



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

KLASICKÝ VS. TRADIČNÍ BULHARSKÝ JOGURT – CHEMICKÁ, MIKROBIOLOGICKÁ A SENZORICKÁ CHARAKTERIZACE

CLASSIC VS. TRADITIONAL BULGARIAN YOGURT - CHEMICAL, MICROBIOLOGICAL AND SENSORY
CHARACTERIZATION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Zahraa Jasimová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1780/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Zahraa Jasimová**
Studijní program: Chemie přírodních látek
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Klasický vs. tradiční bulharský jogurt – chemická, mikrobiologická a senzorická charakterizace

Zadání diplomové práce:

- Zpracujte literární přehled dané problematiky:
 - jogurt – charakteristika, technologie výroby, senzorická kvalita, těkavé (aromatické) látky, mikrobiální profil, nutriční význam
 - možnosti stanovení těkavých látek v jogurtu – princip, provedení, přehled aplikací
 - možnosti senzorického hodnocení jogurtu – přehled aplikací
 - možnosti identifikace mikrobiálních kultur (molekulárně biologické a mikrobiologické metody)
 - princip, provedení, přehled aplikací na jogurty
- Optimalizujte a standardizujte postup výroby jogurtu
- Pomocí vybraných metod posuďte profil těkavých látek, mikrobiální profil a celkovou senzorickou kvalitu vyrobených vzorků
- Porovnejte kvalitu klasického vs. bulharského jogurtu, diskutujte rozdíly mezi vzorky

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Zahraa Jasimová
studentka

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá výrobou a charakterizací jogurtu. Celkem byly vyrobeny tři typy jogurtů: „klasický“ bílý jogurt, bulharský jogurt vyrobený z komerční kultury a tradiční bulharský jogurt získaný přeočkováním jogurtu přivezeného z Bulharska. Výrobky byly charakterizovány z hlediska sensorické kvality, profilu těkavých látek (HS-SPME-GC-MS) a mikrobiálního profilu (qPCR). Cílem bylo zjistit, zda a jak se uvedené vzorky liší z hlediska uvedených parametrů.

V teoretické části je charakterizován bulharský jogurt a jeho způsob technologie výroby. Dále je zmíněna sensorická kvalita, možnosti sensorického hodnocení jogurtů, stanovení přítomnosti těkavých látek a způsob jejich stanovení. V poslední kapitole teoretické části je charakterizován mikrobiální profil, možnosti identifikace mikrobiálních kultur, a nakonec je popsán nutriční význam jogurtů.

V experimentální části byl nejprve optimalizován proces výroby vzorků bulharských jogurtů, tyto byly následně porovnány s „klasickým“ bílým jogurtem.

Pro sensorické hodnocení byly použity grafické stupnice pro hodnocení vzhledu, barvy, konzistence, vůně a chuti, dále profilový test (sladká, kyselá, hořká, kvasinková a příp. jiná chuť) a pořadový test. Z výsledků vyplývá, že bulharské jogurty byly hodnoceny sensoricky hůře než klasický jogurt, především kvůli kyselejší chuti.

Vzorky bulharských jogurtů také vykazovaly kvasinkovou chuť, přítomnost kvasinek byla potvrzena pomocí metody qPCR.

Pomocí metody HS-SPME-GC-MS byl stanoven profil těkavých (aromatických) látek ve vzorcích. Ve všech vzorcích jogurtů bylo identifikováno celkem 24 těkavých látek, z toho 6 alkoholů, 2 estery, 6 kyselin, 7 karbonylových sloučenin a 3 sirné sloučeniny. Profil a obsah sloučenin se v bulharských jogurtech a jogurtu klasickém lišily; nejvyšší obsah těkavých látek byl v bulharském tradičním jogurtu, nejnižší v jogurtu klasickém. Pro bulharské jogurty je typické vysoké zastoupení esterů.

KLÍČOVÁ SLOVA

jogurt, aromatické látky, sensorická analýza, SPME, GC-MS, PCR

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the production and characterization of yogurt. In total, three types of yogurt were produced: "classic" white yogurt, Bulgarian yogurt made from commercial culture, and traditional Bulgarian yogurt obtained by inoculation of yogurt brought from Bulgaria. The products were characterized in terms of sensory quality, volatile profile (HS-SPME-GC-MS), and microbial profile (qPCR). The aim was to find out whether and how the mentioned samples differ in terms of the mentioned parameters.

In the theoretical part, Bulgarian yogurt and its method of production technology are characterized. Sensory quality, the possibilities of sensory evaluation of yogurts, the determination of the presence of volatile substances, and the method of their determination are also mentioned. In the last chapter of the theoretical part, the microbial profile is characterized, the possibilities of identifying microbial cultures, and finally the nutritional value of yogurts is described.

In the experimental part, the production process of Bulgarian yogurt samples was first optimized, and these were subsequently compared with "classic" white yogurt. For sensory evaluation, graphic scales were used to evaluate appearance, color, consistency, aroma, and taste, as well as a profile test (sweet, sour, bitter, yeasty, and possibly other tastes) and an ordinal test. The results show that the Bulgarian yogurts were assessed sensorially worse than the classic yogurt, mainly because of the sour taste. Samples of Bulgarian yogurts also showed a yeasty taste, the presence of yeast was confirmed using the qPCR method.

The profile of volatile (aromatic) substances in the samples was determined using the HS-SPME-GC-MS method. A total of 24 volatile substances were identified in all yogurt samples, of which 6 alcohols, 2 esters, 6 acids, 7 carbonyl compounds, 3 and sulfur compounds.

KEYWORDS

yogurt, aroma compounds, sensory analysis, SPME, GC-MS, PCR

JASIMOVÁ, Zahraa. *Klasický vs. tradiční bulharský jogurt – chemická, mikrobiologická a senzorická charakterizace*. Brno, 2023. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/148892>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Eva Vítová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce paní doc. Evě Vítové, Ph.D. za ochotu, čas, trpělivost a za odborné připomínky v průběhu zpracování práce. Dále bych chtěla poděkovat paní Ph.D. Štěpánce Trachtové a ing. Matěji Rychetskému. A v neposlední řadě všem hodnotitelům.

OBSAH

Úvod.....	8
1 Teoretická část	9
1.1 Jogurt.....	9
1.1.1 Výroba jogurtu	9
1.1.2 Chemický a fyzikální rozbor jogurtů	10
1.2 Nutriční význam jogurtů	11
1.3 Bulharský jogurt.....	13
1.4 Senzorické hodnocení jogurtů.....	14
1.4.1 Senzorická analýza.....	14
1.4.2 Senzorické vlastnosti jogurtů	14
1.4.3 Vady jogurtu a jejich příčiny	15
1.5 Těkavé aromatické látky a jejich stanovení v jogurtech	15
1.5.1 Biochemické procesy v jogurtech	15
1.5.2 Možné metody stanovení těkavých látek	19
1.6 Mikrobiologický rozbor jogurtů	21
1.6.1 Stanovení celkového počtu mikroorganismů	21
1.6.2 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase	22
1.6.3 16S rRNA-targeted DNA sequencing.....	23
2 Experimentální část.....	24
2.1 Analyzované vzorky	24
2.1.1 Příprava jogurtových kultur	24
2.1.2 Postup výroby klasického jogurtu.....	24
2.1.3 Postup výroby bulharského jogurtu	24
2.1.4 Postup výroby „tradičního“ bulharského jogurtu	24
2.2 Stanovení titrační kyselosti	25
2.3 Stanovení těkavých látek	26
2.3.1 Laboratorní vybavení, pracovní pomůcky a přístroje	26
2.3.2 Použité plyny	26
2.3.3 Příprava vzorků	26
2.3.4 Podmínky HS-SPME-GC-MS analýzy	26

2.3.5	Identifikace a výpočet obsah těkavých (aromatických) látek	26
2.4	Polymerázová řetězová reakce.....	27
2.4.1	Laboratorní vybavení, pracovní pomůcky a přístroje.....	27
2.4.2	Komponenty PCR.....	27
2.4.3	Příprava hrubého lyzátu	27
2.4.4	Izolace DNA ze vzorků (fenolová extrakce)	28
2.4.5	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA	29
2.4.6	qPCR měření.....	29
2.5	Senzorická analýza jogurtů.....	31
2.6	Statistické zpracování výsledků.....	32
3	Výsledky a diskuze	33
3.1	Optimalizace výroby bulharského jogurtu.....	33
3.2	Těkavé (aromatické) látky ve vzorcích jogurtů	37
3.3	Výsledky sensorického hodnocení jogurtů.....	40
3.3.1	Výsledky hodnocení sensorických vlastností pomocí grafických stupnic	40
3.3.2	Výsledky profilového testu vybraných chutí	42
3.3.3	Porovnání sensorických vlastností jednotlivých typů jogurtů.....	45
3.3.4	Výsledky pořadového testu.....	46
3.4	Výsledky polymerázové řetězové reakce v reálném čase.....	48
4	Závěr	53
5	Seznam použitých zkratk	54
6	Seznam použitých zdrojů.....	55
7	Přílohy.....	58

ÚVOD

Jogurty jsou nejoblíbenější a nejrozšířenější fermentované mléčné výrobky na světě. Obecně lze říci, že jsou pro člověka výživnými potravinami, protože obsahují několik základních živin, včetně energie. Jejich konzumací se do těla dostávají látky, které pozitivně ovlivňují složení střevní mikroflóry a zlepšují tak trávení. Tento jev je velmi důležitý například při narušení rovnováhy trávicího systému (např. antibiotika). Dnes se trh s mlékem orientuje podle přání zákazníků a snaží se uspokojit jejich potřeby. To je jeden z hlavních důvodů, proč je na trhu široká škála jogurtů, od bílých ochucených přes jogurty bez tuku, bez laktózy až po jogurty pro nové skupiny spotřebitelů, jako jsou jogurty „speciálně pro muže“ nebo pro seniory. Všechny inovativní trendy v jogurtech musí splňovat požadavky zákazníků z hlediska konzistence, textury, chuti, viskozity, kyselosti, popř. sladkosti atd.

Oproti klasickému jogurtu má bulharský jogurt výraznou a kyselejší chuť, díky přítomnosti živých bakterií, především bakterie *Lactobacillus Bulgaricus*, která byla objevena v Bulharsku již na začátku 20. století.

Tato diplomová práce se zabývá výrobou bulharského jogurtu a jeho porovnáním s klasickým jogurtem v oblasti kvality z pohledu chemické, mikrobiální a senzorické. Cílem bylo zjistit, zda a příp. jak se tyto v zásadě stejné produkty od sebe liší.

1 TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část se zabývá základními pojmy souvisejícími s řešenou problematikou – jogurt, technologie jeho výroby, chemické složení a senzorické vlastnosti.

1.1 Jogurt

Podle Vyhlášky Ministerstva zemědělství č. 274/2019 Sb. je jogurt ... „kysaný mléčný výrobek získaný kysáním mléka, smetany, podmáslí, nebo jejich směsí pomocí MO, které tvoří protosymbiotickou směs *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.“

Jogurt je tradiční fermentovaný mléčný produkt pocházející z balkánské oblasti. Již v roce 1905 bulharský lékař Stamen Grigorov zjistil, že mikroorganismus *Lactobacillus bulgaricus* je příčinou přeměny mléka na jogurt. Později se zjistilo, že na této změně se podílí i *Streptococcus thermophilus* [1, 2].

Jogurtová kultura se skládá z primárních mikroorganismů (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*) a příp. ze sekundárních mikroorganismů (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium longum*, *bifidum*, *infantis*), ale musí být zachován poměr primárních tyčinek a koků 1:1 až 1:2, významná převaha jednoho z nich by změnila vlastnosti výrobku. Fermentace probíhá standardně při teplotě 43–45 °C, po dobu 2,5–12 h. Zásadní funkcí těchto kultur je okyselení, chuť a textura [3].

Základní dělení jogurtů:

- přírodní (bez přísad, neochucené)
- ochucené (s přísadami) – s přidavkem ovoce, zeleniny, koření, cereálií, kakaa, kávy, čokolády aj. Pro ochucené jogurty jsou povolena aditiva jako potravinářská barviva, sladidla, aroma, stabilizátory, zahušřovadla (škrob a želatina).

Trvanlivost výrobků se pohybuje většinou od 4 do 5 týdnů za předpokladu dodržení chladírenského řetězce [4].

1.1.1 Výroba jogurtu

Princip výroby jogurtu je jednoduchý – mléko je zaočkováno jogurtovou kulturou, která přemění část laktózy na kyselinu mléčnou. Další metabolity vznikající v průběhu fermentace dodávají výrobkům specifickou chuť a vůni.

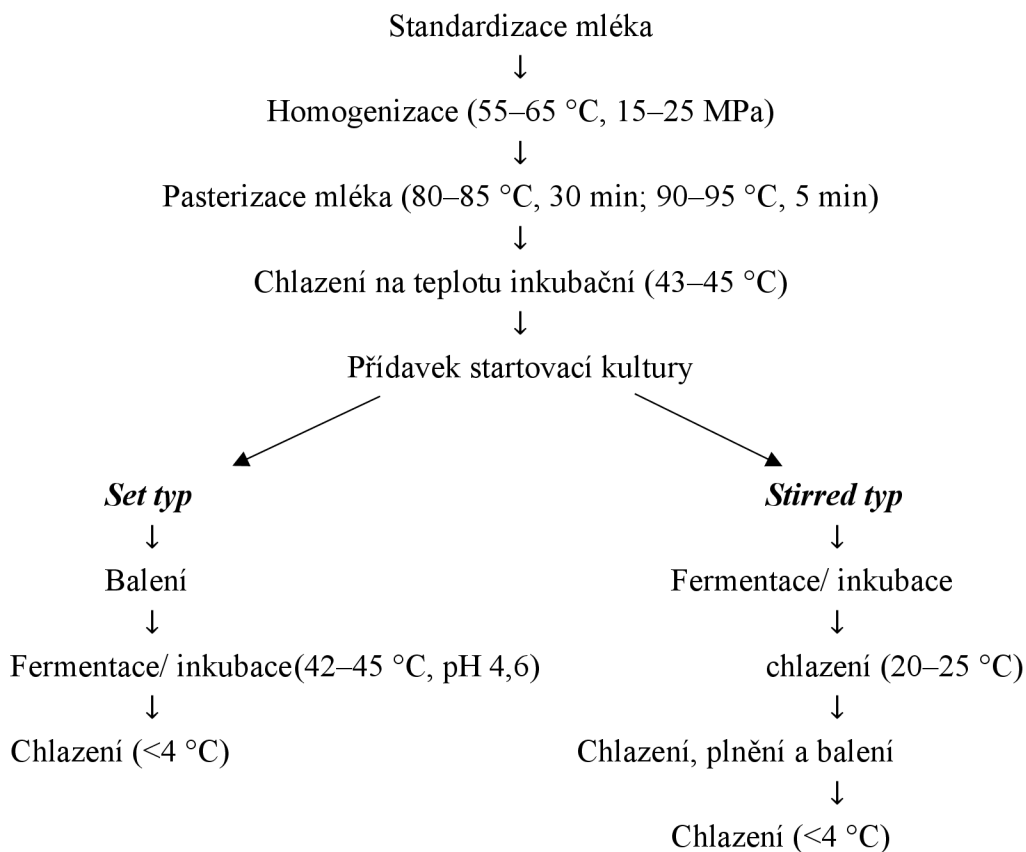
Způsob fermentace jogurtu zůstává stejný jako před stovkami let. Při výrobě tradičního jogurtu se syrové mléko převarí, dokud nedosáhne téměř poloviny svého objemu. Převařené mléko se ochladí na teplotu 45–50 °C, zaočkuje přidavkem jogurtu a nechá se fermentovat, dokud nedosáhne požadovaného pH (4,5). Hotový vychladlý jogurt se nalije do čistých lahví a uchovává se v lednici [2, 5].

V dnešní době se používají dva technologické postupy výroby jogurtů. Oba typy musí splňovat kritérium pro označení jogurt a to nejméně 10⁶ živých buněk bakterií mléčného kvašení v 1 g [2]. Jedná se o:

- **Set typ jogurt** (nerozmíchaný koagulát) se vyrábí plněním zaočkovaného mléka do spotřebitelských obalů před fermentací a vyznačuje se pevnou, porcelánovitou až lomivou konzistencí. Fermentace je obvykle 3-4 hod při 42-45 °C.
- **Stirred typ** (rozmíchaný koagulát) se nechá fermentovat v nádrži a finální koagulát se vychladí a před plněním rozbije mícháním. Struktura bývá méně pevná (krémovitá konzistence). Fermentace je obvykle po dobu 16-18 hod při 30 °C [4].

Přehled postupu výroby obou typů jogurtu je uveden na obrázku č. 1. Mohou se vyrábět buď s přidáním nebo bez přidání některých dalších přírodních derivátů mléka, jako jsou syrovátkové koncentráty, sušené odstředěné mléko, kaseináty nebo smetana, [2, 6].

Jogurt se vyrábí v různých formách, a to podle textury (tekutý, ztuhlý a míchaný jogurt), obsahu tuku (tučný, polotučný, nízkotučný) a příchutí (přírodní, ovocný, cereální, čokoládový) [6].



Obrázek č. 1: Moderní technologický proces výroby jogurtu [6, 7]

1.1.2 Chemický a fyzikální rozbor jogurtů

- Stanovení sušiny jogurtu se provádí pomocí vážkové rozhodčí metody a vyjadřuje sušinu jogurtu jako podíl zbývající po vysušení (teplota 102 ± 2 °C). Je vyjádřena v gramech na 100 g výrobku. Další metodou stanovení sušiny je pomocí analytických vah s infračervenou sušičkou. Navážka vzorku jogurtu je vysušena při teplotě 110 °C po dobu 5 minut [8].
- Stanovení tuku v jogurtu se provádí acidobutyrometrickou metodou.

Tabulka č. 1: Fyzikálně–chemické požadavky různých typů jogurtů [1].

druh jogurtu	obsah tuku v hm. %	obsah sušiny v hm. %
bílý	nejméně 3,0	neméně 8,2
smetanový	nejméně 10	nejméně 7,0
nízkotučný/odtučněný	<0,5	neméně 8,2
se sníženým obsahem tuku	<3,0	neméně 8,2

Stanovení aktivní kyselosti se provádí pH metrem. Stanovení titrační kyselosti se provádí Soxhlet Henkelovou metodou (viz kapitola 3.2.1). Stanovení biacetylu (aromatických/těkavých látek) kreatinovou zkouškou. Kreatin dává v alkoholickém prostředí s diacetylem růžové zbarvení [8].

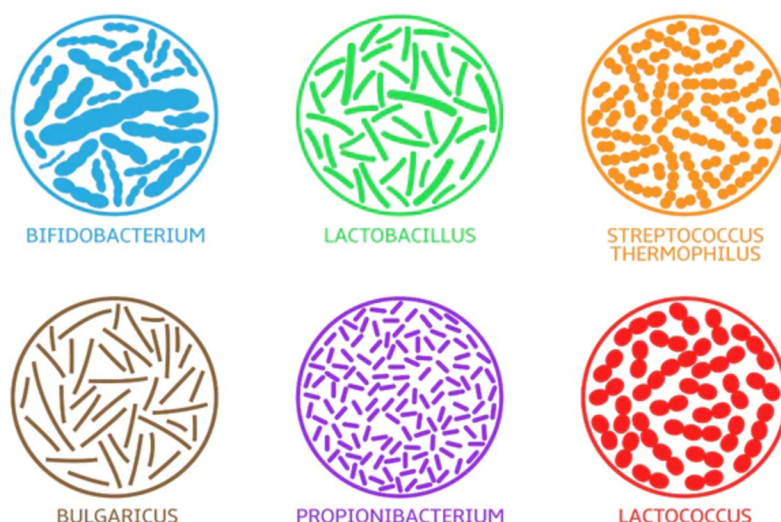
1.2 Nutriční význam jogurtů

Stěžejním procesem při fermentaci je rozklad laktózy za vzniku kyseliny mléčné. V důsledku snížení pH je kasein vysrážený ve formě jemných vloček lépe přístupný enzymům v trávicím traktu a lépe stravitelný, než je tomu u mléka. Vzniklá kyselina mléčná však vykazuje řadu dalších pozitivních účinků, proto je konzumace tradičních jogurtů po staletí spojována s pozitivním vlivem na lidské zdraví [9].

Jedním z pozitivních vlivů je ochrana proti gastrointestinálním infekcím (*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus acidophilus* a *Bifidobacterium bifidum*), které způsobují bioaktivní peptidy, jako jsou bakteriociny a ty jsou spojeny s antimikrobiální aktivitou proti gastrointestinálním patogenům, jako jsou klostridie, *Enterobacteriaceae*, pseudomonády a *Helicobacter pylori*. Jiné peptidy produkované *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* mohou vyrovnat krevní tlak inhibicí enzymu konvertujícího angiotenzin (ACE) [9–11].

