

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra veterinárních disciplín a kvality produktů

Studijní program: M4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Provozně podnikatelský

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Prokysávací schopnosti mlékárenské suroviny

(Fermentation capability of bulk milk under usual conditions)

Vedoucí diplomové práce:

ING. EVA SAMKOVÁ, PH.D.

Konzultant: ING. PAVEL SMETANA

Autor diplomové práce:

LUCIE BOUŠKOVÁ

České Budějovice

2012

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně na základě vlastních poznatků a s použitím pramenů, uvedených v přehledu literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 27. dubna 2012

.....

Lucie Boušková

PODĚKOVÁNÍ

Poděkování za odbornou pomoc, cenné připomínky a rady při zpracování a řešení mé diplomové práce patří obzvláště Ing. Evě Samkové, Ph.D. Děkuji i mé rodině a přátelům, kteří mě po dobu pětiletého studia podporovali.

Zvláštní dík patří paní Bc. Haně Leherové ze společnosti AGRO-LA, spol. s r. o., která mi umožnila provést pokus ve skutečných výrobních podmínkách.

ABSTRAKT

Cílem práce bylo vyhodnocení změn v prokysávání tepelně ošetřeného mléka. Při sledování dynamiky prokysávání byly sledovány změny titrační a aktivní kyselosti.

Sledování prokysávání mlékárenské suroviny se uskutečnilo v podniku AGRO-LA, spol. s r.o., která působí v Jindřichově Hradci.

Pro fermentaci bylo použito pasterované mléko bez úpravy tučnosti, které bylo zahuštěno sušeným mlékem. Fermentace probíhala při 4 fermentačních teplotách po dobu 12,5 hodin (+ 1,5 hodiny chlazení), přičemž sledovanými ukazateli byly titrační kyselost, aktivní kyselost a dynamika růstu kulturních bakterií kmene *Lactobacillus debriueckii subsp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*.

Titrační kyselost byla sledována každou hodinu pro jednotlivé fermentační teploty a dynamika růstu kulturních bakterií byla stanovována každé dvě hodiny. Celkem bylo vyhodnoceno 112 vzorků u titrační kyselosti, 112 vzorků u aktivní kyselosti a 128 vzorků u kulturních bakterií.

Součástí práce bylo také posouzení jakostních ukazatelů již hotových výrobků (jogurtů), k tomuto účelu byly využity záznamy společnosti AGRO-LA, spol. s r. o. za období 2010 a 2011. V rámci této části byly sledovanými ukazateli celkový počet mikroorganismů syrového a pasterovaného mléka, titrační kyselost pro jednotlivé druhy jogurtů, výskyt koliformních bakterií, výskyt kvasinek a plísní.

Titrační kyselost byla stanovena metodou Soxhlet-Henkela. Aktivní kyselost byla určena přímo pomocí pH metru. Kulturní mikroorganismy byly stanoveny mikrobiologickou metodou.

Získaná data byla statisticky zpracována v programu Statistica Cz 9.0 (StatSoft s. r. o.) a následně zpracována v programu Microsoft Excel do tabulek a grafů.

Klíčová slova: mléko; kyselost; titrační kyselost; aktivní kyselost; pH; bakterie mléčného kysání

ABSTRACT

Evaluation of acidification of raw and heat-treated milk was main objective of this research. Titratable and active acidity was observed during milk acidification process. Observation took place at AGRO-LA Co. Jindřichův Hradec.

Pasteurized milk without fat modification was concentrated with milk powder and subsequently used for fermentation at four fermentation temperatures during 12,5 hour (+1,5 hour of cooling). Titratable acidity, active acidity and dynamics of bacteria (strain *Lactobacillus debrueckii subsp. bulgaricus* and *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus*) growth were measured.

Measuring of titratable acidity at specified fermentation temperature was made every hour and every two hour measuring of dynamics of bacteria growth was made. 112 samples were evaluated for titratable and active acidity and 128 samples were evaluated for bacteria growth dynamics.

The evaluation of the quality of final products (yogurts) was also part of this work. Data were obtained during 2010 and 2011 in AGRO-LA, spol. s r. o. Total number of microorganisms of raw and pasteurized milk, titratable acidity, presence of coliform bacteria, yeasts and molds were selected as quality indicators.

Titratable acidity was determined by Soxhlet-Henkel. Active acidity was determined by pH meter. Microbiological method was used to determine strains of lactic acid bacteria.

Obtained data was processed by StatSoft Statistica CZ 9.0 and further processing was made by Microsoft Excel.

Keywords: milk; acidity; titratable acidity; active acidity; pH; lactic acid bacteria

Obsah

| | | |
|---------|--|--------|
| 1 | Úvod..... | - 9 - |
| 2 | Literární přehled..... | - 10 - |
| 2.1 | Mikrobiální požadavky na syrové mléko..... | - 10 - |
| 2.1.1 | Psychrotrofní mikroorganismy | - 11 - |
| 2.1.1.1 | Mikrobiální lipázy..... | - 12 - |
| 2.1.1.2 | Mikrobiální proteázy..... | - 12 - |
| 2.1.2 | Termofilní mikroorganismy..... | - 13 - |
| 2.1.3 | Termorezistentní mikroorganismy..... | - 13 - |
| 2.1.4 | Koliformní bakterie..... | - 13 - |
| 2.2 | Bakterie mléčného kysání..... | - 14 - |
| 2.3 | Čisté mlékařské kultury | - 16 - |
| 2.4 | Inhibiční látky..... | - 16 - |
| 2.5 | Technologické vlastnosti mléka..... | - 17 - |
| 2.5.1 | Kyselost..... | - 17 - |
| 2.5.1.1 | Titrační kyselost..... | - 18 - |
| 2.5.1.2 | Aktivní kyselost | - 18 - |
| 2.5.2 | Kysací schopnost..... | - 19 - |
| 3 | Charakteristika materiálu..... | - 20 - |
| 3.1 | Cíl práce..... | - 20 - |
| 3.2 | Materiál a metoda pokusu..... | - 20 - |
| 3.3 | Analýza vzorků..... | - 21 - |
| 3.3.1 | Kyselost..... | - 21 - |
| 3.3.2 | Stanovení <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> mikrobiologickou metodou..... | - 23 - |
| 3.3.3 | Stanovení <i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i> mikrobiologickou metodou..... | - 24 - |
| 3.3.4 | Stanovení účinku pasterační teploty na mikrobiální obraz mléka..... | - 25 - |
| 3.4 | Statistické vyhodnocení | - 25 - |

| | | |
|-------|--|--------|
| 4 | Výsledky a diskuze | - 27 - |
| 4.1 | Vyhodnocení kysací schopnosti..... | - 27 - |
| 4.1.1 | Dynamika růstu mikroorganismů kmene <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> a <i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i> | - 27 - |
| 4.1.2 | Kyselost..... | - 32 - |
| 4.2 | Vyhodnocení kvality mlékárenské suroviny a jogurtů..... | - 35 - |
| 4.2.1 | Vliv roku na mikrobiologickou kvalitu..... | - 37 - |
| 4.2.2 | Vliv roku na titrační kyselost | - 39 - |
| 4.2.3 | Vliv měsíce na mikrobiologickou kvalitu | - 41 - |
| 4.2.4 | Vliv měsíce na titrační kyselost | - 43 - |
| 5 | Závěr | - 46 - |
| 6 | Summary | - 47 - |
| 7 | Seznam literatury | - 49 - |
| 8 | Přílohy..... | - 57 - |
| 8.1.1 | Fermentační teplota 28°C..... | - 57 - |
| 8.1.2 | Fermentační teplota 33°C..... | - 58 - |
| 8.1.3 | Fermentační teplota 38°C..... | - 60 - |
| 8.1.4 | Fermentační teplota 43°C..... | - 61 - |

1 Úvod

Prokysávací schopnost mléka je jednou z nejdůležitějších vlastností, podle které hodnotíme kvalitu této suroviny. Tato schopnost je dána množstvím a druhem bakterií mléčného kysání v mléce. Po určitý čas závisela prokysávací schopnost pouze na přirozené kontaminaci mléka bakteriemi mléčného kysání. Získané produkty měly velmi kolísavou jakost podle nahodilých změn mikroflóry. Pro dnešní mlékárenský průmysl je to již nemyslitelné. S objevem čistých mlékařských kultur se vytvořil předpoklad pro pasteraci mléka, a tím i zajištění zdravotní nezávadnosti mléčných výrobků. Syrové mléko je očkováno kulturami s vybraným a předvídatelným působením, aby se dosáhlo jednotné kvality produktů.

Kysané výrobky patří mezi potraviny s řadou pozitivních účinků. Prokysávání produktů v provozovnách je způsobeno vlivem mnoha faktorů, a proto cílem této práce je vyhodnocení změn v prokysávání tepelně ošetřeného mléka v závislosti na různých fermentačních teplotách. Během fermentačního procesu jsou sledovány změny titrační kyselosti, aktivní kyselosti a dynamika růstu bakterií kmene *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*.

2 Literární přehled

ČSN 57 0529 definuje syrové kravské mléko jako čisté, čerstvé, neporušené mléko z jedné nebo více důjí, získané úplným vydojením dojníc, jež jsou prosté všech onemocnění, včetně kožních onemocnění mléčné žlázy. Mléko lze ale také charakterizovat jako velmi dobré prostředí pro rozvoj různorodých mikroorganismů. Může obsahovat nesčetné formy virů, parazitujících na bakteriích používaných v mlékařství, a proto je hlavní ochranou především prevence ve formě řádné hygieny při získávání, tepelném zpracování, chlazení, zahušťování, sušení a zakysání požadovanou mikroflórou (ČEPIČKA A KOL., 1995).

2.1 Mikrobiální požadavky na syrové mléko

V roce 2006 nabyly účinnosti nařízení a směrnice EU týkající se hygieny potravin a úřední kontroly a to pod souhrnným názvem „hygienický balíček“ (*WWW.EAGRI.CZ, STAŽENO 12. 1. 2011*).

Dle NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1020/2008 obsahují požadavky na syrové kravské mléko z hlediska mikrobiologických kritérií pouze hranici pro celkový počet mikroorganismů (CPM), v syrovém mléce dodávaném 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). Doplnkové ukazatele zůstaly od roku 1988 nezměněny dle ČSN 57 0529. Jedná se především o počet psychrotrofních mikroorganismů, termorezistentních mikroorganismů, koliformních bakterií a sporotvorných anaerobních bakterií, jejichž hodnoty udává tabulka č. 1.

Dříve byly požadavky na syrové mléko méně přísné. Limity pro výběrové mléko, udávané normou ČSN 57 0529 z roku 1988, z hlediska CPM byly 200 000 KTJ/ml. U mlék III. jakostní třídy byl za maximální přípustné množství považován CPM 20 000 000 KTJ/ml.

Tabulka č. 1: Mikrobiologické požadavky na syrové mléko

| Surovina | Celkový počet mikroorganismů (v ml) | Počet psychrotrofních mikroorganismů (v 1ml) | Počet termorezistentních mikroorganismů (v 1ml) | Koliformní bakterie (v 1ml) | Sporotvorné anaerobní bakterie (v 0,1ml) |
|--------------|-------------------------------------|--|---|-----------------------------|--|
| Syrové mléko | max. 100 000 | 50 000 | 2 000 | 1 000 | test negativní |

ZDROJ: NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) Č. 1020/2008 A ČSN 57 0529

Mikroorganismy v mlékařství mají nejen zdravotní, ale také hygienické a technologické poslání. Mléko a mléčné výrobky jsou vhodným prostředím pro růst mikroorganismů, které svou činností mohou ovlivnit příznivě ale také i nepříznivě kvalitu a biologickou hodnotu výrobku (LUKÁŠOVÁ, 1990). Zdravotní nezávadnost potravin je všeobecně chápána jako nepřítomnost zdraví škodlivých (toxických) látek a choroboplodných (patogenních) mikroorganismů v potravine (JIČÍNSKÁ A HAVLOVÁ, 1995).

2.1.1 Psychrotrofní mikroorganismy

Psychrotrofní mikroorganismy jsou rozšířené v přírodním prostředí (voda, půda, prach, rostliny), mohou se také vyskytovat v syrovém mléce nebo výrobcích z nepasterovaného mléka. Některé z nich jsou patogenní pro lidi, zvířata nebo rostliny (GRIEGER A LUKÁŠOVÁ, 1990). Dle GOUNOTA (1986) je pro ně typická schopnost rozkládat potraviny. Jejich optimální teplota růstu je kolem 22°C, ale mohou být aktivní i při teplotách mezi 0 až 7°C. Z bakterií lze zařadit především rody *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Streptococcus* a *Pseudomonas*. Mimo jiné i některé kvasinky a plísňe zahrnující rody *Penicillium*, *Aspergillus*, *Geotrichum* a *Batrytis*, které jsou schopny růst a přežít v chlazených surovinách ve velkých počtech. Psychrotrofní mikroorganismy mohou způsobovat chuťové změny v potravinách (SPENCER, 2001).

Rod *Pseudomonas* zahrnuje pouze aerobní bakterie bez kvasných vlastností. Řada druhů tvoří barviva žlutých, zelených, modrých nebo červených odstínů, která uvolňují do růstového prostředí. Tím způsobují nežádoucí zbarvení potravin (např. modránání nebo červenání mléka). Jejich nežádoucí činnost v potravinách probíhá i za poměrně nízkých skladovacích teplot (ŠILHÁNKOVÁ, 2002).

Změny spočívají v produkci enzymů, které rozkládají základní složky mléka. Svoji aktivitu si psychrotrofní mikroorganismy uchovávají i po pasteraci, čímž způsobují nechtěné změny v mléčných produktech a snižují tak jejich kvalitativní hodnotu. Mléko získané za dobrých hygienických podmínek nesmí obsahovat více než 10^4 KTJ psychrotrofních mikroorganismů v jednom ml, vyšší počet signalizuje nevyhovující podmínky při získávání mléka (GRIEGER A LUKÁŠOVÁ, 1990).

Mléko je poškozováno hlavně růstem psychrotrofních mikroorganismů, které produkují termorezistentní lipázy a proteázy. Tyto enzymy nemusí být denaturovány během pasterace a způsobují u mléčných výrobků žluklou, nahořklou nebo mýdlovou chuť (TEBALDI ET AL., 2008).

2.1.1.1 Mikrobiální lipázy

Mikrobiální lipázy představují nejdůležitější enzymy, které snižují kvalitu mléka a mléčných výrobků (GRIEGER A LUKÁŠOVÁ, 1990). Lipázy jsou jedinečné, neboť hydrolyzují tuky na mastné kyseliny a glycerol (GHOSH ET AL., 1996). Pro vznik smyslových vad mléka a mléčných výrobků dochází při hodnotách vyšších než 10^6 KTJ lipolytických mikroorganismů na ml výrobku. Na těchto vadách se převážně účastní kyselina máselná, neboť je produktem činnosti lipolytických mikroorganismů. (GRIEGER A LUKÁŠOVÁ, 1990).

Mnoho mikroorganismů je známo jako potenciální producenti lipáz, což zahrnuje bakterie, kvasinky a plísně. Nejdůležitějšími plísňovými producenty jsou rody *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Mucor* a *Rhizomucor*. Z dalších producentů jsou to například rody *Micrococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* a *Clostridium* (TREICHEL ET AL., 2010). Bylo dokázáno, že k inaktivaci některých lipáz je potřeba teploty až 150°C (KISHONTI, 1975).

2.1.1.2 Mikrobiální proteázy

Většina psychrotrofních mikroorganismů produkuje v mléce vedle lipáz také proteolytické enzymy. Mikrobiální proteázy štěpí všechny mléčné bílkoviny, což má za následek koagulaci mléka. Mezi největší producenty patří rody *Bacillus*, *Aspergillus*, *Flavobacterium* a *Pseudomonas* (GRIEGER A LUKÁŠOVÁ, 1990). Při výrobě kysaných mléčných výrobků a sýrů se vlastnosti proteáz hojně využívají (MALA ET AL., 1998).

2.1.2 Termofilní mikroorganismy

Termofilní mikroorganismy jsou organismy s optimální teplotou růstu mezi 50 a 60°C. Extrémně termofilní organismy mohou růst i při 80°C (GOMES A STEINER, 2004). Rozšíření termofilních mikroorganismů v prostředí je značné, vyskytují se v půdě, prachu a najdeme je i v odpadních vodách. Většina termofilních bakterií důležitých v potravinářství patří do rodů *Bacillus*, *Streptococcus*, *Paenibacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Geobacillus*, *Alicyclobacillus* a *Thermoanaerobacter* (MONROE ET AL., 2005). *Streptococcus thermophilus* se účastní při zrání tvrdých sýrů a společně s *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* je součástí mikroflóry jogurtů. Tyto mikroorganismy se používají k produkci kyseliny mléčné (GRIEGER A LUKÁŠOVÁ, 1990).

2.1.3 Termorezistentní mikroorganismy

Skupina termorezistentních mikroorganismů zahrnuje sporotvorné mikroorganismy např. rodu *Bacillus* i nesporotvorné mikroorganismy schopné přežít teplotní ošetření (HAVLOVÁ A KOL., 1993). Dle ČSN 570 101 se jedná o ošetření při teplotě 85°C po dobu 10 minut.

Počet termorezistentních aerobních mikroorganismů je důležité doplňkové kritérium pro hodnocení syrového mléka. Za termorezistentní aerobní mikroorganismy se považují ty, které přežívají krátkodobý záhřev na vysokou teplotu v tekutém živném médiu (např. mléku) a jsou schopny růst při aerobních podmínkách (ČSN ISO 4833).

2.1.4 Koliformní bakterie

Koliformní bakterie jsou indikátorem hygienické kvality syrového mléka. Jde o skupinu tyčinkovitých bakterií, které mají podobné biochemické vlastnosti, tj. schopnost zkvašovat laktózu za současné výroby kyseliny a plynu. Optimální teplota růstu je 35°C, jsou aerobní i anaerobní (GHONG, 2008). Výskyt koliformních bakterií v mléce a mléčných produktech je důkazem znečištění fekáliemi. V mléce a mléčných produktech jsou zjišťovány tyto druhy mikroorganismů rodu: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Proteus*, *Yersinia*, *Serratia*. Z nichž převládá *Enterobacter* a to syrovém i pasterovaném mléce (GRIEGER A LUKÁŠOVÁ, 1990).

