

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinový a přírodních zdrojů**

**Katedra kvality zemědělských produktů**



**Bakalářská práce**

**Využití táhlovitých kmenů bakterií mléčného kvašení při  
výrobě fermentovaných mléčných produktů**

**Autor práce: Lucie Červenková**

**Vedoucí práce: Ing. Miroslava Potůčková**

© 2015 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Využití táhlovitých kmenů bakterií mléčného kvašení při výrobě fermentovaných mléčných produktů" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 17. 4. 2015

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Miroslavě Potůčkové za cenné rady, věcné připomínky, vstřícnost a trpělivost při konzultacích a vypracování bakalářské práce.

# Využití táhlovitých kmenů bakterií mléčného kvašení při výrobě fermentovaných mléčných produktů

## Souhrn

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout současné poznatky o využití táhlovitých kmenů bakterií mléčného kvašení při výrobě fermentovaných mléčných produktů.

Fermentované mléčné výrobky jsou produkty vyráběné kyselou koagulací kaseinu. Ke koagulaci dochází účinkem kyseliny mléčné produkované během zpracování laktosy bakteriemi mléčného kvašení ve formě čistých mlékařských kultur. Bakterie mléčného kvašení označované v češtině jako „táhlovité“ patří mezi mikroorganismy schopné syntetizovat a exkretovat do svého živného prostředí polymerní látky sacharidické povahy, exopolysacharidy. V angličtině je však tento termín používán pouze pro kultury, jež jsou schopny produkcí exopolysacharidů zvyšovat viskozitu živného média.

Bylo zjištěno, že mlékařské kultury sekretující exopolysacharidy s vhodnými molekulárními parametry (molekulovou hmotností, rigiditou a nábojem molekuly) mohou pozitivně ovlivnit viskozitu a množství odloučené syrovátky u kysaných mléčných výrobků. Naopak bakterie mléčného kvašení exopolysacharidy neprodukující, mají pozitivní vliv na sensorické vlastnosti fermentovaných mléčných produktů, neboť vytvářejí vyšší množství acetaldehydu. Praktickým řešením by tedy mohl být vývoj mlékařských kultur kombinujících bakterie mléčného kvašení exopolysacharidy produkující s kmeny bez jejich sekrece, jež by mohly být s výhodou používány zejména pro výrobu nízkotučných kysaných mléčných výrobků, které budou mít pro spotřebitele přijatelné nejen nutriční, ale i texturní, rheologické a sensorické vlastnosti.

## Klíčová slova:

exopolysacharidy, bakterie mléčného kvašení, fermentované mléčné výrobky

# **The application of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains in the fermented milk products processing**

## **Summary**

The aim of this bachelor thesis was to summarise the application possibilities of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria strains in the fermented milk products processing.

Fermented dairy products are made by acid coagulation of casein. This process is caused by lactic acid produced by lactic acid bacteria during lactose fermentation where lactic acid bacteria are used in a form of pure dairy starter. In Czech, ropiness of lactic acid bacteria means the ability of the microorganism to synthesise and excrete polymeric saccharide-type compounds, exopolysaccharides, into the growth medium. In English, only starters able to increase viscosity of the growth medium by production of exopolysaccharides, are classified as “ropy” lactic acid bacteria.

It was investigated that the exopolysaccharide-producing dairy starters with appropriate molecular parameters of the exopolysaccharides (molecular weight, molecule rigidity and charge) may improve viscosity and whey separation of fermented dairy products. On the other hand, lactic acid bacteria without exopolysaccharide production can improve sensory properties of fermented dairy products thanks to higher production of acetaldehyde. For the production of low-fat fermented milk products could therefore be valuable to develop dairy starters combining exopolysaccharide-producing and non-producing strains of lactic acid bacteria. Final products would be more acceptable and attractive for consumers not only for their nutritional but also for textural, rheological and sensory characteristics.

## **Keywords:**

exopolysaccharides, lactic acid bacteria, fermented milk products

## **Obsah:**

<b>1.</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>2.</b>	<b>CÍL</b> .....	<b>8</b>
<b>3.</b>	<b>LITERÁLNÍ REŠERŠE</b> .....	<b>9</b>
3.1.	Bakterie mléčného kvašení.....	9
3.2.	Mléčné kvašení.....	10
3.2.1	Homofermentativní mléčné kvašení.....	10
3.2.2	Heterofermentativní mléčné kvašení.....	11
3.3.	Extracelulární polysacharidy .....	11
3.3.1	Exopolysacharidy bakterií mléčného kvašení .....	12
3.3.2	Struktura exopolysacharidů bakterií mléčného kvašení.....	13
3.4.	Podmínky ovlivňující produkci exopolysacharidů.....	14
3.5.	Fermentované mléčné výrobky .....	15
3.5.1	Jakost syrového mléka .....	16
3.5.2	Standardizace mléka.....	19
3.5.3	Přídavek aditiv.....	20
3.5.4	Deaerace a deodorace mléka .....	21
3.5.5	Homogenizace mléka .....	21
3.5.6	Tepelné ošetření mléka.....	21
3.5.7	Fermentace a chlazení .....	22
3.5.8	Mlékařské kultury pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků.....	24
3.5.9	Technologie výroby mlékářských kultur .....	26
3.6.	Využití exopolysacharidů bakterií mléčného kvašení při výrobě fermentovaných mléčných produktů.....	30
3.6.1	Využití exopolysacharidů bakterií mléčného kvašení při výrobě jogurtů.....	31
3.6.2	Využití exopolysacharidů bakterií mléčného kvašení při výrobě Lassi.....	42
<b>4.</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>43</b>
<b>5.</b>	<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>44</b>
<b>6.</b>	<b>Seznam použitých zkratk</b> .....	<b>51</b>

# 1. ÚVOD

Bakterie mléčného kvašení byly známy již v minulosti pro svou využitelnost v potravinářství, farmacii a chemickém průmyslu. Tyto mikroorganismy zahrnují mimo jiné rody, které jsou využívány pro výrobu fermentovaných potravin. S účelem dosažení požadovaných vlastností se při výrobě některých fermentovaných mléčných výrobků používají stabilizační aditivní látky. Přídavek stabilizátorů, většinou na bázi hydrofilních koloidů, zvyšuje viskozitu a zabraňuje oddělování syrovátky v konečném produktu. Odlučování syrovátky je přirozený jev, který je však spotřebiteli vnímán negativně. Je problémem zejména u výrobků nízkotučných a s nízkým obsahem tukoprosté sušiny. U plnotučných fermentovaných mléčných výrobků s vyšším obsahem tukoprosté sušiny vzniká pevná, gelovitá struktura s vysokou viskozitou přirozeně a stabilizátory není bezpodmínečně nutno do receptury přidávat.

Vzhledem k tomu, že v současné době jsou lidé lépe obeznámeni s problémy, které přináší konzumace vysokého množství tuků, jako například zvýšené riziko obezity, aterosklerózy, vysokého krevního tlaku a dalších kardiovaskulárních chorob, vznikl během posledních let nový trend konzumace přírodních nízkotučných potravin bez aditiv. Z tohoto důvodu se i výrobci snaží vytvářet produkty odtučněné či se sníženým obsahem tuku a vyjít tak vstříc poptávce. Nízkotučné výrobky se však vyznačují horšími sensorickými a texturními vlastnostmi, jež byly popsány výše.

Bakterie mléčného kvašení v posledních desetiletích vyvolaly zájem pro svou schopnost produkovat exopolysacharidy, jež mohou působit jako „*in vivo*“ produkované stabilizátory. Exopolysacharidy produkované bakteriemi mléčného kvašení se statusem GRAS tak mohou být využity jako bezpečná, přírodní a zdravá alternativa aditiv k vylepšení textury a stability konečných produktů. Využití těchto látek by mohlo mít zásadní vliv i na vývoj nových výrobků. V porovnání s běžně používanými zahušťovadly mají exopolysacharidy často již při nízkých koncentracích lepší schopnost zvyšovat viskozitu a vazbu vody fermentovaných mléčných výrobků a sýrů a tím ovlivňovat jejich rheologii a texturu. Kmeny bakterií mléčného kvašení produkující tyto látky by mohly být s výhodou využívány zejména při výrobě nízkotučných jogurtů, acidofilních mlék a dalších odtučněných variant fermentovaných mléčných výrobků, sýrů či dezertů.

## **2. CÍL**

Cílem bakalářské práce je zpracování literární rešerše shrnující současné poznatky o bakteriích mléčného kvašení schopných produkce exopolysacharidů a zkušenosti s jejich využitím při výrobě fermentovaných mléčných produktů. Hypotézou je, že využití kmenů bakterií mléčného kvašení produkujících exopolysacharidy zlepšuje sensorické, texturní, rheologické a nutriční parametry fermentovaných mléčných výrobků, zejména odtučněných.



### 3. LITERÁLNÍ REŠERŠE

#### 3.1. Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou pravděpodobně největší skupinou bakterií spojenou s člověkem. Přirozeně se vyskytují na sliznicích, zejména v gastrointestinálním traktu (Wood and Warner, 2003). Také byly známy již v minulosti pro svou využitelnost v potravinářství, farmacii a chemickém průmyslu (Cernig and Marshall, 1999; De Vuyst and Degeest, 1999).

Skupina BMK zahrnuje jak tyčinkovité tak kokovité bakterie se schopností fermentovat cukry na kyselinu mléčnou. Jsou to především grampozitivní, acidotolerantní a anaerobní nebo mikroaerofilní buňky, které jsou kataláza negativní a nevytváří spóry (Klaenhammer et al., 2005). BMK jsou mezofilní organismy, které ale mohou růst i při teplotách nižších než 5 °C a vyšších než 45 °C. Stejně tak většina druhů roste při pH 4,0 – 4,5, ale některé až při pH 3,2 či 9,6 (Caplice and Fitzgerald, 1999).

Mezi běžně se vyskytujícími rody BMK patří: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* a *Enterococcus* sp. Další, méně známé rody, jsou např.: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* nebo *Weissella* sp. (Stiles and Holzapfel, 1997). Definice BMK je spíše biologická nežli taxonomická. Většina BMK patří do rodu *Lactobacillaceae*, ale několik zástupců spadá mezi *Actinobacteriaceae* (např. *Propionibacterium* nebo *Bifidobacterium*). Metabolicky se do skupiny BMK zařazují jak homofermentativní tak heterofermentativní druhy. Homofermentativní BMK (např. *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* a některé laktobacily) produkují primárně kyselinu mléčnou, zatímco heterofermentativní BMK (např. *Leuconostoc*, *Weissella* a opět některé laktobacily) kromě kyseliny mléčné produkují i další vedlejší produkty jako například kyselinu octovou, ethanol, vodík nebo oxid uhličitý (Wood and Holzapfel, 1995; Caplice and Fitzgerald, 1999).

BMK zahrnují jak rody lidskému zdraví neškodné či přímo prospěšné (probiotické), které jsou využívány pro výrobu fermentovaných mléčných, masných, cereálních a zeleninových výrobků a jsou také rozhodující pro produkci vína, kávy, kakaa, kvasu nebo siláže, tak rody pro člověka patogenní (např. *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*) (Wood and Holzapfel, 1995; Wood and Warner, 2003). Některé druhy BMK jsou využívány jako probiotika, jelikož mají schopnost opětovně kolonizovat lidský trávicí trakt, podporovat růst přirozené střevní mikroflory

a inhibovat pomnožování nežádoucích mikroorganismů. Byl prokázán i jejich pozitivní efekt při léčbě průjmů, syndromu dráždivého tračníku nebo alergií (Rodríguez et al., 2009). Díky tomu, že jako zdroj uhlíku využívají cukry, tedy i mléčný cukr laktosu, mohou být s výhodou využity u lidí trpících laktosovou intolerancí (Majamaa et al., 1995).

Některé druhy BMK jsou také schopny produkovat bakteriociny. Bakteriociny jsou proteinové antimikrobiální sloučeniny, které, mimo jiné, inhibují růst grampozitivních i gramnegativních patogenních a hnilobných bakterií. Některé z těchto bakteriocinů produkovaných BMK (např. macedocin, macedovicin nebo nisin Z) mohou být využity jako potravinářská aditiva (Benech et al., 2002; Cotter et al., 2005; Georgalaki et al., 2013).

## **3.2. Mléčné kvašení**

Přeměna sacharidů na kyselinu mléčnou pomocí BMK je jednou z nejdůležitějších fermentačních metod v potravinářské mikrobiologii. Mléčné kvašení se uplatňuje při konzervaci zelí, okurek a zelené píce (tzv. silážování), neboť zvyšující se obsah kyseliny mléčné zabraňuje rozvoji hnilobných bakterií. Na principu použití mléčného kvašení je samozřejmě založena také výroba fermentovaných mléčných produktů a sýrařství (Veselá a Drdák, 1999; Šilhánková, 2002).

Dle konečného produktu, který je při mléčném kvašení získáván, rozlišujeme obvykle dva typy fermentace:

- Homofermentativní mléčné kvašení – hlavním produktem je kyselina mléčná.
- Heterofermentativní mléčné kvašení – kromě kyseliny mléčné jsou vytvářeny i další, vedlejší produkty (např. kyselina octová, ethanol, vodík či oxid uhličitý) (Šilhánková, 2002; Vodrážka, 2002).

### **3.2.1 Homofermentativní mléčné kvašení**

Konečným hlavním produktem homofermentativního mléčného kvašení je kyselina mléčná. Jako substrát se zde uplatňují především hexosy, jejichž fermentace probíhá po glykolytické dráze. Sled reakcí glykolýzy je až do vzniku pyruvátu stejný jako při ethanolovém kvašení. Konečnou fází tohoto procesu však představuje přeměna pyruvátu na kyselinu mléčnou. Reakce je katalyzována NAD-laktátdehydrogenasou (Rosypal, 1981).

Homofermentativním kvašením se však v praxi nikdy nedosáhne 100% výtěžku kyseliny mléčné, protože vzniká různé množství vedlejších produktů jako ethanol, kyselina octová, kyselina mravenčí, oxid uhličitý a další. Fermentace s výtěžkem vyšším než 80 % teoretické hodnoty množství kyseliny mléčné jsou považovány za homofermentativní. Homofermentativní BMK jsou hojně využívány v krmivářství při výrobě siláže a v potravinářství při výrobě fermentovaných mléčných výrobků, sýrů, tvarohů a kvašené zeleniny. Mezi homofermentativní druhy BMK patří rody: *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Teragenococcus* a *Vagococcus* (Masák a kol., 1992; Veselá a Drdák, 1999).

### **3.2.2 Heterofermentativní mléčné kvašení**

Heterofermentativní mléčné kvašení je charakteristické tím, že výtěžek kyseliny mléčné je menší než 80 % a v jejím průběhu vznikají i další konečné produkty. Nejčastěji to bývá kyselina octová nebo mravenčí, ethanol, vodík či oxid uhličitý (Kaprálek, 1986). U většiny původců tohoto typu fermentace chybějí základní enzymy glykolytické dráhy (aldolasa a triosofosfátisomerasa). Štěpení hexos, např. glukosy, u nich proto probíhá po tzv. fosfoketolasové dráze (Rosypal, 1981).

