

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta
Katedra veterinárních disciplín a kvality produktů

Diplomová práce

**SLEDOVÁNÍ RŮSTU KULTURNÍ MIKROFLÓRY
V JOGURTU V PRŮBĚHU MINIMÁLNÍ DOBY
TRVANLIVOSTI**

(Monitoring the growth of cultural microflora in yoghurt during the minimum period of
durability)

Vedoucí: doc. Ing. Eva Samková, Ph.D.
Autor práce: Bc. Hana Leherová
Fakulta: Zemědělská
Katedra: Veterinárních disciplín a kvality produktů
Studijní obor: N4101 Agropodnikání
Ročník: 2

České Budějovice 2013

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta zemědělská
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Ilana LEHNEROVÁ
Osobní číslo: Z11698
Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství
Studijní obor: Agropodnikání
Název tématu: Sledování růstu kulturní mikroflóry v jogurtu v průběhu minimální doby trvanlivosti
Zadávací katedra: Katedra veterinárních disciplin a kvality produktů

Zásady pro vypracování:

Jogurt patří mezi oblíbené kysané mléčné výrobky. Podle současné platné legislativy musí obsahovat živé mikroorganismy v přesně definovaném množství, a to po dobu deklarované spotřeby.

Cílem práce bude sledovat počet mikroorganismů jogurtové kultury (*Streptococcus salivarius*, subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii*, subsp. *bulgaricus*) ve vybraných jogurtech po ukončení zračního procesu a posoudit zjištěné hodnoty s požadavky legislativy.

Diplomová práce je součástí řešení projektu OP VK CZ.1.07/2.3.00/09.0081 a bude vypracována na základě pokynů uvedených na www.zf.jcu.cz/studenti/informace-pro-studujici/ podle následující osnovy:

1. Úvod - význam řešené problematiky včetně uvedení cílů práce
2. Literární přehled - současný stav poznání problematiky
3. Materiál a metodika - popis použitých analytických metod včetně metod statistických
4. Výsledky a diskuse - tabulkové a grafické zpracování získaných dat navazující na cíl práce, jejich statistické vyhodnocení a porovnání se zjištěnými literárními údaji
5. Závěr - shrnutí výsledků vlastní práce a doporučení vyplývající z řešené problematiky
6. Summary - přehled a nejdůležitější výsledky včetně klíčových slov (v anglickém jazyce)
7. Seznam literatury - podle zásad ČSN 01 0197, ČSN ISO 690 a ČSN ISO 690-2.

Rozsah grafických prací: Tabulky a grafy dle vlastního uvážení.

Rozsah pracovní zprávy: 40-50 stran textu

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

- SACCARO, D.M. et al.: The viability of three probiotic organisms grown with yoghurt starter cultures during storage for 21 days at 4 degrees C. International Journal of Dairy Technology, 2009, 62 (3): 397-404.
- SCHIARL, M. et al.: Dying in yoghurt: the number of living bacteria in probiotic yoghurt decreases under exposure to room temperature. DIGESTION, 2011, 83 (1-2): 13-17.
- ŠILHÁNKOVÁ, L.: Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. 3. vyd. Praha: Academia, 2002. 363 s. ISBN: 80-200-1024-6.
- Databáze WOS, Česká zemědělská bibliografie, CAB Abstracts, PROQUEST, dostupné na: <http://www.lib.jcu.cz/cs/databaze>
- Vědecké a odborné články v časopisech a sbornících: př. Výživa a potraviny, Mlékařské listy, Den mléka (Praha: ČZU), Mléko a sýry (Praha: VŠCHT), Ingrovy dny (Brno: MENDELU)
- Vyhláška MZe č.77/2003, kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. Částka: 32/2003 Sb.

Vedoucí diplomové práce: Ing. Eva Samková, Ph.D.

Katedra veterinárních disciplin a kvality produktů

Konzultant diplomové práce: MVDr. Lucie Hasoňová, Ph.D.

Katedra veterinárních disciplin a kvality produktů

Datum zadání diplomové práce: 26. března 2012

Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2013



Ing. Karel Suchý, Ph.D.

prodávka pověřený vedením ZF

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13
370 05 České Budějovice
L.S.



prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.

vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 26. března 2012

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích 1. dubna 2013

Bc. Hana Leherová

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu diplomové práce doc. Ing. Evě Samkové, Ph.D. za cenné rady, připomínky a metodické vedení práce.

Dále bych chtěla poděkovat vedení společnosti “AGRO-LA“, spol. s r.o. v Jindřichově Hradci za umožnění naměření experimentální části práce a za vstřícnost při poskytování cenných informací, zejména děkuji Tomáši Vtípilovi a Ing. Věře Svačinové. Neméně děkuji celé své rodině a přátelům za podporu při studiích.

ABSTRAKT

Cílem diplomové práce bylo sledovat počet mikroorganismů jogurtové kultury *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* ve vybraných jogurtech po ukončení zračního procesu a posoudit zjištěné hodnoty s požadavky legislativy.

V literární rešerši jsou zmíněny fermentované mléčné výrobky a jejich rozdělení, charakteristika jednotlivých druhů bakterií mléčného kvašení a nejsou opomenuty ani čisté mlékařské kultury využívané k výrobě kysaných mléčných výrobků. Experimentální část je věnována vyhodnocení mikrobiologických analýz a kyselosti vybraných jogurtů v závislosti na vlivu výrobce a doby skladování.

Zjištěné výsledky ukázaly, že legislativní požadavek pro počet živých mikroorganismů byl dodržen nejen v předepsané době ukončení spotřeby, ale i během celého pokusu, tedy i 56. den skladování.

Klíčová slova: jogurt, bakterie mléčného kvašení, přežívání bakterií, kyselost, skladování.

ABSTRACT

The object of the dissertation was the monitoring of the quantity of the yoghurt culture microbes *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* in selected yoghurts after the end of the fermented process and the consideration of the observed values with the requirements of the legislation.

The literary search mentions the fermented dairy products and their classification, the characterization of individual types of lactic fermentation microbes and also the dairy starter cultures used for the production of fermented dairy products are not left out. The experimental part deals with the evaluation of microbiological analysis and the acidity of selected yoghurts according to the influence of the producer and the storage life.

The observed results showed, that the legislative requirement for the quantity of live microbes has been kept not only during the prescribed best-before period, but also during the complete experiment, it means also on the 56th day of the storage.

Keywords: yoghurt, lactic acid bacteria, bacterial survival, acidity

OBSAH

1	ÚVOD	10
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
2.1	Fermentované mléčné výrobky	11
2.1.1	Kysané mléčné výrobky s mezofilními bakteriemi	12
2.1.2	Kysané mléčné výrobky s termofilními bakteriemi	13
2.2	Mléčné kvašení	16
2.2.1	Homofermentativní mléčné kvašení	16
2.2.2	Heterofermentativní mléčné kvašení	17
2.3	Vybrané bakterie mléčného kvašení (BMK)	17
2.3.1	Rod Streptococcus	18
2.3.2	Rod Lactobacillus	19
2.3.3	Rod Lactococcus	19
2.3.4	Rod Leuconostoc	20
2.3.5	Rod Bifidobacterium	20
2.4	Čisté mlékařské kultury (ČMK)	21
2.4.1	Zdravotní význam ČMK	22
2.4.2	Technologický význam ČMK	22
2.4.3	Rozdělení ČMK	22
2.5	Jogurt	25
2.5.1	Výroba jogurtů	26
2.5.2	Požadavky na jogurtovou kulturu	28
2.5.3	Vady jogurtů	30
3	MATERIÁL A METODIKA	32
3.1	Cíl práce	32
3.2	Materiál a metodika pokusu	32
3.3	Analýza vzorků	34
3.3.1	Stanovení kyselosti	34

3.3.2	Mikrobiologická stanovení	34
3.4	Statistické vyhodnocení	40
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	41
4.1	Kyselost jogurtů	41
4.1.1	Aktivní a titrační kyselost jogurtu v závislosti na výrobci	41
4.1.2	Statistické vyhodnocení vlivu výrobce a doby skladování	44
4.2	Mikrobiologické ukazatele	46
4.2.1	Růst BMK rodů <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> a <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> v závislosti na výrobci	46
4.2.2	Statistické vyhodnocení vlivu výrobce a doby skladování	54
5	ZÁVĚR	60
6	SUMMARY	61
7	SEZNAM ZKRATEK	62
8	SEZNAM LITERATURY	63

1 ÚVOD

Mléko a mléčné produkty hrají důležitou roli ve výživě lidstva již po staletí a v posledních letech je věnována značná pozornost možnosti zlepšení zdravotního stavu člověka úpravou střevní mikroflóry.

Ve výživě mají kysané mléčné produkty v porovnání se sladkým mlékem mnohé přednosti, jako je lepší stravitelnost díky činnosti mikroorganismů a lepší vstřebatelnost vápníku díky kyselině mléčné, která je v těchto výrobcích obsažena. Kysané mléčné výrobky se dostaly do popředí zájmu osob s laktózovou intolerancí, jež nejsou schopni metabolizovat laktózu.

Bakterie mléčného kysání představují skupinu mikroorganismů nejen s velkým ekonomickým významem, ale uplatňují se při udržování a zlepšování lidského zdraví. Tyto bakterie se v mlékárenském průmyslu využívají jako čisté mlékařské kultury k výrobě zakysaných mléčných výrobků, kefirů, zakysaných smetan, acidofilních mlék, jogurtů, tvarohů a sýrů.

Streptococcus salivarius subsp. *thermophilus* je považován za nejdůležitější startovací mléčnou kulturu a v symbióze s *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* je využívána k výrobě jogurtů.

Cílem diplomové práce bylo sledování počtu mikroorganismů jogurtové kultury (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) ve vybraných jogurtech po ukončení zračního procesu.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Fermentované mléčné výrobky

Podle Vyhlášky č.77/2003 Sb. můžeme jako fermentovaný mléčný výrobek označit mléčný výrobek získaný kysáním mléka, smetany, podmáslí nebo jejich směsi za použití mikroorganismů tepelně neošetřený po kysacím procesu. Vyhláška též specifikuje použité mikroorganismy a stanovuje pro jednotlivé skupiny kysaných mléčných výrobků množství bakterií (tabulka č. 1).

Tabulka č. 1. Druhy živých mikroorganismů v kysaných mléčných výrobcích podle Vyhlášky č. 77/2003

Druh výrobku	Použité mikroorganismy	Mléčná mikroflóra výrobku v 1 g
Acidofilní mléko	<i>Lactobacillus acidophilus</i> a další mezofilní, příp. termofilní kultury bakterií mléčného kvašení	10 ⁶ <i>Lactobacillus acidophilus</i>
Jogurty *)	Protosymbiotická směs <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> a <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	10 ⁷
Kysané mléko, vč. smetanového zákysu, podmáslí a kysané smetany	Monokultury nebo směsné kultury bakterií mléčného kvašení	10 ⁶
Kefír	Zákys připravený z kefirových zrn, jehož mikroflóra se skládá z kvasinek zkvašujících laktózu <i>Kluyveromyces marxianus</i> i nezksašujících laktózu <i>Sacharomyces cerevisiae</i> , <i>Sacharomyces exiguus</i> a dále <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> a <i>Aerobacter</i> , rostoucí ve vzájemném společenství	Bakterie mléčného kysání 10 ⁶ a kvasinky 10 ⁴
Kefirové mléko	Zákys skládající se z kvasinkových kultur rodu <i>Kluyveromyces</i> , <i>Torulopsis</i> nebo <i>Candida valida</i> a mezofilních a termofilních kultur bakterií mléčného kvašení v symbióze	Bakterie mléčného kysání 10 ⁶ a kvasinky 10 ²

Kysaný mléčný výrobek s bifidokulturou	<i>Bifidobacterium sp.</i> v kombinaci s mezofilními a termofilními BMK	10 ⁶ bifidobakterie
--	---	--------------------------------

*) U jogurtových výrobků mohou být kromě základní jogurtové kultury přidávány kmeny produkující kyselinu mléčnou a pomáhající dotvářet specifickou chuťovou nebo texturní charakteristiku výrobku, musí však být zachován optimální poměr obou základních kmenů jogurtové kultury.

Mezi kysané mléčné výrobky patří: jogurt (nízkotučný nebo odtučněný, se sníženým obsahem tuku, smetanový), jogurtové mléko, acidofilní mléko, kefir, kefirové mléko, kysané mléko nebo smetanový zákys, kysaná nebo zakysaná smetana, kysané podmásli, kysané mléčné výrobky s bifidokulturou.

2.1.1 Kysané mléčné výrobky s mezofilními bakteriemi

Fermentované mléčné výrobky s mezofilními bakteriemi mléčného kysání se obvykle dělí na:

- kysaná mléka,
- kysané smetany,
- kysané podmásli (KADLEC, 2002).

U těchto výrobků se uplatňuje zejména smetanová kultura, převážně se používají směsné smetanové kultury (HYLMAR, 1986).

Kysaná mléka

Kysaná mléka se vyrábí z homogenizovaného pasterovaného mléka, následně se vychladí na kysací teplotu 18 °C až 23 °C a zakvasí 0,6 až 1,5 % smetanové kultury. Fermentace probíhá 16 – 20 hodin a je ukončena dosažením titrační kyselosti 38 – 42 SH. Koagulát je hustý a má porcelánovitý vzhled (KADLEC, 2002; ZIMÁK, 1982).

Kysané smetany

Kysané smetany jsou výrobky jemné, mírně kyselé chuti a viskózní konzistence. Zaočkovávají se 1 až 4 % smetanové kultury. Fermentace probíhá při teplotě 18 – 21 °C po dobu 18 – 24 hodin. Finální titrační kyselost smetan je 28 - 35 SH (KADLEC, 2002).

Kysané podmáslí

Podmáslí je vedlejší produkt při výrobě másla ze sladké nebo fermentované smetany. Obsahuje asi 0,5 % tuku včetně zvýšeného podílu fosfolipidů z obalů tukových kuliček. Oxidace fosfolipidů zhoršuje chuť podmáslí. Fermentace tuto nežádoucí příchut' pomáhá překonat (KADLEC, 2002).

Podmáslí, které obsahuje mikroflóru základní kultury použité při fermentaci smetany, se nechá prokysat při teplotě 18 – 20 °C. Titrační kyselost se pohybuje do 30 SH.

2.1.2 Kysané mléčné výrobky s termofilními bakteriemi

Fermentované mléčné výrobky s termofilními bakteriemi mléčného kysání lze rozdělit do následujících skupin:

- jogurtové výrobky,
- výrobky s použitím acidofilních a bifidových kultur,
- kysané mléčné výrobky se smíšenou bakteriální a kvasinkovou mikroflórou (HRABĚ a kol., 2007).

Jogurtové výrobky

Jogurtové výrobky patří celosvětově k nejrozšířenějším fermentovaným výrobkům s termofilními bakteriemi mléčného kysání (HRABĚ a kol., 2007).

Z hlediska použité mikroflóry se ve většině zemí definuje jogurt jako výrobek obsahující živé bakterie *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (KADLEC, 2002).

Jogurtové výrobky můžeme rozdělit na:

- přírodní jogurty (*natural yoghurts*),
- ochucené jogurty (*flavoured yoghurts*), které mohou obsahovat různé nemléčné složky (ovoce, cereálie, aromata, barviva a přísady zlepšující konzistenci) (HRABĚ a kol., 2007; KADLEC, 2002).

Podle použitého způsobu fermentace a zpracování koagulátu rozlišujeme:

- jogurty s nerozmíchaným koagulátem (*set yoghurts*) – fermentace probíhá přímo ve spotřebitelském obalu,

- jogurty s rozmíchaným koagulátem (*stirred yoghurts*) – fermentace probíhá v tanku, po promíchání koagulátu a vychlazení se plní do obalů,
- jogurty pitné (*drink yoghurts*) – fermentace probíhá v tanku jako u jogurtu s rozmíchaným koagulátem, po ochlazení na 18 – 20 °C se přidávají přísady a často následuje ošetření s cílem prodloužení trvanlivosti (KADLEC, 2002).

Výrobky s použitím acidofilních a bifidových kultur

Výrobky jsou získané fermentací mléka s použitím mikroorganismů *Lactobacillus acidophilus* nebo *Bifidobacterium bifidum*.

- ***Acidofilní mléko***

Získává se metodou oddělené fermentace. Je vyráběno z 1 dílu pasterovaného mléka, které je po záhřevu na 37 až 40 °C zaočkováno 1 % až 2 % kultury *Lactobacillus acidophilus* a 9 dílů pasterovaného mléka zakysaného smetanovým zákyssem, tj. s použitím kultur *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (DRAGOUNOVÁ, 2003).

Po skončení fermentace se obě sraženiny smíchají a homogenizují při tlaku 5 – 8 MPa, vychladí na 10 °C a plní do obalů (HRABĚ a kol., 2007).

Kyselost výrobku v době vyskladnění má být 36 – 50 SH (ZIMÁK, 1982).

- ***Kysaný mléčný nápoj (biokys)***

Získává se metodou oddělené fermentace. Je vyráběn z 1 dílu mléka zakysaného *Lactobacillus acidophilus* a 9 dílů pasterovaného mléka zakysaného probiotickými kulturami *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* a *Pediococcus acidolactici* (DRAGOUNOVÁ, 2003).

Po ukončení zrání se obě směsi opatrně promíchají a ochladí pod 10 °C a plní do obalů (HYLMAR, 1986).

Některé mléčné výrobky se během zpracování fortifikují prebiotiky, které přispívají k růstu bifidobakterií. Přídavek prebiotik zvyšuje stabilitu bifidobakterií během skladování výrobku (LOURENS-HATTINGH a VILJOEN, 2001).

Kysané mléčné výrobky se smíšenou bakteriální a kvasinkovou mikroflórou

Vedle mléčného kysání zde probíhá i alkoholové kvašení laktózy za vzniku etanolu a CO₂, který dodává výrobkům mírně štiplavou chuť, pěnovitou konzistenci a příznivě působí na vylučování žaludečních šťáv v trávicím traktu. Obsah alkoholu závisí na délce zrání.

Přesné složení mikroflóry těchto kultur není konstantní, obvykle se vyskytují laktokoky, laktobacily a kvasinky rodů *Sacharomyces*, *Candida*, *Kluyveromyces* a *Torula* (KADLEC, 2002).

- ***Kefír a keфіrové mléko***

Kultura k přípravě kefiru má buďto formu kefirových zrn, nebo se jedná o čisté směsné kultury. Základem kefirové kultury jsou *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* a *Lactobacillus kefir*, kvasinky *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* a *Candida kefir*. Tato směsná kultura se míchá se smetanovou aromatickou kulturou o složení *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis biovar diacetylactis* (DRAGOUNOVÁ, 2003).

2.2 Mléčné kvašení

Společným znakem bakterií mléčného kvašení je tvorba kyseliny mléčné ze zkvasitelných sacharidů. Za pravé bakterie mléčného kvašení se považuje velká přirozená skupina nepohyblivých, nesporulujících, grampozitivních koků a tyčinek, které fermentují sacharidy za fakultativně anaerobních podmínek a tvoří jako hlavní produkt kyselinu mléčnou (GÖRNER a VALÍK, 2004).

V kysaných produktech se bakterie mléčného kvašení (**BMK**) projevuje četnými antimikrobiálními aktivitami. To je způsobeno především produkcí organických kyselin, které snižují pH produktu a tak napomáhají potlačit růst patogenních mikroorganismů a organismů způsobujících kažení potravin (LEROY a DE VUYST, 2007).

Mezi mléčné bakterie řadíme zejména rody *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (ŠILHÁNKOVÁ, 1983).

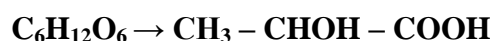
Podle produktu metabolismu rozdělujeme bakterie mléčného kvašení na homofermentativní a heterofermentativní.