2.2 Bakterie mléčného kysání

Bakterie mléčného kysání (LAB) hrají nepostradatelnou roli v mlékařském průmyslu. Jsou odpovědné za fermentační procesy v mléce, rozkládají laktózu na kyselinu mléčnou, která předává fermentovanému mléku svěží nakyslou chuť, napomáhá srážení a tvorbě textury při výrobě sýrů (SHARPE, 1979). V kysaných produktech se LAB projevuje četnými antimikrobiálními aktivitami. To je způsobeno především produkcí organických kyselin, které snižují pH produktu a tak napomáhají potlačit růst patogenních mikroorganismů a organismů způsobujících kažení potravin (LEROY A DE VUYST, 2007). LAB se dělí na homofermentativní mléčné bakterie, kde hlavním metabolitem je kyselina mléčná, a na heterofermentativní, kde mimo kyseliny mléčné vzniká i velké množství jiných produktů (kyseliny octová, CO₂, etanol) (GRIEGER A LUKÁŠOVÁ, 1990).

LAB zahrnuje řadu průmyslově významných rodů, např. *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* a *Lactobacillus* (MAKAROVÁ A KOL., 2006). Nejvíce prostudovanou bakterií tvořící kyselinu mléčnou je *Lactococcus lactis*, (HUGENHOLTZ ET AL., 2002). Je součástí máslašské kultury používané k zakysání smetany. Některé kmeny *Lactococcus lactis* produkují antibiotikum nisin, který znemožňuje tvorbu řady grampozitivních bakterií. Toto antibiotikum se používá jako pomocná látka při konzervaci potravin (ŠILHÁNKOVÁ, 2002). Rod *Lactococcus lactis* má dva poddruhy (*lactis* a *cremoris*). Tyto bakterie mohou být použity v jednotlivých kulturách jako startéry, nebo ve směsi s jinými kulturami LAB, jako jsou *Lactobacillus* a *Streptococcus* (TODAR, 2011). *Streptococcus thermophilus* je hlavním startérem používaným při výrobě jogurtů a sýrů. Je schopen růst při 40 až 45°C, neprosplívají mu teploty pod 10°C, pH 9,6 nebo 6,5% NaCl (DOLORME, 2008).

Historický význam má v mlékárenském průmyslu i rod *Leuconostoc*. Tento rod se považuje za bezpečný i přes nízký počet výskytů onemocnění, které bylo způsobeno právě touto bakterií (OGIER ET AL., 2008). Při fermentačním procesu tvoří kromě kyseliny mléčné i ethanol a CO₂. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* se uplatňuje jako součást máslašské kultury. Propůjčuje máslu příjemné aroma silnou tvorbou biacetylu (ŠILHÁNKOVÁ, 2002).

Mezi LAB patří také rod *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Rod *Lactobacillus* je tvořen gram-pozitivními tyčinkami, které se uplatňují při okyselování syrového mléka a výrobě fermentovaných mléčných výrobků (BERNARDEAU ET AL., 2008). Většina druhů je schopna růst při 45°C. Mezi homofermentativní laktobacily patří druhy *L. delbrueckii*,

L. acidophilus, *L. plantarum*, heterofermentativní jsou druhy *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. buchneri* (ŠILHÁNKOVÁ, 2002).

Tabulka č. 2: Zapojení bakterií mléčného kvašení při výrobě fermentovaných mléčných výrobků

| Produkt | Hlavní kyselinotvorní producenti | Druhotná mikroflóra |
|------------------------------|---|--|
| Sýry | | |
| Čedar, Cottage | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | |
| Modré sýry | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Penicillium roqueforti</i> |
| | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | |
| Mozzarella, Parmazán, Romano | <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | |
| Sýry švýcarského typu | <i>Streptococcus thermophilus</i> | <i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>germanii</i> |
| | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> | |
| Fermentované mléko | | |
| Jogurt | <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> | |
| Podmáslí | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> | <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> |
| | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | |
| Produkt | Hlavní kyselinotvorní producenti | Druhotná mikroflóra |
| Zakysaná smetana | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> | |

ZDROJ: (TODAR, 2011)

2.3 Čisté mlékařské kultury

Jedná se o specifické druhy mezofilních a termofilních bakterií mléčného kysání, které jsou používány ve formě čistých nebo směsných kultur k fermentaci mléka (NECIDOVÁ ET AL., 2002). Přirozená mikroflóra mléka je neefektivní, nekontrolovaná a nepředvídatelná, nebo je zničena tepelným ošetřením mléka. Startovací kultury nabízí konkrétní vlastnosti, předvídatelnou a kontrolovatelnou fermentaci. Jako startovací kulturu lze použít jeden kmen, jeden druh, nebo více druhů LAB (ZIARNO, 2007). Mlékařské kultury se vyrábějí v různých formách a pro různé aplikace. Forma mlékařských kultur může být lyofilizovaná, tekutá ale i mražená. Mlékařské kultury se mohou aplikovat jako matečné, provozní nebo jako kultury pro přímé očkování (WWW.MILCOM-AS.CZ, STAŽENO 10.8.2011). Bylo prokázáno, že rychlost produkce kyseliny ve směsných kulturách (laktobacilů a streptokoků) je vyšší než v monokulturách. *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus* se používají ve směsných kulturách pro svůj symbiotický vztah.

Alternativou mléčného kvašení je přímé okyselování, při kterém se používají čisté kyseliny (např. mléčná, citronová) nebo glukano-delta-lakton (GDL). Dochází tak k rychlejšímu a spolehlivému poklesu pH. Používá se i kombinovaný způsob, v 1. fázi fermentace se použije GDL a v druhé fázi tradiční čisté mlékařské kultury (SUKOVÁ, 2005). Fermentované mléčné výrobky vyrobené touto metodou mají zaměnitelnou chuť i vůni s fermentovanými mléčnými výrobky vyrobenými pomocí tradiční čisté mlékařské kultury (SZIGETI ET AL., 2003).

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

2.4 Inhibiční látky

Souhrnně tak lze označit látky mající tlumivý vliv na rozvoj a aktivitu mlékařských kultur a zákysů. Pokud se v mléce vyskytují v subinhibičních koncentracích, pak jsou z hygienického hlediska považovány za chemický kontaminant (HOLEC, 1990).

Cílem zemědělství je poskytovat vysoce kvalitní a bezpečné potraviny. Použití antibiotik k odstranění infekcí v produkci potravin je nedílnou součástí živočišné

výroby (ANDREW, 2003). Nálezy reziduí inhibičních látek (RIL) v mléce souvisí s rozšířeným využíváním veterinárních léčiv, s nedodržováním ochranných lhůt, se změnou metabolismu nemocného zvířete, popř. s nedůsledným vylučováním mléka léčených zvířat z dodávky, což vytváří zdravotní riziko pro spotřebitele a technologické problémy ve výrobě (NAVRÁTILOVÁ, 2002). Přítomnost inhibičních látek v mléčné surovině vylučuje její fermentaci a je příčinou zvýšených provozních ztrát (PEŠEK, 1999). V důsledku změny legislativy a zlepšením screeningových metod jsou rezidua veterinárních léčiv přísněji sledována (REYBROECK, 2004). ANDREW (2003) však zmiňuje možnost falešně pozitivních výsledků screeningových testů, které jsou způsobeny např. zvýšeným výskytem somatických buněk, vyšším obsahem mléčného tuku a bílkovin. Inhibiční vliv mohou v mléce způsobit i další látky vyskytující se jako přirozený ochranný systém mléčné žlázy, tj. imunoglobuliny, lysozym, laktoferin. Většina těchto látek pasterací mléka ztrácí svou inhibiční vlastnost (NAVRÁTILOVÁ, 2002).

2.5 Technologické vlastnosti mléka

Jakost mléka je daná nejen chemickým složením a mikrobiologickou a hygienickou kvalitou mléka, ale i komplexem dalších vlastností – smyslových, fyzikálních nebo technologických (SAMKOVÁ ET AL., 2009).

Z technologických ukazatelů jsou pak nejdůležitější titrační kyselost, aktivní kyselost a kysací schopnost (FOXA MC SWEENEY, 1998).

2.5.1 Kyselost

Kyselost je jedním z nejdůležitějších technologických ukazatelů jakosti mléka a mlékárenských výrobků. Je dána obsahem organických kyselin, hlavně kyseliny mléčné, ale také obsahem a složením minerálních látek a bílkovin (ČERNÁ A MERGL, 1971). Produkce kyselin je projevem rozvoje kontaminujících mikroorganismů v mléce a mlékárenských výrobcích. Kyselost tedy slouží pro rozpoznání zhoršené kvality suroviny. Naopak mléčné kvašení je hlavním procesem technologie výroby fermentovaných mléčných výrobků a sýrů. Kyselost tedy slouží i ke kontrole průběhu fermentace (KADLEC, 2008). Pro zjištění kyselosti se používají metody definiční, a to buď titrační, stanovení pomocí standardních roztoků alkálií, nebo měření tzv. aktivní kyselosti, dané koncentrací vodíkových iontů (ČERNÁ A CVAK, 1986).

2.5.1.1 Titrační kyselost

Titrační kyselost se vyjadřuje ve stupních Soxhlet-Henkela (°SH) a hodnotí se spotřebou alkálií na neutralizaci kyselých složek mléka a mlékárenských výrobků. Tato metoda je velmi citlivá na zvýšení obsahu kyseliny mléčné, způsobené mikrobiální činností. Čerstvé neporušené mléko od zdravých a dobře krmených dojnic má titrační kyselost v rozmezí 6,8 až 7,2 °SH (ČERNÁ A MERGL, 1971; GAJDŮŠEK, 2003). Dle ČSN 57 0529 se za standardní hodnoty titrační kyselosti pro normální směsné mléko považuje rozmezí hodnot 6,2 až 7,8 °SH.

2.5.1.2 Aktivní kyselost

Aktivní kyselost je dána koncentrací vodíkových iontů a vyjadřuje se jejich záporným logaritmem v hodnotách pH (ČERNÁ A MERGL, 1971; ČERNÁ A CVAK, 1986). Čerstvé mléko má hodnotu pH v rozmezí 6,6 až 6,8. Jeho hodnotu aktivní kyselosti přímo určuje vliv kyselosti na složky mléka, na rozkladu kyselin a solí, konformaci bílkovin a aktivitu enzymů. Metoda je poměrně málo citlivá na tvorbu kyselin mikroorganismy, protože mléko vykazuje výrazné puфраční schopnosti při pH 5,5 (KADLEC, 2008). Puфраční schopnost mléka je dána přítomností puфраů (např. kyseliny fosforečné, citronové, uhličité a mléčných bílkovin). Některé látkové změny v mléce způsobí stav, kdy se na titrační kyselosti (°SH) změny již projevují, kdežto aktivní kyselost (pH) zůstává konstantní (DOLEŽAL A KOL., 2000).

Tabulka č. 3: Hodnoty pH některých mléčných výrobků

| Hodnoty pH | Surovina/Výrobek |
|------------|---|
| 6,5 až 6,7 | mléko sladké |
| 6,3 až 6,4 | mléko nakyslé |
| 5,4 až 6,2 | mléko kyselé |
| 6,8 až 7,1 | mléko podezřelé ze zředění vodou, přidavku alkálií, mléko od nemocných dojnic, staré s proteolytickým rozkladem |
| 4,6 | izoelektrický bod kaseinu |
| 5,1 | smetana k výrobě zakysaného másla |
| 5,2 | mezní hodnota při zakysání jogurtů |

ZDROJ: ČERNÁ A MERGL, 1971

2.5.2 Kysací schopnost

Kysací schopnost (kvasnost) je schopnost mléka vytvořit vhodné podmínky pro růst žádoucích mikroorganismů, především bakterií mléčného kysání. Závisí na chemickém složení mléka a zejména pak na obsahu minerálních solí (*PEŠEK, 1997*). Dále je kysací schopnost ovlivněna obsahem inhibičních látek (především antibiotik a zbytků čistících a dezinfekčních prostředků), na které jsou čisté mlékařské kultury různě citlivé. Pro kvasnost je nutný nízký celkový počet mikroorganismů, především psychrotrofních, které mohou ještě před tepelným ošetřením mléka vyprodukovat metabolity inhibující růst kulturní mikroflóry (*KADLEC, 2008*).

3 Charakteristika materiálu

3.1 Cíl práce

Cílem práce bylo vyhodnocení změn v prokysávání tepelně ošetřeného mléka v závislosti na různých podmínkách fermentace (např. teplota). Při sledování dynamiky prokysávání byly sledovány změny titrační kyselosti, aktivní kyselosti a dynamiky růstu bakterií kmene *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*.

3.2 Materiál a metoda pokusu

- 1) Sledování prokysávání mlékárenské suroviny bylo uskutečněno v podniku AGRO-LA, spol. s r. o., kde se jogurty vyrábí již od roku 1993.

Pro fermentaci bylo použito pasterované mléko bez úpravy tučnosti, které bylo zahuštěno sušeným mlékem. Základní ukazatele chemického složení pro syrové a pasterované mléko, stanovené pomocí přístroje Milkoscan, jsou uvedeny v tabulce č. 4.

Fermentace mlékárenské suroviny byla sledována po dobu 12,5 hodiny ve fázi kysání a 1,5 hodin ve fázi chlazení.

Fermentace probíhala při 4 fermentačních teplotách, přičemž sledovanými ukazateli byly:

- titrační kyselost ($^{\circ}\text{SH}$, $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, g, %)
- aktivní kyselost (pH)
- dynamika růstu kulturních bakterií kmene *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* (KTJ/ml)

Titrační a aktivní kyselost byla sledována vždy u dvou vzorků každou hodinu u jednotlivé fermentační teploty a dynamika růstu kulturních bakterií byla sledována každé dvě hodiny pro jednotlivé fermentační teploty (viz tabulka č. 5).

Tabulka č. 4: Složení mléka (zjištěno pomocí MilkoScan)

| Surovina | Tuk (%) | Bílkoviny (%) | Tukuprostá sušina (%) | Celková sušina (%) |
|-------------------|---------|---------------|-----------------------|--------------------|
| Syrové mléko | 3,66 | 3,32 | 8,79 | 12,45 |
| Pasterované mléko | 3,59 | 5,69 | 14,19 | 17,78 |

Tabulka č. 5: Počet zanalyzovaných vzorků během fermentačního procesu

| Fermentační teplota | Počet vzorků | | |
|--------------------------------|-------------------|------------------|------------------------------------|
| | Titrační kyselost | Aktivní kyselost | Dynamika růstu kulturních bakterií |
| 28 °C | 28 | 28 | 32 |
| 33 °C | 28 | 28 | 32 |
| 38 °C | 28 | 28 | 32 |
| 43 °C | 28 | 28 | 32 |
| Celkem (včetně kontrol) | 112 | 112 | 128 |

Za předpokládaný výsledek testu je považován optimální nárůst mikroflóry bakterií mléčného kysání a optimální hodnoty titrační a aktivní kyselosti při fermentační teplotě 33°C.

Na ověření hypotézy byla použita metoda stanovení kyselosti podle Soxhlet-Henkela, aktivní kyselost je stanovena přímo pomocí pH metru, nárůst mikroflóry byl stanoven mikrobiologickými metodami.

- 2) Součástí práce bylo také posoudit jakostní ukazatele již hotových výrobků (jogurtů), k tomuto účelu byly využity záznamy společnosti AGRO-LA, spol. s r. o. za období 2010 a 2011. V rámci této části byly sledovanými ukazateli:
- celkový počet mikroorganismů syrového a pasterovaného mléka (KTJ/ml)
 - titrační kyselost pro jednotlivé druhy jogurtů (°SH)
 - výskyt koliformních bakterií (KTJ/ml)
 - výskyt kvasinek (KTJ/ml)
 - výskyt plísní (KTJ/ml)

3.3 Analýza vzorků

3.3.1 Kyselost

Titrační kyselost

Kyselost mléka, stanovená podle Soxhlet-Henkela (SH), je množství hydroxidu sodného, odměrného roztoku $c(\text{NaOH})=0,25 \text{ mol/l}$ v 1ml, potřebné ke změně zbarvení

10 ml tekutého vzorku nebo 10g tuhého vzorku za přidavku fenolftaleinu jako indikátoru. Pro lepší homogenizaci tuhého vzorku lze přidat 5 ml destilované vody.

Použity byly tyto chemikálie:

- Fenolftalein, etalonový roztok 2%
- Hydroxid sodný, odměrný roztok $c(\text{NaOH})=0,25 \text{ mol/l}$, jehož faktor se stanoví titrací za použití fenolftaleinu na vhodnou základní látku
- Síran kobaltnatý, roztok 5g síranu kobaltnatého $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ve 100 ml vody. Srovnávací roztok mléka se připraví z 50ml mléka a 1ml roztoku síranu kobaltnatého.

Postup zkoušky

10 ml tekutého vzorku se odpipetuje do titrační baňky, přidají se 2 ml roztoku fenolftaleinu a titruje odměrným roztokem $c(\text{NaOH})=0,25 \text{ mol/l}$ za stálého míchání do slabě růžového zbarvení, které má srovnávací roztok 50 ml mléka + 1 ml 5% CoSO_4 . Zbarvení musí vydržet 30 sekund.

Vyjádření výsledku

- **ve °SH, jako číslo spotřebovaných ml $[c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol.l}^{-1}]$ na 100 ml mléka**

$$^{\circ}\text{SH} = b \cdot 2$$

- **jako látkový obsah kyselin v mmol.l^{-1}**

$$\text{A) } \frac{b \cdot c \cdot 1000}{a},$$

kde a množství vzorku použité k titraci (ml)

b spotřeba $[c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol.l}^{-1}]$ při titraci 50 ml vzorku (ml)

c koncentrace standardního vzorku (mmol.l^{-1}) = 0,25

$$\text{B) } ^{\circ}\text{SH} \cdot 2,5$$

- **v g kyseliny mléčné**

$$1 ^{\circ}\text{SH} = 0,0225 \text{ g kyseliny mléčné}$$

- v % kyseliny mléčné

$$\% = \frac{\text{obsah kyseliny mléčné v g}}{\text{obsah spotřebitelského balení v g}} * 100$$

Aktivní kyselost

Aktivní kyselost mléka a tekutých mléčných výrobků byla měřena pH metrem typu PH WTW 330/set 2 od firmy WTW s rokem výroby 1999.

3.3.2 Stanovení *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* mikrobiologickou metodou

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

Agar byl připraven navážením cca 68,2 g RMS agaru, který se za občasného míchání nechá rozpustit v 1l destilované vody, rozpouštění agaru můžeme uspíšit jeho zahřátím na teplotu 45°C. Po úplném rozpuštění se upraví pH tak, aby po sterilaci měl vzniklý agar pH 5,7 ± 0,2 při 25°C. Sterilace probíhá při 121 °C po dobu 15 minut.

