danému kmenu neposkytuje vhodné podmínky pro růst. Zkoumaný vliv konzervantů na umělou kontaminaci hydrogelu bakteriálním kmenem *B. subtilis* je patrný z tabulky 5. Je zřejmé, že při použití kyseliny propionové se

Tab. 6 Počty kvasinky *K. marxianus* v průběhu skladování

varianta	<i>K. marxianus</i> (log KTJ/g)			
	1. týden	1. měsíc	3. měsíc	6. měsíc
KM-KP	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
KM-S	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
KM-T	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
KM	5,97 ± 0,21	7,31 ± 0,01	6,79 ± 0,14	6,58 ± 0,38

Pozn.: Výsledky jsou průměrem ze dvou stanovení ± směrodatná odchylka
< LOQ hodnota pod limitem detekce



Obr. 2 Inhibice *K. marxianus* v hydrogelech s různými konzervanty po týdnu skladování (zleva kyselina propionová, sorban draselný, thymol, kontrola bez konzervantu)

po týdenním skladování projevil větší pokles počtu *B. subtilis*, a to přibližně o 1 řád v porovnání s kontrolou (vzorek BS). Sorban draselný ani thymol počty *B. subtilis* po týdnu skladování neovlivnily. Vliv jednotlivých konzervantů na růst kmene *B. subtilis* po týdenním skladování je zachycen na Obrázku 1. Po měsíci skladování byl patrný vliv všech tří konzervantů na pokles počtu *B. subtilis* v porovnání s kontrolou s tím, že nejvýraznější pokles byl zaznamenán opět při použití kyseliny propionové. Další pokles *B. subtilis* byl zjištěn vlivem konzervantů po 3 měsících skladování, kdy navíc byl zachycen i patrný pokles počtu *B. subtilis* v kontrolním vzorku (BS). Na konci skladovacího pokusu, tedy po 6. měsících, se dostaly počty *B. subtilis* u všech hydrogelů pod hranici detekce daného kmene, a to včetně kontaminované kontroly.

Při sledování umělé kontaminace hydrogelů kvasinkami *K. marxianus* bylo zjištěno, že hydrogely na bázi karboxymethylcelulózy a kyseliny citrónové s močovinou představují pro kvasinky vhodné prostředí. Kvasinky si zachovávají viabilitu a rozmnožují se. Což je prokázáno výsledky u kontrolního vzorku bez přídavku konzervantu (vzorek KM, tab. 6), kde i po půl roce skladování jsou počty kvasinek >10⁶ KTJ/g. Použití všech typů konzervačních látek způsobilo už po 1. týdnu skladování pokles kvasinek pod mez detekce. Tento stav byl neměnný až do konce doby skladování. Inhibiční vlastnosti vybraných konzervantů po 1 týdnu skladování zachycuje obrázek 2.

V našem předchozím výzkumu bylo zjištěno (Borková a kol., 2023), že kontaminace hydrogelů plísními je pro jejich údržnost důležitým kritériem. Snahou je držet plísně pod problematickou hranicí 10³ KTJ/g, kdy dochází k narušení síťovité struktury hydrogelu a tím pádem ke změnám v jeho konzistenci, což vede až ke ztekucení gelu a tím následně znehodnocení funkce zádrže vody. Počty plísní *A. brasiliensis* v uměle kontaminovaném vzorku hydrogelu bez konzervantu v průběhu skladování mírně rostly od hodnot 10² až do 10⁴ KTJ/g na konci skladování (tab. 7). Po měsíci došlo u těchto hydrogelů k nárůstu plísní nad 10⁴ KTJ/g, tedy nad kritickou hodnotu a k jejich úplnému ztekucení. Zjištěno bylo, že plíseň *A. brasiliensis* je velmi citlivá na působení použité koncentrace kyseliny propionové a sorbanu draselného. Po týdnu skladování kontaminovaného hydrogelu s konzervantem byl zaznamenán pokles pod hranici detekce <1 x 10¹ KTJ/g (viz obrázek 3). Konzervace hydrogelu 0,05 % thymolem (vzorek AB-T) způsobila po týdnu skladování pokles plísní

Tab. 7 Počty plísňe *A. brasiliensis* v průběhu skladování (hodnoty získané ze dvou paralelních měření)