2.2.1 Homofermentativní mléčné kvašení

Homofermentativní mléčné kvašení je proces štěpení polysacharidů na kyselinu mléčnou přes pyruvát cestou glykolýzy. Glykolýza slouží k uvolnění energie z molekul sacharidů. Glykolýzou se přeměňuje glukóza na pyruvát za současné tvorby molekul adenosintrifosfátu (**ATP**). Za anaerobních podmínek probíhá další degradace pyruvátu jako alkoholové kvašení u kvasinek nebo redukce na kyselinu mléčnou (laktát) u mléčných bakterií (HOZA a kol., 2006).

Mezi homofermentativní druhy rodu *Lactobacillus* patří *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* a *Lactobacillus casei*. Dále sem patří rody *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* (ŠILHÁNKOVÁ, 2002).

Homofermentativní mléčné kvašení probíhá podle rovnice:

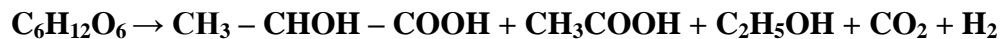


2.2.2 *Heterofermentativní mléčné kvašení*

Při heterofermentativním mléčném kvašení se vytváří kromě kyseliny mléčné ještě etanol, kyselina octová, glycerol a CO₂ (HOŘÁK, 1979).

Heterofermentativní mléčné bakterie na rozdíl od homofermentativních neobsahují enzym aldolázu, tj. glykolytický enzym, který štěpí hexóza - 1,6 - bifosfát ve dva triózafosfáty. Proto převádějí hexózy oxidačním mechanismem hexózafosfátového zkratu v ribóza-5-fosfát a CO₂. Tato pentóza-5-fosfát se pak enzymaticky štěpí na acetylfosfát a glyceraldehyd-3-fosfát. Z acetylfosfátu vzniká za součinnosti NADH etanol. Glyceraldehyd-3-fosfát je glykolýzou přeměněn v pyruvát a pak na laktát. Tím vzniká z hexózy ekvimolekulární množství CO₂, etanolu a laktátu (ŠILHÁNKOVÁ, 2002).

Heterofermentativní mléčné kvašení probíhá podle rovnice:



Hlavními zástupci heterofermentativních bakterií mléčného kvašení vyskytujících se v mléce jsou *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis* a *Lactobacillus buchneri* (VLKOVÁ a kol., 2009).

2.3 Vybrané bakterie mléčného kvašení (BMK)

BMK jsou klasifikovány společně podle stejného produktu metabolismu, kyseliny mléčné (GAJDŮŠEK, 2000).

Morfologicky jsou to koky nebo tyčinky, vesměs grampozitivní. Systematicky se dělí na homofermentativní mléčné bakterie, které zkvašují cukry na pravotočivou kyselinu mléčnou, přičemž tvoří jen malé množství těkavých produktů, a na heterofermentativní mléčné bakterie, které produkují levotočivou kyselinu mléčnou a vedle toho značné množství jiných kyselin a látek (kyselina octová, CO₂, etanol) (GRIEGER, 1990).

BMK jsou využívány pro tvorbu kysaných mléčných výrobků z důvodu produkce kyseliny mléčné, diacetylu, acetaldehydu, volných těkavých mastných kyselin a dalších sensoricky významných látek. Ve výrobcích mají též významnou technologickou

funkci, protože inhibují nežádoucí patogenní a technologicky škodlivé mikroorganismy (FORMAN, 1996; GAJDŮŠEK, 2000; ADOLFSSON a MEYDANI, 2004; CHANDAN, 2006;).

Probiotika – jsou živé organismy (většinou bakterie), dodávané organismu jako potravinové doplňky. Probiotika jsou obvykle vybírána z několika druhů mléčných bakterií, které patří do těchto hlavních skupin: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus* (GIBSON a WILLIAMS, 2000).

Prebiotika – jedná se nejčastěji o vlákninu a některé typy sacharidů, zejména oligosacharidy (NEVORAL, 2008).

Symbiotika – jsou směsí probiotik a prebiotik. V symbiotiku je probiotikum kombinováno s prebiotikem, které je pro něj specifické a tato kombinace potom přispívá k prodloužení přežití probiotika, pro které je prebiotikum specifickým substrátem vhodným k fermentaci (NEVORAL, 2008).

Skupina bakterií mléčného kvašení se dnes skládá z 13 rodů grampozitivních bakterií: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Paralactobacillus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella*. Příbuzné rody s bakteriemi mléčného kvašení jsou rody *Aerococcus*, *Microbacterium* a *Propionibacterium*, které ale nejsou považovány za bakterie mléčného kvašení (JAY a kol., 2009).

V mlékařství se nejčastěji využívají rody *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* a *Propionibacterium* (ZIMÁK, 1982; HYLMAR, 1986; GAJDŮŠEK, 2000; ADOLFSSON a MEYDANI, 2004; HRABĚ a kol., 2007).

Níže je uvedena stručná charakteristika vybraných druhů BMK.

2.3.1 Rod *Streptococcus*

Bakterie rodu *Streptococcus* mají tvar sférický nebo ovoidní, vyskytují se ve dvojicích nebo řetězcích, jsou nepohyblivé, fakultativně anaerobní, nesporulující, grampozitivní. Jejich růstové rozmezí je 25 až 45 °C, optimum růstu je 37 °C. Řadí se mezi homofermentativní bakterie, protože jako jediný produkt tvoří kyselinu mléčnou (ŠILHÁNKOVÁ, 2002; TAMINE, 2006).

Některé druhy fermentují i organické kyseliny (malonovou, citronovou) a aminokyseliny (serin, arginin). Neredukují dusičnan na dusitan (GÖRNER a VALÍK, 2004).

S ohledem na charakter této práce je bližší specifikace nejvýznamnějšího kmene *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* pojednána samostatně v kapitole 2.5.2.

2.3.2 Rod *Lactobacillus*

Buňky pravidelných tyčinek, grampozitivní, nesporulující, fakultativně anaerobní, pouze zřídka pohyblivé. Optimální růstová teplota je 30 až 40 °C (SEDLÁČEK, 2007).

Bakteriální kmeny rodu *Lactobacillus* produkují velké množství kyseliny mléčné. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* je součástí mikroflóry směsných jogurtových kultur, používané především pro různé technologie výroby jogurtů (bližší kapitola 2.5.3.). Kmeny *Lactobacillus acidophilus* se používají k výrobě acidofilního mléka, acidofilního podmásli a smetany. Mohou produkovat bakteriociny potlačující nežádoucí mikroflóru zažívacího traktu. *Lactobacillus kefir* je součástí směsných kefirových kultur, používaných při výrobě kefiru a kefirového mléka (GAJDŮŠEK, 2000; ŠILHÁNKOVÁ, 2002; TAMINE, 2006; BOHAČENKO a kol., 2007).

Dle produktu katabolického metabolismu lze rod *Lactobacillus* rozdělit na homofermentativní mléčné bakterie (např. *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*) a heterofermentativní mléčné bakterie (např. *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*) (ZADRAŽIL, 2002; TAMINE, 2006).

2.3.3 Rod *Lactococcus*

Buňky sférické nebo ovoidní, vyskytující se po dvou a v krátkých řetězcích. Grampozitivní, nesporulující, nepohyblivé, fakultativně anaerobní. Optimální růstová teplota je 37 °C (SEDLÁČEK, 2007).

Nejčastěji využívané v mlékárenském průmyslu jsou *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Jsou součástí mikroflóry základních smetanových kultur a tvoří převážně kyselinu mléčnou. Některé kmeny *Lactococcus* produkují bakteriocin nizin, který inhibuje rozvoj řady grampozitivních bakterií a používá se při konzervaci potravin (ZIMÁK, 1982; ZADRAŽIL, 2002).

2.3.4 *Rod Leuconostoc*

Skupina grampozitivních, heterofermentativních, kataláza negativních, fakultativně anaerobních, nesporelujících koků. Nejsou proteolytické, nehemolyzují, neredukují dusičnan na dusitan (GÖRNER a VALÍK, 2004; KLAZAN, 2005).

Bakterie rodu *Leuconostoc* tvoří při nižším pH aromatické látky, které mají nezastupitelnou funkci jako aromatické látky základních smetanových kultur. Potravinářsky významnými kmeny jsou *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* a *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (ŠILHÁNKOVÁ, 2002; TAMINE 2006).

OGIER a kol. (2008) doplňuje, že tento rod je bezpečný i přes nízký počet výskytů onemocnění, které bylo způsobeno právě touto bakterií.

2.3.5 *Rod Bifidobacterium*

Buňky mají tvar tyčinek, obvykle mírně zakřivené a kyjovité. Jsou grampozitivní, nepohyblivé, nesporelující. Optimální teplota růstu je v rozmezí 37 až 41 °C (SEDLÁČEK, 2007).

Pro bakterie rodu *Bifidobacterium* je charakteristická tvorba kyseliny octové a kyseliny mléčné (v poměru 3:2), za současné produkce malých množství etanolu, sukcinátu a formiátu. Převážná většina kmenů rodu *Bifidobacterium* jsou anaerobního charakteru, avšak v přítomnosti CO₂, jsou schopny po krátkou dobu tolerovat kyslík (ZADRAŽIL, 2002).

Bifidobacterium bifidum společně s dalšími druhy *Bifidobacterium infantis* a *Bifidobacterium longum* bývají nezbytnou součástí zákysových kultur při výrobě mléčných kysaných nápojů (LUKÁŠOVÁ, 2001; TAMINE, 2006;).

Dalšími neméně významnými BMK jsou rody *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus* a rod *Weissella*.

2.4 Čisté mlékařské kultury (ČMK)

Pro celý mlékárenský průmysl a jeho rozvoj měl objev ČMK dalekosáhlý význam. Již v prvním období používání ČMK se ve výrobě mléčných výrobků projevil veliké přednosti ve srovnání s používáním zákysů přírodních. Především byla odstraněna závislost jakosti mléčných výrobků na více nebo méně příznivém složení přírodní mikroflóry mléka používaného k výrobě. Tím se zabránilo dřívějšímu značnému kolísání jakosti výrobků, které bylo způsobeno proměnlivým složením přírodní mikroflóry. Používání ČMK pak vytvořilo předpoklad pro pasteraci mléka, a tím i zajištění zdravotní nezávadnosti mléčných výrobků. Používání ČMK se pro tyto své přednosti rozšířilo do všech zemí s vlastním mlékárenským průmyslem a zakotvilo také v našem mlékařství (TEPLÝ a kol., 1984).

V současné době bývají ČMK nejčastěji definovány jako vybrané a vyšlechtěné mikroorganismy, záměrně přidávané do mléka nebo smetany s cílem vyvolat určité specifické změny ve vzhledu, konzistenci, obsahu, chuti i dalších vlastnostech daného mléčného výrobku. U nás se definují ČMK jako klíčové výrobní prostředky, kterými se do suroviny (mléko, smetana, syrovátka) zbavené všech patogenních i pokud možno nežádoucích a technologicky škodlivých mikroorganismů, zavádějí vybrané účelově zaměřené druhy specifických mikroorganismů, aby vyvolaly a zajistily správný průběh výrobního procesu a dosažení žádoucí jakosti hotových výrobků (HYLMAR, 1985).

Výrobcem a dodavatelem ČMK tuzemské výroby byl Vývojový závod mlékárenského průmyslu, generální ředitelství (Praha – Vokovice). Základem byly originální československé kultury, sestavené z kmenů izolovaných z domácích zdrojů. Označovaly se názvem *Laktoflora*[®].

Dnes je hlavní firmou Christian Hansen (Dánsko), dále Milcom, a.s., Danisco, Texel, DSN – OK servis, Marschal Division (USA, Francie), Wiesby (Dánsko, Německo) (FORMAN, 1996).

Budoucnost startovacích kultur se nachází v hlubším porozumění genetického potenciálu mikroorganismů, které povede k vývoji nových kmenů s více žádoucími vlastnostmi, např. lepší chutí a texturou, delší trvanlivostí, stabilitou a zdraví podporujícími vlastnostmi (MILLS a kol., 2010).

2.4.1 Zdravotní význam ČMK

ČMK mohou mít na metabolismus člověka dieteticko-léčebné účinky. Jde především o zvýšení výživové hodnoty výrobků, u nichž dochází k přeměně složek mléka na často stravitelnější formy. Některé mikroorganismy produkují vitamíny, jimiž obohacují prostředí. BMK např. tvoří kyselinu mléčnou, která tlumí rozvoj škodlivé hnilobné mikroflóry. V tomto směru jsou zvláště významné mikroorganismy se schopností implantace v lidském střevním traktu, zejména tlustém střevě. Podobný účinek mají antibiotika produkovaná některými kmeny mléčných kultur (TEPLÝ a kol., 1984; PAVELKA, 1996).

2.4.2 Technologický význam ČMK

Pasterací se zničí nejenom patogenní zárodky, ale také mikroorganismy technologicky významné. Do pasterovaného mléka se pak přidávají technologicky užitečné mikroorganismy pro zajištění žádaných biochemických procesů, nutných k dosažení specifických vlastností jednotlivých výrobků, jako je konzistence, chuť a vůně. Jde především o fyzikálně chemické změny v důsledku rozkladu složek mléka.

Funkce ČMK se prolínají, kombinují, doplňují a tak vzniká komplex působení ČMK typický pro každý druh mléčných výrobků (TEPLÝ a kol, 1984; ŽIŽKA a MARTÍNKOVÁ, 1980).

2.4.3 Rozdělení ČMK

Čisté mlékařské kultury se dodávají do mlékárenských závodů v různých formách a zde se buď dále rozmnožují, nebo přímo využívají v mlékárenské výrobě. Nejčastější formy ČMK jsou tekuté, sušené, zmrazené, zmrazené a sušené koncentráty (HYLMAR, 1986). V ČR se v převažující míře používali ČMK v tekutém stavu (FORMAN, 1996). Ovšem KADLEC a kol. (2002) uvádí, že s ohledem na počet nutných kroků ve výrobě je tato procedura drahá, pracná, náročná na zručnost a zodpovědnost personálu. Z tohoto důvodu se dnes nejčastěji používají lyofilizované kultury (ampule).

ČMK používané v mlékárenství se rozdělují podle různých kritérií. Druhová a kmenová skladba mikroorganismů může být jedním z nich (KADLEC, 2002). Podle tohoto kritéria se kultury dělí na jednokmenové (*Single Strain Starters*) obsahující jeden

kmen určitého druhu, vícekmenové (*Multiple Strain Starters*) obsahující různé známé kmeny jednoho druhu nebo směsné vícekmenové (*Multiple-Mixed-Strain Starters*) obsahující různé definované kmeny různých druhů. Tradiční kultury (*Traditional Starters or Raw Mixed Strain Starters*) obsahují druhy a kmeny částečně nebo zcela neznámé. S ohledem na využití ČMK v mlékárenství rozeznáváme kulturu smetanovou, jogurtovou, acidofilní, bifidovou a kefirovou.

Důležitým kritériem je skupina mikroorganismů, podle níž se člení ČMK na kultury bakteriální, které se dále dělí podle optimální teploty růstu na mezofilní a termofilní, kultury kvasinkové, kultury plísňové a kultury smíšené (obsahující bakterie a kvasinky).

Mezofilní bakteriální kultury

Mezofilní BMK se vhodně kombinují na složené nebo směsné kultury. Takové se mohou vyrábět pouze z druhů a kmenů, které se dobře snášejí a podle možností se mají v růstu a metabolismu doplňovat. V žádném případě nesmí docházet k antagonismu. Jeho příčinou mezi jednotlivými druhy a kmeny může být tvorba známých nebo neznámých antibiotických látek. Do úvahy přicházejí i rozdílné rychlosti růstu, diferencovaná přizpůsobivost na společné růstové médium, odlišné teplotní optimum růstu a maximálního metabolismu (GÖRNER a VALÍK, 2004).

Mezi mezofilní kultury patří:

Smetanová kultura (základní) - kultura směsná, skládající se z různých diplokoků a streptokoků mléčného kvašení. Charakteristickou chuť a vůni základního zákysu tvoří mléčná kyselina a diacetyl, ale i menší množství octové a propionové kyseliny a dalších složek (TEPLÝ a kol., 1984). Doporučená doba kultivace je až hodin při teplotě 21 až 23 °C. Výsledná titrační kyselost je v rozmezí 36 – 42 SH, přídavek inokula je 1 % (FORMAN, 1996).

Kefirová kultura - se připravuje buď z nálevu originálních kefirových zrn nebo se sestavuje z čistých mlékařských kultur bakteriálních a kvasinkových. Jako základní kmeny k přípravě kefirové kultury se většinou používají tradičně *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Kluyveromyces fragilis*, *Candida kefir*. (GÖRNER a VALÍK, 2004). TEPLÝ (1984) dodává, že výsledná titrační kyselost je v rozmezí 45 - 55 SH.

Termofilní bakteriální kultury

Mikroorganismy termofilních kultur náleží k rodům *Lactobacillus*, *Streptococcus* a *Bifidobacterium*. Z rozsáhlého rodu *Lactobacillus* s více než 50 buď homofermentativními nebo heterofermentativními druhy pro mlékárenské fermentace. Jako významná složka jogurtové kultury sem patří *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* společně se *Streptococcus thermophilus*, (KADLEC, 2002

Mezi termofilní kultury patří:

Jogurtová kultura - je kultura směsná (TEPLÝ, 1984) a je složena z kmenů *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* v poměru 1:1 nebo 1:2 (FORMAN, 1996).

Acidofilní kultura - je monokultura, která obsahuje kmen *Lactobacillus acidophilus*. Tento kmen má významné dietetické a léčebné účinky a patří mezi probiotické mikroorganismy (ZADRAŽIL, 2002).

Bifidogenní kultura - je kultura, která obsahuje druh *Bifidobacterium bifidum* (FORMAN, 1996). Bifidobakterie jsou probiotika, tvoří kyselinu mléčnou a kyselinu octovou (MAXA a RADA, 1989).

2.5 Jogurt

Jogurty patří mezi nejrozšířenější a nejoblíbenější kysané mléčné výrobky. Úprava mléka na jogurtový výrobek byla známa již 5000 let před naším letopočtem v zemích středního Východu. Nejprve byl jogurt vyráběn proto, aby se v horkém podnebí lépe uchovávalo mléko a také pro jeho lahodnou chuť. Na začátku minulého století pak byl rozpoznán i jeho význam pro zdraví člověka (VALENTOVÁ, 2008).

Jogurt je vyvážená a zdraví prospěšná potravina. Při své relativně nízké energetické hodnotě je bohatým zdrojem plnohodnotných bílkovin, vápníku, fosforu a různých vitaminů skupiny B (ŠTAFEN, 2011).

Definice jogurtu byla stanovena v Potravinářské a zemědělské organizaci spojených národů/Světové zdravotnické organizaci (FAO/WHO, 1984) následně: „Jogurt je sražený mléčný produkt získaný mléčným kvašením pomocí bakterií *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Mikroorganismy ve finálním výrobku musí být životaschopné a v hojném množství“. Takový výrobek je blahodárny pro lidské zdraví (HORIUCHI a kol., 2009).

Podle Vyhlášky č. 77/2003 se jogurtem rozumí kysaný mléčný výrobek získaný kysáním mléka, smetany, podmáslí nebo jejich směsi pomocí mikroorganismů *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Rozdělení jogurtu dle technologických kritérií

Výrobků jogurtového typu je několik. PLOCKOVÁ (2009) uvádí, že fermentace a chlazení mléčné směsi a následující operace při výrobě fermentovaných mlék probíhají různým způsobem pro tři základní typy výrobků:

TYP I (*Set Type*) – fermentovaný výrobek s nerozmíchaným koagulátem - do mléka zaočkovaného zákysovou kulturou se přidávají přísady (ovocný podíl, aroma) a takto upravená směs se plní do drobných spotřebitelských obalů (plastové kelímky, skleněné lahve), které se skupinově přemísťují do zracích skříní, kde je udržována požadovaná teplota. Zde proběhne fermentace přímo v obalech.

