

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Růst a přežívání bifidobakterií v mléce přežvýkavců

Diplomová práce

Autor práce: Ondřejka Vološčuková

Obor studia: Kvalita a zpracování zemědělských produktů

Konzultant: Ing. Martina Geigerová

Vedoucí práce: prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Růst a přežívání bifidobakterií v mléce přežvýkavců" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne datum odevzdání _____

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala za trpělivost a cenné rady v průběhu zpracování diplomové práce své vedoucí prof. Ing. Evě Vlkové, Ph.D. a velké díky patří také Ing. Martině Geigerové, která pro mě byla neskutečnou podporou při práci v laboratoři i psaní této diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat skvělému kolektivu na katedře mikrobiologie výživy a dietetiky, vždy byly velice ochotní a vstřícní.

Růst a přežívání bifidobakterií v mléce přežvýkavců

Souhrn

Probiotické bakterie se často podávají v podobě fermentovaných mléčných produktů. Mezi probiotické rody patří i bifidobakterie, které jsou spojovány se zdravou střevní mikrobiotou. V současnosti je tento rod často používán jako probiotikum právě v mléčných výrobcích. Mléko a mléčné výrobky jsou podstatnou složkou výživy. Jedno z nejdůležitějších technologických kritérií, které musí probiotické kultury splňovat, je dlouhodobá schopnost přežívání v mléku. Z hlediska technologie výroby a distribuce mléka a mléčných výrobků s obsahem probiotik by měly bifidobakterie přežít po celou dobu expirace v zákonem daném počtu 10^6 KTJ/ml.

Proto bylo cílem této diplomové práce zjistit míru schopnosti růstu bifidobakterií izolovaných z různých hostitelů v různých druzích mlék (kravské, kozí, ovčí) a dlouhodobě v tomto prostředí přežít. Celkově bylo testováno 24 kmenů bifidobakterií, 6 kmenů bylo izolováno z jehněčích výkalů, 7 z kůzlečích výkalů, 7 z telecích výkalů a 4 kmeny lidského původu. Schopnost bifidobakterií prokysávat mléko a dlouhodobě v něm přežít byla sledována kultivačně.

Většina testovaných kmenů bifidobakterií byla schopná dobře prokysat všechna mléka v počtech vyšších než 10^6 KTJ/ml. Schopnost dlouhodobě přežít v prostředí mléka byla u bifidobakterií kmenově specifická. Po kultivaci byly zaznamenány nejvyšší počty bifidobakterií, které byly původně izolované z trávicího traktu kůzlat v prostředí ovčího mléka. Většina testovaných kmenů je schopna přežít v mléce v minimálním požadovaném množství po obvyklou dobu trvanlivosti mléčných fermentovaných výrobků. Z výsledků také jasně vyplývá, že kmeny lidského původu přežívají v mléce kratší dobu než kmeny původu animálního. Kmeny druhu *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis*, prokázaly nejlepší schopnost dlouhodobého přežívání v mléce.

V této práci bylo také testováno, zda jsou mléčné krmné směsi určená pro telata, dobrým substrátem pro bifidobakterie. Všechny testované směsi růst bifidobakterií podporovaly, dá se tedy říci, že jsou vhodnou náhradou stravy za nativní mléko s ohledem na rozvoj bifidobakterií v trávicím traktu.

Klíčová slova: mléko, přežvýkavci, probiotika, bifidobakterie, přežívání

Growth and survival ability of bifidobacteria in milk of ruminants

Summary

The most frequently are probiotics received in fermented milk products. Bacteria of genus *Bifidobacterium* belong to probiotic bacteria. Bifidobacteria are important part of the normal gastrointestinal microbiota. They are related to good intestinal health and they have generally positive effects on the host. Consequently, bifidobacteria are often used as probiotics. Milk has a balanced composition of nutrients and therefore it is suitable environment for microbial growth. The ability to survive in milk is important technological characteristic of probiotics. After the fermentation process and during the storage period, the number of probiotic microorganisms in the product should remain at least at 10^6 CFU/ml to achieve the desired functions in the gut.

Therefore the aim of the study was to test growth and survival ability of bifidobacteria isolated from different host in different milks of ruminants (cow, sheep, goat). In total 24 bifidobacteria were tested, 4 of human origin, 6 isolated from lambs, 7 from calves, 7 from kid. The ability of bifidobacteria fermented all three kinds of milk and to survive in these milks during storage was tested by cultivation.

The most of tested strains were able to ferment all milks and were found in counts higher than 10^6 CFU/ml. The highest counts of bifidobacteria originating from goat faeces were observed in sheep milk after the fermentation. Majority of tested bifidobacteria survived in all kinds of milks for few weeks or even months. The results showed that bifidobacteria of human origin survived shorter period than bifidobacteria of animal origin. *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* survived the best. According to our results, the survival ability of bifidobacteria in milk is strain specific property.

Milk-replacers for calves are suitable substrate for bifidobacteria. All tested milk-replacer supported the growth of bifidobacteria. It can be assumed, that tested mixture are suitable replacer of native milk with respect of supporting bifidobacterial growth in gastrointestinal tract.

Keywords: milk, ruminants, probiotics, bifidobacteria, survival

Obsah

1 Úvod	5
2 Literární rešerše	6
2.1 Mléko	6
2.1.1 Složení mléka	7
2.1.1.1 Voda	7
2.1.1.2 Lipidy	7
2.1.1.3 Sacharidy	7
2.1.1.4 Bílkoviny.....	8
2.1.1.5 Minerální látky	8
2.1.1.6 Vitamíny.....	9
2.1.2 Charakteristika vybraných mlék přežvýkavců	10
2.1.2.1 Mléko kravské	10
2.1.2.2 Mléko ovčí.....	10
2.1.2.3 Mléko kozí.....	10
2.2 Mléčné krmné směsi	12
2.2.1 Odchov telat	12
2.2.2 Složení mléčných krmných směsí.....	12
2.2.3 Rozdíly v trávení mléka a mléčných krmných směsí u přežvýkavců.....	14
2.3 Probiotika	15
2.3.1 Probiotika a jejich pozitivní působení	15
2.3.2 Probiotika ve výživě zvířat	16
2.3.4 Probiotické mikroorganismy.....	19
2.3.4.1 Rod <i>Bifidobacterium</i>	19
3 Hypotéza	21

4	Cíl práce.....	21
5	Materiál a metodika	22
5.1	Testované kmeny bifidobakterií	22
5.2	Testování růstu a přežívání bifidobakterií v mléce přežvýkavců	23
5.3	Testování růstu bifidobakterií v mléčných náhradách pro telata	24
6	Výsledky	26
6.1	Růst a přežívání bifidobakterií v mléce přežvýkavců	26
6.1.1	Schopnost sledovaných bifidobakterií prokysat různé druhy mlék přežvýkavců	26
6.1.2	Schopnost bifidobakterií přežít v kysaném mléce	27
6.1.3	Přežívání bifidobakteriálních kmenů v mléce přežvýkavců v rámci jednoho druhu	33
6.2	Růst bifidobakterií v mléčných náhradách	37
7	Diskuse	39
7.1	Růst a přežívání bifidobakterií v mléce přežvýkavců	39
7.2	Růst bifidobakterií v mléčných krmných směsích pro telata	43
8	Závěr	44
9	Seznam literatury	45

1 Úvod

V dnešní době je často diskutované téma probiotik a jejich pozitivní účinky na zdraví hostitele. Zdraví prospěšné účinky v oblasti trávicího traktu a imunitního systému jsou vědecky prokázány. Mléko a mléčné výrobky jsou v současnosti nejdostupnějšími výrobky obsahující probiotické mikroorganismy. Pro výrobce těchto probiotických potravin je důležité, aby v něm probiotické kmeny dlouhodobě přežívaly. Při výrobě mléčných produktů s obsahem probiotik je také velmi důležité uvážit, jaký druh mléka tvoří nejpříznivější podmínky pro vybrané kmeny probiotických bakterií.

Mezi probiotické bakterie se řadí i rod *Bifidobacterium*. Bifidobakterie jsou hlavní složkou střevní mikrobioty a jsou nepatogenní pro zvířata i lidi. Bifidobakterie jsou druhově specifické, z tohoto důvodu by měly výrobky určené k lidské výživě obsahovat, kmeny bifidobakterií, které byly izolovány z trávicího traktu lidí.

2 Literární rešerše

2.1 Mléko

Mléko je biologicky významná tekutina. V dnešní době je nejčastěji konzumováno kravské mléko, nicméně v některých částech světa má významný podíl i mléko od jiných druhů zvířat. Kravské mléko představuje 85 % z celkové produkce mléka. Významným zdrojem mléka je také mléko bůvolí, které tvoří 11 % ze světové produkce, dále mléko kozí (2,3 %) a ovčí (1,4%). V pouštních oblastech se nejvíce zužitkovává mléko velbloudí, ale ze světové produkce tvoří pouze 0,2 % (Gerosa and Skoet, 2012). Je mnoho další druhů zvířat produkujících mléko, které je určené ke spotřebě člověkem, například koně, jaci a osli, ale není dostupná žádná celosvětová statistika spotřeby mléka těchto druhů savců. Můžeme pouze usuzovat, že tvoří zbylých 0,1 % z globální produkce mléka (Faye and Konuspayeva, 2012). Mléko je složeno z vody, bílkovin, tuků, sacharidů, vitamínů a minerálních látek. Složení jednotlivých druhů mlék se liší podle toho, jestli jedinec spadá do podřádu přežvýkavců či nepřežvýkavých, avšak množství jednotlivých složek mléka se může lišit v rámci stejného podřádu dokonce i mezi stejnými druhy zvířat. Produkce a složení mléka je ovlivněna nejen druhem zvířete, ale i jeho genetickou výbavou a úrovní šlechtění. Mezi další vlivy, které mohou ovlivnit složení mléka, patří fyziologické faktory daného jedince (věk, interval dojení, etapa kojení), environmentální podmínky (umístění, sezona) a nutriční faktory (množství vitamínů a minerálů, výživová a energetická hodnota krmiva, složení krmiva). Všeobecně jsou rozlišovány dva typy mléka dle bílkovinného složení. Prvním druhem je mléko albuminové, které obsahuje především bílkovinu albumin. Toto mléko je produkováno masožravci, všežravci a nepřežvýkavými býložravci. Druhým typem je mléko kaseinové, které obsahuje minimálně 75 % kaseinu z celkového množství mléčné bílkoviny. Tento druh mléka je produkován především přežvýkavci (Park et al., 2007).

2.1.1 Složení mléka

2.1.1.1 Voda

V mléce se nachází voda v několika podobách, nejvíce je zastoupená voda volná. Volnou vodu lze vymrazit či odpařit. Dalším typem je voda vázaná, která se dělí na substituční a koloidní. V molekulách laktózy a solí je přítomna substituční voda. Koloidní voda vytváří ochranný hydratační povrchový obal koloidních částic tím, že se váže na bílkoviny a zajišťuje tak jejich stabilitu v mléce. Špatnou manipulací s mlékem se v mléce může objevit tzv. cizí voda. Cizí voda je přítomna v mléce pokud jej ředíme vodou nebo při špatné technologii dojení. Ukazatelem porušení mléka cizí vodou je podle Vyhlášky MZe č.289/2007, bod mrznutí mléka (limitní hodnota je - 0,520 °C). Voda je důležitou složkou mléka, protože hydratuje mládě, dokud si není schopno najít jiný zdroj vody. Podíl vody na celkovém složení mléka je u každého druhu jiný.

2.1.1.2 Lipidy

Prvotní účel lipidů je poskytnout energii novorozným mláďatům. Lipidy se v mléce nacházejí ve formě emulgovaných mikroskopických kuliček (globulí) o velikosti 0,1 – 15 μm. Složení mastných kyselin a obsah tuků ovlivňuje řada faktorů, jako je výživa, stádium laktace a plemeno zvířete. Fyzikální vlastnosti tuků ovlivňuje složení mastných kyselin. Mléčný tuk je významným zdrojem esenciálních mastných kyselin. Lipidy mají schopnost po delším stání mléka samovolně vystávat k hladině, jelikož má nižší hustotu než voda. Při vystávání lipidů dochází ke vzniku vrstvy smetany. Z hlediska technologie výroby mléčných produktů je mléčný tuk důležitý, protože ovlivňuje výživové, organoleptické a strukturální vlastnosti mléčných výrobků (Fox and McSweeney, 2006).

2.1.1.3 Sacharidy

Hlavním mléčným sacharidem je laktóza. Jedná se o mléčný cukr, který doposud nebyl nalezen v jiných tělních tekutinách. Laktóza patří do skupiny disacharidů, skládá se ze dvou monosacharidů D-galaktózy a D-glukózy, které jsou spojené β-glykosidickou vazbou. Laktóza je triviální název pro 4-0-β-D-galaktopyranosyl-D-glukopyranosu. Kromě laktózy jsou v mléce obsaženy v nižších koncentracích i jiné sacharidy, jako jsou například glukóza a některé oligosacharidy. Oligosacharidy tvořené 3 – 10 jednotkami monosacharidů se nacházejí ve většině mlék savců a mohou být větvené nebo lineární. Mateřské mléko obsahuje

více než 130 různých druhů oligosacharidů při jejich celkové koncentraci 15 g/l. Pro člověka jsou nestravitelné a mají pozitivní vliv na střevní mikrobiotu (Fox and McSweeney, 2006).