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

Příprava vzorku

Je-li potřeba, provede se homogenizace vzorku. K tomuto účelu slouží homogenizátor 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. Takto vzniklá suspenze je považována za 1. ředění. Následná ředění se provádějí ve zkumavkách. Do zkumavky s 9 ml ředícího roztoku se přidá 1 ml vzniklé suspenze z předchozího kroku a vzorek se homogenizuje na minitřepače Vortex.

Inokulace a kultivace

Stanovení se provádí souběžně do dvou Petriho misek. Za aseptických podmínek se očkuje 1ml vzorku nebo příslušného ředění do sterilních Petriho misek. Takto připravené misky jsou zality MRS agarem. Ředění vzorku se volí tak, 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, vloží se do termostatu kádinka s vodou.

Vyhodnocování výsledků

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

3.3.3 Stanovení *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* mikrobiologickou metodou

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

Agar byl připraven navážením 55g média M17, který se nechá za občasného míchání rozpustit v 1 litru destilované vody, pro urychlení rozpouštění lze suspenzi zahřát na 45°C, po dokonalém rozpuštění se upraví pH tak, aby po sterilaci měl agar pH 7,2 ± 0,2 při 25°C. Sterilace probíhá při 121°C po dobu 15 minut. Po sterilaci se agar zchladí na 45°C a rozlévá do inokulovaných Petriho misek. Médium v Petriho miskách má být hnědé a čiré.

Příprava vzorku

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

Inokulace a kultivace

Stanovení se provádí souběžně do dvou Petriho misek. Za aseptických podmínek se očkuje 1ml vzorku nebo příslušného ředění do sterilních Petriho misek. Takto připravené misky jsou zality M17 agarem. Ředění vzorku se volí tak, 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

Již po 15 hodinách jsou viditelné kolonie laktózo-pozitivních streptokoků.

3.3.4 Stanovení účinku pasterační teploty na mikrobiální obraz mléka

Účinnost pasterace se stanoví jako poměru obsahu přeživších mikroorganismů k jejich obsahu před pasterací. Živným médiem je agar s glukózou a tryptonem.

U syrového mléka se stanoví celkový počet mikroorganismů (CPM) metodou zalití živným médiem. Výše použitého ředění závisí na předpokládané kontaminaci. Poté se vzorek napipetuje do zkumavky (cca 5 ml) a zahřeje se ve vodní lázni na teplotu 72 °C na dobu přibližně 30 sekund. Po uplynutí této doby se vzorek zchladí a stanoví se znovu celkový počet mikroorganismů (CPM). Misky se inkubují při teplotě 30 °C po dobu 24 až 72 hodin. Poté se spočítají narostlé kolonie.

Výpočet pasteračního efektu

$$\text{pasterační efekt (\%)} = 100 - \frac{\text{CPM po zahřátí}}{\text{CPM před zahřátím}}$$

3.4 Statistické vyhodnocení

Pro statistickou analýzu byla využita nabídka programů Microsoft Excel a Statistica Cz 9.0 (Statsoft s. r. o.).

Pro vyhodnocení vlivu roku a měsíce v případě analýzy mikrobiologické kvality mlékárenské suroviny a již hotových jogurtů byla použita jednofaktorová analýza rozptylu. Pro porovnání významnosti jednotlivých skupin, byl využit Fischerův LSD test (vliv měsíce) a Studentův t-test (vliv roku) při obvyklých hladinách významnosti. Statisticky významná data byla označena červeně.

U získaných hodnot byly vypočteny následující základní statistické charakteristiky:

n ... četnost

\bar{x} ... průměrná hodnota

sx ... směrodatná odchylka

min ... minimální hodnota

max ... maximální hodnota

Hladiny významnosti a jejich značení:

$P > 0,5$ statisticky nevýznamné

$P \leq 0,05$ (*) statisticky významné

$P \leq 0,01$ (**) statisticky velmi významné

$P \leq 0,001$ (***) statisticky vysoce významné

4 Výsledky a diskuze

4.1 Vyhodnocení kysací schopnosti

Kysací schopnost mléka (kvasnost) vytváří vhodné podmínky pro růst žádoucích mikroorganismů, především bakterií mléčného kysání (PEŠEK, 1997). V tomto případě se jedná o bakterie kmenů *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, jejichž směs se hojně využívá při výrobě jogurtů.

Následující grafy znázorňují zjištěné hodnoty dynamiky růstu kulturní mikroflóry, titrační a aktivní kyselosti při různých fermentačních teplotách v průběhu zrání jogurtů (fermentace mlékárenské suroviny).

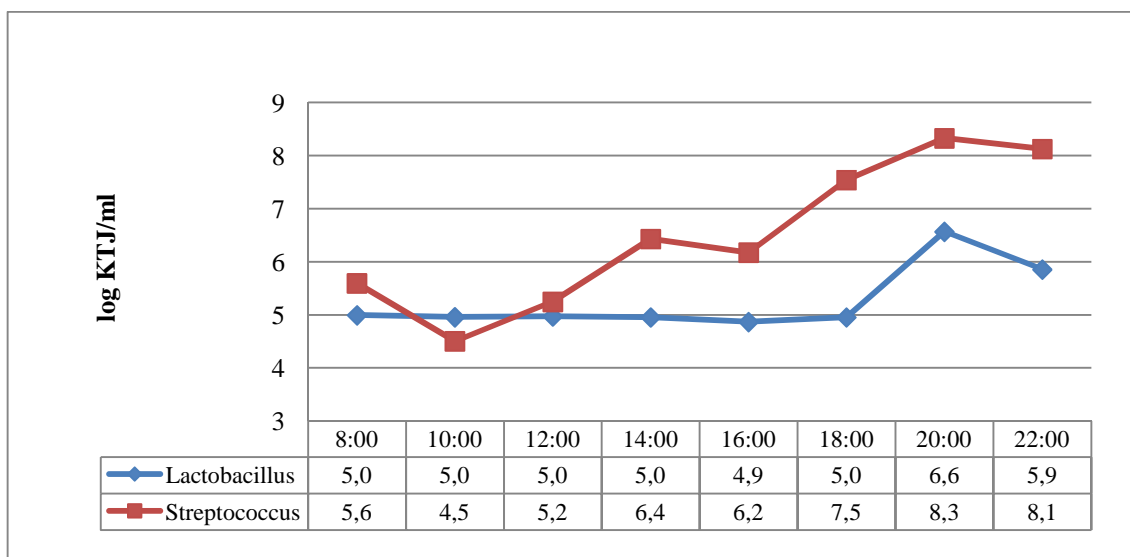
4.1.1 Dynamika růstu mikroorganismů kmene *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*

Zastoupení a optimální počet bakterií obou kmenů jogurtové kultury má vliv na léčebné a dietetické vlastnosti konečného produktu, kyselost, texturu a sensorické vlastnosti (CAIN-SOKOLIŇSKA A PIKUL, 2004).

Bakterie mléčného kysání kmene *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (dále jen tyčinky) jsou homofermentativní, fakultativně anaerobní tyčinky s optimální teplotou růstu 45 °C (SEDLÁČEK, 2007). Způsobují homofermentativní mléčné kvašení cukrů (tj. fermentují sacharidy hlavně na kyselinu mléčnou) bez tvorby CO₂ (ŽIŽKA A MARTÍNKOVÁ, 1980). V mléce tvoří zpravidla kyselinu mléčnou inaktivní, nepatrné množství kyseliny octové, mravenčí a jantarové (TEPLÝ A KOL., 1968).

Streptococcus salivarius subsp. thermophilus (dále jen koky) jsou homofermentativní aerobní až fakultativně anaerobní kokovité nebo oválné bakterie. Rostou v rozmezí 25 °C až 45 °C, za optimum bývá považováno 37 °C (SEDLÁČEK, 2007). Produktem metabolismu cukrů je kyselina mléčná (ŠILHÁNKOVÁ, 2002) a ureasa (ZOTTA ET AL., 2008). Koky jsou termofilní bakterie mléčného kysání, jejichž růst stimuluje tyčinky. Tyčinky rozkládají bílkoviny a uvolňují aminokyseliny důležité pro růst a rozvoj termofilních koků, ty naopak vytváří kyselinu mléčnou, která snižuje pH mléka na optimum pro růst tyčinek (GÖRNER A VALÍK, 2004).

Graf č. 1: Dynamika růstu mikroorganismů kmene *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* při fermentační teplotě 28°C

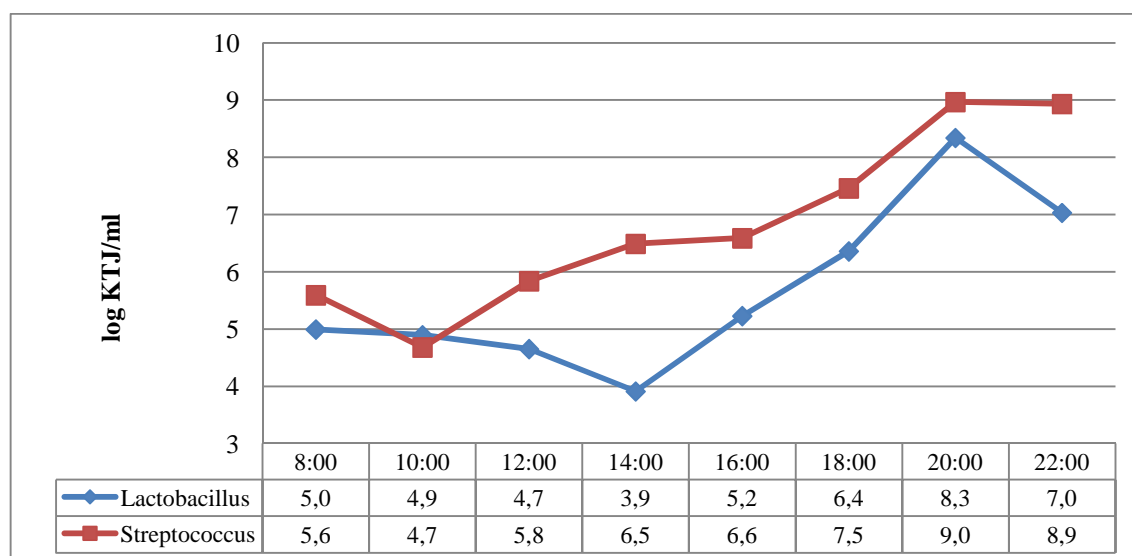


Při fermentační teplotě 28 °C (graf č. 1) dochází zpočátku k prudkému poklesu koků, až do 2. hodiny fermentace (10:00) a posléze k jejich výraznému nárůstu, ukončenému v 6. hodině fermentace (14:00). Poté byl zaznamenán mírný pokles koků v 8. hodině fermentace (16:00). Od 8. hodiny až do 12. hodiny (20:00) fermentace koky opět rostly, maximálního počtu dosáhly ve 12. hodině fermentace, poté z důvodu chlazení jejich počet klesal.

Počet tyčinek při této fermentační teplotě velmi pomalu klesal až do 8. hodiny fermentace (16:00), kdy začal nejdříve pomalu a pak prudce růst s maximem ve 12. hodině fermentace (20:00). Následným chlazením došlo k prudkému snížení počtu tyčinek až na hodnotu 5,9 log KTJ/ml, což odpovídá hodnotě $7,2 \times 10^5$ KTJ/ml.

VYHLÁŠKA 77/2003 SB. udává požadovaný počet bakterií mléčného kvašení, 10^7 KTJ v 1 ml, který by měl být dodržen při expedici výrobku i po celou dobu jeho trvanlivosti. Z tohoto plyne, že mlékárenská surovina prokysávaná fermentační teplotou 28 °C neměla dostatek času k vytvoření takového množství tyčinek. V případě koků bylo této hodnoty dosaženo ve 12. hodině fermentace (20:00).

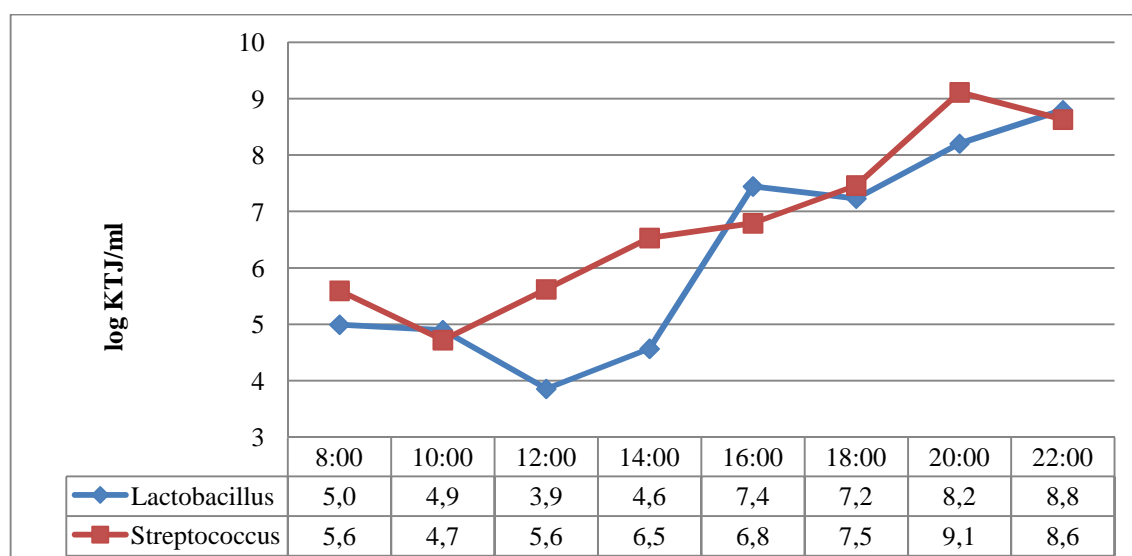
Graf č. 2: Dynamika růstu mikroorganismů kmene *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* při fermentační teplotě 33°C



Při fermentační teplotě 33 °C (graf č. 2) dochází též k počátečnímu poklesu koků, je zde však lépe viditelný pokles tyčinek v době, kdy dochází k nárůstu koků a to v 6. hodině fermentace (14:00). Oba zastoupené rody rostly od 6. hodiny fermentace až do 12. hodiny fermentace (20:00) téměř lineárně. Ve 12. hodině fermentace dosáhly svého maxima a začaly klesat v důsledku chlazení, tyčinky klesají strměji, kdežto u koků docházelo jen k mírnému poklesu.

Optimální hodnoty 10^7 KTJ/ml, dosahovaly oba zastoupené kmeny shodně, a to mezi 10. a 12. hodinou fermentace, tedy mezi 18:00 a 20:00.

Graf č. 3: Dynamika růstu mikroorganismů kmene *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* při fermentační teplotě 38°C

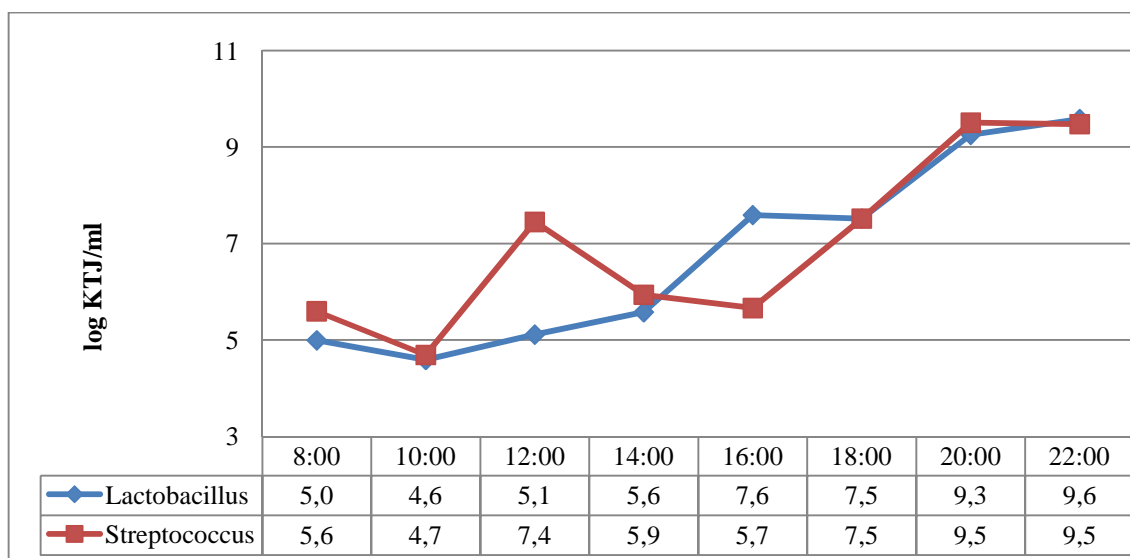


Také u fermentační teploty 38 °C (graf č. 3) dochází k poklesu koků a tyčinek, které se však v případě koků zastavuje ve 2. hodině fermentace (10:00), následuje téměř lineární růst s mírným poklesem v 10. hodině fermentace (18:00). Koky dosahují svého maxima ve 12. hodině fermentace (20:00) a následně důsledkem chlazení a vyčerpání živin klesá jejich počet.

U tyčinek je průběh opačný, do 4. fermentační hodiny (12:00) klesají, následně začínají růst. Jejich množství přesáhne u 8. hodiny fermentace (16:00) i hodnotu koků. Dále se jejich počet krátkodobě sníží, aby posléze mohly zase růst. Naměřená maximální hodnota byla u 14. hodiny fermentace (tj. 22:00, již probíhalo 1,5 hodiny chlazení), kde koky již klesaly.

Optimální hodnoty 10^7 KTJ/ml dosahovaly i při této fermentační teplotě oba zastoupené kmeny současně a to 10. hodinu fermentace (18:00).