TYP II (*Stirred Type*) – výrobek s rozmíchaným koagulátem - vzniká koagulát ve fermentačním tanku a struktura vzniklého gelu je rozrušena před nebo během procesu chlazení a balení.

TYP III (*Drink Type*) – výrobek s nízkou viskozitou určený k pití - fermentace opět probíhá ve fermentačním tanku. Při následujících operacích zahrnujících podle typu výrobku tepelné ošetření (pasterací, UHT záhřevem), příp. homogenizaci výrobku, je zcela rozrušena struktura vzniklého koagulátu.

2.5.1 Výroba jogurtů

Mléko určené na výrobu kysaných mléčných výrobků musí svými vlastnostmi a složením tvořit vhodné podmínky pro rozvoj přidaných čistých mlékařských kultur. Mléko nesmí obsahovat žádné inhibiční látky, musí být hygienicky získáváno od zdravých a dobře krmených dojnic a musí mít normální složení a vlastnosti. Na výrobu kysaných mléčných výrobků se používá mléko o různé tučnosti, případně i obnovené mléko ze sušeného mléka. Pro vlastní výrobu se mléko standardizuje na obsah tuku a sušiny (ŠUSTOVÁ a LUŽOVÁ, 2008).

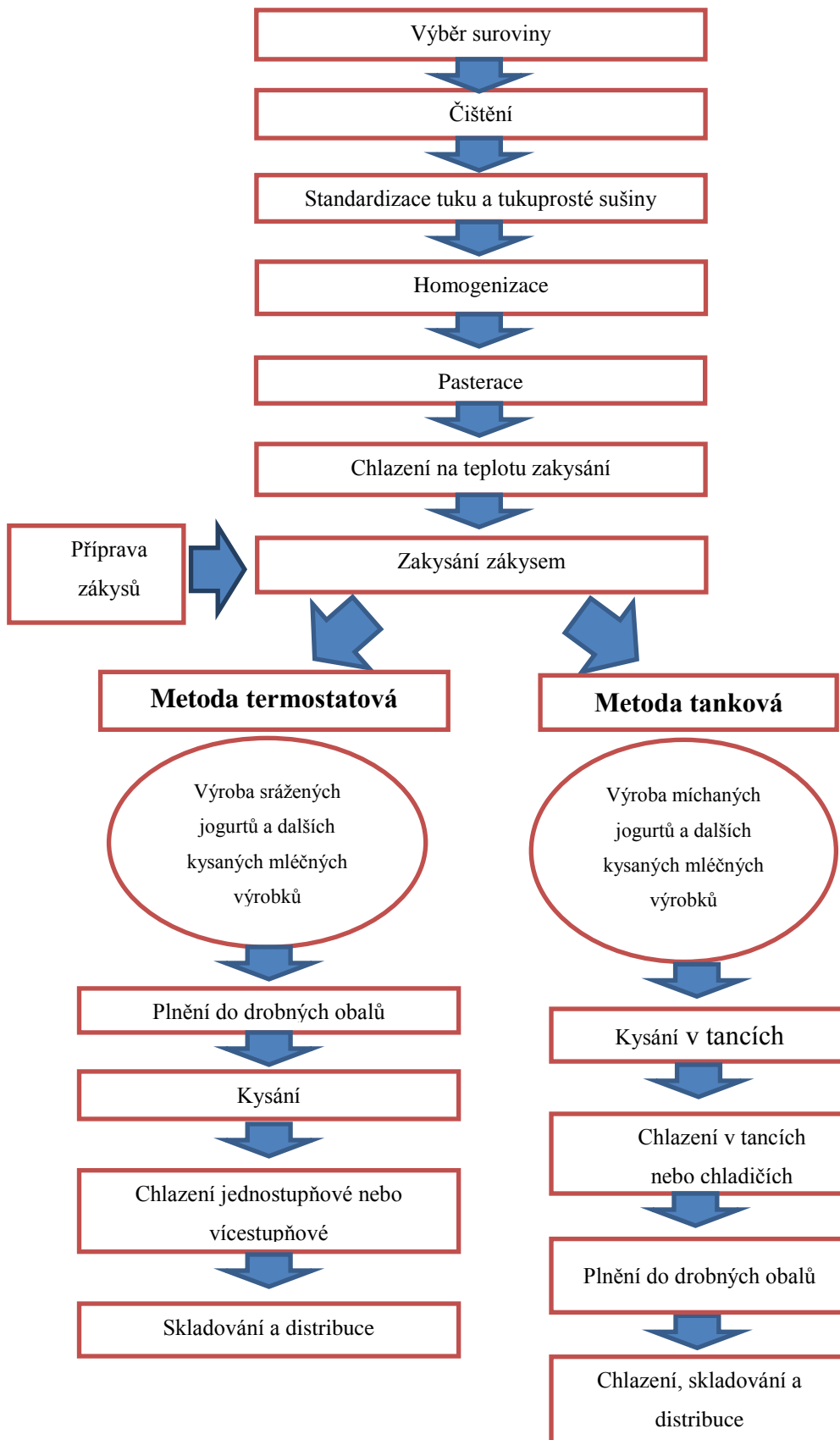
Zajištění sanitace a hygieny při výrobě kysaných mléčných výrobků musí snížit rozsah dodatečných mikrobiálních kontaminací jak z výrobních zařízení, tak z rukou pracovníků, jejich oděvů a také z vnějšího výrobního prostoru (GRIEGER, 1990).

Tento fakt potvrzuje ŠTAFEN (2011), který uvádí, že v současné době jsou k výrobě jogurtů používány moderní technologické linky, které jsou zpracovány z nerezové oceli a koncipovány tak, aby byly výborně čistitelné. Naprostá sterilita zařízení je nezbytným předpokladem pro zajištění správné fermentace, vyloučení možnosti kontaminace a dosažení trvanlivosti jogurtů.

Výroba jogurtu zahrnuje několik klíčových kroků: standardizaci směsi, homogenizaci, tepelné ošetření, ochlazení na inkubační teplotu, zaočkování jogurtovou kulturou, inkubaci, chlazení a balení (MARTH a STEELE, 2001).

Jak již bylo uvedeno výše, fermentace může probíhat v tancích nebo drobném spotřebitelské balení (obrázek 1).

Obrázek 1 Princip výroby kysaných mléčných výrobků dle Zadražila (2002)

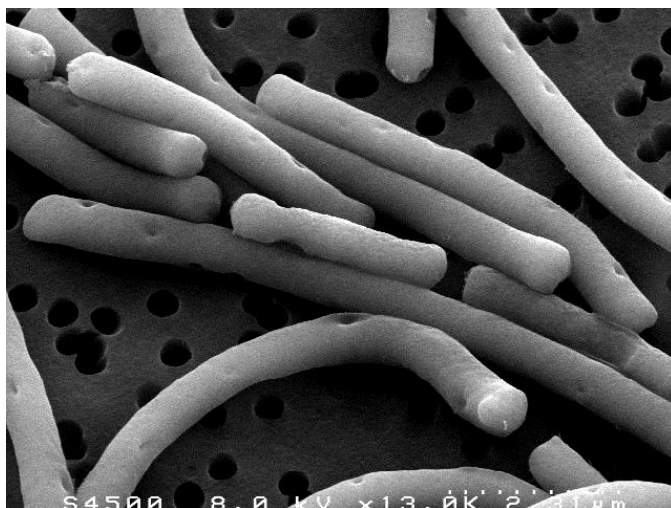


2.5.2 Požadavky na jogurtovou kulturu

Z hlediska použité mikroflóry se ve většině zemí definuje jogurt jako výrobek obsahující živé bakterie *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus* (KADLEC, 2002).

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* (Obr. 2) je grampozitivní, fakultativně anaerobní tyčinka, dlouhá 5-10 μm , někdy i delší, se sklonem ke granulaci. Je silně variabilní. Optimální teplota pro jeho růst je 45 °C. Při této teplotě sráží mléko za 3 až 4 hodiny v porcelánovitou kompaktní hmotu. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* hyne už v žaludku (ŽIŽKA a MARTÍNKOVÁ, 1980; GÖRNER a VALÍK, 2004).

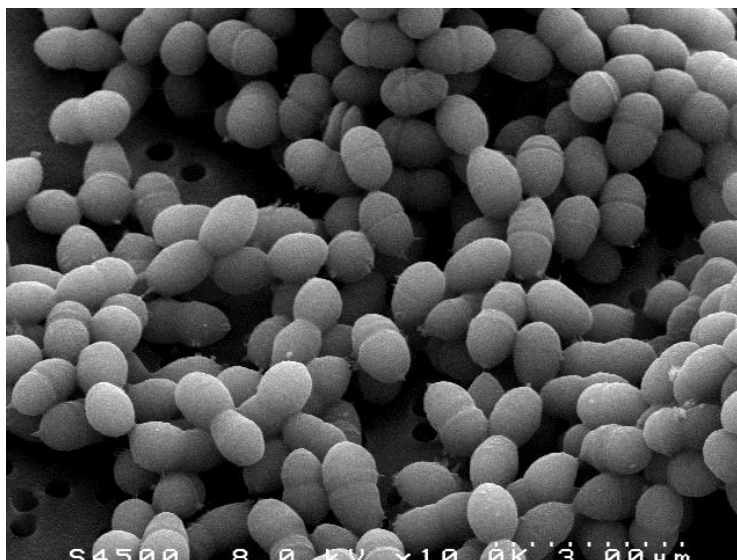


Zdroj: www.probioticsnews.creativetesting.co.uk

Obrázek 2: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

- *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

Streptococcus salivarius subsp. *thermophilus* (Obr. 3) je grampozitivní, buňky jsou nepohyblivé, hemolytické, fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní a fermentují cukry s produkcí laktátu (SEDLÁČEK, 2006). Buňky mají velikost 0,7 – 0,9 μm a bývají ve dvojicích nebo tvoří řetízky. Optimální teplota pro jeho růst je 40 až 45 °C. Neroste při 10 °C. Zkvašuje laktózu homofermentativně na mléčnou kyselinu, a to v množství asi 0,5 %. Kultivuje se v mléce po zaočkování 0,5 – 1 % kultury při 37 °C po dobu 16 – 20 hodin. Je také producentem ureázy (ZOTTA a kol., 2008).



Zdroj: <http://microbiology.ucoz.com>

Obrázek 3: *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

Tyto mikroorganismy mají symbiotický vztah a spolu se vyznačují rychlou tvorbou kyseliny mléčné, při optimální teplotě 40 až 43 °C koagulují kasein za 2 až 3 hodiny.

Kultury nejsou schopny nezávisle na sobě vytvářet ideální rovnováhu kyseliny a aroma. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* zahajuje produkci mléčné kyseliny a snižují množství kyslíku, který stimuluje růst *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (MARTH a STEELE, 2001).

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* částečně odbourává kasein, čímž uvolňuje valin, histidin, methionin, kyselinu glutamovou a leucin. Z této směsi pak zejména valin působí stimulačně na rozvoj streptokoků (HOLEC, 1990).

Streptococcus salivarius subsp. *thermophilus* je tedy citlivější ke kyselině než *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, z toho důvodu během delšího skladování jogurtu jsou streptokoky kyselinou poškozeny a postupně zanikají. Proto se poměr laktobacilů a streptokoků během skladování jogurtu mění (MARTH a STEELE, 2001).

Dobrá jogurtová kultura ve vychlazeném stavu má hustou konzistenci. Film na stěnách neulpívá, ale rozděluje se v praménky, které stékají po skle. Chuť je čistě kyselá, specificky jogurtová (KNĚZ, 1960).

Podle TEPLÉHO (1984) musí jogurtová kultura vykazovat: mikrobiální čistotu, vitální růstovou dynamiku, tvorbu výrazné jogurtové chuti, tvorbu žádoucí rezistence vůči antibiotikům a fágům, stabilitu (rovnováha mezi druhy kultur), nesmí mít tendenci

uvolňovat syrovátku, při skladování za chladu musí zastavit kysání, dobře se snášet s cukrem a snadno se udržovat.

Kmeny tvořící jogurtovou kulturu se vzájemně podporují v růstu a vytvářejí při společné kultivaci více mléčné kyseliny než kmeny kultivované odděleně. Ve společné kultivaci jsou aktivnější a dávají konečnému výrobku vyrovnanější konzistenci (TEPLÝ, 1984).

2.5.3 *Vady jogurtů*

Příčiny vad jsou velmi různorodé povahy, proto se různě projevují. Jsou způsobeny nevhodným mlékem, neaktivní kulturou, nesprávnou technologií i nevhodnými přísadami.

Oddělování syrovátky - je nežádoucí a nastává zejména při použití vyšších kultivačních teplot při zrání, které vedou k překysání. Rovněž nešetrné zacházení vede k mechanickému oddělování syrovátky.

Tuková vrstva - je projevem nedokonalé homogenizace mléčné směsi (pokud je směs homogenizována).

Prostoupení výrobku bublinkami plynu - je projevem silné kontaminace koliformními bakteriemi nebo kvasinkami. Může však být i projevem nevhodně použité kultury s vysokou produkcí CO₂.

Řídká konzistence - může být způsobeno nedostatečným prokysáním, jež může být projevem nevhodné suroviny, např. i porušené vodou, nevhodného ošetření, malé aktivity zářivky, porušení technologického postupu nebo napadení kultur.

Hrudkovitá konzistence - nastává při předčasném rozmíchání výrobků, při nedostatečném rozmíchání kultur ve směsi nebo nedostatečným rozmícháním hotového výrobku.

Barevné vady - vznikají pouze za použití nevhodných barevných přísad, mohou působit nevýrazně nebo naopak působí nevzhledné vzlínání nebo splývání barevných složek.

Vady chuti a aromatu - mají úzký vztah k výrobě i k použitým surovinám, které vznikají při nedostatečném rozvoji kysacích kultur, př. chuť zatuchlá, kvasničná, sladová apod. Připálená chuť a aroma mohou svědčit o nevhodně provedené pasteraci mléčné směsi. Překysání, smyslově vnímané jako příliš kyselá chuť, je důsledkem pomalého chlazení po skončení výroby nebo skladování výrobků za vyšších teplot. (GRIEGER, 1990)

Dalšími příčinami vad jogurtů může být přítomnost nežádoucích mikroorganismů v mléce (MARTH a STEELE, 2001). Hořkost jogurtu vyvolává např. *Bacillus subtilis* nebo *Bacillus cereus*. Spóry těchto mikroorganismů jsou schopny přežít i velmi vysoké teploty. U jogurtů ochucených ovocnou složkou mohou být problémem kvasinky a plísně přítomné v použité ovocné složce (VILJOEN a kol., 2003; MATARAGAS a kol., 2011).

Plísně často produkují látky udělující materiálu zatuchlý půdní pach, některé produkují žlutá až červená barviva, často toxické povahy, a většina plísní produkuje také mykotoxiny, z nichž některé působí silně toxicky již tehdy, kdy nárůst plísně není ještě tak patrný (ŠILHÁNKOVÁ, 2002).

Celkový počet mikroorganismů je nejen ukazatelem hygienických podmínek při výrobě a manipulaci s výrobkem, ale u výrobků podléhajících rychlejší zkáze je také ukazatelem jejich kvality a údržnosti. Koliformní bakterie jsou ukazatelem fekálního znečištění a tedy i stupně hygieny při výrobě a manipulaci s výrobky (ŠILHÁNKOVÁ, 2002).

Pokud jsou bezpečně určeny příčiny způsobující vady kysaných mléčných výrobků, je nutné k zajištění další výroby na požadované úrovni jakosti tyto příčiny odstranit. Tato práce vyžaduje odborné znalosti a praktické zkušenosti i znalost místních výrobních podmínek (HYLMAR, 1986).

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo sledování počtu mikroorganismů jogurtové kultury (*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) ve vybraných jogurtech po ukončení zračního procesu a posouzení zjištěných hodnot s požadavky legislativy.

Diplomová práce byla součástí řešení projektu OP VK CZ.1.07/2.3.00/09.0081 Komplexní vzdělávání lidských zdrojů v mlékařství.

3.2 Materiál a metodika pokusu

Experimentální část práce byla uskutečněna v laboratoři společnosti “AGRO-LA“, spol. s r.o., Jindřichův Hradec. Při skladovací teplotě 4 °C zde byly uchovány vzorky jogurtů po dobu osmi týdnů za účelem sledování schopnosti přežívání kulturních bakterií a posouzení změn kyselosti.

Pro pokus byly vybrány bílé jogurty a jogurty s jahodovou ovocnou složkou (dále jen ovocné) od třech různých výrobců (tabulka č. 2).

Tabulka č. 2: Charakteristika sledovaných vzorků

Výrobce/ typ výroby	Druh jogurtu	Sušina * (g/100 g)	Laktóza** (%)	Bílkoviny * (%)	Vápník* (mg/100 g)
1 / termostatová	Bílý	18,2	5,1	5,87	162
	Ovocný	21,8	-	5,04	156
2 / tanková	Bílý	16,2	4,2	5,36	140
	Ovocný	23,1	-	4,34	130
3 / termostatová	Bílý	12,2	3,2	3,45	108
	Ovocný	18,6	-	2,81	89

* obsah vybraných ukazatelů chemického složení byl stanoven v akreditované laboratoři “AGRO-LA“, spol. s r.o., Jindřichův Hradec.

** obsah vybraných ukazatelů chemického složení byl stanoven v akreditované laboratoři Státního veterinárního ústavu v Jihlavě

Pro vyhodnocení vlivu změn v kyselosti a mikrobiologických ukazatelích sledovaných vzorků jogurtů byly jako nezávislé proměnné zvoleny následující faktory:

- **výrobce** (1, 2 a 3)
- **druh jogurtu** (1 = ovocný; 2 = bílý)
- **doba skladování** (7., 14., 21., 28., 35., 42., 49. a 56. den po ukončení výroby)

Sledované ukazatele (závislé proměnné) včetně počtu analyzovaných vzorků během pokusu jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Počet analyzovaných vzorků v rámci jednotlivých sledovaných ukazatelů

Počty vzorků (včetně kontroly)	Celkem
Kyselost	
titrační – bílé jogurty	96
aktivní – bílé a ovocné jogurty	192
Mikrobiologické ukazatele	
<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> – bílé a ovocné jogurty	192
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> – bílé a ovocné jogurty	192
Celkový počet mikroorganismů – bílé a ovocné jogurty	96
Koliformní bakterie – bílé a ochucené jogurty	96
Kvasinky a plísňe – bílé a ochucené jogurty	96
Chemické ukazatele	
Laktóza	6
Sušina	12
Bílkoviny	12
Vápník	12
Celkem	1002

3.3 Analýza vzorků

3.3.1 Stanovení kyselosti

Titrační kyselost

Stanovení titrační kyselosti bylo provedeno metodou podle Soxhlet-Henkela. Kyselost podle Soxhlet-Henkela je dána počtem mililitrů odměrného roztoku $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol.l}^{-1}$ spotřebovaného při titraci zkušební vzorku na fenolftalein jako indikátor. Vyjadřuje se v ml roztoku $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol.l}^{-1}$ spotřebovaných na 100 g u smetany nebo zakysaných tekutých mléčných výrobků včetně jogurtů.

Příprava vzorku

Tekutý vzorek byl homogenizován pomocí minitřepačky Vortex.

Vlastní stanovení

Do Erlenmayerovy baňky se odměřilo 10 g vzorku a přidalo 2 ml 2 % roztoku fenolftaleinu. Za stálého míchání byl roztok titrován NaOH ($c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol.l}^{-1}$) do slabě růžového zbarvení.

Výpočet

$$\text{SH} = \frac{a \cdot 100}{m_0}$$

a... spotřeba roztoku $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol.l}^{-1}$ při titraci naváženého zkušební vzorku, v ml.

m_0 ... navážené množství vzorku, v ml nebo g.

Aktivní kyselost

Aktivní kyselost bílých jogurtů byla měřena pH metrem typu PH WTW 330/set 2 od firmy WTW s rokem výroby 1999.