2.1.1.4 Bílkoviny

Primární funkce mléčných bílkovin je poskytnout mláďatům savců esenciální aminokyseliny, které jsou důležité pro vývoj svalových tkání a biologicky aktivních proteinů (proteinové hormony, imunoglobuliny, proteiny vázající vitamíny a kovy). Mláďata savců mají různé fyziologické a nutriční potřeby v závislosti na druhu, protože se rodí v rozdílných fázích vospělosti. Rozdíly potřeb mláďat se odrážejí v obsahu bílkovin v mléce, a proto se podíl proteinů pohybuje mezi 1-24 % v závislosti na druhu. Jelikož mléčné bílkoviny mají tendenci vytvářet komplexy, tak jejich izolace a charakteristika poměrně komplikovaná. Vytváření komplexů, také ztěžuje popis imunologických, nutričních a fyziologických vlastností (Fox and McSweeney, 2003). Většina technologií výroby mléčných produktů závisí na obsahu a vlastnostech mléčných bílkovin. (Fox and McSweeney, 1998).

2.1.1.5 Minerální látky

Minerální látky jsou významnými prvky pro vývoj a růst kostí, regulaci osmolality a mnohé funkce buněk. Minerální látky obsažené v mléce zahrnují zejména soli, jako jsou chloridy sodné, draselné, vápenaté a hořečnaté dále citráty a fosfáty, které se vyskytují v mléce ve formě koloidních látek v komplexu s kaseiny nebo ve formě iontu v roztoku. Minerální látky jsou esenciální látky a v mléce jsou zastoupeny v nízké avšak důležité koncentraci. Vlastnosti mléka jsou markantně ovlivněny přítomností solí, protože jejich výskyt má vliv na různé koligativní a pufrací vlastnosti, formování a stabilitu kaseinových micel a v neposlední řadě vykonávají klíčové biologické role. Pro udržení osmolarity a extracelulárního objemu plazmy je nezbytná přítomnost chloridového aniontu a sodíkového kationtu. Významným prvkem je také draslík, který je důležitý pro buněčný příjem aminokyselin, udržení krevního a osmotického tlaku. Další nezbytná minerální látka obsažená v mléce je vápník, který je u obratlovců základní součástí kostí a zubů. Zhruba 99 % z celkového množství v těle obratlovců se nachází právě v kostech a zubech. Zbývající 1 % vápníku je významným poslem mezi extracelulárními signály a intracelulárními odpověďmi buňky, jelikož zprostředkovává přenos nervového signálu, sekreci žláz a svalové kontrakce (Fox and McSweeney, 2009).

2.1.1.6 Vitamíny

V malém množství jsou v mléce obsaženy také vitamíny. Jsou rozlišovány dva typy vitamínů: hydrofilní (rozpuštěné ve vodě) a lipofilní (rozpuštěné v tucích). Lipofilní vitamíny jsou vitamíny A, D, E a K. Vitamín A způsobuje nažloutlé zbarvení mléka. Prekurzorem vitamínu A je β -karoten. Tento vitamín je důležitý pro správný vývoj embrya, také má pozitivní účinky na zrakové ústrojí. Naopak jeho nedostatek může způsobit nadměrné vysychání kůže, šeroslepost, hubnutí či průjem (Donoghue et al., 1981). Vitamín D se v mléku vyskytuje ve dvou formách, ergokarciferol (D_2) a cholekarciferol (D_3). Tyto dvě formy musí nejdříve podstoupit řadu metabolických proměn, aby byly v lidském těle aktivní. V pokožce je vitamín D_3 syntetizován z prekurzoru 7-dehydrocholesterol za působení ultrafialového světla (295–300 nm) (Higashi et al., 2010). Vitamín E je v mléce obsažen v mnohem menší koncentraci než například v rostlinných olejích. Při běžném průmyslovém zpracování, za nepřístupu kyslíku a oxidovaných lipidů, je vitamín E poměrně stabilní. Vitamín E je velmi účinný antioxidant, brání nádorovému bujení a stárnutí. Poslední lipofilní vitamín je vitamín K. Tento vitamín se zúčastňuje syntézy většiny koagulačních faktorů, které probíhají v játrech. Díky této syntéze v konečné fázi vzniká v játrech nerozpustná bílkovina fibrin. Vznik fibrinu je podstatou srážení krve. V tlustém střevě je tento vitamín produkován bakteriemi střevní mikrobioty. Vitamín K je v mléčných produktech a mléce celkem stabilní, pokud nejsou vystaveny přímému slunečnímu záření. Hydrofilní vitamíny se účastní metabolismu bílkovin, nukleových kyselin, tuků, sacharidů a další látek. Vitamíny rozpustné ve vodě jsou syntetizované v trávicím traktu, neukládají se a jsou poměrně stabilní. Zástupci hydrofilních vitamínů jsou například B₁₂, B₆, B₂, B₁, folacin, vitamín C a biotin. Množství hydrofilních vitamínů je variabilní v závislosti na druhu zvířete a je uvedeno v tabulce číslo 1. (Fox and McSweeney, 2006).

2.1.2 Charakteristika vybraných mlék přežvýkavců

2.1.2.1 Mléko kravské

Jak už bylo jednou zmíněno, kravské mléko je nejrozšířenějším mlékem na světě. V rozvojových zemích tvoří kravské mléko pouze 2/3 z celkové produkce, naopak v rozvinutých zemích je produkce kravského mléka dominantní (98 %). Kravské mléko obsahuje karoteny, což způsobuje lehce nažloutlé zbarvení mléka (Gajdůšek, 2003). Toto mléko má nejnižší obsah tuku ve srovnání s ovčím, kozím a mateřským mlékem (Jandal, 1996). Podle Veliška a Hajšlové (2009) se kravské mléko liší od kozího a ovčího mléka také podílem aminokyselin.

2.1.2.2 Mléko ovčí

Ovčí mléko má bělavou barvu a vyznačuje se specifickou vůní, která je ovlivněná přítomností mastných kyselin a to především kyseliny kaprinové a kaprylové. Ovčí mléko je z 81 % tvořeno vodou (Prokš, 1969). Obsah mléčného tuku, který do jisté míry udává energetickou hodnotu mléka, se pohybuje mezi 7-8 % což je dvakrát vyšší obsah mléčného tuku, než je obsaženo v mléce kravském (Park et al., 2007). V mléce konzumním je tuk obvykle upraven na 3,5 %. Tuk, obsažen v ovčím mléce je z větší části v emulgovaném, velmi dobře stravitelném stavu. Tuk z ovčího mléka je jedním z nevýhodnějších tuků z hlediska stravitelnosti, jelikož je využitelný z 99 % (Březina et al., 2001). Ovčí mléko má nejvyšší podíl STP (10,33 %) ve srovnání s kozím, kravským a lidským mlékem. Pro účely prodeje mléka podle předpisu ČSN 570529 musí být obsah STP minimálně 8,5 % (Forman a Čurda, 2001). U všech druhů mlék je mléčný cukr tvořen především laktózou a ta je v ovčím mléce zastoupena v množství 3,7 %. Oproti kravskému a kozímu mléku, ovčí mléko obsahuje poměrně vysoký podíl bílkovin. Bílkoviny se na složení ovčího mléka podílejí z 6,21 % (Jandal, 1996).

2.1.2.3 Mléko kozí

Kozí mléko má svou specifickou vůni a chuť tzv. „kozínu“, což může být nežádoucí při přímé konzumaci mléka, avšak tato specifická chuť kozího mléka dodává kozím sýrům typické aroma. Zvláštní chuť mléka je způsobena vyšším obsahem mastných kyselin s krátkým řetězcem, zejména kyselinou kaprinovou. Tato chuť se mění během laktace (Fantová et al., 2010). Mléko koz má křídově bílou barvu, což je způsobeno absencí β -karotenu. Kozy

mění veškerý β -karoten na vitamín A proto je kozí mléko bělejší než mléko kravské (Park et al., 2007). Kozí mléko má sušinu kolem 13 %, z toho je 4,1 % tuku, 3,3 % bílkovin a 4,7 % laktózy (Fantová a kol., 2010). Kozí mléko má vyšší podíl nenasycených mastných kyselin linolenové a linolové oproti kravskému mléku. Tyto nenasycené mastné kyseliny pozitivně působí na navýšení obranyschopnosti organismu proti infekčním chorobám a přirozeně bojují proti ateroskleróze. Kozí mléko je lépe stravitelné než mléko kravské tedy nezatěžuje tolik lidský organismus díky menším kapénkám tuku (Smetana et al., 2009).

Tabulka č. 1 Složení mléka (Jandal, 1996).

Složky	koza	Ovce	kráva
Tuk (%)	3,80	7,62	3,67
Sušina tukuprostá (%)	8,68	10,33	9,02
Laktóza (%)	4,08	3,70	4,78
Proteiny (%)	2,90	6,21	3,23
Kasein (%)	2,47	5,16	2,63
Syrovátkové proteiny (%)	0,43	0,81	0,60
Popeloviny (%)	0,79	0,90	0,73
Vápník (%)	0,19	0,16	0,18
Fosfor (%)	0,27	0,15	0,24
Vitamín A (IU g ⁻¹ tuku)	39,00	25,00	21,00
Vitamín B ₁ (mg/100 ml)	68,00	7,00	45,00
Vitamín B ₁₂ (mg/100 ml)	210,00	36,00	159,00
Vitamín C (mg/100 ml)	20,00	43,00	2,00
Vitamín D (IU g ⁻¹ tuku)	0,70	N	0,70

N – nedetekováno

2.2 Mléčné krmné směsi

2.2.1 Odchov telat

Výkrm telat je prováděn formou intenzivního nebo extenzivního chovu skotu. Intenzivní odchov telat je používán u plemen dojného skotu. Tento odchov je založen na oddělení matky a mláděte z důvodu využití mléka dojnic v mlékárenském průmyslu. Tele je v prvních dnech vyživováno směsným mlezivem, které je oddojené od matek. Mládě je krmeno mlezivem po dobu pěti až deseti dní. Poté je tele napájeno mléčným nápojem, nestandardním mlékem či mlékem plnotučným, podle způsobu výkrmu daného chovu. Po celou dobu výkrmu je teleti podáváno i seno a to v množství ad libitum. Extenzivní odchov je jinak nazývaný jako pastevní chov. Pastevní způsob chovu je uplatňován u masného plemene skotu. Tele je ponecháno s matkou na pastvě. Teleti je tedy umožněn neomezený přísun mléka, tudíž v tomto odchovu není potřeba používat mléčné krmné směsi.

2.2.2 Složení mléčných krmných směsí

Začátkem 60. let se ve výživě telat začaly používat mléčné krmné směsi (MKS), které slouží jako náhražka přírodního mléka dojnic. Důvodem je zlepšení ekonomiky chovů, kdy se mléko dojnic dostává na trh a není použito k výkrmu telat. Zkrmování mléčných náhražek může být pro chovy dojnic 2 až 3 krát levnější než zkrmování mléka nativního. MKS nejsou plnohodnotnou náhradou za plnotučné kravské mléko a proto se nižší obsah živin a energie musí doplňovat z pevných krmiv. Dřívější přísun pevných krmiv, která zahrnují seno a jadrná krmiva, stimuluje rychlejší rozvoj bachoru a tím i dřívější odstav telete z mléčné stravy, což je z finančních důvodů výhodnější pro odchov mláďat. Ekonomické důvody mají také vliv na složení mléčných nápojů, kdy některé dražší suroviny mohou být zaměňovány za levnější varianty. Jejich cena je tudíž závislá na primárních surovinách použitých při jejich výrobě. Pro snížení ceny MKS mohou být mléčné bílkoviny do určité míry nahrazeny sojovými, kvasničnými, lněnými nebo obilnými bílkovinami. Také živočišný tuk může být substituován za levnější smíšené či rostlinné tuky. V současné době je na českém trhu k dispozici několik desítek MKS určených pro mláďata přežvýkavců, které se liší použitými krmnými surovinami a obsahem živin. Mléčné náhražky mohou být obohacovány o různé množství specifických aditiv, jako jsou například probiotika, prebiotika, vitamíny, minerální látky, okyselovadla, konzervanty, aromatizující a zchutňující látky. Kvůli lepší stravitelnosti a vstřebatelnosti minerálních látek je možné nahradit mikroprvky anorganických sloučenin (Cu, Se, Fe, Zn)

organickými sloučeninami obsahující tyto mikroprvky. V neposlední řadě mohou být pozměněny koncentrace jednotlivých vitamínů nebo jejich prekurzorů. Další součástí mléčných krmných směsí jsou sacharidy. Některé z nich mohou hrát důležitou úlohu v podpoře bakterií mléčného kvašení, které se běžně vyskytují v trávicím traktu mláďat přežvýkavců. Stejně jako bílkoviny a tuky i sacharidy se v MKS do určité míry nahrazují. Hlavním cukrem obsaženým v mléce je laktóza. Mléčné náhražky obsahují její nižší množství, naopak jiné sacharidy mohou být přítomny v mléčných nápojích ve vyšším množství ve srovnání s kravským mlékem. Podíl laktózy či obsah celkových sacharidů se většinou neuvádí na obalu mléčných koncentrátů. Neznamená to ale, že se v mléčné krmné směsi nenachází laktóza. Mléčný cukr je běžnou součástí sušené syrovátky, která se často přidává do MKS. Jedinou výjimkou je tzv. delaktózovaná syrovátka, která je, jak už název napovídá, bez laktózy. Jestliže je sušená syrovátka součástí směsi mléčných nápojů, pak je uvedena výrobcem na obalu. Trávicí trakt telat má omezené možnosti trávení sacharidů. Jedinou výjimkou je laktóza, která je přirozenou součástí nativního mléka a proto ji telata umí štěpit a vstřebávat. Teprve až za několik týdnů po narození je tele schopno účinně trávit i jiné cukry jako je například škrob (Staněk, 2012).