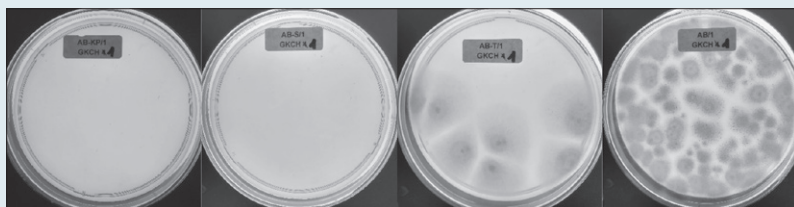
varianta	<i>A. brasiliensis</i> (log KTJ/g)			
	1. týden	1. měsíc	3. měsíc	6. měsíc
AB-KP	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
AB-S	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
AB-T	1,76 ± 0,11	0,85 ± 0,15*	0,85 ± 0,15*	0,85 ± 0,15*
AB-2T	0,85 ± 0,15*	< LOQ	< LOQ	< LOQ
AB	2,96 ± 0,04	4,02 ± 0,16	3,30 ± 0,10	4,07 ± 0,07

Pozn.: Výsledky jsou průměrem ze dvou stanovení ± směrodatná odchylka

< LOQ hodnota pod limitem detekce

* Hodnoty pod mezí kvantifikace (<10 KTJ/g) byly pro účely výpočtu nahrazeny hodnotou 5 KTJ/g (tj. LOQ/2) podle běžné laboratorní praxe.

† Zaznamenáno narušení struktury hydrogelu po týdnu skladování: vzorek je mírně tekutý, od měsíce skladování je vzorek zcela tekutý.

**Obr. 3** Inhibice *A. brasiliensis* v hydrogelech s různými konzervanty po týdnu skladování (zleva kyselina propionová, sorban draselný, 0,05 % thymol, kontrola bez konzervantu)

přibližně o 1,5 řádu v porovnání s kontrolou. Detekovány byly velmi nízké počty v řádu 10^1 KTJ/g, které byly v průběhu dalšího skladování sníženy až na, resp. pod hranici detekce.

Protože považujeme kontaminaci hydrogelu plísněmi za velmi problematickou, byl dodatečně testován i přídatek dvojnásobného množství thymolu 0,1 % (AB-2T). Touto zvýšenou koncentrací bylo již po týdnu skladování dosaženo snížení počtu plísní na, resp. pod hranici detekce plísní.

V průběhu skladování výše zkoumaných hydrogelů bylo provedeno i jejich senzorické a vizuální hodnocení. Všechny konzervované a nekonzervované hydrogely s umělou kontaminací *B. subtilis* a *K. marxianus* neprokazovaly po celou dobu skladování významné změny. Jedinou výjimkou byl kontrolní hydrogel bez konzervační látky s plísní *A. brasiliensis* (AB). Tento vzorek již týden po výrobě vykazoval mírné ztekucení gelové struktury a tvorbu žlutého mycelia. K úplnému ztekucení hydrogelů došlo po 1 měsíci skladování (viz tab. 7). Zjištěné výsledky plně korespondují s detekovanými počty plísní v tomto vzorku.

Závěr

Hydrogel na bázi kyselé syrovátky a karboxymethylcelulózy síťovaný kyselinou citrónovou a močovinou je rizikový zejména z hlediska kontaminace kvasinkami a plísněmi. Počty kvasinek *K. marxianus* a plísní *A. brasiliensis* si zachovávají viabilitu a rozmnožují se. Umělá kontaminace plísní *A. brasiliensis* při počtech téměř 10^3 KTJ/g po týdnu skladování způsobovala změny v gelové struktuře hydrogelu. Použití 1 % kyseliny pro-

pionové, příp. 1 % sorbanu draselného jako konzervantu snížilo umělou kontaminaci hydrogelu plísněmi *A. brasiliensis* a kvasinkami *K. marxianus* pod mez detekce již po týdnu skladování. Thymol ve zvolené koncentraci 0,05 % byl stejně účinný jako ostatní testované konzervanty na redukci počtu kvasinek, v případě plísní bylo nutné koncentraci zdvojnásobit na 0,1 %.

Testovaný typ hydrogelu bez konzervačních látek není vhodným prostředím pro růst bakterie *B. subtilis* a má mikrobistatické až mikrobicidní účinky. Použité konzervanty v porovnání s kontrolou snižovaly počty *B. subtilis* pouze nepatrně. Největší konzervační potenciál na redukci *B. subtilis* prokázala kyselina propionová.

Tato práce byla uskutečněna za finanční podpory Ministerstva zemědělství při řešení institucionální podpory MZE-RO1425 a projektu QK1910392.