Heterofermentativní BMK jsou též hojně využívány v krmivářství a potravinářství. Některé heterofermentativní BMK se vyskytují jako nežádoucí kontaminace ve vinařství a pivovarnictví, kde způsobují chuťové vady, a v droždářství, kde vedou ke ztrátám výtěžnosti. Mezi heterofermentativní druhy BMK patří rody: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus* a *Weissella* (Veselá a Drdák, 1999)

### **3.3. Extracelulární polysacharidy**

Velký počet druhů mikroorganismů má schopnost extracelulárně produkovat polymerní sloučeniny jako jsou polysacharidy, bílkoviny, polyamidy či DNA. Tyto látky jsou souhrnně označovány jako extracelulární polymery (ECP). Nejrozšířenější skupinou jsou u prokaryotických organismů extracelulární polysacharidy, neboli exopolysacharidy (EPS). Obecně buňky tvoří polysacharidy zásobní nebo strukturní. EPS jsou produkovány různými druhy bakterií a řas, v menší míře je nalezneme také u kvasinek a plísní. Buňky vylučují EPS ve formě kapsulí, které jsou spojeny s povrchem buňky (netáhlivé bakterie) nebo formou slizu, který je vylučován do extracelulárního prostoru (táhlivé bakterie).

EPS hrají důležitou roli při růstu i ve strategiích buňky pro přežití v různých podmínkách. Mikrobiální EPS mají v současnosti též průmyslové či potravinářské využití (De Vuyst and Degeest, 1999; Sutherland et al., 2001; Fusconi et al., 2006).

### 3.3.1 Exopolysacharidy bakterií mléčného kvašení

Pro svoji schopnost produkovat EPS vyvolaly v posledních letech zájem především BMK (Cernig and Marshal, 1999; De Vuyst and Degeest, 1999). Jejich EPS mají pro své průmyslově užitečné fyzikálně-chemické vlastnosti značný potenciál, který je navíc umocněn jejich variabilním složením a funkcí a tedy celkově širokou škálou sloučenin. BMK spojené s potravinami mají garantovaný status „Generally recognized as safe“ (GRAS), tedy „Všeobecně považovány za bezpečné“ a jsou považovány za vhodné kandidáty pro produkci funkčních EPS (Laws et al., 2001).

EPS produkované mikroorganismy se statusem GRAS mohou být zdrojem přírodních alternativ ke komerčně využívaným aditivům rostlinného a živočišného původu, která navíc pro zlepšení kvality konečného produktu bývají chemicky modifikována a proto je jejich používání ve většině zemí Evropské unie omežováno (Roller and Dea, 1992; Gibson and Roberfroid, 1995). Díky zvyšující se popularitě přírodních potravin bez aditiv by EPS produkované BMK mohly být využity jako bezpečná, přírodní a zdravá alternativa k vylepšení textury a stability konečných produktů, což by mohlo mít zásadní vliv i na vývoj nových výrobků (Schelhaass and Morris, 1985; Looijesteijn and Hugenholtz, 1999).

Kmeny BMK produkující EPS jsou v mlékárenství využívány zejména při výrobě nízkotučných jogurtů, acidofilních mlék a dalších fermentovaných výrobků, sýrů a mléčných dezertů. Využitelnost různých EPS závisí na tom, ze kterých monosacharidů jsou složeny, na typech vazeb, stupni rozvětvení a molární hmotnosti (Duboc and Mollet, 2001; Iliev et al., 2006).

EPS produkované BMK mohou mít též prospěšné fyziologické účinky na lidské zdraví (u některých byla prokázána např. antikarcinogenní nebo imunomodulační aktivita či prebiotická funkce) (Doleyres et al., 2005).

BMK, kromě EPS, dovede produkovat i různé exooligosacharidy. Řada těchto oligosacharidů má významnou prebiotickou hodnotu a působí jako modulatory složení střevní mikroflory. Oligosacharidy vyprodukované např. *Leuconostoc mesenteroides* jsou

ochotně katabolizovány bifidobakteriemi a laktobacily, díky čemuž tyto bakterie lépe rostou. Naopak *Salmonella* sp. a *Escherichia coli* nejsou schopny tyto oligosacharidy využít a jejich růst je tedy inhibován. Z toho vyplývá, že bifidobakterie a laktobacily (lidskému zdraví prospěšné) se stávají dominantními. Oligosacharidy mohou být dále využívány jako sladidla, humektanty, imunostimulátory atd. ( Loo et al., 1999; Remaud-Simoen et al., 2000; Patel et al., 2012).

### 3.3.2 Struktura exopolysacharidů bakterií mléčného kvašení

Bakteriální EPS mají obvykle jednoduchou strukturu. Mohou to být buď homopolysacharidy nebo heteropolysacharidy (Sutherland, 2001).

#### 3.3.2.1 Homopolysacharidy

Homopolysacharidy jsou polymery tvořeny stejnými monosacharidovými jednotkami. Obvykle se jedná o *D*-glukosu či *D*-fruktosu (Sutherland, 2001).

Homopolysacharidy mléčných bakterií je možno rozdělit do 4 podskupin:

- 1)  $\alpha$ -*D*-glukany (např. dextran, alternan) - složeny hlavně z glukosových zbytků spojených vazbami  $\alpha(1-6)$  nebo  $\alpha(1-3)$  a s výskytem různého stupně větvení řetězců.
- 2)  $\beta$ -*D*-glukany (např. glucan-DM5) -  $\beta(1-3)$  vazba spojená s vazbou  $\beta(1-2)$  a větvením.
- 3) Fruktany (např. levan, inulin) - skládají se převážně z fruktosových molekul spojených  $\beta(2-6)$  vazbami.
- 4) Ostatní (např. polygalaktany) - složeny ze strukturálně shodných jednotek monosacharidů s různými vazbami (De Vuyst and Degeest, 1999).

#### 3.3.2.2 Heteropolysacharidy

Druhým typem EPS jsou heteropolysacharidy. Heteropolysacharidy jsou složeny z pravidelně se opakujících jednotek oligosacharidů, konkrétně disacharidů až oktasacharidů. Tyto oligosacharidy jsou dále složeny ze dvou nebo více typů monosacharidů. Mezi nejobvyklejší stavební jednotky patří např. glukosa, galaktosa či rhamnosa. Ty mohou dále obsahovat další acylové skupiny. K heteropolysacharidům

se řadí např. kefiran, xanthan nebo gellan (Micheli et al., 1999; Laws et al., 2001; Sutherland, 2001).

### **3.4. Podmínky ovlivňující produkci exopolysacharidů**

Množství EPS produkovaných BMK závisí na kmeni bakterie, stavu kultury, složení kultivačního média a vnějších podmínkách jako například teplotě, pH, obsahu kyslíku a době inkubace (Looijesteijn and Hugenholtz, 1999; Degeest et al., 2001; Darilmaz, D. O., 2013; Polak-Berecka et al., 2014).

Složení média, respektive dostatečný zdroj dusíku a uhlíku, má za účinek zvýšení produkce EPS. Na produkci EPS mají vliv i genetické predispozice organismu. Například *Streptococcus thermophilus* ST 111 v mléčném médiu obsahujícím galaktosu a rhamnosu produkoval vysokomolekulární EPS, zatímco *Streptococcus thermophilus* LY 03 ve stejném médiu produkoval jak vysoko tak nízkomolekulární EPS a *Streptococcus thermophilus* CH 101 produkoval pouze nízkomolekulární EPS (Marshall et al., 1995; De Vuyst et al., 1998; De Vuyst and Degeest, 1999).

### 3.5. Fermentované mléčné výrobky

Mléčné výrobky připravené za pomoci mléčného kvašení nebo kombinací mléčného a ethanolového kvašení se nazývají kysané nebo také fermentované mléčné výrobky (FMV). První zmínky o těchto produktech pocházejí z Blízkého východu. Odtud se pak postupně rozšířily do východní a střední Evropy. Jednotlivé druhy FMV byly vytvořeny náhodně zkysnutím mléka při vhodné, nahodile dosažené kombinaci v něm přítomných kmenů bakterií a kvasinek a teploty okolního prostředí (Bylund, 1995).

Principem výroby FMV je kyselá koagulace kaseinu. Kyselá koagulace kaseinu znamená jeho vysrážení v isoelektrickém bodě (pH 4,6) účinkem kyseliny mléčné, která vzniká fermentací laktosy BMK a snižuje přirozené pH mléka (Bylund, 1995).

Mléko je naočkováno startovací kulturou, která část laktosy obsažené v mléce převede primárně na kyselinu mléčnou a dále pak na kyselinu octovou, oxid uhličitý, acetaldehyd, diacetyl a další vedlejší produkty. Ty dávají výslednému výrobku charakteristickou svěží chuť a aroma. Některé mlékařské kultury (např. kefirová) mohou produkovat i určité množství ethanolu. V tomto případě dochází k vysrážení kaseinu kombinací mléčného a ethanolového kvašení (Bylund, 1995).

Aby mohl výsledný produkt nést označení „fermentovaný mléčný výrobek“, musí dle platné legislativy EU a ČR i na konci doby trvanlivosti obsahovat poměrně vysoké množství BMK, řádově  $10^6 - 10^7$  KTJ v 1 g (Zákon č. 110/1997 Sb.). Kvůli tomu jsou kladeny vysoké požadavky jak na technologický proces tak i na dodržování hygienických podmínek a kontrolu jakosti surovin (Bylund, 1995; Walstra et al., 2006). Základní druhy FMV jsou uvedeny v tabulce 1.

**Tab 1: Základní druhy FMV (Vyhláška č. 336/2013)**

<b>Druh výrobku</b>	<b>Použitá kultura</b>	<b>Počet MO* [KTJ.g<sup>-1</sup>]</b>
Acidofilní mléko	<i>Lb. Acidophilus</i> a další mezofilní, příp. termofilní kultury BMK	10 <sup>6</sup> <i>Lb. acidophilus</i>
Jogurt	jogurtová kultura	10 <sup>7</sup> BMK
Kysané mléko, vč. smetanového zákysu, podmáslí a kysané smetany	smetanová kultura	10 <sup>6</sup> BMK
Kefír	kefírová kultura	10 <sup>6</sup> BMK a 10 <sup>4</sup> kvasinek
Kefírové mléko	kefírová kultura a ABT kultura	10 <sup>6</sup> BMK a 10 <sup>2</sup> kvasinek
Kysaný mléčný probiotický výrobek	jogurtová probiotická kultura a ABT kultura	10 <sup>7</sup> BMK a 10 <sup>6</sup> bifidobakterií

\* na konci doby trvanlivost

Po celém světě je produkováno mnoho různých tradičních i průmyslově vyráběných FMV. Kurman a kol.(1992) rozlišují až 400 různých produktů, přičemž lze říci, že téměř každá země má svůj vlastní typický výrobek (Prasad et al., 1989; Kurman et al., 1992).

### 3.5.1 Jakost syrového mléka

Mléko určené pro výrobu FMV musí pro růst BMK tvořit vhodné podmínky a tedy dosahovat vysoké mikrobiální kvality. Musí splňovat požadavky na jakost syrového mléka podle platné legislativy (Zákon č. 110/1997 Sb.). Nejvyšší pozornost je věnována přítomnosti reziduí inhibičních látek (RIL) v syrovém mléce, které na BMK působí bakteriostaticky nebo baktericidně a tím zcela znemožňují výrobu FMV. Nežádoucí je také příměs mlék s vysokým obsahem somatických buněk, jež obsahují aktivní lipasy či mlék s vysokými hladinami přirozených antimikrobiálních látek (Bylund, 1995; Walstra et al., 2006).

Na kvalitu mléka negativně působí také vysoký počet nežádoucích mikroorganismů, zejména psychrotrofních. Psychrotrofní mikroorganismy produkují



tepelně stabilní enzymy jako lipasy nebo proteasy, které zůstávají částečně aktivní i po tepelném ošetření suroviny a následně způsobují vady u finálních výrobků. Negativní vliv na fermentabilitu mléka má také enzym diacetylreduktasa, který snižuje hladinu diacetylu ve FMV a způsobuje tak jejich senzoričké vady (Bylund, 1995; Walstra et al., 2006).

Z hlediska chemického složení je u mléka pro výrobu FMV důležitý obsah tukoprosté sušiny. Ta by měla být vyšší než 8,9 % hm. Z dalších složek mléka je významný obsah laktosy, základního substrátu pro BMK. Obsah vybraných složek mlék běžně průmyslově zpracovávaných na FMV je uveden v tabulkách 2 - 5 (Bylund, 1995; Walstra et al., 2006).

**Tab 2: Obsah základních složek v České Republice nejvíce průmyslově zpracovávaných druhů mléka (Nutrient Content of Milk Varieties, 2014)**

Složka	Jednotka	Kravné mléko	Kozí mléko	Ovčí mléko
voda	g.100 g <sup>-1</sup>	83,20	87,03	80,70
laktosa	g.100 g <sup>-1</sup>	4,52	4,45	5,36
tuk	g.100 g <sup>-1</sup>	3,25	4,14	7,00
bílkoviny	g.100 g <sup>-1</sup>	3,22	3,56	5,98
energie	kcal	60,00	69,00	108,00

**Tab 3: Obsah minerálů v České Republice nejvíce průmyslově zpracovávaných druhů mléka (Nutrient Content of Milk Varieties, 2014)**

Složka	Jednotka	Kravné mléko	Kozí mléko	Ovčí mléko
vápník	mg.100 g <sup>-1</sup>	113,00	134,00	193,00
měď	mg.100 g <sup>-1</sup>	0,02	0,05	0,05
železo	mg.100 g <sup>-1</sup>	0,03	0,05	0,10
hořčík	mg.100 g <sup>-1</sup>	10,00	14,00	18,00
mangan	mg.100 g <sup>-1</sup>	0,01	0,02	0,02
fosfor	mg.100 g <sup>-1</sup>	91,00	111,00	158,00
draslík	mg.100 g <sup>-1</sup>	143,00	204,00	137,00
selén	μg.100 g <sup>-1</sup>	3,70	1,40	1,70
sodík	mg.100 g <sup>-1</sup>	40,00	50,00	44,00
zinek	mg.100 g <sup>-1</sup>	0,40	0,30	0,54

**Tab 4: Obsah vitaminů v České Republice nejvíce průmyslově zpracovávaných druhů mléka (Nutrient Content of Milk Varieties, 2014)**

Složka	Jednotka	Kravné mléko	Kozí mléko	Ovčí mléko
vitamín A	μg.100 g <sup>-1</sup>	28,00	57,00	44,00
vitamín B1	mg.100 g <sup>-1</sup>	0,05	0,06	0,07
vitamín B2	mg.100 g <sup>-1</sup>	0,18	0,14	0,36
vitamín B3	mg.100 g <sup>-1</sup>	0,11	0,28	0,42
vitamín B5	mg.100 g <sup>-1</sup>	0,36	0,31	0,41
vitamín B6	mg.100 g <sup>-1</sup>	0,04	0,05	0,06
vitamín B12	μg.100 g <sup>-1</sup>	0,44	0,07	0,71
kyselina listová	μg.100 g <sup>-1</sup>	5,00	1,00	7,00
vitamín E	mg.100 g <sup>-1</sup>	0,06	0,07	0,08
vitamín D	μg.100 g <sup>-1</sup>	0,90	0,30	1,50
vitamín K	μg.100 g <sup>-1</sup>	0,20	0,30	0,25

**Tab 5: Obsah cholesterolu a mastných kyselin běžně průmyslově zpracovávaných druhů mlék (Nutrient Content of Milk Varieties, 2014)**

<b>Složka</b>	<b>Jednotka</b>	<b>Kravné mléko</b>	<b>Kozí mléko</b>	<b>Ovčí mléko</b>
cholesterol	mg.100 g <sup>-1</sup>	10,00	11,00	27,00
nasyčené	mg.100 g <sup>-1</sup>	1,87	2,68	4,60
mono-nenasycené	mg.100 g <sup>-1</sup>	0,81	1,11	1,73
poly-nenasycené	mg.100 g <sup>-1</sup>	0,20	0,15	0,30

### **3.5.2 Standardizace mléka**

Syrové mléko je před základním ošetřením přefiltrováno, aby byly odstraněny případné mechanické nečistoty, které by mohly způsobit poškození zařízení. Ke zvýšení mikrobiální čistoty je možno využít baktofugaci nebo mikrofiltraci.

