

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

Bakalářská práce

**SLEDOVÁNÍ RŮSTU KULTURNÍ MIKROFLÓRY
BĚHEM FERMENTACE MLÉKÁRENSKÉ SUROVINY**

(A survey of lactic bacteria growth during fermentation of bulk milk)

Vedoucí	Ing. Eva Samková, Ph.D.
Autor práce:	Hana Leherová
Fakulta:	Zemědělská
Katedra:	Veterinárních disciplín a kvality produktů
Studijní obor:	B4131 Agropodnikání
Ročník:	3

Prohlašuji, že svoji bakalářskou jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

15. dubna 2011

vlastnoruční podpis studentky – studenta

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

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

ABSTRAKT

Práce se zabývá sledováním růstu kulturní mikroflóry během fermentace mlékárenské suroviny. Cílem práce bylo sledovat růstovou aktivitu bakterií mléčného kysání rodů *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* mikrobiologickými metodami a změny titrační kyselosti v průběhu fermentace mléka při výrobě jogurtů.

Klíčová slova: mléko, bakterie mléčného kvašení, jogurt

ABSTRACT

The paper deals with monitoring of the cultural growth of microflora during fermentation of dairy ingredients. The aim was to monitor the growth activity of lactic acid bacteria of the general *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* by microbiological methods and changes in titratable acidity during fermentation of milk in the production of yogurt.

Key words: milk, lactic acid bacteria, yoghurt

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1	Mléko a jeho kvalita	2
2.1.1	Charakteristika kravského mléka	2
2.1.2	Požadavky na kvalitu mléka	3
2.2	Jogurt a jeho kvalita	4
2.2.1	Historie, charakteristika a význam jogurtů	5
2.2.2	Požadavky na hygienu při výrobě jogurtu	8
2.2.3	Technologie výroby jogurtů	9
2.2.4	Vady kysaných mléčných výrobků	10
2.3	Čisté mlékařské kultury (ČMK)	11
2.3.1	Význam ČMK	11
2.3.2	Požadavky na surovinu pro výrobu ČMK	13
2.3.3	Požadavky na ČMK	13
2.3.4	Charakteristika a požadavky na jogurtovou kulturu	14
3	EXPERIMENTÁLNÍ A METODICKÁ ČÁST	18
3.1	Cíl práce	18
3.2	Technologie výroby jogurtů ve společnosti "AGRO-LA"	18
3.3	Metody stanovení	18
3.3.1	Stanovení <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	19
3.3.2	Stanovení <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	20
3.3.3	Stanovení titrační kyselosti jogurtu	22
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	24
4.1	Sledování titrační kyselosti	24
4.1.1	Titrační kyselost jogurtů v průběhu roku	24
4.1.2	Titrační kyselost v průběhu fermentace	25

4.2	Sledování růstu mikroorganismů	27
4.2.1	Dynamika růstu celkového množství mikroorganismů	27
4.2.2	Dynamika růstu kmenů <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> a <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	30
5	ZÁVĚR.....	36
6	SUMMARY	37
7	SEZNAM LITERATURY	38

1 ÚVOD

Fermentované mléčné výrobky patří mezi tradiční a populární výrobky mlékárenského průmyslu. Jejich tržní sortiment se neustále rozšiřuje a výrobky jsou oblíbeny. Mnohé z nich se uplatňují v různých dietách a při léčebné výživě. Fermentovaná mléka jsou produkty vyrobené z mléka o různé tučnosti a sušině, které bylo fermentováno pomocí speciálních mikroorganismů. Během fermentace mléka je část přítomné laktózy přeměněna na kyselinu mléčnou, která snižuje pH výrobku a zamezuje růstu nežádoucích bakterií.

Cílem práce bylo sledování růstu kulturní mikroflóry během fermentace mlékárenské suroviny – mléka. Experimentální část bakalářské práce byla zaměřena na sledování růstových křivek bakterií mléčného kysání rodů *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* mikrobiologickými metodami a změn titrační kyselosti v průběhu fermentace mléka při výrobě jogurtů. Experimentální práce byly uskutečněny ve společnosti “AGRO-LA“, spol. s r.o., Jindřichův Hradec.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Mléko a jeho kvalita

2.1.1 Charakteristika kravského mléka

Mléko je zemědělský produkt zvláštního významu, jak pro výrobce, tak i spotřebitele. Mléko je jedním z mála zemědělských výrobků ze živočišné produkce, které se hodí bez dalšího zpracování k přímé konzumaci.

Vzhledem k tomu, že mléko má vysokou nutriční hodnotu – obsahuje vápník, fosfor, draslík, hořčík, jód, zinek, karotenoidy, vitamíny A, E, D, aminokyseliny (lyzin, tyrozin, fenylalanin, leucin) – je významné pro lidskou výživu. Zvláště pro děti, dospívající mládež, ale také pro starší a nemocí oslabené jedince je mléko téměř nenahraditelnou částí denního jídelníčku u velké části populace (DOLEŽAL, 2000).

Je zřejmé, že mléko představuje ucelený komplex látek potřebných k výživě (tabulka 1). Mléko dává člověku nejen nejhodnotnější živočišné bílkoviny, ale i dobře stravitelný tuk a cukry důležité pro látkovou výměnu. Kromě toho jsou v mléce mimořádně cenné a pro lidské tělo nezbytné minerální, důležité stopové prvky a neocenitelné vitamíny (TEPLÝ, 1968).

Tabulka 1 Průměrné složení kravského mléka (%) podle Zadražila (2002):

Voda	max. 87,25
Sušina	min. 12,75
z toho:	
- obsah laktózy	4,60 – 4,90
- obsah bílkovin	2,80 – 3,60
- obsah mléčného tuku	3,20 – 6,00
- obsah minerálií	0,80 – 1,10
- obsah nebílkovinného dusíku	0,015 – 0,029
- (obsah močoviny)	(2,50 – 5,00 mmol/l)

Množství a složení mléka i jeho vlastností záleží na řadě vnějších i vnitřních faktorů. Mezi vnitřní faktory můžeme počítat plemennou příslušnost, dědičnost, individualitu dojnice, aktivitu mléčné žlázy, dýchací a krevní systém, plodnost, věk a další. Vnitřními faktory jsou podmínky chovu, výživa (GRIEGER, 1990).

Mezi fyziologické funkce řadíme laktační stádium, pohlavní funkce, zdravotní stav (MARENDIAK a kol., 1987).

2.1.2 *Požadavky na kvalitu mléka*

Kvalitu mléka jako potravinářské suroviny lze definovat jako souhrn nejdůležitějších, různým způsobem zjistitelných či měřitelných vlastností, které nás informují o vhodnosti pro zpracování a kulinářskou úpravu, ale i o nezávadnosti pro konzumenty nebo též o pozitivním přínosu pro zdraví populace (DOLEŽAL, 2000).

Legislativní požadavky na syrové kravské mléko jsou dány Nařízením Komise (ES) č.1020/2008, které z mikrobiologických kritérií obsahuje pouze limit pro celkový počet mikroorganismů (CPM), a to v syrovém mléce dodaném ke zpracování ($\leq 100\ 000$ kolonií tvořících jednotek (KTJ)/ml), v syrovém mléce bezprostředně před tepelným ošetřením ($\leq 300\ 000$ KTJ/ml) a v tepelně ošetřeném mléce používaném pro výrobu mléčných výrobků ($\leq 100\ 000$ KTJ/ml).

Jakostní znaky pro syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování jsou uvedeny v normě ČSN 57 0529 (1998). Kromě výše zmíněného CPM norma udává doplňkové mikrobiologické znaky jakosti: počet psychrotrofních mikroorganismů ≤ 50 tis. KTJ/ml, počet termorezistentních mikroorganismů $\leq 2\ 000$ KTJ/ml, počet koliformních bakterií $\leq 1\ 000$ KTJ/ml a negativní výsledky testu na sporotvorné anaerobní mikroorganismy v 0,1 ml.

Podle *Vyhlášky 77/2003 Sb.* v platném znění, §3, *odst. 3*, se kravské mléko označuje pouze jako mléko.

ŠTĚTINA (2002, 2009) uvádí základní požadavky na vlastnosti mléka přijímaného ke zpracování:

- mléko musí pocházet od zdravých dojnic, kritériem je počet somatických buněk ($\leq 400\ 000$ /ml),
- nesmí obsahovat inhibiční látky, tj. rezidua antibiotik nebo zbytků dezinfekčních a čisticích prostředků, neboť mléčné bakterie jsou na inhibiční látky velmi citlivé,
- celkový počet mikroorganismů by neměl překročit $100\ 000$ KTJ/ml,
- mléko musí mít neporušené složení, např. podle obsahu tuku a bílkovin, bodu mrznutí a podle titrační kyselosti,
- musí být dodržena teplota uchování $4 - 6\ ^\circ\text{C}$,

- sensorické znaky jakosti – barva, konzistence a vzhled, chuť a vůně musí být typické pro mléko bez zjevných změn, příchutí a pachů.

2.2 Jogurt a jeho kvalita

Fermentované mléčné nápoje zakysané a zkvašené, jsou v podstatě biologicky aktivní mléka. Ve srovnání se sladkým mlékem mají mnoho předností, v některých státech jsou nejoblíbenější z kysaných mléčných produktů a mají vysokou přidanou hodnotu. Významnou předností těchto výrobků je i to, že jsou mnohem trvanlivější než obyčejné mléko, a lze je proto déle skladovat (ŽIŽKA, 1980).

Výroba fermentovaných mlék představuje progresivní způsob zpracování mléka na výrobky ceněné pro pozitivní vlastnosti nutriční, sensorické i dietetické (PLOCKOVÁ, 2009).

Výživná a léčebná hodnota zakysaných a zakvašených mléčných výrobků spočívá především v tom, že obsahují všechny důležité složky mléka, ale nepřetěžují trávicí orgány. Je to dáno tím, že bílkoviny se vysrážejí v jemných vločkách, které se rychle a lépe tráví. Kyselina mléčná zlepšuje resorpci vitamínů a některých aminokyselin, které se uvolňují při enzymovém odbourávání bílkovin. Působením některých druhů čistých kultur použitých ve výrobě dochází dále k částečné hydrolýze mléčného tuku a také k tvorbě antibiotických látek, které mají tlumivý účinek na růst některých škodlivých mikroorganismů.

Mezi nejznámější zakysané mléčné výrobky s příznivými výživnými a dietetickými účinky patří jogurt. Celosvětově patří k nejrozšířenějším fermentovaným výrobkům s termofilními bakteriemi mléčného kysání.