Literatura:

- ČSN EN ISO 4833-1 (2014): Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C, ÚNMZ, Praha.
- ČSN ISO 6611 (2009): Mléko a mléčné výrobky – Stanovení počtu jednotek vytvářejících kolonie kvasinek a/nebo plísní – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 25 °C. ÚNMZ, Praha.
- ANTONE U., CIPROVICA I., ZOLOVS M., SCERBAKA R., LIEPINS J. (2023): Propionic Acid Fermentation—Study of Substrates, Strains, and Antimicrobial Properties. *Fermentation*, 9, (26), s. 1–21.
- BERNARDES T.F., DE OLIVEIRA I.L., LARA M.A.S., CASAGRANDE D.R., ÁVILA C.L.S., PEREIRA O.G. (2014): Effects of potassium sorbate and sodium benzoate at two application rates on fermentation and aerobic stability of maize silage. *Grass Forage Sci.*, 70, (3), s. 491–498.
- BARON N.C., COSTA N.T.A., MOCHI D.A., RIGOBELLO E.C. (2018): First report of *Aspergillus sydowii* and *Aspergillus brasiliensis* as phosphorus solubilizers in maize. *Ann Microbiol.*, 68, s. 863–870.
- BORKOVÁ M., PEROUTKOVÁ J., ŠALAKOVÁ A., DRBOHLAV J., DUŘPEKOVÁ S., ČECHMÁNKOVÁ J., BĀR L. (2023): Hydrogely na bázi karboxymethylcelulózy a kyselé syrovátky s přídatkem zemědělských hnojiv. *Mlékařské listy* 200, 34, (5), s. 11–17.
- COBLENTZ W. K., BERTRAM M. G. (2012): Effects of a propionic acid-based preservative on storage characteristics, nutritive value, and energy content for alfalfa hays packaged in large round bales. *J. Dairy Sci.*, 95, (1), s. 340–352.
- ESCOBAR A., PEREZ M., ROMANELLI G., BLUSTEIN G. (2020): Thymol bioactivity: A review focusing on practical applications. *Arab. J. Chem.*, 13, (12), s. 9243–9269.
- FELIZIANI E., ROMANAZZI G., MARGOSAN D.A., MANSOUR M.F., SMILANICK J.L., GU S., GOHIL H.L., AMES Z.R., LICHTER A. (2014): Effect of field treatments with fungicide, potassium sorbate, or chitosan on postharvest rots and quality of table grapes. *Acta Horticulturae*, 1053, (28), s. 257–264.
- GERANSAYEH M., SEPAHVAND S., ABDOSSI V., NEZHAD R.A. (2015): Effect of thymol treatment on decay, postharvest life and quality of strawberry (*Fragaria ananassa*) Fruit cv. 'Gaviota. *JAAAR*, 6, (4), s. 151–162.
- KNICKY M., SPÖRNDLY R. (2009): Sodium benzoate, potassium sorbate and sodium nitrite as silage additives. *J. Sci. Food Agric.*, 89, (15), s. 2659–2667.

- KUNG. L., SMITH M.L., DA SILVA E.B., WINDLE M.C., DA SILVA T.C., POLUKIS S.A. (2018): An evaluation of the effectiveness of a chemical additive based on sodium benzoate, potassium sorbate, and sodium nitrite on the fermentation and aerobic stability of corn silage. *J. Dairy Sci.*, 101, (7), s. 5949–5960.
- MORADI S., HOSSEINI M., BERDIMURODOV E. (2025): The potential of *Bacillus subtilis*: innovative applications in energy harvesting and bio-sensing technologies. *Microchem. J.*, 216: 114633.
- MARCHESE. A., ORHAN I.E., DAGLIA M., BARBIERI R., DI LORENZO A., NABAVI S.F., GORTZI O., IZADI M., NABAVI S.M. (2016): Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chem.*, 210, s. 402–414.
- NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 1129/2011 ze dne 11. listopadu 2011, kterým se mění příloha II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 vytvořením seznamu potravinářských přídatných látek Unie.
- NIKOLOV A., GANCHEV D. (2011): In vitro antifungal examination of potassium sorbate towards some phytopathogenes. *Bulg. J. Agric. Sci.*, 17, (2), s. 191–194.
- REINA-POSSO D., GONZALES-ZUBIATE F.A. (2025): Expanding Horizons: The Untapped Potential of *Kluyveromyces marxianus* in Biotechnological Applications. *Ferment.*, 11: 98.
- RUTENBERG R., BERNSTEIN S., FALLIK E., PASTER N., POVERENOV E. (2018): The improvement of propionic acid safety and use during the preservation of stored grains. *Crop Protection*, 110, s. 191–197.
- SHCHERBAKOVA L., MIKITYUK O., ARSLANOVA L., STAKHEEV A., EROKHIN D., ZAVRIEV S., DZHAVAKHIYA V. (2021): Studying the Ability of Thymol to Improve Fungicidal Effects of Tebuconazole and Difenoconazole Against Some Plant Pathogenic Fungi in Seed or Foliar Treatments. *Front. Microbiol.*, 12, s. 1–13.