Bakterie mléčného kvašení mohou chránit před průjmem vyvolaným antibiotiky u pacientů užívajících antibiotika schopná zničit přirozené antagonisty choroboplodných organismů. Mají schopnost snižovat pH střev, což podporuje růst bakterií mléčného kvašení, a jejich schopnost produkovat kyseliny, jako kyselina mléčná, octová, mravenčí a propionová, které vytvářejí nepříznivé prostředí pro množení patogenních bakterií. Přináší například úlevu od zácpy (příznivé účinky, především u starších jedinců) [11].

Pravidelná konzumace jogurtových bakterií mléčného kvašení (BMK) a jejich metabolitů má také protirakovinné, antioxidační a imunomodulační účinky a snižuje hladinu cholesterolu v krvi. Jogurt dokáže regulovat mikrobiom, který podporuje střevní bariéru a zlepšuje imunitní odpověď [9].



Obrázek č. 2. : Mikroorganismy zvané jako „probiotika“ [12]

Jogurt přirozeně obsahuje laktózu, dále tuky, bílkoviny, minerální látky a vitaminy. Oproti mléku obsahuje jogurt vyšší obsah bílkovin a vitamínu B2, B6, B12, dále vápníku, hořčíku, draslíku a zinku. Nutriční hodnota jogurtu závisí na typu mléka (ovčí, kravské atd.) a na obsahu tuku mléka (nízkotučné, polotučné a plnotučné). Nutriční kompozice různých druhů jogurtů jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2: Nutriční složení různých druhů jogurtů, hodnoty se udávají ve 100 g výrobku [13]

komponenta	plnotučný jogurt	nízkotučný jogurt	odtučněný jogurt	řecký jogurt
energie (kcal)	79	57	54	133
protein (g)	5,7	4,8	5,4	5,7
sacharidy (g)	7,8	7,8	8,2	4,8
z toho cukry (g)	7,8	7,5	7,9	4,5
tuk (g)	3	1	0,2	10,2
thiamin (mg)	0,06	0,12	0,12	0,12
riboflavin (mg)	0,27	0,22	0,22	0,13
niacin (mg)	0,2	0,1	0,1	0,1
vitamin B12 (ug)	0,2	0,3	0,3	0
folát (ug)	18	18	18	6
sodík (mg)	80	63	71	66
draslík (mg)	280	228	247	184
vápník (mg)	200	162	160	126
hořčík (mg)	19	16	16	13
fosfor (mg)	170	143	151	138
železo (mg)	0,7	0,08	0,13	0,11
chlorid (mg)	170	235	252	159
jodid (ug)	63	34	53	39

1.3 Bulharský jogurt

Bulharský jogurt, známý také jako jogurt balkánského typu, je považován za nejzdravější ze všech jogurtů. Jeho historie sahá až k Thrákům, dávným obyvatelům bulharských zemí, kdy si chovatelé ukládali ovčí mléko do sáčků z jehněčí kůže kolem pasu a fermentovali jogurt pomocí vlastního tělesného tepla. Slovo „jogurt“ je odvozeno ze slov pro „hustý“ a „mléko“ ve starověké thráctině [14].

Bulharský jogurt se obvykle připravuje z kravského mléka, ale může být vyráběn také z buvolího, kozího nebo ovčího mléka. Obsahovat by měl alespoň 10^7 životaschopných buněk tvořících kolonie (CFU) na 1 gram výrobku [1].

Při výrobě tradičního jogurtu se syrové mléko převarí, dokud nedosáhne téměř poloviny svého objemu. Převařené mléko se ochladí na teplotu 45–50 °C. Poté se syrové mléko naočkuje startovací kulturou (0,5 až 2 %) skládající se z *L. bulgaricus* a *S. thermophilus* v poměru 1:2 až 1:5 [2, 5].

Naočkované teplé mléko se rozlévá do sterilních nádob nebo obalů, obvykle od 150 g do 1 kg a ihned po naplnění se uzavírají a inkubují na teplém místě nebo v tepelné komoře při 42–45 °C po dobu 2,5–4,0 hodiny. BMK se rychle množí a dosahují 10^7 – 10^8 CFU/g (*L. bulgaricus*) a 10^8 – 10^9 CFU/g (*S. thermophilus*). BMK fermentují laktózu na kyselinu mléčnou, která váže ionty vápníku (Ca^{2+}) z kaseinu v mléce, čímž dochází k jeho koagulaci. Pro výrobu kvalitního jogurtu by měla být teplota při kvašení stabilní. Konečný produkt se chladí na 6–12 °C a může být skladován až 21 dní [1, 2, 5]. Fyzikálně-chemické vlastnosti bulharského jogurtu jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Fyzikálně-chemické vlastnosti bulharského jogurtu [1].

vlastnosti	druh mléka			
	kravské	ovčí	buvolí	kozí
	obsah sušiny (%)			
plnotučný	11,8	16,5	16,0	11,0
nízkotučný	10,3	-	-	-
proteinový	3,2	5,2	4,2	3,0
	obsah tuku (%)			
plnotučný	3,6	6,5	7,0	3,0
nízkotučný	2,0	-	-	-
celková kyselost (°T)	90,0-150,0			
skladovací teplota (°C)	2,0-6,0			

Bulharský jogurt má bílou, někdy lehce nažloutlou barvu. Konzistence výrobku je hustá a hladká. Při použití syrového buvolího nebo ovčího mléka může být konzistence buď homogenní a krémová, nebo granulovaná. Chuť a vůně je specifická, příjemně nakyslá a závisí na druhu mléka [1].

1.4 Senzorické hodnocení jogurtů

Senzorická analýza patří mezi nejstarší způsob hodnocení potravin a může poskytnout obraz o kvalitě potraviny. Výsledky však může ovlivnit řada faktorů, které je nutné při hodnocení eliminovat nebo minimalizovat. Patří mezi ně objektivní faktory, jako jsou optimální podmínky při hodnocení (místnost, osvětlení, pokojová teplota, příprava vzorku, čistota vzduchu atd.) a volba správných metod přípravy. Méně důležité jsou subjektivní faktory, jako je stav hodnotitele, který se projevuje únavou, nedostatečnou schopností koncentrace při hodnocení a neschopností správně hodnotit z důvodu nemoci. Obecně platí, že ve smyslových studiích se nejprve hodnotí příjemnost (hédonické hodnocení) a teprve poté intenzita (hodnocení intenzity). Hodnotitel nejprve hodnotí vjem jako celek a teprve poté si všímá detailů, tzn. posuzuje povahu vnímání [15].

V dnešní době spotřebitelé neustále požadují vysoce kvalitní výrobky se zdravými a sensorickými vlastnostmi. Mezi požadované sensorické vlastnosti patří vzhled, barva, textura, chuť a vůně výrobku. Tyto vlastnosti si navíc musí zachovat stabilitu po dobu skladovatelnosti produktu [16].

1.4.1 Senzorická analýza

Pořadová zkouška (ČSN ISO 8587)

Pořadový test se provádí, pokud existují rozdíly mezi 2 a více druhů vzorků. Hodnotitel obdrží řadu vzorků v náhodném pořadí a jeho úkolem je seřadit je podle intenzity určeného znaku. Hodnotitel by měl ochutnávat vzorky odleva doprava, nejčastěji od nejméně intenzivního vzorku. Pokud hodnotitel si není jistý, může ochutnávat i několikrát. Vyhodnocení výsledků probíhá tak, že pro každý jednotlivý vzorek si hodnotitel zapíše pořadí a vypočte se součet pořadí pro všechna hodnocení [17].

Profilový test

Tato metoda slouží ke stanovení rozdílu charakteru vjemu vzorku, často chutě a vůně. Hodnotitel posuzuje celkový vjem chuti nebo vůně a rozdělí na dílčí vjemy a jejich intenzity se vyjadřují s použitím buď bodové nebo grafické stupnice [17].

Grafické stupnice

Hodnocení pomocí grafických stupnic patří v současnosti mezi nejpoužívanější. Slouží ke stanovení velikosti rozdílu. Stupnice můžeme rozdělit na strukturované a nestrukturované. Strukturované bývají rozděleny na řadu úseků a jsou vhodné pro méně zkušené hodnotitele. Oproti tomu nejsou nestrukturované stupnice nějak dělené. To může způsobit větší rozptýl při hodnocení. Výsledky jsou zaznamenány na stupnicích nejčastěji příčnou čarou nebo křížkem. Vyhodnocení se provádí tak, že se změří vzdálenost od jednoho konce stupnice po vyznačený bod pomocí pravítka. Vzdálenost bývá v mm. Grafické stupnice lze používat také při hodnocení magnitudových nebo poměrových metod [18, 19]

1.4.2 Senzorické vlastnosti jogurtů

Jogurt je výrobek se specifickými sensorickými vlastnostmi, které jsou odlišné od jiných kysaných výrobků. Je popisován jako středně kyselý výrobek s hladkým, viskózním koagulátem a s delikátní oříškovou chutí.

Působením vzniklé kyseliny mléčné postupně dochází ke snížení pH až do izoelektrického bodu kaseinu (4,6 - 4,9 pH), což vede ke koagulaci kaseinu a vzniku charakteristické jemně gelovité konzistence.

Neochucené jogurty i celkově kysané mléčné výrobky musí při sensorickém hodnocení splňovat tyto požadavky:

- obal – čistý, nepoškozený, správně označený
- barva – bílá
- konzistence – hustá (záleží na typu jogurtu), stejnorodá
- chuť a vůně – mléčně nakyslá, bez cizích pachů a příchutí, chuť je charakteristická podle použití druhu mléčné kultury [8]

1.4.3 Vady jogurtu a jejich příčiny

Příčiny vad jsou velmi různorodé, jsou způsobeny nevhodným mlékem, neaktivní kulturou, nesprávnou technologií i nevhodnými přísadami (ovoce, barviva), či nesprávným skladováním finálních výrobků.

1. Příliš kyselý nebo nízká kyselost

Uchovávání při vyšších teplotách anebo pomalé zchlazení, nebo naopak příliš krátká doba zrání nebo příliš nízká zrací teplota.

2. Hořká chuť

Kontaminace proteolytickými bakteriemi, nedostatek prokysání, uchovávání při vyšších teplotách.

3. Přítomnost bublinek

Kontaminace cizími mikroorganismy.

4. Uvolňování syrovátky

Nížší obsah tuku nebo sušiny překysání, rozrušení koagulátu během zrání a chlazení.

5. Povlak na povrchu

Plísňová nebo kvasinková kontaminace [3].

1.5 Těkavé aromatické látky a jejich stanovení v jogurtech

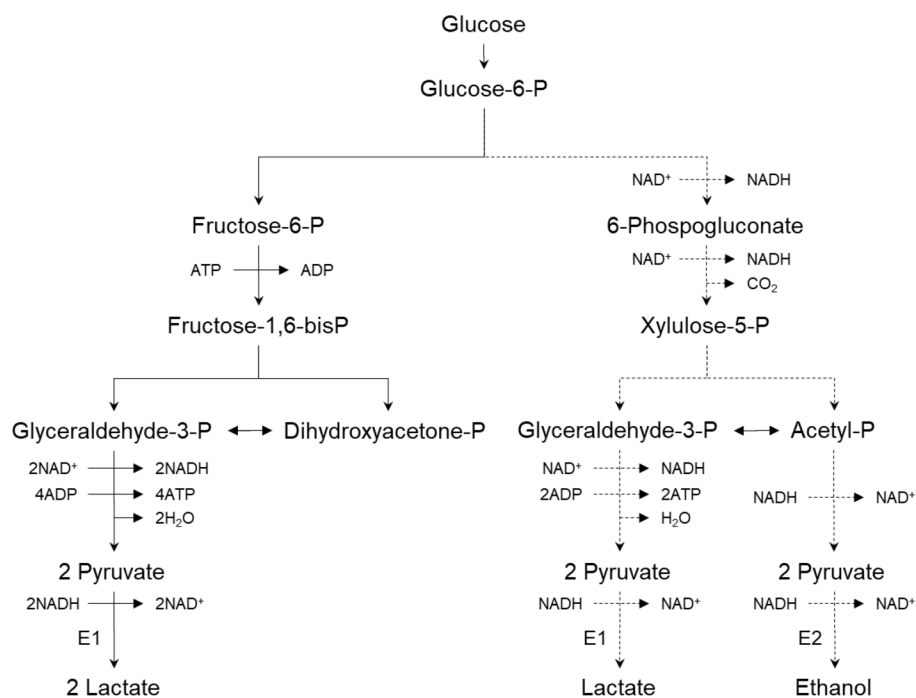
Senzorické vlastnosti mléčných výrobků závisí do značné míry na relativní rovnováze chutí odvozených z mléčného tuku, bílkovin nebo sacharidů. K charakteristické chuti jogurtu přispívá kyselina mléčná a komplexní směs aromatických látek, které vznikají kvašením mléka.

Během skladování se mohou těkavé složky jogurtu měnit v závislosti na kultuře, složení směsi a podmínkách skladování.

Různé mikrobiální, enzymatické nebo chemické reakce probíhající v jogurtu během skladování mohou změnit jeho fyzikální, chemickou a mikrobiologickou strukturu, což může vést ke zkažení nebo znehodnocení. Tvorba těkavých vedlejších produktů způsobuje pachů a činí produkt neuspokojivým pro chuť spotřebitelů. Tvorba těkavých sloučenin může často určovat trvanlivost jogurtu [20].

1.5.1 Biochemické procesy v jogurtech

Jogurty vykazují typické a výrazné aromatické, sensorické, texturní vlastnosti v důsledku procesu mikrobiální fermentace, kde dochází k produkci metabolitů. Dráha začíná glykolýzou. (obrázek č. 3) [21, 22].



Obrázek č.3: Metabolická dráha homofermentativní (plná čára) a heterofermentativní (tečkovaná čára) fermentace bakteriemi mléčného kvašení [23]

Hlavním úkolem při výrobě jogurtu za použití homofermentativních bakterií *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus bulgaricus* je okyselení mléka, a to produkcí velkého množství kyseliny mléčné z laktózy. Kyselina mléčná snižuje pH mléka a vede k postupnému rozpouštění micelárního fosforečnanu vápenatého, která způsobuje demineralizaci a destabilizaci kaseinových micel, což vede k vysrážení kaseinu v rozmezí pH 4,6-4. Kyselina mléčná navíc dává jogurtu typickou příjemně kyselou chuť [24].

Jedním z hlavních procesů pro produkci aromatických látek v jogurtu je lipolýza a následná oxidace mastných kyselin v mléčném tuku. Nenasycené mastné kyseliny jsou oxidovány v přítomnosti volných radikálů za vzniku hydroxidů, které rychle degradují na hexanal nebo nenasycené aldehydy. Další důležitou cestou je mikrobiologická přeměna laktózy a citrátu produkovaných bakteriemi (*laktokoky* a *laktobacily*) za vzniku aromatických sloučenin, jako je kyselina mléčná, acetaldehyd, diacetyl, acetoin a ethanol. Alkoholy v jogurtu pak mohou reagovat s volnými kyselinami za vzniku esterů, jako je ethylacetát a butylacetát. Přehled těkavých (aromatických) látek identifikovaných v jogurtu je uveden v tabulce č. 4. Přehled těkavých látek a jejich chuťové deskriptory je uveden v tabulce č. 5 [20].

Tabulka č. 4: Ukázka těkavých látek identifikovaných v jogurtech [20]

Alkoholy	kyseliny	karbonylové sloučeniny	terpeny
ethanol	kyselina benzoová	aceton	L-limonen
1-heptanol	kyselina máselná	acetoin	aromatické sloučeniny
1-pentanol	kyselina dekanová	acetaldehyd	benzen
1-okten-3-ol	kyselina heptanová	benzaldehyd	ethylenbenzen
oktan-2-ol	kyselina hexanová	butanal	propylbenzen
okt-1-en-3-ol	kyselina isobutyrová	pentanal	trimethylbenzen
guaiakol	kyselina isovalerová	3-penten-2-on	1,2-dimethylbenzen
methanol	kyselina 2-methylpropanová	propanal	1,3-dimethylbenzen
1-propanol	kyselina nonanová	2-propanon	1,4-dimethylbenzen
2-propanol	kyselina octová	2-butanon	1-methylethenylbenzen
1-butanol	kyselina oktanová	diacetyl	1-ethyl-4-methylbenzen
2-butanol	kyselina pentanová	3-methyl-2-butenal	toulen
2-methyl-1-propanol	kyselina propionová	2-pentanon	
cyklobutanol	dušikaté sloučeniny	2-methylbutanal	
3-pentanol	laktamid	3-methylbutanal	
1-penten-3-ol	N-ethyl-benzenamin	2,3-pentandion	
3-methyl-2-butenol	N,N-dimethylformamid	hexanal	
3-methylbutanol	uhlovodíky	2-hexanon	
pentan-2-on-4-ol	heptan	3-hexanon	
3-methyl	methylcyklohexan	2-heptanon	
3-cyclohexenol	nonan	3-heptanon	
2-ethylhexanol	undekan	2-hydroxy-3-pentanon	

Tabulka č.4: Ukázka těkavých látek identifikovaných v jogurtech–pokračování [21]

Alkoholy	Heterocyklické sloučeniny	Karboonylové sloučeniny
2-butylloktanol	benzothiazol	heptanal
estery	furan	nonanal
butylacetát	2-furanmethanol	2-nonanon
ethylacetát	furfural	2-pentanon
ethylbutanoát	furfuralkohol	heptanon
ethylhexanoát	methylpyrazin	oktanal
ethylloktanoát	2-pentylfuran	3-oktanon
methyl acetát	2-methylfuran	1-okten-3-on
methyl formát	pyrazin	2-nonanon
sírné sloučeniny	pyrrol	2-undekanon
dimethylsulfid	1-methylpyrrol	γ -dodekalakton
dimethyldisulfid	2-methyltetrahydrofuran-3-on	δ -dodekalakton
dimethyltrisulfid	2-methylthiofen	2-fenylacetaldehyd
methional	2-methyltetrahydrothiofen-3-on	1-nonen-3-on
S-methylthioacetát	methyl 2-piperidin	(E)-2-nonenal
	1,2-dihydro-2,2,4-trimethylquinolin	dekanal
	2,3-dihydro-1,3,3-trimethyl 1H-Indol	undekanal
		2-dodekanon
		2-pentadekanon

Tabulka č. 5: Ukázka těkavých látek a jejich deskriptory [20]

sloučenina	deskriptor
alkoholy	
ethanol	jemný, éterický
1-pentanol	alkoholový, podobný jodoformu
2-heptanol	zemitý, mastný
1-okten-3-ol	houbový
oktan-2-ol	zelený
okt-1-en-3-ol	houbový
guaiakol	slaninový, fenolový, uzený, pikantní
estery	
ethylacetát	rozpuštědlový, ovocný, ananasový
ethylbutanoát	ovocný, sladký, banánový
ethylhexanoát	ovocný, jablečný, banánový
ethylloktanoát	ovocný, banánový, jablečný
butylacetát	ananasový

Tabulka č. 5: Ukázka těkavých látek a jejich deskriptory – pokračování [20]

karbonylové sloučeniny	
acetaldehyd	éterický, svěží, zelený, štiplavý
aceton	sladký, ovocný
2-propanon	sladké, ovocný
2-butanon	lakový, sladký, ovocný
diacetyl	máslový, krémový, vanilkový
acetoin	máslový
3-methyl-2-butenal	kovový, aldehydový, bylinný
2-pentanon	ovocný, acetonový
3-methylbutanal	zelený, sladový, nezralý, kakaový, sladový
2,3-pentanedion	máslový, vanilkový, jemný
hexanal	zelený, posečená tráva
2-hexanon	květinový, ovocný
heptanal	zelený, sladký
nonanal	sladký, květinový, citrusový, podobné trávě
2-nonanon	ovocný, zatuchlý
2-pentanon	sladký, ovocný, sýrový
heptanon	ovocný, kořeněný, skořicový
3-oktanon	houbový, ovocný
1-okten-3-on	houbový, zemitý, ovocný
nonanon	travně-bylinný, zeleno-ovocný, květinový
2-undekanon	květinový, růžový, bylinný
g-dodekalakton	čerstvé ovoce, broskvový, švestkový, kokosový, máslový
d-dodekalakton	broskvový, kokosový, máslový, pižmový
2-fenylacetaldehyd	květinový
kyseliny	
kyselina octová	octový, štiplavý, kyselý
kyselina propionová	octový, štiplavý, kyselé mléko
kyselina máselná	ostrý, sýrový, žluklý, zpocení, kyselý, hnilobný
kyselina isomáselná	sladký, jemný, shnilé jablko
Kyselina isovalerová	shnilé ovoce, mírný, zpocení, žluklý, fekální, hnilobný
sírné sloučeniny	
dimethylsulfid	intenzivní, laktonový, simatý, zeli
dimethyldisulfid	vařené zeli, květákový, česnekový
dimethyltrisulfid	simatý, fekální
methional	vařené zeli, vařený brambor, sírný
S-methylthioacetát	vařený květák

1.5.2 Možné metody stanovení těkavých látek

Relativně vysoká koncentrace lipidů, proteinů a sacharidů v mléčných výrobcích ztěžuje separaci těkavých (aromatických) látek na základě obecných charakteristik, jako je polarita nebo jejich těkavost. Bylo navrženo a v praxi je používáno několik instrumentálních metod (viz dále) [25].