2.2.1 *Historie, charakteristika a význam jogurtů*

Historie jogurtu

Historie jogurtu sahá až do starověku. Nejstarší písemná zmínka o jogurtu je připisována římskému spisovateli Pliniovi staršímu. Ten ve svých zápiscích poznamenává, že některé „barbarské kmeny“ uměly „zahustit mléko na příjemně kyselou hmotu“. Důkazy o existenci kysaných mléčných výrobků však sahají až do 3. tisíciletí před naším letopočtem.

První jogurt vznikl náhodným kysáním, pravděpodobně při kontaktu s bakteriemi, které se nacházely uvnitř vaku z kozí kůže, v němž bylo přepravováno mléko. Teplé prostředí ve vaku vytvořilo vhodné podmínky pro bakterie mléčného kysání.

Za zemi původu je považováno Bulharsko. Podle jiných teorií pochází jogurt odněkud z oblasti Středního východu, z území dnešního Íránu nebo Kurdistánu. V tomto regionu se do dnešních dní vyrábí jogurt tradičně fermentací ve vaku z kozí nebo ovčí kůže.

Rozšíření jogurtu do Evropy

Do evropského jídelníčku se jogurt dostal z východu nejprve jako lék. Stalo se tak v 16. století díky francouzskému králi Františku I. Ten, když trpěl těžkými zažívacími potížemi a nikdo z dvorních lékařů ho neuměl vyléčit, požádal o pomoc tureckého sultána Sulejmana I. Sultán poslal z Istanbulu lékaře, který Františka I. vyléčil podáváním jogurtu z ovčího mléka.

Na začátku minulého století byl pak v Evropě rozpoznán a popsán význam jogurtu pro zdraví člověka. Známý ruský lékař a badatel, ředitel Pasteurova institutu v Paříži, prof. Ilja Iljič Mečnikov vyslovil jako první hypotézu, že dlouhověkost bulharských pastevců je dána specifickým způsobem jejich stravování. Pastevci každodenně konzumovali velké množství kysaného mléka a jogurtu. Profesor Mečnikov identifikoval v kysaném mléku dva kmeny bakterií, kterým přisoudil onen pozitivní vliv na dlouhověkost (ŠTAFEN, 2011).

Mikrobiologie jogurtu

Mikroflóra jogurtu představuje směs koků a tyčinek: *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Obě skupiny se

při společné kultivaci vzájemně ovlivňují. Na začátku kultivace rychleji rostou koky, neboť *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* hydrolyzuje kasein, tím uvolňuje aminokyseliny, které potřebují koky při svém růstu. V pozdějším stádiu zrání rychleji rostou tyčinky a vytvářejí větší množství kyseliny mléčné. Zvýšená kyselost omezuje další růst koků (PIJANOWSKI, 1977).

Rozdělení jogurtu dle technologických kritérií

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

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

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

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

Význam jogurtu ve výživě

Jogurt je vyvážená a zdraví prospěšná potravina. Při své relativně nízké energetické hodnotě je jogurt bohatým zdrojem plnohodnotných bílkovin, vápníku, fosforu a různých vitaminů skupiny B (tabulka 2).

Tabulka 2 Průměrný obsah složek ve 100g jogurtu podle Spheerise (2002)

	Jednotky	Plnotučný jogurt	Nízkotučný jogurt
Energetická hodnota	kalorie	72	62
Bílkoviny	g	3,9	4,5
Tuk	g	3,4	1,6
Sacharidy	g	4,9	6,5
Vápník	mg	145	50
Fosfor	mg	114	118
Sodík	mg	47	51
Draslík	mg	186	192

Bakteriální kultury obsažené v jogurtu pozitivně ovlivňují složení střevní mikroflóry. Nenahraditelné jsou ve chvíli, kdy je rovnováha bakterií v trávicím traktu narušena, například po léčbě antibiotiky. Jogurty díky obsahu zdraví prospěšných živých kultur dlouhodobě napomáhají snadnějšímu vstřebávání minerálních látek a některých vitaminů. V neposlední řadě pomáhají jogurtové bakterie chránit dětský organismus před průjmovými onemocněními a omezují s nimi spojený úbytek hmotnosti. Pravidelná konzumace jogurtů má příznivé účinky na lidský organismus.

ŠTAFEN (2011) uvádí, že přibližně 10-15 % české populace trpí metabolickou poruchou zvanou intolerancí laktózy. Tito lidé se vyhýbají, velice často pod vlivem ne vždy pravdivých informací, konzumaci všech mléčných výrobků. Neuvědomují si však, že laktózová intolerance je důsledek reakce jejich těla na konkrétní proces. Příčinou těchto problémů je skutečnost, že nejsou schopni využít mléčný cukr laktózu, neboť jejich tělo neprodukuje potřebný enzym nazvaný laktáza. V důsledku toho se laktóza dostává nestrávená do střeva, což u těchto lidí způsobuje střevní koliky, průjemy a zvracení. Jogurty jsou vhodnou alternativou konzumace mléka pro takto postižené jedince, protože výše zmíněnou poruchu metabolismu pomohou řešit. Jogurtové kultury totiž samy produkují enzym laktázu, který již v samotném jogurtu štěpí laktózu na glukózu a galaktózu. Následně jsou tyto jednoduché cukry přeměněny na kyselinu mléčnou.

ŽIŽKA (1980) uvádí, že v Japonsku zjistili velmi dobré účinky jogurtu při léčení nepříznivých následků radioaktivního záření.

SPHEERIS (2002) uvádí, že konzumace 100g nízkotučného jogurtu z pohledu výživy pokrývá:

- 39% doporučené denní dávky vápníku
- 24 % doporučené denní dávky vitamínu B2
- 25% doporučené denní dávky fosforu
- 20 % doporučené denní dávky bílkovin
- 4 % doporučené denní dávky tuku
- 4 % doporučené denní dávky sacharidů

2.2.2 Požadavky na hygienu při výrobě jogurtu

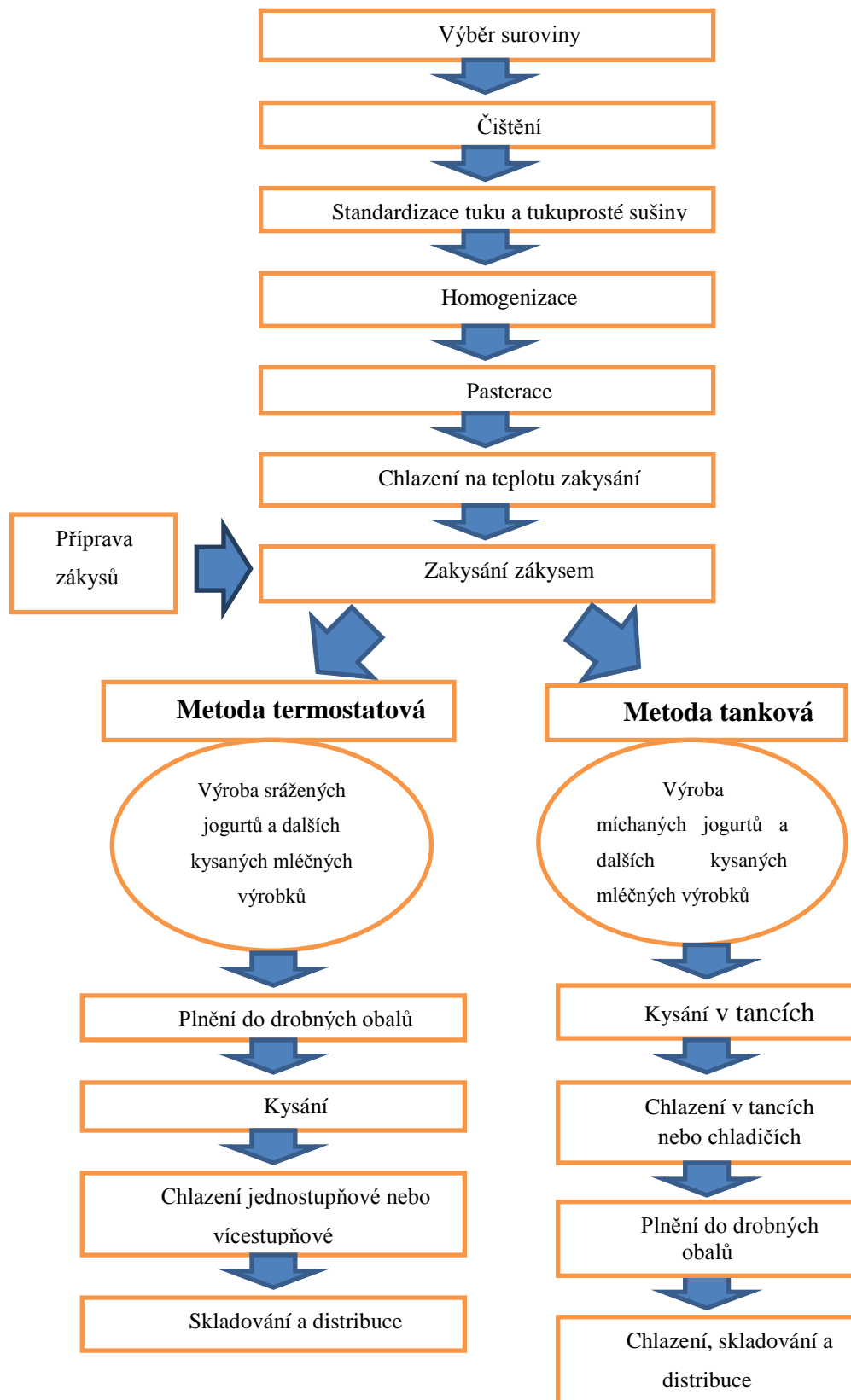
Mléko určené pro výrobu jogurtu nesmí obsahovat žádné látky, které by tlumily rozvoj kulturní mikroflóry. Mléko musí být získáváno hygienickým způsobem od zdravých dojnic, musí splňovat legislativní požadavky a obsahovat co nejnižší počet nežádoucích mikroorganismů. Dále musí vykazovat dobrou kysací schopnost.

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

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

2.2.3 Technologie výroby jogurtů

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



2.2.4 *Vady kysaných mléčných výrobků*

Příčiny vad kysaných mléčných výrobků jsou velmi různorodé povahy, proto se různě projevují. Tam, kde se vyrábí jogurt z mléka zahuštěného s použitím sušeného mléka, je třeba dbát na kvalitu sušeného mléka. Nekvalitní sušené mléko způsobuje v praxi často potíže v prokysávání i konzistenci, které se nesprávně přičítají čistě kultuře a z ní připravenému provoznímu zákysu.