Podpora mikrobioty gastrointestinálního traktu mláďat je důležitou součástí jejich výkrmu. Bylo zjištěno, že obohacením mléčné krmné směsi přidáním různých oligosacharidů (prebiotik), má pozitivní vliv na stimulaci růstu prospěšných bakterií, které přirozeně osídlují trávicí trakt (Uyeno et al., 2015). Mezi prospěšné mikroorganismy, které jsou běžně přítomné v trávicím traktu telat, patří například rod *Bifidobacterium* a rod *Lactobacillus*. Zároveň je snížena schopnost kolonizovat trakt nežádoucími bakteriemi, jako jsou například *E.coli* nebo salmonely (Gaggia et al., 2010). V USA mohou být mléčné nápoje obohaceny o sušenou zvířecí krevní plasmu. Zvířecí plasma obsahuje složky s antibakteriální a antivirovou aktivitou, například imunoglobuliny. Imunoglobuliny jsou díky přítomnosti inhibitorů proteáz a složením proteinů odolné vůči kyselému prostředí traktu a tím jsou schopny udržet imunologickou aktivitu během průchodu traktem (Quigley et al., 2002). Na území Evropské unie je zkrmování zpracovaných živočišných bílkovin upraveno Nařízením (ES) č.1774/2002. V současné době se stále pracuje na vylepšování MKS pro mláďata přežvýkavců. Kromě obměny množství jednotlivých surovin se zlepšuje i jejich technologická stránka přípravy. Do vývoje je zahrnuta technologicko-fyzikální úprava což udává hrubost našrotování směsi, extruzi, způsoby sušení a další. Dalším příkladem je enzymatická příprava látek, které jsou součástí MKS. Vzhledem k tomu, že je v průběhu vývoje telete složení mléka dojnic pozměňováno, tak bylo nutné tomuto faktu přizpůsobit i složení mléčných náhrad. Každý

druh směsi je vyhrazen pro určité vývojové stádium mláďete, také je přihlíženo na jeho zdravotní stav. Příkladem mléčných krmných směsí, které jsou v současné době dostupné na trhu, mohou být Biolac, Laktosan, Miktel, Milsan, Nutrimilk, Sanolac, Telmilk, Telesan, Telsur, Vitamilk a další.

Jednou z výhod mléčných krmných směsí oproti příjmu nativního mléka je možnost namíchání přesného objemu nápoje. Díky tomu si chovatel může přesně pohlídat příjem živin u jednotlivých telat. Při zkrmování kvalitních směsí mláďaty dochází k adekvátnímu růstu a časný příjem pevných krmiv. Práce s mléčnými náhražkami je jednoduchá, a pokud jsou správně skladovány, neobsahují žádné nežádoucí mikroorganismy, které by mohly ohrozit zdraví mláďete. Toto riziko naopak hrozí u zkrmování nestandardního mléka. Naopak významnou nevýhodou mléčných náhražek, a to i těch kvalitních, je absence různých nutričních faktorů jakou hormony, růstové faktory a buňky imunitního systému (Staněk, 2012).

2.2.3 Rozdíly v trávení mléka a mléčných krmných směsí u přežvýkavců

Nativní mléko nebo mléčné nápoje jsou u telat tráveny ve slezu a v tenkém střevě. Předpokladem optimálního trávení je kvalitní bílkovina, která je za pomoci chymozinu, pepsinu a kyseliny chlorovodíkové trávena. Po několika minutách je ve slezu vytvořena bílkovinná sraženina, která je dále trávena ve dvanácterníku. Při přijímání MKS je vhodné použít umělý struk, protože sáním mléčné náhrady z umělého struku je podporována tvorba slinných esteráz a žaludečních lipáz. Tyto enzymy jsou schopny natrávit mléčný tuk. Vypitím mléčného nápoje dochází u telat ve slezu ke zvýšení hodnoty pH a to z hodnoty 1,5 na hodnotu 6 a to většinou do 15 minut. Rychlostí navrácení pH ve slezu na hodnotu 1,5 je indikována rychlost trávicích reakcí. Nativní kravské mléko ve srovnání s mléčnými nápoji je stráveno rychleji. Nízkou hodnotou pH je významně podpořena obranyschopnost telete před nežádoucími mikroorganismy, jako například *E. coli* či salmonelami, které mohou postupovat dále traktem a způsobovat průjmová onemocnění, dehydrataci až úhyn. Naopak dlouhodobě nízká hodnota pH může zapříčinit narušení sliznice, což může mít za následek vznik žaludečních vředů. Ovlivnit rychlost srážení mléka je možné za pomoci úpravy teploty podávaného nápoje telatům (Staněk, 2015). Pokud dochází k poruše trávení, může být MKS okyselena. Okyselením mléčných nápojů může být, do určité míry, nahrazena aktivita žaludečních šťáv ve slezu a tím přispět k trávení MKS (Bayram et al., 2007).

2.3 Probiotika

Pojem probiotikum je poměrně nový a v překladu znamená „pro život“. Definice probiotik se v průběhu let několikrát změnila. První definici uvedl Lilly a Stillwell (1965), kteří uvádějí, že se jedná o látky vylučované jedním organismem, které stimulují růst ostatních organismů. Parker (1974) charakterizoval probiotika jako organismy a látky, které pomáhají udržovat střevní mikrobiální bilanci. V současné době jsou probiotika definována jako živé mikroorganismy, které při podávání v dostatečném množství poskytují hostiteli zdravotní přínos (FAO/WHO, 2002). V posledních dvaceti letech se evropský trh s probiotiky rychle rozvíjel díky vzrůstajícímu zájmu spotřebitelů o potraviny, které mají příznivý účinek na jejich zdraví. Ačkoliv je mnoho vědeckých studií, které potvrzují pozitivní účinek probiotik na zdraví, v roce 2007 vstoupila platnost směrnice Evropské unie týkající se výživy a zdravotních tvrzení č.1924/2006, kde je uvedeno, že výrobci probiotik musí prokázat Evropskému výboru pro bezpečnost potravin jejich zdravotní přínosy (EFSA, European Food Safety Authority). EFSA pak na základě vědeckých studií daný zdravotní výrok posoudí a následně buď potvrdí, nebo zamítne. Doposud nebylo žádné zdravotní tvrzení související s konzumací probiotik schváleno. Uznáno bylo pouze jedno zdravotní tvrzení týkající se mléčných výrobků a to fakt, že kysané mléčné výrobky snižují intoleranci na laktosu (Evropská komise, ND). V České republice se problematikou probiotik zabývá Společnost pro probiotika a prebiotika, která sdružuje multidisciplinárně zaměřené pracovníky. Tato společnost si klade za cíle vzájemně informovat odborníky o problematice probiotik a podpořit základní i aplikovaný výzkum (Nařízení evropského parlamentu a rady (ES) č. 1924/2006).

2.3.1 Probiotika a jejich pozitivní působení

Užívání probiotických mikroorganismů má příznivý účinek na střevní mikrobiální rovnováhu. I když mnoho vědeckých studií prokázalo pozitivní účinek probiotik na zdraví hostitele, tento poznatek se většinou vztahuje pouze na určité kmeny, které byly předmětem studie, a tudíž nelze předpokládat, že všechny probiotické bakterie mají stejný příznivý účinek. D'Amico et al. (2007) ve své studii uvádí, že probiotika ochraňují organismus proti nežádoucím bakteriím. Podle Rasica (2003) mohou mít některé probiotické organismy anti-karcinogenní účinky, snižovat hladinu cholesterolu a krevního tlaku. Probiotika také různými mechanismy zvyšují obranyschopnost hostitele (Gilliland, 1990). Probiotika se používají jako preventivní ochrana nebo terapeutika při léčbě různých onemocnění. U některých onemocnění

jsou účinky probiotik považovány za prokázané a u jiných se jejich účinek považuje za možný. Probiotických mikroorganismů se může využívat při léčbě průjmu u kojenců, osteoporóze, atopického onemocnění, urogenitálních onemocnění, zmírnění zácpy. Zároveň mohou probiotika sloužit jako ochrana proti rakovině močového měchýře a tlustého střeva a také se ukázal jejich pozitivní vliv při regulaci zánětlivých onemocnění střev (Lourens-Hattingh and Viljoen, 2001). Probiotika se také používají v průběhu nebo po antibiotické léčbě. Antibiotika inhibují bakterie bez ohledu na to, jestli mají negativní účinek nebo prospívají a tím narušují správné složení střevní mikrobioty. Probiotika tak napomáhají obnovit narušenou rovnováhu střevní mikrobioty po antibiotické terapii. Doporučuje se pravidelná konzumace výrobků s obsahem probiotik, pro zvýšení obranyschopnosti organismu (Soccol et al., 2010).

2.3.2 Probiotika ve výživě zvířat

Ve výživě zvířat má podávání látek mikrobiálního charakteru dlouhou historii a první zmínka o jejich použití byla v roce 1946 panem Moore a kol. Tito autoři zjistili, že po přidání antimikrobiálních látek do krmné směsi kuřat se jejich růst zrychlil až o 30 %. Kromě zvýšení váhových přírůstků patří mezi pozitivní účinky probiotik i zlepšení konverze živin, zvýšení produkce a zlepšení kvality mléka. U hospodářských zvířat bylo také mnohokrát dokumentováno snížení výskytu průjmových onemocnění, a jelikož probiotika snižují výskyt patogenních mikroorganismů v trávicím traktu, dochází i ke snížení kontaminace jatečně opracovaného těla při porážce (Timmeman et al., 2004; Fuller, 1997). Cílem používání probiotik je pozitivní ovlivnění složení mikrobioty trávicího traktu. Mezi mikroorganismy, které jsou běžně používána jako probiotika ve výživě zvířat patří především bakterie mléčného kvašení (BMK) a kvasinky, jejich seznam je uvedený v tabulce č. 2 (Gaggia et al., 2010). Aplikace probiotik je různorodá. Je nutné brát ohled na způsob ustájení, věk, druh a způsob krmení zvířete. Dále je nutné zohlednit, jak vysoká dávka bude zvířeti podána a jakou cestou (Ewing a Cole, 1994). Novorozená mláďata mají téměř neosídlený trávicí trakt a proto je nejúčinnější aplikace probiotik ideální v raném věku telat (Rosell, 1987). Zároveň je vhodné zahrnout probiotika ve stresujících obdobích jako jsou změna krmné dávky, odstav od matky nebo začátek laktace. Způsoby podání probiotických bakterií je možný několika způsoby a to ve formě lyofilizovaného prášku či aerosolu, dále v pitné vodě nebo ve formě pasty. Nejčastěji jsou probiotika podávány v podobě lyofilizovaného prášku a to v množství 0,1-1kg na 1 tunu krmiva (Ewing a Cole, 1994).

Při výběru vhodného probiotického kmene by se mělo přihlížet k původu kmene. V současné době se uvádí, že pro zvýšení možnosti trvalé kolonizace použitého kmene, by tento kmen měl být izolován ze stejného druhu zvířete, pro který jsou daná probiotika určena. Například pro prasata jsou vhodné lactobacily (*Lactobacillus reuteri*, *L.johnsonni*) a enterokoky (*Enterococcus faecium*)(Leser et al., 2002) Laktobacily jsou také dominantní skupinou bakterií v trávicím traktu mláďat například u myší a kuřat. U kojených dětí a telat bylo zjištěno, že dominují bifidobakterie (Rada et al., 2006). Bifidobakterie jsou ve vysokých počtech přítomny i v trávicím traktu jehňat (Vlková et al., 2009). Proto jako vhodná probiotika pro mláďata přežvýkavců mohou být považovány bifidobakterie.

Tabulka č. 2 Seznam probiotických organismů (Gaggia et al., 2010)

Grampozitivní nesporeující bakterie		
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	
<i>Conynebacterium glutamicum</i>		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus farciminis</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Lactobacillus gallinarum</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>
<i>Lactobacillus alimantarius</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus aviaries</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus pontis</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>
<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lactobacillus kefiri</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
<i>Lactobacillus curvatum</i>	<i>Lactobacillus mucosae</i>	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus panis</i>	<i>Lactobacillus zeae</i>
<i>Lactococcus lactis</i>		
<i>Leuconostoc citreum</i>	<i>Leuconostoc lactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pediococcus dextrinicus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>		
<i>Streptococcus thermophilus</i>		
<i>Bacillus</i>		
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus lentus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>Bacillus clausii</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus vallismortis</i>
<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus mojavensis</i>	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
<i>Bacillus fusiformis</i>		
Kvasinky		
<i>Debaryomyces hansenii</i>		
<i>Hanseniaspora uvarum</i>		
<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	
<i>Pichia angusta</i>	<i>Pichia anomala</i>	
<i>Saccharomyces bayanus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces pastorianus</i> (syn. <i>Saccharomyces carlsbergensis</i>)
<i>Shizosaccharomyces pombe</i>		
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>		

2.3.4 Probiotické mikroorganismy

Probiotické vlastnosti různých kmenů bakterií se liší i v rámci stejného druhu. Každý kmen je jedinečný, a proto je jejich probiotický potenciál rozdílný. Nynější výzkumy střevní mikrobioty se, mimo jiné, zabývají skladbou a koncentrací mikroorganismů v trávicím traktu lidí i dalších živočichů a jednotlivých částech zažívacího traktu, čímž se snaží charakterizovat co je to zdravá střevní mikrobiota. Cílem výzkumů je pochopit, jak mikroorganismy spolupracují a jak ovlivňují hostitele, těchto informací může být jednou v budoucnosti využito při léčbě specifických onemocnění střevního traktu (Isolauri a kol., 2004). Dnes se jako probiotika nejvíce používají bakterie mléčného kvašení (BMK) a bifidobakterie. Kromě bakterií se používají i probiotické kvasinky rodu *Saccharomyces* a někteří zástupci vláknitých hub jako je například *Aspergillus oryzae* (Czerucka et al., 2007; Vinderola and Reinheimer, 2003). Tyto probiotické mikroorganismy jsou všeobecně považovány za bezpečné (GRAS-generally recognized as safe), jelikož mají dlouhodobou historii bezpečného užívání.

2.3.4.1 Rod *Bifidobacterium*

Prvním vědcem, který se zasadil o popsání a izolování bifidobakterií byl Tissier a to v letech 1899-1900. Bifidobakterie byla izolována z trávicího traktu kojenců a tehdy byla nazvána *Bacillus bifidus*. Bifidobakterie mají nepravidelný tvar, který se může podobat písmenu V nebo Y, některé druhy se mohou shlukovat. Obecně rod *Bifidobacterium* je možné klasifikovat jako anaerobní, nesporulující, nepohyblivé, kataláza negativní, grampozitivní tyčinky (Sgorbati et al., 1995).

Deklarovaná optimální teplota u živočišných druhů bifidobakterií je v rozmezí 41 °C až 43 °C a dokonce může být vyšší než 49,5 °C a to u *B. thermacidophilum*. Bifidobakterie izolované z lidského těla preferují teplotu nižší a to v rozmezí 36 – 38 °C (Dong et al., 2000). Studie Gavini et al. (1991) tvrdí, že je možné od sebe odlišit bifidobakterie lidského a živočišného původu na základě teploty 46 °C. Tato teplota znemožňuje růst bifidobakterií lidského původu, naopak většina živočišných druhů je při této teplotě schopna růst. Další limitují teplota pro většinu zástupců rodu je 20 °C. Tato teplota je spodní hranice teplotního rozhraní, ovšem i zde je výjimka a to *B. psychroaerophilum*, která je schopna růst dokonce i při 8 °C (Simpson et al., 2004). Obecně je rod *Bifidobacterium* kataláza negativní, ačkoli jsou druhy, jako například *B. indicum* a *B. asteroides*, původně izolované ze včel, u kterých byla prokázána aktivita katalázy (Felis and Dellaglio, 2007). Bifidobakterie jsou považovány za striktně anaerobní mikroorganismy, přesto byly pozorovány druhy, které mohou růst

v přítomnosti kyslíku. Bylo zjištěno, že zvířecí druhy *B.boum* a *B. thermophilum* jsou schopné růst při 20 % koncentraci kyslíku (Kawasaki et al., 2006). Jako fakultativně anaerobní byl charakterizován druh *B. scardovi*, izolovaný z lidské krve (Hoyles et al., 2002). Druh, původně izolovaný z trávicího traktu zvířat a dnes používaný do výrobků s obsahem probiotik, *B. animalis* ssp. *lactis* je také tolerantní ke kyslíku (Li et al., 2010). Příznivé prostředí pro většinu zástupců bifidobakterií je také ovlivňováno hodnotou pH. Neoptimálnější pro růst a množení je hodnota pH 6,5-7,0. Potlačení jejich růstu nastupuje při hodnotách pH vyšších než 8,0 - 8,5 a nižší než 4,5-5,0 (Biavati a Mattarelli, 2012). Výše zmíněný druh *B. animalis* ssp. *lactis* je také schopný přežít při pH 3,5, což značí jeho dobrou technologickou využitelnost do kysaných probiotických výrobků (Maus a Ingham, 2003). Příznivý vztah k nízkému pH je velice podstatný při výběhu vhodného druhu, který má být přidáván jako aditivum do výrobků s obsahem probiotik.

Bifidobakterie patří do skupiny sacharolytických bakterií. Sacharolytické bakterie štěpí sacharidy, ze kterých získávají energii. Bifidobakterie mají schopnost fermentovat glukosa, galaktosa a fruktosa (Leahy et al., 2005). Ke katabolismu hexos využívají specifický enzym fruktózo-6-fosfát fosfoketolasu (F6PPK). Tento enzym je charakteristický pouze pro rod *Bifidobacterium* a proto je možná identifikace bifidobakterií na rodové úrovni na základě přítomnosti tohoto enzymu. Enzym F6PPK rozkládá fruktózo-fosfát na erytrózo-4-fosfát a acetylfosfát, jenž jsou postupně metabolizovány až na kyselinu octovou a mléčnou, které jsou produkovány v molekulárním poměru 3:2 (Doleyres and Lacroix, 2005).

Rod *Bifidobacterium* zahrnuje 68 druhů a poddruhů, z toho bylo 32 druhů původně izolováno z trávicího traktu či z výkalů zvířat (List of prokaryotic names with standing in nomenclature, ND). Některé druhy byly objeveny jak u lidí, tak u zvířat a to *B. longum* ssp. *longum* a *B. adolescentis*. Reuter (1963) jako první detekoval přítomnost *B. adolescentis* jak v bacheru krav, tak i v trávicím traktu dospělého člověka. Dále jako první prokázal přítomnost *B. longum* ssp. *longum* v traktu dospělého člověka a ve výkalech telat. Zástupci, kteří byly izolovány pouze z lidské mikrobioty jsou například *B.bifidum*, *B. longum* a další. Další byly izolovány také z moči, zubního kazu, zubního plaku a z mléčných výrobků (Gomes and Malcata, 1999). Zajímavostí je, že bifidobakterie jsou také nedílnou součástí střevní mikrobioty hmyzu se sociálním způsobem života (Sanchez et al., 2013).

3 Hypotéza

Stěžejní význam pro naše zdraví a dobře fungující imunitu má zdravá střevní mikrobiota. Regenerace mikrobioty je doporučována hlavně po antibiotické léčbě. Probiotické bakterie jsou často používány právě pro úpravu harmonie mikrobioty trávicího traktu. Jedna z forem příjmu probiotik je také v rámci fermentovaných mléčných výrobků. Probiotické mikroorganismy podléhají celé řadě fyziologických a technologických kritérií. Přežívání v mléce je jednou z důležitých technologických vlastností. Domníváme se, že nejlépe budou růst a přežívat bifidobakterie v mléce živočišného druhu, ze kterého byly izolovány a zároveň se domníváme, že mléčné náhrady pro telata budou vhodným substrátem pro růst bifidobakterií.

4 Cíl práce

Pro růst a přežívání probiotických mikroorganismů je mléko vhodným substrátem. Bifidobakterie byly izolovány z trávicího traktu lidí a různých druhů zvířat. Cílem diplomové práce je otestování schopnosti růstu bifidobakterií v mléce různých druhu přežvýkavců a porovnání jejich potenciálu v nich přežívat a také schopnost bifidobakterií růst v mléčných náhradách pro teleta.

5 Materiál a metodika

5.1 Testované kmeny bifidobakterií

Bifidobakterie jsou řazeny mezi probiotické bakterie, které jsou přidávány do různých mléčných výrobků. Pro testování růstu a přežívání rozdílných kmenů bifidobakterií v mléce přežvýkavců byly použity izoláty z výkalů kůzlat, jehňat, telat a ze stolice kojenců a dospělého jedince. Bylo použito 23 kmenů bifidobakterií. Bifidobakterie, které byly použity v tomto testování, jsou uloženy ve sbírce mikroorganismů katedry Mikrobiologie, výživy a dietetiky na ČZU. Sledované kmeny jsou uvedeny v tabulce číslo 3.

Tabulka č. 3: Použité kmeny bifidobakterií.

Zkratka	Celý název	původ kmene
1/1	<i>Bifidobacterium choerinum</i>	Kůzle
1/2	<i>Bifidobacterium adolescencis</i>	Kůzle
1/5	<i>Bifidobacterium adolescencis</i>	Kůzle
4/2	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i>	Kůzle
4/4	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i>	Kůzle
14/2	<i>Bifidobacterium boum</i>	Kůzle
14/4	<i>Bifidobacterium boum</i>	Kůzle
JKM	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Kojenec
JOV	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Kojenec
EV2	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Dospělý jedinec
TP1	<i>Bifidobacterium longum</i>	Kojenec
1/11	<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>animalis</i>	Tele
017III2	<i>Bifidobacterium thermophilus</i>	Tele
017III1	<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>animalis</i>	Tele
022II	<i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>suis</i>	Tele
805III2	<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>animalis</i>	Tele
023I2	<i>Bifidobacterium choerinum</i>	Tele
5IIA	<i>Bifidobacterium choerinum</i>	Jehně
5VB	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i>	Jehně
9VIB	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	Jehně
14V	<i>Bifidobacterium choerinum</i>	Jehně
7VIA	<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>animalis</i>	Jehně
3II	<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>animalis</i>	Jehně

5.2 Testování růstu a přežívání bifidobakterií v mléce přežvýkavců

Pro sledování byly použity 3 druhy mlék, a to ovčí, kravské a kozí. Kozí a kravské mléko bylo získáno nadojením. Ovčí mléko bylo také původně nadojeno, ale po vyvážení se vysrážely kaseinové bílkoviny a z mléka se stala pevná suspenze sýra. Takto vysrážené mléko se nedalo pro testování růstu a přežívání bifidobakterií použít. Tudíž za mléko ovčí byla zvolena náhrada v podobě sušeného ovčího mléka. Mléko ovčí bylo připraveno z mléčné krmné směsi pro jehňata LAMLAC. Jednotlivé vzorky mlék byly rozděleny do 23 penicilínek po 10 ml. Celkově bylo naplněno 69 penicilínek, které bylo nutné vyvařit, probublat oxidem uhličitým, tak aby uvnitř vzniklo anaerobní prostředí a následně vysterilovat po dobu 1 hodiny. Vychladlé penicilínky byly zaočkovány příslušnými kmeny bifidobakterií. Do jednotlivých penicilínek byly zaočkovány čerstvě narostlé kultury v množství 0,5 ml. Takto zaočkované penicilínky byly kultivovány anaerobně v termostatu po dobu 24 hodiny při 37 °C. Po dvaceti čtyř hodinové kultivaci bylo mléko prokysáno, tudíž bylo možné po tomto intervalu stanovit počáteční nárůst bifidobakterií. Ke stanovení počtu bifidobakterií po prokysání mléka byla použita kultivační metoda. Před vlastní kultivací byla připravena ředící řada. Vialky, které jsou potřebné pro vytvoření ředících řad, byly připraveny metodou roll-tube z Wilkins-Chalgren bujonu (Oxoid). Ředící řady byly sestaveny z ředění od hodnoty 10^{-1} až po 10^{-8} . Takto nařazený vzorek byl z každé hodnoty ředění zaočkovan v množství 0,5 ml na malé Petriho misky, které byly zality pěstebním médiem. Jako kultivační medium pro bifidobakterie, byl použit Wilkins-Chalgren agar podle Rady a Petra (2000; WSPMup), do kterého je přidáván sojový pepton (5 g/l), cystein (0,5 g/l), tween 80 (1 ml/l), kyselina octová (1 ml/l) a antibiotikum mupirocin (100 mg/l). Anaerobní podmínky pro správnou kultivaci a růst bifidobakterií jsou zabezpečeny v anaerostatu s palladinovým katalyzátorem, z něhož je odsán vzduch a nahrazen vodíkem a oxidem uhličitým, a to v poměru 90:10. Vzorky bifidobakterií, které jsou takto připraveny, jsou následně vloženy do termostatu, kde se kultivují při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. Po 48 hodinové kultivaci byly kolonie spočítány a počet bifidobakterií byl vyjádřen v jednotkách log KTJ na 1 ml mléka. Rozbor výše popsanou metodou byl opakován v daných časových intervalech, tak aby bylo sledováno přežívání v jednotlivých druzích mlék.

5.3 Testování růstu bifidobakterií v mléčných náhradách pro telata

Vybrané kmeny bifidobakterií, které byly použity pro testování prokysání mléčných náhrad pro telata jsou uvedené v tabulce č. 4. Mléčné náhrady, které byly použity při testování růstu bifidobakterií, jsou dodávány v sušené formě, proto bylo nutné je nejdříve rozmíchat s vodou. Mléko bylo připraveno rozmícháním 10 g mléčné náhražky a 90 ml vody. Takto připravená mléčná směs byla rozdělena do deseti penicilínek, neboť bylo sledováno deset kmenů bifidobakterií. Každá penicilínka obsahovala 10 ml mléka. V penicilínkách bylo potřeba vytvořit anaerobní prostředí, které je vhodné pro růst bifidobakterií. Penicilínky bylo nutné vyvařit, probublat oxidem uhličitým, díky němuž bylo zajištěno anaerobní prostředí a následně penicilínky vysterilovat. Vysterilované penicilínky byly zaočkovány testovanými kmeny bifidobakterií a to v množství 0,3 ml. Pro vytvoření optimální teploty pro růst bifidobakterií byl použit termostat, kde byly penicilínky ponechány kultivaci při 37 °C po 48 hodin. Po kultivaci byl stanoven počet bifidobakterií pomocí kultivační metody.

Penicilínky připravené metodou roll-tube s Wilkins-Chalgren bujónem (Oxoid), byly použity na vytvoření ředících řad. Ředění bylo připraveno od koncentrace 10^{-2} až po poslední hodnotu 10^{-8} . Z takto připravených ředících řad bylo přeočkováno 0,5 ml směsi s bifidobakteriemi na malé Petriho misky. Na rozbor byly použity pouze penicilínky s ředěním 10^{-5} až 10^{-8} . Jako médium, kterým byly přelity zaočkované Petriho misky, bylo opět použito Wilkins-Chalgren agar s přísadkou mupirocinu (100 mg/l), sojového peptonu (5 g/l) a kyseliny octové (1 ml/l), připravené podle Rada a Petr (2000). Testované kmeny bifidobakterií byly kultivovány anaerobně při 37 °C a to 48 hodin. Anaerobní podmínky byly zajištěny pomocí anaerostatu s palladinovým katalyzátorem v němž byl vzduch nahrazen oxidem uhličitým a vodíkem v poměru 10:90.

Použité mléčné krmné směsi byly Telmilk spec, Telmilk EX, Telmilk LEN, Telfid grand a Acid, Heiferlac instant, Milac.

Tabulka č. 4: Testované kmeny bifidobakterií.

původ/označení		Kmeny bifidobakterií
Tele	017III2	<i>Bifidobacterium thermophilus</i>
Tele	805III2	<i>Bifidobacterium animalis ssp. animalis</i>
Tele	017III1	<i>Bifidobacterium animalis ssp. animalis</i>
Tele	1/11	<i>Bifidobacterium animalis ssp. animalis</i>
kojenec	JKM	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
Kůzle	4/2	<i>Bifidobacterium pseudolongum ssp. globosum</i>
Jehně	9VIB	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>

6 Výsledky

6.1 Růst a přežívání bifidobakterií v mléce přežvýkavců

6.1.1 Schopnost sledovaných bifidobakterií prokysat různé druhy mlék přežvýkavců

Vybrané kmeny bifidobakterií byly testovány na růst a přežívání v kozím, kravském a ovčím mléce. První rozbor byl proveden po prokysání mléka, tedy v den námi stanovený jako den 0. V tento den byly zjištěny počty bifidobakterií, respektive jejich schopnost prokysat mléko. Podle získaných výsledků jsou, nejen kravské mléko, ale i kozí a ovčí mléko, vhodným substrátem pro růst bifidobakterií. Pro výrobu mléčných kysaných potravin s obsahem probiotických kultur je důležité minimální množství bifidobakterií, které je zákonem dané na hodnotu 10^6 KTJ/ml. V kravském mléce všechny testované izoláty prokysaly mléko ve vyšším množství než udává legislativa. Naopak v kozím mléce byly tři izoláty, jeden lidský (TP1) a dva telecí (017III2 a 017III1), které hodnoty 10^6 KTJ/ml nedosáhly. V ovčím mléce neprokysal v dostatečném množství pouze jeden telecí kmen (022II).

Nejnižší průměrný nárůst bifidobakterií byl zjištěn u izolátů lidských a telecích v mléce ovčím a to v průměrných počtech $7,82 \pm 0,99$ KTJ/ml a $7,98 \pm 2,33$ KTJ/ml. Telecí izoláty narostly v nízkých počtech také v mléce kozím, v počtech $7,99 \pm 2,77$ KTJ/ml. Naopak v kravském mléce byly průměrné hodnoty prokysání jak telecích tak lidských izolátů nejvyšší ve srovnání s ostatními mléky ($9,28 \pm 2,92$ KTJ/ml pro lidské izoláty a $8,80 \pm 0,46$ KTJ/ml pro telecí izoláty). Jehněčí izoláty bifidobakterií prokysaly všechny tři druhy mlék ve vyšším množství jak 10^9 KTJ/ml. Celkově nevyšší průměrný nárůst byl evidován u kůzlečích izolátů v ovčím mléce, kde byl jejich počet $10,28 \pm 0,39$ KTJ/ml. Naopak nejnižšího průměrného nárůstu dosáhly kůzlečí kmeny v mléce kravském ($9,14 \pm 1,17$ KTJ/ml).

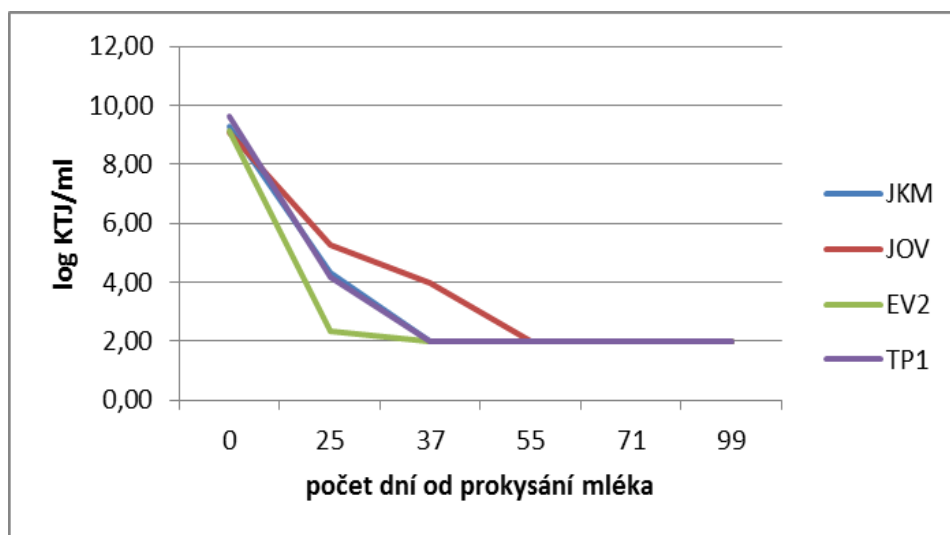
Tabulka č. 5: Počet bifidobakterií po prokysání různých druhů mlék, hodnoty uvedené v tabulce jsou v log KTJ/ml \pm SD.

		Původ bifidobakteriálního kmene			
		lidské	Telecí	jehněčí	Kůzlečí
Mléko	kravské	$9,28 \pm 2,92$	$8,80 \pm 0,46$	$9,25 \pm 0,25$	$9,14 \pm 1,17$
	kozí	$8,61 \pm 2,76$	$7,99 \pm 2,77$	$9,62 \pm 1,10$	$9,92 \pm 0,69$
	Ovčí	$7,82 \pm 0,99$	$7,98 \pm 2,33$	$9,02 \pm 0,44$	$10,28 \pm 0,39$

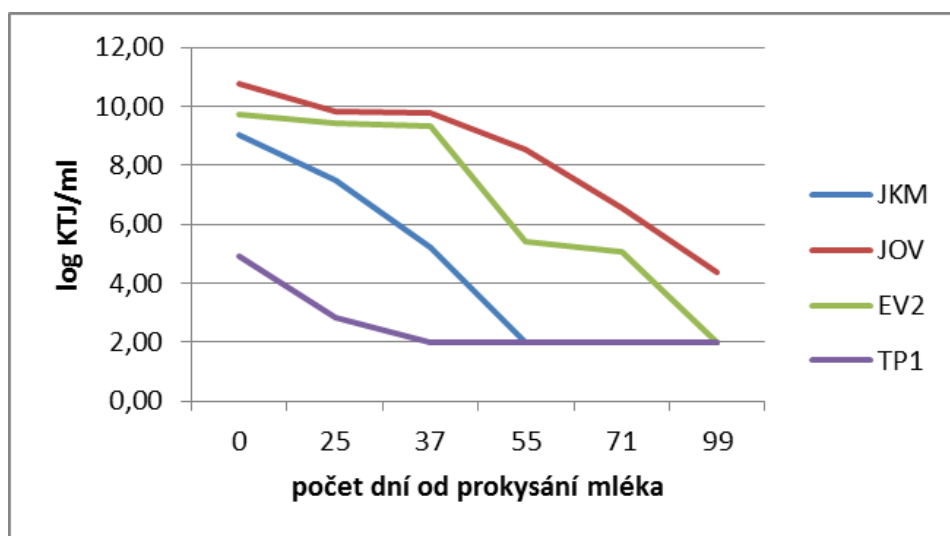
6.1.2 Schopnost bifidobakterií přežít v kysaném mléce

V grafu číslo 1, 2, a 3 jsou uvedeny lidské kmeny ve všech třech testovaných mlékách. Lidské izoláty ve vysokých počtech přeživaly nejlépe v mléce kozím. Nejdéle přežival kmen JOV (*Bifidobacterium bifidum*), izolovaný ze stolice kojence, a to v počtech vyšších než 10^6 KTJ/ml po dobu 71 dní. Tento kmen, i přes jeho dlouhodobé přežívání v mléce kozím, v mléce ovčím přežival po dobu kratší než jeden měsíc. Kravské mléko nebylo vhodným substrátem pro lidské izoláty, protože zde bifidobakterie přeživaly v počtech 10^6 KTJ/ml kratší dobu než 25 dní.

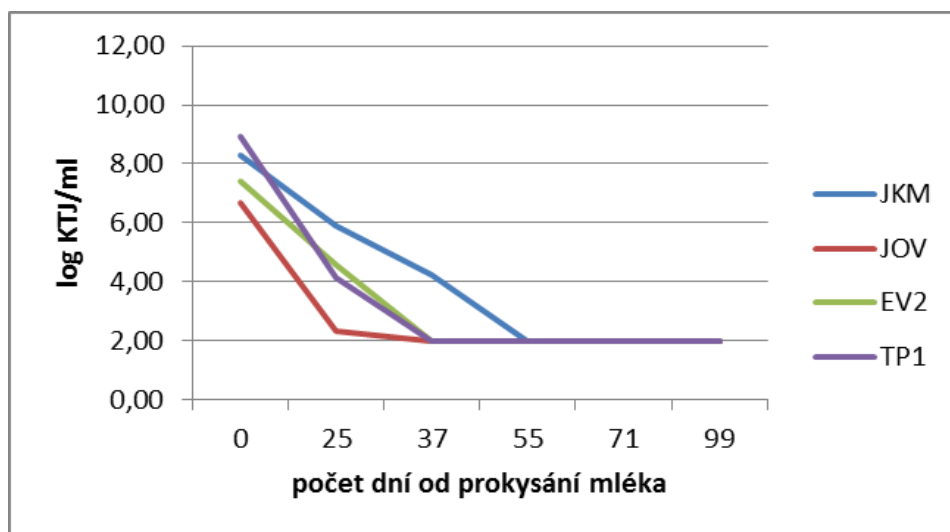
Graf č. 1: Počet bifidobakterií lidského původu v kysaném kravském mléce v průběhu skladování.



Graf č. 2: Počet bifidobakterií lidského původu v kysaném kozím mléce v průběhu skladování.

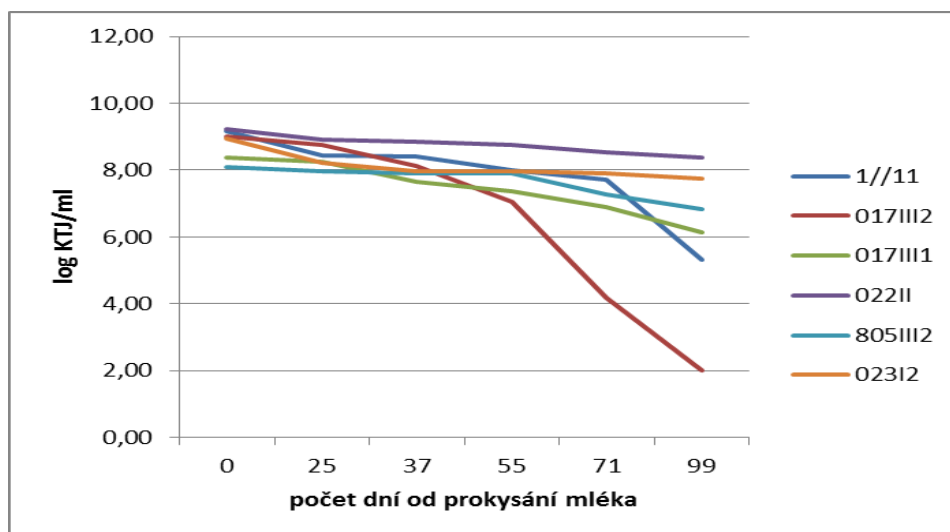


Graf č. 3: Počet bifidobakterií lidského původu v kysaném ovčím mléce v průběhu skladování.

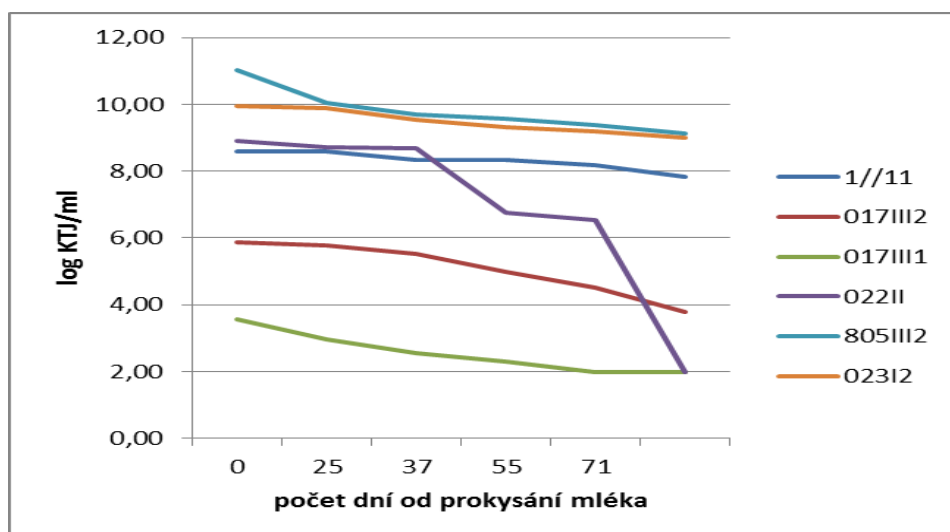


V grafech číslo 4,5 a 6 je zobrazeno přežívání telecích kmenů bifidobakterií. V mléce kravském přežívaly telecí kmeny v množství vyšším než 10^6 KTJ/ml déle než 55 dní. V mléce kozím byla schopnost přežít velice rozdílná. Některé kmeny jako například 022II, 805III2, 023I2 a 1/11 byly v prostředí kozího mléka schopné přežít ve vyšších počtech po dobu minimálně 71 dní. Naopak izoláty označené 017III1 a 017III2 v kozím mléce sice přežívaly minimálně 55 dní, ale jejich počet se pohyboval mezi hodnotami 10^2 a 10^6 KTJ/ml. V ovčím mléce přežívaly telecí izoláty minimálně 71 dní v počtech vyšších, než je požadováno vyhláškou. Pouze jeden kmen označený jako 022II v mléce ovčím přežíval v hodnotách nižších než 10^4 KTJ/ml a to po dobu 25 dní

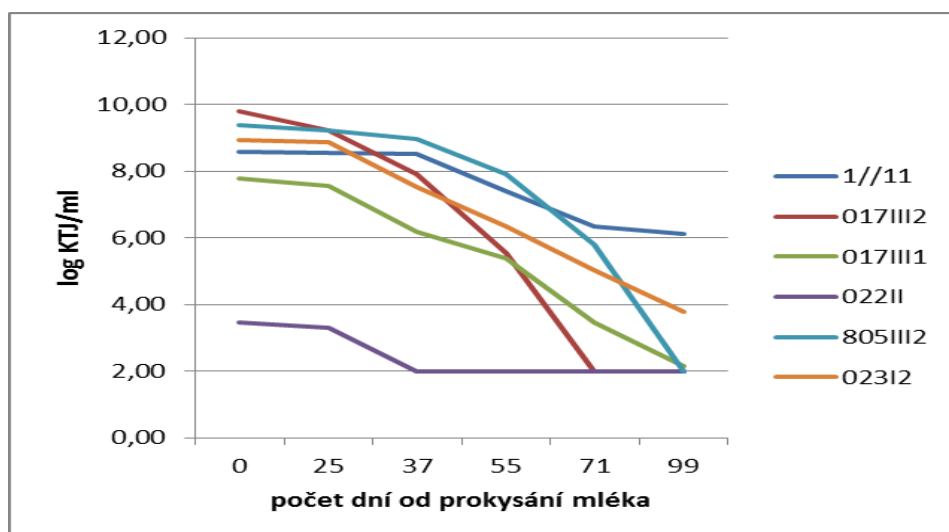
Graf č. 4: Počet bifidobakterií telecího původu v kysaném kravském mléce v průběhu skladování.



Graf č. 5: Počet bifidobakterií telecího původu v kysaném kozím mléce v průběhu skladování.

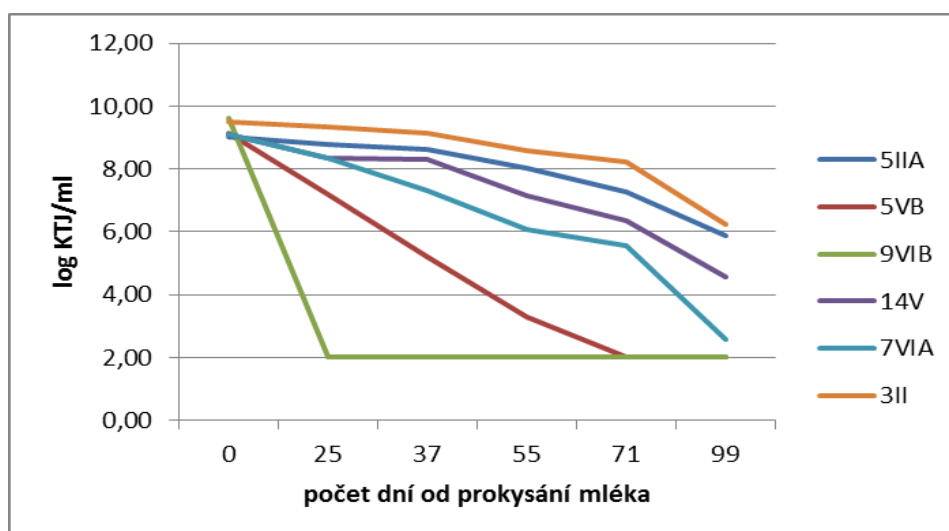


Graf č. 6: Počet bifidobakterií telecího původu v kysaném ovčím mléce v průběhu skladování.

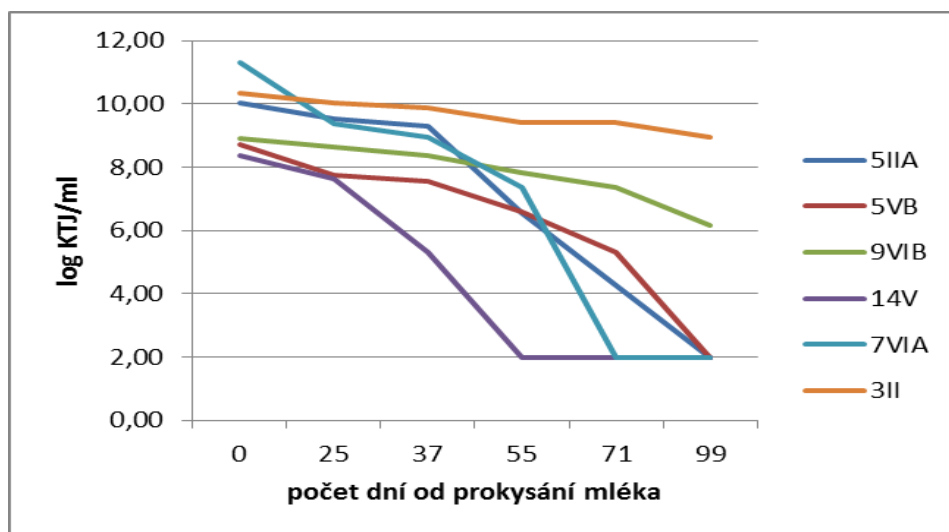


V grafech 7,8 a 9 je znázorněno přežívání jehněčích kmenů v testovaných druzích mlék. Jehněčí izoláty ve všech třech mlékách přežívaly minimálně 37 dní v množství vyšším než 10^6 KTJ/ml. Výjimkou byl kmen *B. pseudocatenulatum*, označený jako 9VIB, který nepřežíval v mléce kravském a ovčím déle než 25 dní. Izolát označený jako 3II přežíval ve vysokých počtech v mléce kravském a kozím minimálně 71 dní. V mléce ovčím přežíval výrazně kratší dobu a to 37 dní. V mléce kozím přežíval nejkratší dobu kmen *B. choerinum*, označený jako 14V.

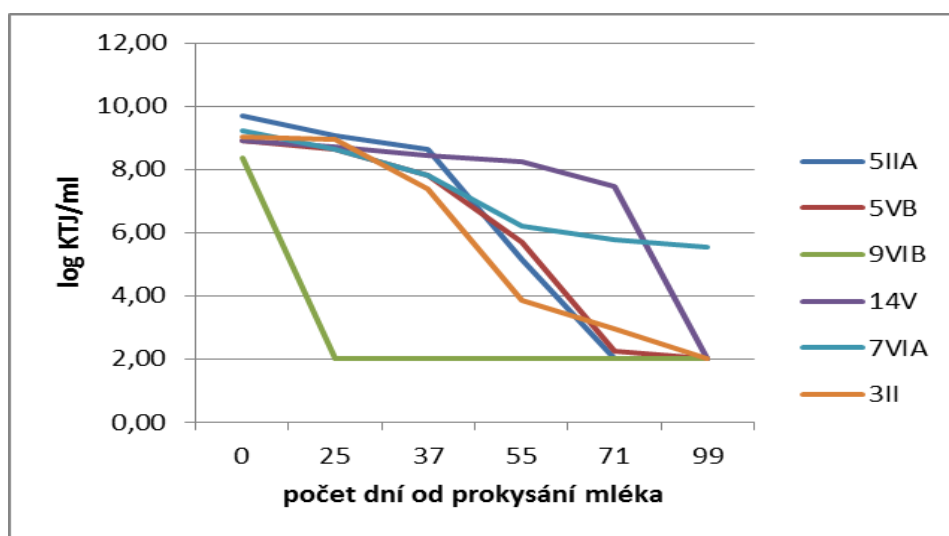
Graf č. 7: Počet bifidobakterií jehněčího původu v kysaném kravském mléce v průběhu skladování.



Graf č. 8: Počet bifidobakterií jehněčího původu v kysaném kozím mléce v průběhu skladování.

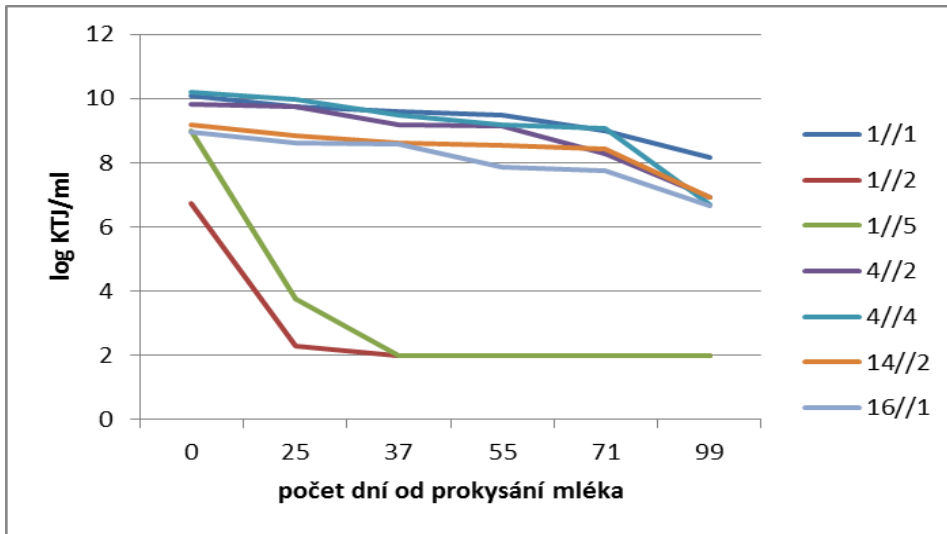


Graf č. 9: Počet bifidobakterií jehněčího původu v kysaném ovčím mléce v průběhu skladování.

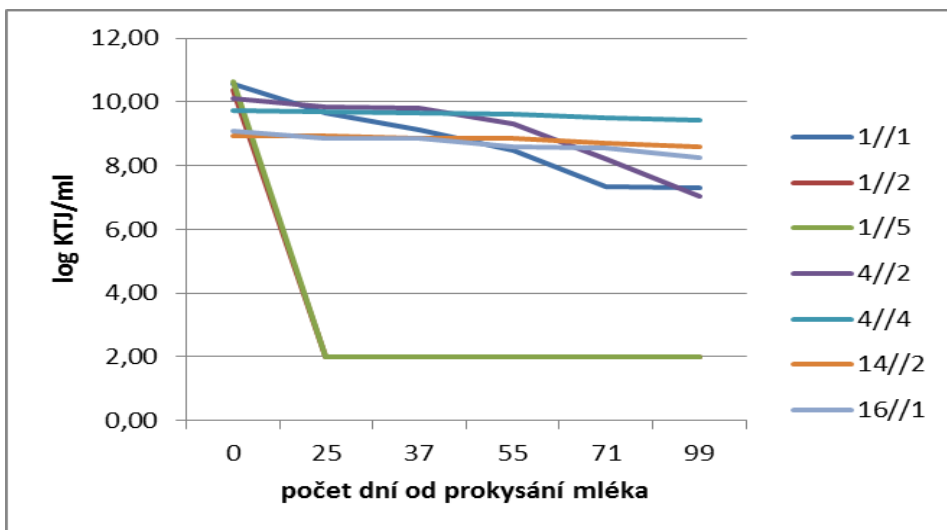


Testované kmeny izolované z trávicího traktu kůzlat jsou zobrazeny v grafech číslo 10, 11 a 12. Kůzlečí kmeny déle přeživaly v počtech vyšších než 10^6 KTJ/ml v mléce kozím a kravském, kromě kmene *B. adolescentis*, který krátkodobě přežival jak v mléce kravském tak i kozím a to méně než 37 dní. Další výjimka je kmen označený jako 1/2, který v mléce kravském přežival kratší dobu než 25 dní. Kmeny označené jako 14/2, 16/1 a 1/1 přeživaly v ovčím mléce déle než 99 dní ve vysokém počtu, stejně tak i v mléce kravském a kozím. Naopak kmeny označené jako 1/2, 1/5, 4/2 a 4/4 přeživaly v mléce ovčím kratší dobu než 37 dní.

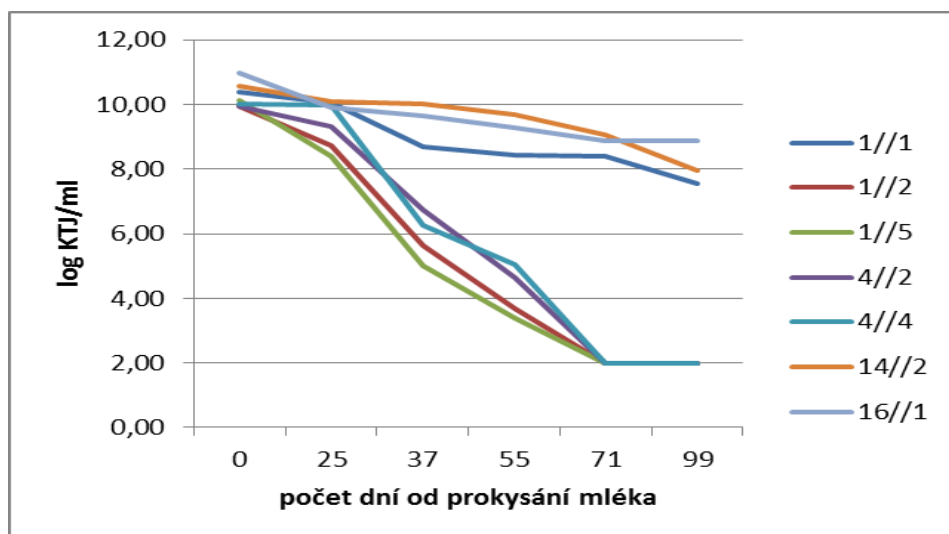
Graf č. 10: Počet bifidobakterií kůzlečího původu v kysaném kravském mléce v průběhu skladování.



Graf č. 11: Počet bifidobakterií kůzlečího původu v kysaném kozím mléce v průběhu skladování.



Graf č. 12: Počet bifidobakterií kůzlečího původu v kysaném ovčím mléce v průběhu skladování.

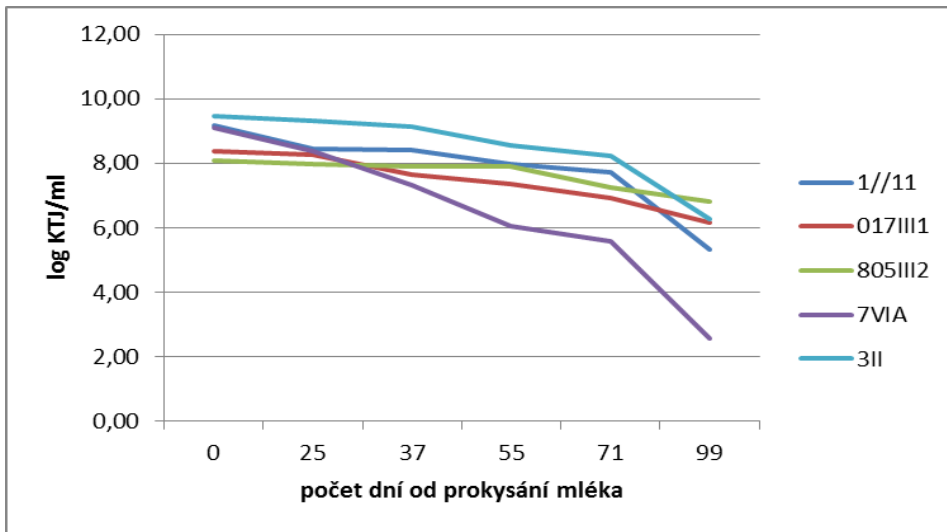


6.1.3 Přežívání bifidobakteriálních kmenů v mléce přežvýkavců v rámci jednoho druhu

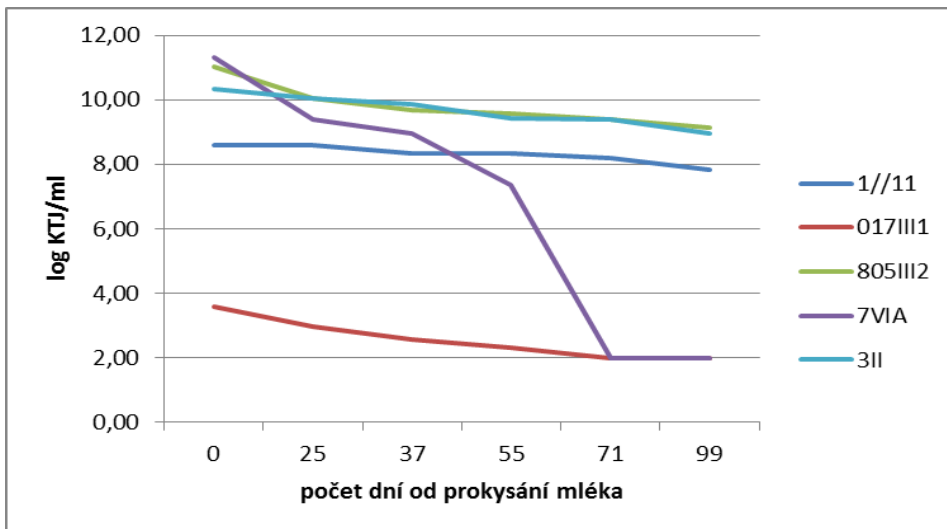
Naměřené hodnoty byly upraveny do jednotlivých grafů nejen podle původu izolátů (viz výše), ale i podle bakteriálního druhu. Byly vybrány dva druhy *Bifidobacterium choerinum* a *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis*, které měly největší kmenové zastoupení. Jednotlivé kmeny v rámci jednoho druhu byly porovnány ve schopnosti přežívání v kravském, kozím a ovčím. Schopnost bifidobakteriálních kmenů dlouhodobě přežít v mléce přežvýkavců je kmenově specifická.

V grafech číslo 13, 14 a 15 je vyobrazeno přežívání pěti kmenů *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* v jednotlivých druzích mlék. Všechny sledované kmeny přežívaly v kravském mléce víceméně podobně, 71 dní byly sledované kmeny ve vyšším množství než 10^6 KTJ/ml, kromě kmene 7VIA. Naopak v kozím mléce jednotlivé kmeny přežívaly různě dlouhou dobu a kmen 017III1 nebyl schopen prokysat kozí mléko v dostatečném množství. V mléce ovčím bylo přežívání jednotlivých kmenů celkem vyrovnané. U kmenu 7VIA bylo zaznamenáno, stejně jako v mléce ovčím, zhoršení schopnosti přežít v mléce kozím ve srovnání s mlékem kravským. Podobně na prostředí kozího mléka reagoval kmen 3II. Oproti tomu kmen 7VIA, ve srovnání s mlékem kozím a kravským, projevil lepší schopnost přežít v mléce ovčím.

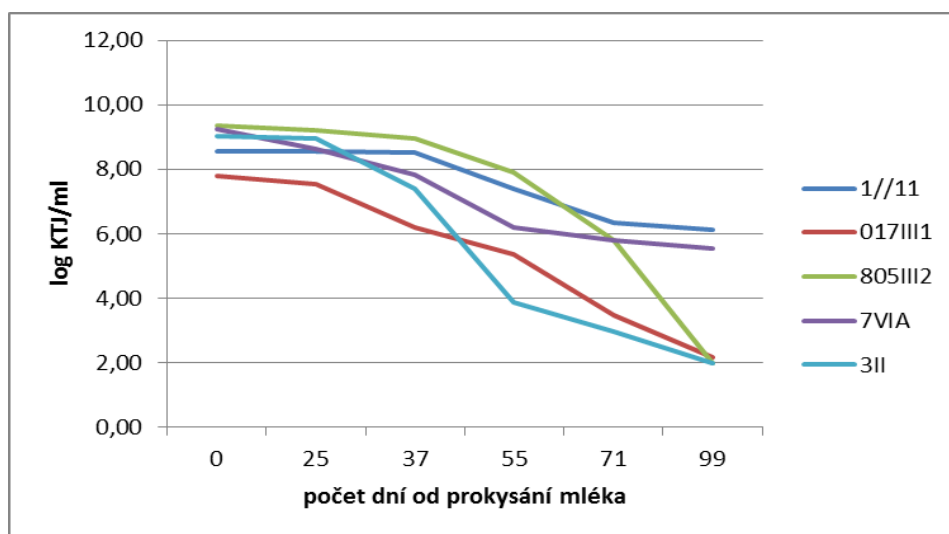
Graf č. 13: Počet bifidobakteriálního kmene *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* v kysaném kravském mléce v průběhu skladování.



Graf č. 14: Počet bifidobakteriálního kmene *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* v kysaném kozím mléce v průběhu skladování.

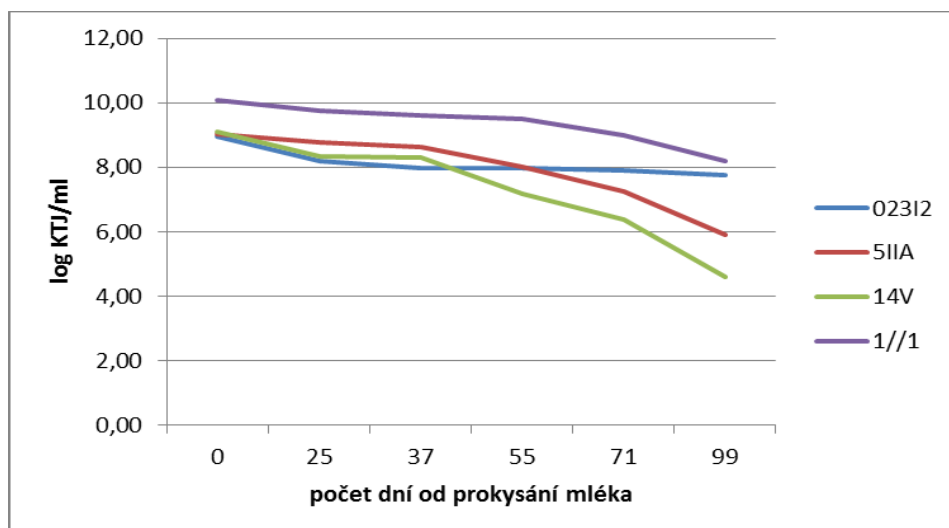


Graf č. 15: Počet bifidobakteriálního kmene *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* v kysaném ovčím mléce v průběhu skladování.

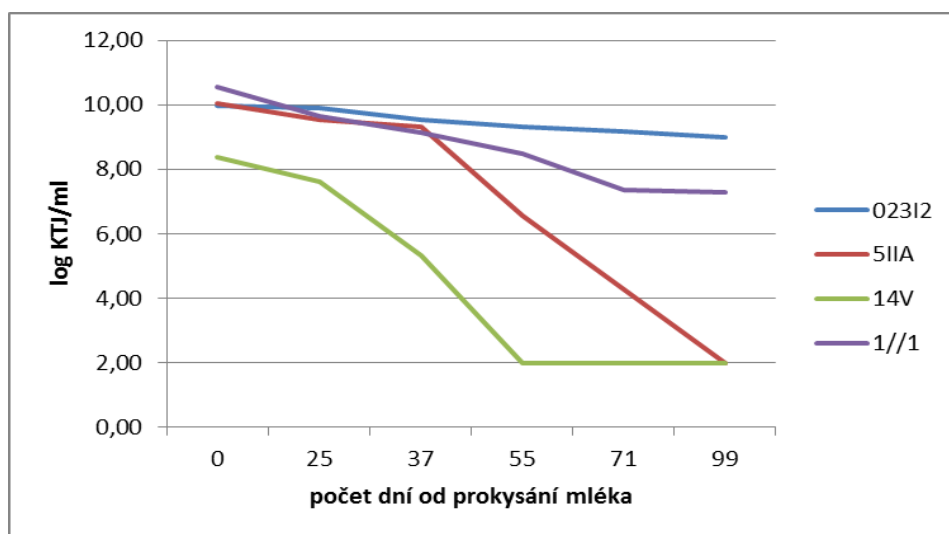


Grafy, které znázorňují přežívání čtyř kmenů *Bifidobacterium choerinum* jsou uvedeny v grafech číslo 16, 17 a 18. V mléce kravském byla schopnost dlouhodobě přežít celkem vyvážená. Všechny kmeny přežily minimálně 71 dní v počtech vyšších jak 10^6 KTJ/ml. V mléce kozím se opět projevila kmenová specifita. Schopnost přežívání sledovaných kmenů v kozím mléce byla různá. Nejlépe zde přežily kmeny 023I2 a 1/1. Tyto kmeny byly dominantní v kravském mléku. V mléce ovčím kmeny přežily podobně do 37. dne, poté se jejich počty začaly lišit. Opět nejlépe přežíval kmen 1/1.

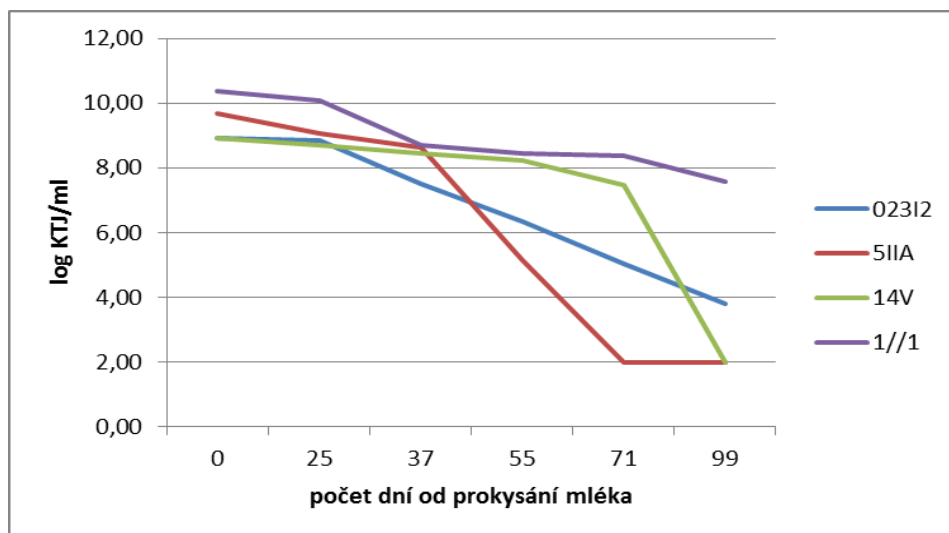
Graf č. 16: Počet bifidobakteriálního kmene *Bifidobacterium choerinum* v kysaném kravském mléce v průběhu skladování.



Graf č. 17: Počet bifidobakteriálního kmene *Bifidobacterium choerinum* v kysaném kozím mléce v průběhu skladování.



Graf č. 18: Počet bifidobakteriálního kmene *Bifidobacterium choerinum* v kysaném ovčím mléce v průběhu skladování.



6.2 Růst bifidobakterií v mléčných náhradách

Byla testována schopnost vybraných druhů bifidobakterií prokysat různé mléčné náhrady pro telata. Sledováno bylo sedm kmenů bifidobakterií, z toho 4 kmeny byly izolovány z trávicího traktu telat, jeden izolát byl z trávicího traktu kůzlete, jeden izolát z trávicího traktu jehněte a poslední byl izolovaný z trávicího traktu dospělého jedince.

Mléčné krmné směsi jsou, podobně jako mléka přežvýkavců, také vhodným médiem pro růst bifidobakterií. Všechny sledované kmeny prokysaly MKS v množství vyšším než 10^6 KTJ/ml. Nejvyšší nárůst kmene *Bifidobacterium thermophilum* (017III2) byl v mléčné náhradě Telmilk EX v počtech 9,50 KTJ/ml naopak nejméně narostl tento kmen v mléčné náhradě Heiferlac instant. Kmen *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* (805III2) také narostl nejlépe v mléčné náhradě Telmilk EX a to v počtu 8,62 KTJ/ml, nejnižší počty byly zaznamenány v mléčné náhradě Telmilk LEN a to v jedné z nejnižších hodnot testovaných bifidobakterií 6,97 KTJ/ml. *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* pod označením 017III1 nejlépe prokysal Telmilk EX a to v množství 9,52 KTJ/ml oproti mléčné náhradě Heiferlac instant, ve které byl v množství 8,43 KTJ/ml. Stejný druh pod označením 1/11 narostl nejlépe v náhradě Telfid grand a Acid v počtech 9,31 KTJ/ml. U tohoto kmene byl také zaznamenán nejnižší nárůst ze všech testovaných kmenů a to v množství 5,97 KTJ/ml v mléčné náhradě Heiferlac instant. Kojenecký izolát *Bifidobacterium bifidum* (JKM) byl detekován v nejvyšších počtech ve dvou náhradách a to v Telmilk EX a Telfid grand a Acid v množstvích 9,05 KTJ/ml. Izolát JKM nejméně prokysal mléčnou náhradu Milac. Pro *Bifidobacterium pseudolongum* ssp. *globosum* (4/2) byly nejvhodnější mléčné náhrady Telmilk spec a Milac, narostly zde ve velmi podobných počtech. V náhradě Telmilk EX narostlo v počtu 9,23 KTJ/ml a v náhradě Milac v počtu 9,21 KTJ/ml. Tento kmen byl nejméně schopný prokysat mléčnou náhradu pod názvem Telmilk LEN, oproti kmenu 9VIB (*Bifidobacterium pseudocatenulatum*). Jehněčí izolát 9VIB nejlépe, ze všech testovaných izolátů na mléčných náhradách, narostl v počtu 9,82 KTJ/ml v Telmilk LEN. Tento kmen nejméně narostl v mléčné náhradě Milac.

Telecí izoláty většinou nejlépe narostly v mléčné náhradě Telmilk EX. Pro kojenecký izolát byly nejvhodnější náhrady Telmilk EX a Telfid grand a Acid. Mléčná náhrada Telmilk spec byl nejvhodnější pro kůzlečí izolát. Jehněčí izolát zaznamenal nejvyšší nárůst v mléčné náhradě Telmilk LEN.

Tabulka č. 6: Počet bifidobakterií po prokysání mléčných náhrad, hodnoty uvedené v tabulce jsou v log KTJ/ml

Izoláty		Telmilk EX	Telmilk spec	Telmilk LEN	Telfid grand a Acid	Heiferlac instant	Milac
Telecí	017III2	9,50	9,33	9,16	9,33	8,38	9,13
Telecí	805III2	8,62	8,04	6,97	8,37	8,43	8,43
Telecí	017III1	9,52	9,08	9,24	9,45	8,83	9,31
Telecí	1/11	8,10	8,22	7,86	9,31	5,97	6,43
Lidský	JKM	9,05	8,98	8,90	9,05	9,00	8,80
Kůzlečí	4/2	8,64	9,23	6,76	6,84	8,85	9,21
Jehněčí	9VIB	9,04	8,79	9,82	8,54	9,16	8,39

7 Diskuse

7.1 Růst a přežívání bifidobakterií v mléce přežvýkavců

Střevní mikrobiota u zvířat i lidí je osídlena mnoha různými mikroorganismy a její správné složení ovlivňuje jejich zdraví. Jednou z možností jak podpořit správnou skladbu střevní mikrobioty je příjem probiotik. Probiotika jsou živé mikroorganismy, mezi které můžeme řadit i některé bakteriální druhy z rodu *Bifidobacterium*. Bifidobakterie používané jako probiotika mají mnoho pozitivních účinků na lidského či zvířecího hostitele, které jsou dokumentovány mnohými studiemi (Bunešová et al., 2012; Paturi et al., 2015; Servin, 2004). Mezi hlavní terapeutické a zdravotní přínosy bifidobakterií patří zvýšení odolnosti proti patogenům způsobujícím střevní infekce a tím i prevence proti průjmovým onemocněním. Jako další pozitivní účinky jsou uváděny stabilizace střevní slizniční bariéry, zlepšení využití laktózy a zvýšení prevence proti rakovině tlustého střeva (Mättö et al., 2004). Na základě prokázaného pozitivního účinku probiotik na lidské zdraví existuje na trhu již řada výrobků, z větší části výrobky mléčné, obsahující bifidobakterie, především fermentovaná mléka, sušená mléka, sýry cottage, mléčné dezerty a mražené krémy (Lourens-Hattingh and Viljoen, 2001). Mléko a mléčné výrobky jsou vhodnou živnou půdou pro růst mikroorganismů, které svými metabolickými procesy mohou ovlivňovat příznivě i nepříznivě biologickou hodnotu výrobku.

Nárůst a přežívání probiotických kultur v daném produktu je závislé na řadě faktorů, mezi které je řazena velikost a typ inokula, teplota a doba fermentace, interakce mezi přítomnými druhy, skladovací teplota, použitý kmen, konečná kyselost a složení fermentačního média. Fermentační médium se liší složením a to koncentrací a typem cukerného zdroje, dostupností živin, inhibitory a růstovými promotory (Čurda et al., 2004). V experimentální části diplomové práce byly pouze dva rozdílné faktory, které ovlivňovaly přežívání bifidobakterií v mléce. Prvním faktorem byly mléka nadojená od různých druhů přežvýkavců a druhým faktorem byly rozdílné druhy a kmeny bifidobakterií. Pomocí sterilace mlék byly odstraněny nežádoucí faktory. Termolabilní antimikrobiální látky, které se běžně vyskytují v čerstvém mléce, byly inaktivovány spolu s již přítomnými bakteriemi, které by mohly potlačit růst inokulovaných bifidobakterií. Teplota a doba fermentace byly pro všechny testované kmeny a mléka shodné. Co se týče inokula, v našem experimentu bylo použito inokulum čerstvě narostlých bakterií. Kromě čerstvého inokula mohou být bakterie zaočkovány do média v mražené nebo lyofilizované formě, nebo jako prášek získaný ze

sprejové sušárny (Carvalho et al., 2004). Forma inokula může ovlivnit výsledný počet bifidobakterií ve fermentovaném mléku. Abe et al. (2009) testoval mražené a lyofilizované bifidobakterie (*B. longum*), které zaočkoval společně s jogurtovou kulturou do vysterilovaného mléka. Bifidobakterie zaočkované ve zmražené formě prokázaly mírně vyšší nárůst ve srovnání s počtem bifidobakterií přidaných v lyofilizovaném stavu (Abe et al., 2009). Testované bifidobakterie byly schopny prokysat mléko v přibližném množství 10^8 KTJ/ml, což je ve srovnání s našimi výsledky menší počet. Podle našich výsledků jsou bifidobakterie schopny prokysat kravské mléko v přibližném množství 10^9 KTJ/ml, což je o řád více. Jedním z možných důvodů je, že v našem experimentu jsme sledovali prokysání jednoho kmene v jednom mléce, kdežto Abe et al. spolu s testovaným kmenem zaočkovali i jogurtovou kulturu. Tudíž mohlo dojít ke kompetici o živiny. Abe et al., (2009) kromě vlivu typu inokula na prokysání mléka sledoval i vliv inkubační teploty. Byly testovány 3 různé fermentační teploty bifidobakterií, a to teploty 37 °C, 39 °C a 41 °C. Podle jeho výsledků, počty bifidobakterií kultivované při 37 °C byly nejvyšší a ve srovnání s teplotou 41 °C byl rozdíl dokonce i statisticky významný. Přesto ale počty bifidobakterií u všech třech sledovaných teplot byly vyšší než je 10^7 KTJ/ml, což je důležité především z hlediska legislativního, kde je limit pro nejnižší počet probiotických kultur (bifidobakterií) v mléčném výrobku stanoven na 10^6 KTJ/ml. V našem experimentu byla zvolena teplota fermentace 37 °C a v této teplotě bylo mléko fermentováno po dobu 24 hodin. Z našich výsledků vyplývá, že všechny tři testované mléka jsou vhodným substrátem pro bifidobakterie. