

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav agrochemie, půdoznalství, mikrobiologie a výživy rostlin



Mikroflóra kysaných mléčných výrobků
Bakalářská práce

Vedoucí práce:
Ing. Libor Kalhotka, Ph.D.

Vypracoval:
Tomáš Horňák, DiS

Brno 2017

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Mikroflóra kysaných mléčných výrobků vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom/a, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis

Poděkování:

Děkuji mému vedoucímu práce, Ing. Liboru Kalhotkovi, Ph.D. za vstřícný přístup, připomínky, a odborný dohled při psaní mé bakalářské práce a při vykonávání praktické části práce.

Abstrakt

Kysané mléčné výrobky jsou produkty vyrobené z mléka, pomocí fermentace bakteriemi mléčného kvašení. Tato fermentace se nazývá mléčné kvašení a jejím hlavním výsledkem je přeměna laktózy na kyselinu mléčnou. Současně dle typu mléčné fermentace, použitých bakterií a podmínek kvašení vznikají i různé další látky, které mají sensorický či nutriční význam. Mezi nejdůležitější výrobky patří jogurty a jogurtová mléka, smetanové zákysy, acidofilní mléka a keфіry a keфіrová mléka. Tato bakalářská práce pojednává zejména o jejich mikroflóře, a to jak té nejdůležitější, která je potřeba pro vlastní výrobu, tak i o různých mikroorganismech nežádoucích či patogenních a jejich vlivech na finální výrobek.

Praktická část práce se soustředí na mikroflóru vybraných keфіrů a porovnává výsledky s platnou legislativou.

Klíčová slova:

Kysané mléčné výrobky, bakterie, mikroflóra, kyselina mléčná

Abstract

Fermented dairy products are made from milk fermentation, using lactic acid bacteria. This fermentation is called lactic acid fermentation and its main result is the conversion of lactose into lactic acid. Simultaneously, according to the type of lactic acid fermentation, bacteria used, and fermentation conditions, various substances with sensory and nutritional significance are made. The most important fermented daily products include yoghurt and yoghurt milk, fermented cream, acidophilus milk and kefir and kefir milk. This thesis is mainly about mikroflora of this products, both the most important that are required for production, as well as variety of undesirable microorganisms and pathogens and their influence on the final product.

The practical part focuses on the mikroflora of selected kefir and compares results with the current legislation.

Keywords:

Fermented dairy products, bacteria, mikroflora, lactic acid

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Cíl práce.....	8
3	Literární přehled	9
3.1	Historie výroby kysaných mléčných výrobků.....	9
3.2	Význam pro zdraví a výživu	9
3.3	Požadavky na mléko pro kysané mléčné výrobky	12
3.4	Čisté mlékařské kultury.....	12
3.4.1	Kefírová kultura.....	13
3.4.1.1	Kefírová zrna	16
3.4.2	Jogurtová kultura	16
3.4.3	Smetanová kultura	17
3.4.4	Acidofilní kultura.....	17
3.4.5	Probiotická kultura.....	18
3.5	Legislativa	19
3.5.1	Mikrobiologické požadavky	19
3.5.2	Ostatní požadavky.....	20
3.6	Druhy a charakteristika kysaných mléčných výrobků	20
3.6.1	Kysané mléčné výrobky se symbiózou bakterií a kvasinek	20
3.6.1.1	Kefír.....	20
3.6.1.2	Kefírová mléka	21
3.6.1.3	Kumys.....	21
3.6.1.4	Ostatní výrobky se symbiózou bakterií a kvasinek	22
3.6.2	Kysané mléčné výrobky s jogurtovou kulturou.....	22
3.6.2.1	Jogurt	22
3.6.2.2	Ostatní výrobky s jogurtovou kulturou.....	23
3.6.3	Kysané mléčné výrobky s využitím mezofilních kultur	23
3.6.4	Acidofilní mléka	23
3.7	Vady kysaných mléčných výrobků	24
3.7.1	Vady způsobené mikroorganismy	24
3.7.1.1	Kefír.....	24
3.7.1.2	Jogurty	25
3.7.1.3	Ostatní kysané mléčné výrobky.....	25
3.7.2	Vady způsobené bakteriofágy.....	26
3.7.3	Vady technologické	26
3.8	Patogenní mikroorganismy	26

3.8.1	<i>Salmonella</i> spp.....	27
3.8.2	<i>Shigella</i> spp.....	28
3.8.3	<i>Yersinia enterocolitica</i>	28
3.8.4	<i>Escherichia coli</i>	28
3.8.5	<i>Listeria monocytogenes</i>	30
3.8.6	<i>Staphylococcus aureus</i>	30
3.8.7	<i>Clostridium</i> spp.....	31
3.8.8	<i>Bacillus cereus</i>	31
3.8.9	Mikromycety.....	32
3.8.10	Ostatní patogenní mikroorganismy.....	33
3.9	Prevence vad a výskytu nežádoucích mikroorganismů.....	33
4	Materiál a metodika.....	35
4.1	Analyzovaný materiál.....	35
	Domácí kefír.....	35
	Originální kefír z Krasolesí.....	35
	Kozí kefír (farma Zahrádka).....	35
	BIO Kozí kefír (kozí farma Pěňčín).....	36
4.2	Kultivační půdy.....	36
4.3	Vlastní mikrobiologická analýza.....	39
5	Výsledky a diskuze.....	40
6	Závěr.....	44
7	Použité zdroje.....	45

1 ÚVOD

Kysané (fermentované) mléčné výrobky jsou výrobky z mléka, připravené pomocí fermentace čistými mlékařskými kulturami obsahujícími bakterie mléčného kvašení, a v některých případech i kvasinky. Kvasinky jsou zejména součástí čistých mlékařských kultur pro výrobu kefíru a keřírového mléka. Vzhledem k náplni praktické části této práce byla keříru věnována větší pozornost i v části teoretické.

Mléčná fermentace neboli mléčné kvašení je proces, při kterém bakterie fermentují jednoduché sacharidy na kyselinu mléčnou. U mléka je tímto sacharidem laktóza. Vedle kyseliny mléčné mohou vznikat v menším množství také některé vedlejší produkty.

Bakterie mléčného kvašení poté zůstávají i ve finálním výrobku, který není nijak tepelně upravován, a dále ho i při nízkých skladovacích teplotách prokysávají. Mezi nejčastější bakterie mléčného kvašení patří rody *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* či *Streptococcus*. Kromě bakterií mléčného kvašení může mikroflóra těchto výrobků obsahovat i jiné, nežádoucí mikroorganismy, a to různé kontaminující mikroorganismy z prostředí, které mohou způsobit kažení (např. kvasinky) nebo i některé patogenní mikroorganismy (*Staphylococcus aureus*, *Listeria*). Ve finálním výrobku mohou také přežít některé mikroorganismy z původního, nefermentovaného mléka.

Mezi nejčastější kysané mléčné výrobky patří jogurty, jogurtové nápoje, kysaná smetana, acidofilní mléko a keřír a keřírová mléka. Existuje i mnoho dalších druhů kysaných mléčných výrobků, často jsou specifické pro dané země či oblasti. Mezi takové patří například kumys, typický pro Rusko a Střední Asii.

Kysané mléčné výrobky hrají významnou roli ve výživě člověka. Jsou pro organismus lépe využitelné a stravitelnější než mléko a mají i některé pozitivní zdravotní účinky. K jednomu z nejvýznamnějších účinků patří prospěšná činnost probiotických bakterií na lidské zažívání. K probiotickým bakteriím patří některé druhy rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*.

2 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části je podat stručný přehled o kysaných mléčných výrobcích a popsat zejména jejich mikroflóru, jak tu přirozenou, tak i kontaminující a popsat vlivy těchto mikroorganismů na výrobek, případně na konzumenta. Praktická část se zabývá mikrobiologickou analýzou vybraných vzorků kefíru. Výsledky mikrobiologické analýzy jsou porovnávány s předepsanou legislativou.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Historie výroby kysaných mléčných výrobků

Fermentace mléka je jednou z nejstarších metod, jak prodloužit jeho trvanlivost. Lidstvo tento způsob využívá již tisíce let, první fermentovaná mléka byla cíleně vyráběna přibližně před 10 000 lety. Souvisí to jednak s přechodem tehdejších lidí ze sběračství a lovu na zemědělství a produkci potravin, tak s domestikací savců produkujících mléko (krávy, ovce, kozy, buvoli, velbloudi). Nejpravděpodobnější první oblastí, kde začali lidé vyrábět fermentovaná mléka, byl Balkán a Blízký a Střední východ. Z archeologických nálezů je doloženo, že fermentaci mléka si osvojili již staří Babylóňané či Sumerové (Tamime, 2002).

Dnes existuje celá řada kysaných mléčných výrobků, podle odhadů několik set, často typických pro jednotlivé země. Mezi nejznámější patří jogurt, kefir, acidofilní a jiná kysaná mléka, které se po celém světě běžně vyrábí průmyslovou cestou. Specifickými výrobky jednotlivých zemí jsou například tåtemjlk ze severských států (Norsko, Švédsko, Finsko), kumys typický pro Střední Asii (Mongolsko, Kazachstán, Rusko), dahi z Indie, nebo třeba skym z Islandu (Hylmar, 1986).

Dnešní spotřeba zakysaných výrobků a rozšířenost po celém světě je dána zejména rozvojem průmyslové výroby, ale také dobrou chutí těchto výrobků, širokou možností úpravy, snadnou výrobou, skladováním a nízkou cenou. Největšího rozšíření se výrobky dočkaly v druhé polovině 20. století. Například jogurt byl do 50. let 20. století rozšířen spíše jen na Balkánu, Blízkém a Středním východě, ve východní Evropě a v Indii. Celosvětové oblíbenosti a rozšíření se dočkal až později (Tamime, 2002).

Kefír pochází z oblasti Kavkazu. Tradičně se fermentuje kontinuálně v kožených vacích, kdy se jen pravidelně ubírá již zfermentované mléko a přidává mléko čerstvé. Nyní je kefir populární v celém Rusku, rozšířen je i po světě (Chandan, 2006).

3.2 Význam pro zdraví a výživu

Kysané mléčné výrobky mají pro člověka velký význam. Ve své formě umožňují uchování mléka po dlouhou dobu a jsou hodnotné z hlediska výživového, dietetického a léčivého. Fermentované mléčné výrobky mají také dobrou stravitelnost, a to až o 7 –

11 % lepší než plnotučné konzumní mléko, mají tak i vyšší nutriční hodnotu. Stravitelnost je závislá zejména na druhu použitých fermentujících mikroorganismů, největší význam mají v tomto ohledu laktobacilové kultury (Hylmar, 1986). Význam má také použité mléko a z toho plynoucí rozdílné složení a účinek finálního výrobku na organismus. V České republice převládá kravské mléko. Využít lze ale i mléko kozí, ovčí, buvolí, kobylí a velbloudí (výroba kumysu), či mléko smíšené (Parmjit, 2011).

Kromě vhodnosti těchto výrobků ke konzumaci při různých intolerancích je pro člověka velmi prospěšná i mikroflóra fermentovaných mléčných výrobků. Význam má především jejich inhibiční povaha vůči jiným mikroorganismům, například hnilobným bakteriím. Mají tak příznivý vliv na lidské zažívání a předcházení gastrointestinálním infekcím a zácpám. Inhibičně působí například kyselina mléčná, peroxid vodíku, nebo jejich přirozené antibiotické látky, jako je nisin produkovaný bakterií *Lactococcus lactis* (Hylmar, 1986; Parmjit, 2011). Dalším pozitivním účinkem na zdraví je protirakovinný efekt, konzumace některých fermentovaných mléčných výrobků může pomoci předcházet například rakovině prsu. Některé kmeny *Lactobacillus acidophilus* mají i schopnost snižovat sérový cholesterol, což má zase význam pro prevenci kardiovaskulárních chorob. Neopomenutelná je i pozitivní stimulace imunitního systému, která byla zkoumána především v souvislosti s jogurty (Parmjit, 2011).

Z nutričního hlediska jsou důležité zejména bílkoviny, sacharidy a organické kyseliny, tuky, minerály a vitaminy obsažené v mléčných výrobcích.

Ze sacharidů kysané mléčné výrobky obsahují ve významnějším množství pouze laktózu. Ta bývá z 20 až 30 % přeměněna fermentací na kyselinu mléčnou. Již částečné odbourání laktózy má význam pro osoby s laktózovou intolerancí, které tyto výrobky obvykle dobře snášejí. Také má význam pro lepší využití vápníku a dalších minerálních látek. Ve finálním výrobku lze podmínkami kvašení a použitými kulturami ovlivnit jak množství vznikající kyseliny mléčné, tak i poměr jejich izomerů (Hylmar, 1986; Saeed et al., 2016).

