

Výroba probiotických jogurtů a pozorování bakterií

Úvod:

Jogurty patří k nejrozšířenějším fermentovaným výrobkům obsahujícím termofilní bakterie mléčného kvašení. Jogurt obsahuje živé bakterie *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgarius*. Při získávání energie a jako zdroj uhlíku využívají tyto bakterie mléčného kvašení mléčný cukr (laktózu), zkvašováním laktózy tvoří kyselinu mléčnou, která do značné míry určuje chuť jogurtu. Jelikož původní mikroflóra mléka je proměnlivá, zastoupení mléčných bakterií je vlivem chlazení potlačeno a větší část mikroflóry je zničena pasterací, používá se podle typu výrobku přísada čistých mlékařských kultur, které obsahují pouze určité dříve vyizolované mikroorganismy.

Podle použitého způsobu fermentace se rozlišují jogurty na:

- a) jogurty s nerozmíchaným koagulátem** („set yoghurts“) s fermentací přímo ve spotřebitelských obalech,
- b) jogurty s rozmíchaným koagulátem** („stirred yoghurts“) s fermentací v tanku, kdy se po promíchání koagulátu a vychlazení plní směs do spotřebitelských obalů.

Úkol:

Vyrobte jogurty z **tří typů mlék (odstředěné, polotučné a plnotučné)**. Určete charakteristické parametry aktivní a titrační kyselosti před inkubací a po vychlazení jogurtu. Připravte preparát pro mikroskopii pomocí Gramova barvení. Pozorujte tyčinky (*Lactobacillus*), koky (*Streptococcus*) a *Bifidobacteria* (tvar Y). Nakonec vyrobené jogurty ohodnoťte pomocí senzorické analýzy.

Postup práce:

Výroba jogurtu

Zahřáté mléko na cca. 43 °C nalijte do sterilních skleniček. Poté přidejte dvě až tři lžičky sušeného mléka. Následně přidejte jogurtovou kulturu lyofilizovanou (Laktoflora) a pipetujte 1 ml ABT probiotické kultury (Laktoflora). Pracujte sterilně a asepticky u kahanu. Poté se jogurt vloží do termostatu a inkubace probíhá při 43 °C po dobu 4-5 hodin.

Mikroskopie

Pro mikroskopické pozorování morfologie streptokoků, laktobacilů a bifidobakterií ve vyrobeném jogurtu použijte optický mikroskop. Bakterie pozorujte s použitím imerzního objektivu při celkové zvětšení 1000x/1500x.

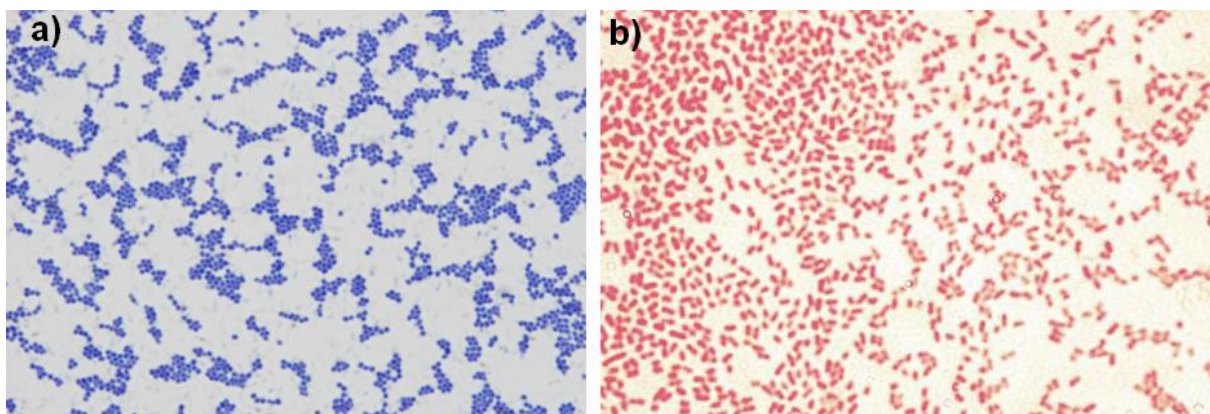
Na povrch odmaštěného podložního sklíčka přeneste do kapky vody nebo fyziologického roztoku vyšetřovaný vzorek jogurtu pomocí vyžíhané platinové kličky a rovnoměrně rozetřete v tenké vrstvě. Získaný nátěr opatrně vysušte nad plamenem kahanu a závěrem 2-3krát protáhne plamenem. Tepelně fixovaný preparát následně barvěte pomocí Grama.

Gramovo barvení

Na připravený teplem fixovaný preparát kápněte roztok krystalové violeti a nechte působit 20 s. Bez opláchnutí preparátu přidejte dostatečné množství Lugolova roztoku, který se slije s původním barvivem, znovu naneste Lugolův roztok v dostatečném množství a nechte působit 20-30 s. Preparát odbarvěte směsí acetonu a ethanolu (1:4), dokud se barvivo odplavuje. Preparát se pak dokonale opláchně destilovanou vodou a dobarvuje zředěným safraninem po dobu 30-60 s. Nakonec preparát znovu opláchněte a osušte na vzduchu nebo nad plamenem. Mikroskopujte v olejové imerzi při celkovém zvětšení 1000 x. Určete, zda patří pozorované bakterie mezi Grampozitivní/Gramnegativní, zda se jedná o tyčinky či koky a v jakém poměru se zhruba v preparátu vyskytují. Pokud budete mít možnost, preparát si vyfoťte a uložte.