3.3.2 Mikrobiologická stanovení

Ke sledování mikrobiologických ukazatelů byly využity mikrobiologické kultivační metody.

Po otevření víčka jogurtu a promíchání bylo sterilně odebráno a naváženo 10 g vzorku z každého vzorku. V případě nutnosti byla provedena homogenizace vzorku pomocí homogenizátoru Stomacher. Po přidavku 90 ml sterilní destilované vody byla

směs homogenizována pomocí minitřepačky Vortex. Vzniklá suspenze představovala 1. ředění. Následná ředění byla prováděna přidáním 1 ml vzniklé suspenze s 9 ml ředícího roztoku.

Pro očkování vzorků byla použita metoda přelivem – zalití živným médiem. Tato metoda spočívá v tom, že na dno sterilní misky bylo napipetováno 1 ml příslušného ředění. Po napipetování vzorku byla miska zalita příslušným živným médiem, řádně promíchána a následně se nechaly Petriho misky ztuhnout. Petriho misky se vkládají do termostatu dnem vzhůru a kultivují se za podmínek daného mikrobiologického stanovení. Každé stanovení se provádí souběžně ve dvou Petriho miskách.

Pro jednotlivá stanovení byla použita následující živná média:

Stanovení *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Pro stanovení *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mikrobiologickou metodou byl použit komerční výrobek firmy Merck, s.r.o., MRS agar (Lactobacillus agar podle DE MAN, ROGOSA a SHARPE) o následujícím složení: Pepton z kaseinu 10,0 g; masový extrakt 10,0 g; kvasničný extrakt 4,0 g, D(+) glukóza 20,0 g; hydrogenfosforečnan didraselný 2,0 g; Tween® 80 1,0 g; kyselý citran amonný 2,0 g; octan sodný 5,0 g; síran hořečnatý 0,2 g; síran manganatý 0,04 g; agar-agar 14,0 g, destilovaná voda 1 litr.

Agar byl připraven navážením cca 68,2 g MRS agaru, který se za občasného míchání nechá rozpustit v 1 litru destilované vody, rozpuštění agaru můžeme uspišit jeho ohřátím na 45 °C. Po dokonalém rozpuštění se upraví pH tak, aby po sterilaci měl vzniklý agar pH 5,7 ± 0,2 při 25 °C. Sterilace probíhá 15 minut při 121 °C.

Po ukončené sterilaci se agar zchladí na 45 °C a rozlévá do inokulovaných Petriho misek. Agar v Petriho miskách má být hnědý a čirý.

Příprava vzorku

Odváží se 10 g vzorku a přidá se 9 - ti násobek ředícího roztoku a provede se homogenizace na stupeň 3 po dobu 2 x 10 sekund. Takto vzniklá suspenze je považována za 1. ředění. Následná ředění se provádějí ve zkumavkách. Do zkumavky s 9 ml ředícího roztoku se přidá 1 ml vzniklé suspenze z předchozího kroku a vzorek se homogenizuje na minitřepačce Vortex.

Inokulace a kultivace

Stanovení bylo provedeno souběžně na dvou Petriho miskách. Za aseptických podmínek se očkuje 1 ml vzorku nebo příslušného ředění do sterilních Petriho misek. Takto připravené misky byly zality MRS agarem. Ředění vzorku se volilo tak, aby Petriho misky po inkubaci obsahovaly 15 až 150 charakteristických kolonií. Inokulované Petriho misky se nechaly ztuhnout na vodorovné ploše za laboratorní teploty. Po ztuhnutí se inokulovaná živná půda převrstvila asi 5 až 7 ml MRS agarem, pro zajištění anaerobního prostředí. Ztuhlé misky se kultivovaly při 30 °C po dobu 72 hodin. Aby se zabránilo vysychání živné půdy, vložila se do termostatu kádinka s vodou.

Vyhodnocování výsledků

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* tvoří na MRS agaru drobné bílé nepravidelné kolonie.

(WWW.MECOMM.CZ, STAŽENO 23. 10. 2012).

Stanovení *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

Pro kultivaci a stanovení počtu mléčných streptokoků se v porovnání s jinými srovnatelnými médii nejvíce osvědčil agar M17 (podle TERZAGHI). Ve sledovaném pokusu byl použit komerční výrobek firmy Merck, s.r.o., o následujícím složení: Pepton ze sójové moučky 5,0 g; pepton z masa 2,5 g; pepton z kaseinu 2,5 g; kvasničný extrakt 2,5 g; masový extrakt 5,0 g; laktóza monohydrát 5,0 g; kyselina askorbová 0,5 g; b-glycerofosfát sodný 19,0 g; síran hořečnatý 0,25 g; agar-agar 12,75 g, destilovaná voda 1 litr.

Agar byl připraven navážením 55 g média M17, který se nechal za občasného míchání rozpustit v 1 litru destilované vody, pro urychlení rozpouštění se suspenze zahřála na 45 °C, po dokonalém rozpuštění se upravilo pH tak, aby po sterilaci měl agar pH 7,2 ± 0,2 při 25 °C. Sterilace probíhala 15 minut při 121 °C. Po sterilaci se agar zchladil na 45 °C a rozléval do inokulovaných Petriho misek. Médium v Petriho miskách má být hnědé a čiré

Příprava vzorku

Příprava vzorku probíhala stejným způsobem jako příprava vzorku v případě stanovení *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Inokulace a kultivace

Stanovení se provádělo souběžně do dvou Petriho misek. Za aseptických podmínek se očkovalo 1 ml vzorku nebo příslušného ředění do sterilních Petriho misek. Takto připravené misky byly zality M17 agarem. Ředění vzorku se volilo tak, aby Petriho misky po inkubaci obsahovaly 15 až 150 charakteristických kolonií. Inokulované Petriho misky se nechaly ztuhnout na vodorovné ploše za laboratorní teploty. Ztuhlé misky se kultivovaly při teplotě 28 °C po dobu 24 až 48 hodin za aerobních podmínek.

Vyhodnocování výsledků

Již po 15 hodinách jsou viditelné kolonie laktózo-pozitivních streptokoků. (WWW.MECOMM.CZ, STAŽENO 23. 10. 2012).

Stanovení celkového počtu mikroorganismů

Pro stanovení celkového počtu mikroorganismů mikrobiologickou metodou byl použit komerční výrobek firmy Merck, s.r.o., GTK agar (agar s peptonem z kaseinu, glukózou a kvasničným extraktem) o následujícím složení: Pepton z kaseinu 5,0 g; kvasničný extrakt 2,5 g; D(+)glukóza 1,0 g; agar - agar 14,0 g, destilovaná voda 1 litr.

Agar byl připraven navážením cca 22,5 g GTK agaru, který se za občasného míchání nechal rozpustit v 1 litru destilované vody, rozpuštění agaru bylo možné uspišit jeho ohřátím na 45 °C. Po dokonalém rozpuštění se upravilo pH tak, aby po sterilaci měl vzniklý agar pH 7,0 ± 0,2 při 25 °C. Sterilace probíhala 15 minut při 121 °C.

Po ukončené sterilaci se agar zchladil na 45 °C a rozléval do inokulovaných Petriho misek. Agar v Petriho miskách má být čirý a nažloutlý.

Příprava vzorku:

Příprava vzorku probíhala stejným způsobem jako příprava vzorků výše zmíněných.

Inokulace a kultivace

Stanovení se provádělo souběžně do dvou Petriho misek. Za aseptických podmínek se očkovalo 1 ml vzorku prvního ředění do sterilních Petriho misek. Takto připravené misky byly zality GTK agarem. Ředění vzorku se volilo tak, aby Petriho misky po inkubaci obsahovaly 15 až 150 charakteristických kolonií. Inokulované Petriho misky

se nechaly ztuhnout na vodorovné ploše za laboratorní teploty. Ztuhlé misky se kultivovaly při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin za aerobních podmínek.

Vyhodnocování výsledků

Po kultivaci jsou kolonie na GTK agaru velmi drobné, ale dobře viditelné bílé kolonie.

(WWW.MECOMM.CZ, STAŽENO 23. 10. 2012).

Stanovení koliformních bakterií

Pro stanovení koliformních bakterií mikrobiologickou metodou byl použit komerční výrobek firmy Merck, s.r.o., VČŽL agar - VRB agar (agar s krystalovou violetí, neutrální červení a žlučovými solemi) o následujícím složení: Pepton z masa 7,0 g; kvasničný extrakt 3,0 g; chlorid sodný 5,0 g; laktóza 10,0g; neutrální červeň 0,03 g; směs žlučových solí 1,5 g; krystalová violet' 0,002 g; agar-agar 13,0 g, 1 litr destilované vody.

Agar byl připraven navážením cca 39,5g VČŽL agaru, který se za občasného míchání nechal rozpustit v 1 litru destilované vody, rozpuštění agaru bylo možné uspišit jeho ohřátím na 45 °C. Po dokonalém rozpuštění se upravilo pH tak, aby měl vzniklý agar pH 7,4 ± 0,2. Sterilace agaru neprobíhala a tento byl ihned rozlíván do inokulovaných Petriho misek. Agar v Petriho miskách má být čirý a tmavě červený.

Příprava vzorku:

Příprava vzorku probíhala stejným způsobem jako příprava vzorků výše zmíněných.

Inokulace a kultivace

Stanovení se provádělo souběžně na dvou Petriho miskách. Za aseptických podmínek se očkovalo 1 ml vzorku prvního ředění do sterilních Petriho misek. Takto připravené misky byly zality VČŽL agarem. Ředění vzorku se volilo tak, aby Petriho misky po inkubaci obsahovaly 15 až 150 charakteristických kolonií. Inokulované Petriho misky se nechaly ztuhnout na vodorovné ploše za laboratorní teploty. Ztuhlé misky se kultivovaly při teplotě 37 °C po dobu 24 až 48 hodin za aerobních podmínek.

Vyhodnocování výsledků

Po kultivaci jsou kolonie na VČŽL agaru dobře viditelné s jemně růžovým nádechem.

(WWW.MECOMM.CZ, STAŽENO 23. 10. 2012).

Stanovení kvasinek a plísní

Pro stanovení kvasinek a plísní mikrobiologickou metodou byl použit komerční výrobek firmy Merck, s.r.o., GKCH agar -YGC agar (agar s kvasničným extraktem, glukózou a chloramfenikolem FIL-IDF) o následujícím složení: Kvasničný extrakt 5,0 g; D(+)glukóza 20,0 g; chloramfenikol 0,1 g; agar - agar 14,9 g, 1 litr destilované vody.

Agar byl připraven navážením cca 40 g GKCH agaru, který se za občasného míchání nechal rozpustit v 1 litru destilované vody, rozpuštění agaru se uspíšilo jeho ohřátím na 45 °C. Po dokonalém rozpuštění se upravilo pH tak, aby měl vzniklý agar pH $6,6 \pm 0,2$. Sterilizace probíhala 15 minut při 121 °C. Po sterilaci se agar zchladil na 45 °C a rozléval do inokulovaných Petriho misek. Médium v Petriho miskách má být žlutavé a čiré.

Inokulace a kultivace

Stanovení se provádělo souběžně na dvou Petriho miskách. Za aseptických podmínek se očkovalo 1 ml vzorku prvního ředění do sterilních Petriho misek. Takto připravené misky byly zality GKCH agarem. Ředění vzorku se volilo tak, aby Petriho misky po inkubaci obsahovaly 15 až 150 charakteristických kolonií. Inokulované Petriho misky se nechaly ztuhnout na vodorovné ploše za laboratorní teploty. Ztuhlé misky se kultivovaly při teplotě 25 °C po dobu 5 dnů za aerobních podmínek.

Vyhodnocování výsledků

Po kultivaci se počítaly všechny kolonie kvasinek a plísní.

(WWW.MECOMM.CZ, STAŽENO 23. 10. 2012).

3.4 Statistické vyhodnocení

Pro statistickou analýzu byla využita nabídka programů Microsoft Excel a Statistica Cz 9.0 (Statsoft s.r.o.). Zjištěné hodnoty mikrobiologických ukazatelů byly vyjádřeny také v logaritmických jednotkách.

U souboru byly vyhodnoceny předpoklady pro užití parametrických metod a k analýze vlivů výrobce, skladování a druhu jogurtu byla použita jednofaktorová analýza rozptylu. Pro porovnání (post-hoc testy) ve skupinách byl použit Fisherův LSD test na obvyklých hladinách významnosti ($p < 0,05$; $p < 0,01$).

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Zastoupení a množství živých mikroorganismů jsou jedním z hlavních kritérií jakosti kysaných mléčných produktů a ovlivňují také jejich kyselost (DAVE a SHAH, 1997). V jogurtech je množství použitých mikroorganismů jogurtové kultury stanoveno na hodnotu 10^7 kolonií tvořících jednotek (KTJ) v 1 g (VYHLÁŠKA č. 77/2003).

Za účelem posouzení životaschopnosti mikroorganismů v jogurtech a sledování odpovídajícího minimálního množství stanoveného vyhláškou byly prováděny po dobu deklarované spotřeby (do 3. týdne) a dále pak dalších 5 týdnů mikrobiologické analýzy. Pro stanovení počtu mléčných bakterií – kmenů *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (dále jen *Lactobacillus*) a *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (dále jen *Streptococcus*) byly použity bílé a ovocné jogurty z tržní sítě od 3 výrobců.

Kromě počtu kulturních mikroorganismů byly sledovány také nežádoucí mikroorganismy (koliformní mikroorganismy, plísně a kvasinky) a kyselost produktu, kterou výrazným způsobem ovlivňuje množství přítomných mikroorganismů.

4.1 Kyselost jogurtů

Stanovení kyselosti potravin je základní analytický rozbor, který poskytuje informace o složení a jakosti potravin, lze jim kontrolovat technologii výroby potravinářských produktů a může se využít i ke kontrole správného skladování hotových výrobků nebo surovin pro potravinářskou výrobu. Zvýšená kyselost upozorňuje na zhoršení podmínek skladování, které vedou k rozkladu sacharidů a vzniku různých organických kyselin. Tento jev může být technologicky využitelný, např. rozklad laktózy při výrobě kysaných mléčných výrobků či tvarohů, ale někdy může signalizovat zhoršení organoleptických vlastností výrobků (DAVÍDEK 1982; DVOŘÁK 2003).

4.1.1 Aktivní a titrační kyselost jogurtu v závislosti na výrobcí

Aktivní a titrační kyselost je jedním z nejdůležitějších jakostních ukazatelů kysaných mléčných výrobků (ČERNÁ a MERGL, 1971). Ve všech vzorcích jogurtů byla proto stanovována aktivní kyselost (tabulka č. 4, graf č. 1), u jogurtů bílých navíc i titrační kyselost (tabulka č. 4, graf č. 2).

Vycházíme-li z prvního měření aktivní kyselosti bílých jogurtů, tedy z hodnot zjištěných po výrobě, vychlazení a distribuci do obchodní sítě, dochází při druhém

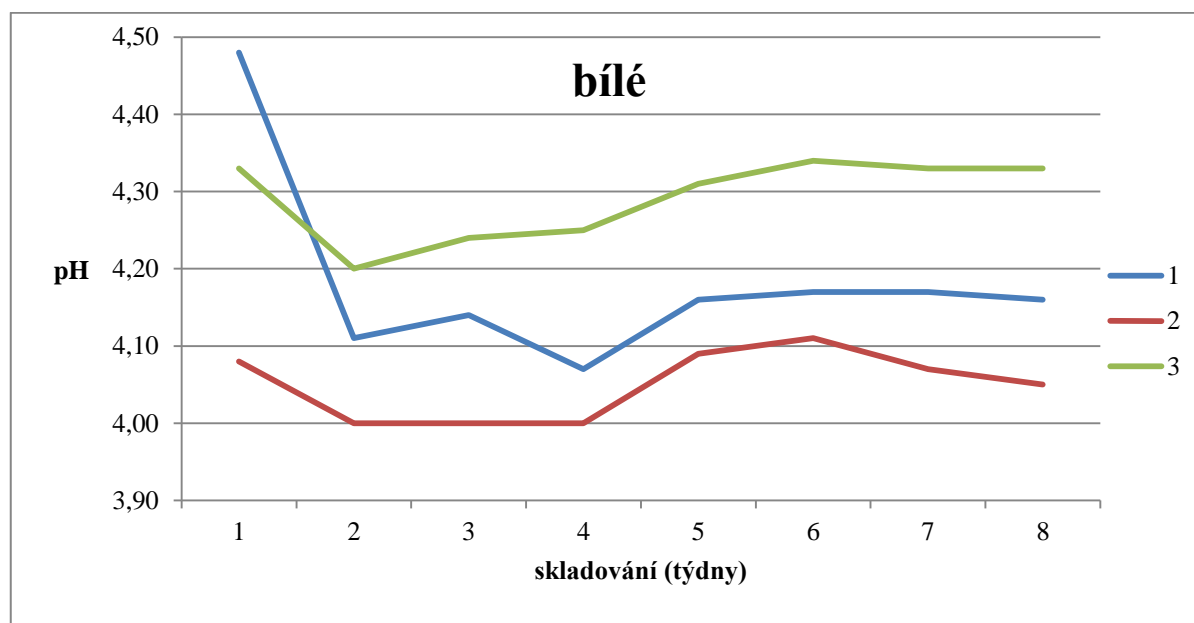
měření, tj. 14. den k výraznému poklesu pH, a to u jogurtů všech výrobců (graf č. 1). K nejvýraznějšímu poklesu dochází u výrobce č. 1. Po další 3 týdny zůstává kyselost relativně stabilní a od čtvrtého týdne dochází opět k nárůstu a tyto hodnoty se s výjimkou výrobce č. 2 udržují až do konce sledovaného období.