Graf č. 4: Dynamika růstu mikroorganismů kmene *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* při fermentační teplotě 43°C



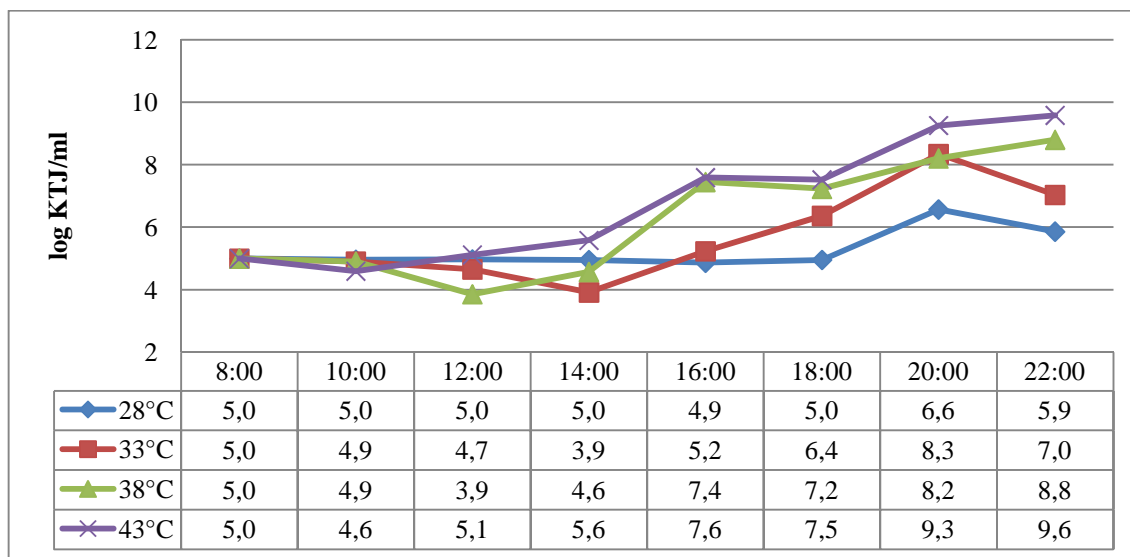
Při fermentační teplotě 43 °C (graf č. 4) docházelo k poklesu počtu mikroorganismů do 2. hodiny fermentace (10:00). Poté koky prudce rostly až do 4. hodiny fermentace (12:00), posléze prudce klesaly až do 8. hodiny fermentace (16:00), kde opět začaly růst s maximem ve 12. hodině fermentace (20:00). Chlazením jejich počet mírně klesl.

Tyčinky od 2. hodiny fermentace (10:00) do 4. hodiny fermentace (12:00) rovnoměrně narůstaly. Poté byl zaznamenán jejich rychlý nárůst do 8. hodiny fermentace (16:00). Další 2 hodiny jejich růst stagnoval. Od 10. hodiny fermentace

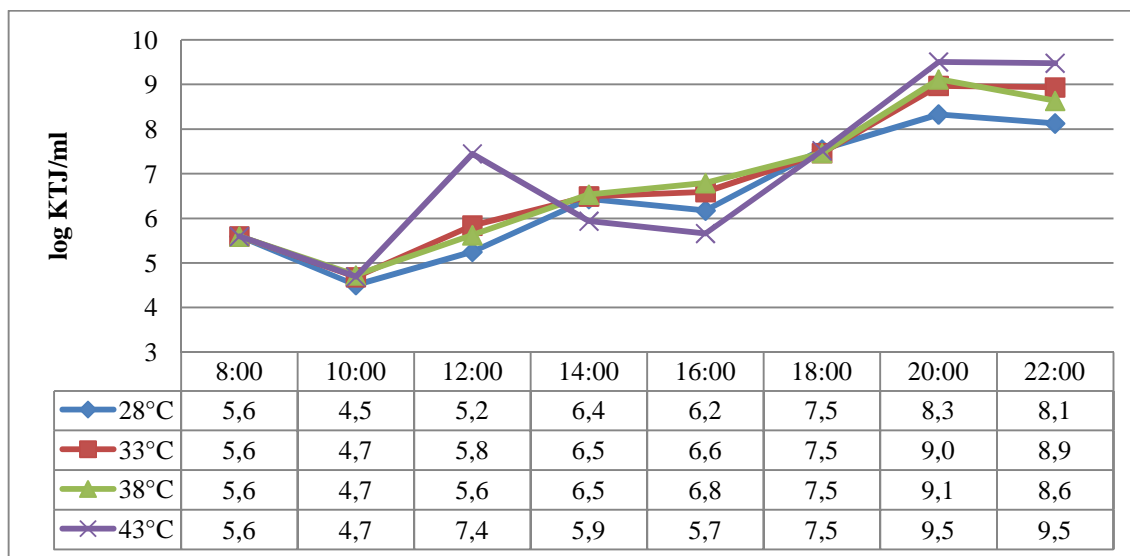
(18:00) opět rostly s maximem ve 12. hodině fermentace (22:00). Kvůli vysoké teplotě nebyl jejich pokles zaznamenán.

Optimální hranice 10^7 KTJ/ml dosahovala surovina fermentovaná teplotou 43 °C v rozdílných dobách. Tyčinky této hodnoty dosáhly mezi 7. a 8. hodinou fermentace, tj. mezi 15:00 a 16:00. Koky hranice dosáhly až v 10. hodině fermentace, tj. 18:00 hodin.

Graf č. 5: Dynamika růstu mikroorganismů kmene *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* v závislosti na teplotě fermentace



Graf č. 6: Dynamika růstu mikroorganismů kmene *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* v závislosti na teplotě fermentace



Grafy č. 5 a č. 6 zobrazují dynamiku růstu (poklesu) tyčinek a koků. V prvních hodinách fermentace rostou koky rychleji než tyčinky a to bez ohledu na fermentační

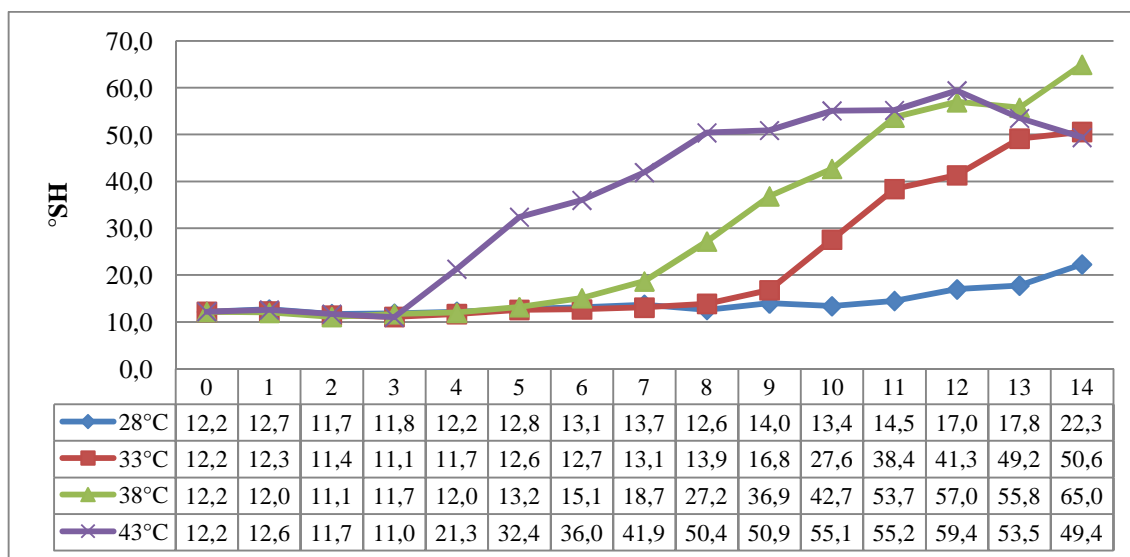
teplotu (viz. přechozí grafy č.1 až 5). *PIJANOWSKI (1977)* přičítá tento jev produkci aminokyselin vznikajících metabolickou činností tyčinek. *GÖRNER A VALÍK (2004)* popisují další fázi, kdy koky vytváří kyselinu mléčnou, snižuje se pH na optimální pro růst tyčinek. Dále koky spotřebovávají kyslík, čímž podporují růst tyčinek. V pozdějších stádiích fermentace způsobuje zvýšené množství tyčinek i zvýšenou kyselost, což brání dalšímu rozvoji koků. Stejný názor zastává i *ZIMÁK (1982)*, který uvádí, že koky se přestávají množit při kyselosti 50 – 55 °SH (cca 1 % kyseliny mléčné), avšak u laktobacilů ustává činnost teprve při kyselosti 80 – 120 °SH (cca 1,8 – 2,7 % kyseliny mléčné). Autor dále zmiňuje závěrečnou fázi fermentace, při níž vzniká velké množství acetaldehydu jako základní složky jogurtového aroma. V konečné fázi dochází k poklesu koků i tyčinek. *ŠILHÁNKOVÁ (2002)* uvádí jako důvod poklesu bakterií mléčného kysání vyčerpání dostupných živin a nahromadění metabolitů, které brání dalšímu pomnožování. Další důvod jejich poklesu ve fázi chlazení může být tzv. teplotní šok, kdy se během několika hodin dostanou mikroorganismy mimo svou optimální teplotu růstu. V současné době se fermentace vede tak, aby konečný produkt obsahoval převážné množství koků, byl méně kyselý a obsahoval vyšší podíl kyseliny mléčné (WWW.UTB.CEPAC.CZ, STAŽENO 7. 2. 2012).

4.1.2 Kyselost

Titrační kyselost spolu s aktivní kyselostí jsou jedny z nejdůležitějších ukazatelů fermentace mlékárenské suroviny a vyvážených sensorických vlastností (*ČERNÁ A MERGL, 1971*). Kyselost slouží pro rozpoznání zhoršené kvality suroviny i ke kontrole průběhu fermentace (*KADLEC, 2008*).

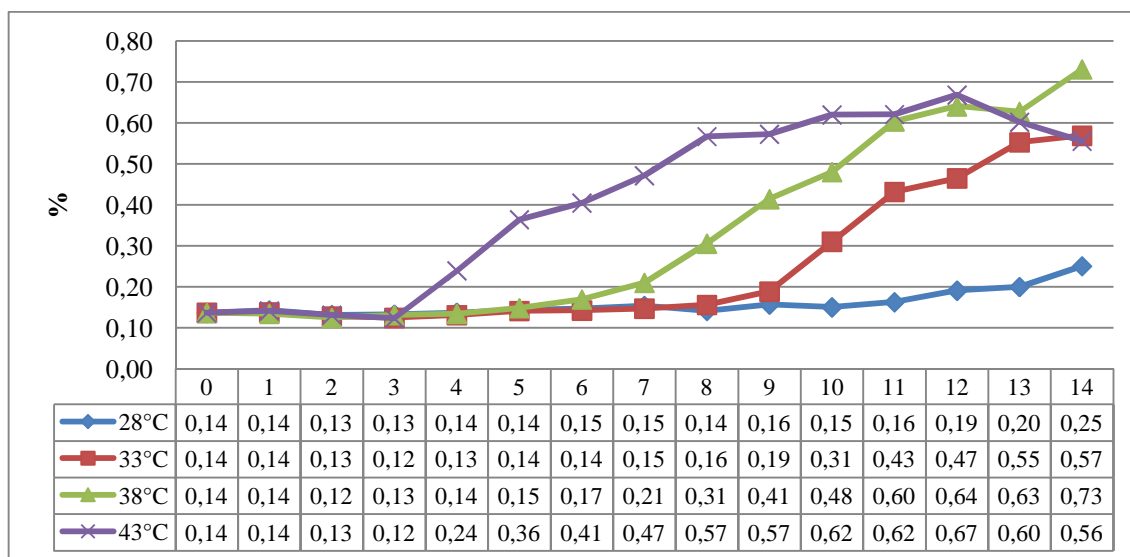
Kyselost nebo i další nežádoucí příchuť může výrazně ovlivnit přijatelnost výrobku konečnými spotřebiteli (*LUCEY, 2002*).

Graf č. 7: Titrační kyselost (°SH) v průběhu fermentace (8 – 22 hod.) v závislosti na různých fermentačních teplotách



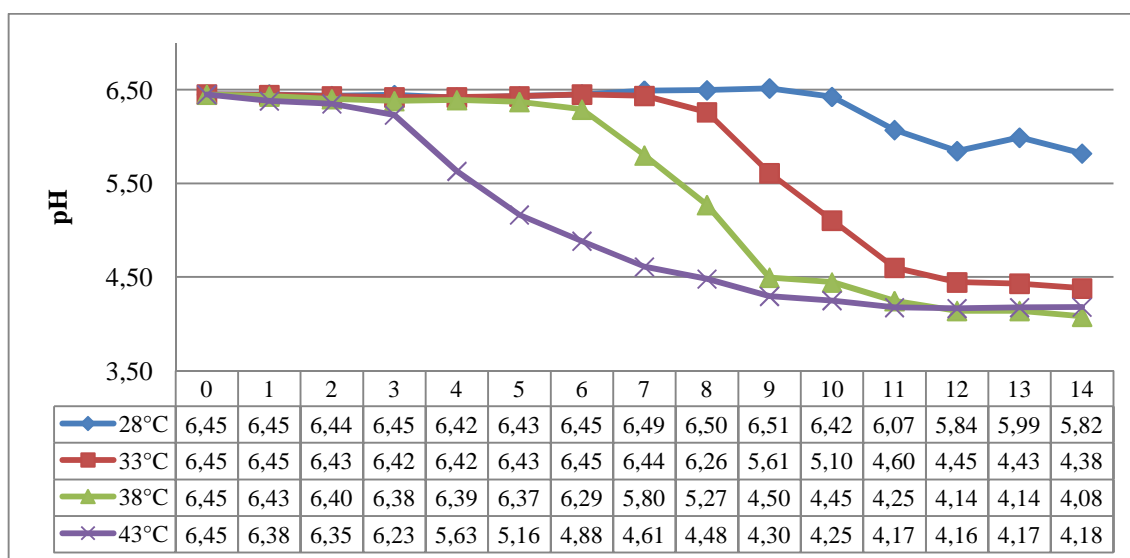
Graf č. 7 znázorňuje zjištěné titrační kyselosti v závislosti na různé fermentační teplotě. Za zmínku stojí hodnoty titrační kyselosti zjištěné při fermentačních teplotách 28°C a 43°C. Teplota 28°C je pro fermentaci nevhodná, proces okyselování probíhá velmi pomalu a po 14-ti hodinách má surovina stále příliš nízkou hodnotu SH (Soxhlet-Henkel). Právý opak platí pro teplotu 43°C, kde je celkový proces velmi rychlý. Je to dáno rozdílnými nároky bakterií rodu *Lactobacillus* a *Streptococcus*. Rod *Lactobacillus* má své optimální pH pro růst kolem hodnoty 5,6, kdežto rod *Streptococcus* je schopen růst i při vyšších hodnotách pH (SALMINEM ET AL., 2004). STILES A HOLZAPFEL (1997) dále uvádějí, že optimální teplota pro růst bakterií rodu *Lactobacillus* se blíží 40 °C, naproti tomu rod *Streptococcus* se spokojí s teplotou okolo 30 °C. Dle GRIEGERA (1990) je proces fermentace jogurtu ukončen, je-li dosaženo titrační kyselosti 65 °SH, nesmí však při expedici překročit hodnotu 75 °SH. Této hodnoty by mlékárenská surovina fermentovaná při teplotě 28 °C dosáhla cca po 41 hodinách, při teplotě 33 °C po 18 hodinách, při teplotě 38 °C by této hodnoty dosáhla po 14 hodinách a při teplotě 43 °C by teoreticky této hodnoty dosáhla již za 13 hodin. Kolísání titrační kyselosti může být způsobeno mnoha vlivy, ŠTĚTINA (2002) uvádí, že mezi nejčastější patří vlivy sezónní, pak doba fermentace a kvalita syrového mléka.

Graf č. 8: Obsah kyseliny mléčné, přepočten na %, v průběhu fermentace (8 - 22 hod.) v závislosti na různých fermentačních teplotách



Na grafu č. 8 jsou uvedeny hodnoty kyseliny mléčné v %. Dle *FORMANA (1996)* se obvyklá koncentrace kyseliny mléčné pohybuje v rozmezí 0,6 až 1,2 %. Tomuto závěru odpovídají fermentační teploty 33°C a 38°C. Teplota 38°C je však z hlediska celkového pH pro konzumaci nevhodná, o čemž nás informuje následující graf. Autor dále uvádí, že kyselina mléčná působí asepticky vůči hnilobným bakteriím, prodlužuje trvanlivost kysaného produktu, zvyšuje utilizaci vápníku, fosforu a železa, zlepšuje stravitelnost mléčných bílkovin a napomáhá vzniku jemně kyselé osvěžující chuti.

Graf č. 9: Aktivní kyselost (pH) v průběhu fermentace (8 – 22 hod.) v závislosti na různých fermentačních teplotách

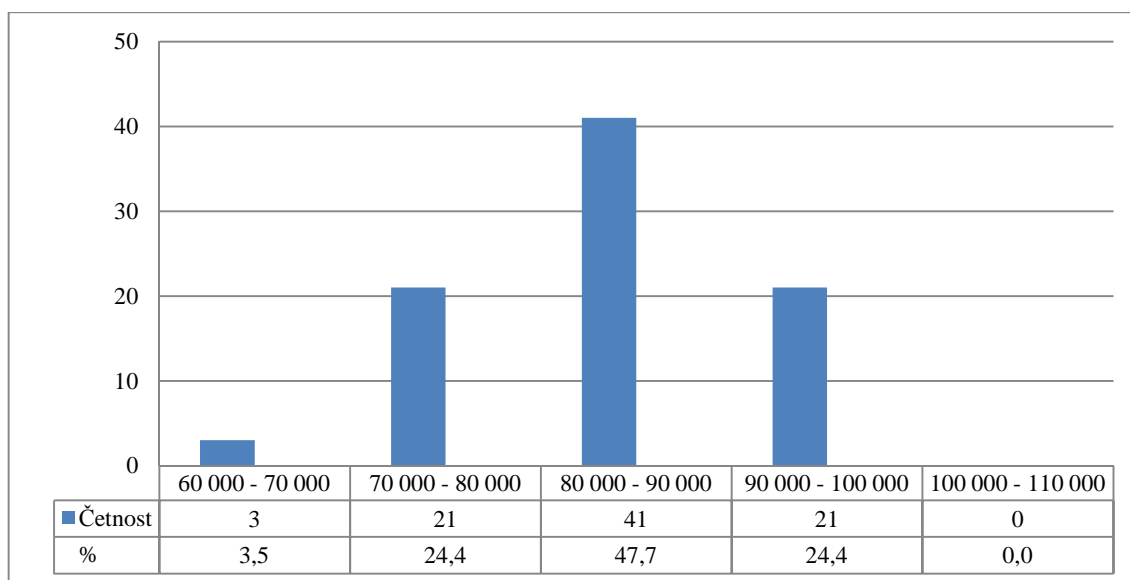


Graf č. 9 uvádí hodnoty aktivní kyselosti naměřené pH metrem. Všeobecně známým faktem je, že ideální kyselost jogurtů se pohybuje okolo hodnoty pH 4,4. Vzorky zrající při fermentační teplotě 28 °C by této hodnoty teoreticky dosáhly za 18,5 hodiny, při teplotě 33 °C dosahovaly vzorky požadované hodnoty pH po cca 13,5 hodinách, při teplotě 38 °C bylo hodnoty pH 4,4 dosaženo po 10 hodinách a při teplotě 43 °C již cca po 8,5 hodinách fermentace. Tyto výkyvy teplot mají vliv na sensorické vlastnosti mléka jako je vůně, barva, chuť a vzhled (CAIN-SOKOLÍNSKÁ A PIKUL, 2004).