Dále je upravován obsah sušiny, tukoprosté sušiny, tuku a dalších složek dle druhu konečného výrobku. Metody standardizace mléka jsou uvedeny v tabulce 6 (Bylund, 1995; Walstra et al., 2006).

**Tab 6: Metody standardizace mléka** (Bylund, 1995)

Obsah mléčné složky	Mléčná složka	Metoda
zvýšení	celková sušina	přídavek sušeného mléka
		přídavek zahuštěného mléka
		zahuštění mléka ve vakuové odparce nebo s použitím reverzní osmózy
	tukoprostá sušina	přídavek odtučněného sušeného mléka, zahuštěné syrovátky, sušené syrovátky
	bílkoviny	přídavek kaseinátů, koprecipitátů, syrovátkových bílkovin, koncentrátů syrovátkových bílkovin
		zvýšení koncentrace ultrafiltrací
		selekce mléka s vyšším obsahem bílkovin
tuk	přídavek smetany	
snížení	laktosa	ultrafiltrace
	tuk	odstředění na odstředivce
		zředění plnotučného mléka přídavkem mléka odtučněného

### 3.5.3 Přídavek aditiv

Za účelem dosažení požadovaných rheologických vlastností výrobku se při výrobě některých FMV do mléka přidávají různé aditivní látky.

Přídavek stabilizátorů, většinou na bázi hydrofilních koloidů, zvyšuje viskozitu a zabraňuje oddělování syrovátky v konečném produktu. Odlučování syrovátky je přirozený jev, který je však spotřebiteli vnímán negativně. Je problémem zejména u výrobků nízkotučných a s nízkým obsahem tukoprosté sušiny. U plnotučných FMV s vyšším obsahem tukoprosté sušiny vzniká pevná, gelovitá struktura s vysokou viskozitou přirozeně a stabilizátory není bezpodmínečně nutné do receptury přidávat. Mezi nejběžněji

využívané stabilizátory při výrobě FMV patří želatina, pektin, agar nebo škrob (Bylund, 1995).

#### **3.5.4 Deaerace a deodorace mléka**

Obsah vzduchu v mléce určeném pro výrobu FMV by měl být co nejmenší. Nicméně minimální příměs vzduchu je nevyhnutelná. Proces deaerace je většinou spojen též s deodorací, tedy odstraněním nežádoucích pachů pocházejících z prvovýroby.

Pokud je obsah sušiny zvyšován přidávkem sušeného mléka, je mléko deaerováno v následujícím kroku principem rozstříknutí mléka do vakua. Při zvyšování obsahu sušiny pomocí odpařování, je deaerace součástí tohoto technologického kroku.

Výhodami deaerace mléka jsou zvýšení účinnosti procesů odstředění, homogenizace a tepelného ošetření. Také dochází ke zlepšení stability a viskozity produktu (Bylund, 1995).

#### **3.5.5 Homogenizace mléka**

Hlavním důvodem homogenizace mléka určeného pro výrobu FMV je dosažení rovnoměrné distribuce tuku ve výrobku. Homogenizace také zlepšuje stabilitu a konzistenci výrobků, dokonce i těch nízkotučných. Dle obecného doporučení pro dosažení optimálních fyzikálních vlastností produktu by mělo být mléko homogenizováno při tlaku 20 – 25 MPa a teplotě 65 – 75 °C. Nehomogenizované FMV se pak vyznačují vrstvičkou vyvstálé smetany na povrchu výrobku (Bylund, 1995).

#### **3.5.6 Tepelné ošetření mléka**

Cílem tepelného ošetření mléka při výrobě FMV je zajištění zdravotní nezávadnosti suroviny, vytvoření vhodného prostředí pro růst BMK, zajištění adekvátní viskozity a tuhosti koagulátu a snížení rizika vylučování syrovátky u finálních výrobků (Bylund, 1995).

Během tepelného ošetření mléka dochází ke snížení celkového počtu mikroorganismů, usmrcení patogenních mikroorganismů, inaktivaci bakteriofágů a přirozených antimikrobiálních látek či enzymů. Dle zvoleného teplotního režimu dochází též během záhřevu k různému stupni denaturace syrovátkových bílkovin, čímž jsou upraveny technologické vlastnosti suroviny (Bylund, 1995).

Optimálním tepelným ošetřením mléka pro výrobu FMV je pasterační záhřev na 90 až 95 °C trvající 5 – 20 min. Při této kombinaci teploty a času je denaturováno 70-80 % syrovátkových bílkovin. Zvýšený stupeň denaturace syrovátkových bílkovin vede ke zvýšení jejich hydrofilních vlastností. Denaturovaný  $\beta$ -laktoglobulin se napojuje na  $\kappa$ -kasein, díky čemuž vzniká během fermentace pevnější a jemnější sraženina, která zadržuje více syrovátky (Bylund, 1995).

### **3.5.7 Fermentace a chlazení**

Po tepelném ošetření následuje zchlazení mléka na optimální teplotu fermentace. Teplota inokulace (zaočkování), množství a druh použité kultury se liší dle typu výrobku. Například při výrobě jogurtů je nejčastěji použito 2,5 - 3 % hm. výrobní startérové kultury, fermentace probíhá za teploty 40 – 45 °C a požadovaného pH 4,2 – 4,5 je dosaženo za 2,5 – 3 h. Oproti tomu při výrobě kefíru je použito 2 - 3 % hm. výrobní startérové kultury, fermentace probíhá za teploty 23 °C a požadovaného pH 4,3 – 4,4 je dosaženo za 12 h (Bylund, 1995; Walstra et al., 2006).

Principem fermentace je koagulace kaseinu v isoelektrickém bodě (pH 4,6). Díky činnosti mlékařských kultur dochází při produkci kyseliny mléčné k poklesu pH a následně tvorbě 3D kaseinové sítě (gelu), jehož výplň tvoří mléčné sérum (syrovátka) a mléčný tuk (tukové kuličky).

V závislosti na technologickém postupu rozlišujeme dva základní typy fermentace. Kysání ve spotřebitelském balení a kysání ve fermentačním tanku (Bylund, 1995; Walstra et al., 2006).

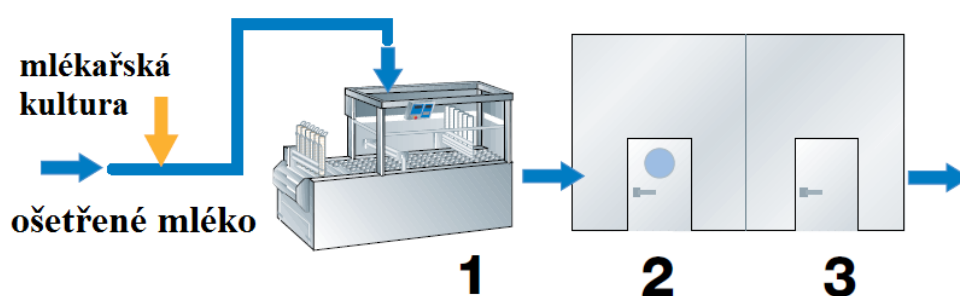
#### **3.5.7.1 Fermentace ve spotřebitelském balení**

Při postupu, kdy kysání probíhá přímo ve spotřebitelském balení, je mléčná směs, zaočkováná startovací kulturou, plněna přímo do jednotlivých spotřebitelských obalů. Do mléčné směsi mohou být před fermentací přidána aromata, ochucující složky a další přídatné látky. Naplněné obaly jsou následně přemístěny do inkubačního zařízení (zracího tunelu, skříně nebo místnosti), kde proběhne zakysání.

Výrobky jsou po dosažení finální hodnoty pH  $\leq$  4,5 zchlazeny, aby byl fermentační proces ukončen. Chladicí režim je dvoustupňový, za 30 min musí být dosaženo teploty

maximálně 35 °C, během dalších 30 – 40 min pak teploty 18 – 20 °C. Produkty v malém spotřebitelském balení (0,175 – 0,200 kg) by měly být zchlazeny celkem za 65 – 70 min, výrobky ve větším balení ( $\geq 0,5$  kg) za 80 – 90 min (Bylund, 1995; Walstra et al., 2006).

FMV vyrobené kysáním v obale se vyznačují pevnou a lomivou konzistencí. Jejich nevýhodou je sklon k vylučování syrovátky na povrch produktu. Anglickým termínem se označují jako „set – type“ výrobky. Technologie „set – type“ fermentace je zobrazena na obrázku 1 (Bylund, 1995).



- 1 balička
- 2 inkubační místnost
- 3 chladicí místnost

Obr 1: „Set – type“ fermentace (Bylund, 1995)

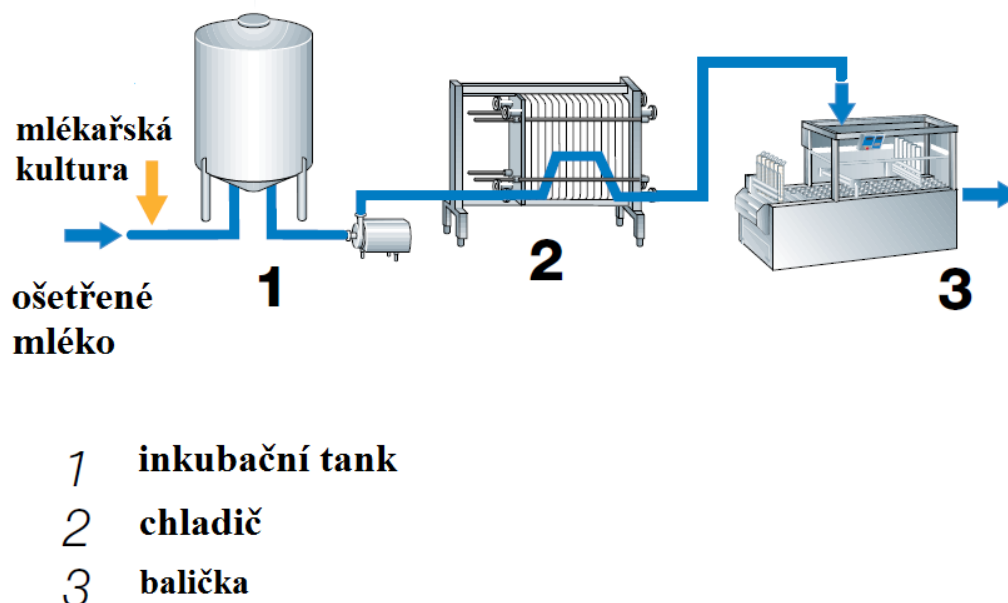
### 3.5.7.2 Fermentace ve fermentačním tanku

Je-li mléčná směs kysána ve fermentačním tanku, dochází k její inokulaci startovací kulturou přímo ve výrobníku. Po dosažení finálního pH ( $\leq 4,5$ ) koagulátu je fermentační proces ukončen zchlazením. To opět probíhá ve fermentačním tanku do teploty 18 – 20 °C. Současně je během něj pomocí šetrného míchání rozrušena struktura gelu.

Vychlazený koagulát je dále čerpán do vyrovnávacího tanku, kde setrvává před dalšími operacemi, jako je míchání s ochucující složkou nebo samotné plnění do spotřebitelských obalů (Bylund, 1995; Walstra et al., 2006).

FMV vyrobené kysáním ve fermentačním tanku se díky rozrušení původní gelovité struktury vyznačují jemnou, lesklou a polotekutou konzistencí. Anglickým termínem

se označují jako „stirred – type“ výrobky. Technologie „stirred – type“ fermentace je zobrazena na obrázku 2 (Bylund,1995).



Obr 2: „Stirred – type“ fermentace (Bylund, 1995)

### 3.5.8 Mlékařské kultury pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků

Při výrobě FMV jsou používány speciální, většinou komerčně vyráběné, směsi mikroorganismů, tzv. mlékařské kultury (MK). MK pro produkci FMV jsou specifické směsi BMK, případně BMK a kvasinek. Tyto živé mikroorganismy v mono- či směsných kulturách jsou selektovány podle specifických vlastností. Základním požadavkem je, aby použité BMK mezi sebou nevykazovaly antagonismus, ale jen metabiosu nebo symbiosu (Bylund, 1995; Walstra et al., 2006).

MK lze rozdělit dle několika hledisek. Při členění zákysů dle optimální kultivační teploty rozlišujeme startéry mezofilní (optimální teplota růstu 20 – 30 °C) a termofilní (optimální teplota růstu 40 – 50 °C). Dále je možno MK rozdělit dle kmenové variability mikroorganismů v kultuře na monokultury (obsahují pouze jeden definovaný kmen jednoho druhu) a složené kultury (obsahují více definovaných druhů a kmenů) (Bylund, 1995; Walstra et al., 2006).

Hlavními funkcemi MK jsou prokysání suroviny, tvorba specifické chuti a vůně výrobku a případně probiotický účinek. Díky různým vlastnostem jednotlivých MK může vznikat široké spektrum FMV. Základní druhy mlékařských kultur pro výrobu



fermentovaných mléčných výrobků jsou uvedeny v tabulce 7 (Bylund, 1995; Walstra et al., 2006).