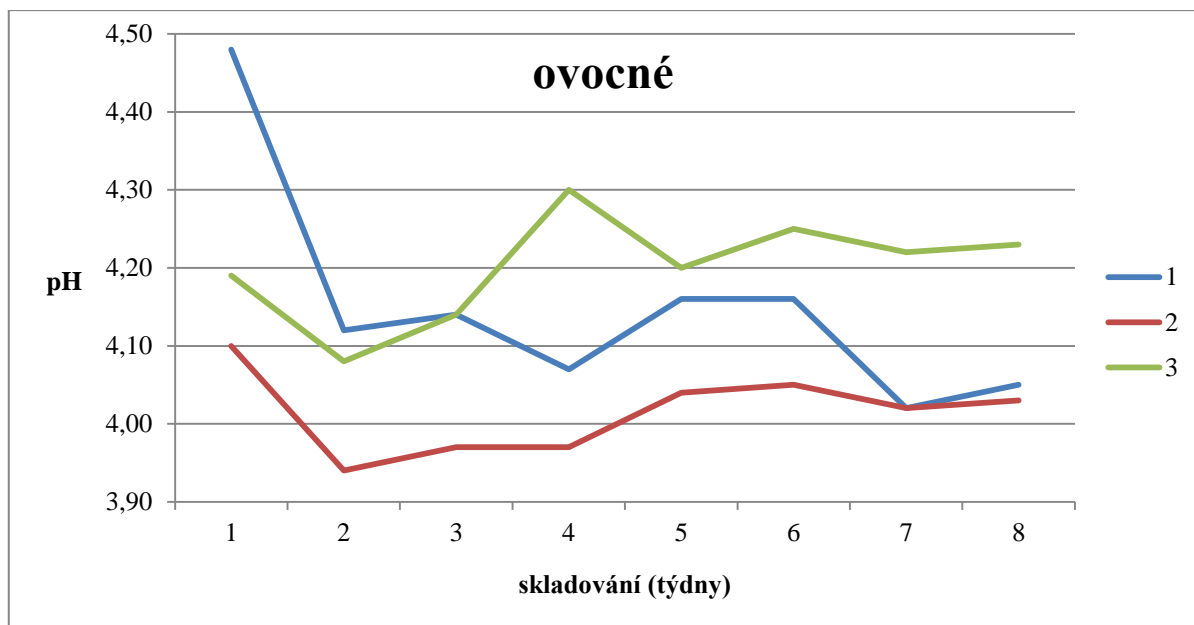
Tabulka č. 4: Aktivní a titrační kyselost bílých a ovocných jogurtů v jednotlivých týdnech skladování

Jogurty	Výrobce	Skladování (týdny)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Aktivní kyselost									
bílé	1	4,48	4,11	4,14	4,07	4,16	4,17	4,17	4,16
	2	4,08	4,00	4,00	4,00	4,09	4,11	4,07	4,05
	3	4,33	4,20	4,24	4,25	4,31	4,34	4,33	4,33
ovocné	1	4,48	4,12	4,14	4,07	4,16	4,16	4,02	4,05
	2	4,10	3,94	3,97	3,97	4,04	4,05	4,02	4,03
	3	4,19	4,08	4,14	4,30	4,20	4,25	4,22	4,23
Titrační kyselost* (SH)									
bílé	1	68,0	68,7	68,9	71,0	75,7	77,2	76,7	76,2
	2	68,8	70,0	70,1	69,0	69,0	68,6	70,0	69,8
	3	36,2	36,2	39,4	35,0	37,0	39,6	39,4	39,6

* titrační kyselost byla stanovována pouze u jogurtů bílých

Graf č. 1: Aktivní kyselost bílých jogurtů a ovocných jogurtů v jednotlivých týdnech skladování





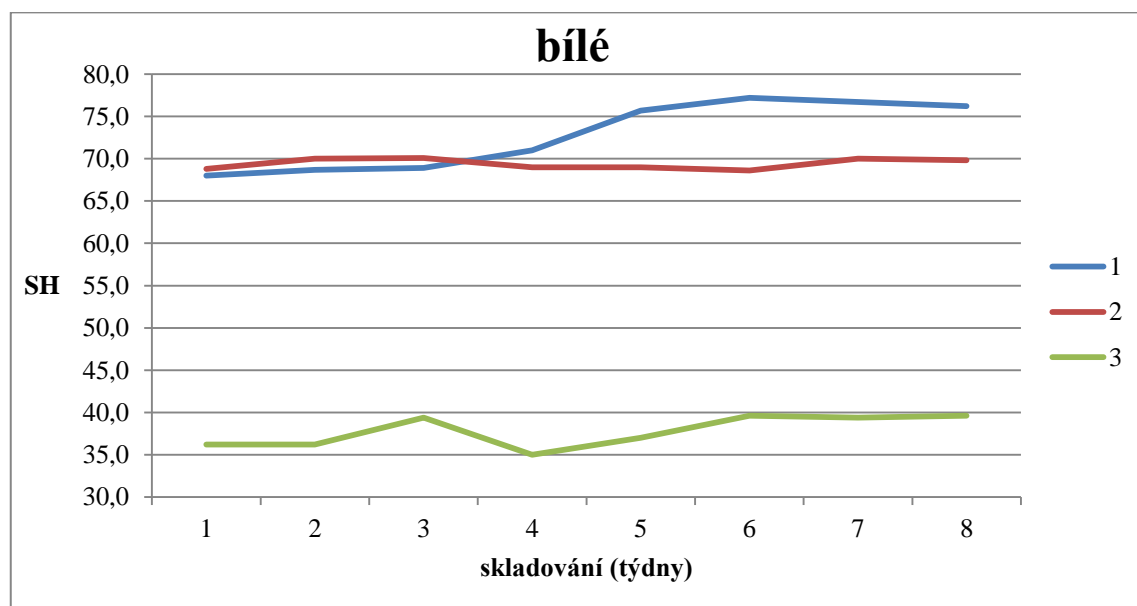
Zajímavou skutečností jsou velké rozdíly v kyselosti bílých jogurtů od jednotlivých výrobců při jejich distribuci do obchodní sítě. Ty jsou zřejmě zapříčiněny odlišným způsobem výroby, který používají daní výrobci – použitými teplotami při fermentaci, použitou kulturou, poměrem mezi kmeny *Lactobacillus* a *Streptococcus*, protože to jsou podle ONGOLA a kol. (2007) faktory, které ovlivňují fermentační proces a tedy i kyselost jogurtů. Rozdílné kyselosti jogurtů mezi výrobci byly zjišťovány po celou dobu pokusu. Jogurt výrobce č. 1 měl „expediční“ aktivní kyselost 4,48, ale v průběhu skladování klesla až na hladinu 4,16. Jogurt výrobce č. 2 měl expediční aktivní kyselost 4,08 a v průběhu skladování se hodnota aktivní kyselosti měnila jen velmi mírně. U výrobce č. 3 měl jogurt hodnotu aktivní kyselosti při expedici vyšší (4,33) než u výrobce č. 2 a po počátečním mírném poklesu na hodnotu 4,20 (2. týden) dále během skladování neustále mírně narůstala a osmý týden dosáhla původní hodnoty 4,33.

Podobný průběh kyselosti jako u bílých jogurtů byl zjištěn také u jogurtů ovocných. Jediná změna byla v tom, že po prudkém poklesu pH 14. den docházelo dále k dalším, i když nikterak výrazným výkyvům. K významnému poklesu z první naměřené hodnoty 4,48 oproti druhé naměřené hodnotě dochází opět u výrobce č. 1. Průběh křivky ukazuje, že v 7 týdnu skladování dochází u tohoto výrobce k dalšímu výraznému poklesu (4,02). U výrobce č. 2 byly od třetího týdne skladování relativně stále hodnoty a aktivní kyselost jogurtu v porovnání s jogurty druhých dvou výrobců nejnižší. Hodnoty kyselosti jogurtu u výrobce č. 3 v druhém měření sice poklesly z hodnoty 4,19 na 4,08, ale poté vzrostly a čtvrtý týden dokonce překročily

hodnoty kyselosti zjištěné v prvním týdnu (4,30). Vyšší hodnoty v porovnání s prvním týdnem pak byly zjišťovány až do konce sledovaného období osmi týdnů.

Zjištěné hodnoty titrační kyselosti bílých jogurtů v průběhu skladování znázorňuje graf č. 2. U výrobců č. 1 a č. 2 se titrační kyselost pohybuje kolem hodnoty 70 SH a během skladování je křivka relativně stabilní. U výrobce č. 3 je hodnota kolem 40 SH. HYLMAR (1986) uvádí, že požadovaná titrační kyselost by se měla pohybovat mezi 70 – 75 SH a GRIEGER (1990) uvádí, že při expedici by neměla překročit hodnotu 75 SH. Tyto hodnoty byly dosahovány u výrobce č. 2 po celou dobu sledování (68,8 až 70 SH). U výrobce č. 1 se hodnota titrační kyselosti po 4. týdnu zvýšila až na hodnotu 77,2 (6. týden), poté byl zjištěn mírný pokles 76,2 (8. týden). Výrobce č. 3 má velmi nízkou hodnotu SH, po celou dobu sledování prakticky nepřesáhly hodnot 40 SH, což mohla ovlivnit doba a teplota fermentace, příp. poměr ve složení kmenů jogurtové kultury (TAMIME, 2006).

Graf č. 2: Titrační kyselost bílých jogurtů v jednotlivých týdnech skladování



4.1.2 Statistické vyhodnocení vlivu výrobce a doby skladování

I když z předchozí kapitoly je zřejmé, že v průběhu skladování byly v kyselosti jogurtů často výrazné rozdíly, při statistickém vyhodnocení bylo zjištěno, že průměrné hodnoty aktivní a titrační kyselosti se u sledovaných vzorků jogurtů všech výrobců statisticky významně nelišily (tabulka č. 5).

Aktivní a titrační kyselost byla během celého období skladování prakticky stejná s výjimkou prvních třech týdnů skladování, kdy se hodnoty jak aktivní, tak titrační kyselosti výrazněji lišily, ovšem pravděpodobně z důvodu nízkého počtu vzorků nebyly rozdíly statisticky potvrzeny.

Tabulka č. 5 Vliv doby skladování na aktivní a titrační kyselost jogurtu

Skladování (týdny)	aktivní kyselost (n=6)		celková kyselost (n=3)	
	x	s _x	x	s _x
1	4,28	0,18	57,67	18,59
2	4,08	0,09	58,30	19,15
3	4,11	0,10	59,47	17,39
4	4,11	0,13	58,33	20,23
5	4,16	0,09	60,57	20,68
6	4,18	0,10	61,80	19,70
7	4,14	0,12	62,03	19,89
8	4,14	0,12	61,87	19,55
p	0,6981		0,9999	

*x = průměrné hodnoty, s_x = směrodatná odchylka, p = statistická významnost

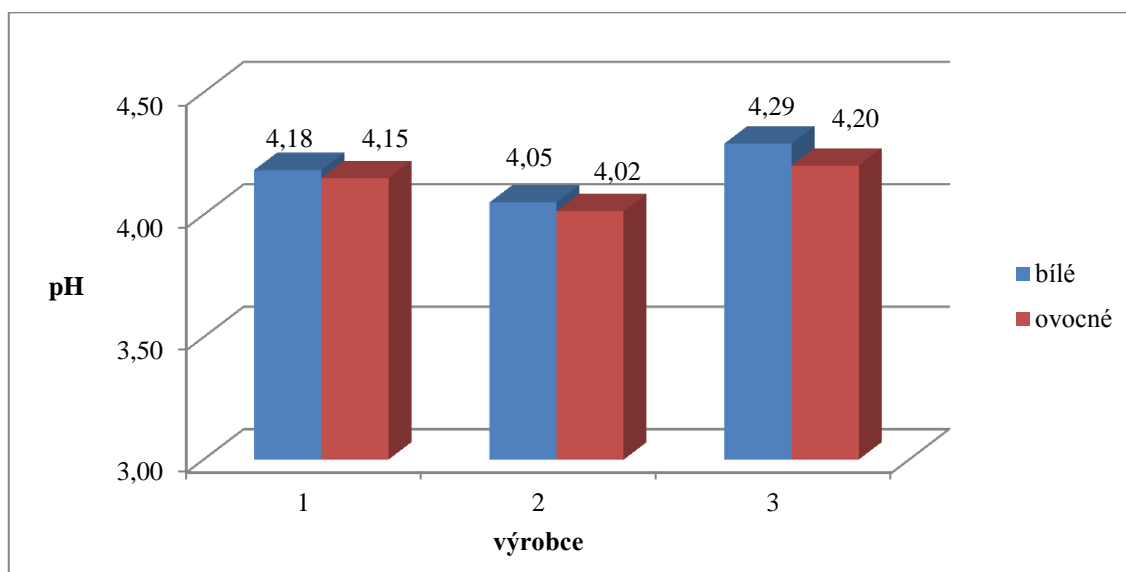
Při statistickém vyhodnocení vlivu výrobce bylo zjištěno, že průměrné hodnoty aktivní a titrační kyselosti jogurtů se statisticky významně lišily v závislosti na výrobci, zejména u jogurtů bílých (tabulka č. 6, graf č. 3). Nejnižší kyselost bílých jogurtů byla zjištěna u výrobce č. 3 (aktivní 4,3; celková 37,8 SH), nejvyšší u výrobce č. 2 (aktivní 4,1), resp. výrobce č. 1 (celková 72,8 SH). Rozdílné výsledky v aktivní a celkové kyselosti byly pravděpodobně způsobeny výrazně odlišnými hodnotami při prvním měření pH, kdy v případě výrobce č. 1 byly zjišťovány vyšší hodnoty, tedy nižší kyselost (viz kapitola 4.1.1), a tyto vyšší hodnoty mohly ovlivnit i celkovou průměrnou hodnotu pH 4,2.

Tabulka č. 6: Vliv výrobce na aktivní a titrační kyselost jogurtu

Výrobce	aktivní kyselost (n=8)				celková kyselost (n=8)	
	bílé		ovocné		bílé	
	x	s _x	x	s _x	x	s _x
1	4,2 ^b	0,13	4,2 ^a	0,14	72,8 ^c	4,0
2	4,1 ^a	0,04	4,0 ^b	0,05	69,4 ^b	0,6
3	4,3 ^c	0,05	4,2 ^a	0,07	37,8 ^a	1,9
p	0,0000		0,0026		0,0000	

*x = průměrné hodnoty, s_x = směrodatná odchylka, p = statistická významnost

Graf č. 3: Aktivní kyselost bílého a ovocného jogurtu v závislosti na výrobci



V grafu č. 3 je navíc patrné, že bílé jogurty mají nepochybně vyšší hodnotu aktivní kyselosti (4,18; 4,05 a 4,29 pro výrobce č. 1, 2 a 3) než jogurty ovocné (4,15; 4,02; 4,20). Důvodem nižší kyselosti ovocných jogurtů může být přidaná ochucující složka, která znamená výživnější prostředí pro kmen *Lactobacillus*, který v jogurtech zajišťuje kyselou chuť (KAILASAPATHY a kol., 2008).

4.2 Mikrobiologické ukazatele

4.2.1 Růst BMK rodů *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* v závislosti na výrobci

Při výrobě jogurtů se používá specifická kultura složená z mikroorganismů *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (BIROLLO a kol., 2000). Poměr tyčinek a koků v kultuře se pohybuje v rozmezí 1:2 až 2:1. Tyto mikroorganismy mají symbiotický vztah a spolu rychle tvoří kyselinu mléčnou, aromatické látky a popřípadě látky slizové, zlepšující konzistenci jogurtů. Dalším významným produktem rozkladu laktózy je acetaldehyd v množství 20 až 30 mg/l (GÖRNER A VALÍK, 2004).

Mikrobiologická analýza sledovaných vzorků jogurtů byla zaměřena na čtyři významné skupiny mikroorganismů, a to BMK, celkový počet mikroorganismů, koliformní bakterie, plísně a kvasinky, přičemž všechny mohou významně ovlivňovat

výslednou jakost vyráběných jogurtů. BMK jsou zodpovědné za vznik sensoricky aktivních látek a koliformní bakterie, kvasinky a plísně patří mezi nežádoucí mikroorganismy, které způsobují jakostní vady (MATARAGAS a kol., 2011).

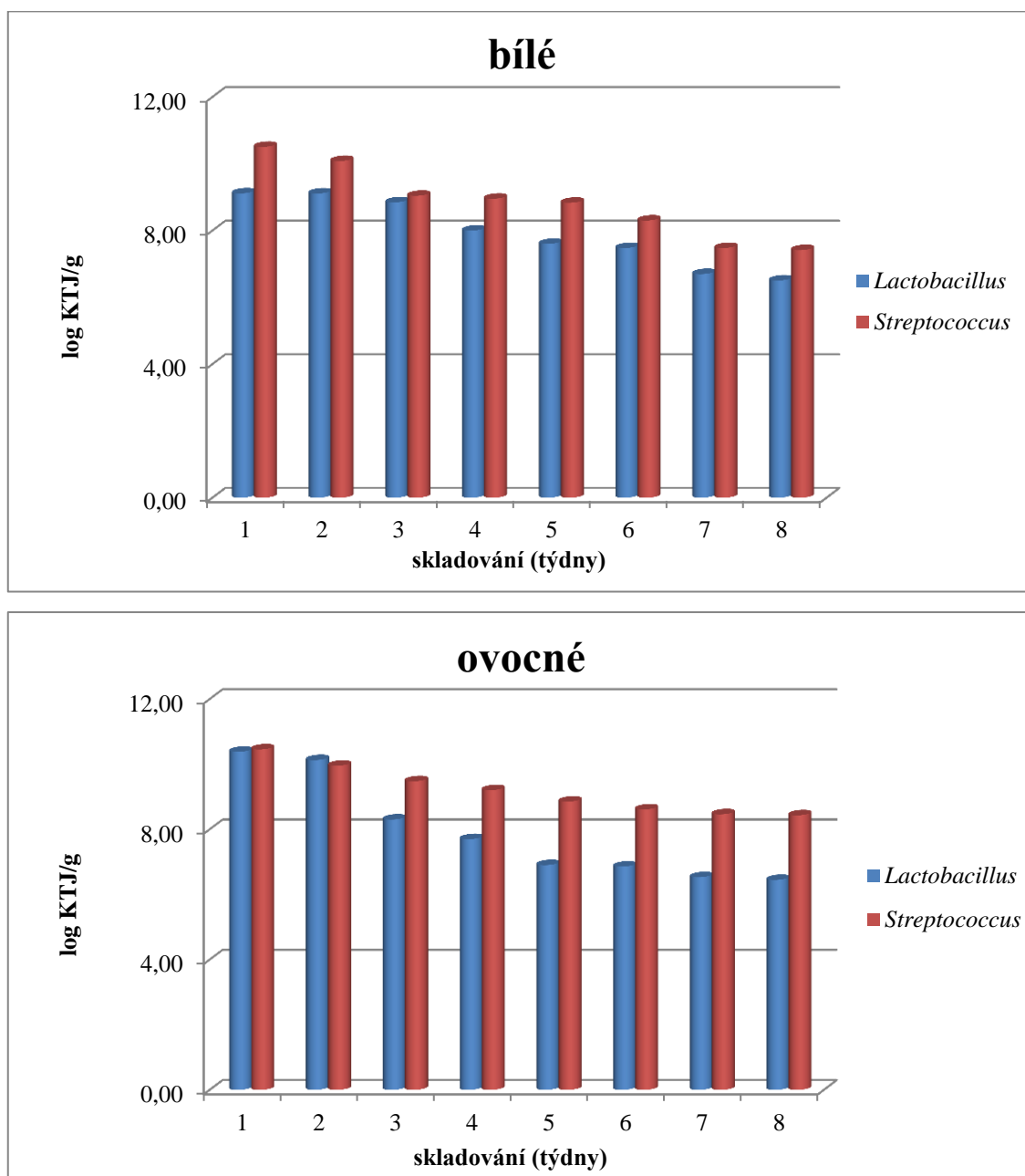
Celkový počet mikroorganismů kmenů *Lactobacillus* a *Streptococcus* u bílého a ovocného jogurtu výrobce č. 1 během celé doby sledování znázorňuje tabulka č. 7 a graf č. 4. Na počátku experimentu bylo u bílého jogurtu množství bakterií kmene *Lactobacillus* $1,3 \times 10^9$ KTJ/g (9,11 log KTJ/g) a kmene *Streptococcus* $3,2 \times 10^{10}$ KTJ/g (10,51 log KTJ/g). Celkové množství obou kmenů pak bylo $3,33 \times 10^{10}$ KTJ/g (8,83 log KTJ/g). Během skladování mají hodnoty BMK klesající tendenci a v osmém týdnu dosahovaly $2,9 \times 10^7$ KTJ/g (6,41 log KTJ/g).

U ovocného jogurtu bylo zjištěno, že na počátku obsahoval $2,4 \times 10^{10}$ KTJ/g (10,38 log KTJ/g) kmene *Lactobacillus* a $2,85 \times 10^{10}$ KTJ/g (10,45 log KTJ/g) kmene *Streptococcus*, tedy hodnoty vyšší než u jogurtu bílého. Celkové množství pak bylo $5,25 \times 10^{10}$ KTJ/g (9,86 log KTJ/g). Během skladování měly počty BMK též klesající tendenci, v osmém týdnu byly celkové počty kulturních bakterií $2,7 \times 10^8$ KTJ/g (7,0 log KTJ/g).