Nedostatky v kvalitě vstupních surovin či technologii mohou způsobovat podle GRIEGERA (1990) následující vady:

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

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

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

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

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

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

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

2.3 Čisté mlékařské kultury (ČMK)

ČMK jsou ušlechtilé mikroorganismy pro výrobu mléčných výrobků a to zejména kysaných mléčných výrobků, tvarohů, sýrů, popř. dalších fermentovaných výrobků (KADLEC, 2009).

ČMK jsou vyráběny v různých formách a pro rozdílné aplikace. Forma mlékařských kultur může být lyofilizovaná, tekutá a mražená. Mlékařské kultury jsou aplikovány jako matečné, provozní nebo jako kultury pro přímé očkování.

Pro mlékárenskou produkci jsou ČMK vybírány na základě požadovaných vlastností pro mlékárenskou aplikaci, tj. na základě biochemických, senzorických a reologických vlastností. Jsou vyráběny buď jako monokultury nebo jako směsné kultury složené z různých kmenů stejného druhu nebo různých druhů mikroorganismů.

Používání ČMK dává předpoklad k dosažení dobré, standardní kvality výrobků. Snižuje se riziko nevyhovujících produktů a zvyšuje se hospodárnost výroby. ČMK umožňují též rozšiřování sortimentu výrobků.

2.3.1 Význam ČMK

ČMK se uplatňují ve většině výrobních úseků mlékárenského průmyslu. Především k nim patří několik vybraných variet kultury jogurtové, dále kultura pro výrobu acidofilního jogurtu, kultura kefírová a samozřejmě kultura smetanová (KNĚZ, 1960).

Funkci ČMK lze rozdělit do několika skupin, dělené podle základního účelu, kterému ve výrobě slouží:

Fyzikálně-chemické změny - mající vliv na strukturu a konzistenci výrobků. Jde především o funkci koagulační, vyvolanou kyselinou mléčnou, která vzniká činností bakterií mléčného kysání. Kyselina mléčná odštěpuje vápník vázaný na kasein a vytváří volný kasein a mléčnan vápenatý. V druhé fázi se kasein převádí do isoelektrického stavu (pH 4,55), v němž má nejnižší rozpustnost a vylučuje se. Pokud se průběhem kysání nedosáhne isoelektrického bodu kaseinu, kasein (pokud se nezahřívá) se viditelně nesráží, avšak nabobtnává a silně houstne. Tím se značně mění viskozita, struktura i chuť kultur mléčného kysání.

Ochranné faktory - důležitou funkcí ČMK je tvorba ochranných látek, kterými kultury zasahují do vzájemného poměru v mikroflóře a zabraňují rozvoji typických nepříznivých mikroorganismů mléka a mléčných výrobků. Ochranný účinek mikrobiálních kultur je do značné míry dán již tvorbou kyselin, zejména kyseliny mléčné, která vytvářením vysoké kyselosti ve výrobku zabraňuje rozvoji četných škodlivých bakterií, zvláště peptonizujících. Kromě toho však bakterie mléčného kysání vytvářejí redukující látky a tím zabraňují autooxidaci tuku. Konečně bakterie mléčného kysání vytvářejí také antibiotika, potlačující rozvoj nežádoucí mikroflóry.

Bakterie mléčného kysání, obsažené v používaných mlékařských kulturách žijí v antagonismu s většinou škodlivých mikroorganismů, které by při svém rozvoji v mléce ohrozily úspěch celé výroby. Přidáním ČMK se zajistí převaha a rychlý rozvoj užitečných bakterií mléčného kysání, které zabrání vývinu a škodlivému působení uvedené nepříznivé mikroflóry mléka.

Účinek zrání mléčných výrobků - zrání mléčných výrobků záleží jednak v chemických změnách, ve změnách koloidního stavu a ve vytváření žádoucí struktury. Průběh zrání výrobků je vyjádřen jejich chutí, vůní, konzistencí i vzhledem. Při fermentativním pochodu zrání se mění většinou základní složky mléka, tj. mléčný cukr, tuk i bílkoviny.

Tvorba výživných a léčivých faktorů - obecně, co se mléčných výrobků týče, jde o přeměnu bílkovin mléka ve stravitelnější formy a o tvorbu vitamínů, zvláště vitamínů skupiny B, produkovaných činností mikroorganismů kultur. Dietetická a léčebná funkce čistých mlékařských kultur spočívá, jak již bylo zmíněno, v tvorbě kyseliny mléčné, která vyvolává kyselé prostředí ve střevním traktu a tím inhibuje škodlivou hnilobnou mikroflóru.

V současné době dochází k prudkému vzestupu přímého léčivého využívání ČMK s hlavní složkou *Lactobacillus acidophilus* – ve formě sušených koncentrátů, v prášku, granulcích nebo tabletách, používajících se k léčení řady chorob zažívacího traktu – zácpy, průjmů, kolitidy aj.

2.3.2 *Požadavky na surovinu pro výrobu ČMK*

Mléko pro kultivaci kultur musí být výběrovou směsí čistého, řádně vychlazeného ranního mléka od zdravých, všestranně dobře krmených dojníc. Má být makroskopicky i mikrobiálně co nejčistší a plnohodnotné a všechny jeho složky musí být v optimálních hodnotách. Špatná kvalita mléka snižuje životaschopnost a celkovou kvalitu kultury.

GRIEGER (1990) uvádí nejdůležitější požadavky na surovinu pro výrobu ČMK:

- ČMK s dobrou kysací aktivitou,
- dobře vybraná, ošetřená, případně upravená základní surovina jako kultivační médium,
- vhodné laboratorní i přístrojové vybavení,
- dodržení optimálního technologického postupu přípravy pod dozorem zkušeného specialisty,
- správné uskladnění a manipulace s čistou kulturou.

Úprava mléka pro kultivaci ČMK

Mléko před použitím se upravuje podle toho, pro kterou kulturu bude použito. Většinou se kultura kultivuje v takovém prostředí, v jakém se nakonec uplatní v konečném výrobku. Adaptujeme tak kulturu na určité prostředí.

Mléko sterilujeme v proudící páře co nejdéle, avšak nesmí nastat zjevné porušení jeho součástí – karamelizace cukrů, denaturace bílkoviny. Mléko po sterilaci ihned vychladíme, vytemperujeme na optimální kultivační teplotu a pak kulturu naočkujeme.

2.3.3 *Požadavky na ČMK*

Bezvadná jakost mléčných výrobků závisí na několika základních činitelích. Kromě kvality zpracovávaného mléka, technického zařízení, technologie výroby a kvality lidské práce významně spolurozhoduje o kvalitě hlavních výrobků také kvalita čistých mlékařských kultur, respektive kvalita matečných a provozních zákysů.

U ČMK se sleduje a hodnotí:

- mikroskopický obraz – morfologické znaky, tvar mikroorganismů, poměr tyčinek a koků,
- kyselost – uvádí se většinou titrační nebo celková kyselost dle SH,
- aromatické látky,
- vitalita kultury – fenolový test a další (GRIEGER, 1990).

Důležitým ukazatelem kvality kultury jsou organoleptické vlastnosti. Podle organismů obsažených v kulturách se ČMK člení na:

- kultury bakteriální
- kultury kvasinkové
- kultury smíšené
- kultury plísňové

Podle účelu, k němuž kultury slouží, rozlišujeme následující ČMK na:

- smetanové – univerzální, máslařská, sýrařská
- kultury pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků
- speciální sýrařské kultury
- pro využití v zemědělství – např. na výrobu fermentovaných mlék ke krmným účelům, popř. speciální kultury k přípravě siláží (ŽIŽKA, 1980).

2.3.4 *Charakteristika a požadavky na jogurtovou kulturu*

Jogurtová kultura se používá k výrobě jogurtu, ovocného jogurtu, jogurtového mléka a výrobků jogurtového typu.

Jogurtovou kulturu tvoří bakteriální druhy *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, jejichž poměr má být 2:1 až 1:2 (GRIEGER, 1990).

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus se běžně označuje jako „bulharská tyčinka“. V tekutém prostředí se jeví jako tyčinka dlouhá 5 až 10 μm a široká 0,7 až 1,5 μm . Byly však pozorovány i tyčinky dlouhé až 12 μm a široké až 1,2 μm . Vyskytují se jednotlivě i v řetízcích přecházejících někdy i do vláken dlouhých 50 až 100 μm .

V mladé kultuře jsou silně grampozitivní, starší se stávají gramnegativní. Tyčinky jeví sklon ke granulaci. Bulharská tyčinka je silně variabilní. Tato její vlastnost se projevuje zejména vlivem změn teploty, povahy a koncentrace dusíkatých látek, kdy vznikají rozmanité tvary.

Na agaru tvoří nepravidelně okrouhlé kolonie. Želatinu neztekucuje. Roste v tepelném rozmezí 37 až 42 °C. Podle Bergeyova klasifikačního systému je pro typický *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* tepelné optimum 45 až 50 °C. Tímto znakem se odlišuje „bulharská tyčinka“ od ostatních pravých tyčinek zkvašujících laktózu. Z uhlohydrátů fermentuje glukózu, galaktózu a laktózu. Nezkysává xylózu, arabinózu, manitol, dextrin, inulin a škrob. Je to nejtypičtější mléčná tyčinka (KNĚZ, 1960).

Nejvhodnějším prostředím pro kultivaci je mléko. Vytváří v něm podle Bergeye inaktivní, podle Demetera levotočivou nebo inaktivní kyselinu mléčnou. Kromě kyseliny mléčné tvoří stopy kyseliny jantarové, octové a mravenčí.

Charakteristickým znakem *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* je však způsob srážení mléka při optimální teplotě. Při teplotě 40 až 50 °C ztuhne mléko během 3 až 4 hodin v celé hmotě najednou v porcelánovitou kompaktní hmotu. Tím se liší od velmi podobné tyčinky acidofilní (*Lactobacillus acidophilus*), tuhnoucí odspodu a pomaleji spíše při teplotách 35 až 40 °C.

Ze všech tyčinek mléčného kysání *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* nejmírněji štěpí kasein. Žlučí hyne *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* již v žaludku, nanejvýš v horní části střevního traktu. Mimo to je k alkalickému prostředí daleko citlivější než ostatní termofilní tyčinky a nenesá hnilobné produkty indol a fenol.