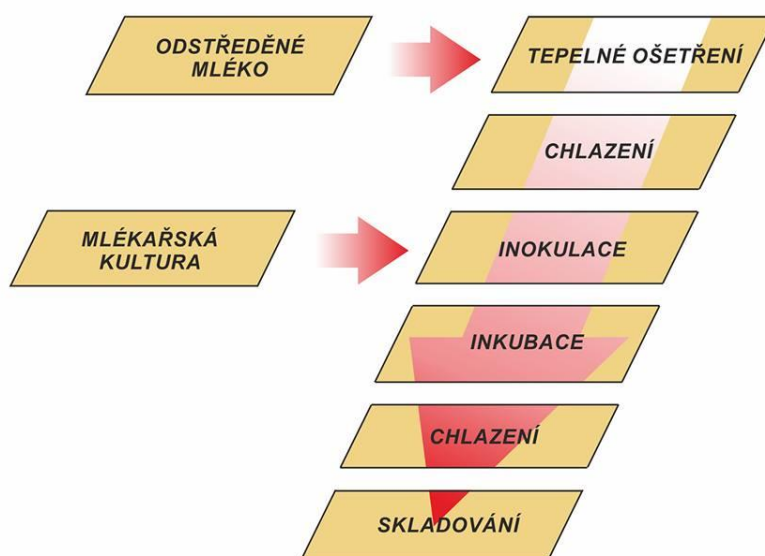
**Tab 7: Mlékařské kultury (Panesar, 2011)**

Kultura (případně název výrobku)	Obsažené mikroorganismy
Jogurtová kultura	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Streptococcus thermophilus</i></li> <li>• <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i></li> </ul>
Acidofilní kultura	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactobacillus acidophilus</i></li> <li>• <i>Streptococcus thermophilus</i></li> <li>• <i>Bifidobacterium</i> sp.</li> </ul>
Kefirová kultura	BMK: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i></li> <li>• <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i></li> <li>• <i>Streptococcus lactis</i></li> <li>• <i>Leuconostoc</i> sp.</li> </ul> Kvasinky: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Candida</i> sp.</li> <li>• <i>Saccharomyces</i> sp.</li> <li>• <i>Kluyveromyces</i> sp.</li> <li>• <i>Torula</i> sp.</li> </ul>
Kysané podmásli	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactococcus</i> sp.</li> <li>• <i>Leuconostoc</i> sp.</li> </ul>
Lassi	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i></li> </ul>
Kumiss	BMK: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i></li> <li>• <i>Lactobacillus acidophilus</i></li> </ul> Kvasinky: <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Saccharomyces</i> sp.</li> <li>• <i>Micrococcus</i> sp.</li> </ul>
Leben	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Streptococcus lactis</i></li> <li>• <i>Streptococcus thermophilus</i></li> <li>• <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i></li> <li>• kvasinky fermentující laktosu</li> </ul>

### 3.5.9 Technologie výroby mlékárenských kultur

Použití komerčně vyráběných MK značně usnadňuje náročnou práci s přípravou zákysu. Výroba MK je jedním z nejdůležitějších, ale také nejsložitějších procesů v mlékárenství, jelikož vyžaduje vysoké hygienické standardy. Riziko kontaminace musí být minimální. Výrobce kultur zaručuje standardní čistotu, kvalitu, aktivitu, růstové a metabolické charakteristiky (glykolýza, proteolýza, lipolýza, tvorba aromatických látek atd.), definované fyziologické vlastnosti a rezistenci vůči bakteriofágům (Bylund, 1995; Walstra et al., 2006).

Technologie přípravy MK je v podstatě totožná s postupem výroby samotných FMV. Základními kroky tedy jsou tepelné ošetření média, chlazení na inokulační teplotu, inokulace, inkubace, chlazení, konzervace a skladování zákysu. Schéma technologie výroby MK je znázorněno na obrázku 3 (Bylund, 1995).



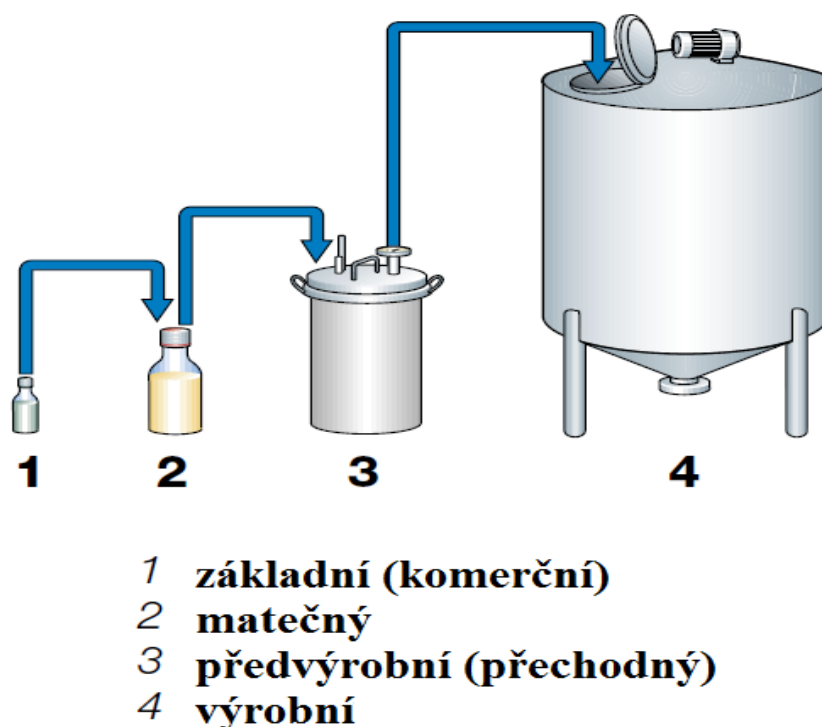
**Obr 3: Schéma technologie výroby MK (Bylund, 1995)**

Nejčastěji používaným růstovým médiem pro výrobu MK je odstředěné mléko s vysokou mikrobiální kvalitou. Používá se ve formě čerstvé nebo obnovené ze sušeného odstředěného mléka s obsahem sušiny 9 – 12 % hm. Hlavním důvodem používání odstředěného mléka je snadnější rozpoznání vad chuti. Médium také může být obohaceno o růstové faktory (Bylund, 1995).

Při přípravě mlékařských startérů musí být během celého procesu dodržovány přísné hygienické podmínky a aseptický režim. MK jsou obvykle produkovány

v oddělených místnostech s filtrací vzduchu a mírným podtlakem. Čisticí systém všech nástrojů musí být navržen tak, aby nemohlo dojít ke kontaminaci zbytky detergentů nebo desinfekce, což by mělo za následek znehodnocení celé kultury. Veškerý transport zákysů by též měl probíhat za aseptických podmínek (Bylund, 1995).

MK lze rozdělit dle formy využití ve výrobě na zákys základní (komerční), matečný, předvýrobní (přechodný) a výrobní. Schéma přípravy jednotlivých typů zákysů pro FMV je znázorněno na obrázku 4. V současnosti je již k inokulaci suroviny využíván převážně komerční startér (Bylund, 1995; Walstra et al., 2006).



Obr 4: Schéma výroby zákysu (Bylund, 1995)

### 3.5.9.1 Tepelné ošetření mléka

Prvním krokem při výrobě MK je tepelné ošetření nosného média. Médium je pasterováno při teplotě 90 – 95 °C po dobu 30 – 45 min. Tímto dochází nejen k zajištění mikrobiální čistoty, ale také ke zničení původních mikrorganismů, eliminaci inhibujících složek, zničení bakteriofágů, vyloučení rozpuštěného kyslíku a denaturaci části proteinů (Bylund, 1995).

### **3.5.9.2 Chlazení na teplotu inokulace**

Po tepelném ošetření je médium zchlazeno na inokulační teplotu, jež se liší dle typu kultury, která bude vyráběna. Chlazení na inokulační teplotu je kritickým bodem výroby zejména u složených kultur, kde nedodržení správné teploty může vést k přemnožení jednoho kmene na úkor ostatních, což vede ke změně vlastností zákysu (Bylund, 1995).

### **3.5.9.3 Inokulace růstového média**

Zaočkování růstového média vyráběným typem startéru nastává po jeho tepelném ošetření a následném zchlazení na inokulační teplotu. Množství použitého startéru může ovlivnit složení MK, zejména poměry acidulantů (homofermentativní kmeny mikroorganismů) a aromatizantů (heterofermentativní kmeny mikroorganismů). Inokulační dávkou lze tedy ovlivnit složení a technologické vlastnosti připraveného zákysu (Bylund, 1995; Walstra et al., 2006).

### **3.5.9.4 Inkubace v růstovém médiu**

Inkubace neboli fermentace je pomnožení zaočkovaných mikroorganismů. Během inkubace dochází k rapidnímu množení mikroorganismů a fermentaci laktosy na kyselinu mléčnou. Kultury obsahující heterofermentativní kmeny mikroorganismů zároveň produkují aromatické látky jako je acetaldehyd, diacetyl, kyselina octová či propionová, různé aldehydy a ketony, alkoholy, estery, vyšší mastné kyseliny a oxid uhličitý.

Inkubační doba závisí na typu bakterií v kultuře, dávce inokula a teplotě kultivace. Obvykle se pohybuje v rozmezí 3 – 20 h. V průběhu fermentace je pečlivě kontrolována inkubační teplota, pH růstového média, čas a dodržení aseptických podmínek, aby nemohlo dojít ke kontaminaci (Bylund, 1995; Walstra et al., 2006).

### **3.5.9.5 Chlazení mlékařských kultur**

Chlazení má za úkol zastavit množení mikroorganismů a tudíž udržet kvalitu kultury na vysoké úrovni. Pokud bude startér použit do 6 h, chladí se na 10 – 12 °C. Pokud je třeba kulturu skladovat déle než 6 h, je lepší ji zchladit pod 5 °C (Bylund, 1995).

### **3.5.9.6 Konzervace a skladování mlékařských kultur**

V současnosti jsou MK konzervovány technologickými postupy, jež zajišťují jejich dlouhou trvanlivost a vysokou kvalitu. Moderní formy startérových kultur jsou vyráběny v koncentrované formě a konzervovány sušením, hlubokým zamražením nebo lyofilizací. Konzervace hlubokým zamražením obvykle používá teploty okolo  $-160\text{ }^{\circ}\text{C}$  a jako chladicí médium tekutý dusík. Konzervace MK pomocí lyofilizace sestává ze zmražení buněk v aktivním stadiu a sublimace vodní páry za sníženého tlaku. (Bylund, 1995; Walstra et al., 2006).

### 3.6. Využití exopolysacharidů bakterií mléčného kvašení při výrobě fermentovaných mléčných produktů

Jako prevence vad textury v nízkotučných a odtučněných FMV se běžně využívají náhražky tuku. EPS produkované mlékařskými kulturami jsou díky své hydrokoloidní povaze možnou náhradou těchto aditiv. To se také setkává s požadavky spotřebitele na snížení množství přídatných látek, jelikož v mnoha zemích je jejich využívání striktně regulováno nebo přímo zakázáno (Robitaille et al., 2009). V porovnání s ostatními zahušťovadly mají EPS často již při nízkých koncentracích lepší schopnost zvyšovat viskozitu FMV a tím ovlivňovat jejich rheologii a texturu (Duboc and Mollet 2001). Bylo pozorováno, že EPS produkované BMK „*in situ*“, tedy přímo v průběhu fermentace výrobku, prospívají rheologickým i fyzikálně-chemickým vlastnostem lépe, než EPS v práškové podobě pouze přidané do výrobku (Doleyres et al., 2005). Jelikož se EPS různých BMK výrazně liší složením, prostorovým uspořádáním, nábojem, pevností a schopností reagovat s proteiny, nebyl zatím stanoven jasný vzájemný vztah mezi koncentracemi sledovaných EPS a viskozitou konečných produktů. Nicméně dosavadní poznatky je možné shrnout pravidlem, že pro získání výrobku s vysokou viskozitou, je třeba využít EPS s relativně vysokou rigiditou řetězce (Jolly et al., 2002).

Faber a kol. (1998) zjistili, že pokud bylo mléko fermentováno dvěma různými kmeny produkujícími stejné množství EPS, které mají zároveň stejné opakující se podjednotky, ale různou molární hmotnost, ten FMV, který obsahoval EPS s vyšší molární hmotností byl zároveň viskóznější, než produkt s EPS o nižší molární hmotnosti. Van den Berg a kol. (1995) zjistili, že neutrální EPS přispívají k viskozitě, ale ne k elasticitě FMV. Na druhé straně záporně nabitě EPS účinkují opačně. Další studie popsaly některé obecné rysy týkající se vztahů mezi vazbami v molekule EPS a rigiditou jejich řetězce.  $\beta(1-4)$  vazby mají za následek rigidnější polymer než vazby  $\alpha(1-4)$  a  $\beta(1-3)$ . Naopak vazby  $\alpha(1-6)$  a  $\beta(1-6)$  jsou velmi pružné. Postranní řetězce EPS také ovlivňují celkovou odolnost molekuly vůči deformacím a tedy i texturní a rheologické vlastnosti EPS (Van den Berg et al., 1995; Faber et al., 1998; Tuinier et al., 1999; Tuinier et al., 2001).

### 3.6.1 Využití exopolysacharidů bakterií mléčného kvašení při výrobě jogurtů

Jogurt je FMV k jehož výrobě je využívána jogurtová kultura obsahující mikroorganismy *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Při výrobě jogurtů je nejběžnější použití 2,5 – 3 % hm. výrobní startérové kultury. Fermentace může probíhat za teploty 40 – 45 °C a požadovaného pH 4,2 – 4,5 je dosaženo přibližně za 2,5 – 3 h (vyšší teplota - kratší čas) nebo za teploty 30 – 37 °C přičemž požadovaného pH je dosaženo během 7 – 8 h (nižší teplota - delší čas). Kysání může probíhat přímo v jednotlivých spotřebitelských obalech („set-type“ fermentace) nebo ve fermentačním tanku, kdy je gelová struktura jogurtu následně rozrušena pomocí šetrného míchání („stirred-type“ fermentace) (Bylund, 1995; Guzel-Seydim et al., 2005; Walstra et al., 2006; Panesar and Parmjit, 2011). Kmeny BMK produkující EPS byly použity při výrobě „set – type“ i „stirred – type“ jogurtů z různých druhů mléka. Vliv EPS<sup>+</sup> kmenů byl hodnocen obvykle u těchto parametrů: celkový obsah sušiny, celkový obsah tuku, pH, titrační kyselost, obsah kyseliny mléčné, acetaldehydu, těkavých mastných kyselin, thyrosinu či polysacharidů (vyjádřených jako ekvivalent glukosy), viskozita, konzistence, tuhost, pružnost, vylučování syrovátky či zadržnost vody. S výhodou bývají též používány mikroskopické obrazové analýzy pro pozorování FMV a působení EPS „*in situ*“ na mikrostrukturu jogurtu (Guzel-Seydim et al., 2005; Güler-Akin et al., 2009; Yang et al. 2014).