Korespondující autor: Ing. Markéta Borková, Ph.D.
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke Dvoru 12a,
160 00 Praha 6, e-mail: borkova@milcom-as.cz

Přijato do tisku: 28. 7. 2025

Lektorováno: 22. 9. 2025

LYSOZYM A JEHO VÝZNAM V MLÉKAŘSTVÍ

**Hana Nejeschlebová^{1,2}, Oto Hanuš¹, Marcela Klimešová¹,
Eva Samková², Lucie Hasoňová², Lenka Vorlová³,
Klára Bartáková³, Pavlína Navrátilová³**

¹ Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

² Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
Fakulta zemědělská a technologická

³ Veterinární univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny
a ekologie

Lysozyme and its role in dairy production

Abstrakt

Lysozym je ubikvitární enzym s významnou antibakteriální aktivitou, který se vyskytuje u lidí, zvířat i rostlin. V mléce savců plní důležitou roli v nespecifické imunitní obraně, podporuje rozvoj střevní mikrobioty a chrání mléčnou žlázu před infekcí. Vysoké koncentrace lysozymu jsou přítomny v lidském, oslím, kobyším

a velbloudím mléce, zatímco v kravském, kozím a ovčím se nachází jen ve stopovém množství. V mlékárenské praxi se lysozym využívá především při výrobě sýrů jako přírodní konzervant, který inhibuje růst klostridií způsobujících pozdní duření. Přestože byly vyvinuty různé metody stanovení obsahu lysozymu, efektivní rutinní diagnostika v kravském mléce zůstává výzvou. Potenciální využití geneticky modifikovaných zvířat produkujících mléko s vyšším obsahem lysozymu otevírá možnosti pro inovace v kojenecké výživě a mlékárenské technologii.

Klíčová slova: lysozym, mléko, imunita, mastitida, mlékárenské zpracování, metody detekce

Abstract

Lysozyme is a ubiquitous enzyme with strong antibacterial activity, present in humans, animals, and plants. In mammalian milk, it plays an essential role in non-specific immune defense, supports intestinal microbiota development, and protects the mammary gland from infection. While human, donkey, mare, and camel milk contain high concentrations of lysozyme, only trace amounts are found in cow, goat and sheep milk. In dairy processing, lysozyme is primarily used as a natural preservative in cheese production to inhibit the growth of *Clostridium* species responsible for late blowing defects. Although various methods for lysozyme determination have been developed, efficient routine diagnostics in bovine milk remain challenging. The potential application of genetically modified animals producing milk with higher lysozyme concentrations offers new opportunities for infant nutrition and dairy technology.

Keywords: lysozyme, milk, immunity, mastitis, dairy processing, detection methods

Úvod

Před více než sto lety skotský lékař Alexander Fleming (1922) pozoroval, že kapka nosního sekretu způsobuje lyzi koků *Kocuria rhizophila* (dříve *Micrococcus lyso-deikticus*). Následnými pokusy zjistil, že látka s lytickou aktivitou je přítomna nejen v dalších lidských tělních tekutinách (krevní sérum, sliny, sputum, slzy, peritoneální tekutina, sperma, semenná tekutina či hnis) a tkáních, ale také u jiných savců (pes, králík, morče), ve slepičím bílku a dokonce i u rostlin (tuřín). Fleming tuto látku pojmenoval jako lysozym.

Dnes je lysozym znám jako ubikvitární enzym vyskytující se u lidí, zvířat, rostlin, hub, bakterií i bakteriofágů (Ghosh a kol., 2018). Strukturou se jedná o malý monomerní protein, stabilizovaný čtyřmi disulfidickými můstky mezi osmi cysteinovými zbytky svého řetězce (Canfield a Liu, 1964). Na základě rozdílů v primární a terciární struktuře byly u živočichů identifikovány tři hlavní typy lysozymu, typ c (kuřecí – chicken), typ g (husí – goose) a typ i (bezobratlí – invertebrate). Lysozym typu c se