Streptococcus salivarius subsp. thermophilus

Je ze skupiny koků. Buňky mají velikost 0,7 až 0,9 μm a bývají ve dvojicích nebo tvoří řetízky. Optimální teplota pro jeho růst je 40 až 45 °C. Zkvašuje laktózu homofermentativně na kyselinu mléčnou. Kultivuje se v mléce po zaočkování 0,5 až 1 % kultury při 37 °C po dobu 16 až 20 hodin (ŽIŽKA, 1980).

Demeter uvádí, že byly popsány kmeny rostoucí při 5 °C. Z uhlohydrátů zkysává glukózu, fruktózu, laktózu a sacharózu, zřídka arabinózu a rafinózu.

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus

O kmenech *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* je známo, že se ve svých biochemických aktivitách podporují vzájemnou symbiózou. Na počátku zrání produkuje *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* látky, které stimulují růst *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* nastávající teprve později. Naopak *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* svou proteolytickou aktivitou uvolňuje v mléce aminokyseliny, a umožňuje tak pokračující činnost bakterií *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* po spotřebování důležitých aminokyselin obsažených v mléce.

Tato symbióza se projevuje příznivě i ve vlastnostech jogurtu, např. tvorbou typického aromatu, jehož hlavní složkou je acetaldehyd. Hlavním producentem acetaldehydu je *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, ale ve směsné kultuře se acetaldehyd tvoří rychleji a ve větším množství. Nevýhodou kultury je značná citlivost bakterií *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* vůči inhibičním látkám, takže častěji dochází k jejich oslabení, a tím i ke snížení kvality finálního výrobku.

Kultura se pěstuje ve vybraném plnotučném nebo odstředěném mléce. Sterilní mléko se očkuje 1% kultury. Inkubace probíhá při 42 až 45 °C po dobu 3 až 3,5 hodiny. Při ožívování kultury se používá větší množství inokula a delší doba srážení.

Kvalitní kultura má po vychlazení na 10 °C vykazovat hustou konzistenci. Povrch má být suchý, prostý syrovátky. Film neulpívá, ale rozděluje se v praménky. Chuť má čistě kyselou, specificky jogurtovou. Kyselost kultury se pohybuje v rozmezí 42 až 50 SH.

V zahuštěném mléce má lasturovitý lom a kulturu (zákys, jogurt) lze krájet. Tento znak se tak vžil, že je považován za rozhodující znak dobrého jogurtu (KNĚZ, 1960).

3 EXPERIMENTÁLNÍ A METODICKÁ ČÁST

3.1 Cíl práce

Cílem práce bylo sledování růstu kulturní mikroflóry během fermentace mlékárenské suroviny – mléka. Experimentální část bakalářské práce byla zaměřena na sledování růstových křivek bakterií mléčného kysání rodů *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* mikrobiologickými metodami a změn titrační kyselosti v průběhu fermentace mléka při výrobě jogurtů.

Experimentální část byla zaměřena na sledování:

- růstových křivek bakterií mléčného kysání rodů *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* mikrobiologickými metodami
- změn titrační kyselosti v průběhu fermentace mléka při výrobě jogurtů termostatovou metodou.

3.2 Technologie výroby jogurtů ve společnosti“AGRO-LA“

Jogurty společnosti AGRO-LA jsou vyráběny z čerstvého pasterovaného mléka bez úpravy tučnosti, dodávaného od prověřených vybraných dodavatelů, jsou zahušťovány sušeným odstředěným mlékem a zakysávány léty prověřenou živou kulturou. Přesné mikrobiální složení je technologickým know-how výrobce. Samozřejmostí zdejší výroby jsou velmi přísná hygienicko-sanitační kritéria a vysoký standard jakosti. V technologii nejsou používány žádné přídavné látky.

3.3 Metody stanovení

Technologická a laboratorní část práce byla uskutečněna ve dvou pokusech v rámci běžné průmyslové výroby jogurtů ve společnosti “AGRO-LA“, spol. s r.o. v Jindřichově Hradci. Tato společnost je předním českým výrobcem tradičních jogurtů typu „Set Type“ a výroba zde probíhá již od roku 1993.

3.3.1 Stanovení *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

Ke stanovení *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* byl použit MRS agar (Agar pro *Lactobacillus* podle de Mana, Rogosy a Sharpe) podle ČSN ISO 15214 : 1998. Tyto bakterie mléčného kvašení byly stanoveny plotnovou metodou.

Živné médium navrhli DE MAN, ROGOSA a SHARPE (1960) pro pomnožení, kultivaci a izolaci příslušníků rodu *Lactobacillus* ze všech typů materiálů.

Složení a příprava MRS agaru

Pepton z kaseinu 10,0g; masový extrakt 10,0g; kvasničný extrakt 4,0g, D(+) glukóza 20,0g; hydrogenfosforečnan didraselný 2,0g; Tween® 80 1,0g; kyselý citran amonný 2,0g; octan sodný 5,0g; síran hořečnatý 0,2g; síran manganatý 0,04 g; agar-agar 14,0g, destilovaná voda 1 litr. Pro přípravu MRS agaru byl použit komerční výrobek firmy Merck, s.r.o.

Naváží se 68,2 g MRS agaru a za občasného míchání se nechá rozpustit v 1 litru destilované vody, pro lepší rozpuštění se může vzniklá suspenze ohřát na 45°C, po dokonalém rozpuštění se upraví pH tak, aby po sterilaci měl vzniklý agar pH $5,7 \pm 0,2$ při 25°C. Agar se steriluje v požadovaných objemech. Sterilace probíhá 15 minut při 121°C

Po sterilaci se agar ochladí na 45°C a rozlévá do inokulovaných Petriho misek. Agar v Petriho miskách má být hnědý a čirý. Vlastnímu stanovení předcházela kontrola kvality média (tabulka 3).

Tabulka 3 Kontrola kvality média – MRS agar

Kontrolní kmen	Inokulum KTJ/ml	Produktivita v %
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	$10^3 - 10^5$	≥ 50
<i>Lactobacillus lactis</i> ATCC 19435	$10^3 - 10^5$	≥ 50
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	$>10^5$	bez růstu
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	$>10^5$	bez růstu

KTJ – kolonie tvořící jednotky

Postup stanovení *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

Příprava vzorku

Pokud to vzorek vyžaduje, provede se homogenizace vzorku. Homogenizace se provede v homogenizátoru typu Stomacher. Odváží se 10 g vzorku a přidá se 9-ti násobek ředícího roztoku a provede se homogenizace na stupeň 3 po dobu 2 x 10 sekund. Vzniklá suspenze je považována za 1. ředění. Následná ředění se provádějí ve zkumavkách. Do zkumavky obsahující 9 ml ředícího roztoku se přidá 1 ml vzniklé suspenze z předchozího kroku a vzorek se homogenizuje na minitřepače Vortex.

Inokulace a kultivace

Stanovení se provádí vždy paralelně do dvou Petriho misek. Za aseptických podmínek se očkuje 1ml vzorku nebo jeho příslušného ředění do sterilních Petriho misek. Zaočkované misky jsou zality MRS agarem. Ředění vzorku se volí takové, aby Petriho misky po inkubaci obsahovaly 15 až 150 charakteristických kolonií.

Inokulované Petriho misky se nechají ztuhnout na vodorovné ploše za laboratorní teploty. Po ztuhnutí se inokulovaná živná půda převrství asi 5-7 ml MSR agarem, pro zajištění anaerobního prostředí. Ztuhlé misky se kultivují při 30 °C po dobu 72 hodin. Aby se zabránilo vysychání živné půdy, jež by vedlo ke zvýšení koncentrace octanu na povrchu a inhibici růstu laktobacilů, vloží se do termostatu kádinka s vodou.

Vyhodnocování výsledků

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

3.3.2 Stanovení *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*

Médium, navržené TERZAGHIM a SANDINEM (1975) pro kultivaci a stanovení počtu mléčných streptokoků v mléce a mléčných produktech a pro diferenciaci bakteriofágů, infikujících mléčné streptokoky.

Média M 17 se v porovnání s jinými srovnatelnými živnými médii výborně osvědčila pro kultivaci náročných druhů. Díky přidavku b-glycerofosfátu sodného je zvýšena pufrovací kapacita media, což podporuje růst mléčných streptokoků.

Složení a příprava média M17

Pepton ze sójové moučky 5,0g; pepton z masa 2,5g; pepton z kaseinu 2,5g; kvasničný extrakt 2,5g; masový extrakt 5,0g; laktóza monohydrát 5,0g; kyselina askorbová 0,5g; b-glycerofosfát sodný 19,0g; síran hořečnatý 0,25g; agar-agar 12,75g, destilovaná voda 1 litr. Pro přípravu média M17 byl použit komerční výrobek firmy Merck, s.r.o.

Navází se 55g média M17 a za občasného míchání se nechá rozpustit v 1 litru destilované vody, pro lepší rozpuštění se může vzniklá suspenze ohřát na 45°C, po dokonalém rozpuštění se upraví pH tak, aby po sterilaci měl vzniklý agar pH $7,2 \pm 0,2$ při 25°C. Agar se steriluje v požadovaných objemech. Sterilace probíhá 15 minut při 121°C

Po sterilaci se agar ochladí na 45°C a rozlévá do inokulovaných Petriho misek. Médium v Petriho miskách má být hnědé a čiré. Výsledky kontroly kvality média jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4 Kontrola kvality média – M17 agar

Kontrolní kmeny	Růst
<i>Streptococcus agalactiae</i> ATCC 13813	dobry / velmi dobry
<i>Lactococcus lactis</i> spp.cremoris ATCC 19257	dobry / velmi dobry
<i>Lactococcus lactis</i> spp. lactis ATCC 19435	dobry / velmi dobry
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 11700	dobry / velmi dobry
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	dobry / velmi dobry
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356	uspokojivy / dobry
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 393	uspokojivy / dobry

Postup stanovení *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*

Příprava vzorku

Pokud to vzorek vyžaduje, provede se homogenizace vzorku. Homogenizace se provede v homogenizátoru typu Stomacher. Odváží se 10 g vzorku a přidá se 9-ti násobek ředícího roztoku a provede se homogenizace na stupeň 3 po dobu 2 x 10 sekund. Vzniklá suspenze je považována za 1. ředění. Následná ředění se provádějí ve zkumavkách. Do zkumavky obsahující 9 ml ředícího roztoku se přidá 1 ml vzniklé suspenze z předchozího kroku a vzorek se homogenizuje na minitřepače Vortex.

Inokulace a kultivace

Stanovení se provádí vždy paralelně do dvou Petriho miskek. Za aseptických podmínek se očkuje se 1 ml vzorku nebo jeho příslušného ředění do sterilních Petriho misek. Zaočkované misky jsou zality médiem M17 (Merck).