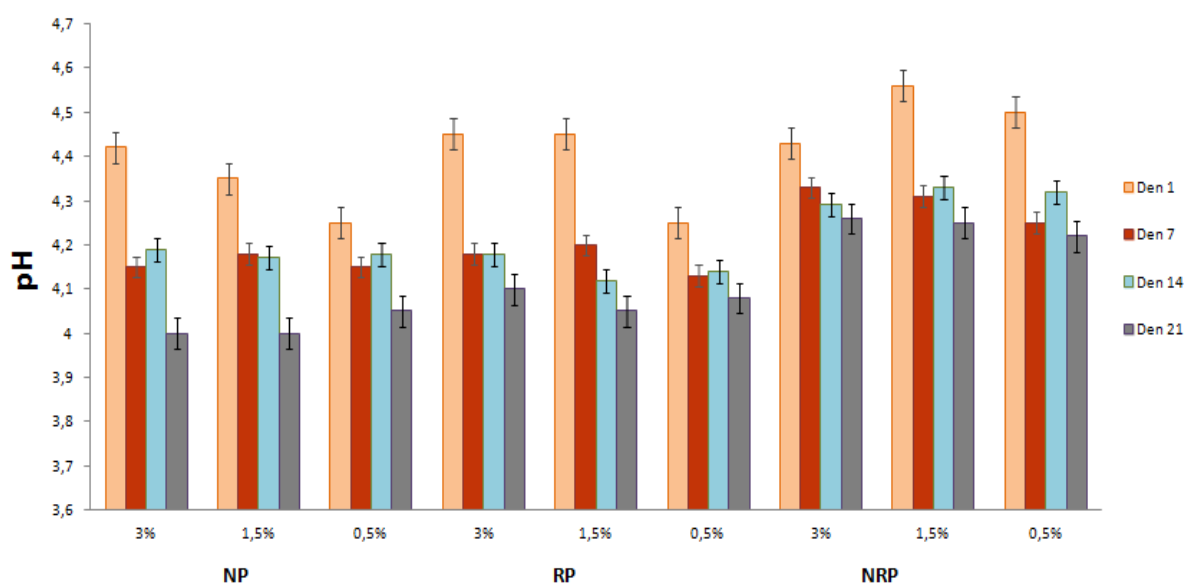
#### 3.6.1.1 „Stirred – type“ jogurt

Güler-Akin a kol. (2009) se zabývali vlivem aplikace EPS u „stirred-type“ jogurtů. Použité kravské mléko obsahovalo 12,37 % hm. sušiny a 3,78 % hm. tuku, jehož obsah byl následně odstředěním standardizován na 0,5; 1,5 a 3,0 % hm. Po tepelném ošetření a zchlazení na inokulační teplotu 45 °C byla mléka o všech třech tučnostech inokulována 2 % hm. zákysu. Použité kultury byly získány od firmy Danisco Cultor (Turecko). Všechny zákysy obsahovaly kmeny *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Šlo o komerční kulturu netáhlovitou EPS<sup>+</sup> YO - MIX 532; táhlovitou EPS<sup>+</sup> YO-MIX 601 a kulturu EPS<sup>-</sup> YO-MIX 621. Po inokulaci mléka o různých tučnostech těmito startéry tak nakonec vzniklo celkem 9 typů vzorků. Inkubace probíhala za teploty 42 °C dokud pH nedosáhlo hodnoty 4,6 (průměrně 207 ± 8 min). Po zastavení

fermentace ochlazením na 4 °C byla struktura koagulátu rozrušena mícháním po dobu 3 min při otáčkách nižších než 20 rpm. Takto připravené vzorky byly ve 200 g baleních skladovány při 4 °C. Analýzy celového obsahu sušiny a tuku, pH, titrační kyselosti, obsahu acetaldehydu, polysacharidů (vyjádřený jako ekvivalent glukosy), viskozity a odlučování syrovátky byly prováděny 1., 7., 14. a 21. den po výrobě (Güler-Akin et al., 2009).

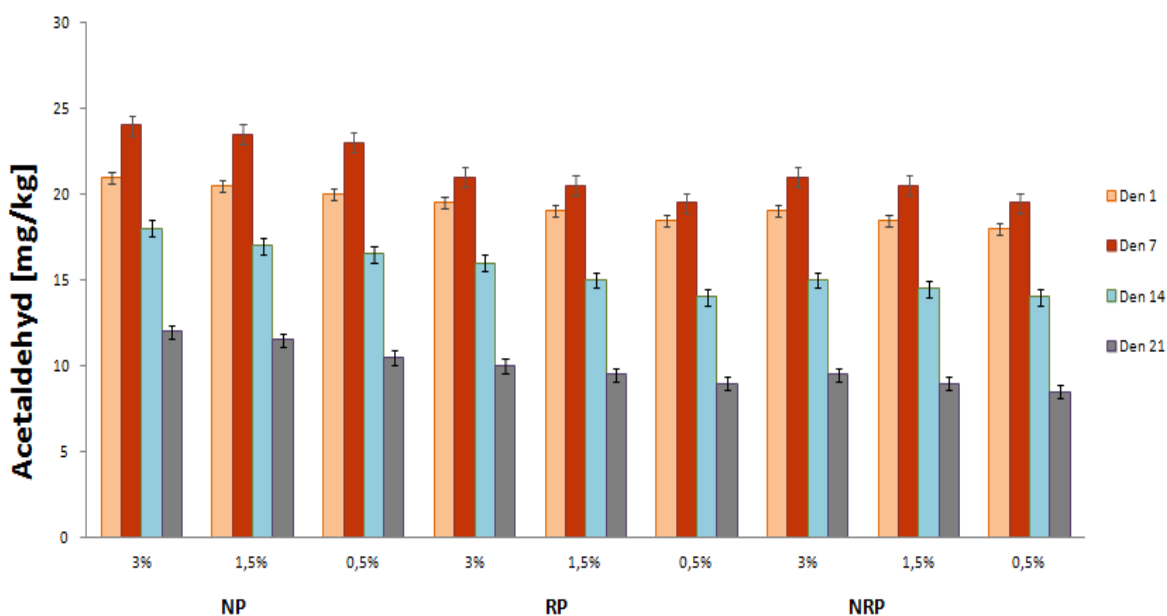
Vliv tučnosti, použité kultury a doby skladování na pH a obsah acetaldehydu jsou zobrazeny na obr. 5 a 6 (Güler-Akin et al., 2009). S dobou skladování pH klesalo u všech vzorků (mikroorganismy měly více času přeměnit laktosu na kyselinu mléčnou). Vývoj acidity byl ale významně ovlivněn tučností média a použitou kulturou. První den skladování bylo nejvyšší pH u vzorku s netáhlovitými EPS<sup>+</sup> BMK a tučností 1,5 % hm. Výrobky zakysané tímto startérem v porovnání s ostatními kulturami prokazovaly pomalejší pokles pH v průběhu skladování. Se snižující se tučností se pH spíše mírně zvyšovalo. Převážná část acetaldehydu, který dodává výrobku chuť, byla vytvořena během fermentace. Stabilita acetaldehydu je však závislá právě na pH. Při nižších hodnotách pH je acetaldehyd snadno oxidovatelný na acetát a proto při skladování jeho množství klesá. Na konci doby skladování byl nejvyšší obsah acetaldehydu naměřen u vzorků s EPS<sup>-</sup> kulturou. Přesto, že netáhlovitý EPS<sup>+</sup> zákys vyprodukoval více acetaldehydu, než táhlovitý EPS<sup>+</sup> startér, je tento rozdíl v porovnání s acetaldehydem vyprodukovaným EPS<sup>-</sup> kmeny zanedbatelný. Byla tedy prokázána negativní korelace mezi obsahem EPS a acetaldehydu (Güler-Akin et al., 2009; Tamime and Robinson, 1999).





**Obr. 5: Vliv tučnosti, použité kultury a doby skladování na pH stirred-type jogurtu.**

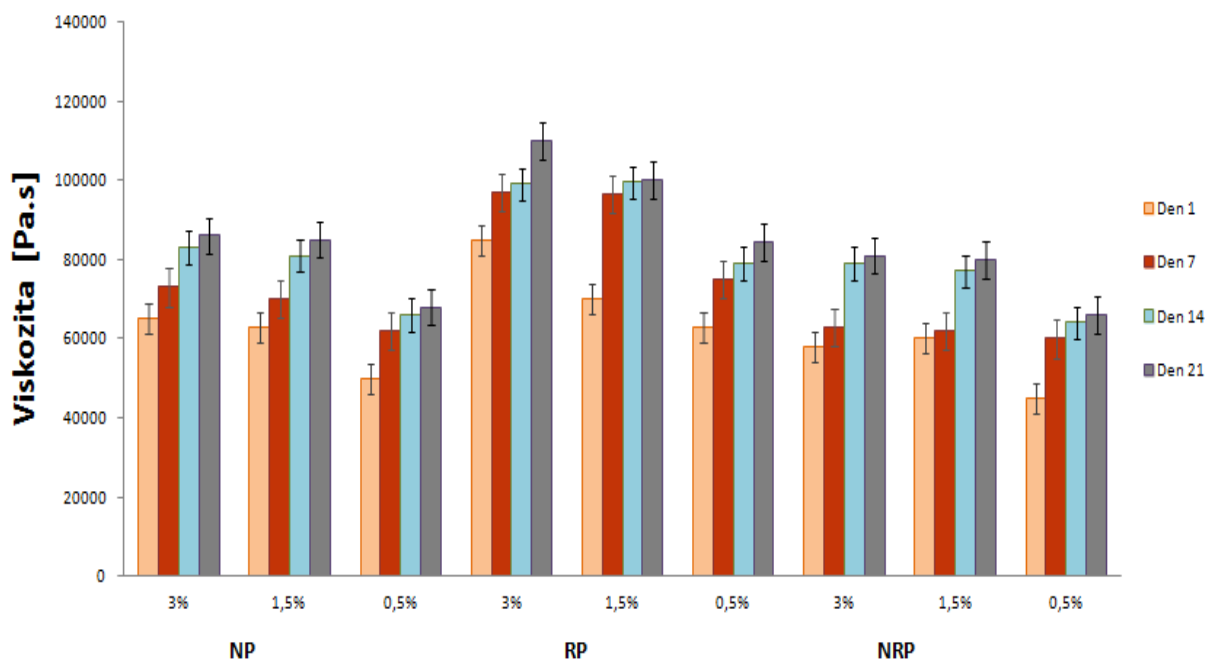
NP – EPS<sup>-</sup> jogurtová kultura; RP – táhlovitá EPS<sup>+</sup> jogurtová kultura; NRP – netáhlovitá EPS<sup>+</sup> jogurtová kultura. Výsledky jsou zázorněny jako aritmetický průměr ze 2 měření ± směrodatná odchylka (Güler-Akin et al., 2009).



**Obr. 6: Vliv tučnosti, použité kultury a doby skladování na obsah acetaldehydu stirred-type jogurtu.**

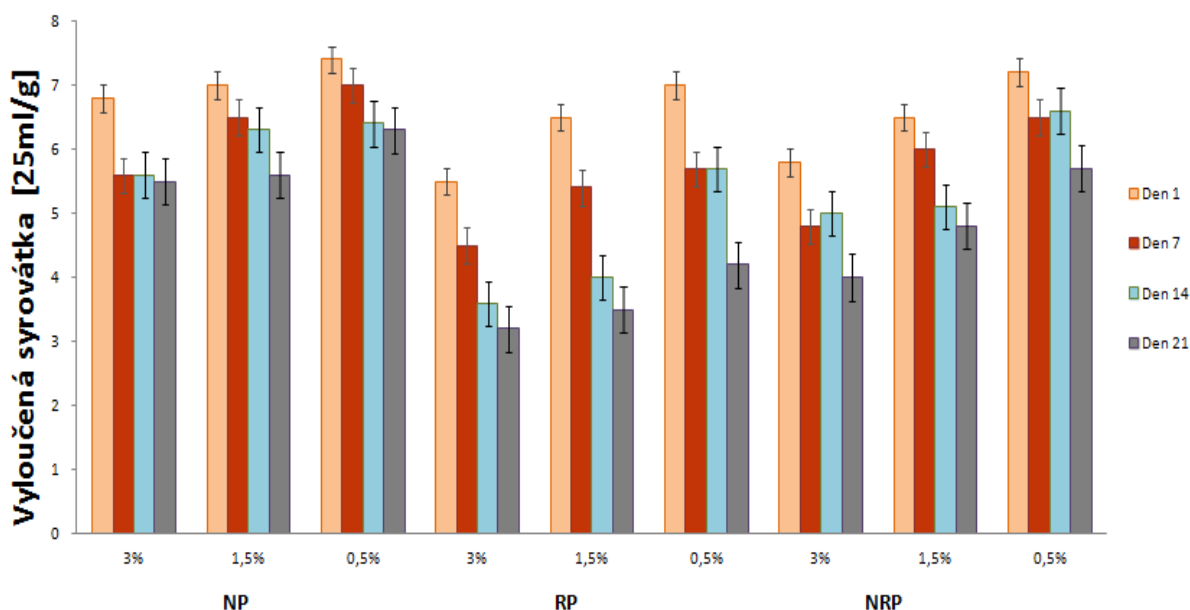
NP – EPS<sup>-</sup> jogurtová kultura; RP – táhlovitá EPS<sup>+</sup> jogurtová kultura; NRP – netáhlovitá EPS<sup>+</sup> jogurtová kultura. Výsledky jsou zázorněny jako aritmetický průměr ze 2 měření ± směrodatná odchylka (Güler-Akin et al., 2009).

Vliv tučnosti, použité kultury a doby skladování na viskozitu „stirred-type“ jogurtu je zobrazen na obr. 7 (Güler-Akin et al., 2009). Jogurty s táhlovitou EPS<sup>+</sup> kulturou měly nejvyšší viskozitu. Jogurty s netáhlovitým EPS<sup>+</sup> zákysem prokazovaly naopak viskozitu nejnižší. Mnoho autorů pozorovalo, že EPS v mléčných výrobcích, které byly fermentovány EPS<sup>+</sup> mikroorganismy, významně ovlivňovaly viskozitu konečného produktu. V tomto případě však výsledky dokazují, že rheologický vliv EPS záleží zejména na charakteru jejich molekuly (např. molekulové hmotnosti, rigiditě a větvení řetězce, typu vazeb), a jsou v souladu se závěry De Vuysta a kol. (2003), kteří prokázali, že *Streptococcus thermophilus* LY03 i přes produkci velkého množství EPS s vysokou molární hmotností vytvářel relativně řídké jogurty. Vliv různých EPS<sup>+</sup> kmenů na rheologii a texturu FMV tedy může být značně odlišný (De Vuyst et al., 2003; Mende et al., 2012). Dále byla pozorována pozitivní korelace růstu viskozity s dobou skladování a rostoucím obsahem tuku a tedy i sušiny (Sebastiani and Zelger, 1998; Güler-Akin et al., 2009).