Tabulka č. 7: Zastoupení kmenů *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (log KTJ/g) u výrobce č. 1, bílé a ovocné jogurty

Jogurty	Kmeny	Skladování (týdny)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
bílé	<i>Lactobacillus</i>	9,11	9,11	8,85	8,00	7,60	7,48	6,70	6,51
	<i>Streptococcus</i>	10,51	10,08	9,04	8,95	8,83	8,30	7,48	7,41
	CELKEM	8,83	8,72	7,93	7,11	7,00	6,84	6,54	6,41
ovocné	<i>Lactobacillus</i>	10,38	10,13	8,30	7,70	6,90	6,86	6,53	6,45
	<i>Streptococcus</i>	10,45	9,95	9,48	9,20	8,85	8,61	8,46	8,43
	CELKEM	9,86	9,68	9,41	8,76	8,32	7,75	7,63	7,00

Graf č. 4: Zastoupení kmenů *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (log KTJ/g) u výrobce č. 1, bílé a ovocné jogurty



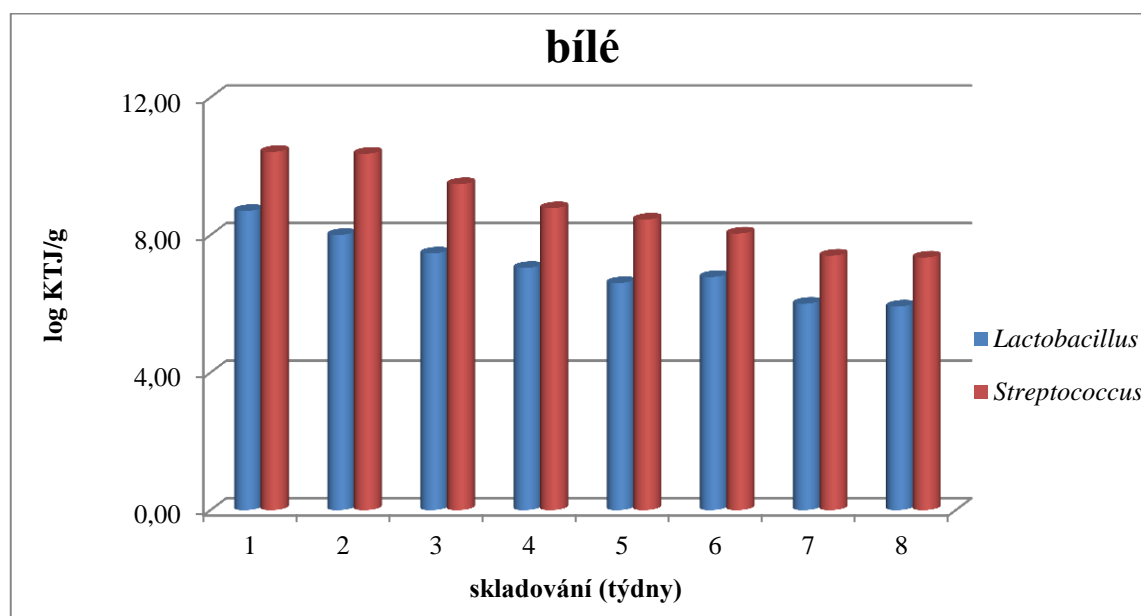
Tabulka č. 8 a graf č. 5 znázorňují výsledky analýz vzorků bílého a ovocného jogurtu u výrobce č. 2. Počáteční hodnoty kmene *Lactobacillus* byly $1,9 \times 10^9$ KTJ/g (9,28 log KTJ/g) a kmene *Streptococcus* $1,4 \times 10^{10}$ KTJ/g (10,15 log KTJ/g). Celkové množství obou kmenů bylo $1,59 \times 10^{10}$ KTJ/g (9,41 log KTJ/g). Stejně jako u výrobce č. 1 během skladování klesají. Celkové počty kulturních bakterií dosáhly v osmém týdnu hodnoty $1,4 \times 10^7$ KTJ/g (5,91 log KTJ/g).

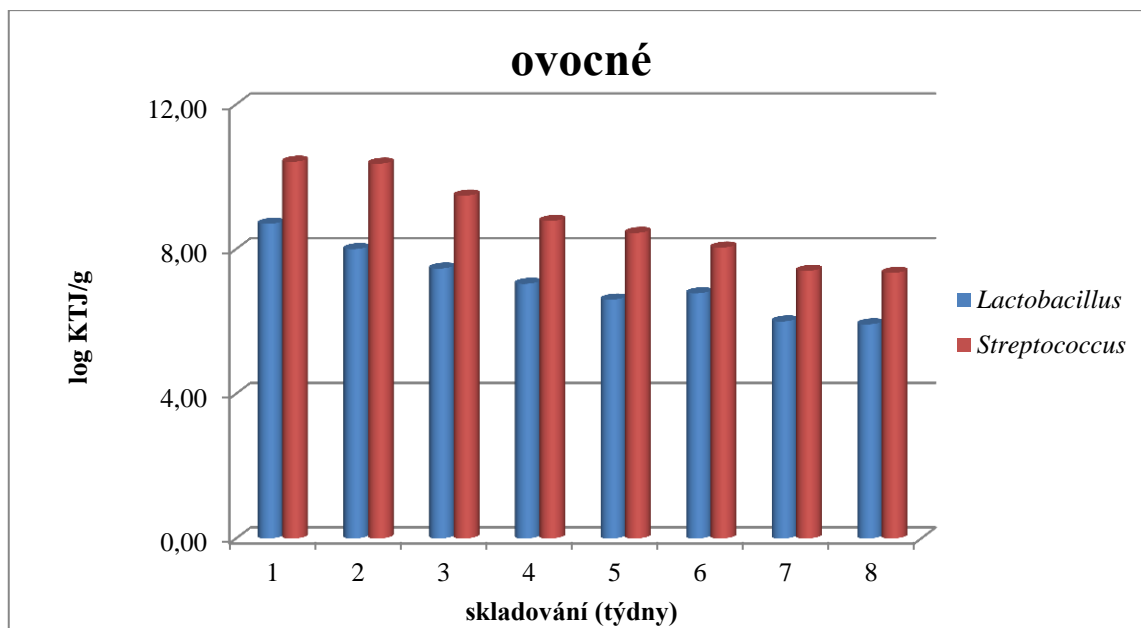
Ovocný jogurt obsahoval na počátku experimentu $5,8 \times 10^8$ KTJ/g (8,7 log KTJ/g) bakterií kmene *Lactobacillus* a $2,6 \times 10^{10}$ KTJ/g (10,41 log KTJ/g) kmene *Streptococcus*. Celkové množství pak činilo $2,65 \times 10^{10}$ KTJ/g (8,58 log KTJ/g) a během skladování se snížilo až na hodnoty $2,2 \times 10^7$ KTJ/g (5,92 log KTJ/g).

Tabulka č. 8: Zastoupení kmenů *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (log KTJ/g) u výrobce č. 2, bílé a ovocné jogurty

Jogurty	Kmeny	Skladování (týdny)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
bílé	<i>Lactobacillus</i>	9,28	8,00	7,66	7,04	6,95	6,00	5,85	5,84
	<i>Streptococcus</i>	10,15	9,18	9,04	8,78	8,18	8,00	7,23	7,15
	CELKEM	9,41	9,60	8,88	8,51	8,61	8,20	6,72	5,91
ovocné	<i>Lactobacillus</i>	8,70	8,00	7,46	7,04	6,60	6,78	6,00	5,92
	<i>Streptococcus</i>	10,41	10,36	9,48	8,78	8,45	8,04	7,40	7,34
	CELKEM	8,58	8,61	7,80	7,28	7,04	6,75	6,54	5,92

Graf č. 5: Zastoupení kmenů *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (log KTJ/g) u výrobce č. 2, bílé a ovocné jogurty





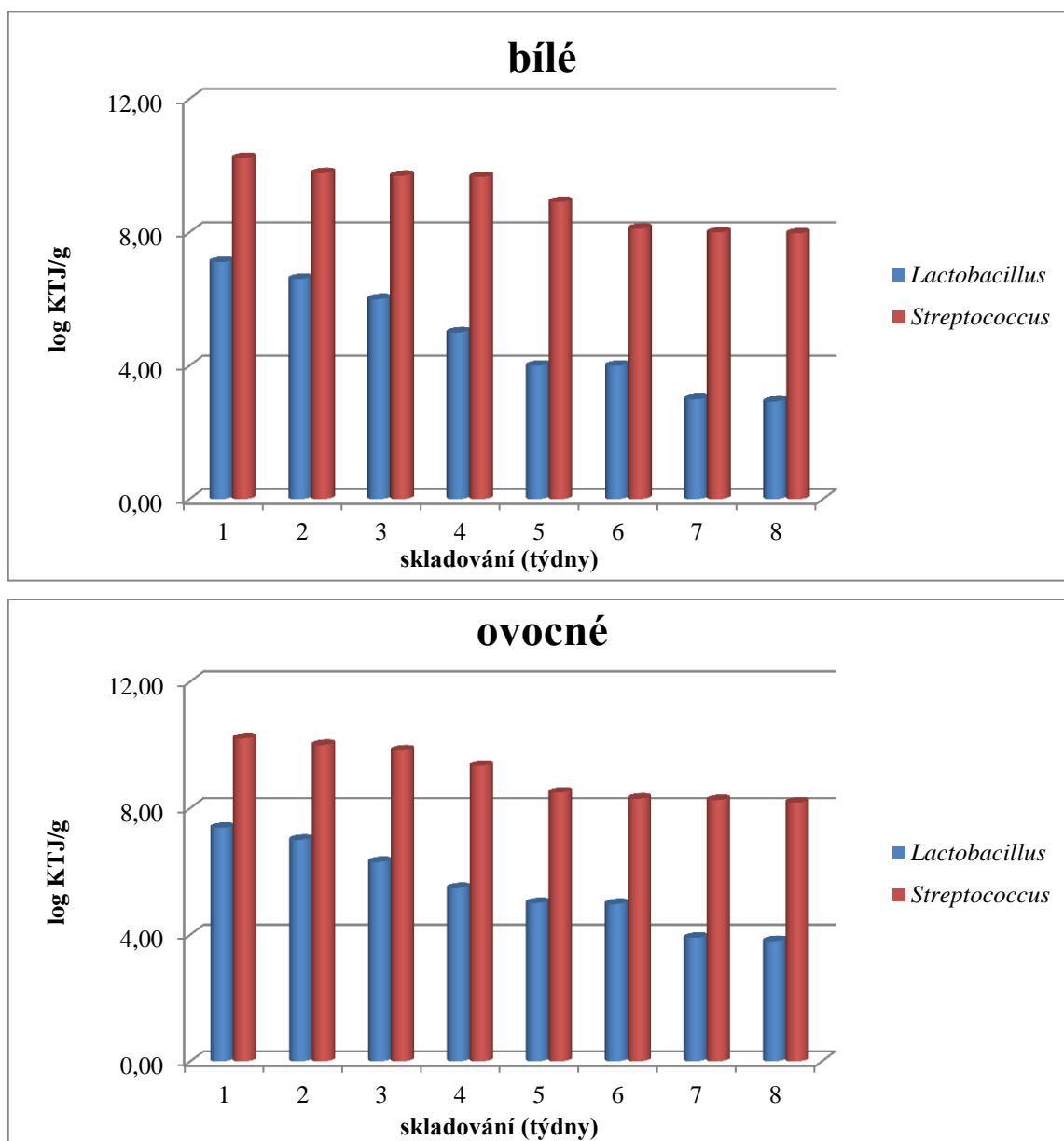
Výsledky sledování počtu mikroorganismů kmenů *Lactobacillus* a *Streptococcus* u výrobce č. 3 jsou znázorněny v tabulce č. 9 a grafu č. 6. U kmene *Lactobacillus* byla počáteční hodnota $1,3 \times 10^7$ KTJ/g (7,11 log KTJ/g), u kmene *Streptococcus* hodnota $1,7 \times 10^{10}$ KTJ/g (10,23 log KTJ/g). Celkové množství bakterií mléčného kvašení pokleslo z počáteční hodnoty $1,7 \times 10^{10}$ KTJ/g (9,72 log KTJ/g) a během skladování až na hodnoty $9,3 \times 10^7$ KTJ/g (7,20 log KTJ/g).

Ovocný jogurt obsahoval $2,4 \times 10^7$ KTJ/g (7,38 log KTJ/g) kmene *Lactobacillus* a $1,6 \times 10^{10}$ KTJ/g (10,20 log KTJ/g) kmene *Streptococcus*. Celkové množství bakterií mléčného kvašení bylo $1,6 \times 10^{10}$ KTJ/g (8,77 log KTJ/g) a osmý týden $1,5 \times 10^8$ KTJ/g (6,68 log KTJ/g).

Tabulka č. 9: Zastoupení kmenů *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (log KTJ/g) u výrobce č. 3, bílé a ovocné jogurty

Jogurty	Kmeny	Skladování (týdny)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
bílý	<i>Lactobacillus</i>	7,11	6,60	6,00	5,00	4,00	4,00	3,00	2,93
	<i>Streptococcus</i>	10,23	9,78	9,70	9,66	8,91	8,11	8,00	7,97
	CELKEM	9,72	8,98	8,80	8,48	7,95	7,76	7,63	7,20
ovocné	<i>Lactobacillus</i>	7,38	7,00	6,30	5,48	5,00	4,97	3,90	3,80
	<i>Streptococcus</i>	10,20	10,00	9,83	9,34	8,49	8,30	8,26	8,18
	CELKEM	8,77	8,61	7,93	7,80	7,26	6,98	6,74	6,68

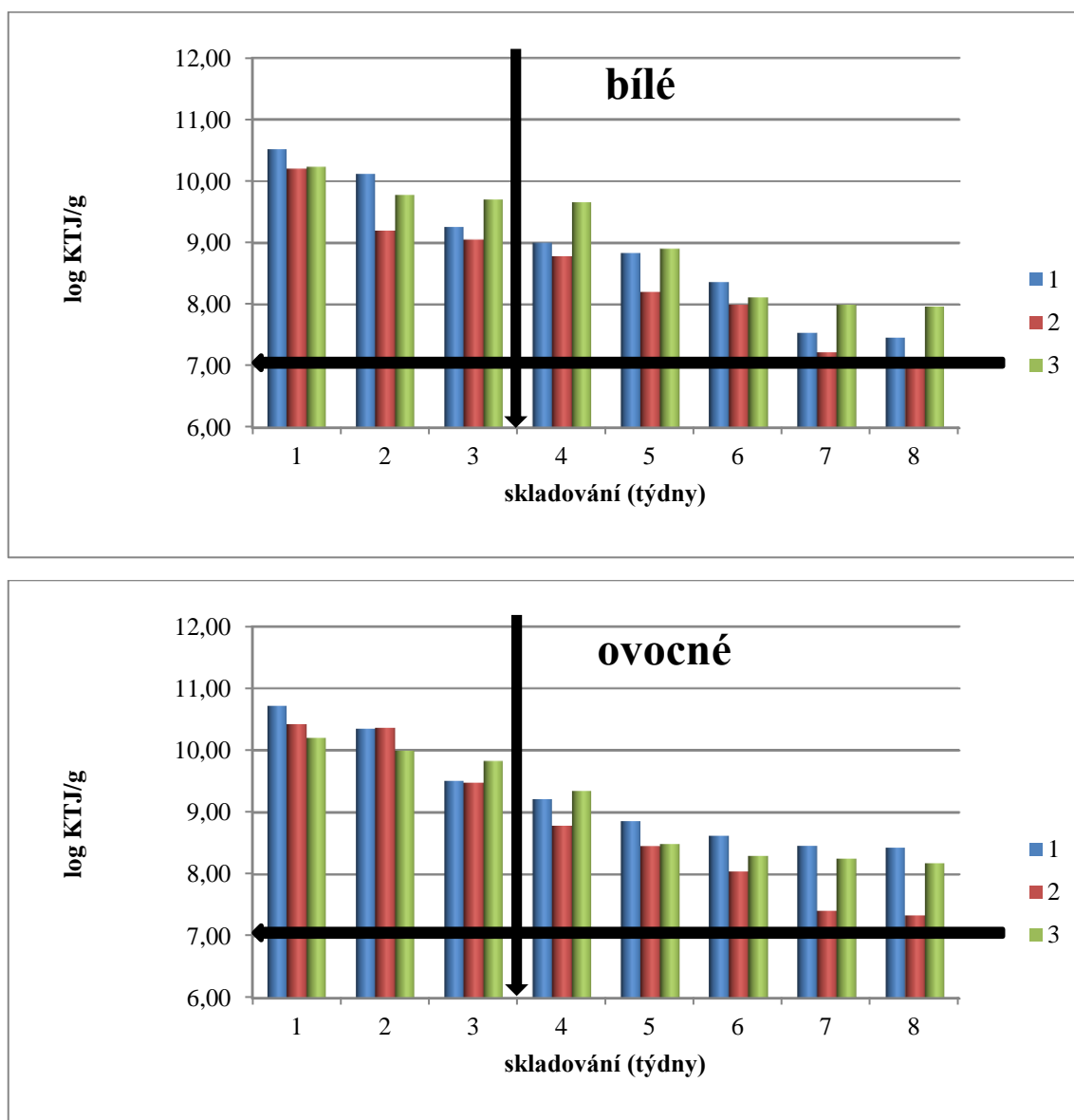
Graf č. 6: Zastoupení kmenů *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* u výrobce č. 3, bílé a ovocné jogurty



Při celkovém hodnocení počtu mikroorganismů u všech výrobců je patrné, že u výrobce č. 1 je poměr obou zastoupených kmenů bakterií mléčného kvašení vyrovnanější v porovnání s poměry obou kmenů u výrobce č. 2 a zvláště pak u výrobce č. 3. U jogurtů prvních dvou výrobců byly také zjištěny vyšší hodnoty kyselosti (kapitola 4.1.1) než tomu bylo u výrobce č. 3. Jak uvádí MCSWEENEY a kol. (2009), vyšší množství mikroorganismů kmene *Lactobacillus* výrazně ovlivňuje kyselost, tedy nižší zastoupení tohoto kmene u výrobce č. 3 pravděpodobně ovlivnilo i nižší hodnoty pH.

Souhrnné vyhodnocení sledovaných kmenů bakterií (graf č. 7) ukazuje, že celkové množství živých mikroorganismů 10^7 KTJ/g požadované legislativou ČR (Vyhláška č. 77/2003) bylo u všech výrobců splněno nejen v době, kdy je deklarované ukončení spotřeby, ale ještě dalších 5 týdnů poté, přičemž u výrobce č. 1 byly zjištěny nejvyšší hodnoty zdraví prospěšných mikroorganismů ($3,33 \times 10^{10}$ KTJ/g u jogurtů bílých a u jogurtů ovocných byla hodnota $5,25 \times 10^{10}$ KTJ/g).