Ředění vzorku se volí takové, aby Petriho misky po inkubaci obsahovaly 15 až 150 charakteristických kolonií.

Inokulované Petriho misky se nechají ztuhnout na vodorovné ploše za laboratorní teploty. Ztuhlé misky se kultivují při 28 °C po dobu 24-48 hodin za aerobních podmínek.

Vyhodnocování výsledků

Po 15 hodinách jsou již dobře viditelné kolonie laktózo-pozitivních streptokoků. Kolonie laktózo-pozitivních mléčných streptokoků mají po 5 dnech průměr 3-4 mm.

3.3.3 Stanovení titrační kyselosti jogurtu

Stanovení titrační kyselosti bylo provedeno metodou podle Soxhlet-Henkela.

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

Postup stanovení titrační kyselosti podle Soxhlet-Henkela

Příprava vzorku

Tekutý vzorek byl homogenizován pomocí minitřepačky Vortex. U tuhého vzorku byla odstraněna tuková vrstva.

Vlastní stanovení

Do Erlenmayerovy baňky se odměří 10 ml tekutého vzorku nebo 10 g tuhého vzorku a přidá se 2 ml 2% roztoku fenolftaleinu. Pro lepší homogenizaci tuhého vzorku lze přidat 5 ml destilované vody. Za stálého míchání se titruje roztokem NaOH ($c_{\text{NaOH}} = 0,25 \text{ mol.l}^{-1}$) do slabě růžového zbarvení, které má vydržet minimálně 1 minutu.

Výpočet

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

m_0

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

m_0 odpipetované nebo navážené množství vzorku, v ml nebo g

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Experimentální část byla zaměřena na sledování fermentace kravského mléka při výrobě jogurtů ve společnosti “AGRO-LA“ v Jindřichově Hradci. Uvedené analýzy nejsou v každodenní praxi závodu běžně prováděny, proto se dá předpokládat, že zjištěné výsledky budou cennou informací pro řízení technologie fermentace.

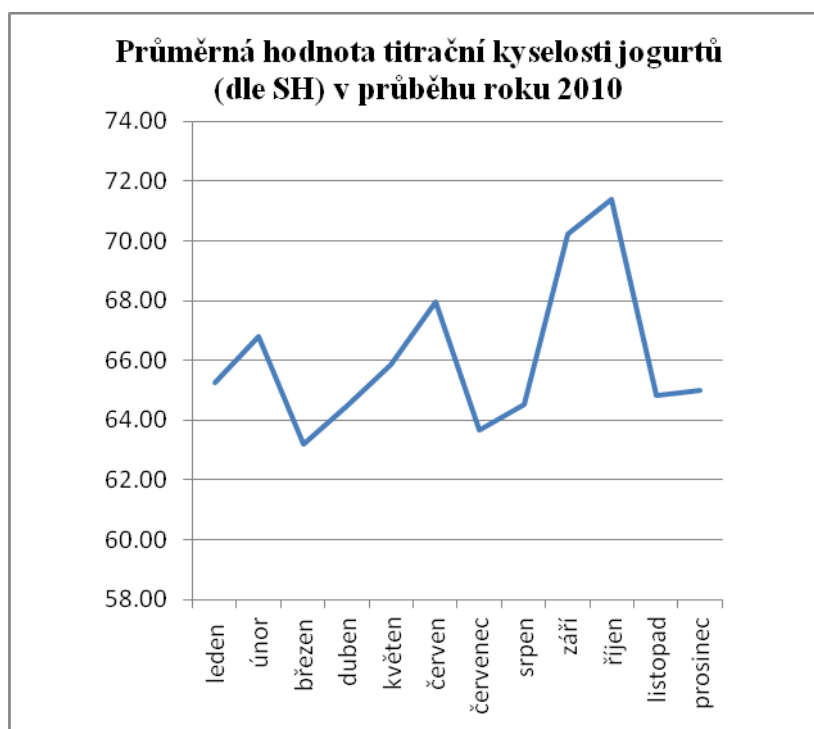
4.1 Sledování titrační kyselosti

4.1.1 *Titrační kyselost jogurtů v průběhu roku*

Nejprve byla vyhodnocena titrační kyselost jogurtů v době expedice, která je zaznamenávána do laboratorních deníků výrobce. Uvedená číselná hodnota (označená symbolem SH) představuje spotřebu odměrného roztoku hydroxidu sodného o koncentraci $0,25 \text{ mol.l}^{-1}$ na přesně definovanou hmotnost vzorku. Do hodnocení byly zahrnuty výsledky měření titrační kyselosti jogurtů v době expedice za celý kalendářní rok 2010. Hodnoty zaznamenané v tabulce 5 a grafu 1 představují průměrnou titrační kyselost jogurtu před expedicí za uvedený měsíc.

Tabulka 5 a graf 1 Průměrné hodnoty titrační kyselosti jogurtů (dle SH) v průběhu roku 2010

Měsíc	Titrační kyselost dle SH
Leden	65,25
Únor	66,81
Březen	63,20
Duben	64,50
Květen	65,86
Červen	67,95
Červenec	63,68
Srpen	64,53
Září	70,21
Říjen	71,40
Listopad	64,84
Prosinec	64,98



GRIEGER (1990) uvádí, že zrání se ukončí, když titrační kyselost dosáhne 65 SH, ochlazením v chladárně tak, aby kyselost při expedici nepřekročila 75 SH.

Nejvyšší hodnota titrační kyselosti byla naměřena v říjnu a to 71,40 SH. V dalších měsících se titrační kyselost pohybovala v rozmezí 64 až 66 SH. Nejnižší titrační kyselost byla zaznamenána březnu. Na kolísání titrační kyselosti může působit mnoho vlivů a mohou jí ovlivnit zejména sezónní vlivy, doba fermentace, ale významně se může podílet také kvalita syrového mléka (ŠTĚTINA, 2009). Titrační kyselost je důležitým ukazatelem nejen z hlediska fermentace mlékařenské suroviny, ale také z hlediska vyvážených sensorických vlastností (GÜRISOY et al., 2010).

Vzhledem k tomu, že v podniku je maximálně využíváno přirozeného zdroje chlazení, je pravděpodobné, že v teplejších měsících lze zkrátit dobu fermentace, zatímco v zimních měsících bude provoz ekonomičtější.

4.1.2 *Titrační kyselost v průběhu fermentace*

Vývoj titrační kyselosti byl sledován v době fermentace mlékařenské suroviny a technologického chlazení jogurtů. Titrační kyselost byla měřena průběžně od doby umístění vzorků do termoboxů (0:00 hod.) do ukončení zrání a chlazení (24:00). Získané hodnoty měření jsou zpracovány v tabulce 6 a grafu 2.

Z výsledků vyplývá, že používaná zákysová kultura je dostatečně vitální, což je předpokladem pro vysokou kvalitu vyráběných produktů. Po dosažení expediční teploty cca 8 °C se růst titrační kyselosti zastavuje, a pokud je teplota skladování udržována v rozmezí 4 – 8 °C, je zaručena vysoká kvalita výrobku daná Vyhláškou 77/2003 Sb. po celou dobu minimální trvanlivosti. Kyselost v době expedice byla v optimální hodnotě, což se shoduje s údaji, jež uvádí GRIEGER (1990).

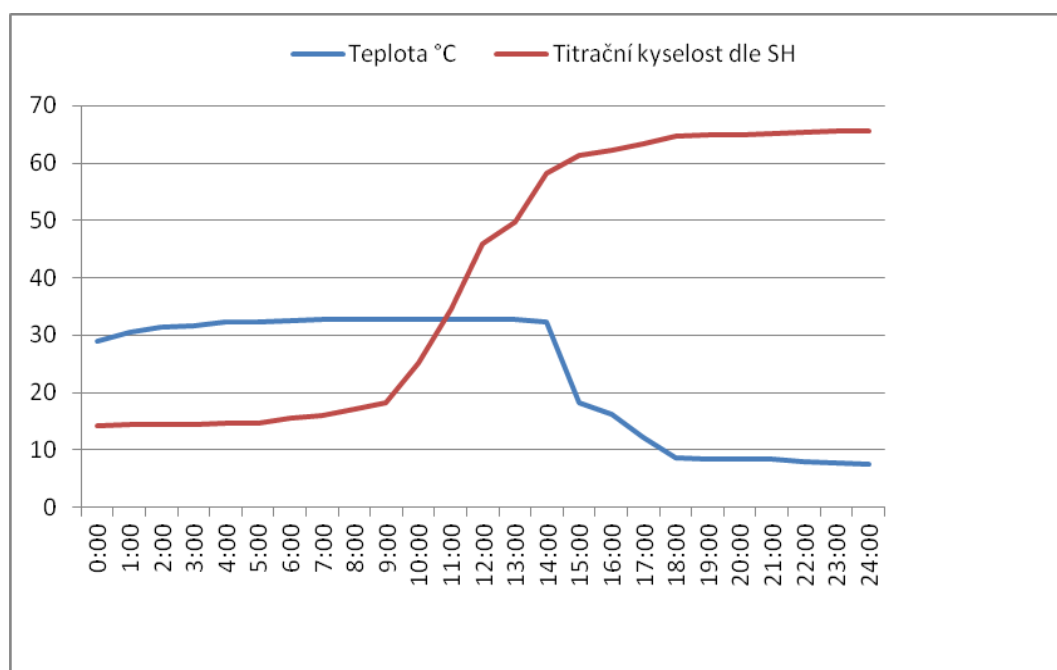
Tabulka 6 Změny teploty a titrační kyselosti mlékařenské suroviny během fermentace a chlazení

Čas fermentace (hod.)	Teplota (°C)	Titrační kyselost (dle SH)
0:00	29,0	14,2
1:00	30,6	14,4
2:00	31,4	14,4

pokračování tabulky 6

Čas fermentace (hod.)	Teplota (°C)	Titrační kyselost (dle SH)
3:00	31,6	14,4
4:00	32,4	14,6
5:00	32,4	14,7
6:00	32,6	15,6
7:00	32,7	16,0
8:00	32,8	17,2
9:00	32,8	18,2
10:00	32,8	25,2
11:00	32,8	34,5
12:00	32,8	46,0
13:00	32,7	49,8
14:00	32,4	58,2
15:00	18,2	61,3
16:00	16,3	62,2
17:00	12,2	63,3
18:00	8,7	64,6
19:00	8,5	65,0
20:00	8,5	65,0
21:00	8,3	65,2
22:00	8,0	65,3
23:00	7,7	65,6
24:00	7,6	65,6

Graf 2 Změny teploty a titrační kyselosti mlékárenské suroviny během fermentace a chlazení



4.2 Sledování růstu mikroorganismů

4.2.1 Dynamika růstu celkového množství mikroorganismů

Před vlastním experimentálním testováním byl zkontrolován počet mikroorganismů obou kmenů zastoupených v použité jogurtové kultuře (tabulka 7), který má být podle GRIEGERA (1990) 2:1 až 1:2.

Tabulka 7 Poměr zastoupených kmenů v jogurtové kultuře

Kmen	KTJ/ 1 ml
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	6,9 x 10 ⁸
<i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i>	2,6 x 10 ⁶

KTJ-kolonie tvořící jednotky

Optimální počet a zastoupení obou kmenů bakterií jogurtové kultury má význam pro léčebné a dietetické vlastnosti finálního produktu, neboť ovlivňují kyselost, texturu a senzorické vlastnosti (CAIS-SOKOLÍNSKA A PIKUL, 2004).

Pokus 1

Celkový počet obou kmenů bakterií mléčného kysání, tj. kmene *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a kmene *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* byl stanovován každé dvě hodiny, od doby umístění do termoboxu (0:00) do ukončení zrání po 24 hodinách (24:00).

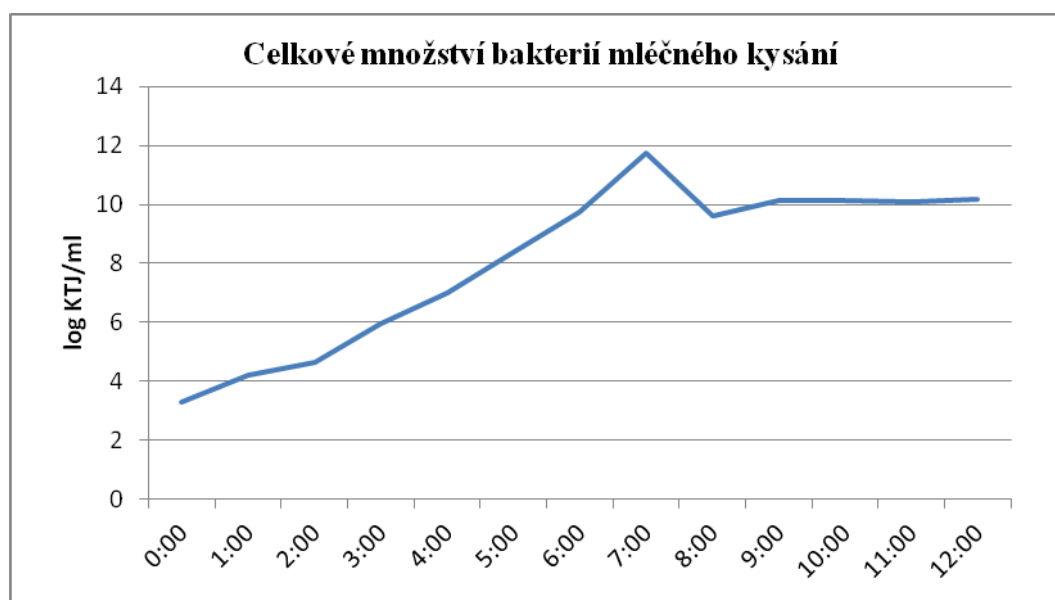
Vyhláška 77/2003 Sb. udává požadovaný počet bakterií mléčného kvašení 10⁷ v 1 ml, který by měl být dodržen při expedici výrobku i po celou dobu spotřeby. Z tabulky 8 je patrné, že limitní hodnota celkového počtu mikroorganismů byla splněna. Růstová křivka celkového počtu obou kmenů jogurtové kultury je zaznamenána v grafu 3, kde lze vyčíst maximální nárůst celkového počtu bakterií mléčného kysání během prvních 14-ti hodin, poté dochází v důsledku chlazení k poklesu růstu a jeho stagnaci. ŠILHÁNKOVÁ (1983) uvádí, že důvodem poklesu může být vyčerpání dostupných živin a nahromadění produktů metabolismu, které dalšímu rozmnožování mikroorganismů zabraňují.

Tabulka 8 Celkový počet bakterií mléčného kysání v průběhu fermentace a chlazení (pokus 1)

Čas fermentace (hod.)	KTJ/ 1 ml
0:00	$1,16 \times 10^5$
2:00	$2,58 \times 10^5$
4:00	$4,32 \times 10^5$
6:00	$2,44 \times 10^6$
8:00	$1,52 \times 10^7$
10:00	$6,52 \times 10^7$
12:00	$1,58 \times 10^8$
14:00	$2,08 \times 10^9$
16:00	$4,29 \times 10^8$
18:00	$2,33 \times 10^8$
20:00	$2,39 \times 10^8$
22:00	$2,26 \times 10^8$
24:00	$2,47 \times 10^8$

KTJ-kolonie tvořící jednotky

Graf 3 Růstová křivka bakterií mléčného kysání kmenů *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* během fermentace při výrobě jogurtů (celkové množství mikroorganismů vyjádřené v log KTJ/ml) – pokus 1



Pokus 2

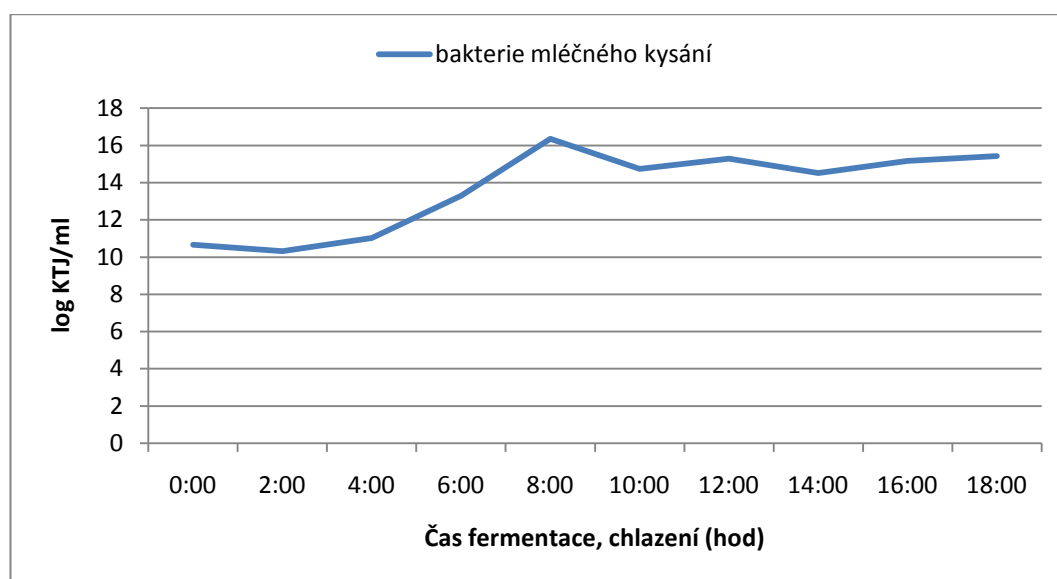
Obdobné výsledky byly prokázány i v pokusu 2 (tabulka 9, graf 4). Vzhledem k časové náročnosti a k ověření dynamiky růstu mikroorganismů během doby maximálního nárůstu a následující stagnace bylo za čas 0:00 zvolena doba od šesté hodiny po vložení do termoboxu.

Tabulka 9 Celkový počet bakterií mléčného kysání v průběhu fermentace a chlazení (pokus 2)

Čas fermentace (hod.)	KTJ/ 1 ml
0:00	$1,28 \times 10^7$
2:00	$3,00 \times 10^7$
4:00	$6,12 \times 10^7$
6:00	$5,89 \times 10^8$
8:00	$1,26 \times 10^{10}$
10:00	$2,52 \times 10^9$
12:00	$4,31 \times 10^9$
14:00	$2,01 \times 10^9$
16:00	$3,86 \times 10^9$
18:00	$4,96 \times 10^9$

KTJ – kolonie tvořící jednotky

Graf 4 Růstová křivka bakterií mléčného kysání kmenů *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* v průběhu fermentace a chlazení (celkové množství mikroorganismů vyjádřené v log KTJ/ml) – pokus 2



4.2.2 Dynamika růstu kmenů *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*

Na základě stejného postupu, kterým probíhal pokus 1 a 2 v případě celkového množství bakterií mléčného kysání, byla sledována také množství bakterií kmenů *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*.

Pokus 1

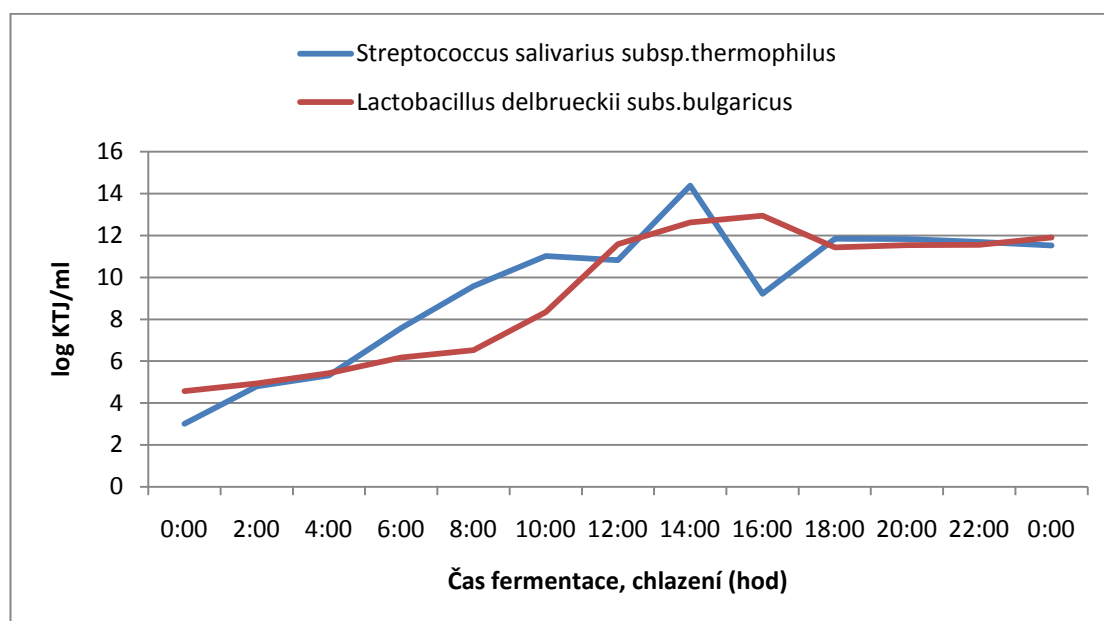
Růst kmene *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* je znázorněn v tabulce 10 a grafu 5.