1.5.2.1 Plynová chromatografie ve spojení s headspace (Headspace GC)

Plynová chromatografie (GC) je běžně používaná metoda v analytické chemii pro separaci a analýzu sloučenin, které jsou plynné nebo mohou být vypařovány bez rozkladu. Pro svou jednoduchost, citlivost a účinnost při separaci složek směsí je plynová chromatografie důležitým nástrojem v chemii. Je široce používána pro kvalitativní a kvantitativní analýzu směsí, pro čištění sloučenin a pro stanovení termochemických konstant (teplo, rozpouštění, odpařování a tlak par). Sloučeniny se oddělují kvůli rozdílům v jejich rozdělovacím koeficientu mezi stacionární a mobilní fází v koloně.

Plynová chromatografie ve spojení s headspace (Headspace GC) se používá k měření těkavých sloučenin, které jsou v páře nad pevným nebo kapalným vzorkem v uzavřené vialce.

U komplexních vzorků, které se liší molekulovou hmotností, polaritou a těkavostí je to nejrychlejší a nejčistší metoda pro analýzu těkavých organických sloučenin. Vzorek se normálně připravuje v lahvičce obsahující vzorek, ředící rozpouštědlo, modifikátor matrice a headspace. Těkavé složky z komplexních směsí vzorků mohou být extrahovány z netěkavých složek vzorku a izolovány v horní části nebo v parní části lahvičky se vzorkem. Alikvotní část páry v horním prostoru je dodávána do GC systému pro separaci všech těkavých složek.

Plynná fáze je označována jako headspace a leží nad kondenzovanou fází vzorku. Vzorková fáze obsahuje sloučeninu, která je obvykle ve formě kapaliny nebo pevné látky v kombinaci s ředícím rozpouštědlem nebo modifikátorem matrice. Jakmile je vzorková fáze zavedena do lahvičky a lahvička je utěsněna, těkavé složky difundují do plynné fáze, dokud horní prostor nedosáhne stavu rovnováhy. Vzorek se pak odebere z headspace [26].

1.5.2.2 Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickým detektorem (GC-MS) a mikroextrakce na tuhou fázi (SPME)

Mikroextrakce na pevné fázi (SPME) je technika přípravy vzorku, která využívá malé množství extrakční fáze k extrakci analytů ze studované matrice vzorku. SPME má výhodu v tom, že nevyužívá rozpouštědlo, ovládání je jednoduché, víceúčelový, nízká cena atd. Úspěšně se používá v různých oblastech jako parfémy, potraviny apod. [27].

Metoda SPME spojená s GC-MS poskytuje vysokou citlivost s malým potřebným objemem vzorku; proto může být použita k analýze chuťového profilu mnoha různých látek. V poslední době byla tato technika použita ke studiu těkavých profilů například u fermentovaného mléka, hroznů a vína a za sucha fermentované klobásy [28].

1.5.2.3 Parní destilace

Parní destilace se používá k oddělení těkavých ve vodě nerozpustných látek od netěkavých materiálů. Je užitečná především v případech, kdy je k dispozici relativně malé množství netěkavého materiálu. Princip parní destilace platí pouze v případě, že organická látka je nerozpustná ve vodě a má bod varu vyšší než 100°C. Vhodná je pro extrakci látek, které se mohou rozkládat, pokud jsou destilovány při mnohem vyšší teplotě. Má mnoho výhod jako je jednoduchost vybavení, nízká cena a použití bezpečného rozpouštědla [29, 30].

1.6 Mikrobiologický rozbor jogurtů

Jak už bylo několikrát zmíněno, jogurt obsahuje standardně dva druhy termofilních bakterií, *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Tyto BMK jsou v symbiotickém vztahu-laktobacily uvolňují proteolýzou aminokyseliny, které stimulují růst streptokoků, streptokoky naopak produkují větší množství kyseliny mléčné, která okyseluje prostředí a vytváří vhodné podmínky pro růst laktobacilů, navíc uvolňují další metabolity, např. kyselinu mravenčí, která stimuluje růst laktobacilů [39].

Pokud je zachován optimální poměr základních kmenů jogurtové kultury, mohou být použity také další BMK, např. probiotické kmeny bifidobakterií a laktobacilů [39].

Fermentované mléčné výrobky jsou potraviny, které jsou zvláště citlivé na dobu a podmínky skladování. Pro zachování vysoce kvalitního produktu bez fyzikálně-chemických, mikrobiologických nebo sensorických změn by měly být jogurty správně skladovány, protože variabilita bakterií BMK je v kontextu funkčních vlastností produktu extrémně důležitá. Aby bylo možné určit mikrobiální variabilitu v jogurtech s ohledem na dobu a teplotu skladování, byly provedeny studie, které prokázaly, že čím delší je doba skladování a čím vyšší je teplota skladování, tím větší je míra změn pozorovaných u jogurtů. Bylo pozorováno počáteční zvýšení počtu probiotických bakterií a následně pokles počtu BMK v průběhu času [31].

V jogurtech obsahujících různé druhy aditiv, jako je ovoce, zelenina, luštěniny, omega-3 kyseliny, koření, bylinky, obiloviny, extrakty, ořechy a oleje, se nakonec množství BMK výrazněji mění. Tyto změny jsou zpravidla nepříznivé, vedoucí ke snížení počtu živých bakterií pod požadovanou normu [31].

Mezi techniky vhodné pro stanovení mikroflóry potravin patří mikrobiologické (stanovení celkového počtu mikroorganismů) a molekulárně diagnostické metody (polymerázové řetězová reakce v reálném čase, 16S rRNA-targeted DNA sequencing)

1.6.1 Stanovení celkového počtu mikroorganismů

Principem kultivačních metod je přenesení mikroorganismů do vhodného živného média, kde se mohou namnožit. Na rozdíl od mikroskopického vyšetření lze určit počet živých buněk konkrétního druhu nebo i skupiny mikroorganismů. Není však možné určit všechny typy mikroorganismů ve vzorku, protože každý typ má jiné růstové požadavky (podmínky) [32].

1.6.2 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je enzymatická metoda používaná k syntéze definovaného segmentu DNA *in vitro*, pro kterou jsou k dispozici oligonukleotidové primery komplementární k 3' a 5' hlavičkovým sekvencím amplifikovaného segmentu. Tato metoda, umožňuje vybrané části se zmnožit až 106krát za 1-3 hodiny. Jednotlivé kroky duplikace jsou následující:

- 1) denaturace DNA
- 2) připojení primerů (annealing)
- 3) syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA polymerázy.

Opakování těchto kroků vede k syntéze segmentu s konečnými definovanými primery začleněnými do vznikajících molekul.

Kvantitativní PCR (qPCR) je metoda založená na sledování průběhu PCR během reakce (tzv. "v reálném čase") pomocí fluorescenčních sond nebo barviv, které detekují množství produktu PCR během reakce zvýšením jeho fluorescenční aktivity. Její výhodou oproti konvenční PCR je schopnost přesně určit počáteční počet kopií sekvence cílového templátu DNA, tj. schopnost kvantifikovat. Fluorescence se měří během každého cyklu PCR a její intenzita je přímo nebo nepřímo úměrná množství amplifikace v reakční směsi [30].

Typická amplifikační křivka má tvar acetátové křivky a lze ji rozdělit do tří částí: 1. fáze „pozadí“, kdy je zesílení tak malé, že její fluorescence ještě nedosahuje měřitelných hodnot; 2. exponenciální fáze, kdy se množství produktu zvyšuje exponenciálně a 3. fáze, kdy se množství amplifikovaného produktu již nemění, protože je systém saturován a fluorescenční signál zůstává konstantní. Platí, že čím rychleji amplifikační křivka dosáhne exponenciální fáze nebo překročí určitý práh fluorescence nastavený pro tuto fázi, tím více výchozích templátových molekul bylo přítomno ve vzorku na začátku reakce. Použité matematické modely pracují s hodnotou Ct ("prahový cyklus"), která se rovná cyklu, kdy amplifikační křivka překročí práh fluorescence nastavený v exponenciální fázi uvedené reakce. Absolutní kvantifikace používaná kupř. při identifikaci konkrétních mikroorganismů přímo určuje počáteční počet kopií cílových molekul. To je založeno na pozorování, že existuje lineární vztah mezi logaritmem počátečního počtu kopií vzorku a Ct odpovídající křivky zesílení. Když je tedy vzorek neznámé koncentrace obohacen sérií ředění standardů o známé koncentraci, získá se kalibrační křivka ("standardní křivka"), od které lze odečíst počáteční koncentraci neznámého vzorku [30].

DNA taje nejrychleji při určité teplotě, která se blíží tzv. teplotě tání T_m . Tání DNA lze monitorovat po dokončení reakce PCR v reálném čase ochlazením roztoku dsDNA na teplotu pod očekávanou T_m produktů, postupným zahříváním na teplotu nad očekávanou T_m a měřením fluorescence. Je pravda, že fluorescenční aktivita oligonukleotidové sondy nebo interkalovaného barviva je přímo úměrná množství dsDNA v reakční směsi. Pokud se naměřená intenzita fluorescence znázorní jako funkce odpovídající teploty, je možné dostat tzv. křivku tání, která náhle prudce klesá kolem T_m . Teplota v inflexním bodě křivky se rovná bodu tání a lze ji snadno zjistit pomocí derivace křivky tání, kde je v grafu „vrchol“. Identifikace nescifických produktů s interkalovanými barvivy je založena na předpokladu, že nescifické produkty mají jinou (obvykle nižší) T_m než specifické produkty [33].

1.6.3 16S rRNA-targeted DNA sequencing

Sekvenování 16S rRNA se již dlouho používá k analýze bakteriální mikroflóry v různých typech vzorků. Je dlouhá asi 1 550 bp a je složena z variabilních i konzervovaných oblastí. Tato sekvence je stanovena pro velký počet kmenů [34, 35].

Gen 16S rRNA je v bakteriích univerzální, takže vztahy lze měřit mezi všemi bakteriemi. Obecně platí, že srovnání sekvencí genu 16S rRNA umožňuje diferenciaci mezi organismy na úrovni rodu napříč všemi hlavními kmeny bakterií, kromě klasifikace kmenů na více úrovních, včetně toho, co nyní nazýváme úroveň druhu a poddruhu.

Prvním krokem pro sekvenování DNA jsou produkty PCR purifikovány, aby se odstranily přebytečné primery a nukleotidy [32].

Dalším krokem je proces zvaný sekvenování cyklů. Je podobný PCR v tom, že jako templát se používá DNA (purifikované produkty prvního cyklu PCR). Dopředná i reverzní sekvence se používají jako templát v samostatných reakcích, ve kterých se používá pouze dopředný nebo reverzní primer. Sekvenování cyklů se od PCR liší také tím, že se nevytvoří žádný nový templát a produktem je směs DNA různých délek. Toho je dosaženo přidáním speciálně značených bází nazývaných terminátorová barviva (spolu s neznačenými bázemi), které, když jsou náhodně začleněny v tomto druhém cyklu, ukončí sekvenci [32].

Takto jsou generovány fragmenty všech velikostí. Protože každá ze čtyř přidaných značených terminátorových bází má jiné fluorescenční barvivo, z nichž každá absorbuje při jiné vlnové délce, lze terminální bázi každého fragmentu určit fluorometrem. Produkty se čistí, aby se odstranily nezačleněné terminátorová barviva, a délka každého z nich se stanoví pomocí kapilární elektroforézy nebo gelové elektroforézy. Pak lze znát délku a koncovou bázi každého fragmentu a také lze určit sekvenci bází. Dva řetězce DNA jsou sekvenovány odděleně, čímž vznikají jak přímé, tak i reverzní (komplementární) sekvence. Záznam detekce separovaných fragmentů se nazývá elektroforegram. [35].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V experimentální části byly vyrobeny vzorky tří typů jogurtů a následně charakterizovány z hlediska těkavých (aromatických) látek, mikrobiálního složení a sensorické kvality.

2.1 Analyzované vzorky

V rámci této práce byly vyrobeny a analyzovány vzorky bulharského a klasického jogurtu (viz obrázek č. 4).

Celkem byly vyrobeny tři typy jogurtů: „klasický“ bílý jogurt, bulharský jogurt vyrobený z komerční kultury a tradiční bulharský jogurt získaný přeočkováním jogurtu přivezeného z Bulharska.

Vzorky byly vyrobeny v laboratorních podmínkách na FCH VUT v Brně; výroba vycházela ze standardního technologického postupu, podmínky výroby byly optimalizovány (viz kap. 4.1). Označení jednotlivých vzorků jogurtů je uvedeno v tabulce č. 6.

Tabulka č 6: Označení jednotlivých vzorků jogurtů

Označení vzorku	jogurt
B-TR	bulharský tradiční
B-K	bulharský koupenny
J-KL	klasický

2.1.1 Příprava jogurtových kultur

Komerční polotučné mléko (1 litr, obsah tuku 1,5 %) se pasteruje při 95 °C po dobu 2-3 minut, vychladí na teplotu 40-45 °C, zaočkuje se balením sušené jogurtové kultury Laktoflora a dobře se promíchá. Fermentace probíhá v uzavřené nádobě při 42-45 °C po dobu 4-6 h. Hotová kultura se uchovává v chladničce při teplotě 4 ± 2 °C.

V případě bulharské kultury se očkuje balením sušené bulharské kultury Laktoflora, fermentace probíhá v uzavřené nádobě při 45 °C po dobu 8-10 h. Ostatní podmínky a postupy jsou totožné.

2.1.2 Postup výroby klasického jogurtu

Komerční polotučné mléko (1 litr, obsah tuku 1,5 %) se pasteruje při 95 °C po dobu 2-3 minut, vychladí na teplotu 40-45 °C, zaočkuje se 3 % připravené jogurtové kultury a dobře se promíchá. Fermentace probíhá v uzavřené nádobě při 42-45 °C po dobu 4-6 h. Hotový jogurt se uchovává v chladničce při teplotě 4 ± 2 °C.

2.1.3 Postup výroby bulharského jogurtu

Podmínky a postup výroby jsou totožné jako u klasického jogurtu, pouze k očkování se použije 2 % připravené bulharské kultury.

2.1.4 Postup výroby „tradičního“ bulharského jogurtu

Tento jogurt byl vyroben přeočkováním tradičního bulharského jogurtu získaného komerčně přímo od výrobce. Podmínky výroby nebyly přesně specifikovány a mikrobiální složení je předmětem zkoumání v rámci této práce.

Podmínky a postup výroby zkoumaného vzorku jsou totožné jako u klasického jogurtu, k očkování se použije 1 % tradičního bulharského jogurtu.

Použité kultury:

- kultura pro přípravu originál bulharského jogurtu: složení – *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*, MILCOM a.s., ČR
- jogurtová kultura sušená; složení *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, MILCOM a.s., ČR



Obrázek č. 4: Vyrobené modelové jogurty. Zleva: „tradiční“ bulharský jogurt „koupenny bulharský jogurt a klasický jogurt

2.2 Stanovení titrační kyselosti

Titrační kyselost udává počet ml roztoku hydroxidu sodného (NaOH) o koncentraci 0,25 mol.l⁻¹ potřebného k neutralizaci kyselých reagujících látek ve 100 ml (100 g) vzorku na indikátor fenolftalein. Udává se v Soxhlet-Henkelových stupních (°SH) a platí:

$$1 \text{ ml NaOH} = 1^\circ\text{SH} = 0,0225 \% \text{ kyseliny mléčné ve } 100 \text{ g výrobku}$$

Postup stanovení:

Do titrační baňky bylo naváženo 25 g vzorku jogurtu (s přesností 0,01 g), k tomu bylo přidáno 25 ml vody a 1 ml fenolftaleinu. Směs byla promíchána a titrována do slabě růžového zbarvení. V případě tekutých vzorků (mléko), tedy na začátku fermentace bylo titrováno 50 ml mléka za stejných podmínek. Výsledek byl vyjádřen na 100 g (100 ml) vzorku.

Kyselost jogurtu na 100 g vzorku bylo vyjádřeno pomocí této rovnice:

$$x = \frac{100 \cdot a \cdot f}{m}$$

, kde a vyjadřuje průměrnou spotřebu roztoku NaOH (v ml) o koncentraci 0,25 mol.l⁻¹ a f je faktor titrace. Titrační kyselost u jogurtu bývá v rozsahu 42–50 °SH [8].

2.3 Stanovení těkavých látek

Pomocí SPME byly extrahovány těkavé látky ze vzorků jogurtů a stanoveny byly dále pomocí GC-MS.

2.3.1 Laboratorní vybavení, pracovní pomůcky a přístroje

- NaOH 0,25 mol.dm⁻³
- fenolftalein 0,2%
- běžné laboratorní sklo a vybavení
- vialky se šroubovacím uzávěrem (10 ml)
- nádobí potřebné pro výrobu jogurtů
- nádobí a pomůcky pro senzorkou analýzu
- SPME vlákno DVB/CAR/PDMS 50/30 μm, Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA
- Plynový chromatograf Trace 1310 se split/splitless injektorem (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Hmotnostní detektor ISQ LT Single Quadrupole (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Knihovna spekter NIST/EPA/NIH, verze 2.0 (Gaithersburg, Maryland, USA)
- pH metr (Hanna Instruments, ČR)

2.3.2 Použité plyny

- dusík 5.0, v tlakové lahvi s redukčním ventilem a kovovou (SIAD, Česká republika)
- hélium 4.8, v tlakové lahvi s redukčním ventilem (SIAD, ČR)
- vodík 5.5, v tlakové lahvi s redukčním ventilem (SIAD, Česká republika) Vzduch 5.0, v lahvi s redukčním ventilem pro kyslík (SIAD, Česká republika)

2.3.3 Příprava vzorků

2 g vzorku jogurtu byly převedeny do vialky. Vialka se vzorkem byla umístěna do autosampleru plynové chromatografie. Vyhodnocení výsledků bylo založeno na porovnání hmotnostních spekter sloučenin s knihovnou spekter, obsah sloučenin je vyjádřena semikvantitativně na základě ploch píků.

2.3.4 Podmínky HS-SPME-GC-MS analýzy

- doba extrakce: 20 minut
- teplota agitátoru (teplota extrakce a inkubace): 40 °C
- agitátor zapnutý: 5s
- agitátor vypnutý: 60 s
- hloubka ponoření vlákna do vialky: 20 mm
- hmotnost vzorku: 2 g

2.3.5 Identifikace a výpočet obsah těkavých (aromatických) látek

Těkavé látky byly identifikovány na základě srovnání retenčních časů jednotlivých látek, relativní obsah (%) byl vypočítán na základě ploch píků na chromatogramu.

2.4 Polymerázová řetězová reakce

Pomocí qPCR metody, která poskytuje rychlou a vysoce účinnou detekci a kvantifikaci cílových sekvencí DNA v různých matricích. V této části jsou u vzorků jogurtů stanoveny přítomnosti bakterie a kvasinky.

2.4.1 Laboratorní vybavení, pracovní pomůcky a přístroje

- Automatický izolátor QuickGene-Mini80 (FUJIFILM Corporation, Japonsko)
- Centrifuga 5430R (Eppendorf, Německo)
- Minicentrifuga HERMLE Z100 (Hermle LaborTechnik GmbH, Německo)
- Spektrofotometr NanoDrop™ 2000 (ThermoScientific, USA)
- Třepačka temperovaná TS-100C a termoblok SC-18/02C (Biosan, Lotyšsko)
- Vortex-Genie 2 (Mo Bio Laboratories, Inc., QIAGEN, Německo)
- Real-time thermal cycler LightCycler® Nano (Roche, Švýcarsko)

2.4.2 Komponenty PCR

- PCR voda (PCR Ultra H₂O) (Top-Bio, Praha, ČR)
- qPCR 2x SYTO-9 Master Mix (2x koncentrovaný: 150mM Tris-HCl; pH 8,8; 40mM (NH₄)₂SO₄; 5mM MgCl₂; 400μM dATP; 400μM dCTP; 400μM dGTP; 400μM dTTP; Taq DNA polymeráza (50 U/ml); monoklonální protilátka anti-Taq; SYTO-9; stabilizátory a aditiva) (Top-Bio, Praha, ČR)
- primery
 - specifické pro doménu *Bacteria* - F_eub, R_eub
 - specifické pro celkové kvasinky - Oli-F, Oli-R
- pozitivní kontroly – DNA izolovaná z kultury *Bifidobacterium breve* CCM 7825, kvasinky *Candida glabrata* CCM 8270. Sbírkové kmeny byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM).