Příklad Vyhodnocení Gramova barvení (viz Obr. 1)

- Grampozitivní bakterie (G^+) jsou modré,
- Gramnegativní bakterie (G^-) jsou růžové,



Obrázek 1 a) Grampozitivní koky, b) Gramnegativní tyčinky (celkové zvětšení 1000x).
Stanovení aktivní kyselosti (pH)

Stanovení aktivní kyselosti (pH) jogurtu provedte u zaočkovaného mléka a po ukončení inkubace jogurtu (po vychlazení). Měření provedte na pH metru se skleněnou elektrodou kalibrovanou na pufrů o pH 4 a 7 při pokojové teplotě. Aktivní kyselost nám vysvětluje vznik kyseliny mléčné z laktózy. Koagulace začíná při hodnotě pH 5,3 a při 4,5 je ukončená. Jedná se o kyselé srážení mléka pomocí jogurtové kultury.

Titrační kyselost

Stanovte titrační kyselost zaočkovaného mléka a vyrobeného jogurtu. Do titrační baňky navažte 50 g vzorku, s přídatkem 2 ml 2 % roztoku fenolftaleinu. Titrujte $0,25 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztokem NaOH do slabě růžového zbarvení, které má srovnávací roztok 50 ml vzorku s 1 ml 5 % roztoku $\text{CoSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$. Zabarvení by mělo vydržet 30 s. Výsledek vyjádřete jako číslo spotřebovaných ml $0,25 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH na 100 ml vzorku, což je vyjádření dle Soxhlet – Henkela (SH). Výpočet provedte dle rovnice (1):

$$\text{SH} = b \cdot 2 \cdot c / 0,25 \quad (\text{rovnice 1})$$

b.....spotřeba $0,25 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH na 50 g vzorku,

c.....koncentrace roztoku NaOH ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Senzorická analýza

Senzoricky posuďte vyrobený jogurt. Utvořte se svými spolužáky a vyučujícími hodnotící komisi a při hodnocení postupujte podle pracovního listu.

Slovníček pojmů

bakterie mléčného kvašení - bakterie, které štěpí mléčný cukr na kyselinu mléčnou a částečně vytvářejí také aromatické látky.

bílkovina - jedna ze základních živin; skládá se z lineárního řetězce aminokyselin, který vytváří různá prostorová uspořádání; mléčná bílkovina je velmi cenným zdrojem důležitých aminokyselin

denaturace - zpravidla nevratné změny ve struktuře bílkovin, přičemž primární struktura (aminokyselinové složení) zůstává zachována; k denuraci dochází za vyšších teplot, v některých oblastech **pH** nebo v přítomnosti některých chemických sloučenin

jogurt - kysaný výrobek z různě tučného mléka a jogurtové kultury (směs bakterií *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* a *Lactobacillus delbruckii subsp. bulgaricus*); může být bez přísad nebo s přidávkem ovocné či jiné složky

kasein - skupina mléčných bílkovin s vázaným fosforem (fosfoproteinů), které se sráží na rozdíl od bílkovin syrovátky z mléka při **pH** 4,6

kyselina mléčná - slabá organická kyselina, která vzniká při fermentaci laktózy, existuje ve dvou formách, které se liší prostorovým uspořádáním molekuly (L+, D-). Obsah v kysaných mléčných výrobcích je 0,6 až 1,3 %.

laktóza - mléčný cukr složený z glukózy a galaktózy, produkt mléčné žlázy

mléčná bílkovina - bílkoviny obsažené v mléku; dělí se na **kasein** a syrovátkové bílkoviny

mléko pasterované - mléka ošetřené záhřevem s použitím teplot nižších než 100°C po různé dlouhou dobu; který zaručuje zdravotní nezávadnost a prodloužení trvanlivosti

mléko plnotučné - mléko s obsahem tuku nejméně 3,5 %

mléko trvanlivé – mléko, kde bylo dosaženo zvýšení trvanlivosti tepelným záhřevem nad 100°C

mléko UHT (ultra high temperature) - mléko ošetřené vysokými teplotami 130 - 150 °C s velmi krátkou prodlevou 2 - 5 s; trvanlivost mléka je pak až 6 měsíců

pH – jednotka vyjadřující kyselost (koncentraci vodíkových iontů), neutrální roztok má pH = 7, nižší hodnoty odpovídají kyselému prostředí, vyšší hodnoty prostředí alkalickému

probiotická kultura - kultura živých mikroorganismů, která kladně působí na zdraví nad rámec obvyklého nutričního vlivu, pokud je přijímána v dostatečném množství

senzorické hodnocení - hodnocení senzorických vlastností výrobku - vzhledu, konzistence, chuti a vůně

srážení mléka kyselé – srážení mléčné bílkoviny kaseinu účinkem kyseliny při poklesu **pH** na hodnotu 4,6; kyselé srážení se obvykle provádí kyselinou mléčnou produkovanou bakteriemi mléčného kvašení

zákys - kultura vybraných živých mikroorganismů sloužící k zajištění průběhu fermentace a vedoucí k požadovaným změnám výrobků