Tabulka 10 Počet mikroorganismů kmenů *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* během fermentace a chlazení (pokus 1)

Čas fermentace, chlazení (hod.)	Teplota	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> KTJ/ 1 ml	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> KTJ/ 1 ml
0:00	29,0	$9,64 \times 10^4$	$2,00 \times 10^4$
2:00	31,4	$1,38 \times 10^5$	$1,20 \times 10^5$
4:00	32,4	$2,27 \times 10^5$	$2,05 \times 10^5$
6:00	32,6	$4,82 \times 10^5$	$1,96 \times 10^6$
8:00	32,8	$6,86 \times 10^5$	$1,46 \times 10^7$
10:00	32,8	$4,17 \times 10^6$	$6,10 \times 10^7$
12:00	32,8	$1,08 \times 10^8$	$4,98 \times 10^7$
14:00	32,4	$3,04 \times 10^8$	$1,77 \times 10^9$
16:00	16,3	$4,19 \times 10^8$	$1,00 \times 10^7$
18:00	8,7	$9,30 \times 10^7$	$1,40 \times 10^8$
20:00	8,5	$1,03 \times 10^8$	$1,37 \times 10^8$
22:00	8,0	$1,05 \times 10^8$	$1,21 \times 10^8$
24:00	7,6	$1,47 \times 10^8$	$1,00 \times 10^8$

KTJ – kolonie tvořící jednotky

Graf 5 Růstové křivky kmenů *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* během fermentace a chlazení (množství mikroorganismů vyjádřené v log KTJ/ml) – pokus 1



Z uvedeného grafu 5 vyplývá, že na začátku fermentace rostou pomaleji bakterie kmene *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (tyčinka), zatímco bakterie kmene *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (kok) stoupají téměř lineárně. Růst koků nastupuje dříve, zatímco tyčinky rostou pomalejším tempem a jejich pokles v čase začátku chlazení není tak prudký, jako tomu je u koků. Tyto závěry podporují teorii PIJANOWSKÉHO (1977), který přičítá růst koků produkci aminokyselin vznikajících metabolickou činností tyčinek. V pozdějších stádiích zrání pak zvýšené množství tyčinek způsobuje zvýšenou kyselost, což brání dalšímu rozvoji koků.

Z tabulky 10 vyplývá, že v době expedice, tj. při teplotě 7,6 °C se počty obou kmenů ustálí na poměr přibližně 1,5:1.

Pokus 2

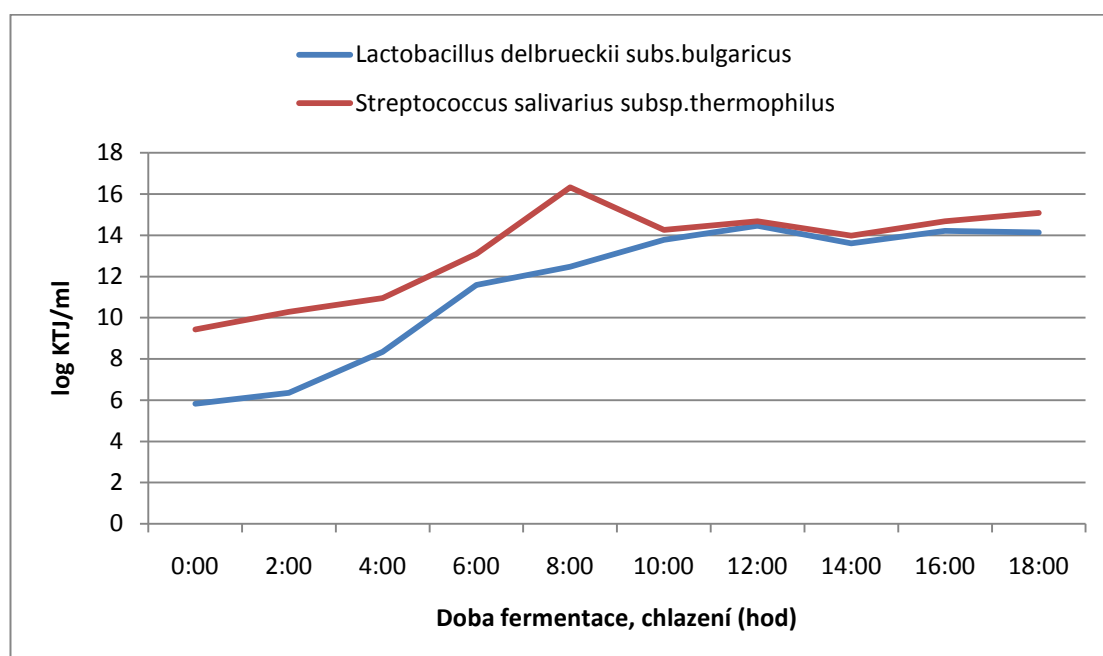
Stejně výsledky byly prokázány i opakovaným pokusem. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 11 a grafu 6.

Tabulka 11 Počet mikroorganismů kmenů *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* v průběhu fáze fermentace a chlazení (pokus 2)

Čas fermentace, chlazení (h)	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> KTJ/ 1 ml	<i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i> KTJ/ 1 ml
0:00	$3,40 \times 10^5$	$1,25 \times 10^7$
2:00	$5,70 \times 10^5$	$2,95 \times 10^7$
4:00	$4,17 \times 10^6$	$5,70 \times 10^7$
6:00	$1,08 \times 10^8$	$4,82 \times 10^8$
8:00	$2,60 \times 10^8$	$1,23 \times 10^{10}$
10:00	$9,64 \times 10^8$	$1,56 \times 10^9$
12:00	$1,93 \times 10^9$	$2,38 \times 10^9$
14:00	$8,15 \times 10^8$	$1,19 \times 10^9$
16:00	$1,48 \times 10^9$	$2,38 \times 10^9$
18:00	$1,39 \times 10^9$	$3,57 \times 10^9$

KTJ – kolonie tvořící jednotky

Graf 6 Růstové křivky kmenů *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* během fermentace a chlazení (množství mikroorganismů vyjádřené v log KTJ/ml) – pokus 2



Srovnání výsledků pokusu 1 a 2

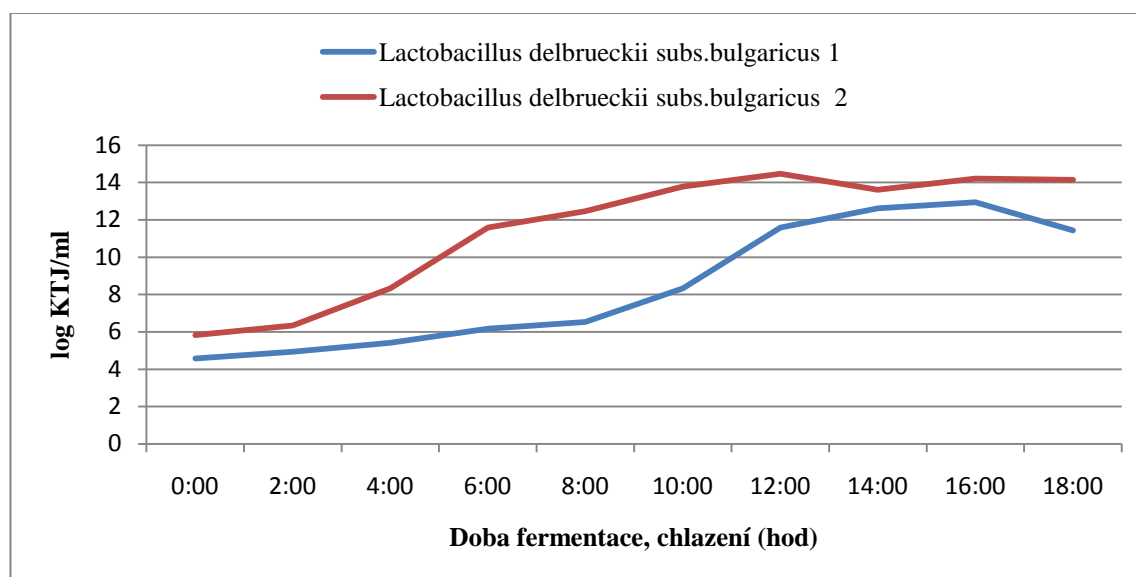
V následujících tabulkách 13 a 14 a grafech 7 a 8 je možné porovnat dynamiku růstu kmene *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a kmene *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* během obou pokusů.

Tabulka 13 Počet mikroorganismů kmene *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* v průběhu fermentace a chlazení pokusu 1 a 2

Čas fermentace, chlazení (h)	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> KTJ/ 1 ml Pokus 1	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> KTJ/ 1 ml Pokus 2
0:00	$9,64 \times 10^4$	$3,40 \times 10^5$
2:00	$1,38 \times 10^5$	$5,70 \times 10^5$
4:00	$2,27 \times 10^5$	$4,17 \times 10^6$
6:00	$4,82 \times 10^5$	$1,08 \times 10^8$
8:00	$6,86 \times 10^5$	$2,60 \times 10^8$
10:00	$4,17 \times 10^6$	$9,64 \times 10^8$
12:00	$1,08 \times 10^8$	$1,93 \times 10^9$
14:00	$3,04 \times 10^8$	$8,15 \times 10^8$
16:00	$4,19 \times 10^8$	$1,48 \times 10^9$
18:00	$9,30 \times 10^7$	$1,39 \times 10^9$