4.2 Vyhodnocení kvality mlékárenské suroviny a jogurtů

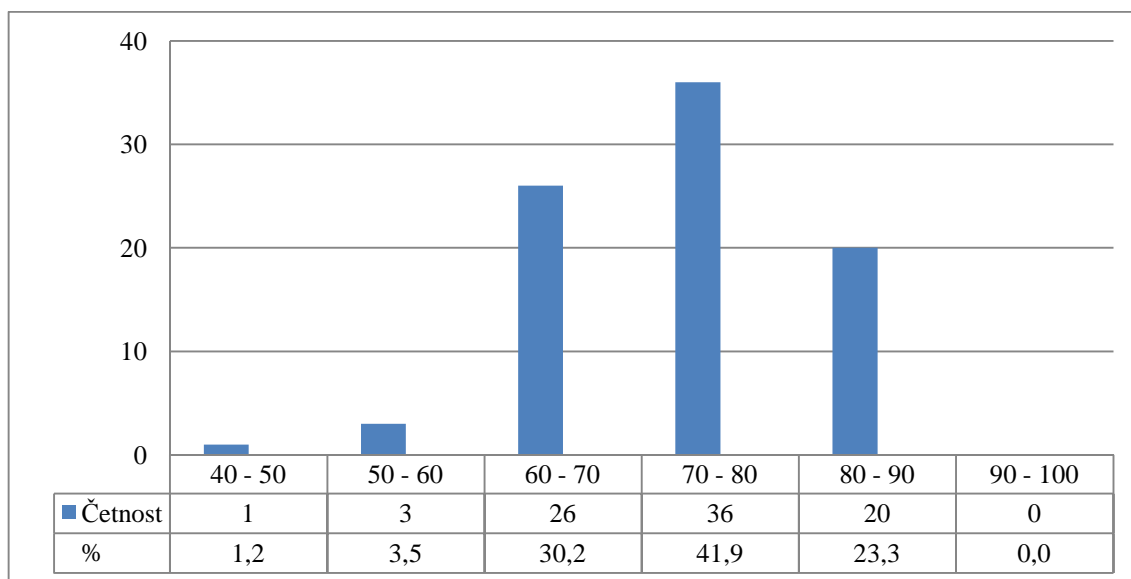
Kvalita mlékárenské suroviny a vybraných druhů jogurtů byla vyhodnocena z hlediska mikrobiologického a z hlediska titrační kyselosti, za dva roky, tj. 2010 a 2011. Mezi sledované mikrobiologické ukazatele patří CPM, výskyt koliformních bakterií, kvasinek a plísní (KTJ/ml).

Graf č. 10: Rozdělení četností celkového počtu mikroorganismů (KTJ/ml) u vzorků syrového mléka (n = 86)



Graf č. 10 sleduje četnosti CPM syrového mléka. Nejvyšší dosažená četnost byla v intervalu 80 000 až 90 000 KTJ/ml, což odpovídá 41 vzorkům, tj. 47,7 %.

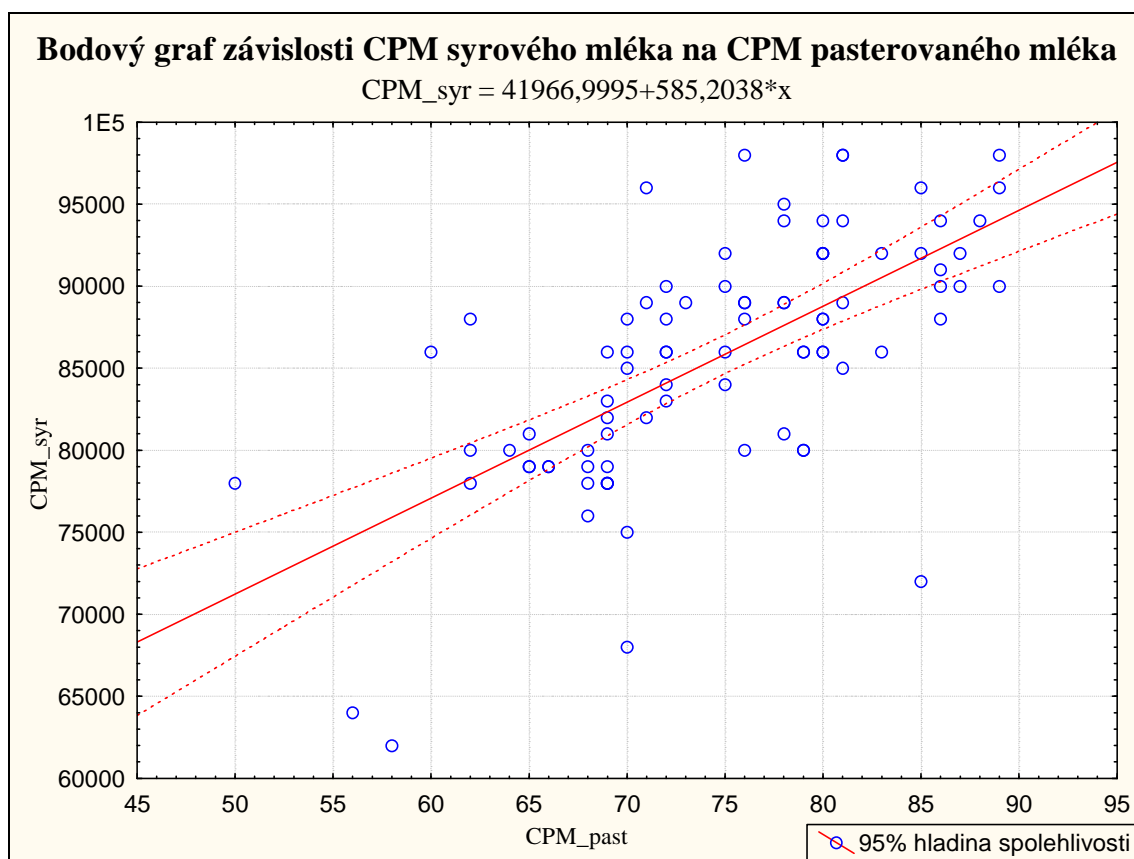
Graf č. 11: Rozdělení četností celkového počtu mikroorganismů (KTJ/ml) u vzorků pasterovaného mléka (n = 86)



Rovněž graf č. 11 sleduje četnosti celkového počtu mikroorganismů, ale již v pasterovaném mléce. Nejvyšší četnost byla sledována v intervalu 70 až 80 KTJ/ml, čili u 36 vzorků, tj. u 41,9 %. V intervalu od 60 do 90 KTJ/ml se nachází celkem 82 vzorků, tj. 95,4 %.

V grafu č. 12, kde je zachycena závislost mezi CPM syrového mléka a mléka pasterovaného, lze nalézt souvislost s tzv. pasteračním efektem, který udává hodnotu úspěšnosti pasterace v procentech. Pasterační efekt činí pro rok 2010 i 2011 99,99%. S ohledem na stejné hodnoty pasteračního efektu lze usuzovat i stejnou kvalitu mléka z hlediska počtu mikroorganismů.

Graf č. 12: Vztah mezi CPM syrového a pasterovaného mléka



4.2.1 Vliv roku na mikrobiologickou kvalitu

O statisticky významných rozdílech mezi rokem 2010 a 2011 vypovídají zjištěné údaje v tabulce č. 6. Až na jednu výjimku se průměrné hodnoty roku 2010 a 2011 nelišily. Z hlediska CPM syrového a pasterovaného mléka je rozdíl mezi roky minimální, koliformní bakterie se vyskytovaly ve větším množství v roce 2010, u kvasinek docházelo k vyššímu nárůstu v roce 2011 a plísně se vyskytly ve vyšším počtu pouze v roce 2010.

Rozdíly mezi roky 2010 a 2011 se mohly projevit kvalitou dojeného mléka, přepravou nebo i zpracováním suroviny.

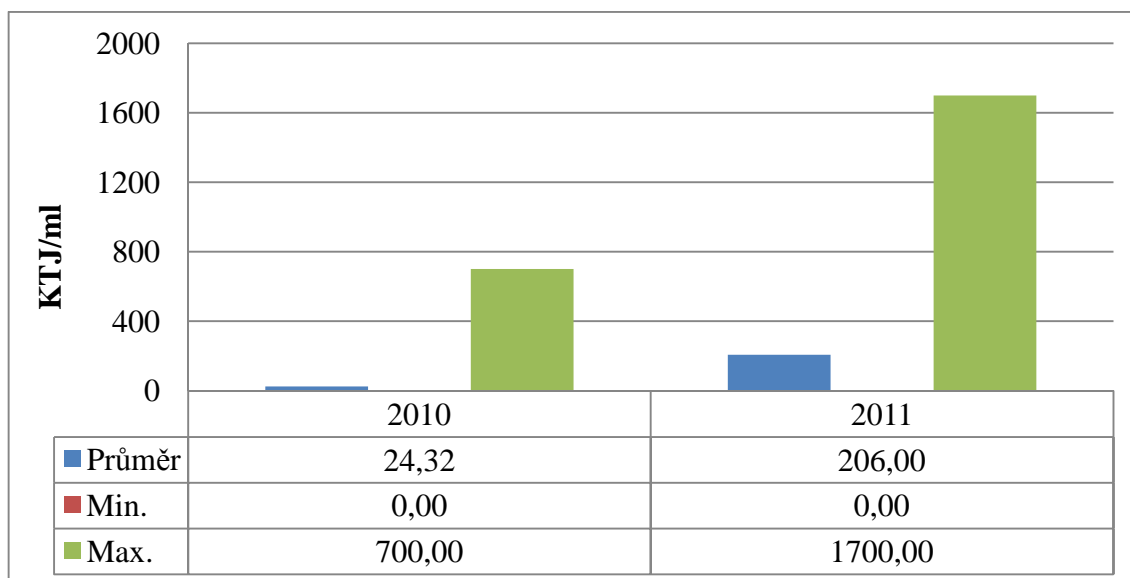
Tabulka č. 6: Vliv roku na mikrobiologickou kvalitu syrového, pasterovaného mléka a vybraných druhů jogurtů

| Mikrobiologická kvalita * | Rok | | | | | | | | | | Hodnota P |
|------------------------------|------|-----------|------|-------|-------|------|-----------|------|-------|-------|--------------|
| | 2010 | | | | | 2011 | | | | | |
| | n | \bar{x} | sx | min | max | n | \bar{x} | sx | min | max | |
| CPM | | | | | | | | | | | |
| Syrové | 38 | 87132 | 5729 | 75000 | 98000 | 48 | 84458 | 8223 | 62000 | 98000 | 0,0924 |
| Pasterované | 38 | 76 | 8 | 50 | 89 | 48 | 74 | 8 | 56 | 89 | 0,2798 |
| Bílý | | | | | | | | | | | |
| Koliform. bakterie | 125 | 768 | 8452 | 0 | 94500 | 228 | 39 | 208 | 0 | 1600 | 0,1934 |
| Kvasinky | 125 | 75 | 652 | 0 | 7200 | 227 | 12 | 133 | 0 | 2000 | 0,1555 |
| Plísňe | 124 | 1 | 9 | 0 | 101 | 227 | 0 | 1 | 0 | 10 | 0,0922 |
| Jahoda | | | | | | | | | | | |
| Koliform. bakterie | 185 | 3 | 44 | 0 | 600 | 179 | 3 | 33 | 0 | 440 | 0,8697 |
| Kvasinky | 183 | 15 | 86 | 0 | 1000 | 179 | 20 | 133 | 0 | 1600 | 0,6683 |
| Plísňe | 183 | 0 | 0 | 0 | 1 | 179 | 0 | 1 | 0 | 10 | 0,4241 |
| Meruňka | | | | | | | | | | | |
| Koliform. bakterie | 129 | 11 | 92 | 0 | 1000 | 128 | 24 | 149 | 0 | 1300 | 0,4101 |
| Kvasinky | 129 | 38 | 176 | 0 | 1600 | 128 | 29 | 120 | 0 | 1100 | 0,6041 |
| Plísňe | 128 | 0 | 2 | 0 | 10 | 128 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0,0933 |
| Borůvka | | | | | | | | | | | |
| Koliform. bakterie | 64 | 17 | 115 | 0 | 900 | 81 | 16 | 93 | 0 | 800 | 0,9249 |
| Kvasinky | 63 | 8 | 25 | 0 | 160 | 81 | 143 | 742 | 0 | 6300 | 0,1513 |
| Plísňe | 63 | 0 | 0 | 0 | 1 | 81 | 0 | 3 | 0 | 30 | 0,3846 |
| Višeň | | | | | | | | | | | |
| Koliform. bakterie | 44 | 3 | 15 | 0 | 101 | 40 | 39 | 237 | 0 | 1500 | 0,3081 |
| Kvasinky | 44 | 24 | 107 | 0 | 700 | 40 | 206 | 459 | 0 | 1700 | 0,0125 |
| Plísňe | 44 | 0 | 2 | 0 | 10 | 40 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,1764 |

* CPM syrového a pasterovaného mléka, výskyt koliformních bakterií, kvasinek a plísňí (KTJ/ml)

Z podnikových záznamů bylo zjištěno, že ke kontaminaci nemohlo dojít ze strojního vybavení mlékárny. Byly provedeny testy na přítomnost mikroorganismů, které vyšly negativně ve všech pozorováních. Jelikož se v tomto případě jedná o jogurty s přídavkem ochucující směsi, nabízí se jako možný zdroj kontaminace právě tato složka, což potvrzuje i *HYLMAR (1986)*, který označuje ochucující směsi jako možný zdroj kontaminace, a proto navrhuje využívání sterilovaných složek, uchovávaných v nerezových aseptických kontejnerech. Stejně tvrzení lze použít i na graf č. 13, kde příčinou zvýšeného počtu kvasinek v roce 2011 byla pravděpodobně kontaminace kvasinkami z nekvalitní dodávky višňové marmelády. Možnou prevencí spatřuji v kontrolách ochucujících látek, které by mohly do budoucna zabránit dalšímu výskytu těchto situací.

Graf č. 13: Výskyt kvasinek (KTJ/ml) v ovocném jogurtu višěň za rok 2010 a 2011



Statistická významnost: *

4.2.2 Vliv roku na titrační kyselost

Titrační kyselost je jedním z nejdůležitějších ukazatelů jakosti mlékařenské suroviny a mléčných výrobků.

Následující grafy a tabulka se tímto významným ukazatelem zabývají.

Tabulka č. 7: Vliv roku na titrační kyselost (°SH) vybraných druhů jogurtů

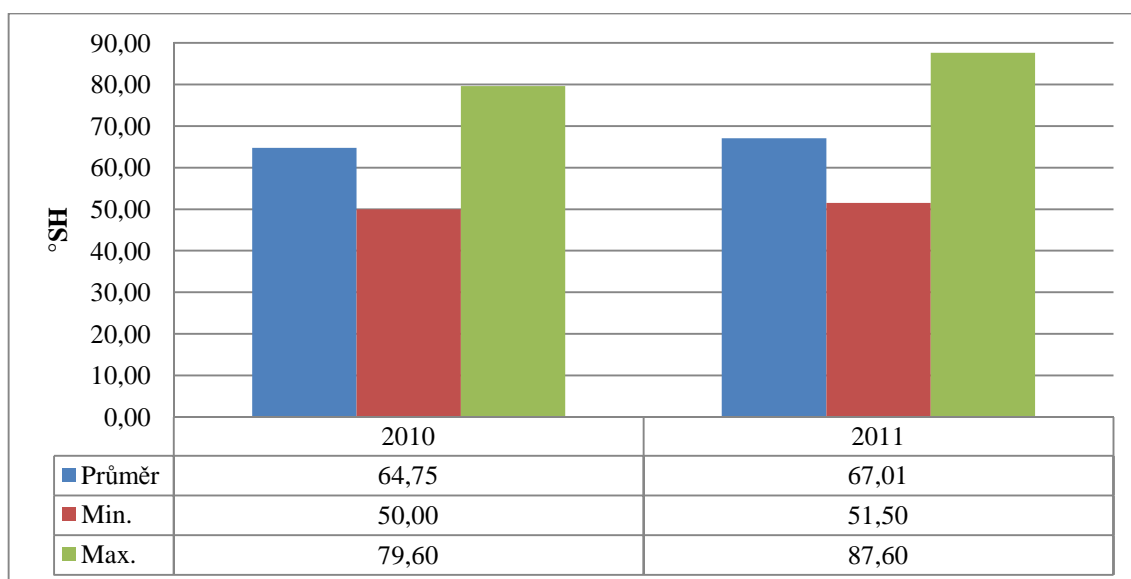
| Kyselost | Rok | | | | | | | | | | Hodnota P |
|----------|------|-----------|------|------|------|------|-----------|------|------|------|-----------|
| | 2010 | | | | | 2011 | | | | | |
| | n | \bar{x} | sx | min | max | n | \bar{x} | sx | min | max | |
| Bílý | 124 | 66,95 | 6,48 | 51,1 | 83,0 | 228 | 67,08 | 6,95 | 49,5 | 90,2 | 0,8666 |
| Jahoda | 185 | 68,88 | 4,67 | 56,8 | 85,0 | 179 | 72,30 | 8,17 | 51,7 | 90,2 | 0,0000 |
| Meruňka | 129 | 64,75 | 4,57 | 50,0 | 79,6 | 128 | 67,01 | 6,83 | 51,5 | 87,6 | 0,0021 |
| Borůvka | 64 | 68,20 | 5,12 | 54,2 | 84,5 | 81 | 70,04 | 6,72 | 56,0 | 87,8 | 0,0717 |
| Víšeň | 44 | 69,13 | 4,83 | 62,1 | 81,0 | 40 | 70,67 | 7,21 | 60,0 | 88,2 | 0,2514 |

Graf č. 14: Titrační kyselosti (°SH) ovocného jogurtu jahoda za rok 2010 a 2011



Statistická významnost: ***

Graf č. 15: Titrační kyselosti (°SH) ovocného jogurtu meruňka za rok 2010 a 2011



Statistická významnost: **

Grafy č. 14 a 15 znázorňují kolísání hodnot kyselosti mezi rokem 2010 a 2011 u jogurtu s příchutí jahoda a meruňka. Dle *TAMINE (1999)* a *GRIEGERA (1990)* se optimální titrační kyselost pohybuje mezi hodnotami 60 až 65 °SH. Dále zdůrazňují maximální hodnotu titrační kyselosti při expedici finálního výrobku a to hodnotou 75 °SH, která by neměla být překročena. Z těchto grafů však vyplývá pravý opak, lze se tak domnívat, že došlo k mikrobiální kontaminaci jogurtu, které vedlo ke zvýšení kyselosti a znehodnocení produktu.

4.2.3 Vliv měsíce na mikrobiologickou kvalitu

Rovněž vliv měsíce se může projevit na mikrobiologické kvalitě konečného produktu (viz. tabulka č. 8), v tomto případě došlo ke statisticky významnému rozdílu pouze v jednom případě a to u výskytu plísní v jogurtu s příchutí meruňka. V ostatních sledovaných ukazatelích nedošlo k potvrzení statistické významnosti.

Průměrné hodnoty CPM u syrového a pasterovaného mléka se v průběhu roku nijak zvlášť nelišily, pohybovaly se v rozmezí 82 – 91 tis. KTJ/ml u syrového mléka a 69 – 78 KTJ/ml u pasterovaného mléka.

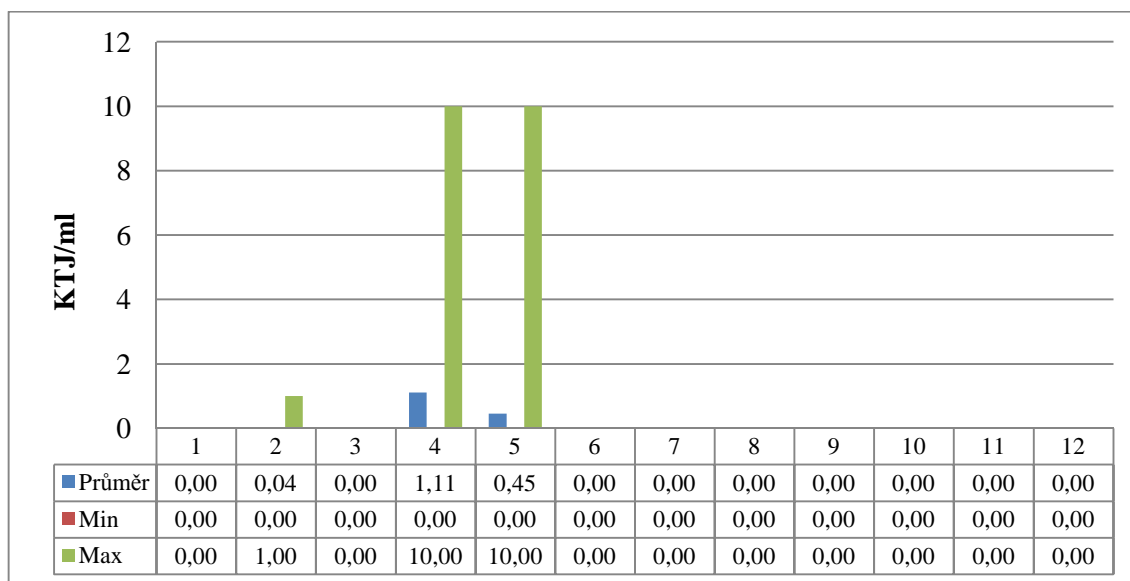
Zvýšené hodnoty mikrobiologických ukazatelů se ve většině případů vyskytovaly od května do října, obzvláště to platí pro výskyt koliformních bakterií a kvasinek. Zvýšené hodnoty mohly být důsledkem vyšších teplot, v zimních měsících jsou až na výjimky hodnoty nižší, nebo nulové.

Tabulka č. 8: Vliv měsíce na mikrobiologickou kvalitu syrového, pasterovaného mléka a vybraných druhů jogurtů

| Mikrobiologická kvalita * | Měsíc | | | | | | | | | | | | Hodnota P |
|---------------------------|-------|----|----|----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------|
| | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. | 7. | 8. | 9. | 10. | 11. | 12. | |
| CPM | | | | | | | | | | | | | |
| n | 7 | 5 | 5 | 6 | 10 | 5 | 7 | 10 | 8 | 7 | 9 | 7 | |
| Syrové | 87 | 86 | 86 | 83 | 85 | 89 | 87 | 88 | 91 | 83 | 82 | 82 | 0,2645 |
| Pasterované | 78 | 71 | 75 | 75 | 73 | 78 | 74 | 79 | 77 | 74 | 69 | 72 | 0,3737 |
| Bílý | | | | | | | | | | | | | |
| n | 30 | 20 | 28 | 24 | 28 | 28 | 22 | 28 | 38 | 42 | 35 | 30 | |
| Koliform. bakterie | 0 | 4 | 21 | 3 | 3497 | 29 | 26 | 4 | 78 | 38 | 3 | 0 | 0,3416 |
| Kvasinky | 2 | 2 | 8 | 0 | 4 | 1 | 2 | 81 | 230 | 0 | 14 | 0 | 0,4427 |
| Plísně | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,2920 |
| Jahoda | | | | | | | | | | | | | |
| n | 31 | 33 | 34 | 27 | 38 | 30 | 17 | 38 | 27 | 36 | 27 | 24 | |
| Koliform. bakterie | 0 | 0 | 0 | 16 | 16 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,6196 |
| Kvasinky | 4 | 0 | 13 | 3 | 4 | 8 | 10 | 85 | 39 | 3 | 5 | 18 | 0,0702 |
| Plísně | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,0570 |
| Meruňka | | | | | | | | | | | | | |
| n | 20 | 28 | 30 | 18 | 22 | 19 | 13 | 21 | 24 | 18 | 20 | 24 | |
| Koliform. bakterie | 0 | 0 | 3 | 0 | 49 | 5 | 100 | 0 | 77 | 0 | 0 | 0 | 0,1229 |
| Kvasinky | 7 | 5 | 10 | 8 | 51 | 33 | 24 | 124 | 79 | 6 | 49 | 10 | 0,2099 |
| Plísně | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,0446 |
| Borůvka | | | | | | | | | | | | | |
| n | 9 | 9 | 16 | 11 | 15 | 13 | 8 | 18 | 9 | 18 | 10 | 9 | |
| Koliform. bakterie | 0 | 0 | 13 | 0 | 7 | 69 | 0 | 0 | 128 | 0 | 0 | 0 | 0,1194 |
| Kvasinky | 2 | 2 | 17 | 0 | 9 | 52 | 11 | 598 | 7 | 2 | 0 | 2 | 0,0871 |
| Plísně | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,5444 |
| Víšeň | | | | | | | | | | | | | |
| n | 6 | 7 | 4 | 11 | 11 | 7 | 2 | 7 | 8 | 9 | 10 | 2 | |
| Koliform. bakterie | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 209 | 0 | 0 | 0 | 0,3914 |
| Kvasinky | 2 | 0 | 0 | 12 | 35 | 391 | 60 | 33 | 434 | 246 | 2 | 0 | 0,0523 |
| Plísně | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,6503 |

* CPM syrového (v tis.) a pasterovaného mléka, výskyt koliformních bakterií, kvasinek a plísní (KTJ/ml)

Graf č. 16: Výskyt plísní (KTJ/ml) v ovocném jogurtu meruňka v závislosti na měsíci



Statistická významnost: *

Graf č. 16 zobrazuje hodnoty výskytu plísní v jogurtu meruňka v jednotlivých měsících. Maximálních hodnot je zde dosaženo ve čtvrtém a pátém měsíci. Mohlo se jednat o nekvalitní dodávku marmelády, která byla v těchto dvou měsících spotřebovávána. Průměrné hodnoty výše zmíněných měsíců však vykazují daleko nižší hodnoty, lze tedy předpokládat, že k maximálním hodnotám mohlo dojít jen u několika kusů, což by mohlo mít na svědomí např. spotřebitelské balení, nebo lidský faktor.

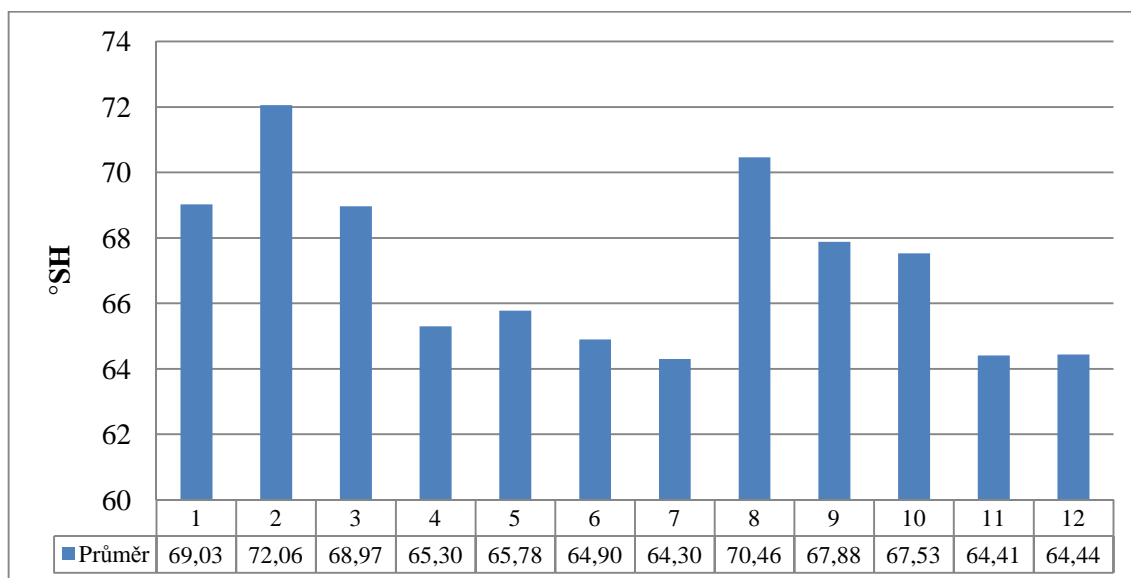
4.2.4 Vliv měsíce na titrační kyselost

Zjištěné údaje v tabulce č. 9 podávají informace o vývoji titrační kyselosti během celého roku. I když došlo ve třech případech k prokázání statistické významnosti, nedošlo ani v jednom případě k překročení hranice 75 °SH, která je pro jogurty z hlediska kyselosti limitující.

Nejvyšší naměřená hodnota 74,52 °SH byla pozorována u jogurtu s příchutí jahoda. U bílého jogurtu se titrační kyselost pohybovala v rozmezí hodnot 64,3 až 72,06 °SH a u jogurtu s příchutí meruňka v rozmezí 61,54 až 69,81 °SH.

Tabulka č. 9: Vliv měsíce na titrační kyselost (°SH) vybraných druhů jogurtů

| Kyselost | Měsíc | | | | | | | | | | | | Hodnota P |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|
| | 1. | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. | 7. | 8. | 9. | 10. | 11. | 12. | |
| Bílý | 69,03 | 72,06 | 68,97 | 65,30 | 65,78 | 64,90 | 64,30 | 70,46 | 67,88 | 67,53 | 64,41 | 64,44 | 0,0000 |
| Jahoda | 73,62 | 74,52 | 72,17 | 69,74 | 72,37 | 72,74 | 69,87 | 71,50 | 66,58 | 65,58 | 67,37 | 68,70 | 0,0000 |
| Meruňka | 67,34 | 68,50 | 67,10 | 67,05 | 66,01 | 69,81 | 68,75 | 66,85 | 61,95 | 63,19 | 61,54 | 63,11 | 0,0000 |
| Borůvka | 68,81 | 72,93 | 67,18 | 69,71 | 70,86 | 70,42 | 67,81 | 70,85 | 68,67 | 68,58 | 65,13 | 68,94 | 0,2777 |
| Víšeň | 68,03 | 71,49 | 73,10 | 70,26 | 72,67 | 71,39 | 66,30 | 70,54 | 68,45 | 67,48 | 66,93 | 72,55 | 0,5219 |

Graf č. 17: Titrační kyselost (°SH) bílého jogurtu v závislosti na měsíci

Statistická významnost: ***

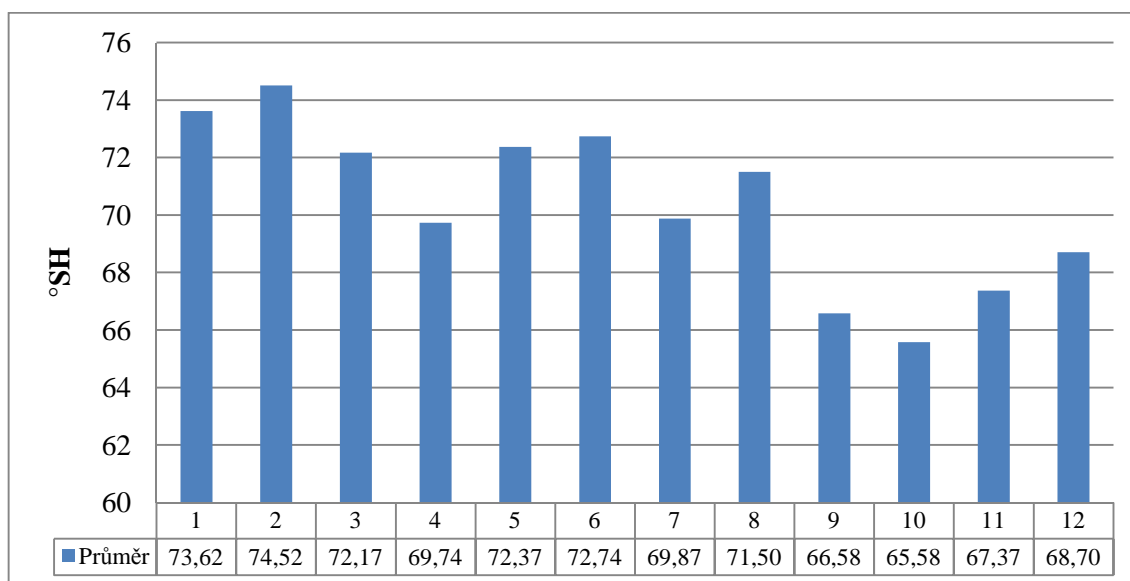
Graf č. 17 předkládá titrační kyselosti bílého jogurtu v závislosti na měsíci. Doporučená hodnota titrační kyselosti jogurtů při expedici nemá přesáhnout 75 °SH (GRIEGER, 1990). Z grafu je patrné, že průměrné hodnoty během celého roku nepřekročily hranici 75 °SH.

Titrační kyselosti grafů č. 18 a 19 se nalézají v rozmezí hodnot 65,58 až 74,52 °SH pro graf č. 18 a 63,11 až 69,81 °SH pro graf č. 19.

Statisticky zajímavé jsou především hodnoty posledních měsíců, které se vyznačují nejnižšími hodnotami z celého roku. U obou grafů se jedná o měsíce září až prosinec, kde v případě grafu č. 18 byly naměřeny hodnoty titrační kyselosti v rozmezí 65,58 až 68,70 °SH a v případě grafu č. 19 to byly hodnoty v rozmezí 61,54 až 63,19 °SH. Dle hodnot v grafu č. 18 docházelo od září k poklesu kyselosti a od listopadu opět k nárůstu, kdežto u grafu č. 19 kyselosti v měsících září až prosinec kolísaly.

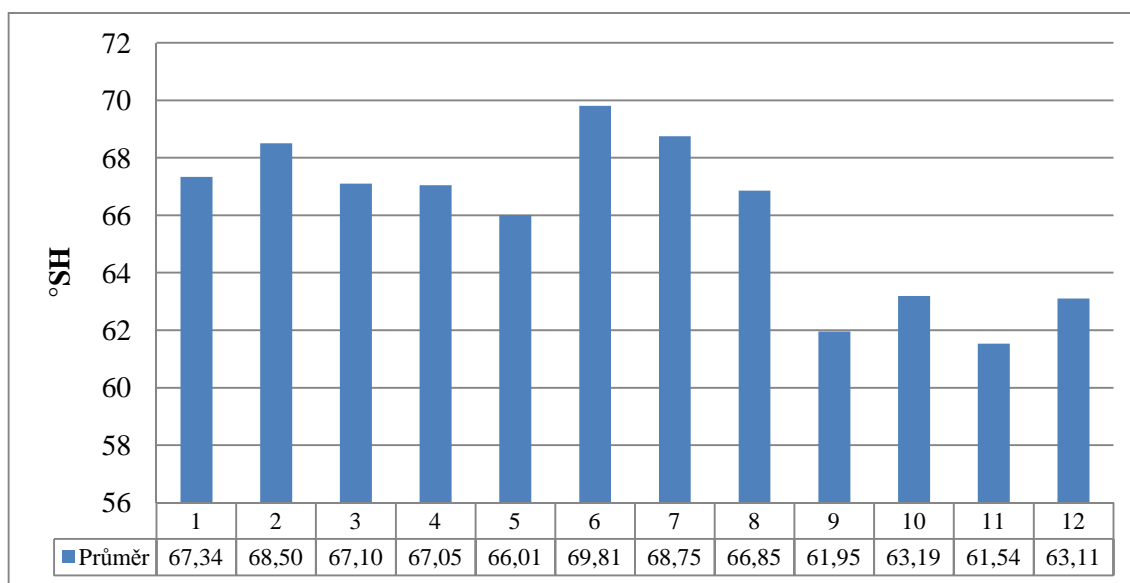
GRIEGER (1990) však udává, že fermentační proces končí, jakmile titrační kyselost dosáhne hodnoty v rozmezí 60 až 65 °SH.

Graf č. 18: Titrační kyselosti (°SH) ovocného jogurtu jahoda v závislosti na měsíci



Statistická významnost: ***

Graf č. 19: Titrační kyselost (°SH) ovocného jogurtu meruňka v závislosti na měsíci



Statistická významnost: ***

5 Závěr

Fermentační teplota významně ovlivňuje dobu a intenzitu růstu kulturních druhů bakterií užívaných v mlékařství.

V části „Vyhodnocení kysací schopnosti“ byla potvrzena hypotéza, že ideální fermentační teplotou pro daný provoz je 33°C. Při této hodnotě docházelo k rovnoměrnému okyselování mléka a ideálnímu poměru bakterií mléčného kysání kmene *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*.