**Obr. 7: Vliv tučnosti, použité kultury a doby skladování na viskozitu stirred-type jogurtu.** NP – EPS<sup>-</sup> jogurtová kultura; RP – táhlovitá EPS<sup>+</sup> jogurtová kultura; NRP – netáhlovitá EPS<sup>+</sup> jogurtová kultura. Výsledky jsou zázorněny jako aritmetický průměr ze 2 měření. ± směrodatná odchylka (Güler-Akin et al., 2009)

Vliv tučnosti, použité kultury a doby skladování na vylučování syrovátky „stirred-type“ jogurtu je zobrazen na obr. 8. Jogurty vyrobené s EPS<sup>+</sup> kmeny prokazovaly výrazně nižší množství vyloučené syrovátky než vzorky neobsahující EPS. Byla zjištěna negativní korelace mezi obsahem tuku a vylučováním syrovátky. To by mohlo být způsobeno nižším obsahem sušiny nízkotučných výrobků (Güler-Akin et al., 2009).



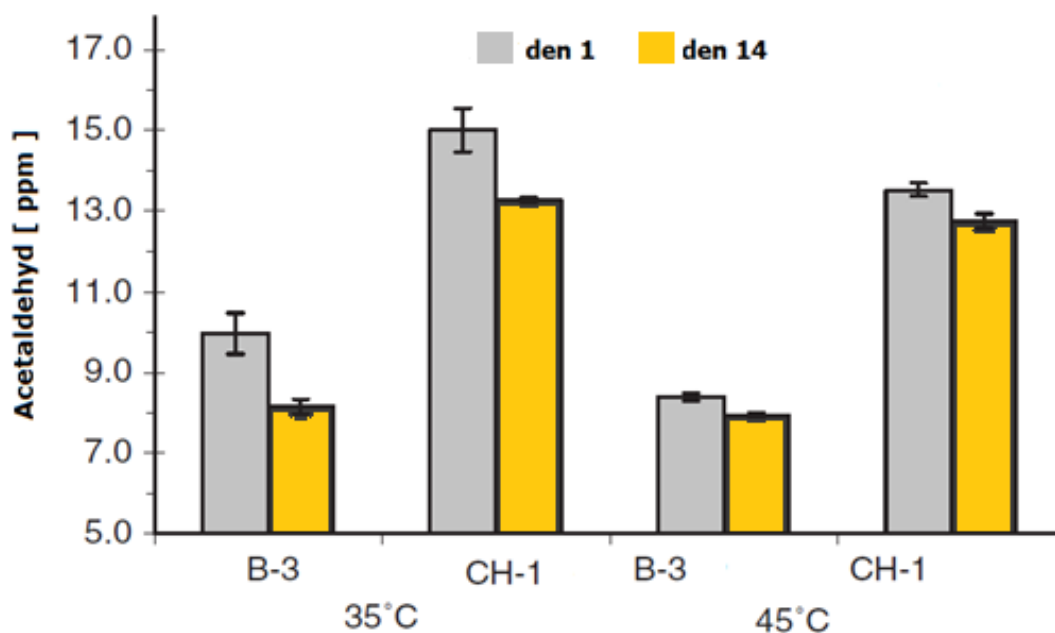
**Obr. 8: Vliv tučnosti, použité kultury a doby skladování na vylučování syrovátky stirred-type jogurtu.** NP – EPS<sup>-</sup> jogurtová kultura; RP – táhlivá EPS<sup>+</sup> jogurtová kultura; NRP – netáhlivá EPS<sup>+</sup> jogurtová kultura. Výsledky jsou zázorněny jako aritmetický průměr ze 2 měření. ± směrodatná odchylka (Güler-Akin et al., 2009)

### 3.6.1.2 „Set – type“ jogurt

Guzel-Seydim a kol. (2005) zkoumali účinky táhlovitých a netáhlovitých EPS<sup>+</sup> MK a různých inkubačních teplot na kvalitu neochuceného „set – type“ jogurtu. Jako surovina bylo použito mléko kravské o tučnosti 3,15 % hm. Přídavkem sušeného odtučněného mléka byl následně upraven obsah jeho sušiny na 15 % hm. Po základním ošetření mléčné směsi (homogenizace, pasterace) a zchlazení na inkubační teploty 35 a 45 °C bylo provedeno zaočkování 2 % hm. jogurtové kultury B-3 (EPS<sup>+</sup>, táhlovitá) a CH-

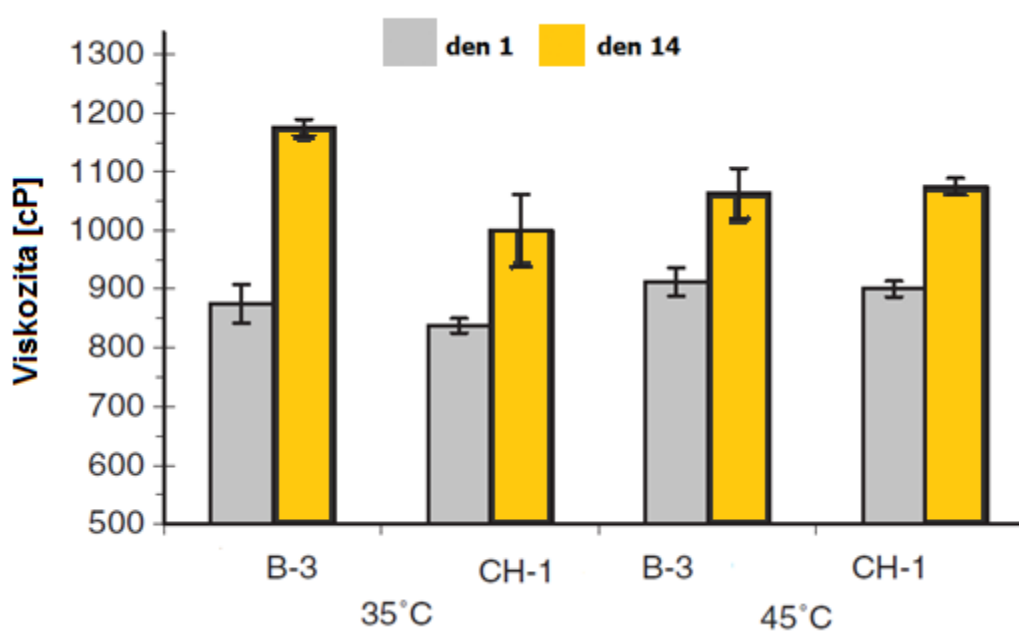
1 (EPS<sup>+</sup>, netáhlovitá). Kultury byly získány od Chr. Hansen-Peyma (Turecko). Kultivace probíhala za teplot 35 a 45 °C. Když pH jogurtů dosáhlo hodnoty 4,7, byly vzorky zchlazeny na 4 °C a uchovány při této teplotě. V 1. a 14. dni skladování byl pak analyzován celkový obsah sušiny, celkový obsah tuku, pH, obsah kyseliny mléčné, acetaldehydu, těkavých mastných kyselin a thyrosinu, viskozita, konzistence (měřena penetrometricky) a vylučování syrovátky.

Na obrázku 9 je znázorněn vliv kultivační teploty a doby skladování na obsah acetaldehydu u jednotlivých vzorků jogurtu. Bylo zjištěno, že s nižší teplotou kultivace byly mikroorganismy schopny vyprodukovat vyšší množství acetaldehydu, který je nejdůležitější složkou chuti jogurtu. Vyšší obsah acetaldehydu byl pozorován ve vzorcích, které byly inokulovány netáhlovitou kulturou při obou teplotách inkubace bez ohledu na délku skladování. Obsah acetaldehydu se s dobou skladování snižoval. Tyto výsledky jsou v souladu s předchozím oddílem (Guzel-Seydim et al., 2005; Güler-Akin et al., 2009; Tamime and Robinson, 1999).



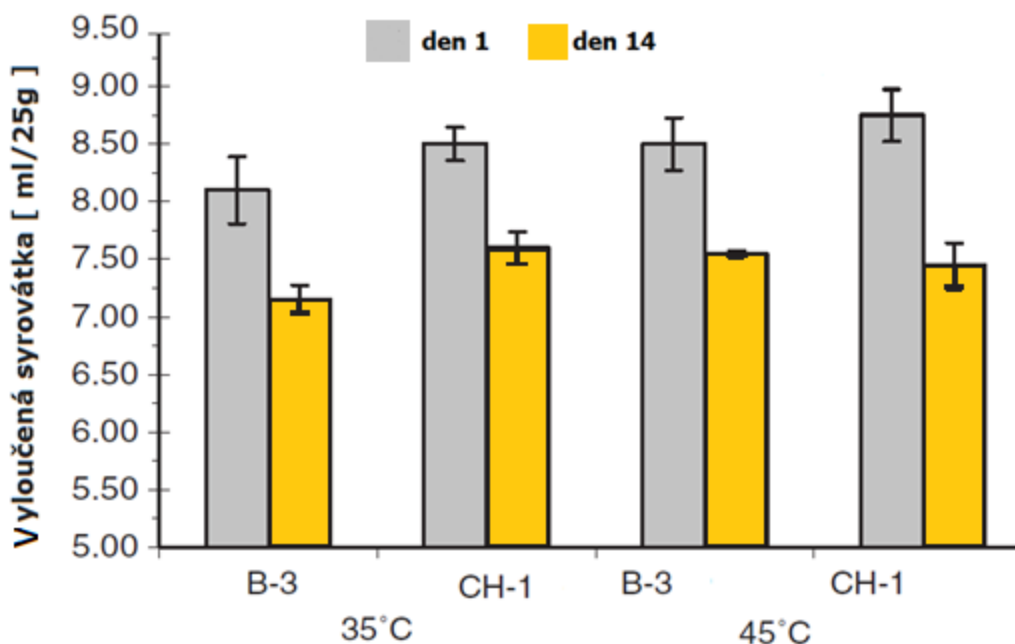
**Obr. 9: Stanovení vlivu kultivační teploty, typu kultury a doby skladování na obsah acetaldehydu u „set-type“ jogurtu. B-3 – EPS<sup>+</sup>, táhlovitá; CH-1 – EPS<sup>+</sup>, netáhlovitá. Výsledky jsou zázorněny jako aritmetický průměr ze 4 měření. ± směrodatná odchylka (Guzel-Seydim et al., 2005).**

Vliv kultivační teploty a doby skladování na viskozitu jednotlivých vzorků jogurtů je znázorněn na obrázku 10. V prvním dni skladování nebyl ve viskozitě vyrobených jogurtů významný rozdíl. Po 14 dnech skladování se viskozita všech vzorků zvýšila díky tomu, že kaseinová síť se s dobou skladování stává tužší. Nejmarkantnější rozdíl ve viskozitě byl pozorován 14. den u vzorku, který obsahoval táhlovité EPS a byl inkubován při teplotě 35 °C (Guzel-Seydim et al., 2005).



**Obr. 10: Vliv kultivační teploty, typu kultury a doby skladování na viskozitu set-type jogurtu.** B-3 – EPS<sup>+</sup>, táhlovitá; CH-1 – EPS<sup>+</sup>, netáhlovitá. Výsledky jsou zázorněny jako aritmetický průměr ze 4 měření ± směrodatná odchylka (Guzel-Seydim et al., 2005).

Dalším kritériem rheologických vlastností jogurtu je vylučování syrovátky, tedy schopnost koagulátu zadržovat vodu. Výsledky měření tohoto parametru jsou znázorněny na obrázku 11. Jogurty připravené s netáhlovitou kulturou prokazovaly vyšší množství vyloučené syrovátky při obou inkubčních teplotách, než jogurty připravené s táhlovitou kulturou, pravděpodobně kvůli tomu, že část volné vody v koagulu byla vázána na slizovitou strukturu EPS. Přes to, že vylučování syrovátky se ve všech vzorcích po 14 dnech skladování výrazně snížilo, z hlediska textury jogurty s táhlovitou kulturou B-3 prokazovaly celkově lepší vlastnosti (Guzel-Seydim et al., 2005).



**Obr. 11: Vliv kultivační teploty, typu kultury a doby skladování na vylučování syrovátky set-type jogurtu.** B-3 – EPS<sup>+</sup>, tálhlovitá; CH-1 – EPS<sup>+</sup>, netálhlovitá. Výsledky jsou zázorněny jako aritmetický průměr ze 4 měření. ± směrodatná odchylka (Guzel-Seydim et al., 2005).

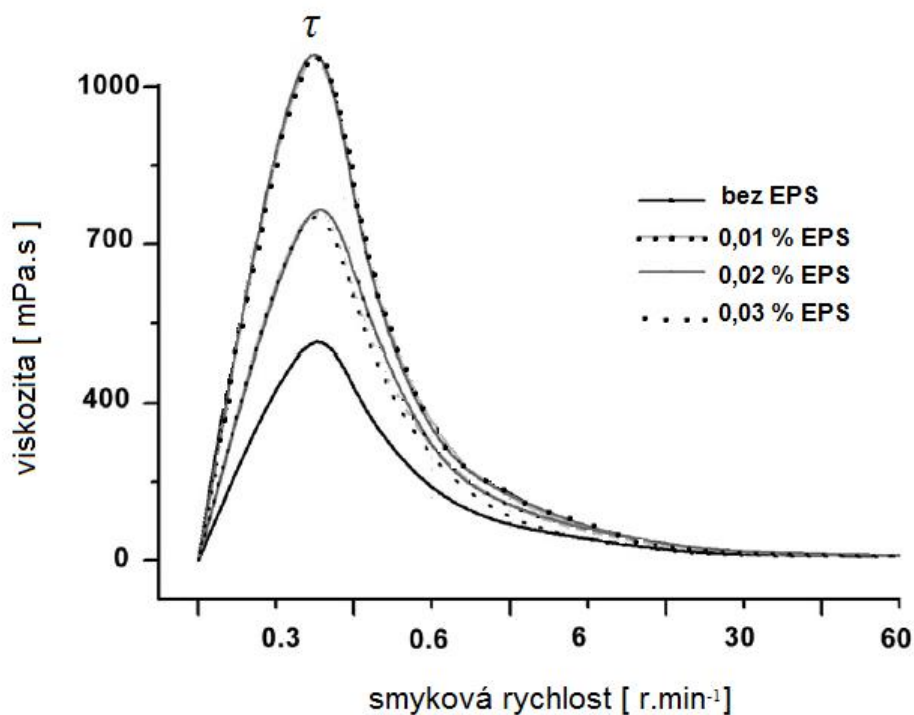
Výsledky získané ve studii Guzel-Seydima a kol. (2005) jsou v souladu se závěry studií zaměřených na vliv EPS<sup>+</sup> kultur na parametry „stirred – type“ jogurtů, jež byly podrobně diskutovány v předchozím oddílu. Obecně lze tedy říci, že především tálhlovité kultury EPS<sup>+</sup> BMK mohou pomoci vylepšit texturu jogurtů, zejména nízkotučných (Guzel-Seydim et al., 2005; Güler-Akin et al., 2009; Tamime and Robinson, 1999).

### 3.6.1.3 „Set-type“ jogurt z buvolího mléka

Yang a kol. (2014) zkoumali vliv EPS na texturu a mikrostrukturu buvolího jogurtu. K přípravě vzorků jogurtu bylo použito buvolí (*Bubalus bubalis*) mléko s obsahem 14 % hm. sušiny a 7 % hm. tuku. Po tepelném ošetření mléka a zchlazení na inokulační teplotu 43 °C bylo prováděno zaočkování 3 % hm. inokula. Základní kultura byla složena z EPS<sup>-</sup> *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* L1 a *Streptococcus thermophilus* S1. Aby mohl být studován vliv množství EPS na texturu a fyzikálně-chemické vlastnosti jogurtu, bylo do vzorků před inokulací navíc přidáno postupně se zvyšující množství EPS

vyextrahovaných od EPS<sup>+</sup> kmene *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* GL03-1 a to v koncentracích 0,01, 0,02 a 0,03 % hm. Vzorek bez přidaných EPS byl použit jako kontrola. Jogurty byly inkubovány za teploty 41,8 °C, dokud nedosáhly požadované titrační kyselosti 32 SH. Poté byly ochlazeny a skladovány při teplotě 4 °C po dobu 24 h. Byla testována titrační kyselost, viskozita, zádrž vody a z texturních parametrů tuhost a pružnost. Dále byla pomocí skenovacího elektronového mikroskopu sledována mikrostruktura výrobků (Yang et al., 2014).

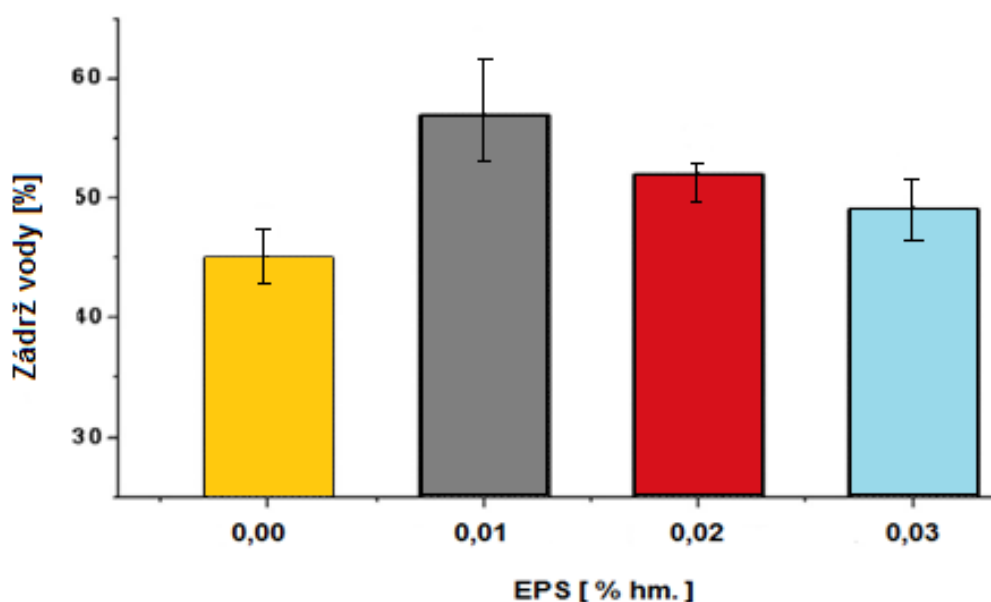
Vliv množství EPS na viskozitu vzorků v závislosti na smykovém tření je zobrazen na obr. 12. Viskozita buvolího jogurtu se s rostoucím množstvím EPS postupně snižovala. Tento výsledek se liší od předchozích tvrzení, že EPS by měly obecně zvyšovat viskozitu FMV. Tento jev by mohl být vysvětlen tím, že Yang a kol. (2014) přidávali do mléka vyextrahované EPS ještě před započítáním fermentačního procesu, kdežto v ostatních studiích byly EPS<sup>+</sup> kmeny využity přímo pro samotnou fermentaci (Guzel-Seydim et al., 2005; Güler-Akin et al., 2009; Yang et al., 2014).



$\tau$ - mez toku

**Obr. 12: Vliv množství EPS na viskozitu buvolího jogurtu.** Výsledky jsou zázorněny jako aritmetický průměr ze 3 měření (Yang et al., 2014).

Vliv množství EPS na zádrž vody ve vzorcích je zobrazen na obr. 13. Vzorky, které obsahovaly přidané EPS, se v zádržnosti vody výrazně lišily od kontrolního vzorku bez EPS. Zádržnost vody kontrolního vzorku byla 45 %. Tato hodnota se zvýšila na 57 % po přidání 0,01 % hm. EPS. S dalším růstem množství přidaných EPS se zádržnost vody v buvolím jogurtu mírně snížila. Při přidavku 0,03 % hm. EPS byla zádržnost 49 %. Mezi vzorkem s přidavkem 0,02 a 0,03 % hm. EPS nebyl shledán statisticky významný rozdíl. Pozorované výsledky lze vysvětlit tím, že gelový systém jogurtu s přidavkem EPS tvoří strukturu 3D sítě, která má díky interakci mezi mléčnými proteiny a EPS zvýšenou schopnost zadržovat vlhkost. Nicméně s rostoucím množstvím EPS se póry v této struktuře stávají slabšími a zádržnost se opět mírně sníží (Yang et al., 2014).

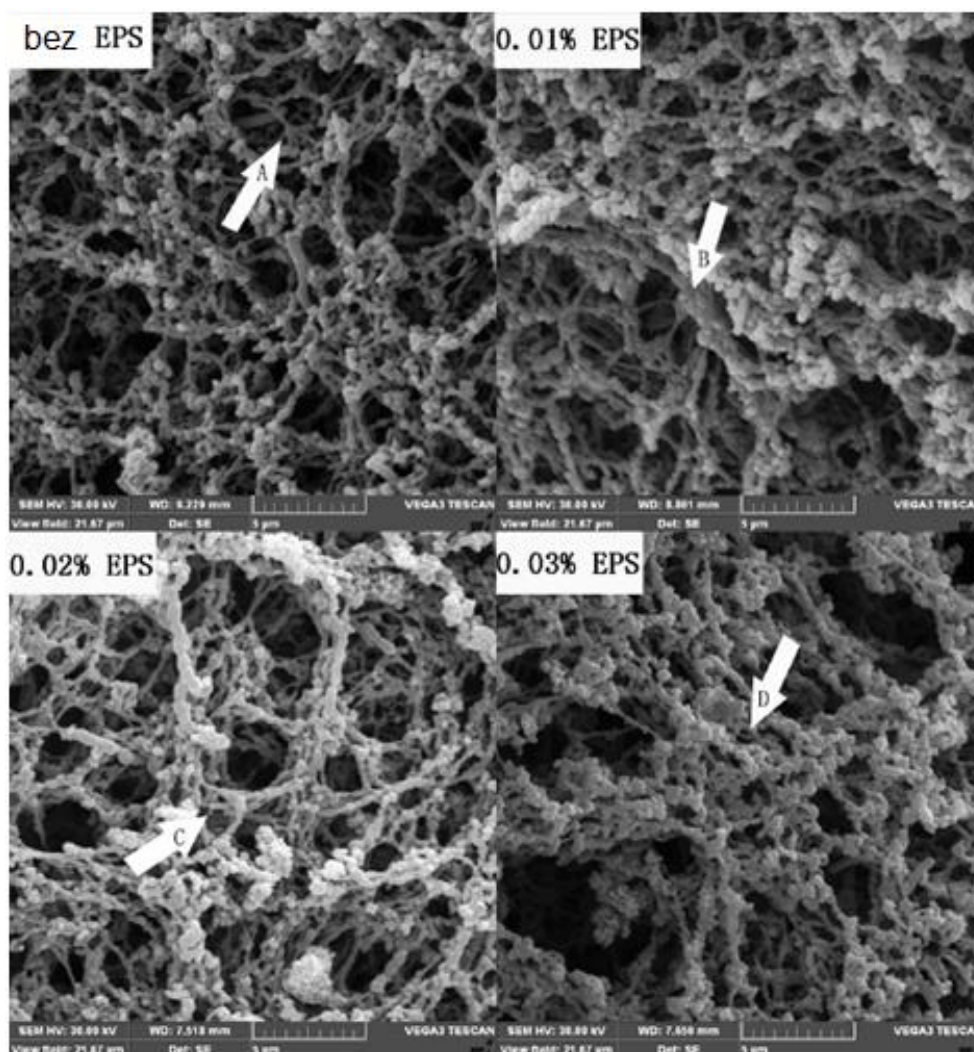


**Obr. 13: Vliv množství EPS na zádržnost vody v buvolím jogurtu.** Výsledky jsou zázorněny jako aritmetický průměr ze 3 měření  $\pm$  směrodatná odchylka (Yang et al., 2014).

Rozdíly v mikrostruktuře buvolích jogurtů s různými přidavky EPS jsou zobrazeny na obr. 14. Proteinové micely v jogurtu bez přidavku EPS se spojily dohromady a vytvořily homogenní a relativně pevnou 3D síť s malými a pravidelně rozmístěnými póry (šipka A na obr. 14). Při přidavku 0,01% hm. EPS se kaseinové micely těsněji shlukly a v síti tak vznikly větší mezery (šipka B na obr. 14). S dalším přidavkem EPS (0,02 % hm. a 0,03 % hm.) se micely kaseinu přeskupily, spojily pevněji a vytvořily velké póry (šipka C a D



na obr. 14), což vedlo k nižší zádržnosti vody ve srovnání s přidavkem 0,01 % hm. EPS (Yang et al., 2014).



**Obr. 14: Mikrostruktura vzorků buvolího jogurtu. A, B, C, D – velikost pórů v kaseinové síti. Snímky byly vytvořeny skenovacím elektronovým mikroskopem (Yang et al., 2014).**

Autoři této studie uzavřeli, že EPS reagující s kaseinovými micelami mléka mají významný vliv na fyzikálně-chemické vlastnosti a mikrostrukturu buvolího jogurtu. Při nízkých koncentracích EPS zlepšovaly vaznost vody a tuhost produktu. Ačkoli nezlepšovaly viskozitu, efektivně redukovaly mez toku buvolího jogurtu díky interakci s proteiny (Yang et al., 2014).

### 3.6.2 Využití exopolysacharidů bakterií mléčného kvašení při výrobě Lassi

Lassi je sladký, krémově bílý viskózní mléčný nápoj s bohatým aroma a mírně nakyslou chutí pocházející z Indie. Vyrábí se z dahi (produkt podobný tvarohu) intenzivním mícháním s cukrovým sirupem a případně přídavkem příchuti. Nicméně nízkotučné Lassi má příliš tekutou konzistenci, nevýraznou chuť a vyznačuje se přílišným vylučováním syrovátky (Khurana and Kanawjia, 2007; Behare et al., 2010).

Behare a kol. (2010) izolovali 64 kmenů termofilních EPS<sup>+</sup> BMK z tradičních indických FMV. Tyto mikroorganismy byly identifikovány jako *Lactobacillus*, *Streptococcus* a *Enterococcus* sp. Dle analýz technologických, rheologických, texturních a senzorických vlastností (titrační kyselost, vylučování syrovátky, viskozita, konzistence, chuť, barva a vzhled, sladká chuť) Lassi vyrobeného za pomoci těchto kmenů bakterií bylo zjištěno, že *Streptococcus thermophilus* IG16 by mohl být slibným kmenem, který produkuje jak netáhlovité (kapsulární) tak táhlovité (volné, slizovité) EPS v koncentracích až 211 mg.l<sup>-1</sup>. Tyto EPS byly převážně heteropolysacharidy obsahující rhamnosu a galaktosu v poměru 5,3 : 1. Využití *Streptococcus thermophilus* IG16 jako MK snížilo oddělování syrovátky a zlepšilo viskozitu, konzistenci, chuť, barvu a vzhled Lassi. Kapsulární EPS vytvořený bakterií *Streptococcus thermophilus* IG16 je vyobrazen na obr. 15 (Behare et al., 2010).



**Obr. 15:** Kapsulární EPS vytvořený bakterií *Streptococcus thermophilus* IG16 (Behare et al., 2010).

## 4. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo zhodnotit možnosti využití kmenů BMK produkujících EPS při výrobě FMV, zejména odtučněných, a jejich vliv na sensorické, texturní, rheologické a nutriční parametry těchto produktů. EPS jsou nejrozšířenější skupinou extracelulárních polymerů. Dle složení jsou děleny na homopolysacharidy a heteropolysacharidy a dle vaznosti na buňky mikroorganismů na netáhlovité (kapsulární) a táhlovité (slizovité). Množství a charakter produkovaných EPS závisí na řadě podmínek, například na druhu a kmenu BMK a růstových podmínkách (obsahu živin, teplotě). Rheologické a texturní vlastnosti EPS pak závisí na molekulové hmotnosti, typu vazby a větvení, tj. rigiditě molekuly, a interakcích EPS a mléčných bílkovin. Dle vlivu na texturu a rheologii FMV lze říci, že táhlovité EPS tyto vlastnosti ovlivňují, zatímco netáhlovité na ně vliv nemají. Nutriční význam EPS je též ovlivněn strukturou molekuly.

EPS<sup>+</sup> kmeny BMK byly využity pro produkci „stirred – type“ i „set – type“ jogurtů z různých druhů mléka a Lassi. U uvedených typů výrobků byl popsán vliv přítomnosti EPS na pH, obsah acetaldehydu, viskozitu a vylučování syrovátky či zádržnost vody. Bylo pozorováno, že EPS produkované BMK „*in situ*“, tedy přímo v průběhu fermentace výrobku, prospívaly rheologickým i fyzikálně-chemickým vlastnostem produktů lépe, než EPS v práškové podobě pouze přidané do výrobku. EPS obvykle zlepšovaly texturní a rheologické vlastnosti, avšak zhoršovaly sensorické aspekty (nižší obsah acetaldehydu jako zástupce sensoricky aktivních látek podílejících se na aroma FMV). Vzorky vyrobené s EPS<sup>+</sup> kmeny prokazovaly výrazně nižší množství vyloučené syrovátky než produkty s EPS<sup>-</sup> kmeny. Při porovnání jogurtů s obsahem táhlovitých EPS<sup>+</sup>, netáhlovitých EPS<sup>+</sup> a EPS<sup>-</sup> MK bylo zjištěno, že vzorky zakysané táhlovitým startérem měly nejvyšší viskozitu. Jogurty s netáhlovitou EPS<sup>+</sup> kulturou prokazovaly naopak viskozitu nejnižší, což potvrzuje význam důležitosti typu použitých EPS.