Z dalších kyselin vznikajících při mléčné fermentaci lze uvést např. kyselinu octovou, mravenčí, jantarovou, a fumarovou. Tyto kyseliny vznikají jen ve velmi malých množstvích (Hylmar, 1986; Saeed et al., 2016).

Bílkoviny jsou významnou složkou kysaných mléčných výrobků. Jejich vyšší stravitelnost je vysvětlována tvorbou vloček při procesu srážení, které jsou díky většímu povrchu rychleji a lépe štěpitelné v zažívacím ústrojí. Opět zde plyne význam pro osoby

s intolerancí, tentokrát vůči nativním mléčným bílkovinám. Při konzumaci těchto výrobků u nich totiž nedochází k žádným nežádoucím reakcím. Vysoký je také obsah volných aminokyselin, a bioaktivních peptidů (například laktoferin, laktofericin, imunopeptidy, kasokinin), jejichž tvorba je přímou funkcí doby a aktivity působení mikrobiálních kultur při fermentaci. Tyto štěpné produkty, ať už vzniklé při fermentaci, nebo následně při trávení v gastrointestinálním traktu, pozitivně ovlivňují imunitní systém, krevní tlak, antimikrobiální aktivitu střevní flóry, vážou vitaminy a minerály a mají i řadu dalších účinků (Hylmar, 1986; Saeed et al., 2016).

Tuk má především vysokou energetickou hodnotu, k jeho změnám oproti tuku v mléce dochází jen málo, stravitelnost se zlepšuje jen minimálně. Pro jeho větší stravitelnost a lepší sensoriku kysaných mléčných výrobků je vhodná jeho homogenizace v mléce (Hylmar, 1986).

Prakticky k žádným změnám ve finálním výrobku nedochází u minerálních látek. Železo, vápník a fosfor jsou pouze v přítomnosti kyseliny mléčné lépe využitelné. Taktéž kombinace kyseliny mléčné, laktózy, vápníku a vitamínu D má význam pro vyšší retenci vápníku v těle, než tomu je nativního mléka. U vitaminů naopak ke změnám dochází, a to v jejich obsahu. K největším změnám dochází u vitaminů skupiny B. Výsledný obsah vitaminů závisí prakticky na všech faktorech výroby i vstupních produktů, od složení mléka a použitých kulturách, až po dobu a teplotu fermentace i způsob chlazení a skladování. Některé vitaminy jsou v průběhu fermentace mikroorganismy spotřebovávány, jiné naopak produkovány. U různých typů výrobků je tedy vitaminová bilance velmi rozdílná. Až na výjimky dochází při růstu k vyšší spotřebě vitaminů, a při skladování naopak k vyšší biosyntéze a jejich hromadění. Všeobecně převládá názor, že celkové množství vitaminů ve finálním výrobku je o něco menší než v původním mléce. Výjimkou jsou výrobky, kde se výrobou vitaminy cíleně zvyšují (Hylmar, 1986).

Význam v kysaných mléčných výrobcích mají také chuťové a aromatické látky vznikající při fermentaci. U mezofilních kultur použitých při výrobě jde především o diacetyl, u jogurtových kultur o acetaldehyd. Dále to jsou různé kyseliny nebo látky vzniklé proteolytickou a lipolytickou činností mikroorganismů (Hylmar, 1986).

3.3 Požadavky na mléko pro kysané mléčné výrobky

Základním ukazatelem kvality mléka je celkový počet mikroorganismů a počet somatických buněk. Limity stanovuje Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ve znění pozdějších předpisů. Celkový obsah mikroorganismů (CPM) v čerstvě nadojeném kravském mléce musí být menší nebo roven 100 000 na ml, obsah somatických buněk menší nebo roven 400 000 na ml (Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004).

Mléko musí být také prosté reziduí inhibičních látek (detergenty, antibiotické látky), které negativně ovlivňují činnost bakterií mléčného kvašení. Dále by mléko na kysané mléčné výrobky mělo mít nejméně 8,5 % tukuprosté sušiny a správné chemické a senzorické vlastnosti. Vady a odchylky se projeví i na finálním výrobku (Hylmar, 1986).

3.4 Čisté mlékařské kultury

V dřívějších dobách se pro výrobu kysaných mléčných výrobků, ale také másla a sýrů, využívalo především mikroorganismů obsažených v mléce. Takováto výroba se však zakládala především na empirických zkušenostech. Výrobky byly často různé kvality, a rychleji se kazily. Pro průmyslovou výrobu byl velkým skokem vpřed objev a následné využívání čistých mlékařských kultur. Ty se dnes ve většině případů využívají jak pro průmyslovou, tak i farmářskou výrobu (Kněz et al., 1960).

Čistá mlékařská kultura je tedy příslušné živné prostředí, ve kterém jsou rozmnoženy nebo ve kterém rostou přesně definované druhy mikroorganismů. Kultury se vpravují do tepelně ošetřeného mléka, zbaveného co největšího množství nežádoucích mikroorganismů, a za příslušných podmínek (zejména teplota a čas) dochází k inkubaci a mléčnému kvašení. Kultury můžeme dělit podle účelu (jogurtové, smetanové, keфіrové, acidofilní), a podle druhů a kmenů mikroorganismů (jednodruhové, vícedruhové, směsné). Dále také podle toho, zda se přidávají přímo do mléka na výrobu, nebo se z nich napřed připravuje zákys (matečný, či rovnou provozní). Mohou být buď aktivované, nebo se musí nejdříve aktivovat. Čisté mlékařské kultury vyrábějí specializované firmy, které je distribuují ke koncovým uživatelům (mlékárenské závody, farmy). Distribuují se obvykle v uzavřených

lahvičkách, jako tekuté, často také zmražené či lyofilizované (Teplý et al., 1968; Görner, Valík, 2004; Tamime, 2006).

Práce s čistými kulturami vyžaduje přísné dodržování všech zásad. I malé odchylky a chyby mohou vést k velkým problémům u finálního výrobku. Je třeba dodržovat všechny technologické postupy a normy. Samozřejmostí je čistota a desinfekce pracovního prostředí, pomůcek a nástrojů. Důležitý je i výběr mléka, jeho chemické a mikrobiální složení, a jeho úpravy před vlastní výrobou. Matečné a provozní kultury se musí důsledně hlídat, a při odchylkách v jakosti nahradit novými (Teplý et al., 1968, Tamime, 2006).

Velkým problémem mohou být i bakteriofágy. Jde o viry napadající bakterie, což vede v případě kysaných mléčných výrobků k různým odchylkám jakosti, pomalému kvašení zákysů, či k jejich znehodnocení, nebo znehodnocení finálního výrobku (Marcó et al., 2012).

Hlavní funkcí čistých mlékařských kultur je fermentace mléka, která vede k tvorbě kyseliny mléčné a malého množství dalších produktů. Dochází tak k posunu pH do kyselejší oblasti. Tvorba kyseliny mléčné vede v pozdější fázi ke změně konzistence mléka. Především se to týká koagulace kaseinu. U tvarohů dochází vlivem kyseliny mléčné k posunu pH až na hodnotu izoelektrického bodu (pH 4,7) a kasein tvoří viditelnou sraženinu. Při výrobě kysaných mléčných výrobků kyselost nedosáhne izoelektrického bodu a ani nedochází k záhřevu, tím pádem se kasein viditelně nesráží. Srážení se projeví pouze jeho nabobtnáním a tím i zhoustnutím mléka, změnou viskozity a struktury a sensorickými změnami. Kyselé prostředí má také podstatný antibakteriální význam. Ten mají i různé ochranné látky, které bakterie mléčného kvašení produkují a upravují tím mikroflóru výrobku, především zabraňují rozvoji nežádoucích mikroorganismů. Jednou z nejvýznamnějších ochranných látek je nisin. Další schopností mikroorganismů čistých mlékařských kultur je tvorba výživných a léčivých faktorů. Za zmínku stojí například tvorba vitaminů skupiny B v kefiru kvasinkami či přeměna bílkovin mléka na jednodušší, stravitelnější formy (Kněz et al., 1960; Tamime, 2006).

3.4.1 Kefírová kultura

Kefírová kultura oproti většině ostatních kultur obsahuje kromě bakterií i kvasinky. Kromě uměle připravených čistých zákysů se mikroorganismy kefírové kultury mohou přirozeně vyskytovat ve formě takzvaných kefírových zrn. Mikroflóra kefírových zrn je značně různorodá. Bakterie i kvasinky v nich rostou ve vzájemné symbióze. Pro průmyslovou výrobu se vzhledem k variabilnímu složení často využívají jednotlivé mikroorganismy oddělené, získané z kefírových zrn nebo i jiných zdrojů. Přesně definované složení vytvořených kultur má význam pro delší trvanlivost kefirů. (Kněz et al., 1960, Tamime, 2006).

K základním bakteriím v kefírové kultuře patří *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefir* a *Lactobacillus brevis* (Kněz et al., 1960; Görner, Valík, 2004). K typickým bakteriím kefiru patří také rod *Leuconostoc* (Vyhláška č. 397/2016 Sb.)

Lactococcus lactis subsp. *lactis* tvoří buňky o velikosti 0,6 – 1 μm , nejčastěji bývá v párech, může být i v řetězcích. Jde o fakultativně anaerobní, grampozitivní kok. Je schopen štěpit glukózu, laktózu, maltózu, v malé míře i sacharózu. Při 20 až 30 °C tvoří převážně pravotočivou formu kyseliny mléčné a pouze minimum vedlejších produktů. Optimální teplota pro růst je 30 °C, roste však i při 10 °C, maximálně při 40 °C. pH optimum pro růst je kolem 6,5 až 7. Na agarových půdách tvoří malé, kulaté až oválné kolonie s bělavou až šedou barvou. Na syrovátkovém agaru s čínskou modří a autolyzátem tvoří dobře viditelné modré kolonie. Některé kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* produkují potravinářsky významnou (zejména v mlékárenství), antibioticky účinnou látku, nisin (Teplý et al., 1968, Görner, Valík, 2004).

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* je také fakultativně anaerobní, grampozitivní kok. Má podobné vlastnosti jako *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, v řetězcích se vyskytuje častěji (Görner, Valík, 2004). Růst na agarových půdách je podobný jako u předešlého laktokoka (Teplý et al., 1968, Görner, Valík, 2004).

Lactobacillus je rod anaerobních, či aerotolerantních, gramnegativních tyčinek. Člení se do třech základních skupin, podle toho, které substráty převážně fermentují. I. skupina fermentuje téměř výhradně hexózy na kyselinu mléčnou, jde o homofermentativní bakterie. Patří sem *Lactobacillus delbrueckii* a jeho poddruhy, dále např. *Lactobacillus acidophilus*, *L. helveticus*, *L. salivarius*. Jsou mikroaerofilní, optimální teplota růstu je 30 až 45 °C, rozmezí 15 až 45 °C. Optimální pH mají 5,5 až 6,2. II. skupina laktobacilů je fakultativně heterofermentativní, fermentují výlučně

hexózy na kyselinu mléčnou, při nedostatku glukózy i na kyselinu octovou, mravenčí a ethanol, mohou fermentovat i pentózy. Patří se *Lactobacillus casei* a jeho poddruhy (subsp. *casei*, *rhamnosus*, *tolerans*), dále např. *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sake*. Optimální teplotu mají 28 až 32 °C, rozmezí 15 až 45 °C. II. skupina je obligátně heterofermentativní, fermentují hexózy na kyselinu mléčnou, octovou, oxid uhličitý a ethanol. Fermentují také pentózy na kyselinu mléčnou a octovou. Do této skupiny patří např. *Lactobacillus brevis*, *L. fermentum*, *L. kefir* či *L. buchneri* (Görner, Valík, 2004).

Na agarových půdách tvoří laktobacily neprůhledné, bezbarvé, vyduté, lesklé kolonie s pravidelným okrajem, o průměru 2 až 5 mm. Jsou náročné na růstové faktory, kromě fermentovatelných sacharidů požadují jako zdroj uhlíku a energie i aminokyseliny, nukleotidy a vitaminy skupiny B. Na běžných kultivačních médiích nevytvářejí žádný charakteristický pach (Görner, Valík, 2004).

Leuconostoc je rod grampozitivních, heterofermentativních, fakultativně anaerobních koků. Všechny druhy fermentují glukózu. Při fermentaci tvoří kyselinu mléčnou, oxid uhličitý a ethanol, některé kmeny produkují místo ethanolu kyselinu octovou. Růst na kultivačních médiích je poměrně pomalý, optimální teplota růstu je kolem 20 až 30 °C (Görner, Valík, 2004). Pro kefir je typický například *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, či *L. mesenteroides* subsp. *cremoris* (Batt, Tortorello, 2014).