2.4.3 Příprava hrubého lyzátu

Při přípravě hrubého lyzátu se používaly vzorky jogurtu bulharského tradičního, koupeneho a klasického jogurtu.

Každý vzorek jogurtu byl odebrán 3 x 2 ml do sterilní 2 ml eppendorfky, které byly následně centrifugovány 5 minut při 14 000 ot. /min. Získaný sediment byl po slití supernatantu promyt v roztoku A (10 mM Tris-HCl, pH 7,8; 5 mM EDTA). Po centrifugaci 14 000 ot. /5 min byl supernatant slit. Sediment byl resuspendován v 1 ml lyzačního roztoku (10 mM Tris HCl (pH 7,8), 5 mM EDTA (pH 8,0), lyzozym 3 mg/ml). Po půl hodinové inkubaci při laboratorní teplotě bylo ke vzorku přidáno 50 μl 20 % SDS a 5 μl proteinázy K (1 mg/ml). Vzorky byly inkubovány v termostatu při teplotě 55 ° C inkubovány do 3 dnů [36].

2.4.4 Izolace DNA ze vzorků (fenolová extrakce)

Připravené lyzáty (z předchozí kapitoly) byly pipetovány 500 μ l do nových eppendorfek, a byl přidán stejný objem fenolu (předestilovaného, pH upraveno na 7,8). Směs byla promíchána kývavým pohybem po dobu 4 min, poté byly Centrifugovány při 15 000 ot./ 3 min. Po centrifugaci byla odebrána vodní fáze DNA do nové eppendorfky pomocí špičky a byla přidáno 700 μ l CIZ směsi (chloroform: isoamylalkohol 24:1) a opět byla směs promíchána kývavým pohybem promíchávána po dobu 4 min. Následovala centrifugace při 10 000 ot./ 3 min a poté byla odebrána vodní fáze do čisté eppendorfky. Způsoby přípravy sady vzorků lyzátů k izolaci DNA jsou zobrazeny na obrázku č. 5 [36].



Obrázek č. 5: Příprava vzorků lyzátů k izolaci DNA

2.4.4.1 Přesrážení DNA ethanolem

Do připravené vzorků DNA (9 sady) bylo přidáno 1/20 objemu 3M octanu sodného a následně byly promíchány. Poté bylo přidáno 800 μ l 96 % ethanolu p.a., obsah byl promíchán. DNA byla uchovávána v mrazicím boxu k vysrážení při -20 ° C po dobu 15 min. Po uplynutí 15 minut byly směsi centrifugovány při 10 000 ot./ 15 min. Opatrně byl slit supernatant. Získaný sediment DNA (obrázek č. 6) byl usušen v exikátoru po dobu 15 minut (k odstranění zbytku ethanolu). A na konci DNA byl rozpuštěn ve 50 μ l TE pufru. Směs byla rozpuštěna přes noc, kdy druhý den byla měřena v PCR zařízení [36].



Obrázek č. 6: Izolovaná DNA po ethanolové přesrážení.

2.4.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA bylo stanoveno pomocí NanoPhotometru™ od Implenu.

2.4.6 qPCR měření

Pro samotné detekce přítomnosti bakterií a kvasinek byla použita DNA (viz kapitola 2.4.4.1), které byla naředěna na finální koncentraci 10 ng/μl. K měření byly použity i pozitivní kontroly (DNA o koncentraci 10 ng/μl) a negativní kontroly (PCR směs bez DNA matrice). Příprava PCR směsi jsou uvedeny v tabulce č. 7, pro doménu *Bacteria* a pro přípravu směsi pro kvasinky, ty jsou uvedeny v tabulce č. 8.

Tabulka č. 7: Příprava 25 μl PCR směsi pro doménu *Bacteria*

komponenty	objem (μl)
PCR voda	9,5
SYTO PCR 2x Master Mix	12,5
primer F_eub (10ng/μl)	1,0
primer R_eub (10ng/μl)	1,0
DNA matrice (10ng/μl)	1,0

Tabulka č. 8: Příprava 25 μ l PCR směsi pro kvasinky

komponenty	objem (μ l)
PCR voda	9,5
SYTO PCR 2x Master Mix	12,5
primer Oli-F (10ng/ μ l)	1,0
primer Oli-R (10ng/ μ l)	1,0
DNA matrice (10ng/ μ l)	1,0

Pro přesnější měření bylo připraveno ze 3 vzorků jogurtů 9 vzorků (3x B-TR, 3x B-K, 3x J-KL). Vzorky byly ředěny na koncentraci 10 ng/ μ l. Po spektrofotometrickém stanovení koncentrace a čistoty jsou výsledné koncentrace jednotlivých vzorků uvedeny v tabulce č. 9.

Tabulka č. 9: koncentrace jednotlivých komponent pro PCR měření

vzorek		c (ng/ μ l)	Lid
B-TR	1A	55,2	5
	1B	440,0	50
	1C	14,6	5
B-TR	2A	3055,0	50
	2B	9,0	5
	2C	3248,0	50
J-KL	3A	3703,0	50
	3B	4235,0	50
	3C	679,0	10

Samotné měření proběhlo pomocí PCR přístroje LightCycler® Nano (Roche, Švýcarsko). Programování cycleru pro doménu *Bacteria* je uvedeno v tabulce č. 10 a pro kvasinky v tabulce č. 11.

Tabulka č. 10: amplifikační profil PCR pro doménu *Bacteria*

	T ($^{\circ}$ C)	čas (s)
iniciační denaturace	95	300
denaturace	95	
připojení primerů	55	30 cyklů
syntéza DNA	72	600
melt analýza	50 \rightarrow 90	-

Tabulka č. 11: amplifikační profil PCR pro kvasinky

	T ($^{\circ}$ C)	čas (s)
iniciační denaturace	94	300
denaturace	94	
připojení primerů	51	30 cyklů
syntéza DNA	72	300
melt analýza	50 \rightarrow 99	-

2.5 Senzorická analýza jogurtů

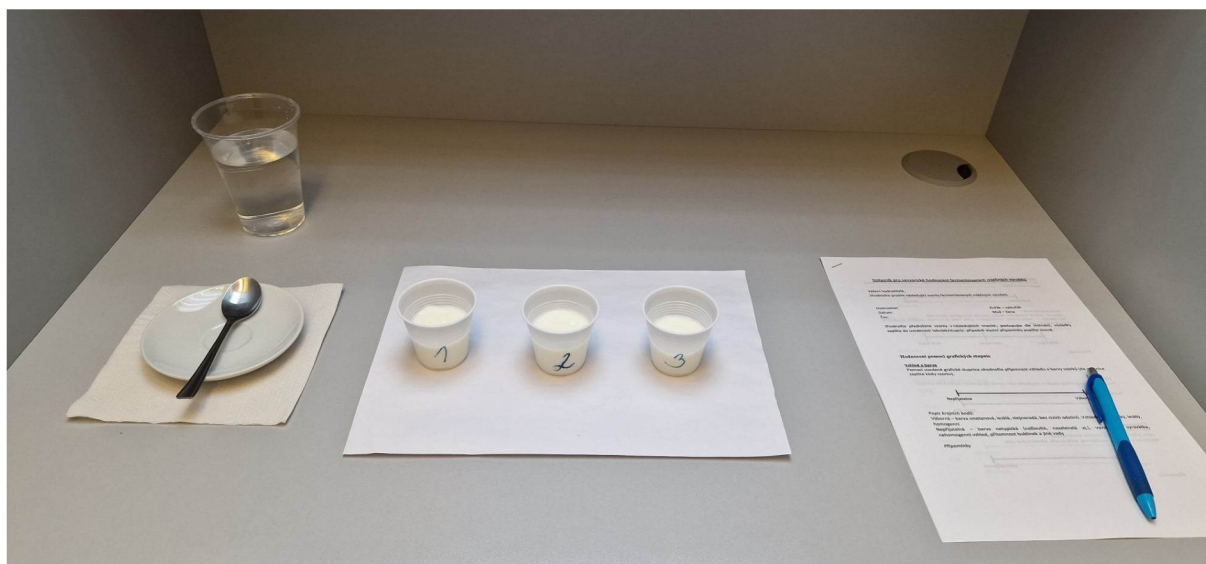
Senzorické analýza probíhala v laboratoři sensorické analýzy Fakulty chemické VUT v Brně (obrázek č. 7). Pro sensorické hodnocení byly vzorky hodnotitelům předkládány v plastových kelímcích (cca 50 ml) označených číselnými kódy. Jako neutralizátor chuti měli hodnotitelé k dispozici pitnou vodu. Hodnotitelé byli především studenti z FCH VUT. Celkem se zúčastnilo 11 hodnotitelů, z toho 4 muži a 7 žen ve věkovém rozmezí 18–28 let.

Senzorická analýza se skládala z hodnocení pomocí grafických stupnic, profilového a pořadového testu. Byly hodnoceny vzhled, barva, konzistence (textura), vůně (intenzita; příjemnost), chuť (intenzita; příjemnost). U profilového testu byly hodnoceny vybrané chutě (sladká, kyselá, hořká, kvasinková a jiná) a celková přijatelnost vzorků byla hodnocena pomocí pořadového testu (nejlepší \Rightarrow nejhorší). Použitý formulář je uveden v příloze 1.



Obrázek č. 7: Laboratoř sensorické analýzy na Fakultě chemické Brno

Konzumenti měli k dispozici tři vzorky jogurtů, pitnou vodu, lžičku, dotazník a tužku na psaní (obrázek č. 8).



Obrázek č. 8: Připravené vzorky jogurtů k sensorické analýze

2.6 Statistické zpracování výsledků

Výsledky všech analýz jsou zpracovávány v excelu (Microsoft 365).

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce se zabývá porovnáváním bulharského a klasického jogurtu, jejich organoleptických vlastností, chemickým a mikrobiálním složením.

Nejprve byla provedena optimalizace výroby všech typů jogurtů, po optimalizaci následovala senzorická analýza. Postup optimalizace klasického jogurtu (J–KL) je součástí bakalářské práce Jakuba Kirchdorfera [37].

3.1 Optimalizace výroby bulharského jogurtu

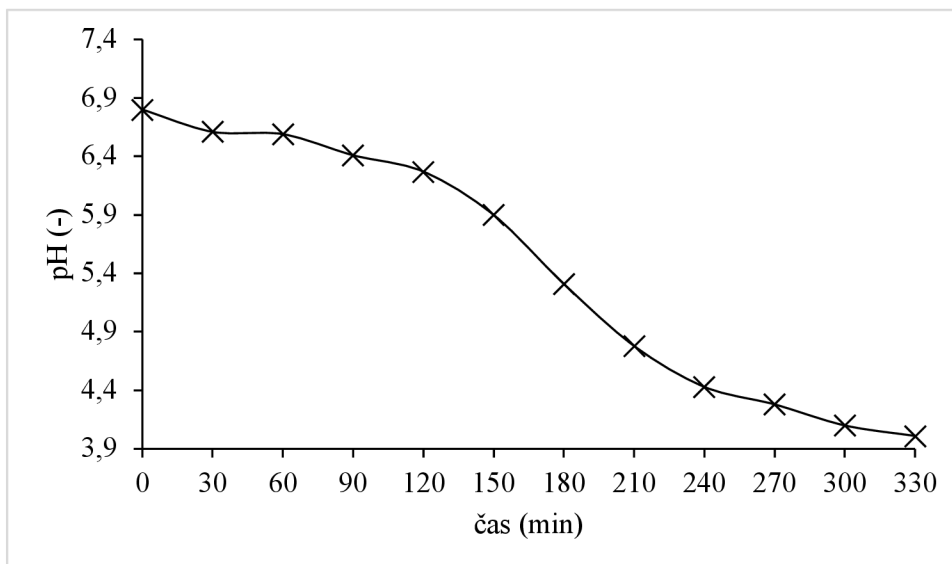
Pro výrobu vzorků byl použit standardní technologický postup pro výrobu jogurtu. Ten je v zásadě jednoduchý: pasterované mléko se převarí na 30 minut, poté se při teplotě 42-45 °C zaočkuje příslušnou kulturou a nechá se fermentovat. Tento postup bylo nutno nejprve ověřit v laboratorních podmínkách a optimalizovat některé faktory, především potřebnou dobu fermentace a potřebné množství přidané kultury, tak aby byl dosažen jogurt co nejlepších senzorických vlastností. Podle literatury se přídavek kultury pohybuje v rozmezí 2-5 %, v rámci této práce byl testován přídavek 1 %, 2 % a 3 % příslušné kultury [14, 38].

Standardní doba kultivace se uvádí 3-6 hod, nicméně doba se může lišit v závislosti na kvalitě použitého mléka, typu a aktivitě použité kultury. Rozhodující pro ukončení fermentace je dosažení požadované kyselosti, tj. pH méně než 4,4 (resp. titrační kyselost vyšší než 40 °SH) [38].

V následujících tabulkách (tabulka č.12-14) a grafech (graf č. 1-3) jsou uvedeny ukázky průběhu prokysávání jogurtů v rámci jednotlivých experimentů. Je vidět, že průběh prokysávání u jednotlivých typů jogurtů se lišil, potřebné kyselosti (méně než 4,4 pH [38]) bylo zpravidla dosaženo po více než 5 hodinách fermentace.

Tabulka č. 12: Měřené hodnoty titrační kyselosti a pH tradičního jogurtu (přídavek 1 %)

Bulharský jogurt (B–TR) 1 %		
čas (h)	pH (-)	SH (°)
0	6,8	6,4
0,5	6,6	6,6
1,0	6,6	7,6
1,5	6,4	8,0
2,0	6,3	8,8
2,5	5,9	13,2
3,0	5,3	22,4
3,5	4,8	26,0
4,0	4,4	26,5
4,5	4,3	34,1
5,0	4,1	38,6
5,5	4,0	43,8

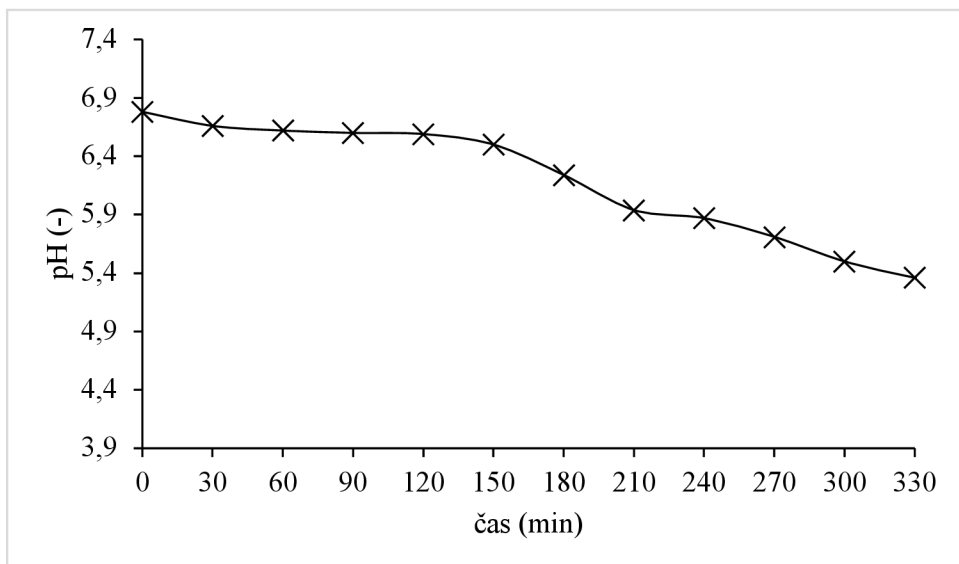


Graf č. 1: Závislost pH na čase u tradičního bulharského jogurtu (přídavek 1 %)

V případě tradičního jogurtu byl optimální přídavek kultury 1 %. Sensoricky bylo hodnocení uspokojivé. Tato koncentrace byla tedy využita k sensorické analýze.

Tabulka č. 13: Měřené hodnoty titrační kyselosti a pH při výrobě bulharského jogurtu (koupený)

Bulharský jogurt (B-K)		
čas (h)	pH (-)	SH (°)
0	6,8	6,2
0,5	6,7	6,6
1,0	6,6	6,8
1,5	6,6	7,1
2,0	6,6	7,6
2,5	6,5	8,0
3,0	6,2	10,0
3,5	5,9	12,0
4,0	5,9	13,6
4,5	5,7	15,2
5,0	5,5	16,8
5,5	5,4	21,2
6,0	5,3	20,4

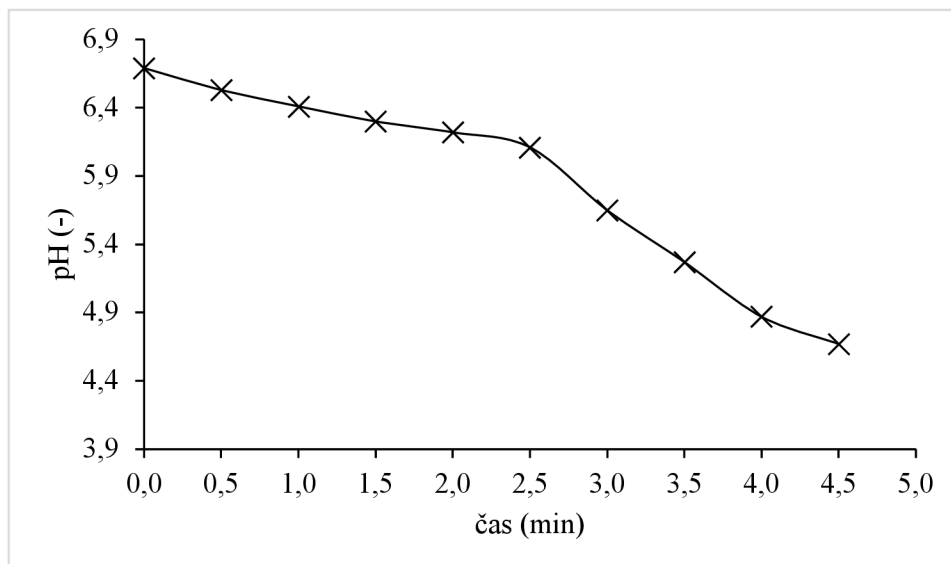


Graf č. 2: Závislost pH na čase u koupeného bulharského jogurtu (B-K)

Při výrobě bulharského jogurtu koupeného (B-K) byla titrační kyselost mnohem nižší oproti tradičnímu jogurtu, během fermentace klesala pomaleji (viz graf č. 2). Žádoucí kyselosti bylo dosaženo po více než 6 hod fermentace.

Tabulka č. 14: Měření pH při přeočkovávání jogurtu koupeného B-K (přídavek 2 %)

čas (h)	pH (-)
0	6,69
0,5	6,53
1,0	6,41
1,5	6,3
2,0	6,22
2,5	6,11
3,0	5,65
3,5	5,27
4,0	4,87
4,5	4,67



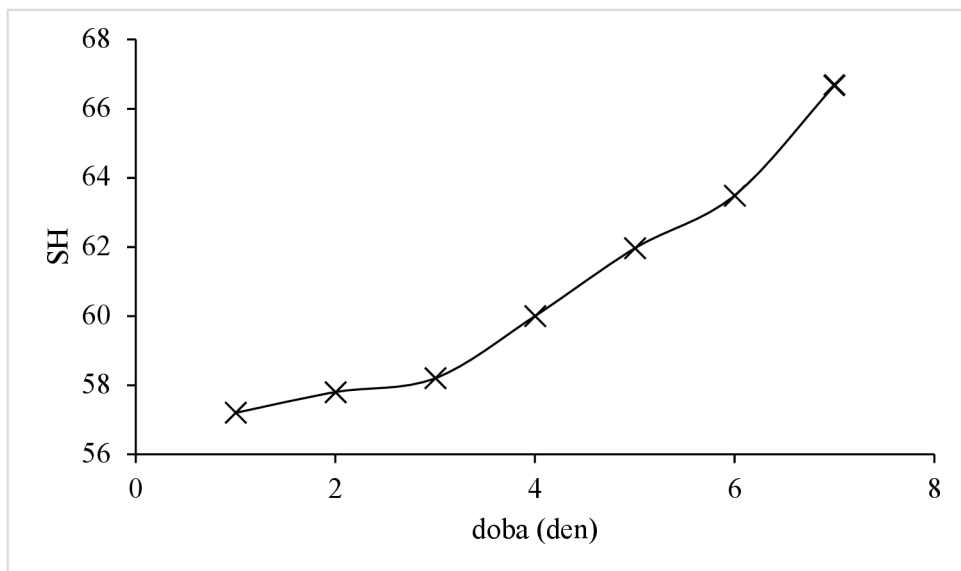
Graf č. 3: Měřené hodnoty pH přeočkovaného bulharského jogurtu koupeného B-K (přídavek 2 %)

Následně byla ověřena trvanlivost připravených jogurtů pomocí měření titrační kyselosti po dobu 7 dní při uchovávání v chladničce při teplotě přibližně 7° C. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 15 a grafech č. 4-5. Z grafů je patrné, že pomalé prokysávání pokračovalo i během uchovávání, jogurty byly po této době velmi kyselé, příliš hořké a nevhodné ke konzumaci. Je tedy nezbytné jogurty uchovávat při co nejnižší teplotě (4 ± 2 °C).