U fermentační teploty 28 °C byla nevýhodou doba fermentace, u teploty 38 °C a 43 °C docházelo i přes výrazné zkrácení fermentačního procesu k nežádoucímu poměru obou zastoupených kmenů bakterií mléčného kysání, kdy tyčinek bylo na konci fermentace více než koků. Tento problém by se mohl odstranit pomocí úpravy poměru zastoupených bakterií a délkou fermentačního procesu.

V části „Vyhodnocení kvality mlékárenské suroviny a jogurtů“ bylo zjištěno, že pasterační efekt, který udává hodnotu úspěšnosti pasterace v procentech, činí pro rok 2010 i 2011 99,99%, lze tedy usuzovat i stejnou kvalitu mléka z hlediska počtu mikroorganismů. Dále byl zjištěn výskyt některých mikrobiologických ukazatelů kvality mlékárenských produktů (koliformní bakterie, kvasinky a plísňe) a to převážně u jogurtů s ovocnou příchutí pravděpodobně v důsledku mikrobiální kontaminace ovocnou složkou. Vliv na kontaminaci měla i vyšší teplota, výskyt byl vyšší v jarních a letních měsících než v zimních měsících. Z hlediska titrační kyselosti nebyly zjištěny hodnoty, které by přesáhly hranici optima 75 °SH.

6 Summary

High decrease of *Streptococcus* after 2 hours of fermentation at temperature 28°C (graph 1) is followed by large increase which stopped after 6 hours (14:00). Slightly decrease of *Streptococcus* was observed at 8 hours of fermentation (16:00). During 8. to 12. hour (20:00) of fermentation *Streptococcus* content had increased again and the highest level was observed at 12. hour of fermentation process. Cooling caused lowering of *Streptococcus* afterwards. *Lactobacillus* content was decreasing till 8. hour of fermentation process (16:00). Slightly increase of *Lactobacillus* was observed till 12. hour (the highest level). Rapid cooling caused lowering of *Lactobacillus* to 7.2×10^5 .

Increase of *Lactobacillus* was more significant than increase of *Streptococcus* at 33°C (graph 2) especially at 6. hour (14:00) of fermentation process. Linear increase of both strain was observed from 6. to 12. hour (20:00) . Highest value was observed at 12. hour and it started to decrease afterwards due to cooling.

Lower content of *Streptococcus* and *Lactobacillus* was significant at fermentation temperature 38°C (graph 3). Decreasing of *Streptococcus* had stopped at 2. hour of fermentation (10:00) which was followed by linear increasing of that content (slightly decrease was observed at 10. hour – 18:00). *Streptococcus* reached its maximum content at 12. hour (20:00) and due to rapid cooling and depletion of nutrients its content is lowering afterwards. Reverse process was observed at *Lactobacillus*. Its content had been lowering up to 4. fermentation hour (12:00) and its followed-up by growth. Content of *Lactobacillus* was even higher then *Streptococcus* at 8. fermentation hour (16:00). The highest content of *Lactobacillus* was detected at 14. fermentation hour (22:00, 1.5 hour after beginning of colling) while *Streptococcus* had been decreasing.

Rapid decrease of *Streptococcus* was detected at 4. (12:00) and 8. (16:00) hour of fermentation (graph 4). After another four hour (to 12. hour of fermentation) its content started to increase and the highest value was observed at 12. hour. Cooling cause slightly decrease.

Lactobacillus was lineary growing from 2. fermentation hour (10:00) to 4. hour (12:00). Rapid growing was recorded to 8. fermentation hour (16:00). The highest value of *Lactobacillus* was observed at 12. hour of fermentation (22:00). Measuring was not made due to high temperature.

Fermentation process of yoghurt is finished at titrable acidity 65 °SH and it cannot reach 75 °SH during expedition. This value could be reached by bulk milk fermented at 28°C after 41 hours, 33°C after 14 hours and 43°C after 13 hours theoretically.

Ideal acidity of youghurts is approximately reached at pH 4,4. Samples which fermented at 28°C could reach this acidity after 18,5 hours; 33°C after 13,5 hours; 38°C after 10 hours and samples fermented at 43°C could reach this acidity (pH 4,4) after 8,5 hours of fermentation process.

7 Seznam literatury

- 1) ANDREW, S. M.: Antimicrobial residues and residues detection in milk and dairy products. *Microbial food safety in animal agriculture*, 2003, s 397-405.
- 2) BERNARDEAU, M., VERNOUX, J. P., HENRI-DUBERNET, S., GUÉQUEN, M.: Safety assessment of dairy microorganisms. The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 126 (278-285).
- 3) 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.
- 4) ČEPIČKA, J., BAREŠ, M., BUBNÍK, Z., a kol.: Obecná potravinářská technologie. 1. vyd.. Praha: VŠCHT, 1995. 246 s. ISBN: 80-7080-239-1.
- 5) ČERNÁ, E., CVAK, Z.: Analytické metody pro mléko a mlékárenské výrobky. Díl I. Chemie. 1. vyd. Praha: Výzkumný ústav potravinářského průmyslu, 1986. 439 s. ISBN: 80-85420-36-4.
- 6) ČERNÁ, E., MERGL, M.: Laboratorní kontrolní metody v mlékařství. 1. vyd. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1971. 264 s.
- 7) ČSN 57 0101 Mikrobiologické zkoušení mléka a mléčných výrobků. 1964.
- 8) ČSN 57 0529 Syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování. 1988.
- 9) ČSN ISO 4833 Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30°C. 1995.
- 10) DOLEŽAL, O., HLÁSNÝ, J., JÍLEK, F., HANUŠ, O.: Mléko, dojení, dojírny. 1. vyd. Praha: Agrospoj, 2000. 241 s.

- 11) DOLORME, CH.: Safety assessment of dairy microorganisms. *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 126 (274-277).
- 12) FORMAN, L.: Mlékárenská technologie. 1. vyd. VŠCHT Praha, 1996, 228 s. ISBN: 80-7080-250-2
- 13) FOX, P., MC'SWEENEY, P.: Dairy chemistry and biochemistry [online, citace 2012-04-12]. New York: Thomson Science, 1998.
- 14) GAJDŮŠEK, S.: Laktologie. 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2003. 78 s. ISBN: 80-7157-657-3.
- 15) GHONG, K.: Coliforms in milk – presence of bad bugs?. *Food Safety Focus*. 2008 [online, citace 2011-08-01]. Dostupné na [www: <http://cfs.gov.hk/english/multimedia/multimedia_PUB/multimedia_pub_fsf_24_01.html>](http://cfs.gov.hk/english/multimedia/multimedia_PUB/multimedia_pub_fsf_24_01.html).
- 16) GHOSH, P. K. SAXENA, R. K., GUPTA, R., YADAV, R. P., DAVIDSON, S.: Microbial lipases. Production and applications. *Science Progress*, 1996, 79 (57-119).
- 17) GOMES, J., STEINER, W.: The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technol. Biotechnol.*, 2004, 42 (223-235).
- 18) GÖRNER, F., VALÍK, L., Aplikovaná mikrobiológia potravín. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004. 528 s. ISBN: 80-967064-9-7.
- 19) GOUNOT, A. M.: Psychrophilic and psychrotrophic microorganisms. *Birhauser Basel*, 1986, 42 (1192-1197).
- 20) GRIEGER, C., LUKÁŠOVÁ, J.: Bakterie mléčného kysání. IN: Hygiena mlieka a mliečnych výrobkov. ED: GRIEGER, C. 1.vyd. Bratislava: Priroda, 1990. 397 s. ISBN: 80-07-00253-7.

- 21) GRIEGER , C., LUKÁŠOVÁ, J.: Koliformní mikroorganismy. IN: Hygiena mlieka a mliečnych výrobkov. ED: GRIEGER, C. 1.vyd. Bratislava: Priroda, 1990. 397 s. ISBN: 80-07-00253-7.
- 22) GRIEGER , C., LUKÁŠOVÁ, J.: Mikrobiální lipázy. IN: Hygiena mlieka a mliečnych výrobkov. ED: GRIEGER, C. 1.vyd. Bratislava: Priroda, 1990. 397 s. ISBN: 80-07-00253-7.
- 23) GRIEGER , C., LUKÁŠOVÁ, J.: Mikrobiální proteázy. IN: Hygiena mlieka a mliečnych výrobkov. ED: GRIEGER, C. 1.vyd. Bratislava: Priroda, 1990. 397 s. ISBN: 80-07-00253-7.
- 24) GRIEGER , C., LUKÁŠOVÁ, J.: Psychrotrofní organismy. IN: Hygiena mlieka a mliečnych výrobkov. ED: GRIEGER, C. 1.vyd. Bratislava: Priroda, 1990. 397 s. ISBN: 80-07-00253-7.
- 25) GRIEGER , C., LUKÁŠOVÁ, J.: Termofilní mikroorganismy. IN: Hygiena mlieka a mliečnych výrobkov. ED: GRIEGER, C. 1.vyd. Bratislava: Priroda, 1990. 397 s. ISBN: 80-07-00253-7.
- 26) GRIEGER, C.: Hygiena mlieka a mliečnych výrobkov. 1.vyd. Bratislava: Priroda, 1990. 397 s. ISBN: 80-07-00253-7.
- 27) HAVLOVÁ, J., HRABOVÁ, H., JIČÍNSKÁ, E.: Mikrobiologické metody v kontrole jakosti mléka a mlékárenských výrobků. 1. vyd. Praha:ÚZPI, 1993. 24 s. ISBN: 80-85120-37-2.
- 28) HOLEC, J.: Cizorodé látky v mléku a v mléčných výrobcích. IN: Hygiena mlieka a mliečnych výrobkov. ED: GRIEGER, C. 1. vyd. Bratislava: Příroda, 1990. 397 s. ISBN: 80-07-00253-7.
- 29) HUGENHOLTZ, J., SYBESMA, W., GROOT, M. N., et al.: Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002, 82 (217-235).

- 30) Hygienický balíček, 2005 [online, citace 2011-01-12]. Dostupné na [www:<http://eagri.cz/public/web/mze/potraviny/hygienicky-balicek/>](http://eagri.cz/public/web/mze/potraviny/hygienicky-balicek/)
- 31) HYLMAR, B.: Výroba kysaných mléčných výrobků. 1. vyd. Praha: SNTL, 1986, 209 s. ISBN: 04-812-86.
- 32) JIČÍNSKÁ, E., HAVLOVÁ, J.: Patogenní mikroorganismy v mléce a mlékárenských výrobcích. 1. vyd. Praha: ÚZPI, 1995. 106 s. ISBN: 80-85120-47-X.
- 33) KADLEC, P.: Technologie potravin II. 1. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. Technologie mléka a mlékárenských výrobků, s. 9-84. ISBN: 978-80-7080-510-7.
- 34) KISHONTI, E.: Influence of heat resistant lipases nad proteases in psychrotrophic bacteria on product quality. *Int. Dairy Fed. Ann. Bull*, 1975, 36 (121-124).
- 35) LEROY, F., DE VUYST, L.: Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2007, 13 (194-199).
- 36) LUCEY, J. A.: Formation and Physical Properties of Milk Protein Gels . *Journal of Dairy Science*. 2002, 2, 85, s. 281 - 294.
- 37) LUKÁŠOVÁ, J.: Hygienicky a technologicky významné skupiny mikroorganismů. IN: Hygiena mlieka a mliečnych výrobkov. ED: GRIEGER, C. 1.vyd. Bratislava: Priroda, 1990. 397 s. ISBN: 80-07-00253-7.
- 38) MAKAROVÁ, K., SLESAREV, A., WOLF, Y. et al.: Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *National Academy of Science*, 2006, 103 (1511-15616).
- 39) MALA, B. R., APARNA, M., MOHINI, S., VASANTI, V.: Molecular and biotechnice aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecurar Biology Review*, 1998, 62 (597-635).

- 40) MILLS, S., O'SULLIVAN, O., HILL, C., FITZGERALD, G., ROSS, R. P.: The changing face of dairy starter culture research. From genomics to economics. *International Journal of Dairy Technology*. 2010, 63 (149-170).
- 41) Mlékárenská technologie I [online] [cit. 2012-02-07]
dostupný na [www:<http://utb.cepac.cz/Screens/ContentProvider.aspx/QUxiItw-Kwj98AiJRVY56zNjg14wYbs1IIBnLtTrRw1/M0029_mlekarenska_technologie/distancni_text/M0029_mlekarenska_technologie_distancni_text.pdf>](http://utb.cepac.cz/Screens/ContentProvider.aspx/QUxiItw-Kwj98AiJRVY56zNjg14wYbs1IIBnLtTrRw1/M0029_mlekarenska_technologie/distancni_text/M0029_mlekarenska_technologie_distancni_text.pdf)
- 42) Mlékařské kultury [online, citace 2011-08-10]. Dostupné na [www:<http://www.milcom-as.cz/vum-a-laktoflora/produkty-laktoflora/mlekarske-kultury.html>](http://www.milcom-as.cz/vum-a-laktoflora/produkty-laktoflora/mlekarske-kultury.html)
- 43) MONROE, J. J., LOESSNER, M. J., GOLDEN, D. A.: Modern food microbiology. NY: Springer, 2005. 790 s. ISBN: 0-387-23180-3.
- 44) 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.
- 45) NAVRÁTILOVÁ, P.: Problematika reziduí inhibičních látek v syrovém kravském mléce. *Veterinářství*, 2002, 52 (478-481).
- 46) NECIDOVÁ, L., CUPÁKOVÁ,Š., JANŠTOVÁ, B., NAVRÁTILOVÁ, P.: Úloha probatik v kysaných mléčných výrobcích. *Veterinářství*, 2002, 52 (66-68).
- 47) OGIER, J. C., CASALTA, E., FARROKH, C., SAIHI, A.: Safety assessment of dairy microorganism. The *Leuconostoc* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, 126 (286-290).

- 48) PEŠEK, M.: Hodnocení jakosti, zpracování a zbožiznalství živočišných produktů. Část I. Jakost potravin, potravinových surovin a mléka. 1. vyd. České Budějovice: Zemědělská fakulta Jihočeské Univerzity, 1997. 117 s. ISBN: 80-7105-191-8.
- 49) PEŠEK, M.: Ošetřování, hodnocení jakosti a zpracování mléka na farmě. 1. vyd. Praha: Institut výchovy a vzdělávání Ministerstva zemědělství ČR, 1999. 54 s. ISBN: 80-7105-191-8.
- 50) PIJANOWSKI, E.: Základy chémie a technológie mliekárstva, 1. diel. Surové mlieko, konzúmnne mlieko, mliečné konzervy. 1. vyd. Príroda: Bratislava, 1977. 499 s.
- 51) REYBROECK, W.: Role of the farmer in preventing residues of antibiotics in farm milk. *Bulletin of the International Dairy Federation*, 2004, 386 (8-9).
- 52) SALMINEN, S., VON WRIGHT, A., OUWEHAND, A. Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects. 3. vyd., New York, U.S.A. 2004. s. 633. ISBN 0-8247-5332-1.
- 53) SAMKOVÁ, E., SMETANA, P., HLAVÁČEK, J., MRÁZEK, J., ROZSYPAL, R., POSPÍŠIL, M., TRÁVNÍČEK, P.: Faremní zpracování mléka v ekologickém zemědělství. Olomouc: Bioinstitut, 2009. ISBN: 978-80-904174-5-8.
- 54) SEDLÁČEK, I., Taxonomie prokaryot. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. 270 s. ISBN: 80-210-4207-9.
- 55) SHARPE, M. E.: Lactic acid bacteria in the dairy industry. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 1979, 32 (9).
- 56) SPENCER, J., DE RAGOUT SPENCER, A.: Food mikrobiology protocols. *Biological and Life Sciences*, 2001, 14 (3-10).
- 57) STILES, M., HOLZAPFEL, W. Lactic acid bacteria of foods and their current taxo-nomy. *International Journal of Food Mikrobiology*, 1997, vol. 36, s. 1-29.

- 58) SUKOVÁ, I.: Možnosti výroby jogurtu bez fermentace. *Australian Journal of Dairy Technology*, 2005, 3 (264-266).
- 59) SUKOVÁ, J.: Enterokoky a jejich hodnocení mlékárenské technologii. *Mliekarstvo*, 2003, 2 (42-45).
- 60) SZIGETI, J., VARGA, L., KRASZ, A.: Some possibilities for production of longer-life functional sour dairy products. *Tejgazdasag*. 2003, 63 (190-210).
- 61) ŠILHÁNKOVÁ, L.: Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii. 3. vyd. Praha: Academia, 2002. 363 s. ISBN: 80-200-1024-6.
- 62) ŠTĚTINA, J.: Vlastnosti mléka a jeho základní ošetření. In: Technologie potravin II. ED: Kadlec a kol. 1. vyd., Praha: VŠCHT, 2002. 236 s. ISBN: 80-7080-510-2.
- 63) TAMINE., A. Y., ROBINSON, R. K.: Yoghurt Science and Technology. 2. vyd. Woodhead Publishing, 1999. 619 s. ISBN: 1-85573-399-4.
- 64) TEBALDI, M. V. R., OLIVEIRA, T. L. C., BOARI, C. A., PICCOLI, R. H.: Isolation of coliforms, staphylococci and enterococci in raw milk from communitarian expansion refrigeration tanks. Identification, lipolytic and proteolytic action. *Science Technologiade Alimentos*, 2008, 28 (753-760).
- 65) TEPLÝ, M., HYLMAR, B., KALINA, Č., RUMLOVÁ, V.: Kefír, jogurt, acidofilní a jiné kyselky. 1. vyd. Praha: SNTL, 1968. 185 s. ISBN 04-819-68.
- 66) TODAR, K.: Fermentation of foods by lactic acid bacteria. 2011 [online, citace 2011-08-01].
Dostupné na www: <http://textbookofbacteriology.net/lactics_3.html>
- 67) TREICHEL, H., DE OLIVEIRA, D., MAZUTTI, A. M., DI LUCCIO, M., OLIVEIRA, J. V.: Microbial lipases production. *Food Bioprocess Technol.*, 2010, 3 (182-196).

- 68) Vyhláška 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje.
- 69) ZIARNO, M.: Charakterystyka komercyjnych kultur starterowych stosowanych w przemyśle mleczarskim. *Medycyna Weterynaryjna*. 2007, 63 (909-913).
- 70) ZIMÁK, E.: Technologie pro 3. ročník SPŠ mlékárenské. 1. vyd. PRAHA: SNTL, 1982.184 s.
- 71) ZOTTA, T., PICCIARDI, A., ROSSANO, R., PARENTE, E.: Urease production by *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiology*. 2008,25 (113-119).
- 72) ŽIŽKA, B., MARTÍNKOVÁ, Z.: Mikrobiologie. Praha: SNTL, 1980. 182 s.

8 Přílohy

8.1.1 Fermentační teplota 28°C

Tabulka č. 10: Titrační a aktivní kyselost při fermentační teplotě 28°C

| Vzorek číslo | Hodina | Titrační kyselost | | Aktivní kyselost (pH) | Teplota (°C) |
|--------------|--------|-------------------|--------------------|-----------------------|--------------|
| | | °SH | Spotřeba NaOH (ml) | | |
| 0 | 8:00 | 12,2 | 6,10 | 6,45 | 26,4 |
| 1 | 9:00 | 12,7 | 6,35 | 6,45 | 28,1 |
| 2 | 10:00 | 11,7 | 5,85 | 6,44 | 28,3 |
| 3 | 11:00 | 11,8 | 5,90 | 6,45 | 28,4 |
| 4 | 12:00 | 12,2 | 6,10 | 6,42 | 28,5 |
| 5 | 13:00 | 12,8 | 6,40 | 6,43 | 28,4 |
| 6 | 14:00 | 13,1 | 6,55 | 6,45 | 28,4 |
| 7 | 15:00 | 13,7 | 6,85 | 6,49 | 28,4 |
| 8 | 16:00 | 12,6 | 6,30 | 6,50 | 27,8 |
| 9 | 17:00 | 14,0 | 7,00 | 6,52 | 28,4 |
| 10 | 18:00 | 13,4 | 6,70 | 6,43 | 28,5 |
| 11 | 19:00 | 14,5 | 7,25 | 6,07 | 28,5 |
| 12 | 20:00 | 17,0 | 8,50 | 5,85 | 28,6 |
| 13 | 21:00 | 17,8 | 8,90 | 5,99 | 25,5 |
| 14 | 22:00 | 22,3 | 11,15 | 5,82 | 23,3 |

Tabulka č. 11: Přepočtené hodnoty °SH na obsah kyseliny mléčné při fermentační teplotě 28°C

| Vzorek číslo | Hodina | Látkový obsah kyseliny v mmol*l ⁻¹ | Obsah kyseliny mléčné v g | Obsah kyseliny mléčné v % |
|--------------|--------|---|---------------------------|---------------------------|
| 0 | 8:00 | 30,50 | 0,27 | 0,14 |
| 1 | 9:00 | 31,75 | 0,29 | 0,14 |
| 2 | 10:00 | 29,25 | 0,26 | 0,13 |
| 3 | 11:00 | 29,50 | 0,27 | 0,13 |
| 4 | 12:00 | 30,50 | 0,27 | 0,14 |
| 5 | 13:00 | 32,00 | 0,29 | 0,14 |
| 6 | 14:00 | 32,75 | 0,29 | 0,15 |
| 7 | 15:00 | 34,25 | 0,31 | 0,15 |
| 8 | 16:00 | 31,50 | 0,28 | 0,14 |
| 9 | 17:00 | 35,00 | 0,32 | 0,16 |
| 10 | 18:00 | 33,50 | 0,30 | 0,15 |
| 11 | 19:00 | 36,25 | 0,33 | 0,16 |
| 12 | 20:00 | 42,50 | 0,38 | 0,19 |
| 13 | 21:00 | 44,50 | 0,40 | 0,20 |
| 14 | 22:00 | 55,75 | 0,50 | 0,25 |

Tabulka č. 12: Zjištěné hodnoty mikroorganismů při fermentační teplotě 28°C

| Vzorek číslo | Hodina | Teplota (°C) | Lactobacillus (MRS) | Streptococcus (M17) |
|--------------|--------|--------------|-----------------------|------------------------|
| 0 | 8:00 | 26,4 | 9,9 x 10 ⁴ | 39,4 x 10 ⁴ |
| 1 | 9:00 | 28,1 | - | - |
| 2 | 10:00 | 28,3 | 9,1 x 10 ⁴ | 3,2 x 10 ⁴ |
| 3 | 11:00 | 28,4 | - | - |
| 4 | 12:00 | 28,5 | 9,4 x 10 ⁴ | 17,7 x 10 ⁴ |
| 5 | 13:00 | 28,4 | - | - |
| 6 | 14:00 | 28,4 | 9 x 10 ⁴ | 2,7 x 10 ⁶ |
| 7 | 15:00 | 28,4 | - | - |
| 8 | 16:00 | 27,8 | 7,4 x 10 ⁴ | 1,5 x 10 ⁶ |
| 9 | 17:00 | 28,4 | - | - |
| 10 | 18:00 | 28,5 | 9 x 10 ⁴ | 34,9 x 10 ⁶ |
| 11 | 19:00 | 28,5 | - | - |
| 12 | 20:00 | 28,6 | 3,7 x 10 ⁶ | 21,4 x 10 ⁷ |
| 13 | 21:00 | 25,5 | - | - |
| 14 | 22:00 | 23,3 | 7,2 x 10 ⁵ | 13,9 x 10 ⁷ |

8.1.2 Fermentační teplota 33°C

Tabulka č. 13: Titrační a aktivní kyselost při fermentační teplotě 33°C

| Vzorek číslo | Hodina | Titrační kyselost | | Aktivní kyselost (pH) | Teplota (°C) |
|--------------|--------|-------------------|--------------------|-----------------------|--------------|
| | | °SH | Spotřeba NaOH (ml) | | |
| 0 | 8:00 | 12,2 | 6,10 | 6,45 | 26,4 |
| 1 | 9:00 | 12,3 | 6,15 | 6,45 | 30,9 |
| 2 | 10:00 | 11,4 | 5,70 | 6,43 | 31,6 |
| 3 | 11:00 | 11,1 | 5,55 | 6,42 | 32,5 |
| 4 | 12:00 | 11,7 | 5,85 | 6,42 | 32,9 |
| 5 | 13:00 | 12,6 | 6,30 | 6,43 | 33,0 |
| 6 | 14:00 | 12,7 | 6,35 | 6,45 | 33,3 |
| 7 | 15:00 | 13,1 | 6,55 | 6,44 | 33,3 |
| 8 | 16:00 | 13,9 | 6,95 | 6,26 | 33,4 |
| 9 | 17:00 | 16,8 | 8,40 | 5,61 | 33,6 |
| 10 | 18:00 | 27,6 | 13,80 | 5,11 | 33,8 |
| 11 | 19:00 | 38,4 | 2,35 | 4,60 | 33,5 |
| 12 | 20:00 | 41,3 | 2,25 | 4,45 | 34,0 |
| 13 | 21:00 | 49,2 | 2,35 | 4,43 | 32,3 |
| 14 | 22:00 | 50,6 | 2,45 | 4,38 | 21,5 |

Tabulka č. 14: Přepočtené hodnoty °SH na obsah kyseliny mléčné při fermentační teplotě 33°C

| Vzorek číslo | Hodina | Látkový obsah kyseliny v mmol*l ⁻¹ | Obsah kyseliny mléčné v g | Obsah kyseliny mléčné v % |
|--------------|--------|---|---------------------------|---------------------------|
| 0 | 8:00 | 30,50 | 0,27 | 0,14 |
| 1 | 9:00 | 30,75 | 0,28 | 0,14 |
| 2 | 10:00 | 28,50 | 0,26 | 0,13 |
| 3 | 11:00 | 27,75 | 0,25 | 0,12 |
| 4 | 12:00 | 29,25 | 0,26 | 0,13 |
| 5 | 13:00 | 31,50 | 0,28 | 0,14 |
| 6 | 14:00 | 31,75 | 0,29 | 0,14 |
| 7 | 15:00 | 32,75 | 0,29 | 0,15 |
| 8 | 16:00 | 34,75 | 0,31 | 0,16 |
| 9 | 17:00 | 42,00 | 0,38 | 0,19 |
| 10 | 18:00 | 69,00 | 0,62 | 0,31 |
| 11 | 19:00 | 96,04 | 0,86 | 0,43 |
| 12 | 20:00 | 103,35 | 0,93 | 0,47 |
| 13 | 21:00 | 122,88 | 1,11 | 0,55 |
| 14 | 22:00 | 126,49 | 1,14 | 0,57 |

Tabulka č. 15: Zjištěné hodnoty mikroorganismů při fermentační teplotě 33°C

| Vzorek číslo | Hodina | Teplota (°C) | Lactobacillus (MRS) | Streptococcus (M17) |
|--------------|--------|--------------|------------------------|------------------------|
| 0 | 8:00 | 26,4 | 9,9 x 10 ⁴ | 39,4 x 10 ⁴ |
| 1 | 9:00 | 30,9 | - | - |
| 2 | 10:00 | 31,6 | 7,9 x 10 ⁴ | 4,8 x 10 ⁴ |
| 3 | 11:00 | 32,5 | - | - |
| 4 | 12:00 | 32,9 | 4,5 x 10 ⁴ | 6,9 x 10 ⁵ |
| 5 | 13:00 | 33,0 | - | - |
| 6 | 14:00 | 33,3 | 8,2 x 10 ³ | 3,1 x 10 ⁶ |
| 7 | 15:00 | 33,3 | - | - |
| 8 | 16:00 | 33,4 | 1,7 x 10 ⁵ | 3,9 x 10 ⁶ |
| 9 | 17:00 | 33,6 | - | - |
| 10 | 18:00 | 33,8 | 2,3 x 10 ⁶ | 2,9 x 10 ⁷ |
| 11 | 19:00 | 33,5 | - | - |
| 12 | 20:00 | 34,0 | 2,2 x 10 ⁸ | 9,3 x 10 ⁸ |
| 13 | 21:00 | 32,3 | - | - |
| 14 | 22:00 | 21,5 | 1,08 x 10 ⁷ | 8,6 x 10 ⁸ |

8.1.3 Fermentační teplota 38°C

Tabulka č. 16: Titrační a aktivní kyselost při fermentační teplotě 38°C

| Vzorek číslo | Hodina | Titrační kyselost | | Aktivní kyselost (pH) | Teplota (°C) |
|--------------|--------|-------------------|--------------------|-----------------------|--------------|
| | | °SH | Spotřeba NaOH (ml) | | |
| 0 | 8:00 | 12,2 | 6,10 | 6,45 | 26,4 |
| 1 | 9:00 | 12,0 | 6,00 | 6,43 | 33,6 |
| 2 | 10:00 | 11,1 | 5,55 | 6,40 | 32,5 |
| 3 | 11:00 | 11,7 | 5,85 | 6,38 | 33,3 |
| 4 | 12:00 | 12,0 | 6,00 | 6,39 | 34,3 |
| 5 | 13:00 | 13,2 | 6,60 | 6,37 | 34,5 |
| 6 | 14:00 | 15,1 | 7,55 | 6,29 | 35,5 |
| 7 | 15:00 | 18,7 | 9,35 | 5,80 | 35,7 |
| 8 | 16:00 | 27,2 | 13,60 | 5,27 | 36,1 |
| 9 | 17:00 | 36,9 | 2,30 | 4,50 | 38,1 |
| 10 | 18:00 | 42,7 | 2,20 | 4,45 | 37,8 |
| 11 | 19:00 | 53,7 | 4,30 | 4,25 | 38,2 |
| 12 | 20:00 | 57,0 | 3,15 | 4,14 | 38,5 |
| 13 | 21:00 | 55,8 | 2,70 | 4,14 | 32,3 |
| 14 | 22:00 | 65,0 | 3,05 | 4,08 | 25,1 |

Tabulka č. 17: Přepočtené hodnoty °SH na obsah kyseliny mléčné při fermentační teplotě 38°C

| Vzorek číslo | Hodina | Látkový obsah kyseliny v mmol*l ⁻¹ | Obsah kyseliny mléčné v g | Obsah kyseliny mléčné v % |
|--------------|--------|---|---------------------------|---------------------------|
| 0 | 8:00 | 30,50 | 0,27 | 0,14 |
| 1 | 9:00 | 30,00 | 0,27 | 0,14 |
| 2 | 10:00 | 27,75 | 0,25 | 0,12 |
| 3 | 11:00 | 29,25 | 0,26 | 0,13 |
| 4 | 12:00 | 30,00 | 0,27 | 0,14 |
| 5 | 13:00 | 33,00 | 0,30 | 0,15 |
| 6 | 14:00 | 37,75 | 0,34 | 0,17 |
| 7 | 15:00 | 46,75 | 0,42 | 0,21 |
| 8 | 16:00 | 68,00 | 0,61 | 0,31 |
| 9 | 17:00 | 92,15 | 0,83 | 0,41 |
| 10 | 18:00 | 106,78 | 0,96 | 0,48 |
| 11 | 19:00 | 134,23 | 1,21 | 0,60 |
| 12 | 20:00 | 142,42 | 1,28 | 0,64 |
| 13 | 21:00 | 139,42 | 1,25 | 0,63 |
| 14 | 22:00 | 162,41 | 1,46 | 0,73 |

Tabulka č. 18: Zjištěné hodnoty mikroorganismů při fermentační teplotě 38°C

| Vzorek číslo | Hodina | Lactobacillus (MRS) | Streptococcus (M17) |
|--------------|--------|---------------------|---------------------|
| 0 | 8:00 | $9,9 \times 10^4$ | $39,4 \times 10^4$ |
| 1 | 9:00 | - | - |
| 2 | 10:00 | $7,9 \times 10^4$ | $5,3 \times 10^4$ |
| 3 | 11:00 | - | - |
| 4 | 12:00 | $7,2 \times 10^3$ | $4,2 \times 10^5$ |
| 5 | 13:00 | - | - |
| 6 | 14:00 | $3,7 \times 10^4$ | $3,4 \times 10^6$ |
| 7 | 15:00 | - | - |
| 8 | 16:00 | $2,8 \times 10^6$ | $6,2 \times 10^6$ |
| 9 | 17:00 | - | - |
| 10 | 18:00 | $1,7 \times 10^7$ | $2,9 \times 10^7$ |
| 11 | 19:00 | - | - |
| 12 | 20:00 | $1,6 \times 10^9$ | $1,3 \times 10^9$ |
| 13 | 21:00 | - | - |
| 14 | 22:00 | $6,3 \times 10^8$ | $4,3 \times 10^8$ |

8.1.4 Fermentační teplota 43°C

Tabulka č. 19: Titrační a aktivní kyselost při fermentační teplotě 43°C

| Vzorek číslo | Hodina | Titrační kyselost | | Aktivní kyselost (pH) | Teplota (°C) |
|--------------|--------|-------------------|--------------------|-----------------------|--------------|
| | | °SH | Spotřeba NaOH (ml) | | |
| 0 | 8:00 | 12,2 | 6,10 | 6,45 | 26,4 |
| 1 | 9:00 | 12,6 | 6,30 | 6,38 | 37,7 |
| 2 | 10:00 | 11,7 | 5,85 | 6,35 | 40,7 |
| 3 | 11:00 | 11,0 | 5,50 | 6,23 | 41,5 |
| 4 | 12:00 | 21,3 | 10,65 | 5,63 | 42,6 |
| 5 | 13:00 | 32,4 | 16,20 | 5,17 | 42,8 |
| 6 | 14:00 | 36,0 | 18,00 | 4,89 | 43,3 |
| 7 | 15:00 | 41,9 | 2,35 | 4,61 | 43,7 |
| 8 | 16:00 | 50,4 | 3,30 | 4,48 | 43,3 |
| 9 | 17:00 | 50,9 | 2,65 | 4,30 | 43,1 |
| 10 | 18:00 | 55,1 | 2,65 | 4,25 | 43,1 |
| 11 | 19:00 | 55,2 | 2,65 | 4,18 | 43,5 |
| 12 | 20:00 | 59,4 | 3,45 | 4,17 | 43,3 |
| 13 | 21:00 | 53,5 | 2,40 | 4,18 | 36,1 |
| 14 | 22:00 | 49,4 | 2,20 | 4,18 | 23,1 |

Tabulka č. 20: Přepočtené hodnoty °SH na obsah kyseliny mléčné při fermentační teplotě 43°C

| Vzorek číslo | Hodina | Látkový obsah kyseliny v mmol*l ⁻¹ | Obsah kyseliny mléčné v g | Obsah kyseliny mléčné v % |
|--------------|--------|---|---------------------------|---------------------------|
| 0 | 8:00 | 30,50 | 0,27 | 0,14 |
| 1 | 9:00 | 31,50 | 0,28 | 0,14 |
| 2 | 10:00 | 29,25 | 0,26 | 0,13 |
| 3 | 11:00 | 27,50 | 0,25 | 0,12 |
| 4 | 12:00 | 53,25 | 0,48 | 0,24 |
| 5 | 13:00 | 81,00 | 0,73 | 0,36 |
| 6 | 14:00 | 90,00 | 0,81 | 0,41 |
| 7 | 15:00 | 104,83 | 0,94 | 0,47 |
| 8 | 16:00 | 126,00 | 1,13 | 0,57 |
| 9 | 17:00 | 127,25 | 1,15 | 0,57 |
| 10 | 18:00 | 137,75 | 1,24 | 0,62 |
| 11 | 19:00 | 138,00 | 1,24 | 0,62 |
| 12 | 20:00 | 148,50 | 1,34 | 0,67 |
| 13 | 21:00 | 133,75 | 1,20 | 0,60 |
| 14 | 22:00 | 123,48 | 1,11 | 0,56 |

Tabulka č. 21: Zjištěné hodnoty mikroorganismů při fermentační teplotě 43°C

| Vzorek číslo | Hodina | Lactobacillus (MRS) | Streptococcus (M17) |
|--------------|--------|-----------------------|------------------------|
| 0 | 8:00 | 9,9 x 10 ⁴ | 39,4 x 10 ⁴ |
| 1 | 9:00 | - | - |
| 2 | 10:00 | 3,9 x 10 ⁴ | 4,9 x 10 ⁴ |
| 3 | 11:00 | - | - |
| 4 | 12:00 | 1,3 x 10 ⁵ | 2,8 x 10 ⁶ |
| 5 | 13:00 | - | - |
| 6 | 14:00 | 3,8 x 10 ⁵ | 8,7 x 10 ⁵ |
| 7 | 15:00 | - | - |
| 8 | 16:00 | 3,9 x 10 ⁸ | 4,6 x 10 ⁵ |
| 9 | 17:00 | - | - |
| 10 | 18:00 | 3,3 x 10 ⁷ | 3,3 x 10 ⁷ |
| 11 | 19:00 | - | - |
| 12 | 20:00 | 1,8 x 10 ⁹ | 3,2 x 10 ⁹ |
| 13 | 21:00 | - | - |
| 14 | 22:00 | 3,8 x 10 ⁹ | 3,0 x 10 ⁹ |