Závěrem lze říci, že hypotéza byla potvrzena a využití kmenů BMK produkujících EPS ve vhodném množství a s adekvátními molekulárními parametry může zlepšit texturní, rheologické a nutriční parametry FMV, zejména odtučněných. Na druhou stranu tyto kultury většinou neprodukují dostatečné množství acetaldehydu k zajištění adekvátních sensorických vlastností FMV. Řešením pro produkci nízkotučných FMV tak může být tvorba MK kombinujících EPS<sup>+</sup> a EPS<sup>-</sup> kmeny.

## 5. Seznam použité literatury

- Behare, P. V., Singh, R., Tomar, S. K., Nagpal, R., Kumar, M., & Mohania, D. 2010. Effect of exopolysaccharide-producing strains of *Streptococcus thermophilus* on technological attributes of fat-free lassi. *Journal of dairy science*, 93(7), 2874-2879.
- Benech, R. O., Kheadr, E. E., Lacroix, C. and Fliss, I. 2002. Antibacterial activities of nisin Z encapsulated in liposomes or produced in situ by mixed culture during cheddar cheese ripening. *Applied and environmental microbiology*, 68(11), 5607-5619.
- Broadbent, J., R., McMahon, D., J., Oberg, C.,J., Welker, D.,L. 2001. Use of exopolysaccharide-producing cultures to improve the functionality of low fat cheese. *International Dairy Journal*, 11(4-7). 433-439.
- Bylund, G. 1995. Dairy processing handbook. Tetra Pack Processing Systems AB. Lund, Sweden. 436 p. ISBN: 9163134276.
- Caplice, E. and Fitzgerald, G. F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International journal of food microbiology*, 50(1), 131-149.
- Cerning, J. and Marshall, V.M.E. (1999). Exopolysaccharides produced by the dairy lactic acid bacteria. *Recent Res Dev Microbiol* 3:195–209
- Costa, N. E., Hannon, J. A., Guinee, T. P., Auty, M. A. E., McSweeney, P. L. H., Beresford, T. P. 2010. Effect of exopolysaccharides produced by isogenic strains of *Lactococcus lactis* on half-fat Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 93(8), 3469-3486.
- Cotter, P. D., Hill, C., and Ross, R. P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777-788.
- Dabour, N., Kheadr, E., Benhamou, N., Fliss, I., LaPointe, G. 2006. Improvement of texture and structure of reduced-fat cheddar cheese by exopolysaccharide-producing lactococci. *Journal of Dairy Science*, 89(1), 95-110.
- Darilmaz, D. O. 2013. Relationship between gastrointestinal tolerance and exopolysaccharide production of propionibacteria strains under different pH and bile conditions. *International Journal of Dairy Technology*, 66(2), 194-201

- De Vuyst, L., Zamfir, M., Mozzi, F., Adriany, T., Marshall, V. M., Degeest, B. And Vaningelgem, F. 2003. Exopolysaccharide producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks. *International Dairy Journal*, 13, 707-717.
- Degeest, B., Janssens, B. and De Vuyst, L. 2001. Exopolysaccharide (EPS) biosynthesis by *Lactobacillus sakei* 0-1: production kinetics, enzyme activities and EPS yields. *Journal of applied microbiology*, 91(3), 470-477.
- Degeest, B., Vaningelgem, F. and De Vuyst, L. 2001. Microbial physiology, fermentation kinetics and process engineering of heteropolysaccharide production by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 747-757.
- Doleyres, Y., Schaub, L. and Lacroix, C. 2005. Comparison of the functionality of exopolysaccharides produced in situ or added as bioingredients on yogurt properties. *Journal of dairy science*, 88(12), 4146-4156.
- Duboc, P. and Mollet, B. 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *International Dairy Journal*, 11(9), 759-768.
- Faber, E. J., Zoon, P., Kamerling, J. P. and Vliegthart, J. F. 1998. The exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Rs and Sts have the same repeating unit but differ in viscosity of their milk cultures. *Carbohydrate research*, 310(4), 269-276.
- Florencia, S., F. 2013. Rheology of spreadable goat cheese made with autochthonous lactic cultures differing in their ability to produce exopolysaccharides. *Food Science and Technology*, 33(2), 233-238.
- Fusconi, R., Godinho, M. J. L., Hernández, I. L. C. and Bossolan, N. R. S. 2006. *Gordonia polyisoprenivorans* from groundwater contaminated with landfill leachate in a subtropical area: characterization of the isolate and exopolysaccharide production. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(2), 168-174.
- Gamar, L., Blondeau, K. and Simonet, J. M. 1997. Physiological approach to extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* strain C83. *Journal of Applied Microbiology*, 83(3), 281-287.

- Georgalaki, M. D., Van den Berghe, E., Kritikos, D., Devreese, B., Van Beeumen, J., Kalantzopoulos, G., Vuyst, D. and Tsakalidou, E. 2002. Macedocin, a food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Applied and environmental microbiology*, 68(12), 5891-5903.
- Gibson, G. R., and Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125(6), 1401–1412.
- Guler-Akin, M. B., Akin, M. S., Korkmaz, A. 2009. Influence of different exopolysaccharide-producing strains on the physicochemical, sensory and syneresis characteristics of reduced-fat stirred yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*. 62 (3). 422-430.
- Guzel-Seydim, Z. B., Sezgin, E. and Seydim, A. C. 2005. Influences of exopolysaccharide producing cultures on the quality of plain set type yogurt. *Food control*, 16(3), 205-209.
- Iliev, I., Ivanova, I. and Ignatova, C. 2006. Glucansucrases from lactic acid bacteria (LAB). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 20(3), 15-20.
- Jolly, L., Vincent, S. J., Duboc, P. and Neeser, J. R. 2002. Exploiting exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82(1-4), 367-374.
- Kaprálék, F. 1986. *Fyziologie bakterií*, 1. vydání. Státní pedagogické nakladatelství. Praha. 604 s. ISBN: 14-600-86.
- Khurana, H. K., and Kanawjia, S. K. 2007. Recent trends in development of fermented milks. *Current Nutrition & Food Science*, 3(1), 91-108.
- Klaenhammer, T. R., Barrangou, R., Buck, B. L., Azcarate-Peril, M. A. and Altermann, E. 2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS microbiology reviews*, 29(3), 393-409.
- Kurmann, J. A., Rasic, J. L., Kroger, M. 1992. *Encyclopedia of Fermented Fresh Milk Products: An International Inventory of Fermented Milk, Cream, Buttermilk, Whey, and Related Products*. Van Nostrand-Reinhold. New York, USA. 368 p. ISBN: 0-442-00869-4.

- Laws, A., Gu, Y. and Marshall, V. 2001. Biosynthesis, characterisation, and design of bacterial exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Biotechnology advances*, 19(8), 597-625.
- Loo, J. V., Cummings, J., Delzenne, N., Englyst, H., Franck, A., Hopkins, M., Kok, N., Macfarlane, G., Newton, D., Quigley, M., Roberfroid, M., van Vliet, T. and van den Heuvel, E. 1999. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *British Journal of Nutrition*, 81(02), 121-132.
- Looijesteijn, P. J., Hugenholtz, J. 1999. Uncoupling of growth and exopolysaccharide production by *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* NIZO B40 and optimization of its synthesis. *Journal of bioscience and bioengineering*, 88(2), 178-182.
- Majamaa, H., Isolauri, E., Saxelin, M. and Vesikari, T. 1995. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 20(3), 333-338.
- Marshall, V. M., Cowie, E. N. and Moreton, R. S. 1995. Analysis and production of two exopolysaccharides from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LC330. *Journal of Dairy Research*, 62(04), 621-628.
- Masák, J., Pelechová, J., Plachý, J. 1992. *Speciální mikrobiální technologie*. 1. vydání. Vysoká škola chemicko-technologická. Praha. 301 s. ISBN: 80-7080-142-5.
- Mende, S., Mentner, C., Thomas, S., Rohm, H., & Jaros, D. 2012. Exopolysaccharide production by three different strains of *Streptococcus thermophilus* and its effect on physical properties of acidified milk. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), 466-474.
- Micheli, L., Uccelletti, D., Palleschi, C. and Crescenzi, V. 1999. Isolation and characterisation of a ropy *Lactobacillus* strain producing the exopolysaccharide kefiran. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(1), 69-74.
- Nutrient Content of Milk Varieties. [Http://milkfacts.info](http://milkfacts.info) [online]. 2014 [cit. 2015-02-24]. Dostupné z: <http://milkfacts.info/Nutrition%20Facts/Nutrient%20Content.htm>
- Odstavec předpisu 77/2003. [Http://eagri.cz/](http://eagri.cz/) [online]. 2014 [cit. 2015-02-24]. Dostupné z: <http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/100112138.html>

- Panesar, P., S. 2011. Fermented dairy products: starter cultures and potential nutritional benefits. *Food and Nutrition Sciences*, 2, 47-51
- Patel, S., Majumder, A. and Goyal, A. 2012. Potentials of exopolysaccharides from lactic acid bacteria. *Indian journal of microbiology*, 52(1), 3-12.
- Polak-Berecka, M., Wasko, A., Kubik-Komar, A. 2014. Optimization of Culture Conditions for Exopolysaccharide Production by a Probiotic Strain of *Lactobacillus rhamnosus* E/N. *Polish Journal of Microbiology*, 63(2), 253-257
- Prasad, J.R., Sinha, P.R. and Sinha, R.N., 1989. Probiotics and lactobacillus fermented milk. *Indian Dairyman*, 41: 570-574.
- Remaud-Simeon, M., Willemot, R. M., Sarçabal, P., Potocki de Montalk, G. and Monsan, P. 2000. Glucansucrases: molecular engineering and oligosaccharide synthesis. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, 10(1), 117-128.
- Robitaille, G., Tremblay, A., Moineau, S., St-Gelais, D., Vadeboncoeur, C., & Britten, M. 2009. Fat-free yogurt made using a galactose-positive exopolysaccharide-producing recombinant strain of *Streptococcus thermophilus*. *Journal of dairy science*, 92(2), 477-482.
- Rodríguez, C., Medici, M., Rodríguez, A. V., Mozzi, F., & Font de Valdez, G. 2009. Prevention of chronic gastritis by fermented milks made with exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains. *Journal of dairy science*, 92(6), 2423-2434.
- Roller, S. and Dea, I. C. M. 1992. Biotechnology in the production and modification of biopolymers for foods. *Critical reviews in biotechnology*, 12(3), 261-277.
- Rosypal, S. 1981. *Obecná bakteriologie*. 1. Vydání. Státní pedagogické nakladatelství. Praha. 749 s.
- Sebastiani, H. and Zelger, G. 1998. Texture formation by thermophilic lactic acid bacteria. *Milchweissenschaft*, 53(1), 15-20.
- Schellhaass, S.M. and Morris, H. 1985. Rheological and scanning electron microscopic examinations of skim milk gels obtained by fermenting with ropy and non-ropy strains of lactic acid bacteria. *Food Microstructure*, 4(2), 279-287.



- Stiles, M. E. and Holzappel, W. H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International journal of food microbiology*, 36(1), 1-29.
- Sutherland, I. W. 2001. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 663-674.
- Šilhánková, L. 2002. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. upravené vydání. Academia. Praha. 363 s. ISBN: 80-200-1024-6.
- Tamime, A. Y. and Robinson, R. K. 1999. *Yoghurt Science and Technology*. 2nd edition. Woodhead Publishing Ltd. Cambridge. 619 p. ISBN: 9781855733992.
- Tuinier, R., Ten Grotenhuis, E., Holt, C., Timmins, P. A. and De Kruif, C. G. 1999. Depletion interaction of casein micelles and an exocellular polysaccharide. *Physical Review E*, 60(1), 848.
- Tuinier, R., Van Casteren, W. H. M., Looijesteijn, P. J., Schols, H. A., Voragen, A. G. J. and Zoon, P. 2001. Effects of structural modifications on some physical characteristics of exopolysaccharides from *Lactococcus lactis*. *Biopolymers*, 59(3), 160-166.
- Van Den Berg, D. J. C. G., Robijn, G. W., Janssen, A. C., Giuseppin, M., Vreeker, R., Kamerling, J. P., Vliegthart, J., Ledebøer, A. M. and Verrips, C. T. 1995. Production of a Novel Extracellular Polysaccharide by *Lactobacillus sake* 0-1 and Characterization of the Polysaccharide. *Applied and environmental microbiology*, 61(8), 2840-2844.
- Vaningelgem, F., Meulen, R. V. D., Zamfir, M., Adriany, T., Laws, A. P., and Vuyst, L. D. 2004. *Streptococcus thermophilus* ST 111 produces a stable high-molecular-mass exopolysaccharide in milk-based medium. *International dairy journal*, 14(10), 857-864.
- Veselá, M., Drdák, M. 1999. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 2. přepracované vydání. Vysoké učení technické. Brno. 88 s. ISBN: 80-214-1305-0.
- Vodrážka, Z. 2002. *Biochemie*. 2. opravené vydání. Academia. Praha. 191 s. ISBN: 80-200-0600-1.

- Vuyst, D. and de Ven, V. 1998. Production by and isolation of exopolysaccharides from *Streptococcus thermophilus* grown in a milk medium and evidence for their growth-associated biosynthesis. *Journal of Applied Microbiology*, 84(6), 1059-1068.
- Vuyst, L. and Degeest, B. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 23(2), 153-177.
- Walstra, P., Wouters, J.T.M., Geurts, T.J. 2006. *Dairy science and technology*. 2nd edition. CRC Press; Taylor & Francis Group. London. 782 p. ISBN: 0824727630.
- Wood, B. J. B., Holzapfel, W. H. N. 1995. *The genera of lactic acid bacteria*. Blackie Academic and Professional, Glasgow, United Kingdom. 398 p. ISBN: 978-1461376668.
- Wood, B. J. B., Warner, P. J. 2003. *Genetics of lactic acid bacteria*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, USA. 394 p. ISBN 0-306-47290-2
- Yang, T., Wu, K., Wang, F., Liang, X., Liu, Q., Li, G., & Li, Q. 2014. Effect of exopolysaccharides from lactic acid bacteria on the texture and microstructure of buffalo yoghurt. *International Dairy Journal*, 34(2), 252-256.
- Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů

## **6. Seznam použitých zkratk**

BMK – bakterie mléčného kvašení

EPS – exopolysacharidy

EPS<sup>-</sup> - kmen neprodukující exopolysacharidy

EPS<sup>+</sup> - kmen produkující exopolysacharidy

GRAS – všeobecně považovaný za bezpečný (Generally Recognized as Safe)

MK – mléčná kultura

RIL – rezidua inhibičních látek