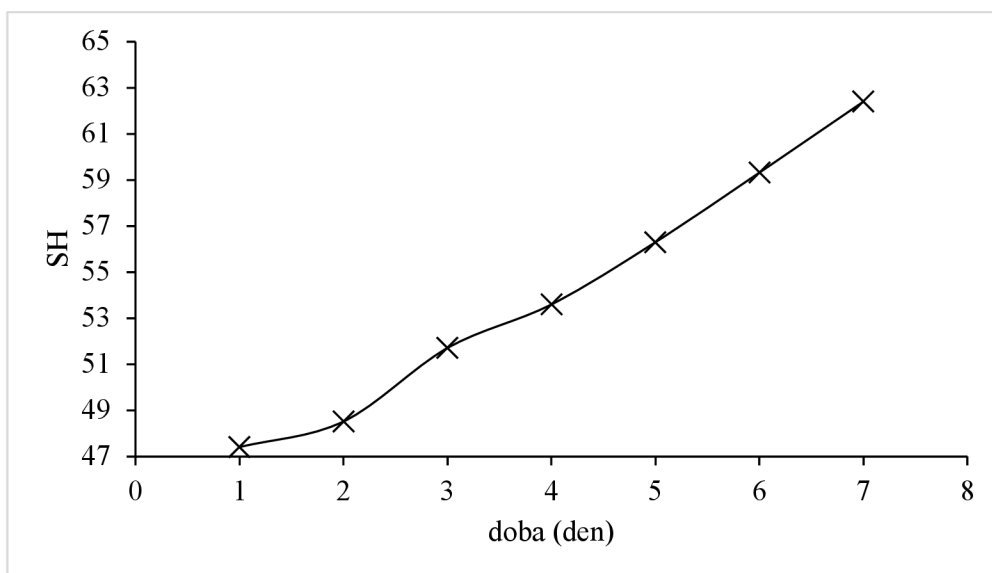
Tabulka č. 15: Titrační kyselosti tradičního bulharského jogurtu (B-TR) (přídavek 2 a 3 %)

bulharský jogurt 2 %	
čas (den)	SH
1	57,2
2	57,8
3	58,2
4	60,0
5	62,0
6	63,5
7	66,7

bulharský jogurt 3 %	
čas (den)	SH
1	47,4
2	48,5
3	51,7
4	53,6
5	56,3
6	59,3
7	62,4



Graf č.4: Závislost titrační kyselosti (SH) tradičního bulharského jogurtu (přídavek 2 %)



Graf č.5: Závislost titrační kyselosti (SH) tradičního bulharského jogurtu (přídavek 3 %)

3.2 Těkavé (aromatické) látky ve vzorcích jogurtů

Ve všech vzorcích jogurtů bylo identifikováno celkem 24 těkavých (aromatických látek). Z toho 6 alkoholů, 2 estery, 6 kyselin, 7 karbonylových sloučenin a 3 sírné sloučeniny. V tabulce č. 17 jsou uvedeny všechny detekované těkavé látky. Přítomnost látky ve vzorku jsou označeny zeleně s procentuálním zastoupením jednotlivých látek.

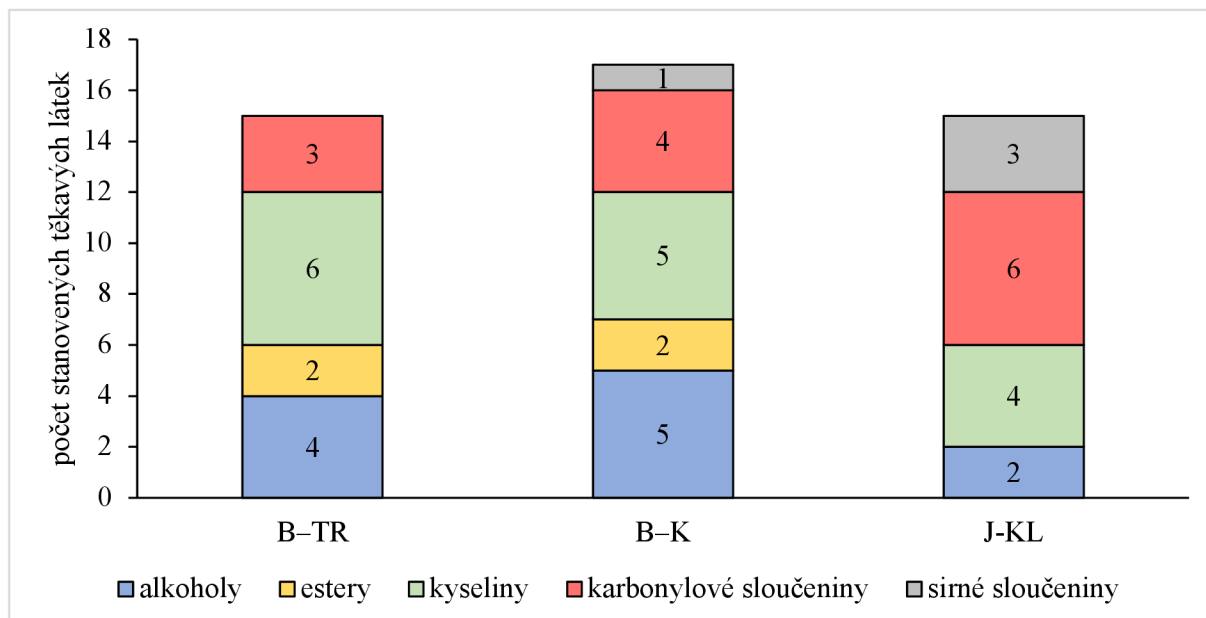
Porovnání počtu a obsahu detekovaných těkavých látek jsou uvedeny v grafu č. 6 a 7. Chromatogramy všech tří vzorků jsou uvedeny v příloze 2, 3 a 4.

Tabulka č. 16: Barevné označení sloučenin pro tabulku č. 6

sloučeniny				
alkoholy	estery	karbonylové sloučeniny	siřné sloučeniny	kyseliny

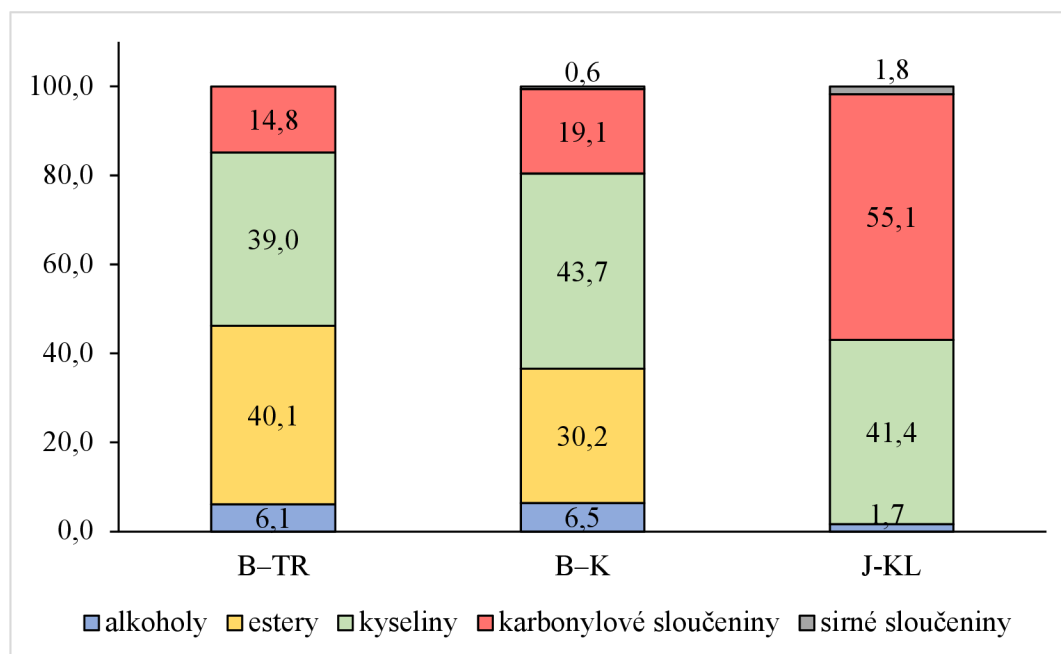
Tabulka č. 17: Detekované těkavé látky ve vzorcích jogurtů

sloučenina	RT [min]	zastoupení sloučenin v %		
		B-TR	B-K	J-KL
2,3-butandion	5,73			14,1
methylbutanoát	5,83	39,3	29,2	
2,3-pentandion	8,14	1,8	4,1	8,8
dimethylsulfid	8,47			1,0
2-heptanon	12,52		0,8	9,2
1-butanol, 2-methyl	13,99	1,8	1,2	
Ethylhexanoát	14,57	0,8	1,0	
Acetoin	17,34	11,7	12,2	19,0
2-heptanol	18,56	1,0	1,2	
3-pentanol	19,66			1,2
2-hydroxy-3-pentanon	20,36			0,7
dimethyltrisulfid	20,97			0,5
2-nonanon	21,34	1,3	1,8	3,3
kyselina octová	24,55	5,1	8,8	20,7
Ethylhexanol	25,7		0,6	
2-nonanol	27,01	0,6	1,2	
kyselina butanová	34,32	3,5	4,8	6,7
kyselina benzoová	35,99	1,1		
Cyklohexanon	36,87		0,2	
kyselina hexanová	47,45	9,5	11,1	10,5
dimethylsulfon	49,69		0,6	0,3
fenylethylalkohol	50,03	2,7	2,2	0,6
kyselina kaprylová/oktanová	55,95	14,8	14,5	3,3
kyselina dekanová	62,92	5,1	4,5	



Graf č. 6: Porovnávání počtu těkavých látek u jednotlivých vzorků

Z tabulky č. 17 a grafu č. 6 je patrné, že složení těkavých látek v jednotlivých typech jogurtů se liší. Nejvíce sloučenin bylo nalezeno v bulharském jogurtu koupeném (17), v obou zbylých 15 sloučenin. V bulharských jogurtech byly nejvíce zastoupeny alkoholy, kyseliny a karbonylové sloučeniny, v jogurtu klasickém to byly kyseliny a karbonylové sloučeniny. Výrazněji jsou patrné rozdíly mezi vzorky z hlediska obsahu identifikovaných sloučenin (graf č. 7). Profil těkavých látek obou bulharských jogurtů byl podobný, převažovaly estery a kyseliny, zatímco v klasickém jogurtu to byly kyseliny a karbonylové sloučeniny.



Graf č. 7: Porovnávání obsahu těkavých látek u jednotlivých vzorků (v %)

3.3 Výsledky sensorického hodnocení jogurtů

3.3.1 Výsledky hodnocení sensorických vlastností pomocí grafických stupnic

Vyrobené vzorky bulharských jogurtů (tradiční označovaný jako vzorek B–TR a koupený jako vzorek B–K) byly srovnávány s klasickým jogurtem (vyrobené jogurtovou kulturou), který byl označován jako vzorek J–KL.

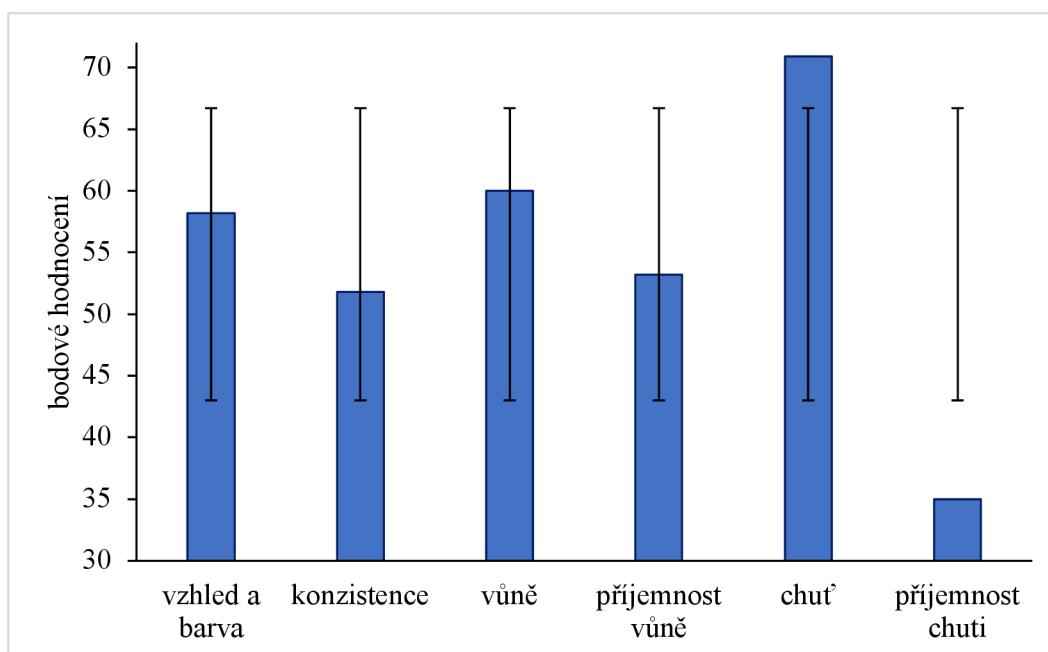
Jednotlivé atributy jako vzhled, barva, chuť, vůně, konzistence (textura) byly porovnávány na základě hodnocení hodnotitelů dle grafické stupnice (10 cm). (viz formulář v příloze 1). Výsledky jsou vyjádřeny v mm od levého okraje stupnice (průměr hodnocení všech hodnotitelů)

V grafech jako chybové úsečky také minimální a maximální dosažené hodnocení. Hodnocení znaků pro jednotlivé vzorky jsou uvedena v tabulkách č. 18, 19 a 20. Hodnotitelé měli za úkol rovněž napsat připomínky k jednotlivým vzorkům.

Tabulka č. 18: Hodnocení všech atributů pro vzorek B–TR

atribut	konzumenti											průměr
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
vzhled a barva	85	55	35	80	80	55	90	10	65	40	45	58,2
konzistence	80	40	40	80	70	80	60	30	25	20	45	52,8
vůně	80	60	60	70	90	20	30	10	80	80	80	60,0
příjemnost vůně	70	30	30	60	60	55	70	80	70	20	40	53,2
chuť	100	30	85	60	70	75	60	50	90	70	90	70,9
příjemnost chuti	35	20	20	40	70	50	40	50	20	20	20	35,0

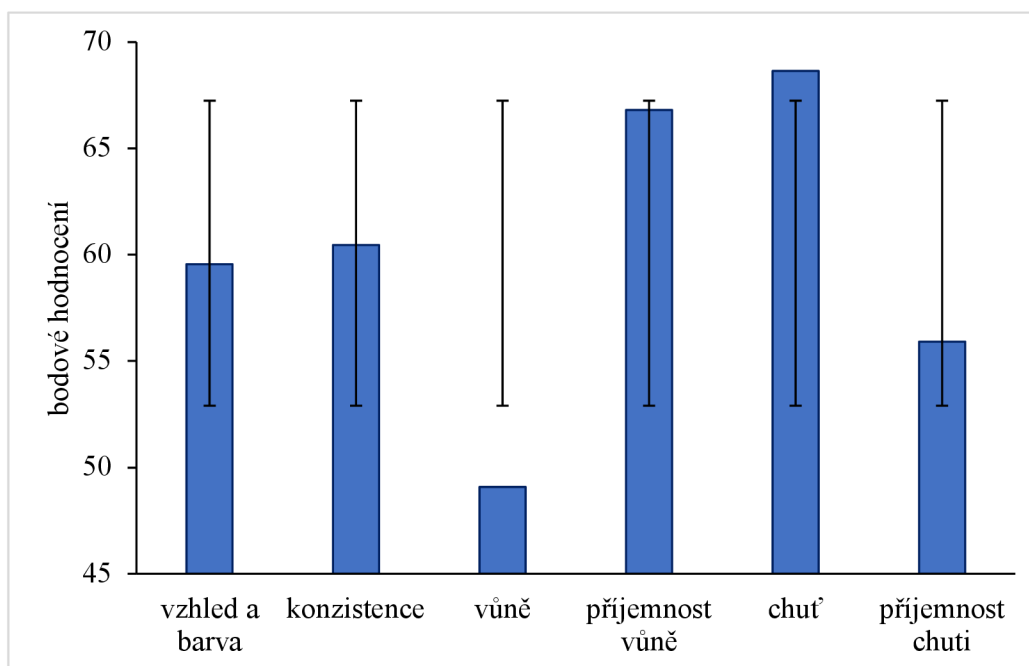
Tradiční bulharský jogurt B–TR (tabulka č. 18) – jeho vzhled, barva, konzistence a vůně byly hodnoceny cca jako dobré (středně příjemné). Chuť byla intenzivní, ale méně příjemná, intenzitu vůně lze označit jako silnější.



Graf č. 8: Výsledky sensorického hodnocení tradičního bulharského jogurtu (1–nepříjemná →10–výborná)

Tabulka č. 19: Hodnocení všech atributů pro B–K

atribut	konzumenti											průměr
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
vzhled a barva	80	55	30	80	70	55	45	65	75	55	45	59,5
konzistence	75	40	20	80	70	90	40	85	55	50	60	60,5
vůně	60	20	40	75	85	15	60	10	70	30	75	49,1
příjemnost vůně	85	30	50	85	80	60	80	80	75	40	70	66,8
chuť	90	35	60	75	70	80	40	80	80	65	80	68,6
příjemnost chuti	40	30	60	50	65	70	70	50	40	60	80	55,9

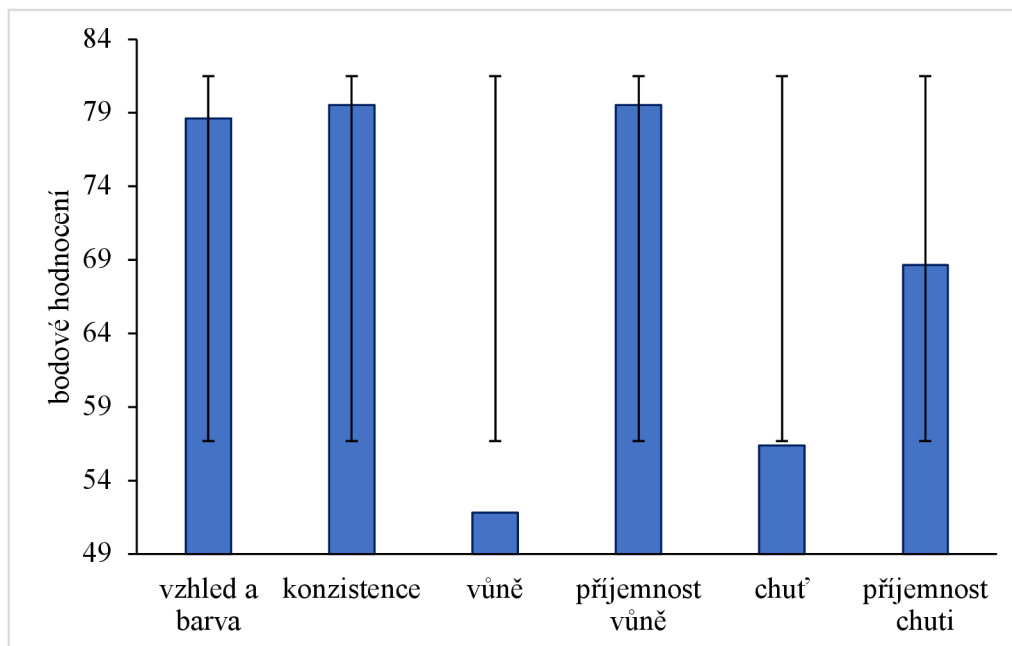


Graf č. 9: Výsledky senzoričského hodnocení bulharského jogurtu koupeného (1–nepřijatelná → 10–výborná)

Bulharský jogurt koupený B–K (tabulka č. 19) - byl hodnocen cca jako středně příjemný (dobrý) ve všech vlastnostech, i intenzitu chuti a vůně lze označit jako středně silnou.