K dalším bakteriím, které mohou být součástí kefirové kultury, patří například *Acetobacter*, *Gluconobacter* (izolován z belgického a brazilského kefiru), nebo i *Streptococcus thermophilus* (Bulharsko, Itálie, Turecko). Poměrně obsáhlý, co se rodů týče, je čínský tibetský kefir, kromě hlavních druhů kefirových bakterií může obsahovat i *Pseudomonas* spp., *Shewanella* spp., *Streptococcus* spp., *Acinetobacter* spp., *Pelomonas* spp., *Dysgomonas* spp., *Weisella* spp. (Prado et al., 2015).

Druhou podstatnou složkou kefirové kultury jsou kvasinky. Jsou to fakultativně anaerobní mikroorganismy, které dokážou ale růst i za anaerobních podmínek s vyšší intenzitou fermentace. Mezi základní kvasinkové mikroorganismy v kefiru patří *Kluyveromyces fragilis* a *Candida kefir* (*Toluroopsis kefir*). Jejich hlavními metabolickými produkty v kefiru jsou oxid uhličitý a ethanol, mají také význam pro senzoriku (Görner, Valík, 2004). K dalším významným kvasinkám v kefiru patří *Saccharomyces cerevisiae*, *S. unisporus*, *Kluyveromyces marxianus*, či *Kluyveromyces lactis* (Gao, Li, 2016). V čínském tibetském kefiru a některých dalších, můžeme nalézt

také rod *Kazachstania* či *Pichia* (Prado et al., 2015). Zastoupení kvasinek v keřírech, keřírových zrnech i čistých mlékařských kulturách, stejně jako zastoupení bakterií, je značně variabilní, různé země používají jiná často typická složení (Gao, Li, 2016).

3.4.1.1 Kefírová zrna

Kefírová zrna jsou unikátním ekosystémem tvořeným bakteriemi a kvasinkami ve vzájemné symbióze. Obsahují i více jak padesát různých rodů těchto mikroorganismů. Součástí mikroflóry mohou být i některé vláknité mikromycety, ty už jsou ale více vázané na oblast původu keříru (Pogačić et al., 2013).

Původ keřírových zrn a jejich tvorba není stále zcela jistě objasněn. Výsledky studie Wang et al. (2012) naznačují, že základem jejich tvorby jsou bakterie a kvasinky se silnou autoagregační schopností (*Lactobacillus kefiranofaciens* a *Saccharomyces turicensis*) v kombinaci se schopností některých bakterií tvořit biofilm (*Lactobacillus kefir*), což následně umožňuje navázání dalších bakterií. Některé bakterie se u keřírových zrn zdržují spíše na povrchu, jiné charakteristicky agregují směrem k centru zrna.

Kromě řady mikroorganismů jsou keřírová zrna tvořena i organickou, houbovitou vláknitou maticí, která se postupně formuje aktivitou mikroorganismů. Tato hmota je tvořena, polysacharidy, proteiny, částicemi bakterií a mnoha stále nedefinovanými složkami. Asi 25 % sušiny zrn je tvořeno ve vodě rozpustným polysacharidem kefiranem (Pogačić et al., 2013).

3.4.2 Jogurtová kultura

Jogurtová kultura, jinak také termofilní jogurtová kultura, obsahuje směs bakterií *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Jde o termofilní bakterie rostoucí ve vzájemné symbióze, s optimální teplotou růstu kolem 40 až 43 °C (Görner, Valík, 2004).

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* patří do I. skupiny laktobacilů, jde o homofermentativní bakterii mléčného kvašení (Görner, Valík, 2004). Má tvar tyčinky o délce 4 až 10 um a šířce 0,5 až 15, um. Je grampozitivní, fakultativně anaerobní, nesporulující. Patří mezi termofilní jogurtové bakterie, s optimální teplotou růstu kolem 40 °C, roste obvykle v rozmezí teplot 22 až 52,5 °C, někdy až při 60 °C. Má schopnost

fermentovat laktózu, glukózu a galaktózu. Tento mikroorganismus také částečně štěpí kasein za uvolnění aminokyselin, což má význam pro růst *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (Teplý et al., 1968; Görner, Valík, 2004).

Streptococcus salivarius subsp. *thermophilus* je grampozitivní, fakultativně anaerobní, nesporulující kok. Tvoří kyselinu mléčnou fermentací laktózy, má schopnost i štěpit kasein. Optimální teplota růstu je 37 až 45 °C, roste v rozmezí teplot 20 až 50 °C. Velikost koků je 0,7 až 0,9 μm. Při teplotě nižší, než optimální se vyskytuje spíše v párech či krátkých řetízcích, jinak i v delších řetízkovitých útvarech. Na syrovátkovém agaru s čínskou modří a kvasničným autolyzátem roste ve formě drobných, sytě modrých kolonií. Je vysoce citlivý na antibiotika i jiné inhibiční látky, čehož lze využít při stanovení inhibičních látek v mléce (Teplý et al., 1968; Görner, Valík, 2004).

3.4.3 Smetanová kultura

Smetanová (často označována také jako mezofilní) kultura je tvořena zejména bakteriemi *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Bývají také zastoupeny některé aromatvorné bakterie, a to *Leuconostoc dextranicum* a *Leuconostoc mesenteroides* (Teplý et al., 1968). Aromatvorné bakterie jsou významné zejména pro produkci diacetylu. Ten je v těchto kulturách někdy produkován i bakterií *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, ta však produkuje také vysoké množství oxidu uhličitého, a proto je jako producent diacetylu méně vhodná (Görner, Valík, 2004). Poměr kyselinotvorných a aromatvorných bakterií by měl být 9 : 1 až 8 : 2 (Teplý et al., 1968). Laktokoky i leukonostoky jsou blíže popsány v podkapitole keřirová kultura.

3.4.4 Acidofilní kultura

Acidofilní kultura je tvořena bakterií *Lactobacillus acidophilus*. Jde o fakultativně anaerobní, grampozitivní tyčinku. Optimální teplota pro růst je 37 °C, špatně roste při teplotách nižších než 20 °C a vyšších než 48 °C. Bakterie je odolná vůči kyselému prostředí. Pěstování této kultury je jednoduché, díky vitálnosti kmenů používaných

v mlékárenském průmyslu a díky velkému rozmezí teploty potřebné k růstu. Doba kultivace bývá kolem 8 až 16 hodin (Teplý et al., 1968).

3.4.5 Probiotická kultura

Probiotickou kulturou lze obohatit rozličné kysané mléčné výrobky. Jde o bakterie, které mají prokazatelně pozitivní význam pro lidské zažívání a dokáží se v zaživacím traktu usadit. Oproti většině ostatních bakterií mléčného kvašení mají lepší schopnost snášet vysoké koncentrace kyseliny chlorovodíkové v žaludku, snášejí lépe žluč a snesou i jiné obranné mechanismy, díky tomu se na rozdíl od nich do střeva dostanou živé. Pozitivní význam pak spočívá zejména v potlačování činnosti patogenních a hnilobných mikroorganismů, čemuž napomáhá zejména produkce kyseliny mléčné a bakteriocinů. Mezi probiotické bakterie patří bakterie mléčného kvašení *Lactobacillus acidophilus* a některé bifidobakterie (*Bifidobacterium bifidum*, *B. longum* a *B. adolescentis*). Pro kultury těchto bakterií je nejlepší kombinace obou druhů, jelikož mají mezi sebou symbiotický vztah, a lépe tak v nich rostou. V mléce rostou oproti jiným bakteriím mléčného kvašení pomalu. Oba druhy se přirozeně vyskytují v lidském zaživacím traktu, jejich optimální teplota je tedy 37 °C. Jako probiotické se označují také některé kmeny *Lactobacillus casei*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. lactis* a *Enterococcus faecium* (Görner, Valík, 2004).

Samozřejmě je i možné obohacovat mléčné výrobky pouze jedním rodem probiotických bakterií. Ve studii Lacmanová et al. (2010) byl kefir obohacen bakteriemi *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri* a *L. plantarum*. Všechny kmeny laktobacilů přežily po celou dobu skladování (28 dní, 4-6 °C) v dostatečném množství (10^6 KTJ/ml). Přidané probiotické bakterie pouze mírně negativně ovlivnily činnost kvasinek, a jen velmi málo ovlivnily senzoričné vlastnosti kefiru.

Důležitá jsou i tzv. prebiotika. Jde o pro člověka nestravitelné látky, především různé polysacharidy, oligosacharidy, ale i peptidy, bílkoviny a lipidy, které mají pozitivní vliv na růst a aktivitu probiotických bakterií ve střevech (Görner, Valík, 2004).

3.5 Legislativa

Obsah a druh mikroorganismů a další požadavky na kysané mléčné výrobky jsou upřesněny ve vyhlášce č. 397/2016 Sb., příloze č. 1.

3.5.1 Mikrobiologické požadavky

U acidofilního mléka je hlavním použitým mikroorganismem *Lactobacillus acidophilus* a další mezofilní, případně termofilní kultury bakterií mléčného kvašení. Mléčná mikroflóra výrobku v 1 g musí být minimálně 10^6 *Lactobacillus acidophilus*.

U jogurtů jsou použitými mikroorganismy protosymbiotická směs *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, v množství 10^7 v 1 g výrobku a případně další kmeny vytvářející kyselinu mléčnou a pomáhající dotvářet specifickou chuťovou nebo texturovou charakteristiku výrobku, při zachování optimálního poměru obou základních kmenů jogurtové kultury.

U kysaných či zakysaných mléčných výrobků dále neuvedených, např. kysaného mléka, smetanového zákysu, zakysaného podmáslí, zakysané smetany či kysaných mléčných nápojů, jsou použitými mikroorganismy monokultury nebo směsné kultury bakterií mléčného kvašení v minimálním množství 10^6 .

U keříru je zdrojem mikroorganismů zákys připravený z keřírových zrn nebo keřírové kultury, jehož mikroflóra se skládá z kvasinek zkvašujících laktózu *Kluyveromyces marxianus* i nezksašujících laktózu *Saccharomyces unisporus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces exiguus* a dále bakterií *Leuconostoc*, *Lactococcus* a *Aerobacter*, rostoucích ve vzájemném společenství. Mléčná mikroflóra výrobku v 1 g musí být min. 10^6 bakterií mléčného kvašení a 10^4 kvasinek.

U keřírového mléka je zdrojem mikroorganismů zákys, skládající se z kvasinkových kultur rodu *Kluyveromyces*, *Torulopsis* nebo *Candida valida* a mezofilních a termofilních kultur bakterií mléčného kvašení v symbióze. Mléčná mikroflóra výrobku v 1 g musí být min. 10^6 bakterií mléčného kvašení a 10^2 kvasinek.

U kysaných mléčných výrobků s bifidokulturou jsou použitými mikroorganismy *Bifidobacterium* subsp. v kombinaci s mezofilními a termofilními bakteriemi mléčného

kvašení. Mléčná mikroflóra výrobku v 1 g musí být min. 10^6 bifidobakterií (Vyhláška č. 397/2016 Sb., příloha č. 1).

3.5.2 Ostatní požadavky

K ostatním požadavkům, uvedeným ve vyhlášce, patří obsah tuku a tukuprosté sušiny u některých typů kysaných mléčných výrobků (viz Tab. č. 1).

Tab. č. 1 – Další legislativní požadavky na kysané mléčné výrobky

Druh výrobku	Obsah tuku (v % hmot.)	Obsah sušiny tukuprosté (v % hmot. nejméně)
Kysaná smetana	Nejméně 10,0	-
Kysané mléko včetně jogurtového	Nejméně 0,5	8,0
Podmáslí	Nejméně 1,5	7,0
Jogurt bílý smetanový	Nejméně 10,0	-
Jogurt bílý	Nejméně 3,0	8,2

(Vyhláška č. 397/2016 Sb., příloha č. 4)

3.6 Druhy a charakteristika kysaných mléčných výrobků

3.6.1 Kysané mléčné výrobky se symbiózou bakterií a kvasinek

3.6.1.1 Kefír

Hlavní úlohou bakterií v kefíru je fermentace laktózy na kyselinu mléčnou, kvasinky tvoří až oxid uhličitý a ethanol. Při vyšší teplotě, která je optimální pro bakterie, ale nikoliv pro kvasinky, probíhá lépe koagulace a kvašení. Obvykle se pro fermentaci využívá kompromis, tedy teplota mezi 18 až 20 °C. Doba zrání bývá jeden až dva dny. Laktóza je ve finálním výrobku zfermentována z 20 až 25 %, jednodenní kefír dosahuje titrační kyselosti 36 až 44 (Görner, Valík, 2004). Po 48 hodinách zrání se kyselost dostává na 45 až 55 °SH. Při delším zrání se kyselost ještě více zvyšuje, a kefír se stává výrazněji šumivým (Kněz et al., 1960).

Symbióza bakterií a kvasinek je dána zejména produkcí kyseliny mléčné bakteriemi, čímž se vytváří ideální prostředí pro kvasinky. Ty zase produkují pro

bakterie vitaminy skupiny B. V průběhu kvašení se zastoupení jednotlivých mikroorganismů mění. Ve finálním výrobku bývá kolem 80 % laktokoků, 10 až 15 % kvasinek a 5 až 10 % laktobacilů (Tamime, 2006). Množství vitaminů a to, zda dojde k jejich snížení či zvýšení, do značné míry závisí na zdroji zákysů a kefírových zrn. Různé studie se v tomto značně liší či si dokonce odporují (Farnworth, 2005).

Na sensorickou jakost výrobku má velký vliv kyselina mléčná, dále také kyselina octová, alkohol a aldehydy, ale i třeba mravenčí či propionová kyselina. Ethanolu je v našich kefírech obvykle velmi malé množství. Chuť je mléčná, lehce kvasnicová. Textura výrobku je ve formě uniformní tekuté sraženiny, při delším stání se odděluje syrovátka. Výrobek je lehce perlivý, což je způsobeno oxidem uhličitým. Bublínky plynu jsou v kefíru viditelné. Dochází i k částečné degradaci tuků, více spíše bílkovin, což má také vliv na finální výrobek (Tamime, 2006).

Dostupnost kefírů v ČR není oproti jiným kysaným mléčným výrobkům příliš velká, ve většině případů v obchodech převažují spíše kefírová mléka. Kefír lze nejčastěji najít v různých farmářských prodejnách potravin, v běžných prodejnách spíše ojediněle. Nejrozšířenější je výroba kefíru v Rusku (Hylmar, 1986).

Kefírová zrna mohou nalézt i jiná uplatnění. Kupříkladu je lze využít pouze k produkci kefiranu ze syrovátky, protože jsou schopna v tomto prostředí růst. Kvasinky kefíru imobilizované na celulóze také dokáží fermentovat glukózu na ethanol v produkčně významném množství (Farnworth, 2005).

3.6.1.2 Kefírová mléka

Kefírová mléka jsou u nás častějším výrobkem než kefír, dají se běžně koupit v supermarketech. Na rozdíl od kefíru neobsahují ethanol. Kvasinky se při výrobě přidávají v menším množství, výsledný výrobek je chuťově jemnější, a má o něco méně hustou konzistenci než kefír. Často se kefírové mléko i ochucuje (jahodové, meruňkové, vanilkové) a dobarvuje (www.zdravapotravina.cz).

3.6.1.3 Kumys

Kumys je kysaný mléčný nápoj, oblíbený a rozšířený už 7. století u mongolských kmenů. Dnes je také dobře znám a je rozšířen i v zemích jako Kazachstán, Ázerbájdžán,

Turecko nebo Čína. Tradičně se zde vyrábí z kobylišho mléka. V Evropě a Severní Americe se k výrobě používá odtučněné kravské mléko (Tamime, 2006).

Mikroflóru těchto výrobků tvoří bakterie mléčného kvašení jako jsou např. laktobacily, laktokoky. Z kvasinek jak kvasinky laktózu fermentující (*Kluyveromyces*, *Candida kefir*), tak i laktózu nefermentující (*Saccharomyces*) (Hylmar, 1986; Montanari et al., 1996).

Kumys se oproti kefiru vyznačuje vyšší koncentrací alkoholu a větší výživovou hodnotou (Hylmar, 1986).

3.6.1.4 Ostatní výrobky se symbiózou bakterií a kvasinek

Mezi další, méně známé druhy kysaných mléčných výrobků se symbiózou kvasinek a bakterií patří například různá acidofilní kvasničná mléka (typická pro Rusko a Polsko), specifické výrobky s bakteriemi i kvasinkami podobné jogurtu (Francie), nebo slovenská žinčice, vyráběná z kysané a zkvašené syrovátky z ovčího mléka (Hylmar, 1986).

3.6.2 Kysané mléčné výrobky s jogurtovou kulturou

3.6.2.1 Jogurt

Jogurt a jeho různé varianty patří mezi nejrozšířenější kysané mléčné výrobky jak u nás, tak i v zahraničí. Existují dva základní technologické postupy výroby jogurtů, a to klasický se zráním přímo v obalu, a tankový způsob se zráním v tancích po delší dobu při nižších teplotách. Jogurty s klasickým způsobem zrání dosahují tužší konzistence a vyšší kyselosti, jogurty vyrobené tankovou metodou jsou méně tuhé s nižší kyselostí (Hylmar, 1986).

Na jogurtovém aroma se nejvíce podílí acetaldehyd, který je tvořen bakterií *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Jeho tvorba začíná při hodnotě pH 5,0 a stabilizuje se při hodnotě 4,0. Během kvašení při 43 °C je za 3 hodiny ve výsledném produktu 20 až 40 mg acetaldehydu na litr (Görner, Valík, 2004).

Na českém trhu existuje řada druhů jogurtů. Mezi ty nejčastější patří jogurty ochucené a jogurt bílý (s obsahem tuku nejméně 3 %), smetanový (obsah tuku nejméně

10 %) a dále jogurty odtučněné či jogurty s bifidokulturou a acidofilní jogurty (Vyhláška č. 397/2016 Sb., příloha č. 4).

3.6.2.2 Ostatní výrobky s jogurtovou kulturou

Častým a čím dál více oblíbeným výrobkem jsou u nás také jogurtové nápoje. Vyznačují se řidší konzistencí a bývají obvykle ochucené.

Novinkou na našem trhu je skyr vyráběný pod značkou Kapucín. Jde o kysaný mléčný výrobek jogurtového typu, původem z Islandu. Vyznačuje se hustou konzistencí, minimálním obsahem tuku a vysokým obsahem bílkovin (www.skyr-kapucin.cz)

3.6.3 Kysané mléčné výrobky s využitím mezofilních kultur

Kysaná mléka jsou vyráběna kvašením pasterovaného mléka čistou smetanovou kulturou. Na trhu se obvykle prodává pod označením kyška. (Kněz et al., 1960, Vyhláška č. 397/2016 Sb.).

Dalším kysaným výrobkem s využitím mezofilních kultur je zakysané podmáslí. Podmáslí je produkt získávaný při stloukání másla, kysané či šlehané podmáslí se vyrábí jeho zakvašením a smícháním s mlékem (Kněz et al., 1960; Görner, Valík, 2004).

Významnými výrobky jsou také kysané smetany a zahuštěný smetanový zákys. Zahuštěný smetanový zákys obsahuje obvykle 4 až 6 % tuku a 18 % tukuprosté sušiny, vyrábí se z mléka jeho zahuštěním a zakvašením. Kysaná smetana se připravuje kvašením smetany, nejběžněji je na trhu k dostání o obsahu tuku v rozmezí 12 až 18 %, méně často mívá i vyšší tučnost, a to až 40 % (Görner, Valík, 2004; www.potravinynapranaryri.cz).

3.6.4 Acidofilní mléka

Acidofilní mléka se vyrábějí kvašením acidofilní kulturou v kombinaci s kulturou mezofilní, která tvoří výrazně větší podíl. Samotná acidofilní kultura by způsobovala příliš vysokou kyselost výrobku. Titrační kyselost acidofilního mléka by měla být 35 až 50 °SH (Hylmar, 1986).

3.7 Vady kysaných mléčných výrobků

Vady kysaných mléčných výrobků mohou mít původ ve vstupní surovině, kontaminované čisté mlékařské kultuře, v nesprávném technologickém postupu, ale i ve skladování či expedici. Organoleptické vady kysaných mléčných výrobků obecně dělíme na vady vzhledu, chuti a vůně a vady reologických vlastností. (Hylmar, 1986).

3.7.1 Vady způsobené mikroorganismy

Mikrobiální příčiny vad kysaných mléčných výrobků jsou nejčastější. Ke kontaminaci může dojít v kterékoliv části výroby od získávání mléka až po jeho balení. Vady mohou být způsobené i čistými mlékařskými kulturami při nedodržování stanovených podmínek. Kontaminace se ani nemusí projevit při výrobě, vady se mohou projevit až při skladování. Dle intenzity kontaminace či závažnosti technologické chyby dochází k vadám zakysaných mléčných výrobků až k jejich zkažení. Základem veškeré práce je čistota a pravidelné kontroly jak na patogenní mikroorganismy, tak na celkový počet mikroorganismů a některé specifické mikrobiální skupiny, jako jsou koliformní a termofilní bakterie. Velký význam má i pasterace mléka před zpracováním a zaočkováním. Důležitá je i kontrola kyselosti obvykle v SH stupních. Mléko na kysané mléčné výrobky by nemělo mít titrační kyselost vyšší než 9 °SH (Teplý et al., 1968; Görner, Valík, 2004).

Skupiny mikroorganismů, způsobujících kažení a vady mléka i kysaných mléčných výrobků lze rozdělit na psychrotrofní mikroorganismy (*Pseudomonas*, *Aerococcus*), koliformní bakterie (čeleď *Enterobacteriaceae*), sporulující mikroorganismy (*Bacillus*, *Clostridium*), kvasinky a plísňe a případně i samotné bakterie mléčného kvašení (Ledenbach, Marshall, 2010).

3.7.1.1 Kefír

Kefír je typický svou chutí, ale bývá často i s různými příchutěmi. Příliš kvasničná chuť může být způsobena přemnožením kvasinek. Nepříjemná chuť a vůně může vznikat působením kontaminujících mikroorganismů. Při příliš vysoké teplotě

skladování se mohou pomnožit bakterie máselného kvašení, pokud jimi bylo mléko kontaminováno. Koliformní bakterie, bakterie octového kvašení, (*Acetobacter*) či křísové kvasinky mohou způsobit nečistou a nečistě kyselou chuť kefiru (Teplý et al., 1968; Tamime, 2006).

Další vadou kefiru může být příliš vysoká kyselost, způsobená přílišným pomnožením bakterií mléčného kvašení na úkor kvasinek při růstu za vyšších teplot. Naopak při nízkých teplotách se mohou přemnožit kvasinky, což kromě již uvedené kvasničné příchutě vede i k nízké kyselosti a vysoké šumivosti výrobku. Pomalé prokysávání kefiru a špatné srážení může být způsobeno i viry napadajícími bakterie, takzvanými bakteriofágy. Existuje i tzv. duření kefiru, způsobené bakterií *Bacillus polymyxa*. Hořkost kefiru může být způsobena plísní *Geotrichum candidum*, nebo různými atypickými kvasinkami. (Teplý et al., 1968; Tamime, 2006).

3.7.1.2 Jogurty

Oproti tekutějším kysaným mléčným výrobkům jsou vady vzhledu u jogurtu patrnější. Při nevhodném dlouhodobém skladování může u jogurtu vzniknout křísový povlak tehdy, pokud je jogurt kontaminován kvasinkami, plísněmi či mikrokoky. Koliformní bakterie či kvasinky kontaminující jogurt mohou způsobit tvorbu plynových bublinek. Vady chuti a vůně mohou být způsobeny například nedostatečným kvašením (převaha streptokoků), nízkou teplotou zrání, krátkou dobou zrání či příliš nízkou sušinou. V takovýchto případech je výsledný jogurt málo kyselý s prázdou chutí. Opakem je příliš kyselá chuť, způsobená příliš dlouhou dobou zrání, vysokými teplotami při zrání, skladování, a podobně. Kontaminace jogurtů nebo mléka na výrobu se může projevit nečistou chutí, kvasnicovou příchutí, hořkostí. Hořká chuť se může vyskytnout i u dlouho skladovaných výrobků působením proteolytických mikroorganismů. Žluklá příchut' vzniká rozkladem tuků, pokud bylo mléko kontaminováno mikroorganismy a nedostatečně tepelně ošetřeno. Řídká konzistence jogurtu může mít kromě technologických příčin původ i ve špatné jakosti kultur. Kašovitá konzistence může být způsobena mikroorganismy produkujícími slizy (Hylmar, 1986; Görner, Valík, 2004).

3.7.1.3 Ostatní kysané mléčné výrobky

K základním vadám výrobků s mezofilní kulturou patří překvašení, které je způsobeno vyšší či delší aktivitou použitých kultur při nedodržení technologických podmínek. Tvorba plynu ve formě bublinek bývá způsobena kvasinkami, koliformními mikroorganismy, nebo i nevhodnou smetanovou kulturou, v níž převládá *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, který intenzivně tvoří oxid uhličitý. Mezi vady chutě patří hořká chuť, způsobená proteolytickými bakteriemi, kvasinková příchut', nečistá kyselá chuť, způsobená octovým kvašením apod. Častým původcem vad bývá také kontaminace bakterií *Bacillus cereus*. U acidofilního mléka mohou být podobné vady, nejčastější bývá překvašení způsobené acidofilní kulturou (Hylmar, 1986; Görner, Valík, 2004).

3.7.2 Vady způsobené bakteriofágy

Bakteriofágy jsou viry, které napadají bakterie. Kontaminace čistých mlékařských kultur vede zejména k pomalému prokysávání mléka, k převaze nevhodných bakterií a ke kažení. Mezi nejprozkoumanější bakteriofágy, problémové v mlékárenském průmyslu, patří ty, které napadají laktokoky. Prevencí je důsledné dodržování hygienických zásad, kontroly čistých mlékařských kultur a důsledná opatření při jejich kontaminaci. Detekce bakteriofágů se dělí na přímé a nepřímé metody. Přímá detekce je založena na průkazu částic viru nebo DNA či proteinů. Nepřímý průkaz využívá stanovení aktivity mlékařské kultury, obvykle se prokazuje pokles produkce kyselin oproti kontrolnímu vzorku. Možností je také měření změn vodivosti v mléku, nebo průkaz bakterií pozměněných bakteriofágy průtokovou cytometrií (Marcó et al., 2012).

3.7.3 Vady technologické

Technologické vady plynou hlavně z nedodržení správné teploty, doby kultivace či nevhodné skladby mléka. Často bývají úzce provázány s činností bakterií (Hylmar, 1986; Görner, Valík, 2004).

3.8 Patogenní mikroorganismy

Zdrojem patogenních mikroorganismů v kysaných mléčných výrobcích je kontaminované mléko či kontaminace při výrobě a manipulaci. Běžně se ale patogenní

mikroorganismy do finálního výrobku nedostanou, protože nepřežijí teploty pasterace, nebo jsou eliminovány činností bakterií mléčného kvašení (fermentace laktózy na kyselinu mléčnou s následným snižováním kyselosti, produkce bakteriocinů) jak uvádějí Fernández et al. (2015). U kefiru má kromě jiného antimikrobiální účinek i polysacharid kefiran (John, Deeseenthum, 2015). I přesto se někdy patogenní mikroorganismy nebo jejich produkty do finálního výrobku dostanou či přežijí a mohou způsobit onemocnění nebo otravu konzumenta. Hlavní faktory ovlivňující vznik onemocnění jsou typ mikroorganismu (rod, druh, kmen apod.), jeho odolnost, počáteční množství v kontaminovaném mléce, tepelná úprava mléka, použité kultury a podmínky fermentace a skladování (Fernández et al., 2015).

Z gram pozitivních bakterií jde především o rody *Staphylococcus* a *Listeria*, a sporulující *Clostridium* (*C. tertium*, *C. perfringens*, *C. botulinum*) a *Bacillus cereus*. Z gram negativních pak *Escherichia coli* a *Salmonella*. Ostatní gram pozitivní bakterie, jako např. *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* či *Proteus*, jsou spíše indikátory špatné hygieny, mohou se podílet na kažení, ze zdravotního hlediska jde o oportunní patogenní mikroorganismy (Fernández et al., 2015).

3.8.1 *Salmonella* spp.

Salmonella je rod gramnegativních, fakultativně anaerobních tyčinek z čeledi *Enterobacteriaceae*. Většinou jsou pohyblivé (Görner, Valík, 2004).

Základní členění salmonel je na 2 druhy a to *Salmonella enterica* a *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* se dále člení na 6 podskupin, a ty dále na jednotlivé sérotypy. Více než polovina sérotypů patří do podskupiny *enterica*. Příčinou salmonelózy je zejména *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérotyp *Enteritidis* a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérotyp *Typhimurium* (Brenner et al., 2000)

Primárním hostitelem salmonel nejvíce významných v potravinářství, tedy salmonel způsobujících alimentární intoxikace, jsou zvířata, přesněji jejich zažívací trakt. Tyto salmonely způsobují gastroenteritidy. Onemocnění se projevuje vodnatými průjmy, vyvolanými uvolněným enterotoxinem působícím na sliznici střeva, a trvá až několik dní, někdy i týdnů. Inkubační doba je několik hodin, maximálně dva dny. Většina sérotypů salmonel produkuje i cytotoxin (Görner, Valík, 2004; Jičínská, Havlová, 1995).

Na vyvolání salmonelózy je potřeba vysoké množství salmonel, proto je přenos z člověka na člověka málo pravděpodobný. Přenos probíhá přes kontaminované předměty a potraviny. Mléko a fermentované mléčné výrobky patří mezi méně rizikové potraviny a navíc by salmonely v mléce měla spolehlivě zničit pasterace, protože hynou už kolem 65 °C při působení déle než několik minut. Zdrojem salmonel pak může být jediné kontaminace způsobená lidským faktorem (Görner, Valík, 2004; Jičínská, Havlová, 1995).

Druhou skupinou onemocnění jsou alimentární infekce. Přenáší se mezi lidmi, mohou se přenášet i potravinami. Onemocnění se nazývá břišní tyfus, hlavními původci jsou *Salmonella typhi* a *Salmonella paratyphi* (Görner, Valík, 2004).

3.8.2 *Shigella* spp.

Shigella je rod gramnegativních, fakultativně anaerobních tyčinek z čeledi *Enterobacteriaceae*. Řadí se sem 4 druhy, a to *Shigella sonnei*, *S. flexneri*, *S. boydii* a *S. dysenteriae*. V Evropě převládá z 80 až 90 % *Shigella sonnei*. Přenášejí se mezi lidmi, cestou přenosu je často mléko a mléčné výrobky, ovoce a zelenina. Způsobuje onemocnění zvané bacilární úplavice (Görner, Valík, 2004).

3.8.3 *Yersinia enterocolitica*

Yersinia enterocolitica je fakultativně anaerobní, gramnegativní tyčinka z čeledi *Enterobacteriaceae*. Yersinie se běžně vyskytují jako součást koliformních bakterií v mléce, případně mléčných výrobcích. Většinou jde ale o nepatogenní druhy, nebo nepatogenní sérotypy *Yersinia enterocolitica*.

Y. enterocolitica je původcem gastroenteritid. Mezi její hlavní virulenční faktory patří yersiniový enterotoxin (Jičínská, Havlová, 1995).

Podle studie Gulmez a Guven (2003) má *Y. enterocolitica* schopnost přežít i v průběhu fermentace a dokonce se namnožit. Po 14 dnech skladování dochází k snížení na nulové hodnoty, do té doby je schopná přežívat.

3.8.4 *Escherichia coli*

Escherichia coli jsou fakultativně anaerobní, gramnegativní tyčinky z čeledi *Enterobacteriaceae*. Jsou součástí běžné mikroflóry střeva u člověka i zvířat, v mléce jsou tedy podobně jako některé jiné enterobakterie indikátorem fekálního znečištění. Jsou značně biochemicky aktivní a mají schopnost fermentovat laktózu za tvorby kyseliny mléčné, octové, oxidu uhličitého a vodíku (Görner, Valík, 2004; Jičínská, Havlová, 1995).

Některé *E. coli* mohou způsobovat rozličné choroby, s potravinami obvykle souvisí různé gastroenteritidy způsobené enteropatogenními kmeny. Enteropatogenní kmeny *E. coli* (EEC) se dělí na dvě skupiny podle typu způsobovaného onemocnění. Těmi jsou gastroenteritidy podobné salmonelózám, vyvolávané kmeny EPEC a ETEC (enteropatogenní *E. coli* v užším slova smyslu a Enterotoxigenní *E. coli*.) a onemocnění typu shigelové dysenterie vyvolávané kmeny EIEC a EHEC (enteroinvazivní a enterohemoragické *E. coli*). Nejrizikovější je sérotyp O157:H7 enterohemoragické *E. coli*. Hlavním faktorem virulence u EHEC je verotoxin VT-1 a VT-2 (Jičínská, Havlová, 1995).

U zakysaných mléčných výrobků je proti *E. coli* velmi účinnou prevencí používání aktivních, rychle prokysávajících startovacích kultur. Ty obvykle inhibují či rovnou inaktivují většinu patogenních mikroorganismů, a to včetně EEC. Samozřejmostí je také dodržování hygienických zásad a kontrola mikrobiologické kvality vody (Jičínská, Havlová, 1995).

E. coli O157:H7 dokáže ve výrobcích přežít relativně dlouhou dobu. Například v jogurtu inokulovaném 10^3 KTJ/ml *E. coli* O157:H7 je schopná přežít až 12 dní při pH 4,0 nebo 28 dní v kysané smetaně (při pH 4,3) a v množství větším jak 10^2 KTJ/ml v kysaném podmáslí a to až 35 dní (při pH 4,1). Z toho plyne, že rekontaminace může být i u kysaných mléčných výrobků velmi závažná. Kontaminace startovacích kultur není tolik riziková i přes počáteční nárůst populace *E. coli* vedou další procesy během fermentace k jejich zániku, a to i při počáteční inokulaci 10^5 KTJ/ml. Ve finálním výrobku (po srážení mléka při výrobě) už se *E. coli* nevyskytuje (Dineen et al., 1998)

U kefiru byl v rámci studie Gulmez a Guven (2003) při inokulaci mléka na začátku fermentace sledován nárůst *E. coli*. Po 21 dnech skladování se dostalo množství *E. coli* pod limit detekce.

3.8.5 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes je grampozitivní, fakultativně anaerobní, pohyblivá krátká tyčinka. Dobře roste při 30–37 °C, je psychrotrofní, roste už při 2,5 °C, dokáže se tedy množit i v chladničkové teplotě. Teplotní maximum je 44 °C. Roste i v širokém rozmezí pH (5,0 až 9,0). Je také halotolerantní, roste i v prostředí s koncentrací 10 % NaCl (Görner, Valík, 2004).

Do mléka se *L. monocytogenes* obvykle dostává z kontaminované siláže, méně často při chronických mastitidách skotu. Je málo odolná vůči záhřevu, nepřežívá již šetrnou pasteraci mléka. Názory na schopnost listerie přežívat pasteraci se však různí. Listerii je také obtížné odstranit z prostředí, jakmile ho jednou kontaminuje (Jičínská, Havlová, 1995).

Typický je výskyt listerie v mléčných výrobcích zejména v sýrech a také zmražených mléčných výrobcích, ty jsou velmi častými zdroji infekcí (Jičínská, Havlová, 1995). U kysaných mléčných výrobků, podobně jako u ostatních, záleží, zda dojde ke kontaminaci před fermentací nebo až po ní. Význam mají doby kultivace a použité kultury. Listerie je v těchto výrobcích schopná přežít, ale obvykle jen po určité době, například v jogurtech v řádu několika dnů až týdnů. Krizové je pro ni zejména pH 4 a nižší, při kterém dochází k její inaktivaci. U výrobků s mezofilní kulturou neroste při pH nižším jak 5 (Ryser, Marth, 1999).

U kefíru, podle studie Gulmez a Guven (2003) došlo v průběhu fermentace dokonce k nárůstu *L. monocytogenes*, a jejímu přežití až po dobu 21 dnů.

Listerie je intracelulární parazit, hlavním faktorem patogenity je hemolytický listeriolysin O. U člověka je listerie významným původcem bakteriální meningitidy a to s výraznou úmrtností. Ohrožení jsou především vnímavější a oslabení jedinci. Dále způsobuje sepsi či meningoencefalitidu. K nejohroženějším skupinám patří těhotné ženy, kojenci a staří lidé (Ryser, Marth, 2007).

3.8.6 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus je grampozitivní, fakultativně anaerobní, nepohyblivý kok. Jde o bakterii odolnou, snese i šetrnou pasteraci a dobře se množí i v potravinách s vysokým obsahem soli a cukru. Tvoří mnoho toxinů, je typickým původcem

hnisavých onemocnění a také způsobuje enterotoxikózy vyvolané enterotoxiny. Za vhodných podmínek produkuje několik typů enterotoxinů, nejodolnější je enterotoxin A. Enterotoxiny odolávají i varu, některým proteolytickým enzymům a někdy i sterilaci (Görner, Valík, 2004).

Mnoho zdravých lidí jsou nosiči *S. aureus* a to na sliznicích, kůži, vyskytuje se i ve stolici. Problémem v potravinářství je nosičství enterotoxických kmenů, typické je šíření z hnisavých ran na rukách či rozšiřování kašláním a kýčáním při zánětech nosohltanu. Nejčastější kontaminace mléka je přímo z dojnice, která má stafylokokovou mastitidu (Görner, Valík, 2004; Jičínská, Havlová, 1995).

Kromě syrového mléka jsou nejrizikovějším mléčným výrobkem sýry. V kysaných mléčných výrobcích růst a tvorba bakterií mléčného kvašení a jejich produkty stafylokoků celkem spolehlivě potlačují. Důležitá je zejména rychlost prokysávání zákysovými kulturami (Jičínská, Havlová, 1995).

3.8.7 *Clostridium* spp.

Clostridium je rod obligátně anaerobních, grampozitivních tyčinek, tvořících spory. Alimentární otravy způsobují nejčastěji *Clostridium botulinum* (botulismus) a *Clostridium perfringens* (otravy, průjmy). Nejzávažnější jsou botulinové intoxikace, které se vyznačují vysokým procentem úmrtnosti až 19 % (Jičínská, Havlová, 1995).

Počátečním příznakem botulismu je zvracení a nevolnost, které pravděpodobně způsobuje jiný produkt metabolismu *C. botulinum* než neurotoxiny. Toxin působí nejprve na oblast hlavy a krku a způsobuje symptomy jako dvojí vidění, ptózu víček, rozostřené vidění, sucho v ústech, poruchy polykání a obtížné mluvení. Následuje ochrnutí dalších svalů a smrt následkem ochrnutí dýchacích svalů (Labbé, Garcia, 2001).

Oba uvedené druhy se běžně vyskytují v půdě, *C. perfringens* i v zažívacím traktu člověka a zvířat. Zdrojem kontaminace mléka je často kontaminovaná, pomalu prokysávaná siláž. Kysané mléčné výrobky jako jogurty bývají spíše druhotně kontaminované z přísad (Jičínská, Havlová, 1995).

3.8.8 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus je aerobní až fakultativně anaerobní tyčinka, grampozitivní, sporulující. Spory jsou odolná stádia, která jsou velmi odolná k podmínkám vnějšího prostředí (teplota, vlhkost). V příznivých podmínkách vyklíčí a bakterie se začne množit. *B. cereus* je běžně rozšířený v půdě, prachu, a tudíž se snadno dostává do potravin (Görner, Valík, 2004).

B. cereus způsobuje otravy, k vyvolání příznaků je potřeba velký počet buněk v potravine (10⁵ až 10⁶ KTJ/g). Produkuje řadu toxinů, zejména emetický toxin, diarhogenní toxin, dále například fosfolipázu C a hemolyzin. Podle převažujícího toxinu se pak onemocnění projevuje zvracením či průjmy (Görner, Valík, 2004; Jičínská, Havlová, 1995).

Fermentace u kysaných mléčných výrobků obvykle spolehlivě zabrání množení *B. cereus*. V keříru, podle Kakisu et al. (2007), už přídavek 5 % keřírových zrn k odstředěnému rekonstituovanému mléku spolehlivě zabrání růstu vegetativních forem i klíčení spor během 24 h. inkubace. Po 48 hodinách dochází i ke snižování množství spor. Menší množství zrn už vede k slabému růstu vegetativních forem v počátečních fázích fermentace.

3.8.9 Mikromycety

Mikromycety by se neměly ve fermentovaných mléčných výrobcích vyskytovat. Výjimkou je například *Geotrichum candidum* v keříru či jiné přirozeně se vyskytující mikromycety ve specifických výrobcích. Běžnější je výskyt houbových mikroorganismů v některých výrobcích v kvasinkové formě.

Hlavním zdrojem mikromycet a jejich produktů v mléčných výrobcích je kontaminované mléko, do kterého se dostávají z kontaminovaného krmiva. Prevencí je tedy především kvalita a správné skladování krmiva pro dojný skot.

Hlavním problémem jsou toxické sekundární metabolity plísni – mykotoxiny, produkované zejména rody *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium*. Mezi nejvýznamnější patří ze zdravotního hlediska trichothecenové mykotoxiny, fumisininy a zearalenony produkované fusarii a aflatoxiny, ochratoxiny a patulin produkované rody *Aspergillus* a *Penicillium*. Jedním z významnějších mykotoxinů je aflatoxin. Jde o polyketid produkovaný hlavně plísní *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*. V mléce a mléčných produktech se vyskytuje zejména aflatoxin M1, vznikající metabolizací

aflatoxinu B1 v těle krávy. Aflatoxin M1 patří mezi zdravotně nejzávažnější mykotoxiny. (Fernández et al., 2015).

Nejvýznamnějšími škodlivými účinky mykotoxinů na člověka jsou poškození jater a ledvin. Většina také negativně působí na imunitní systém, některé jsou karcinogenní. Dále mohou vyvolávat halucinace, křeče, poruchy krevního oběhu, poruchy zažívacího traktu, nebo odumírání svaloviny a postupně až končetin (www.bezpecnostpotravin.cz).

3.8.10 Ostatní patogenní mikroorganismy

Bakterie mléčného kvašení v kysaných mléčných výrobcích produkují zejména látky pro člověka prospěšné. V některých případech ale mohou produkovat i toxické metabolity, jde především o biogenní aminy. Jsou to nízkomolekulární dusíkaté látky vznikající především dekarboxylací aminokyselin. Mezi nejčastější a nejdůležitější biogenní aminy nalézané v těchto produktech patří histamin, tyramin, nebo putrescin. Z mléčných výrobků jsou tyto metabolity typické zejména pro sýry, vyskytují se ale i v kysaných mléčných výrobcích. V mléku mohou biogenní aminy produkovat některé kontaminující mikroorganismy, zejména z čeledi *Enterobacteriaceae*. Dalšími významnými producenty biogenních aminů mohou být bakterie mléčného kvašení, jako jsou rody *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* a *Streptococcus* (Fernández et al., 2015).

Vysoké dávky biogenních aminů, případně porucha jejich metabolismu, mohou způsobit řadu obtíží, například zvýšení produkce adrenalinu a noradrenalinu, vyšší sekreci žaludečních šťáv, migrény, tachykardii, zvýšení krevního cukru, vysoký krevní tlak či různé alergické reakce. (Spano et al, 2010).

3.9 Prevence vad a výskytu nežádoucích mikroorganismů

Hlavní prevencí vad i výskytu patogenních mikroorganismů je hygiena dojení a následného zpracování mléka. Musí být dodržovány podmínky stanovené zákony, jako jsou CPM, počet somatických buněk, či obsah reziduí inhibičních látek. K tomu je potřeba pravidelně tyto hodnoty kontrolovat. Základem kvalitního mléka je i dobrý zdravotní stav dojnice, problémem je především výskyt mastitid. Při dojení se musí správně postupovat, desinfikovat struk, a vždy odebrat vzorek do nádoby s černým

dnem na posouzení množství somatických buněk. Mléko musí být do dalšího zpracování uchováváno při nízkých teplotách. Dojící zařízení, stejně tak i cisterny na mléko se musí pravidelně čistit, a to jak kyselými čistícími prostředky na anorganické usazeniny, tak zásaditými na organické nečistoty (Görner, Valík, 2004; Hylmar, 1986).

Významným technologickým krokem pro redukci CPM a většiny patogenních mikroorganismů je pastace mléka. Nejčastěji využívaná je šetrná pastace při 72 °C 15 sekund, nebo pastace při 63 °C 30 minut. Škodlivé bakterie a spory, které přežijí pastaci, jsou obvykle devitalizovány a omezovány dalšími procesy při výrobě kysaných mléčných výrobků (Smith, 2003). Tepelné ošetření mléka vede také ke zlepšení vlastností mléka pro výrobu (Hylmar, 1986).

Pro prevenci vad a prevenci rozmnožení případných přítomných patogenních mikroorganismů je pochopitelně zásadní i samotná výroba. Ta je rozdílná dle typu výrobku a použité čisté mlékařské kultury. Důležitá je mikrobiologická kvalita čistých mlékařských kultur a inkubace při správné teplotě po vhodnou dobu. U hotového produktu by se mělo co nejdříve započít s chlazením na skladovací teplotu (5 až 10 °C, ideálně 2 až 5 °C). Zchlazení nesmí probíhat příliš pomalu, jinak může dojít k dalšímu prokysávání, ani příliš rychle, protože mohou vznikat reologické vady. Ke kontaminaci může dojít i po výrobě buď v tancích či při balení. Dále i prostřednictvím aditiv a přísad jako jsou například ovocné složky ochucených jogurtů, proto i tyto složky musí splňovat přísná mikrobiologická kritéria (Görner, Valík, 2004; Hylmar, 1986).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Analyzovaný materiál

Pro mikrobiologické analýzy bylo vybráno pět vzorků kefíru pocházejících od různých výrobců či z domácí produkce.

Domácí kefír

Prvním vzorkem byl domácí kefír vyráběný tradičním způsobem pomocí keřírových zrn z nepasterovaného kravského mléka zakoupeného v mlékomatu v Brně Vinohradech (kvašení při pokojové teplotě). Cena mléka byla 16 Kč za objem 1 litr. Přesný původ keřírových zrn (jako např. místo zakoupení) nelze dohledat, jelikož jsou podomácku množena a předávána vzájemně mezi lidmi. K dostání jsou keřírová zrna často přes různá internetová fóra a stránky.

Kefír byl analyzován jednak čerstvý (čerstvě zfermentovaný, vysrážený v tentýž den, kdy proběhlo zaočkování) jako vzorek číslo 1 a po 4 dnech skladování a dalšího prokysávání při chladničkové teplotě jako vzorek číslo 5.

Originální kefír z Krasolesí

Vzorkem číslo 2 byl kefír vyráběný mlékárnou Krasolesí. Kefír je vyráběn z pasterovaného kravského mléka. Obsah tuku je min. 4 %. Zakoupen byl ve farmářském obchodu Sklizeno v Brně, cena kefíru byla 43 Kč za láhev o objemu 500 ml.

Kozí kefír (farma Zahrádka)

Vzorkem číslo 3 byl kozí kefír vyráběný farmou Zahrádka. Jde o kefír vyrobený z pasterovaného kozího biomléka. Obsah tuku je min. 3 %. Cena kefíru byla 30 Kč za balení o objemu 330 ml, zakoupen byl v prodejně Albert Hypermarket.

BIO Kozí kefír (kozí farma Pěčín)

Vzorkem číslo 4 byl BIO kozí kefír z farmy Pěčín. Kefír je vyrobený z pasterovaného kozího biomléka pomocí keřírové kultury. Obsah tuku je min. 3 %. Zakoupen byl v supermarketu Kaufland, za cenu 32 Kč za balení o objemu 500 ml.

4.2 Kultivační půdy

Pro mikrobiologickou analýzu byla použita následující živná média.

MRS Agar (Biokar Diagnostics, Francie)

MRS agar slouží k mikrobiologickému stanovení bakterií mléčného kvašení. Kultivace probíhá 72 h při 30 °C.

Složení:

Enzymaticky naštěpený kasein – 10,00 g, masový extrakt – 10,00 g, kvasničný extrakt – 4,00 g, glukóza – 20,00 g, Tween 80 – 1,08 g, hydrogenfosforečnan draselný – 2,00 g, octan sodný – 5,00 g, citrát amonný – 2,00 g, síran hořečnatý – 0,20 g, síran manganatý – 0,05 g, bakteriologický agar – 16,00 g.

Příprava:

70,3 g dehydratovaného média se rozpustí v jednom litru destilované nebo demineralizované vody. Za stálého, pomalého míchání se pomalu přivede k varu, až do úplného rozpuštění. Poté se půda rozlije do zkumavek nebo lahvíček, a sterilizuje v autoklávu při 121 °C 15 minut. Před použitím se ochladí a udržuje v tekutém stavu při 44 – 47 °C. pH připraveného média při 25 °C je $5,7 \pm 0,1$. Podle potřeby je možno pH před sterilací upravit (pomocí kyseliny octové či NaOH).

PCA with skimmed milk (Biokar Diagnostics, Francie)

PCA s odstředěným mlékem slouží k mikrobiologickému stanovení celkového počtu mikroorganismů za aerobních podmínek. Doporučená je kultivace 72 h při 30 °C.

Složení:

Trypton – 5,0 g, kvasničný extrakt – 2,5 g, glukóza – 1,0 g, sušené odstředěné mléko (zbavené inhibičních látek) – 1,0 g, bakteriologický agar – 12 g.

Příprava:

24,5 g dehydratovaného média se rozpustí v jednom litru destilované nebo demineralizované vody. Za stálého míchání se pomalu přivede k varu, až do úplného rozpuštění. Poté se půda rozlije do zkumavek nebo lahvíček, a sterilizuje v autoklávu při 121 °C 15 minut. Před použitím se ochladí a udržuje v tekutém stavu při 44 – 47 °C. pH připraveného média při 25 °C by mělo být $7,0 \pm 0,2$. Podle potřeby je možno pH před sterilací upravit (pomocí kyseliny octové či NaOH).

COMPASS *Enterococcus* Agar (Biokar Diagnostics, Francie)

COMPASS *Enterococcus* agar slouží k mikrobiologickému stanovení enterokoků. Doporučená je kultivace 24 ± 2 h při 44 ± 1 °C.

Složení:

Peptony – 27,5 g, kvasničný extrakt – 5,0 g, chlorid sodný – 5,0 g, Tween 80 – 1,0 g, inhibiční směs – 0,3 g, X-β-glukosid – 0,1 g, bakteriologický agar – 14 g.

Příprava:

52,9 g dehydratovaného média se rozpustí v jednom litru destilované nebo demineralizované vody. Pomalu se míchá až do úplného rozpuštění. Poté se půda rozlije do zkumavek nebo lahvíček, a sterilizuje v autoklávu při 121 °C 15 minut. Před použitím se ochladí a udržuje v tekutém stavu při 44 – 47 °C. pH připraveného média při 25 °C by mělo být $7,5 \pm 0,2$. Podle potřeby je možno pH před sterilací upravit (pomocí kyseliny octové či NaOH).

Chloramphenicol Glucose Agar (Biokar Diagnostics, Francie)

Půda s glukózou a chloramfenikolem slouží k mikrobiologickému stanovení kvasinek a plísní. Doporučená je kultivace 3 až 5 dnů při 25 °C.

Složení:

Kvasničný extrakt – 5,0 g, glukóza – 20,0 g, chloramfenikol – 0,1 g, bakteriologický agar – 15,0 g.

Příprava:

40,1 g dehydratovaného média se rozpustí v jednom litru destilované nebo demineralizované vody. Za stálého, pomalého míchání se pomalu přivede k varu, až do úplného rozpuštění. Půda se sterilizuje v autoklávu při 121 °C 15 minut. Před použitím se ochladí a udržuje v tekutém stavu při 44 – 47 °C. pH připraveného média při 25 °C by mělo být $6,6 \pm 0,2$. Podle potřeby je možno pH před sterilací upravit (pomocí kyseliny octové či NaOH).

VRBL Agar (Biokar Diagnostics, Francie)

VRBL agar slouží k mikrobiologickému stanovení koliformních bakterií. Doporučená je kultivace 24 ± 2 h při 30 nebo 44 °C.

Složení:

Pepticky natrávené maso – 7,0 g, kvasničný extrakt – 3,0 g, laktóza – 10,0 g, žlučové soli – 1,5 g, chlorid sodný – 5,0 g, neutrální červeň – 30,0 mg, krystalová violet – 2,0 g, bakteriologický agar – 12,0 g.

Příprava:

38,5 g dehydratovaného média se rozpustí v jednom litru destilované nebo demineralizované vody. Za stálého míchání se pomalu přivede k varu, až do úplného rozpuštění. Ve varu se pokračuje ještě 2 minuty. Půda se nesterilizuje. Před použitím se ochladí a udržuje v tekutém stavu při 44 – 47 °C. Použití do 4 hodin od přípravy. pH připraveného média při 25 °C by mělo být $7,4 \pm 0,2$. Podle potřeby je možno pH před sterilací upravit (pomocí kyseliny octové či NaOH).

4.3 Vlastní mikrobiologická analýza

Vzorky keříru v originálních obalech nebo ve sterilních vzorkovnicích byly zchlazené dopraveny do mikrobiologické laboratoře. V rámci mikrobiologické analýzy byly ve vzorcích stanovovány následující skupiny mikroorganismů: celkový počet mikroorganismů (CPM) na PCA with skimmed milk při 30 °C za 72 h, bakterie mléčného kvašení (BMK) na MRS agaru při 30 °C za 72 h aerobně a při 37 °C za 72 h anaerobně, enterokoky na COMPASS *Enterococcus* Agar při 45 °C za 24 h, koliformní mikroorganismy na VRBL agaru při 37 °C za 24 h a kvasinky a plísně na Chloramphenicol Glucose Agar při 25 °C za 72 h.

Ze vzorků keříru bylo připraveno desítkové ředění v rozmezí 10^{-1} až 10^{-7} . 1 ml keříru nebo příslušného ředění byl inokulován do sterilních jednorázových Petriho misek a zalit příslušnou živnou půdou zchlazenou na cca 45 °C. Po zatuhnutí byly Petriho misky umístěny do termostatů a kultivovány po předepsanou dobu při příslušné teplotě. Po uplynutí doby kultivace byly na Petriho miskách odečteny typické narostlé kolonie a po přepočtu byl výsledek vyjádřen jako kolonie tvořící jednotky (KTJ) v 1 ml keříru. Pro přepočet byl použit následující vzorec:

$$N = \frac{\sum c}{V(n1 + 0,1.n2)d}$$

N = počet kolonií tvořících jednotek na mililitr (KTJ/ml)

$\sum c$ = součet kolonií ze všech misek ve dvou po sobě jdoucích ředěních

V = objem inokula

d = faktor ředění prvního ze dvou po sobě jdoucích ředění

n1 = počet misek vybraných pro výpočet z prvního ředění

n2 = počet misek vybraných pro výpočet z druhého ředění

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Při mikrobiologické analýze pěti vzorků kefíru pocházejících z obchodní sítě nebo domácí výroby byly stanovovány tyto skupiny mikroorganismů: celkový počet mikroorganismů (CPM), bakterie mléčného kvašení (BMK) za aerobních a anaerobních podmínek, enterokoky, koliformní mikroorganismy a kvasinky a plísně. Výsledky analýzy jsou uvedeny v Tab. č. 2.

Tab. č. 2 – Zjištěná množství mikroorganismů ve vzorcích kefíru v KTJ/ml

	CPM	BMK aerobně	BMK anaerobně	Koliformní bakterie	Enterokoky	Kvasinky a plísně
Domácí kefír čerstvý	$3,2 \cdot 10^7$	$< 10^5$	$< 10^5$	$7,9 \cdot 10^2$	$6,3 \cdot 10^1$	$3,0 \cdot 10^6$
Originální kefír z Krasolesí	$3,3 \cdot 10^7$	$< 10^5$	$2,2 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^1$	$2,5 \cdot 10^1$	$1,2 \cdot 10^6$
Kozí kefír (farma Zahrádka)	$4,7 \cdot 10^7$	$4,5 \cdot 10^6$	$4,2 \cdot 10^6$	ND	$2,0 \cdot 10^3$	$6,5 \cdot 10^2$
BIO kozí kefír (kozí farma Pěňčín)	$3,9 \cdot 10^7$	$< 10^5$	$1,5 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^1$	ND	$1,4 \cdot 10^5$
Domácí kefír zralý	$5,9 \cdot 10^9$	$1,0 \cdot 10^6$	$4,1 \cdot 10^6$	$8,5 \cdot 10^1$	$4,4 \cdot 10^2$	$6,0 \cdot 10^6$

CPM – celkový počet mikroorganismů. BMK – bakterie mléčného kvašení, ND – nedetekováno

Na základě subjektivního sensorického hodnocení lze za nejlepší kefír ze stanovovaných vzorků označit Originální kefír z Krasolesí. Kefír měl dobrou, nakyslou mléčnou chuť a byl výrazně perlivý. Vzhledem k tomu, že byl jako jediný ze zakoupených kefírů vyroben v mlékárně, lze předpokládat, že to mělo do jisté míry vliv na jeho dobrou kvalitu. Čerstvý domácí kefír měl dobrou chuť i perlivost, pouze s drobnými vedlejšími příchutěmi. Zralejší domácí kefír byl více perlivý a kyselejší. BIO kozí kefír z farmy Pěňčín po chuťové stránce kefír nepřipomínal a neměl ani

náznak perlivosti a to ani po delší době skladování při chladničkové teplotě. Kozí kefír z farmy Zahradka měl výrazně nepříjemnou chuť po kozím mléce a také nebyl perlivý.

Technologicky nejdůležitější mikroorganismy při výrobě kefíru jsou bakterie mléčného kvašení. K hlavním zástupcům patří rody *Lactococcus*, *Lactobacillus*, a *Leuconostoc* (Kněz et al., 1960; Görner, Valík, 2004; Vyhláška č. 397/2016 Sb.) V námi analyzovaných vzorcích kefíru byly jejich počty stanoveny v rozmezí řádově 10^5 až 10^6 KTJ/ml (viz Tab. č. 2.). Na Obr. č. 1. lze sledovat narostlé kolonie laktobacilů po anaerobní kultivaci na MRS agaru. Legislativní požadavky, kladené na obsah těchto bakterií v kefírech, jsou min. 10^6 na 1 g výrobku (Vyhláška č. 397/2016 Sb., příloha č. 1). Vzhledem k tomu, že tato skupina bakterií má různé nároky na kultivaci, nelze námi zjištěné nižší hodnoty považovat za nevyhovující.



Obr. č. 1: Ukázka nárůstu kolonií bakterií mléčného kvašení po anaerobní kultivaci na MRS agaru

Ve vzorcích kefíru byl stanovován i celkový počet mikroorganismů, i když není legislativou požadován. Existuje ale doporučené minimální množství mikroorganismů v kefíru podle FAO/WHO (2011), které by mělo být minimálně 10^7 v 1 g výrobku. CPM poskytuje informaci o celkové kontaminaci potravin, to však vzhledem k tomu, že kefír je fermentovaný výrobek, v tomto případě neplatí, protože do CPM se výrazně promítají počty použité kulturní mikroflóry. Tomu odpovídají i námi zjištěné vysoké počty řádově 10^7 až 10^9 KTJ/ml (viz Tab. č. 2.).

Vezmeme-li v úvahu obě výše popsané skupiny mikroorganismů a vysoké počty, kterých dosahují v analyzovaných vzorcích, lze předpokládat, že legislativní požadavky pro bakterie mléčného kvašení v keфіru, tedy 10^6 v 1 g výrobku, byly splněny.

Další stanovovanou skupinou mikroorganismů ve vzorcích keфіru byly koliformní bakterie. Jde o bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*, jejichž výskyt v potravinách indikuje jejich kontaminaci. Patří sem zejména *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Citrobacter* či *Klebsiella*. Běžně se stanovují v potravinářství jako indikátory fekálního znečištění, jako indikátory špatné hygieny a sanitace či nedostatečného tepelného ošetření. U keфіru mohou způsobovat senzorické vady, především co se týče chuti (Němcová et al., 2011; Teplý et al., 1968). V námi analyzovaných vzorcích keфіru byly stanoveny počty koliformních bakterií v rozmezí řádově 10^1 až 10^2 KTJ/ml (viz Tab. č. 2.). Ukázku narostlých kolonií koliformních bakterií na VRBL agaru lze vidět na Obr. č. 2. Nízké hodnoty koliformních bakterií lze vzhledem k horším hygienickým podmínkám při výrobě domácího keфіru i keфіrů pocházejících z farem považovat za vyhovující. Lze také sledovat snížení počtu koliformních bakterií u zralého domácího keфіru oproti čerstvému. Příčinou snížení je pravděpodobně vyšší množství bakterií mléčného kvašení ve zralějším keфіru, vyšší kyselost a s tím související potlačení aktivity některých mikroorganismů.



Obr. č. 2: Ukázka nárůstu kolonií koliformních bakterií na VRBL agaru

Předposlední skupinou stanovovaných mikroorganismů ve vzorcích keфіru byly enterokoky. Enterokoky se řadí mezi bakterie mléčného kvašení, ale v keфіru se

vyskytovat nemusí. Jsou to ubikvitární mikroorganismy, mohou být považovány i za kontaminanty. Mezi nejčastější enterokoky nalézané v keříru, případně keřírových zrnech, patří *Enterococcus durans*, *E. faecalis* a *E. faecium* (Carasi et al., 2014). V námi analyzovaných vzorcích keříru byly stanoveny počty enterokoků v rozmezí řádově 10^1 až 10^3 (viz Tab. č. 2.). U domácího keříru došlo v průběhu dozrávání k zvýšení počtu enterokoků, stejně jako u ostatních bakterií mléčného kvašení. Typický vzhled kolonií enterokoků na COMPASS *Enterococcus* Agar lze vidět na Obr. č.3.



Obr. č. 3: Ukázka nárůstu kolonií enterokoků na COMPASS *Enterococcus* agaru

Poslední stanovovanou skupinou mikroorganismů byly kvasinky. Kvasinky jsou nezbytnou součástí mlékárenských kultur pro výrobu keříru, patří k nim hlavně *Kluyveromyces fragilis* a *Candida kefir*. V keříru rostou v symbióze s bakteriemi mléčného kvašení, a produkují zejména oxid uhličitý a ethanol (Görner, Valík, 2004). Vzhledem k tomu že jde o nezbytnou součást mikroflóry keříru, vztahuje se na jejich množství i legislativa. Legislativní požadavky na obsah kvasinek v keříru jsou min. 10^4 na 1 g výrobku (Vyhláška č. 397/2016 Sb., příloha č. 1). S výjimkou kozího keříru z farmy Zahrádka, který ale splňuje limit pro keřírové mléko, všechny vzorky keříru legislativní požadavky na obsah kvasinek splňují.

6 ZÁVĚR

Mikroflóra kysaných mléčných výrobků je pojem zahrnující jak prospěšné mikroorganismy, které tyto výrobky fermentují, tak i kontaminující a patogenní mikroflóru. Z těch prospěšných, a to jak pro výrobu, tak pro zdraví člověka, jsou to zejména bakterie mléčného kvašení, jako jsou *Lactobacillus*, *Lactococcus* nebo *Leuconostoc*. Ke kontaminujícím mikroorganismům mohou patřit například *Acetobacter* nebo kvasinky. K nejnebezpečnějším patogenním mikroorganismům, které se mohou ve výrobcích vyskytnout, řadíme např. *Escherichia coli* O157:H7 či *Listeria monocytogenes*. Kysané mléčné výrobky jsou ale také známy tím, že dokáží patogenní mikroorganismy velmi úspěšně eliminovat přirozenými procesy, které v nich probíhají.

Kefír je výrobek fermentovaný pomocí kultury zahrnující bakterie mléčného kvašení i kvasinky. Je typický svou perlivostí, chutí a nízkým obsahem ethanolu. V ČR se setkáme zejména s kefírovými mléky, dostupnými běžně v supermarketech, kefíry jsou méně časté, zakoupit se dají převážně v různých farmářských obchodech.

Mikroflóra kefírů je značně variabilní a bývá velmi typická pro jednotlivé země, ale zároveň rozdílná podle výrobce. To lze vysledovat i ze zjištěné mikroflóry analyzovaných kefírů v praktické části. Rozdíly jsou patrné například v přítomnosti či nepřítomnosti enterokoků, v různých množstvích přítomných kvasinek i různých zastoupení bakterií mléčného kvašení.

Analyzované zakoupené kefíry i domácí kefír splnily legislativní požadavky, s výjimkou kozího kefíru z farmy Zahrádka, který měl nižší hodnoty kvasinek, splňoval však požadavek pro kefírové mléko. Po sensorické stránce byly všechny kefíry výrazně odlišné a ve spojení s výsledky mikrobiologické analýzy lze říci, že celková kvalita jednotlivých kefírů je značně variabilní. Lze předpokládat, že podobně rozdílné budou i další české kefíry od jiných mlékáren a farem. Nízká uniformita kefírů od různých výrobců může být považována za výhodnou, protože si každý konzument může z dostupné nabídky vybrat kefír přesně podle svých preferencí. Některé kefíry jsou ale svými vlastnostmi natolik typické, že mohou případného kupujícího spíše odradit.

7 POUŽITÉ ZDROJE

HYLMAR B., 1986: *Výroba kysaných mléčných výrobků*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 212 s.

GÖRNER F., VALÍK L., 2004: *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. Bratislava: Malé centrum, 528 s. ISBN 80-967064-9-7.

TEPLÝ M., HYLMAR B., KALINA Č., RUMLOVÁ V., 1968: *Kefír, jogurt, acidofilní a jiné kyselky*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 185 s.

JIČÍNSKÁ E., HAVLOVÁ J., 1995: *Patogenní mikroorganismy v mléce a mlékárenských výrobcích*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 106 s. ISBN 808512047X.

KNĚZ V., MAŠEK J., MAXA V., TEPLÝ M., VEDLICH M., 1960: *Čisté mlékařské kultury a jejich použití v mlékárenském průmyslu*. 2. vydání. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 297 s.

TAMIME A. Y., 2006: *Fermented milks*. Oxford: Blackwell Science/SDT, 266 s. ISBN 0632064587.

CHANDAN R. C., 2006: *Manufacturing yogurt and fermented milks*. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 364 s. ISBN 9780813823041.

RYSER T. E., MARTH H. E., 1999: *Listeria: Listeriosis, and Food Safety, Second Edition*. CRC Press, 750 s. ISBN 9781420000870.

RYSER T. E., MARTH H. E., 2007: *Listeria: Listeriosis, and Food Safety, Third Edition*. CRC Press, 896 s. ISBN 9780824757502.

SMITH G., 2003: *Dairy Processing: Improving Quality*. CRC Press, 536 s. ISBN 9781855737075.

BATT A. C., TORTORELLO L. M., 2014: *Encyclopedia of food microbiology*. 2. vydání. Amsterdam: Elsevier, 3248 s. ISBN 9780123847300.

LABBÉ G. R., GARCIA S., 2001: *Guide to Foodborn Pathogens*. John Wiley & Sons, 373 s. ISBN 9780471350347.

FAO/WHO, 2011: *Codex Alimentarius: Milk and Milk Products*. 2. vydání. Řím: Food and Agriculture Organisation of the United Nations, 244 s. ISBN 9251067864.

PARMJIT P. S., 2011: Fermented Dairy Products: Starter Cultures and Potential Nutritional Benefist. *Food and Nutrition Sciences* [online]. 2(1): 47-57 [cit. 2.2.2017]. Dostupné z: doi:10.4236/fns.2011.21006.

TAMIME A. Y., 2002: Fermented milks: a historical food with modern applications – a review. *European Journal of Clinical Nutrition* [online]. 56(4): 2-15 [cit. 2.2.2017]. Dostupné z: doi:10.1038/sj.ejcn.1601657

SAEED M., YASMIN I., KHAN A. W., 2016: Functional and therapeutic effects of fermented milk. *Dairy foods* [online]. [cit. 3.2.2017]. Dostupné z: <http://www.dairyfoods.com/articles/91743-functional-and-therapeutic-effects-of-fermented-milk>

MARCÓ B. M., MOINEAU S., QUIBERONI A., 2012: Bacteriophages and dairy fermentations. *Bacteriophage* [online]. 2(3): 149-158 [cit. 13.2.2017]. Dostupné z: doi:10.4161/bact.21868

PRADO R. M., BLANDÓN M. L., VANDENBERGHE S. P. L., RODRUGUES C., CASTRO R. G., THOMAZ-SOCCOL V., SOCCOL R. C., 2015: Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in Microbiology* [online]. 6(1177) [cit. 15.2.2017]. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2015.01177

GAO X., LI B. 2016: Chemical and microbiological characteristics of kefir grains and their fermented dairy products: A review. *Cogent Food & Agriculture* [online]. 2(1272152): [cit. 16.2.2017]. Dostupné z: doi:10.1080/23311932.2016.1272152

POGAČIĆ T., ŠINKO S., ZAMBERLIN Š., SAMARŽIJA D., 2013: Microbiota of kefir grains. *Mljekarstvo*. 63(1): 3-14 [cit. 15.2.2017]. ISSN 0026-704X.

WANG SHENG-YAO, CHEN KUN-NANM LO YUNG-MING, CHIANG MING-LUN, CHEN HSI-CHIA, LIU JE-RUEI, CHEN MING-JU, 2012: Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. *Food Microbiology* [online]. 32(2): 274-285 [cit. 16.2.2017]. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2012.07.001

LACMANOVÁ I., DRÁB V., VOLNÁ L., 2010: Aplikace probiotických kultur laktobacilů v mléčných výrobcích typu kefiru. *Mlékařské listy*. 123: 18-21. ISSN 1212-950X.

NĚMCOVÁ M., KALHOTKA L., FIŠEROVÁ H., 2011: Metabolická aktivita vybraných mikroorganismů v kravském a kozím mléce. *Mlékařské listy*. 125: 10-14. ISSN 1212-950X.

FARNWORTH R. E., 2005: Kefir – a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin* [online]. 2(1): 1-17 [cit. 8.2.2017]. Dostupné z: doi:10.1616/1476-2137.13938

MONTANARI G., ZAMBONELLI C., GRAZIA L., KAMASHEVA K. G., SHIGAEVA KH. M., 1996: *Saccharomyces unisporus* as the principal alcoholic fermentation microorganism of traditional koumiss. *Journal of Dairy Research*. 63(2) 327-331. Dostupné z: doi:10.1017/S0022029900031836

LEDENBACH H. L., MARSHALL T. R., 2010: Microbial Spoilage of Dairy Products. *Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages, Food Microbiology and Food Safety* [online]. 41-47 [cit. 10.2.2017]. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4419-0826-1_2

FERNÁNDEZ M., HUDSON A. J., KORPELA R., DE LOS REYES-FAVILÁN G. C., 2015: Impact on Human Health of Microorganisms Present in Fermented Dairy Products: An Overview. *BioMed Research international* [online]. 2015. 13 s. [cit. 11.2.2017]. Dostupné z: doi:10.1155/2015/412714

JOHN M. S., DEESEENTHUM S., 2015: Properties and benefits of kefir -A review. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 37(3), 275-282. ISSN 0125-3395.

BRENNER W. F., VILLAR G. R., ANGULO J. F., TAUXE R., SWAMINATHAN B., 2000: Salmonella Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 38(7) 2465-2467 [cit. 11.2.2017]. ISSN: 1098-660X.

GULMEZ M., GUVEN A., 2003: Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* 4b and *Yersinia enterocolitica* O3 in ayran and modified kefir as pre- and postfermentation contaminant. *Veterinárni medicína* [online]. 48(5) 226-132 [cit. 11.2.2017]. ISSN 1805-9392.

DINEEN S. S., TEKEUCHI K., SOUDAH E. J., BOOR J. K., 1998: Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 in Dairy Fermentation Systems. *Journal of food protection* [online]. 61(12) 1602-1608 [cit. 12.2.2017]. Dostupné z: doi:10.4315/0362-028X-61.12.1602

KAKISU J. E., ABRAHAM G. A., PÉREZ F. P., DE ANTONI L. G., 2007: Inhibition of *Bacillus cereus* in Milk Fermented with Kefir Grains. *Journal of food protection* [online]. 70(11) 2613-2616 [cit. 12.2.2017]. Dostupné z: doi:10.4315/0362-028X-70.11.2613

SPANO G., RUSSO P., LONVAUD-FUNEL A., LUCAS P., ALEXANDRE H., GRANDVALET H., COTON E., COTON M., BARNAVON L., BACH B., RATTRAY F., BUNTE A., MAGNI C., LADERO V., ALVAREZ M., FERNÁNDEZ M., LOPEZ P., DE PALENCIA F. P., CORBI A., TRIP H., LOLKEMA S. J., 2010: Biogenic amines in fermented foods. *European Journal of Clinical Nutrition* [online]. 64(3), 95-100 [cit. 12.2.2017]. Dostupné z: doi:10.1038/ejcn.2010.218

CARASI P., JACQUOT C., ROMANIN E. D., ELIE A.-M., DE ANTONI L. G., URDACI C. M., DE LOS SERRADEL A. M., 2014: Safety and Potential beneficial Properties of *Enterococcus* strains isolated from kefir. *International Dairy Journal* [online]. 39(1) 193-200 [cit. 27.2.2017]. Dostupné z: 10.1016/j.idairyj.2014.06.009

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu.

Vyhláška č. 397/2016 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje.

Hodnocení: Kefírová mléka, 2016. *Zdravá potravina* [cit. 5.2.2017]. Dostupné z: <http://www.zdravapotravina.cz/clanky/hodnoceni-kefirova-mleka>

O skyru. *Skyr Kapucín* [cit. 7.2.2017]. Dostupné z: <https://www.skyr-kapucin.cz/>

Mykotoxiny. *Bezpečnost potravin* [cit. 12.2.2017]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76672.aspx>

Mimořádná kontrola jakosti a označování zakysaných mléčných výrobků - (za)kysané smetany, 2014. *Potraviny pranýři*. [cit. 11.03.2017]. Dostupné z: <http://www.potravinynapranryri.cz/InspProduct.aspx?scontrol=38&sbranch=77&lang=cs&design=default&archive=actual&listtype=tiles&page=1>