KTJ – kolonie tvořící jednotky

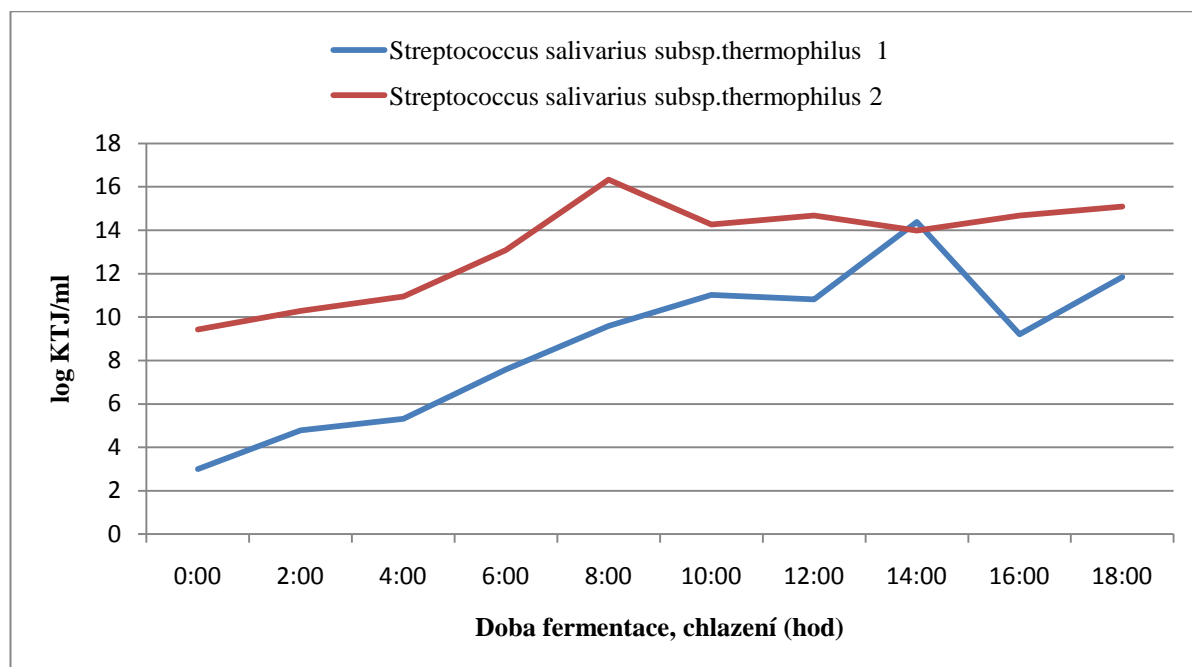
Graf 7 Růstové křivky kmene *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* v průběhu fermentace a chlazení pokusu 1 a 2 (množství mikroorganismů vyjádřené v log KTJ/ml)



Tabulka 14 Počet mikroorganismů kmene *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* v průběhu fermentace a chlazení pokusu 1 a 2

Čas fermentace, chlazení (hod.)	<i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i> KTJ/ 1 ml Pokus 1	<i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i> KTJ/ 1 ml Pokus 2
0:00	$2,00 \times 10^4$	$1,25 \times 10^7$
2:00	$1,20 \times 10^5$	$2,95 \times 10^7$
4:00	$2,05 \times 10^5$	$5,70 \times 10^7$
6:00	$1,96 \times 10^6$	$4,82 \times 10^8$
8:00	$1,46 \times 10^7$	$1,23 \times 10^{10}$
10:00	$6,10 \times 10^7$	$1,56 \times 10^9$
12:00	$4,98 \times 10^7$	$2,38 \times 10^9$
14:00	$1,77 \times 10^9$	$1,19 \times 10^9$
16:00	$1,00 \times 10^7$	$2,38 \times 10^9$
18:00	$1,40 \times 10^8$	$3,57 \times 10^9$

Graf 8 Růstové křivky kmene *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* v průběhu fermentace a chlazení pokusu 1 a 2 (množství mikroorganismů vyjádřené v log KTJ/ml)



Ze zjištěných hodnot vyplývá, že po ukončení fermentace a v okamžiku chlazení dochází v krátké době, cca během 4 hodin, k poklesu počtu všech zastoupených bakterií mléčného kysání.

ŠILHÁNKOVÁ (1983) uvádí, že maximální dosažitelná koncentrace živých buněk v 1 ml růstového prostředí je u bakterií řádu 10^9 , u kvasinek 10^8 . Důvodem poklesu počtů bakterií mléčného kvašení, který byl zaznamenán v experimentální části, je pravděpodobně vyčerpání růstových živin a skutečnost, že produkty metabolismu se nahromadí v takových koncentracích, které již dalšímu rozmnožování organismů zabraňují.

Dalším důvodem může být i to, že v etapě chlazení u bakterií mléčného kysání dochází k tzv. „teplotnímu šoku“, čímž se dostanou mimo svojí optimální teplotu růstu.

5 ZÁVĚR

Experimentem byl ověřen průběh fermentace bakterií mléčného kysání, její závislost na teplotě a čase, která je dána technologickým postupem. Bylo zjištěno, že poměr obou mikrobiálních kmenů *Lactobacillus delbrueckii subs.bulgaricus* a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* v technologické praxi výrobního závodu "AGROLA" se pohybuje v rozmezí 3 : 1 až 1 : 3. Je to dáno tím, že jogurtovou kulturu, která je použita pro výrobu jogurtů si společnost sama vyrábí, a proto nemusí mít stálý poměr obou kmenů, jež udává literatura.

Dalším významným ukazatelem je kyselost jogurtu. Ve všech fermentovaných mléčných výrobcích je přítomna kyselina mléčná, která dodává těmto výrobkům osvěžující chuť a trvanlivost. V době expedice se hodnoty titrační kyselosti vždy pohybovaly v rozmezí 65-75 SH. Kyselost by neměla stoupnout nad optimum, protože výrobek by byl nepříjemně kyselý. Pokud kyselost bude pod optimální hodnotou, jogurt by byl řidší, neměl by typickou jogurtovou a příjemně nakyslou chuť.

Při následném intenzivním chlazení výrobku dochází k dalšímu poklesu celkového množství obou mikroorganismů jogurtové kultury, přesto v hotovém výrobku po celou dobu jeho minimální trvanlivosti převyšuje mnohonásobně hodnotu předepsanou příslušnou Vyhláškou č. 77/2003 Sb.

6 SUMMARY

The experiment verified the course of fermentation of lactic acid bacteria, its dependence on temperature and time, which is given by the technological process. It was found, that the ratio of the two microbial strains of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* in the practice of the factory "AGROLA" ranges from 3:1 to 1:3. This is because the yogurt culture, which is used for making yogurt, is manufactured by the company itself, and therefore it does not have to have a constant ratio of both strains, which are indicated in the literature.

Another important indicator is the acidity of the yogurt. In all fermented dairy products, lactic acid is present, which gives these products a refreshing taste and durability. At the time of shipment, the values of each titrable acidity ranged from 1965 to 1975 RS. The acidity should not rise above the optimum, because the product would be unpleasantly sour. If the acidity is below the optimum value, the yogurt would be thinner; it would not have the typical yogurt and pleasantly acidic taste.

The subsequent intense cooling of the product leads to a further decrease of the total amount of both yogurt culture microorganisms, but in the finished product, the amount throughout the minimum product durability several times exceeds the minimum value prescribed by the relevant Decree No. 77/2003 Coll.

7 SEZNAM LITERATURY

- CAIS-SOKOLIŇSKA, D., PIKUL, J.: Proportion of the microflora of *Lactobacillus* and *Streptococcus* genera in yoghurts of different degree of condensation. Bulletin of the veterinary institute in Pulawy, 2004, 48, 4, 443-447.
- ČSN 57 0529: Syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování, 1998
- DOLEŽAL a kolektiv: Mléko, dojení, dojírny, Praha 2000, 241 s.
- GRIEGER, C. - HOLEC, J. a kolektiv: Hygiena mlieka a mliečnych výrobkov, Príroda Bratislava 1990, 397 s.
- GÜRSOY, A., DURLU-OZKAYA, F., YILDIZ, F., ASLIM, B.: Set Type Yoghurt Production by Exopolysaccharide Producing Turkish Origin Domestic Strains of *Streptococcus thermophilus* (VV22) and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgarius* (B3). Kafkas univeritesi veteriner fakultesi demisi, 2010, 16, S81-S86.
- KADLEC, P. a kol.: Technologie potravin II. 1. vyd., Praha: VŠCHT 2002, 236 s.
- KADLEC, P. – MELZUCH, K. – VOLDŘICH, M. a kolektiv: Co byste měli vědět o výrobě potravin? Technologie potravin 1.vyd., Ostrava KEY Publishing 2009, 536 s.
- KNĚZ – MAŠEK – MAXA – TEPLÝ – VEDLICH: Čisté mlékařské kultury a jejich použití v mlékárenském průmyslu 2.vyd., Praha - Bratislava: SNTL 1960, 297 s.
- MARENDIAK, D. – KOPČANOVÁ, L. – LEITGEB, S.: Polnohospodářská mikrobiológia. Príroda Bratislava, 1987, 444 s.
- MERCK Microbiology Manual 12 th Edition, 688 s.
- Nařízení komise (ES) č.1020/2008, kterým se mění přílohy II., III. Nařízení EP a Rady (ES) č.853/2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu, a Nařízení (ES) č.2076/2005, pokud jde o identické označení, syrové mléko a mléčné výrobky, vejce a vaječné produkty a některé produkty rybolovu.
- PIJANOWSKI, E.: Základy chémie a technologie mlékarenstva, I. díl, Príroda Bratislava 1977, 499 s.
- PLOCKOVÁ, M.: In Kadlec a kol., Technologie potravin II. 1. vyd., Praha: VŠCHT 2002, 236 s.

- PLOCKOVÁ, M.: In KADLEC, P. – MELZOCH, K. – VOLDŘICH, M. a kolektiv: Co byste měli vědět o výrobě potravin? Technologie potravin 1.vyd., Ostrava: KEY Publishing 2009, 536 s.
- SPHEERIS, E.:Yogurt. Yes, please!.Fytrak Publications, 2002, 148 s.
- ŠILHÁNKOVÁ, L.:Mikrobiologie pro potravináře, Praha: SNTL, 1983, 298 s.
- ŠTAFEN, M.: Zakysané mléčné výrobky a jogurt – nezpochybnitelná součást zdravé výživy; Potravinářská revue 2/2011, str. 12-13
- ŠTĚTINA, J.: In Kadlec a kol., Technologie potravin II. 1. vyd., Praha: VŠCHT 2002, 236 s.
- ŠTĚTINA, J.: In KADLEC, P. – MELZOCH, K. – VOLDŘICH, M. a kolektiv: Co byste měli vědět o výrobě potravin? Technologie potravin 1.vyd., Ostrava: KEY Publishing 2009, 536 s.
- TEPLÝ, M. a kolektiv: Kefír, jogurt, acidofilní a jiné kyselky, Praha: SNTL, 1968, 185 s.
- Vyhláška 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje.
- ZADRAŽIL, K.: Mlékařství, Praha: ISV Nakladatelství 2002, 127 s.
- ŽIŽKA, B. – MARTINKOVÁ, Z.: Mikrobiologie, Praha: SNTL 1980, 148 s.