Tabulka č. 20: Hodnocení všech atributů pro vzorek J–KL

atribut	konzumenti											průměr
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
vzhled a barva	10	60	50	80	75	60	85	90	90	75	100	78,6
konzistence	90	40	60	90	85	85	90	95	89	60	100	79,5
vůně	80	20	30	60	30	70	80	50	55	40	55	51,8
příjemnost vůně	100	60	80	50	55	95	100	80	80	75	100	79,5
chuť	80	50	40	20	40	90	50	80	50	70	50	56,4
příjemnost chuti	80	45	70	20	50	80	80	100	80	70	80	68,6



Graf č. 10: Výsledky senzoričkého hodnocení klasického jogurtu (1–nepřijatelná → 10–výborná)

Nejlépe hodnocený byl jogurt klasický J-KL (tabulka č. 20, graf č. 10). Jeho vzhled, barvu, konzistenci, chuť i vůni lze označit jako velmi příjemné, intenzita chuti i vůně byla středně silná.

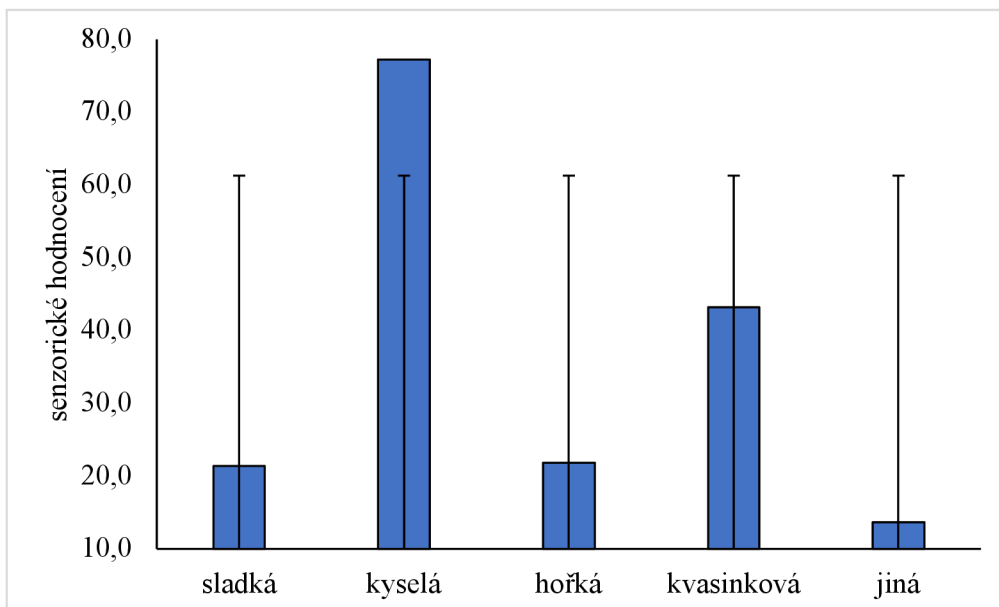
3.3.2 Výsledky profilového testu vybraných chutí

V rámci profilového testu hodnotitelé posuzovali intenzitu vybraných deskriptorů chuti. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 21-23 a grafech č. 11-14.

U všech jogurtů jednoznačně převažovala chuť kyselá, nejvíce kyselý byl podle očekávání tradiční bulharský jogurt, což odpovídalo i zjištěné vysoké titrační kyselosti. Sladkost byla poměrně málo intenzivní u všech vzorků, i když jemně nasládlá chuť je pro jogurt žádoucí. Nejméně sladký byl tradiční bulharský jogurt, zřejmě výrazná kyselost potlačovala chuť sladkou. Kupodivu hodnotitelé ve vzorcích vnímali mírnou hořkou a kvasinkovou chuť. „Jiná“ chuť byla neznatelná.

Tabulka č. 21: Hodnocení jednotlivých chutí pro vzorek B-TR

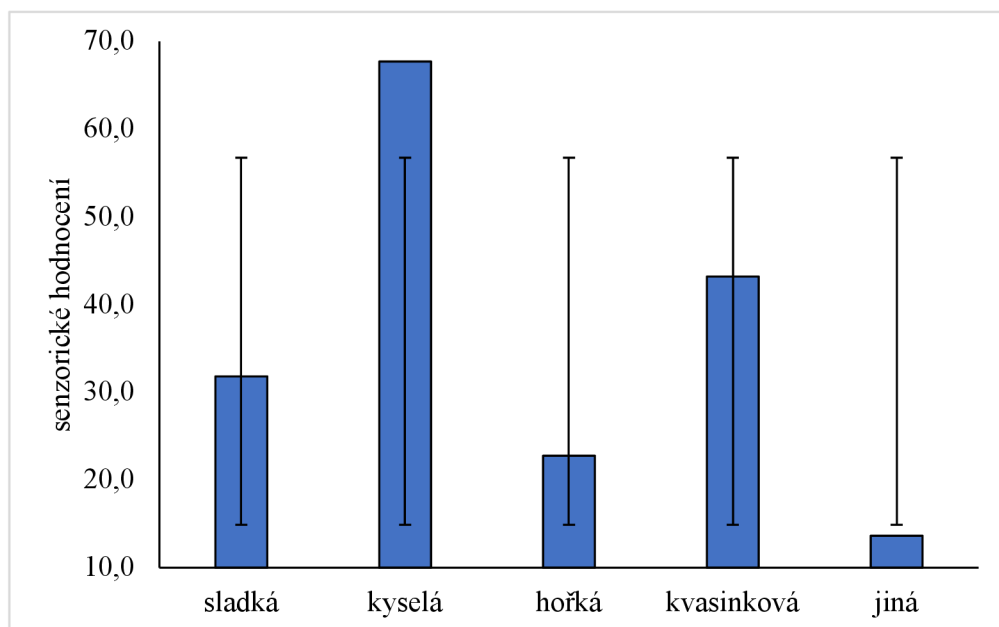
	konzumenti											průměr
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
chuť												
sladká	40	20	20	0	30	35	20	50	10	10	0	21,4
kyselá	60	70	90	70	80	70	70	75	85	90	90	77,3
hořká	0	40	25	0	65	0	10	0	90	10	0	21,8
kvasinková	10	45	90	50	65	0	0	50	75	60	30	43,2
jiná	0	0	10	0	50	0	0	0	0	90	0	13,6



Graf č. 11: Výsledky profilového hodnocení jednotlivých chutí pro vzorek B-TR (1-neznatelná →10-velmi silná)

Tabulka č. 22: Hodnocení jednotlivých chutí pro vzorek B-K

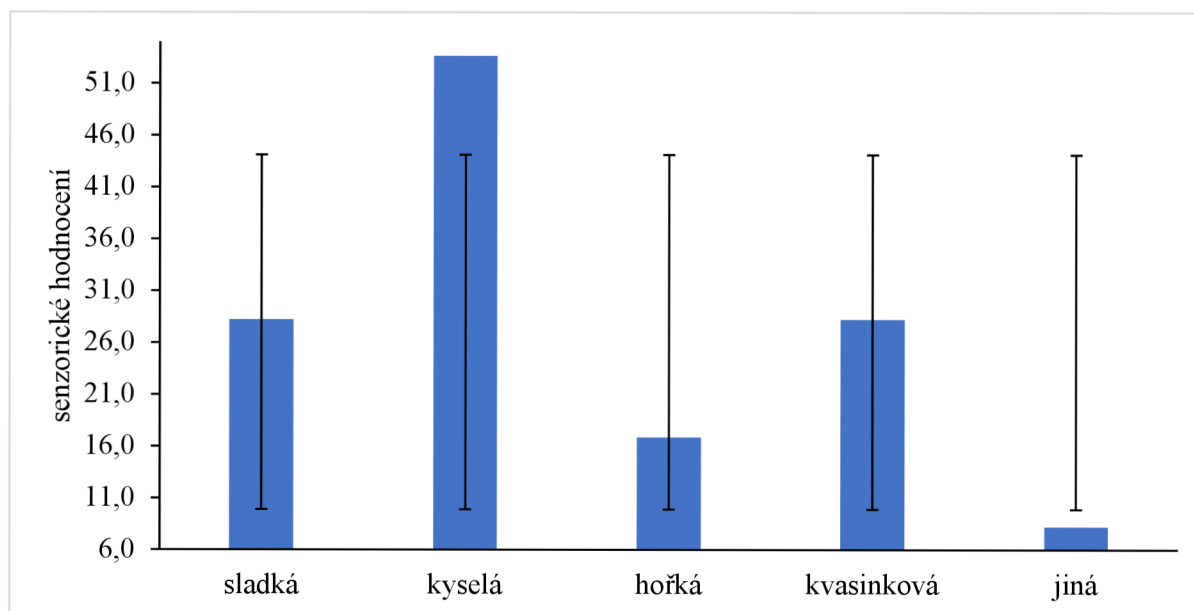
chut'	konzumenti											průměr
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
sladká	20	55	15	20	40	75	15	50	30	30	0	31,8
kyselá	80	50	70	50	90	45	70	75	60	75	80	67,7
hořká	0	25	50	0	75	0	20	0	70	10	0	22,7
kvasinková	55	40	90	40	80	0	0	50	70	30	20	43,2
jiná	0	0	65	0	50	0	0	0	0	35	0	13,6



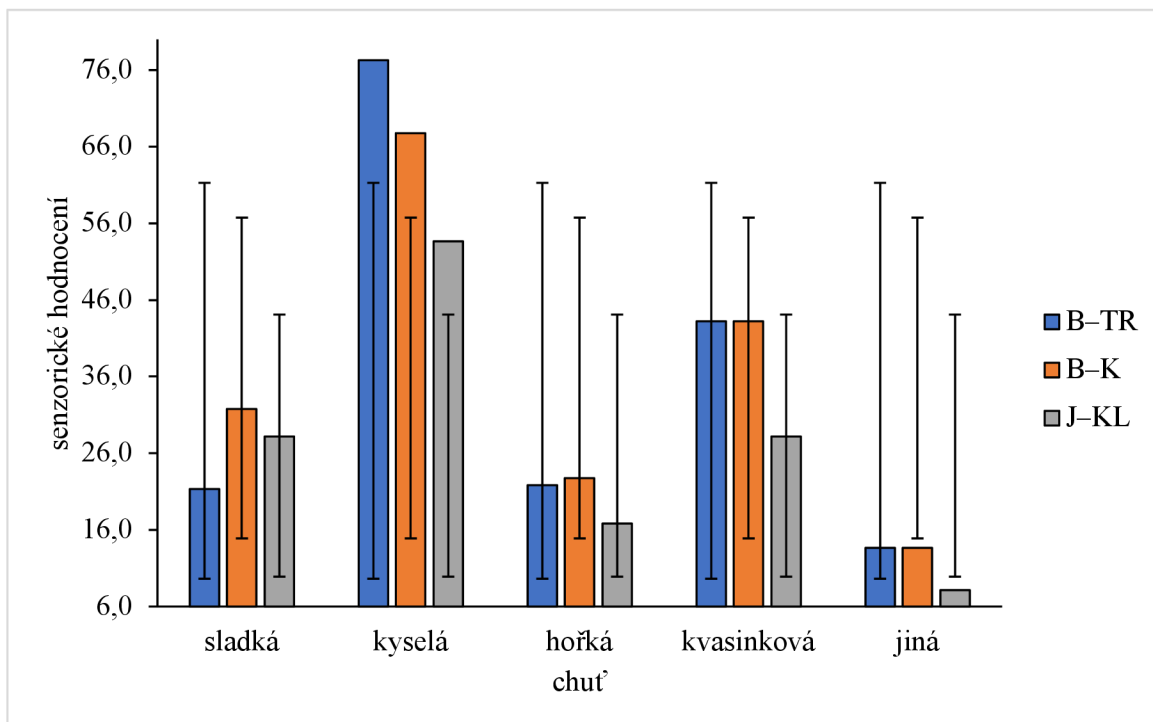
Graf č. 12: Výsledky profilového hodnocení jednotlivých chutí pro vzorek B-K (1-neznatelná →10-velmi silná)

Tabulka č. 23: Hodnocení jednotlivých chutí pro vzorek J–KL

chut'	konzumenti											průměr
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
sladká	30	60	60	0	0	85	20	0	35	20	0	28,2
kyselá	100	50	40	0	50	35	45	75	60	75	60	53,6
hořká	0	25	35	10	40	0	10	0	50	15	0	16,8
kvasinková	70	20	60	0	20	0	0	50	30	40	20	28,2
jiná	0	0	2	0	30	0	0	0	0	40	0	1,0



Graf č. 13: Výsledky profilového hodnocení jednotlivých chutí pro vzorek J–KL (1–neznatelná →10–velmi silná)

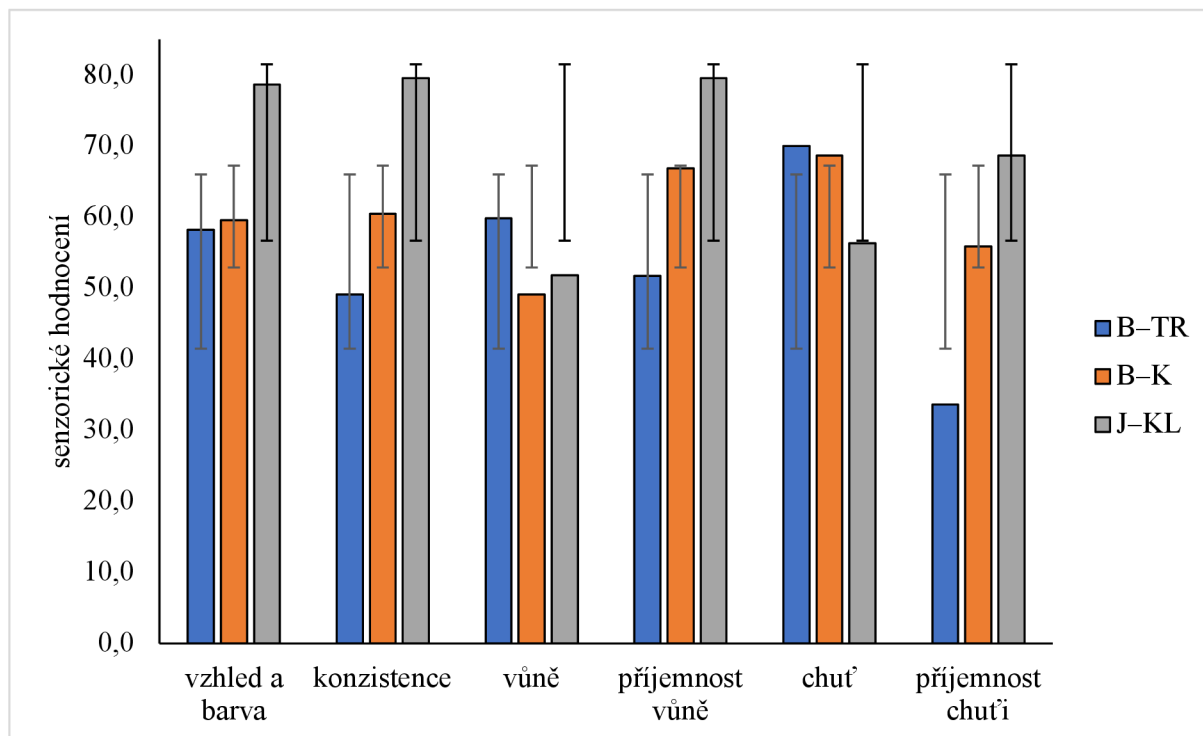


Graf č. 14: Porovnávání výsledků profilového hodnocení jednotlivých chutí (1–neznatelná →10–velmi silná)

3.3.3 Porovnání sensorických vlastností jednotlivých typů jogurtů

Srovnání všech znaků na základě sensorického hodnocení je uvedeno v grafu 15. U všech vzorků se atributy výrazně lišily. Jako nejlepší ze všech vzorků byl hodnocen vzorek J–KL, tedy klasický jogurt. Konzumenti hodnotili u tohoto produktu všechny znaky jako nejlepší. U vzorku B–K byla (kupovaný bulharský jogurt) vůně, vzhled a barva, konzistence a příjemnosti chuti o trochu horší. A jako nejhorší byl hodnocen námi připravený vzorek B–TR (tradiční bulharský jogurt). Ne příliš příjemná chuť byla dána tím, že vzorek byl až příliš kyselý, což mohlo souviset s přítomností kvasinek jako kontaminant ve vzorku.

Chuť a vůně vzorků byla hodnocena nejen z hlediska příjemnosti, ale i intenzity, podle očekávání bulharské jogurty, zvláště jogurt tradiční, měly vyšší intenzitu chuti i vůně oproti jogurtu klasickému.



Graf č. 15: Porovnávání výsledků senzoričkého hodnocení vzhledu a barvy, konzistence, vůně, příjemnosti vůně, chuti, vůně a přijatelnosti chuti (senzoričké hodnocení 1–nepřijatelná → 10–výborná)

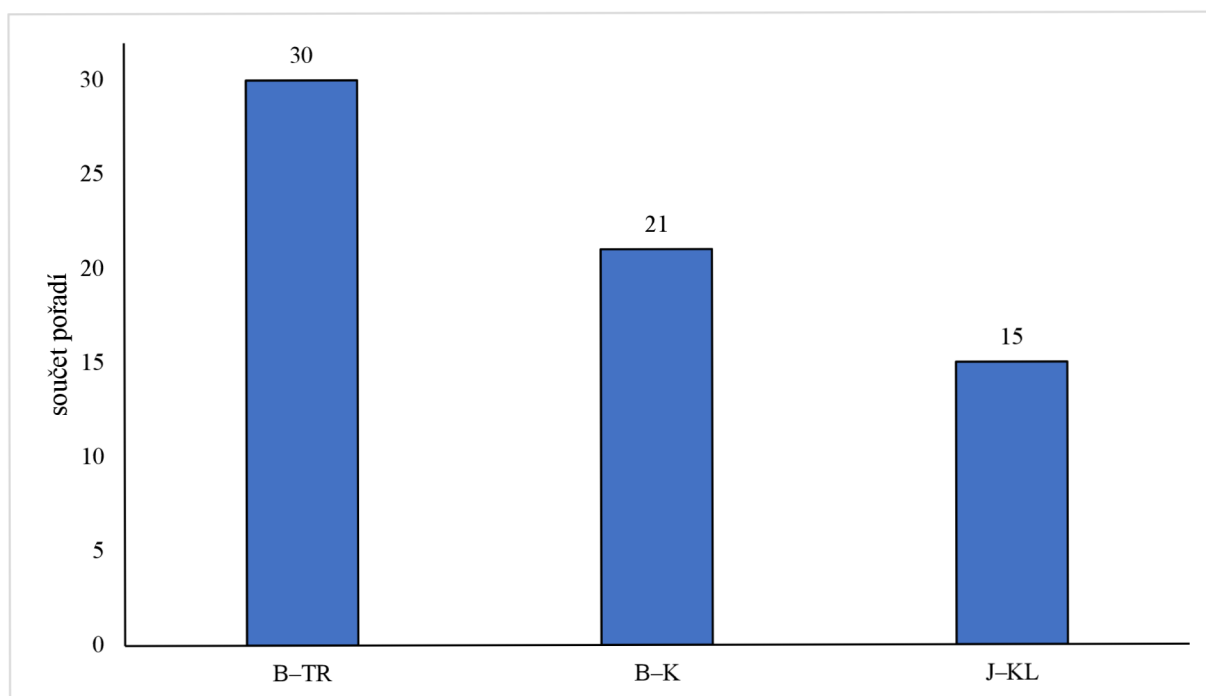
3.3.4 Výsledky pořadového testu

Konzumenti měli za úkol seřadit vzorky jogurtů podle celkové přijatelnosti, tedy od nejlepšího po nejhorší. V tabulce č. 24 jsou uvedeny kódy vzorků a součet pořadí (nejlepší → nejhorší).

Tabulka č. 24: Pořadový test celkové přijatelnosti jednotlivých vzorků jogurtů

hodnotitel č.	vzorek		
	B-TR	B-K	J-KL
1	2	3	1
2	3	2	1
3	3	2	1
4	2	1	3
5	2	1	3
6	3	2	1
7	3	2	1
8	3	2	1
9	3	2	1
10	3	2	1
11	3	2	1
součet pořadí	30	21	15

Výsledky pořadového testu byly vyjádřeny jako součet pořadí všech hodnocení pro každý vzorek. Tyto součty jednotlivých sekvencí vzorků byly vyneseny do sloupcového grafu a byly jim přiřazeny specifické hodnoty. Zde platí, že čím nižší je součet pořadí, tím lépe je daný vzorek hodnocen.



Graf č. 16: Výsledky pořadového testu u všech vzorků

Podle grafu č. 16 byl tedy jako nejlepší (nejvíce přijatelný) hodnocen vzorek J-KL jakožto srovnávací vzorek (klasický jogurt).

Nejhůře byl hodnocen vzorek B-TR (tradiční bulharský), pravděpodobně proto, že tento jogurt má velice výraznou chuť a vůni, která je pro konzumenty nezvyklá.

3.4 Výsledky polymerázové řetězové reakce v reálném čase

Na závěr byly vzorky jogurtů podrobeny molekulárně diagnostickému rozboru pomocí metod polymerázové řetězové reakce v reálném čase (qPCR). Pomocí qPCR metody byly vzorky testovány na přítomnost bakterií a vzhledem k detekované kvasinkové chuti, také kvasinek.

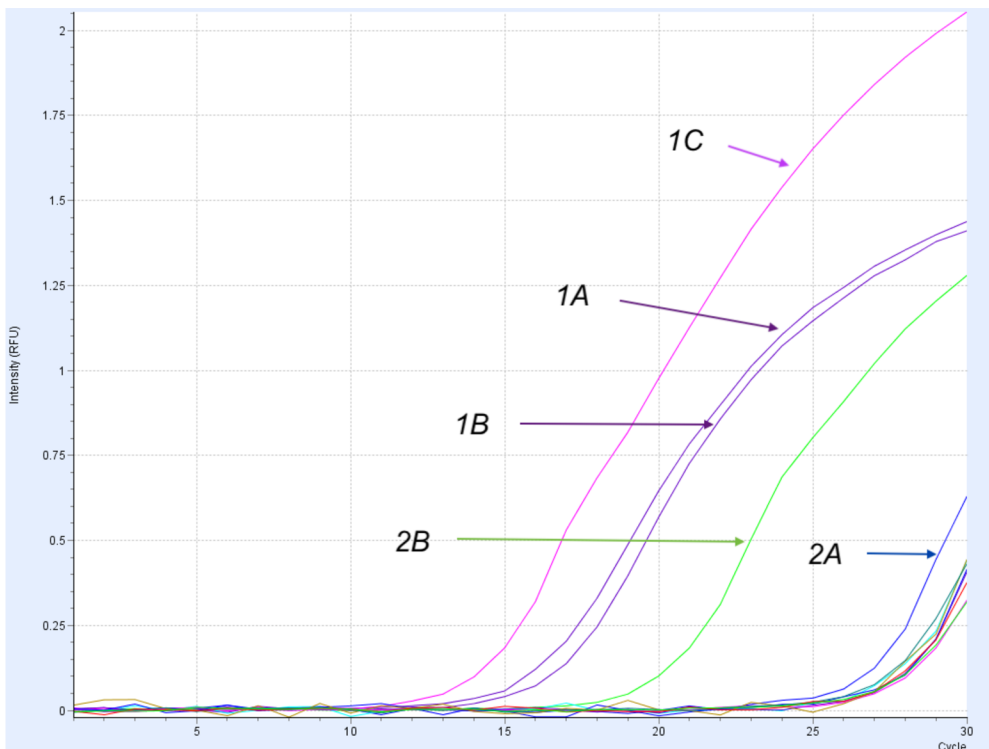
Vzorky DNA izolované z připravených vzorků jogurtu byly naředěny na koncentraci 10 ng/μl. Na měření bylo používáno 9 vzorků jogurtů: B–TR (1A, 1B, 1C), B–K (2A, 2B, 2C), J–KL (3A,3B,3C), negativní kontrola (směs PCR bez DNA maticí, NK) a jako pozitivní kontrola (PK) byla použita DNA izolovaná z bakteriální kultury *Bifidobacterium breve* CCM 7825 respektive kultury kvasinek *Candida glabrata* CCM 8270 o koncentraci 10 ng/μl. Dohromady bylo připraveno a naměřeno 12 vzorků.

Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce č. 25 pro doménu *Bacteria* a v tabulce č. 26 pro kvasinky. Hodnoceny byly pomocí Ct (prahová hodnota). Pomocí této hodnoty je možné porovnávat množství DNA v jednotlivých vzorcích. Platí, že čím nižší hodnota Ct, tím se předpokládá vyšší koncentrace vstupní matrice ve vzorku.

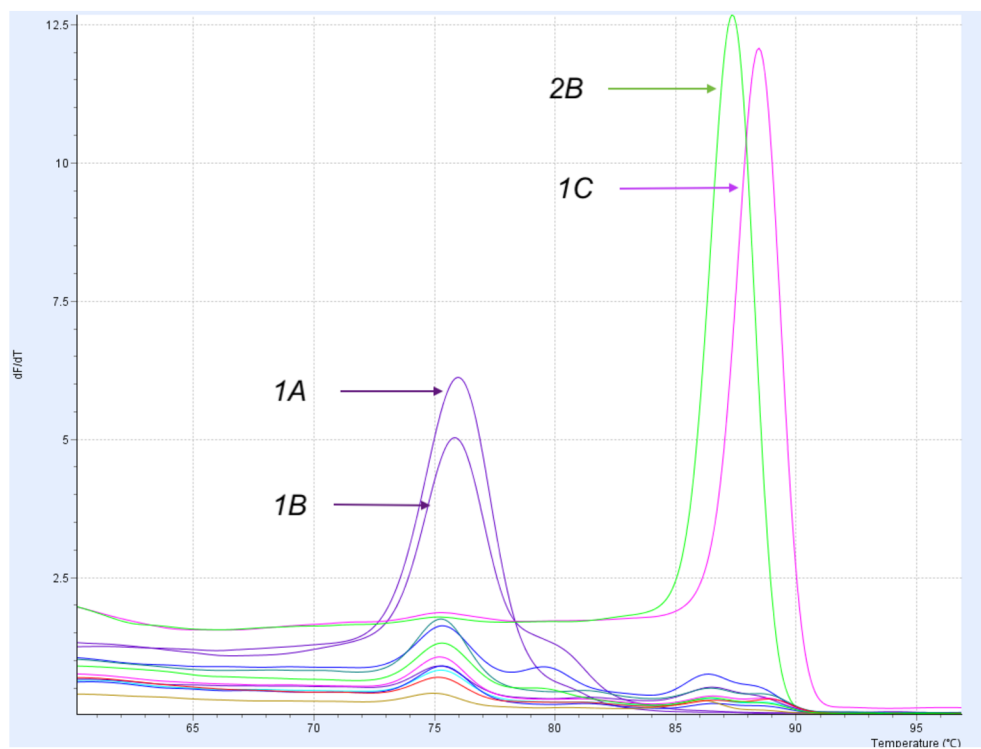
Tabulka č. 25: Naměřená prahová hodnota Ct pro doménu *Bacteria* pro vzorky B–TR (1A–1C), B–K (2A–2C) a J–KL (3A–3C)

Vzorek	typ	Ct
1A	U	13,099
1B	U	25,754
1C	U	19,271
2A	U	26,748
2B	U	26,976
2C	U	27,283
3A	U	26,948
3B	U	26,811
3C	U	26,605
<i>Bifidobacterium</i> 1	PK	27,03
<i>Bifidobacterium</i> 2	PK	27,236
matrice bez DNA	NK	-

Nejvyšší množství bakterií (doména *Bacteria*) obsahuje vzorek 1A (B–TR) s hodnotou Ct 13,099 a jako druhý s nejvyšším obsahem bakterií je vzorek 1C s prahovou hodnotou 19,271. Tato porovnávání lze také pozorovat pomocí amplifikační křivky (viz obrázek č. 9), kde při 11 cyklech začíná se amplifikovat vzorek 1C, potom 1A, 1B a 2B. Platí také, že čím rychleji amplifikační křivka dosáhne exponenciální fáze nebo překročí určitý práh fluorescence nastavený pro tuto fázi, tím více výchozích templátových molekul bylo přítomno ve vzorku na začátku reakce (tedy vyšší koncentrace vzorku). Ostatní vzorky se začaly amplifikovat po 25 cyklech, tedy od vzorků 2A–3C, pozitivní kontroly (jejich koncentrace je nižší). Ovšem podle výsledků všechny vzorky obsahovaly podle očekávání bakterie.



Obrázek č. 9: Amplifikační křivka pro doménu Bacteria



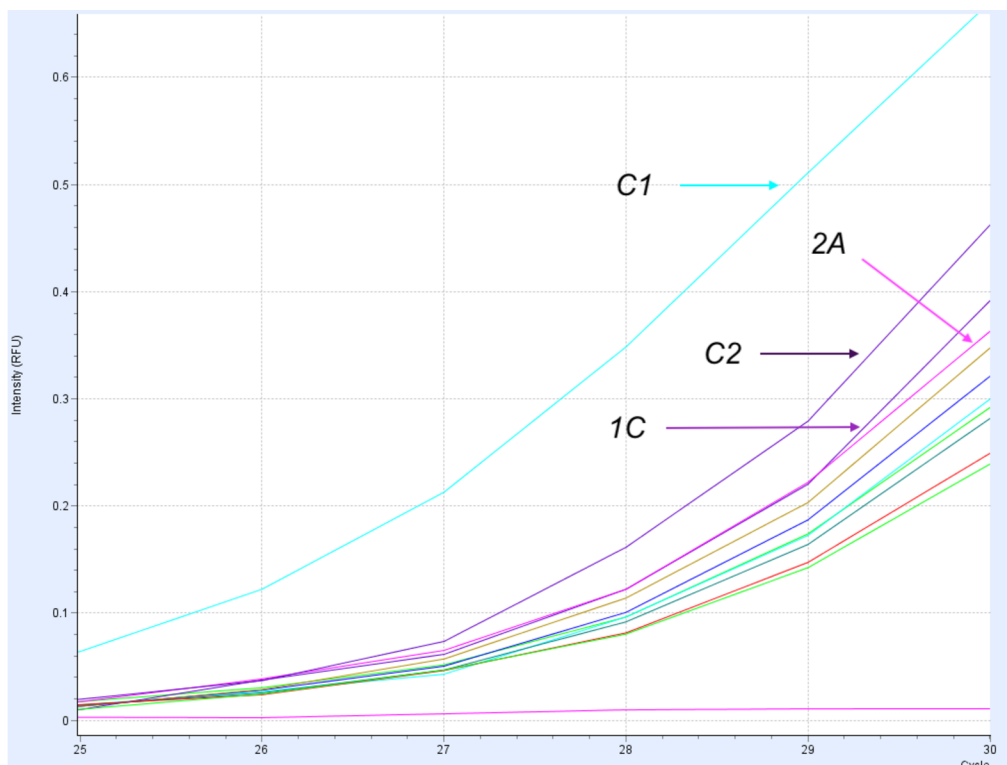
Obrázek č. 10: Melt křivka pro doménu Bacteria

Melt křivka (obrázek č. 10) ukazuje teplotu, při které dochází k denaturaci dvoušroubovice DNA amplifikované specifického produktu PCR. Vzorek 2B (B–K) se začal denaturovat při teplotě cca 83°C a vzorek 1C (B–TR) se začal denaturovat při teplotě 85° C. Ostatní vzorky se začaly denaturovat od 70°C. Pokud měření obsahuje jeden druh DNA, v tomto případě doménu *Bacteria* (primer), tak výsledkem měření bývá jeden pík (1 amplikon). Ovšem, pokud výsledkem hodnocení bývají 2 píky (tedy 2 amplikony), tak to znamená, že v těchto vzorcích indikuje přítomnost kontaminujících nebo mimocílových amplifikačních produktů.

Jelikož při senzoričtém hodnocení vzorků především u bulharských jogurtů (B–TR a B–K) byla cítit kvasinková chuť, byla ověřována přítomnost kvasinek u všech vzorků jogurtů pomocí qPCR měření. Na toto stanovení byly použity primery specifické pro celkové kvasinky (kapitola 2.4.2). Jako pozitivní kontrola byla použita DNA izolovaná z kultury kvasinek *Candida glabrata* CCM 8270. Analýza probíhala po 30 cyklech podle předem nastaveného programu (tabulka č. 10). Naměřené hodnoty jsou zobrazeny v tabulce č. 26.

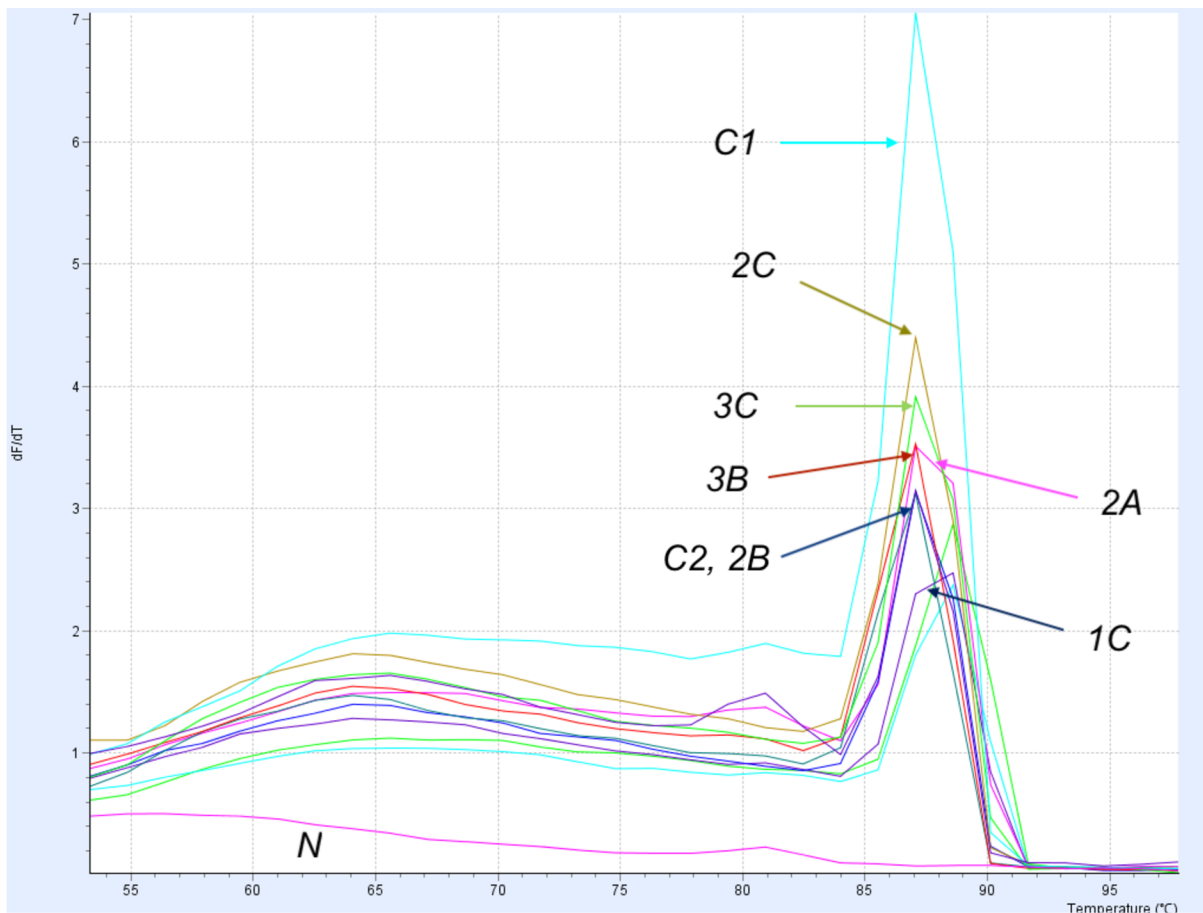
Tabulka č. 26: Naměřená prahová hodnota Ct pro celkové kvasinky pro vzorky B–TR (1A–1C), B–K (2A–2C) a J–KL (3A–3C)

Vzorek	typ	Ct
1A	U	27,404
1B	U	27,355
1C	U	26,894
2A	U	26,929
2B	U	27,233
2C	U	27,061
3A	U	27,493
3B	U	27,746
3C	U	27,829
<i>Candida</i> 1 (C1)	P	24,971
<i>Candida</i> 2 (C2)	P	26,504
matrice bez DNA	N	-



Obrázek č. 11: Amplifikační křivka pro kvasinky

Nejnižší prahovou hodnotu měl pozitivní vzorek C1 (*Candida* 1), který měl hodnotu 24,971, což znamená, že koncentrace cílové DNA, tj. DNA celkových kvasinek zde byla nejvyšší. Již z grafu (obrázek č. 11) je možné potvrdit, že opravdu tento vzorek se začal amplifikovat před 25. cyklem. Jako druhý nejkonzentrovanejší vzorek byl vzorek C2 (*Candida* 2) s prahovou hodnotou 26,504. Na obrázku č. 12 je možné posoudit, zda naše vyráběné vzorky jogurtů obsahují kvasinky.



Obrázek č. 12: Melt křivka pro kvasinky

U primeru C1 (1. pozitivní kontroly) neobsahoval žádný námi vyrobený vzorek jogurtů. Naopak u primeru C2 (2. pozitivní kontrola) obsahoval vzorek 2B (B—K) a patrně i vzorek 1C. Jelikož na obrázku č. 10 u doménu *Bacteria* se vyskytly 2 amplikony, tedy možného výskytu kontaminujícího či jiného amplifikačního produktu, je možné potvrdit, že již vzorek 1C a 2B obsahovaly kvasinky, protože denaturační teplota tání se také pohybuje od 85° C pro analýzu výskytu kvasinek pro obrázek č. 12.

4 ZÁVĚR

Tato práce se zabývala optimalizací výroby jogurtů a jejich charakterizací z hlediska sensorické kvality, profilu těkavých (aromatických) látek a mikrobiálního profilu.

Hlavní pozornost byla věnována bulharským jogurtům (balkánského typu), z nichž jeden byl vyroben přeočkováním tradičního jogurtu přímo převezeného z Bulharska a druhý byl „bulharský jogurt“ běžně dostupný v ČR. Oba byly porovnány s „klasickým“ jogurtem „českým“.

První část práce se zabývala optimalizací výroby vzorků, která se ukázala jako poměrně komplikovaná. Je nezbytné kontrolovat průběh prokysávání vzorků až do dosažení optimální kyselosti ($< 4,4$ pH) a hotové jogurty pak skladovat při nízké teplotě (< 5 °C) co nejkratší dobu.

Z výsledků sensorického hodnocení vyplývá, že hodnotitelům nejvíce chutnal, a byl pro ně nejvíce přijatelný i z hlediska celkové sensorické kvality, jogurt klasický. Je to pravděpodobně způsobeno poměrně výraznou (kyselou) chutí a vůní bulharského jogurtu (zvláště tradičního), což bylo pro konzervativní české konzumenty nezvyklé.

Jogurty mají různé organoleptické vlastnosti a každý jogurt má svoji výjimečnou chuť a vůni, a to souvisí s obsahem těkavých složek, které jsou obsaženy v jogurtech i obecně ve fermentovaných mléčných výrobcích. V této práci byly stanoveny těkavé (aromatické) látky pomocí metody HS-SPME-GC-MS, celkem bylo ve vzorcích identifikováno 24 sloučenin, z toho 6 alkoholů, 2 estery, 6 kyselin, 7 karbonylových sloučenin, 3 sírné sloučeniny.

Nejvíce těkavých látek obsahoval bulharský koupenny jogurt, u kterého bylo detekováno 17 těchto látek. To souviselo i s tím, že u tohoto vzorku připomínalo konzumentům chuť velmi hořkou, kvasinkovou, sladkou a jinou. Nejméně těkavých látek obsahoval vzorek J–KL (15 těk. látek), který nepřipomínal kyselou chuť jogurtu a obecně nebyl výraznější než u bulharských jogurtů. Také u vzorku B–TR bylo stanoveno 15 těkavých látek.

Vzorky se lišily především z hlediska obsahu identifikovaných sloučenin; podle celkové plochy píků nejvyšší obsah těkavých látek byl podle očekávání v bulharském tradičním jogurtu, nejnižší v jogurtu klasickém. U bulharských jogurtů převažovaly estery a kyseliny, v klasickém jogurtu to byly kyseliny a karbonylové sloučeniny.

Jelikož u bulharských jogurtů byla cítit silně kvasinková chuť, lze předpokládat, že by se v nich mohly nacházet kvasinky. Pomocí metody PCR bylo potvrzeno, že kromě standardních bakterií jogurtové kultury, bulharské jogurty kvasinky skutečně obsahovaly, pravděpodobně jako kontaminanty.

5 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

B-TR	bulharský jogurt „ tradiční“
B-K	bulharský jogurt vyráběný z bulharské kultury
bp	komplementární pár bází
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Gas chromatography - Mass spectrometry)
J-KL	jogurt klasický
PCR	polymerázová řetězová reakce
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (quantitative polymerase chain reaction)
SPME	mikroextrakce pevnou fází
M	molární koncentrace (mol. l ⁻³)
° SH	stupnice Soxhlet Henkel
° T	stupnice Thornerova
PK	pozitivní kontrola
NK	negativní kontrola

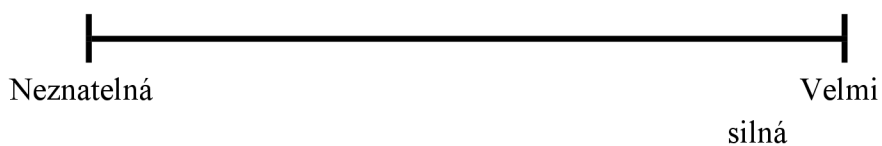
6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] PETROVA, Penka, Ivan IVANOV, Lidia TSIGORIYNA, Nadezhda VALCHEVA, Evgenia VASILEVA, Tsvetomila PARVANOVA-MANCHEVA, Alexander ARSOV a Kaloyan PETROV. Traditional Bulgarian Dairy Products: Ethnic Foods with Health Benefits. *Microorganisms* [online]. 2021, **9**(3), 480. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9030480
- [2] KOPÁČEK, Jiří. *Mléko a mléčné výrobky: jak poznáme kvalitu?* 1. vyd. Praha: Sdružení českých spotřebitelů : Potravinářská komora ČR, 2014. ISBN 978-80-87719-18-3.
- [3] HADAŠOVÁ, Klára. *Domácí mlékař, aneb, Jak přijít vlastním přičiněním k mléčným produktům.* Vyd. 1. Průhonice: Analfabet, 2014. ISBN 978-80-905790-0-2.
- [4] NAGAOKA, Seiji. Yogurt Production. In: Makoto KANAUCHI, ed. *Lactic Acid Bacteria* [online]. New York, NY: Springer New York, 2019 [vid. 2023-02-28], Methods in Molecular Biology, s. 45–54. ISBN 978-1-4939-8906-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-8907-2_5
- [5] AYBUKE CEYHUN SEZGIN¹, BUSRA ACIKALIN¹, NEVIN SANLIER. Fermented Dairy Products for Health Benefits [online]. 2022, **9**(7), 1–7. Dostupné z: doi:10.18410/jebmh/2022/01.50478
- [6] KAUR, Ramandeep, Gurpreet KAUR, RIMA, Santosh Kumar MISHRA, Harsh PANWAR, K.K. MISHRA a Gurvir Singh BRAR. Yogurt: A Nature's Wonder for Mankind. *International Journal of Fermented Foods* [online]. 2017, **6**(1), 57. ISSN 2319-3549, 2321-712X. Dostupné z: doi:10.5958/2321-712X.2017.00006.0
- [7] WEERATHILAKE W.A.D.V., Rasika D.M.D., Ruwanmali J.K.U. a Munasinghe M.A.D.D. The evolution, processing, varieties and health benefits of yogurt. 2014, **4**(4). ISSN 2250-3153.
- [8] DRAGOUNOVÁ, Hedvika. *Hodnocení jakosti mléka a mlékárenských výrobků: návody pro praktická cvičení.* Vyd. 1. Praha: Česká zemědělská univerzita, Agronomická fakulta : ISV, 2003. ISBN 978-80-86642-24-6.
- [9] IVANOV, Ivan, Kaloyan PETROV, Valentin LOZANOV, Iassen HRISTOV, Zhengjun WU, Zhenmin LIU a Penka PETROVA. Bioactive Compounds Produced by the Accompanying Microflora in Bulgarian Yoghurt. *Processes* [online]. 2021, **9**(1) [cit. 2023-05-08]. ISSN 2227-9717. Dostupné z: doi:10.3390/pr9010114
- [10] VELIKOVA, Petya, Kaloyan PETROV, Valentin LOZANOV, Flora TSVETANOVA, Anton STOYANOV, Zhengjun WU, Zhenmin LIU a Penka PETROVA. Microbial diversity and health-promoting properties of the traditional Bulgarian yogurt. *Processes* [online]. 2018, **32**(5), 1205-1217 [cit. 2023-05-08]. ISSN 1310-2818. Dostupné z: doi:10.1080/13102818.2018.1475255
- [11] BUTTRISS, Judith, Kaloyan PETROV, Valentin LOZANOV, Flora TSVETANOVA, Anton STOYANOV, Zhengjun WU, Zhenmin LIU a Penka PETROVA. Nutritional properties of fermented milk products. *International Journal of Dairy Technology* [online]. 1997, **50**(1), 21-27 [cit. 2023-05-08]. ISSN 1364-727X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-0307.1997.tb01731.x
- [12] *The Best Probiotic Strains and Their Benefits* [online]. Dostupné z: <https://biokplus.com/blogs/news/the-best-probiotic-strains-and-their-benefits>
- [13] The Nutritional Composition of Dairy Products. *Dairy Council*. 2013.

- [14] PASKOV, V.P. *Bulharský jogurt - technologická a fyzikálně chemická charakterizace v reakci na nové evropské požadavky pro funkční mléčné výrobky. (Bulgarian „kiselo mljako“ - technological and physicochemical characterization in term of the EU requirements for functional milk products)*. Sofie, 2012. Disertační práce. Vysoká škola chemicko-technologická a metalurgická, Ústav chemického inženýrství.
- [15] KALHOTKA, L., ŠUSTOVÁ, K., GÖBEL, T., KVASNIČKOVÁ, B.: The microbiological and sensory qualities of yoghurts and their changes after of „best before“ date. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, 2009, LVII, No. 5, pp. 167–176. nedatováno.
- [16] BIERZUNSKA, Paulina, Dorota CAIS-SOKOLÍNSKA a Asli YIĞIT. Storage Stability of Texture and Sensory Properties of Yogurt with the Addition of Polymerized Whey Proteins. *Foods* [online]. 2019, **8**(11), 548. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods8110548
- [17] JAROŠOVÁ, Alžběta. *Senzorické hodnocení potravin*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2001. ISBN 978-80-7157-539-9.
- [18] JEŽEK, František. *Senzorická analýza potravin: návody na cvičení*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-724-4.
- [19] JEŽEK, František a Alena SALÁKOVÁ. *SENZORICKÁ ANALÝZA POTRAVIN*. Brno: FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE, 2012. CZ.1.07/2.2.00/15.0063.
- [20] *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. **50**. 2010 [cit. 2023-05-08]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408390903044081>
- [21] VESELÁ, Mária a Milan DRDÁK. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 2. vyd. přeprac. Brno: VUTIUM, 1999. ISBN 80-214-1305-0.
Brno: Vysoké učení technické, Chemická fakulta, 1999. ISBN 978-80-214-1305-4.
- [22] ZHANG, Li, Si MI, Ruo-bing LIU, Ya-xin SANG a Xiang-hong WANG. Evaluation of Volatile Compounds during the Fermentation Process of Yogurts by *Streptococcus thermophilus* Based on Odor Activity Value and Heat Map Analysis. *International Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2020, **2020**, 1-10 [cit. 2023-05-08]. ISSN 1687-8760. Dostupné z: doi:10.1155/2020/3242854
- [23] KIM, Jua, Young-Min KIM, Veeranjaneya Reddy LEBAKA, Young-Jung WEE a Xiang-hong WANG. Lactic Acid for Green Chemical Industry: Recent Advances in and Future Prospects for Production Technology, Recovery, and Applications. *Fermentation* [online]. 2022, **8**(11), 938-950 [cit. 2023-05-08]. ISSN 2311-5637. Dostupné z: doi:10.3390/fermentation8110609
- [24] ZOURARI, A., J. P. ACCOLAS, M. J. DESMAZEAUD, Young-Jung WEE a Xiang-hong WANG. Metabolism and biochemical characteristics of yogurt bacteria. A review: Recent Advances in and Future Prospects for Production Technology, Recovery, and Applications. *Le Lait* [online]. 1992, **72**(1), 1-34 [cit. 2023-05-08]. ISSN 0023-7302. Dostupné z: doi:10.1051/lait:199211
- [25] CARRILLO-CARRIÓN, C., S. CÁRDENAS, M. VALCÁRCEL, Young-Jung WEE a Xiang-hong WANG. Vanguard/rearguard strategy for the evaluation of the degradation of yoghurt samples based on the direct analysis of the volatiles profile through headspace-gas chromatography–mass spectrometry: Recent Advances in and Future Prospects for Production Technology, Recovery, and Applications. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, **1141**(1), 98-105 [cit. 2023-05-08]. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2006.11.108

- [26] PAVAN M. V., Raja a Barron ANDREW R. *PHYSICAL METHODS IN CHEMISTRY AND NANO SCIENCE* [online]. B.m.: Rice University, 2019. Dostupné z: <https://hdl.handle.net/1911/112293>
- [27] ZHANG, Yi-Cai, Qin-Bao LIN, Huai-Ning ZHONG, Ying ZENG a Xiang-hong WANG. Identification and source analysis of volatile flavor compounds in paper packaged yogurt by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry: Recent Advances in and Future Prospects for Production Technology, Recovery, and Applications. *Food Packaging and Shelf Life* [online]. 2022, **34**(1), 98-105 [cit. 2023-05-08]. ISSN 22142894. Dostupné z: doi:10.1016/j.fpsl.2022.100947
- [28] DAN, T., D. WANG, R.L. JIN, H.P. ZHANG, T.T. ZHOU a T.S. SUN. Characterization of volatile compounds in fermented milk using solid-phase microextraction methods coupled with gas chromatography-mass spectrometry: Recent Advances in and Future Prospects for Production Technology, Recovery, and Applications. *Journal of Dairy Science* [online]. 2017, **100**(4), 2488-2500 [cit. 2023-05-08]. ISSN 00220302. Dostupné z: doi:10.3168/jds.2016-11528
- [29] V. MONTEALEGRE, Michael. *CHEM 32 ORGANIC CHEMISTRY 2 Laboratory* [online]. říjen 2009. Dostupné z: buchem.weebly.com
- [30] WAN, Na, Jing LAN, Zhenfeng WU, Xinying CHEN, Qin ZHENG a Xingchu GONG. Optimization of Steam Distillation Process and Chemical Constituents of Volatile Oil from *Angelicaesinensis Radix*: Recent Advances in and Future Prospects for Production Technology, Recovery, and Applications. *Separations*[online]. 2022, **9**(6), 2488-2500 [cit. 2023-05-08]. ISSN 2297-8739. Dostupné z: doi:10.3390/separations9060137
- [31] *Foods* [online]. 12. 2023 [cit. 2023-05-08]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2304-8158/12/6/1275>
- [32] CUPÁKOVÁ, Šárka, Renáta KARPIŠKOVÁ a Lenka NECIDOVÁ. *Mikrobiologie potravin - praktická cvičení II.: metody stanovení mikroorganismů v potravinách*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2010. ISBN 978-80-7305-126-6.
- [33] JEBAVÁ, Ing. Iva. Kvantitativní stanovení bakterií mléčného kvašení (BMK) v potravinách. In: 2) *Kvantitativní stanovení jednotlivých kmenů BMK pomocí qPCR*. Ústav mléka, tuků a kosmetiky: Vysoká škola chemicko-technologická, nedatováno.
- [34] ZHANG, Hongfa a Chunping YOU. 16S ribosomal RNA-depletion PCR and its application in cause analysis of yogurt package shrinkage. *Journal of Dairy Science* [online]. 2022, **105**(9), 7288-7297 [cit. 2023-05-08]. ISSN 00220302. Dostupné z: doi:10.3168/jds.2021-21575
- [35] CLARRIDGE, Jill E. a Chunping YOU. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2004, **17**(4), 840-862 [cit. 2023-05-08]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.17.4.840-862.2004
- [36] VÍTOVÁ, Eva. *Praktikum z molekulární biotechnologie*. B.m.: ÚCHBPT, 2015.
- [37] KIRCHDORF, Jakub. *Vliv obsahu sušiny na profil ékových látek vybraných kysaných mléčných výrobků*. Brno, 2022. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, fakulta chemická.
- [38] ROGINSKI, Hubert, John W. FUQUAY a P. F. FOX, ed. *Encyclopedia of dairy sciences*. Amsterdam ; New York: Academic Press, 2003. ISBN 978-0-12-227235-6.

a. Intenzita chuti

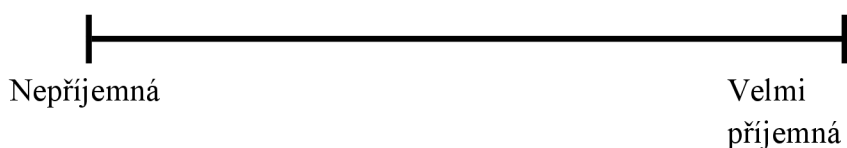


b. Příjemnost chuti

Popis krajních bodů:

Velmi příjemná – čistá, smetanová, jemně mléčně nakyslá, jogurtová

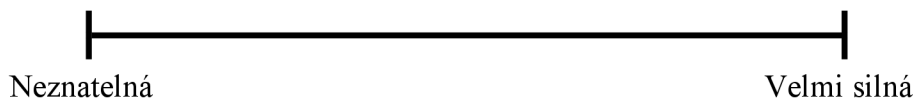
Nepříjemná – málo nebo naopak příliš kyselá, nepříjemná, nahořklá, cizí pachuti a jiné vady



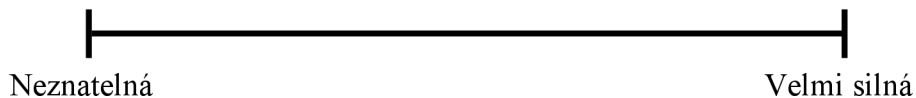
Připomínky

C. PROFILOVÝ TEST VYBRANÝCH CHUTÍ

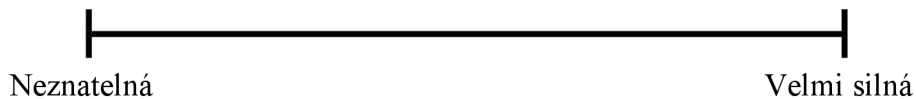
Sladká



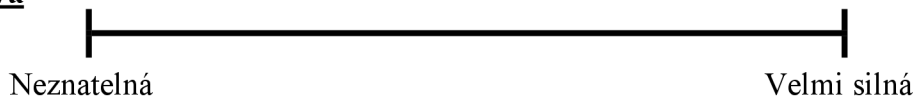
Kyselá



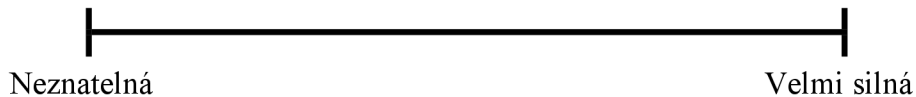
Hořká



Kvasinková



Jiná

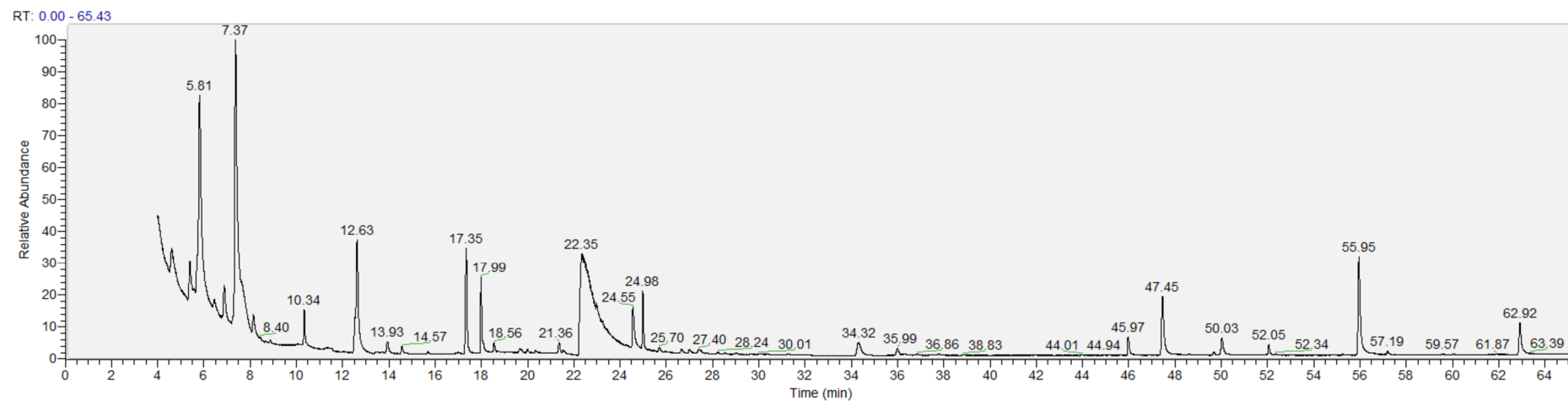


D. POŘADOVÝ TEST

V následující tabulce seřaďte vzorky podle **celkové přijatelnosti**

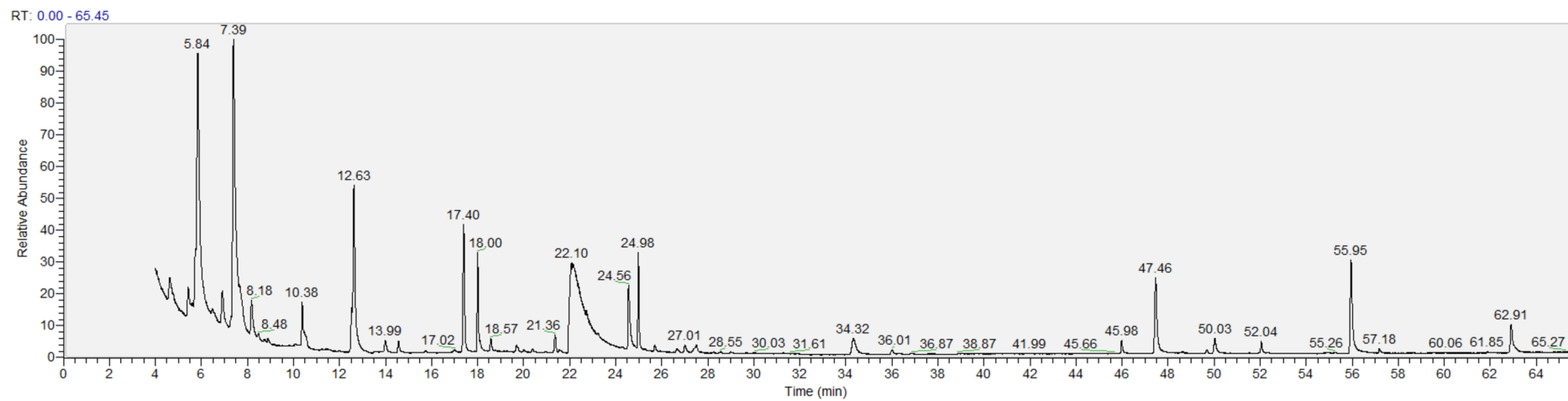
Pořadí vzorků	1. (nejlepší)	2.	3. (nejhorší)
Kód vzorku			

Příloha č. 2



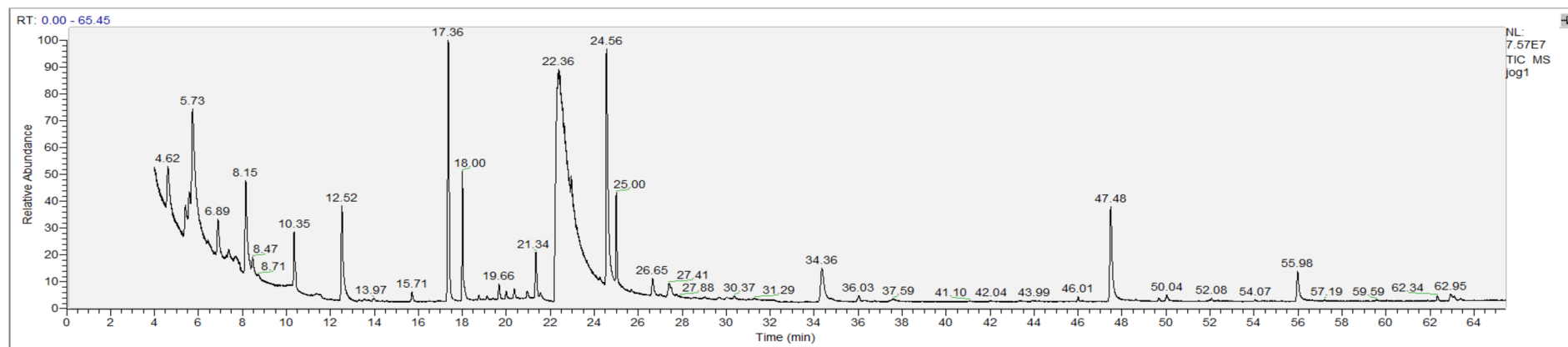
Obrázek č. 12: Chromatogram těkavých látek identifikovaných ve vzorku B-TR (identifikace sloučenin viz tabulka č. 17)

Příloha č. 3



Obrázek č. 13: Chromatogram těkavých látek identifikovaných ve vzorku B-K (identifikace sloučenin viz tabulka č. 17)

Příloha č. 4



Obrázek č. 14: Chromatogram těkavých látek identifikovaných ve vzorku J-KL (identifikace sloučenin viz tabulka č. 17)