

ANALIZE JOGURTA

1 KISLINSKA STOPNJA JOGURTA (Metoda po Soxhlet-Henkelu)

Definicija

Pod kislinsko stopnjo razumemo število ml 0,25 M NaOH, ki so potrebni za titracijo 100 ml produkta, ob dodatku fenolftaleina kot indikatorja, da dosežemo standardno barvo.

Priprava

Vzorec dobro premešamo in ga temperiramo na 20 °C.

Reagenti

- a) 0,25 M NaOH
- b) 2 % alkoholna raztopina fenolftaleina
- c) 5 % vodna raztopina $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Postopek

- a) Priprava standardne barve: Odpipetiramo 25 ml dobro premešanega jogurta v čašo in dodamo 0,5 ml 5 % $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Po treh urah ni več uporabna.
- b) Titracija: Odpipetiramo 25 ml dobro premešanega jogurta v čašo in dodamo 1 ml 2 % fenolftaleina. Med stalnim mešanjem titriramo z 0,25 M NaOH do rožnate barve. Oplaknemo pipeto in ponovno titriramo do rožnate barve primerjalnega vzorca. Za izračun kislinske stopnje (SH) pomnožimo število porabljenih ml 0,25 M NaOH s 4. V izračunu je potrebno upoštevati tudi faktor NaOH.

Zahteve pravilnika

- a) Navadni jogurt in kislo mleko: največ 55 SH
- b) Sadni jogurt: vrednost pH najmanj 3,5.

2 MAŠČOBA JOGURTA

Reagenti

- Žveplena kislina
- Amilni alkohol
- 10 % raztopina amoniaka

Postopek

Z merilnim valjem v erlenmajerico odmerimo 90 ml pripravljenega vzorca jogurta in dodamo 10 ml 10 % raztopine amoniaka, nato pa vsebino pazljivo premešamo.

V butirometer za mleko odmerimo 10 ml žveplene kisline in dodamo 11 ml jogurta z dodatkom amoniaka, na koncu dodamo 1 ml amilnega alkohola.

Maščobo v jogurtu naprej ugotavljamo po postopku za mleko.

Izračun

% maščobe = $a * 1,1$

a - % maščobe, odčitano na skali butirometra

3 BARVANJE PO GRAMU (jogurt)

Z barvanjem po Gramu ugotavljamo razmerje med *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in *Streptococcus thermophilus*, ki se nahajata v jogurtu v razmerju 1:2. Prvi imajo obliko debelejših palčk, drugi pa obliko verižic, če so te razbite, tudi obliko diplokokov ali pa nastopajo posamezno.

Bistvo metode

Celična membrana ima določen električni naboj, ki je nasproten od naboja v celičnem jedru. Barvila, ki jih uporabljamo, posedujejo tudi električni naboj in sicer Gram pozitivna + in Gram negativna -. Če je celična membrana nasprotno naelektrena od barvila, se barvilo veže ne samo fiksno ampak tudi kemijsko na membrano in ga ne moremo izprati z aceton alkoholom. V nasprotnem primeru se veže barvilo le adhezivno in ga lahko izperemo. Stare in degenerirane celice se nerade obarvajo.

Odvzem vzorca

Vzorec vzamemo po predpisih, glej poglavje 3.7.1.3. Vzorec za barvanje vzamemo pod aseptičnimi pogoji s sterilno ezo.

Reagenti

- a) Gram pozitivno barvilo - kristal violet
- b) Gram negativno barvilo - safranin
- c) Lugol
- d) Aceton alkohol
- e) Destilirana voda
- f) Imerzijsko olje

Postopek

- a) Priprava razmaza, sušenje, fiksiranje preparata.
- b) Barvanje z raztopino kristal violeta, pustimo delovati 1 min.
- c) Barvilo odlijemo in speremo vodo, dodamo lugol in pustimo delovati 1min.
- d) Preparat speremo z vodo.
- e) Izpiranje preparata z aceton alkoholom, dokler odteka barva.
- f) Speremo z vodo.
- g) Preparat barvamo z raztopino safranina, 1 min.
- h) Speremo z vodo in preparat osušimo.
- i) Dodamo imerzijsko olje, mikroskopiramo.

Rezultat

- a) Gram pozitivne bakterije: mlečno-kislinske bakterije, temno vijolično obarvanje.
- b) Gram negativne bakterije: koliformne bakterije, rdeče obarvanje.

4 JOGURT – UGOTAVLJANJE ŠTEVILA ZNAČILNIH MIKROORGANIZMOV (Tehnika štetja kolonij po inkubaciji pri 37 °C)

IDF 117:2003 Yogurt – Enumeration of characteristic microorganisms – Colony-count technique at 37 °C

Reagenti

- a) Razredčevalna - fiziološka raztopina (Ringerjeva raztopina ¼ jakosti)
- b) Hranljivo gojišče MRS z znižano vrednostjo pH (5,4) – za laktobacile
- c) Hranljivo gojišče M17 – za streptokoke

Postopek

Vzorec jogurta premešamo. S sterilno pipeto vzamemo 1 ml vzorca in ga prenesemo v epruveto z 9 ml fiziološke raztopine (razredčitev R=10), vsebino premešamo z električnim vorteksom (mešanje traja najmanj 10 sekund), vzamemo svežo pipeto in prenesemo 1 ml mešanice v naslednjo epruveto s fiziološko raztopino (R=100). Postopek ponavljamo do zelene razredčitve, iz katere 1 ml prenesemo v petrijevo ploščo. Vedno uporabimo vsaj dve razredčitvi.

Petrijeve plošče z razredčenim vzorcem prelijemo s hranljivim gojiščem, ohlajenim na 45 ± 1 °C. Prelivanje plošč s prevročim gojiščem uniči bakterijske celice. S krožnimi premiki prelitih plošč po vodoravni površini dosežemo enakomerno premešanje vzorca s hranljivim gojiščem. S tem zagotovimo enakomerno porazdelitev kolonij v ploščah po inkubaciji (manjša napaka štetja).

Ko se hranljivo gojišče ohladi, obrnemo plošče na pokrov in damo v inkubator. Petrijeve plošče smejo biti naložene v višini največ 6 plošč in se ne smejo dotikati sten inkubatorja. Inkubacija traja 48 ur (*Str. thermophilus*) oz. 72 (*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) ur pri temperaturi 37 ± 1 °C.

Rezultat

Število mikroorganizmov ugotovimo na petrijevih ploščah po inkubaciji in sicer s štetjem vidnih kolonij. Velja, da so šteвне tiste plošče, na katerih je med 15 in 300 kolonij. Za izračunavanje števila mikroorganizmov (N) v ml ali g jogurta oziroma drugega izdelka služi naslednja formula:

$$N = \frac{\sum ke}{(n_1 + 0,1 * n_2)} * R$$

$\sum ke$ vsota kolonij, prešteti na vseh ploščah

n_1 število števnih petrijevih plošč (15-300 kolonij) prve razredčitve

n_2 število števnih petrijevih plošč (15-300 kolonij) druge razredčitve

R razredčitveni faktor prve razredčitve, ki smo jo šteli