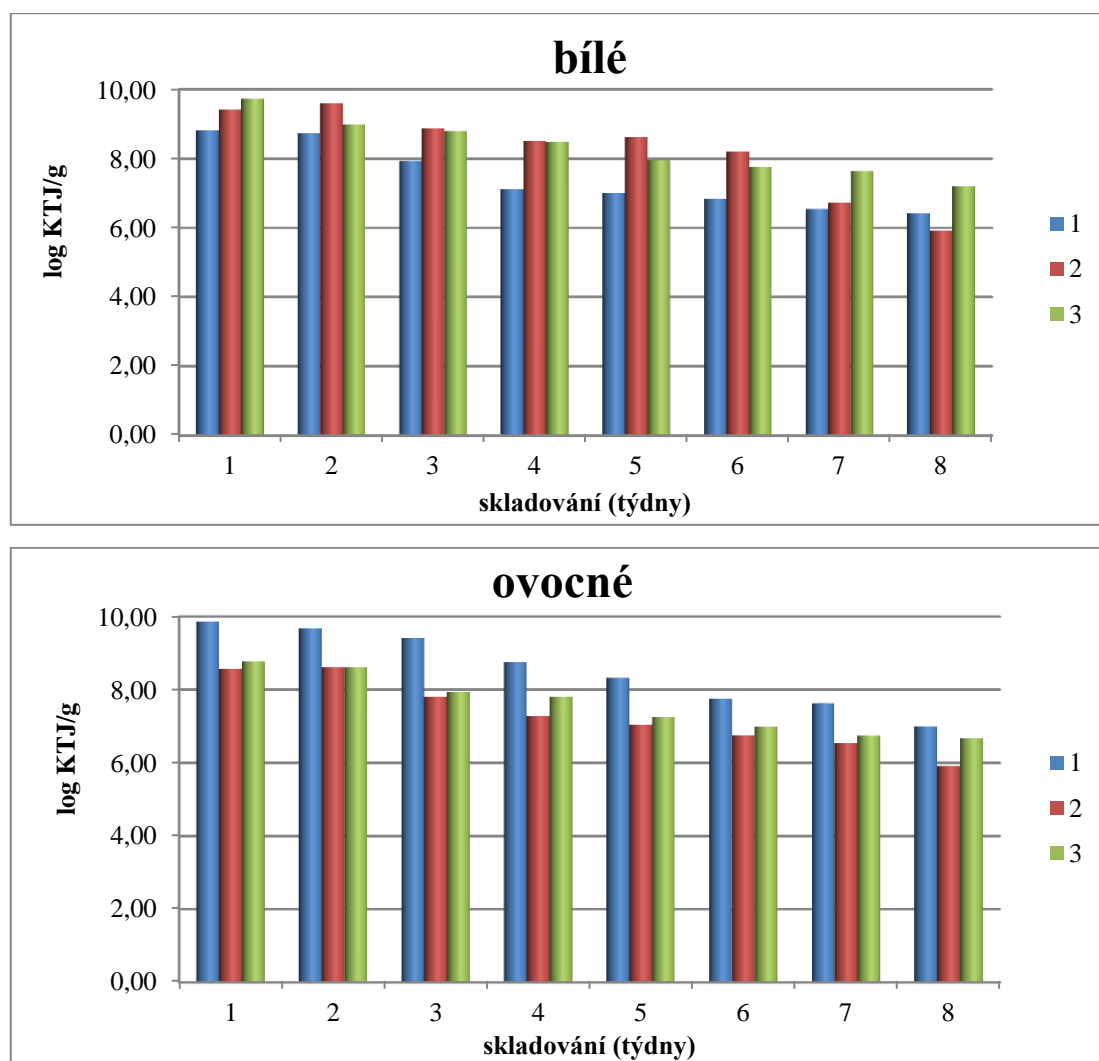
Graf č. 7: Celkový počet bakterií mléčného kvašení (log KTJ/g) v průběhu skladování bílých a ovocných jogurtů



* svislá šipka značí deklarovanou dobu spotřeby; vodorovná požadovaný limit 10^7 bakterií

Celkový počet mikroorganismů (CPM) u jogurtů bílých a ovocných (graf č. 8) není ukazatelem nežádoucí kontaminace a promítají se v něm i počty BMK. Zjištěná rozdílná množství celkového počtu BMK a CPM jsou zřejmě způsobena typem živné půdy (MRS), kde rostou dobře zejména kmeny rodu *Lactobacillus*, méně naopak kmeny rodu *Streptococcus*. Na základě zjištěných výsledků lze usuzovat, že živný agar (GTK resp. Plate count agar), který doporučila Mezinárodní mlékárenská federace (IDF) v roce 1985 jako standardní agar pro zjištění celkového počtu fakultativně anaerobních mezofilních bakterií (tedy CPM) v mléce a mléčných výrobcích, není ideální pro stanovení počtu těchto mikroorganismů ve fermentovaných výrobcích, obzvláště v jogurtech. Zjištěné hodnoty CPM tedy nemají zásadní vliv na posouzení kvality vyráběných jogurtů

Graf č 8: Celkový počet mikroorganismů (log KTJ/g) v průběhu skladování bílých a ovocných jogurtů



Kažení jogurtů, zejména ovocných může být způsobené plísněmi a kvasinkami, které se objevují především před ukončením doby spotřeby (MATARAGAS a kol., 2011). Kromě kažení pak tyto nežádoucí mikroorganismy mohou způsobovat biochemické změny a následně mít vliv na lidské zdraví (VILJOEN a kol., 2003). V žádném z analyzovaných vzorků jogurtů však přítomnost těchto nežádoucích mikroorganismů nebyla potvrzena a stejně tak nebyl zaznamenán výskyt koliformních bakterií.

4.2.2 *Statistické vyhodnocení vlivu výrobce a doby skladování*

Při hodnocení vlivu výrobce (tabulka č. 10) byl prokázán statisticky významný vliv pouze v případě počtu bakterií kmene *Lactobacillus* u bílého ($p < 0,0003$) i ovocného jogurtu ($p < 0,0046$), kde byl statisticky významně vyšší počet u výrobce č. 1 (bílé 7,92 log KTJ/g, ovocné 7,91 log KTJ/g) a č. 2 (bílé 7,08 log KTJ/g, ovocné 7,06 log KTJ/g) v porovnání s výrobcem č. 3 (bílé 4,83 log KTJ/g, ovocné 5,48 log KTJ/g).

Grafy č. 9 až 11 přehledně znázorňují zastoupení BMK jednotlivých výrobců. Vzniklé rozdíly v jejich počtu jsou zřejmě dány použitím různých komerčně připravených kultur pro výrobu jogurtů (DAVE a SHAH, 1997). Výrobce č. 1 používá složenou kulturu, která se připravuje přímo v laboratoři výrobce a je ve vitálním stavu, není tedy ovlivněna procesem úpravy běžným pro komerčně dostupné kultury (např. lyofilizací). Ostatní dva výrobci pravděpodobně používají tyto komerčně připravené kultury a v laboratořích výrobců se kultury následně připravují pro použití ve výrobě. Z výsledků diplomové práce vyplývá, že je výhodnější technologický postup přípravy kultur výrobce č. 1, který je ovšem mnohem náročnější, jednak na vybavení mikrobiologické laboratoře, čas při přípravě, ale i na zkušený personál.

Další faktory, které ovlivňují počty BMK jsou dány pravděpodobně odlišnou technologií výroby jogurtů (fermentační teploty, způsob fermentace) (DAVE a SHAH, 1997) a v neposlední řadě i regionálně odlišným složením kravského mléka, neboť ONGOLA a kol. (2007) a ALMEIDA a kol. (2009) uvádějí, že rozdílné složení suroviny ovlivňuje životaschopnost mikroorganismů.

Podobně jako u porovnání kyselosti bílých a ovocných jogurtů (kapitola 4.1.2) bylo i v případě počtu stanovovaných mikroorganismů zjištěno, že výraznější rozdíly mezi oběma jogurty byly zaznamenány u výrobce č. 3, a to v počtu mikroorganismů kmene *Lactobacillus* (graf č. 9). Při porovnání celkového počtu BMK však u tohoto

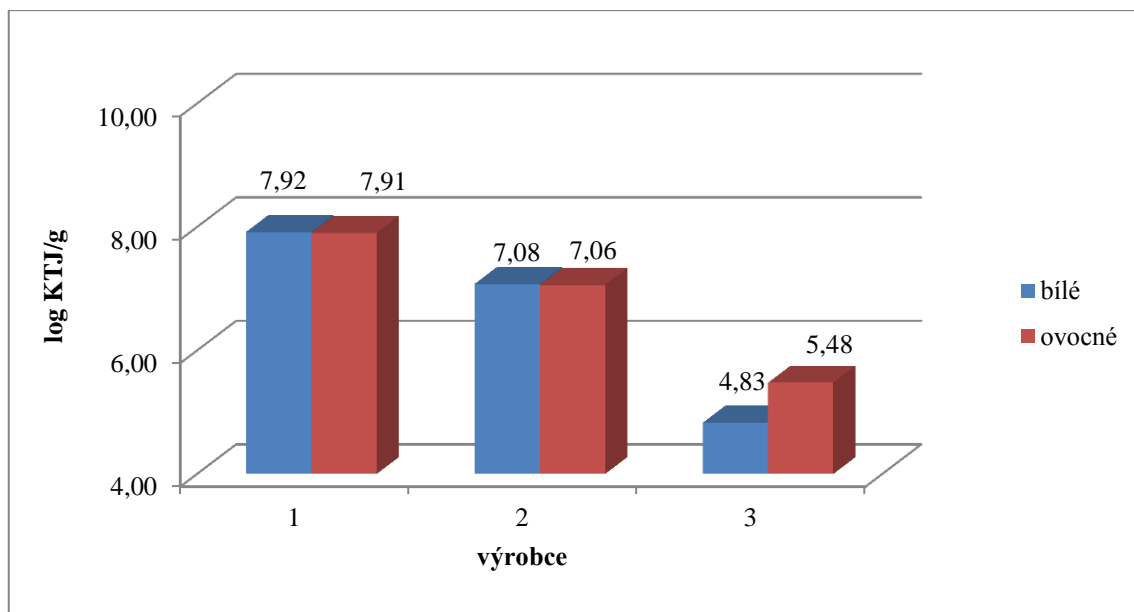
výrobce byly již počty BMK mezi bílými a ovocnými jogurty vyrovnané, zatímco u dalších dvou výrobců byly celkové počty BMK vyšší u ovocných jogurtů (graf č. 11).

Tabulka č. 10 : Vliv výrobce na sledované mikrobiologické ukazatele

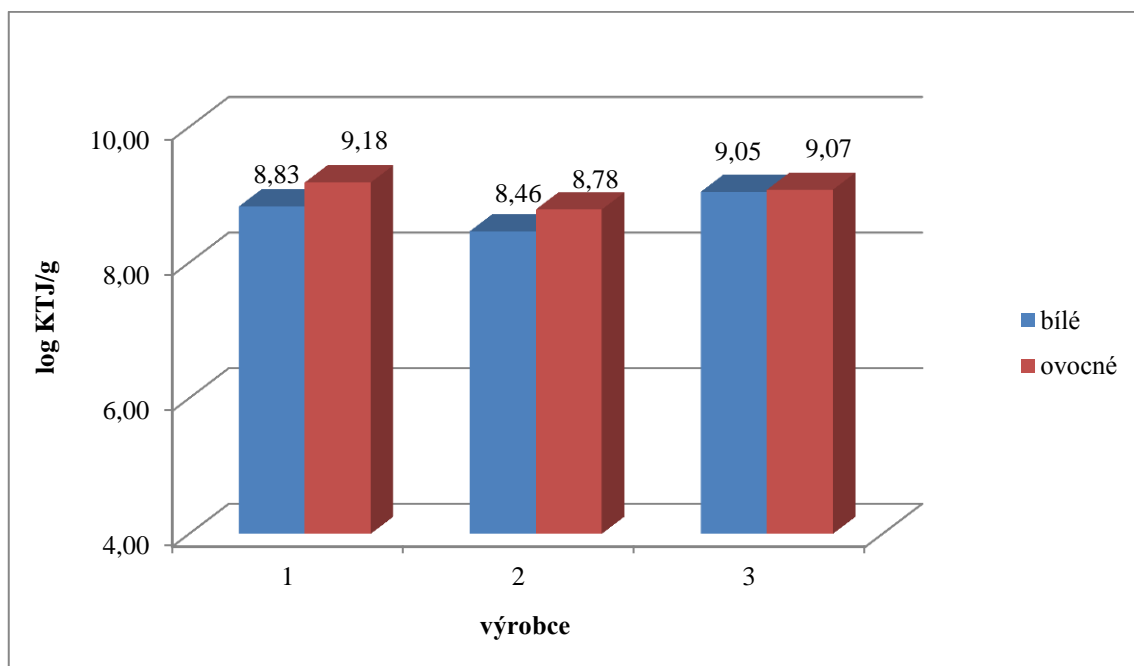
				1	2	3	p
<i>Lactobacillus</i> (v 1 g) (n=8)	bílé	log	x	7,92	7,08	4,83	0,0003
			s _x	1,03	1,21	1,61	
		počet	x	4,33x10 ⁸	2,59x10 ⁸	2,27x10 ⁶	0,2565
			s _x	5,80x10 ⁸	6,64x10 ⁸	4,55x10 ⁶	
	ovocné	log	x	7,91	7,06	5,48	0,0046
			s _x	1,58	0,96	1,33	
		počet	x	4,71x10 ⁹	8,15x10 ⁷	4,56x10 ⁶	0,1464
			s _x	9,09x10 ⁹	1,72x10 ⁸	8,56x10 ⁶	
<i>Streptococcus</i> (v 1 g) (n=8)	bílé	log	x	8,83	8,46	9,05	0,5221
			s _x	1,11	1,02	0,92	
		počet	x	5,88x10 ⁹	2,19x10 ⁹	4,22x10 ⁹	0,6457
			s _x	1,13x10 ¹⁰	4,81x10 ⁹	5,73x10 ⁹	
	ovocné	log	x	9,18	8,78	9,07	0,6949
			s _x	0,74	1,21	0,86	
		počet	x	5,47x10 ⁹	6,63x10 ⁹	4,47x10 ⁹	0,8956
			s _x	9,75x10 ⁹	1,11x10 ¹⁰	5,93x10 ⁹	
Celkem BMK (v 1 g) (n=8)	bílé	log	x	8,89	8,48	9,05	0,5289
			s _x	1,10	1,04	0,92	
		počet	x	6,30x10 ⁹	2,44x10 ⁹	4,22x10 ⁹	0,6481
			s _x	1,18x10 ¹⁰	5,47x10 ⁹	5,73x10 ⁹	
	ovocné	log	x	9,27	8,79	9,07	0,6281
			s _x	0,87	1,21	0,86	
		počet	x	1,02x10 ¹⁰	6,72x10 ⁹	4,47x10 ⁹	0,6826
			s _x	1,87x10 ¹⁰	1,13x10 ¹⁰	5,93x10 ⁹	

*x = průměrné hodnoty, s_x = směrodatná odchylka, p = statistická významnost

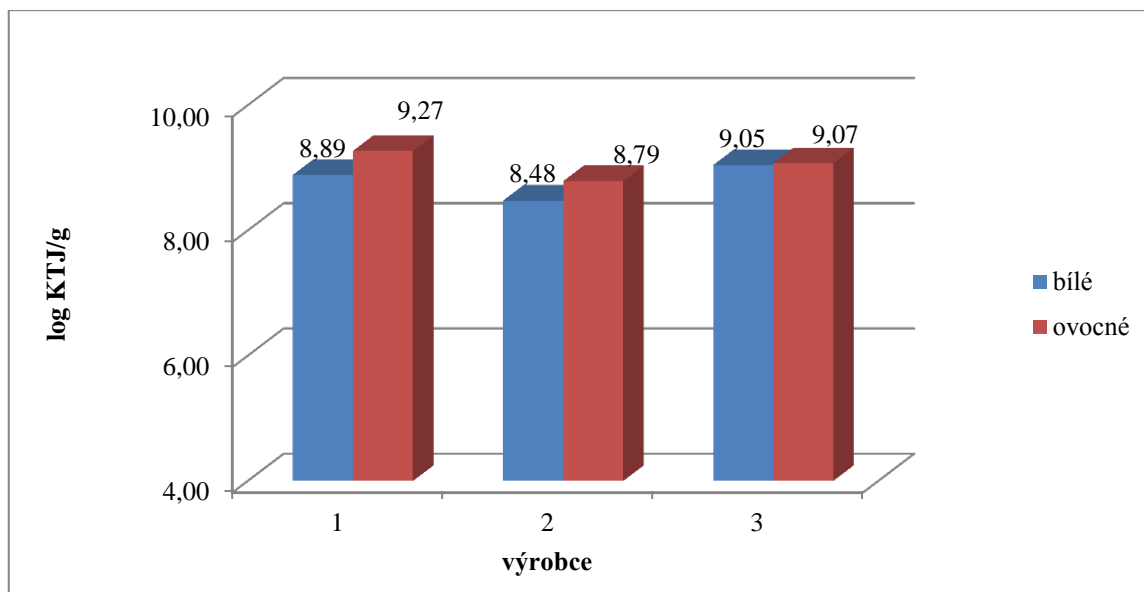
Graf č. 9: Vliv výrobce na počet bakterií rodu *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (log KTJ/g).



Graf č. 10: Vliv výrobce na počet bakterií rodu *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (log KTJ/g).



Graf č. 11: Vliv výrobce na počet bakterií rodu *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (log KTJ/g).



Zajímavé výsledky byly zjištěny také při statistickém vyhodnocení doby skladování (tabulka č. 11). Vliv tohoto faktoru byl statisticky významný u všech ukazatelů s výjimkou počtu bakterií kmene *Lactobacillus*.

Úbytek v počtech mikroorganismů je způsoben především vyčerpáním živin, obzvláště vitamínů a aminokyselin a obsahem vznikající kyseliny mléčné, kdy se postupně se zvyšujícím jejím obsahem zvyšuje i inhibiční schopnost (KADLEC, 2002).

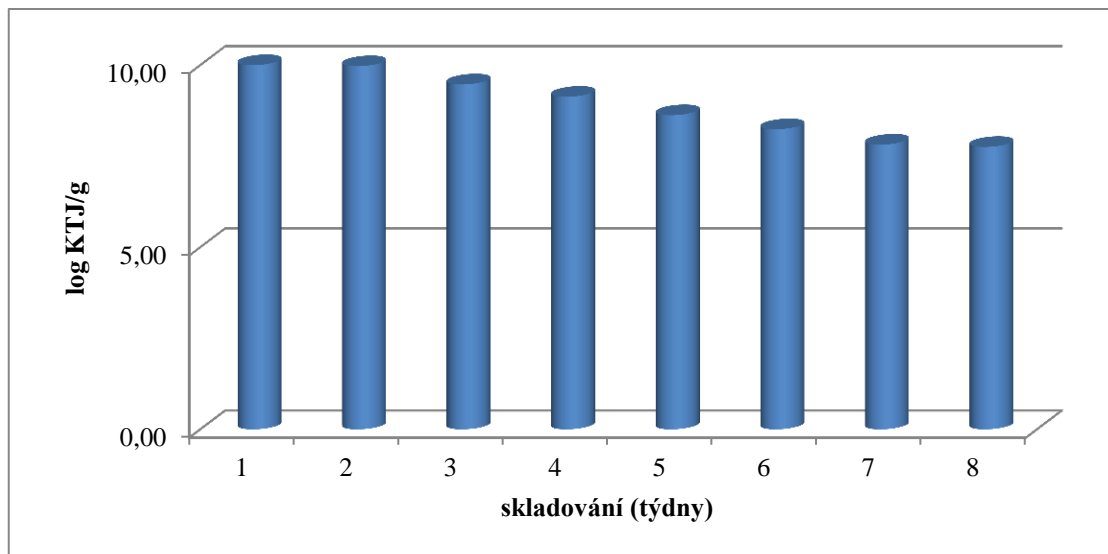
Jak již bylo uvedeno v kapitole 4.2.1, celkové počty mikroorganismů, které jsou z hlediska legislativních předpisů (VYHLÁŠKA č. 77/2003) pro jogurty určující, byly splněny nejen v době ukončení spotřeby, ale také osmý týden po ukončení výroby.

Vzhledem k tomu, že v žádném z analyzovaných vzorků nebyly zjištěny nežádoucí koliformní mikroorganismy, kvasinky a plísně, lze předpokládat, že u jogurtů daných výrobců by bylo možné dosud stanovenou dobu spotřeby prodloužit, neboť z hlediska těchto kritérií jsou výrobky zdravotně nezávadné a navíc splňují požadovaná legislativní kritéria.

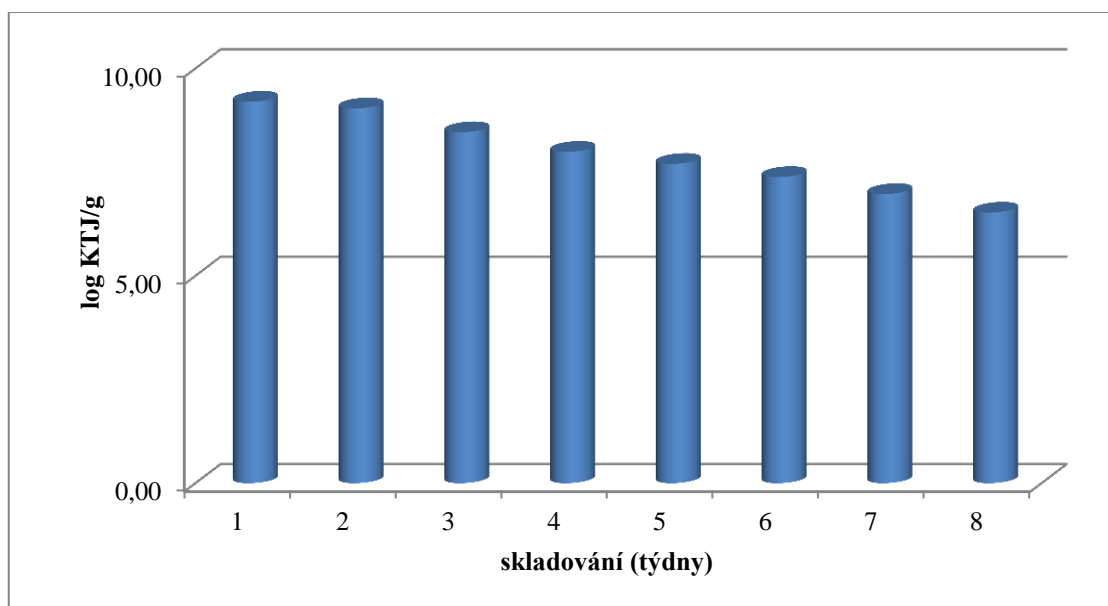
Tabulka č. 11: Vliv skladování na mikrobiologické ukazatele

	1	2	3	4	5	6	7	8	p
<i>Lactobacillus</i> (V 1 g)	x	8,66	7,43	6,71	6,18	6,01	5,33	5,24	0,1597
	s _x	1,23	1,31	1,21	1,38	1,31	1,52	1,50	
<i>Lactobacillus</i> (V 1 g)	x	4,62x10 ⁹	2,48x10 ⁹	1,63x10 ⁸	2,87x10 ⁷	1,019x10 ⁷	7,38x10 ⁶	1,68x10 ⁶	0,0985
	s _x	9,52x10 ⁹	5,37x10 ⁹	2,73x10 ⁸	3,95x10 ⁷	1,51x10 ⁷	1,15x10 ⁷	2,05x10 ⁶	
<i>Streptococcus</i> (V 1 g)	x	10,33	9,89	9,43	9,12	8,62	7,80	7,75	0,0000
	s _x	0,15	0,40	0,33	0,35	0,29	0,23	0,52	
<i>Streptococcus</i> (V 1 g)	x	2,23x10 ¹⁰	1,03x10 ¹⁰	3,32x10 ⁹	1,75x10 ⁹	4,90x10 ⁸	1,92x10 ⁸	1,07x10 ⁸	0,0001
	s _x	7,52x10 ⁹	7,24x10 ⁹	2,20x10 ⁹	1,53x10 ⁹	2,75x10 ⁸	1,15x10 ⁸	1,09x10 ⁸	
Celkem BMK (V 1 g)	x	10,38	9,97	9,47	9,13	8,62	7,82	7,75	0,0000
	s _x	0,21	0,44	0,28	0,34	0,28	0,49	0,51	
Celkem BMK (V 1 g)	x	2,69x10 ¹⁰	1,28x10 ¹⁰	3,48x10 ⁹	1,78x10 ⁹	4,94x10 ⁸	1,98x10 ⁸	9,63x10 ⁸	0,0000
	s _x	1,44x10 ¹⁰	8,72x10 ⁹	2,06x10 ⁹	1,52x10 ⁹	2,74x10 ⁸	1,19x10 ⁸	9,99x10 ⁷	
CPM (V 1 g)	x	9,20	9,04	8,46	7,99	7,70	6,97	6,52	0,0005
	s _x	0,54	0,49	0,66	0,69	0,69	0,52	0,54	
CPM (V 1 g)	x	2,81x10 ⁹	1,85x10 ⁹	7,04x10 ⁸	2,14x10 ⁸	1,25x10 ⁸	4,94x10 ⁷	1,73x10 ⁷	0,0360
	s _x	2,89x10 ⁹	2,00x10 ⁹	9,78x10 ⁸	2,22x10 ⁸	1,60x10 ⁸	5,94x10 ⁷	1,99x10 ⁷	

Graf č. 13: Vliv skladování na počet bakterií kmene *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* (log KTJ/g).



Graf č. 14: Vliv skladování na celkový počet mikroorganismů (log KTJ/g)



5 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo zjistit vitalitu kulturních bakterií v jogurtech v průběhu skladování, porovnat jejich množství s požadavky dané legislativními předpisy a vyhodnotit kyselost, kterou počet kulturních bakterií výrazně ovlivňuje.

Aktivní a titrační kyselost je jedním z nejdůležitějších jakostních ukazatelů kysaných mléčných výrobků. Měření aktivní kyselosti bílých i ovocných jogurtů prokázalo, že u jogurtů všech výrobců dochází po ukončení fermentačního procesu a následné distribuci k výraznému poklesu pH, zejména v prvních třech týdnech skladování. Titrační kyselost bílých jogurtů výrobců č. 1 a č. 2 se pohybovala kolem hodnoty 70 SH a během skladování byly hodnoty SH relativně stabilní. U výrobce č. 3 byla hodnota SH okolo 40 SH. Tuto nižší kyselost jogurtů mohla ovlivnit doba a teplota fermentace, příp. poměr ve složení kmenů jogurtové kultury. Při statistickém vyhodnocení bylo zjištěno, že průměrné hodnoty aktivní a titrační kyselosti u sledovaných vzorků jogurtů se statisticky významně odlišovaly v závislosti na výrobci, nikoliv však v závislosti na době skladování.

Mikrobiologická analýza sledovaných vzorků jogurtů byla zaměřena na čtyři významné skupiny mikroorganismů, a to bakterie mléčného kvašení (kmen *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*), celkový počet mikroorganismů, koliformní bakterie, plísňe a kvasinky.

Při celkovém hodnocení počtu mikroorganismů u všech výrobců je patrné, že u výrobce č. 1 je poměr obou zastoupených kmenů bakterií mléčného kvašení vyrovnanější v porovnání s poměry obou kmenů u výrobce č. 2 a zejména pak u výrobce č. 3. Úbytek v počtech mikroorganismů byl způsoben především vyčerpáním živin, obzvláště vitamínů a aminokyselin a obsahem vznikající kyseliny mléčné, kdy se postupně se zvyšujícím se jejím obsahem zvyšuje i inhibiční schopnost.

Souhrnné vyhodnocení sledovaných kmenů bakterií ukazuje, že celkové množství živých mikroorganismů 10^7 KTJ/g požadované legislativou ČR (VYHLÁŠKA č. 77/2003) bylo u všech výrobců splněno nejen v době, kdy je deklarované ukončení spotřeby, ale ještě dalších 5 týdnů poté.

Vzhledem k tomu, že v žádném z analyzovaných vzorků nebyly zjištěny nežádoucí koliformní mikroorganismy, kvasinky a plísňe, lze předpokládat, že u jogurtů daných výrobců by bylo možné dosud stanovenou dobu spotřeby prodloužit, neboť z hlediska

těchto kritérií jsou výrobky zdravotně nezávadné a navíc splňují požadovaná legislativní kritéria.

6 SUMMARY

The aim of this thesis was to determine the viability of cultural bacteria in yoghurt during storage, compare that amount with the requirements of the legislation and evaluate acidity that number significantly affects bacterial culture.

Active and titratable acidity is one of the most important indicators of quality of fermented dairy products. Measurement of active acidity white and flavoured yoghurts showed that the yoghurt all manufacturers occurs after fermentation and subsequent distribution of a significant decrease in the pH, particularly in the first three weeks of storage. Titratable acidity of white yoghurt's No. 1 and No. 2 was about a 70 SH during storage and SH values were relatively stable. Manufacturer No. 3 was worth around SH 40 SH. This lower acidity of the yoghurt may affect the duration and temperature of fermentation, or. ratio in the composition of strains of yoghurt culture. In statistical evaluation, it was found that the average active and titratable acidity in the investigated samples of yogurt with a statistically significantly differed depending on the manufacturer, but not depending on the storage time.

Microbiological analysis of observed samples of yoghurt were focused on four major groups of microorganisms, namely lactic acid bacteria (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*), total bacterial count, coliform bacteria, fungi and yeasts.

The overall assessment of the number of microorganisms of all manufacturers is obvious that the manufacturer No. 1 is the ratio of both represented by lactic acid bacteria strains smoother compared with the ratios of the two strains with the manufacturer No. 2 and in particular the manufacturer No. 3. Decrease in the number of microorganisms was primarily due to the exhaustion of nutrients, particularly vitamins and amino acids, lactic acid generated when gradually increasing its content increases the inhibitory capacity

Summary evaluation of the monitored bacterial strains shows that the total number of live microorganisms 10^7 CFU / g required by the national legislation (Decree No. 77/2003) were all producers met only when it is declared for consumption, but for another five weeks later.

Given that none of the samples analyzed were found undesirable coliform microorganisms, yeasts and moulds, it can be assumed that the yoghurt of the manufacturers could not set time consumption extended because of the terms of these criteria are wholesome products and also meet the required legislative criteria.

7 SEZNAM ZKRATEK

BMK..... bakterie mléčného kvašení

SH..... titrační kyselost podle Soxhlet-Henkela (je dána počtem mililitrů
odměrného roztoku $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol.l}^{-1}$ spotřebovaného při titraci
zkušebního vzorku na fenolftalein jako indikátor).

KTJ.....kolonie tvořící jednotky

CPM.....celkový počet mikroorganismů

Lactobacillus.....*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Streptococcus.....*Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

x.....průměrné hodnoty

s_xsměrodatná odchylka

p.....statistická významnost

8 SEZNAM LITERATURY

- 1) ADOLFSSON, O., MEYDANI, S. N.: *Yoghurt and gut fiction. The American Journal of Clinical Nutrition*, č. 80, 2004, s 245 – 256
- 2) ALMEIDA, K. E., TAMIME, A. Y., OLIVEIRA, M. N.: *Influence of total solids contents of milk whey on the acidifying profile and viability of various lactic acid bacteria*. *LWT - Food Science and Technology*, 2009, 42, 672–678.
- 3) BIROLLO, G. A., REINHEIMER, J. A., VINDEROLA, C. G.: *Viability of lactic acid mikroflora in different types of yoghurt*. *Food Research International*. 2000, 33, 799-805 s.
- 4) BOHAČENKO, I., PINKROVÁ, J., PEROUTKOVÁ, J.: *Fermentace směsí laktosy a laktulose kmenem *Lactobacillus acidophilus**. *Chemické listy* č. 101, s. 911-915
- 5) ČERNÁ, E., MERGL, M.: *Laboratorní kontrolní metody v mlékařství*. 1 vyd. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1971. 264 s.
- 6) DAVE, I. R., SHAH, P. N.: *Viability of yoghurt and probiotics bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures*. *International Dairy Journal* 7, 1997, 31-41 s.
- 7) DAVÍDEK, J. a kol. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. 2.vyd. Praha: SNTL, 1982
- 8) DRAGOUNOVÁ, H.: *Hodnocení jakosti mléka a mlékárenských výrobků*. Praha: Česká zemědělská Univerzita, 2003, 57 s.
- 9) DVOŘÁK, V. *Analytická chemie I*. 1.vyd. Kroměříž: VOŠP, 2003
- 10) FORMAN., L.: *Mlékárenská technologie II*. 2. vyd., Praha, VŠCHT, 1996, 228 s.
- 11) GAJDŮŠEK, S.: *Mlékařství*. Brno: Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2000, 142 s.
- 12) GIBSON, C., WILLIAMS, CH.: *Functional food, Boca Raton*, 1 st vyd., USA: Woodhead Publishing Limited, 2000
- 13) GÖRNER, F., VALÍK, L. *Aplikovaná mikrobiologie požívatín*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 558 s.
- 14) GRIEGER, C.: *Hygienu mléka a mléčných výrobků*. 1. vyd., Bratislava: Příroda, 1990, 397 s.
- 15) HOĐÁK, F.: *Fyziologie a biochemie bakterií*. Brno: MU (UJEP), 1979
- 16) HOLEC, J.: *Cizorodé látky v mléku a v mléčných výrobcích*. IN: *Hygienu*

- mlika a mliečnych výrobkov. ED: GRIEGER, C. 1. vyd. Bratislava: Príroda, 1990. 397 s. ISBN: 80-07-00253-7.
- 17) HORIUCHI, H., a kol.: *A method for manufacturing superior set yoghurt under reduced oxygen conditions. Journal of Dairy Science: Official Publication of the American Dairy Science Association.* 2009, vol 92, no. 9, č. 4112-4121
 - 18) HOZA, L., KRAMÁŘOVÁ, D., BUDÍNSKÝ, P. *Potravinářská biochemie III.* díl, 1. vyd. Zlín: UTB – Academia centrum, 2006
 - 19) HRABĚ, J., BŘEZINA, P., VALÁŠEK, P.: *Technologie výroby potravin živočišného původu.* 1. vyd. Zlín: UTB – Academia centrum, 2006
 - 20) HRABĚ, J., BUŇKA, F., HOZA, I., BŘEZINA, P.: *Technologie výroby potravin živočišného původu.* 1. vyd., Zlín: UTB ve Zlíně, 2007, 186 s.
 - 21) HYLMAR, B.: *Výroba kysaných mléčných výrobků.* 1. vyd., Praha: SNTL, Bratislava: ALFA, 1986, 209 s.
 - 22) HYLMAR, B.: *Zvyšování nutričních a dietetických vlastností mléka baktériemi mléčného kvašení.* 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav mlékárenský, 1985, 139 s.
 - 23) CHANDAN, R. C.: *Manufacturing Yoghurt and Fermented Milks.* Blackwell Publishing, 2006, 359 s.
 - 24) JAY, James M., LOESSNER, Martin J., GOLDEN, David A.: *Modern food Microbiology,* 7 th edition. New York: Springer, 2009, 790 s.
 - 25) KADLEC, P.: *Technologie potravin II.* 1. vyd., Praha: VŠCHT, 2002, 236 s.
 - 26) KAILASAPATHY, K., HARMSTORF, I., PHILLIPS, M.: *Survival of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium animalis ssp. lactis in stirred fruit yoghurts.* LWT-Science Direct, 2008, 33, 1317-1322 s.
 - 27) KLAZAN, V.: *Ilustrovaný mikrobiologický slovník.* 1. vyd. Praha: Galén, 2005
 - 28) KNĚZ, V., MAŠEK, J., MAXA, V., TEPLÝ, M., VEDLICH, M.: *Čisté mlékařské kultury a jejich použití v mlékárenském průmyslu.* SNTL Praha-Bratislava. 1960, 297 s.
 - 29) LEROY, F., DE VUYST, L.: *Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification and food application.* Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2007, 13 (194-199)
 - 30) LOURENS-HATTINGH, A., VILJOEN, B.: *Yoghurts as probiotic Carrar food.* International Dairy Journal, 2001, 1-17 s.
 - 31) LUKÁŠOVÁ, J.: *Hygiena technologie mléčných výrobků.* 1. vyd. Veterinární a farmaceutická Univerzita Brno, 2001, 180 s.

- 32) MATARAGAS, M., DIMITRIOU, V., SKANDAMIS, P. N., DROSINOS, E. H.: *Quantifying the spoilage and shelf-life of yoghurt with fruits*. Food Microbiology. 2011, 28, 611-616 s.
- 33) MARTH, Elmer H., STEELE, James L.: *Applied Dairy Microbiology*. 2 nd edition. New York: Marcel Dekker, 2001, 13 s.
- 34) MAXA, V., RADA, V.: *Význam bifidobakterií a bakterií mlékařských kultur*. 1.vyd., Praha: Výzkumný ústav potravinářského průmyslu, 1989, 138 s.
- 35) MCSWEENEY, P. L. H., FOX, P. F. : *Advanced Dairy Chemistry, Volume 3 – Lactose, Water, Salt and Minor Constituents*. 3rd Edition, Springer-Verlag. 825 s
- 36) MERCK Microbiology Manual 12 th Edition, 688 s.
- 37) MILLS, S., O'SULLIVAN, O., HILL, C., FITZGERALD, G., ROSS, R. P.: *The changing face of dairy starter culture research. From genomics to economics*. International Journal of Dairy Technology. 2010, 63 (149-170)
- 38) NEVORAL, J.: *Probiotika, prebiotika, symbiotika*. [online] [cit 2008-3-23]. Dostupné z www <<http://>
- 39) OGIER, J. C., CASALTA, E., FARROKH, C., SAIHI, A.: *Safety assessment of dairy mikroorganism. The Leuconostoc genus*. International Journal of Food Microbiology, 2008, 126 (286-290)
- 40) ONGOL, M. P., SAWATARI, Y., EBINA, Y., SONE, T., TANAKA, M., TOMITA, F., YOKOTA, A., ASANO, K.: *Yoghurt fermented by Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus H+ - ATPase-defective mutants exhibits enhanced viability of Bifidobacterium breve during storage*. International Journal and Food Microbiology. 2007, 116, 358-366 s.
- 41) PAVELKA, A.: *Mléčné výrobky pro Vaše zdraví*. 1. vyd. Brno: Littera, 1996, 105 s.
- 42) PLOCKOVÁ, M.: In KADLEC, P., MELZOCH, K., VOLDŘICH, M. a kolektiv: *Co byste měli vědět o výrobě potravin? Technologie potravin I*. 1. Vyd. Ostrava: KEY Publishing, 2009, 536 s.
- 43) SEDLÁČEK, I.: *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova Univerzita, 2007, 270 s.
- 44) ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře*, Praha: SNTL, 1983.
- 45) ŠILHÁNKOVÁ, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Praha: Academia. 2002, 363 s.
- 46) ŠTAFEN, M.: *Zakysané mléčné výrobky a jogurt – nezpochybnitelná součást zdravé výživy*. Potravinářská revue 2/2011, s. 12-13

- 47) ŠUSTOVÁ, K., LUŽOVÁ, T.: *Výroba jogurtů. In: Farmářská výroba sýrů a kysaných mléčných výrobků V. Sborník ze semináře s mezinárodní účastí, 15. 5.2008. MZLU v Brně, s. 12-13*
- 48) TAMINE, A. Y., (eds): *Fermented milks*. Blackwell Science Ltd and Blackwell Publishing company, 2006, 281 s.
- 49) TEPLÝ, M. a kol.: *ČMK- Výroba, kontrola, použití*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1984, 250 s.
- 50) TEPLÝ, M.: *Čisté mlékařské kultury*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1984, 296 s.
- 51) VALENTOVÁ, H.: *Obliba jogurtů a preference chutí u dětí a mládeže*. [online] [cit 2008-19-05]. Dostupný z www
<http://institut-danone.cz/data/studie/pridelene-granty/2001-04.pdf>
- 52) VILJOEN, B. C., LOURENS-HATTINGH, A., IKALAFENG, B., PETER, G.: *Temperature abuse initiating yeast growth in yoghurt*. Food Research International. 2003, 36, 193-197 s.
- 53) VLKOVÁ, E., RADA, V., KILLER, J.: *Potravinářská mikrobiologie*. 2. vyd. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha, 2009, 62 s.
- 54) Vyhláška Ministerstva zemědělství ČR č. 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje.
- 55) ZADRAŽIL, K.: *Mlékařství (přednášky)*. 1. vyd. Praha: Česká zemědělská Univerzita a ISV, 2002, 127 s.
- 56) ZIMÁK, E.: *Technologie pro 3. Ročník SPŠ mlékárenské, obor zpracování mléka*. 1. vyd., Praha: SNTL, 1982, 184 s.
- 57) ZOTTA, T., RICCIARDI, A., ROSSANO, R., PARENTE, E.: *Urease production by Streptococcus thermophilus*. Food Microbiology. Volume 25, Issue 1, February 2008, pages 113-114
- 58) ŽIŽKA, B., MARTÍNKOVÁ, Z.: *Mikrobiologie pro čtvrtý ročník SPŠ mlékárenské*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1980, 150 s.

Elektronické zdroje:

www.google.cz

www.mecomm.cz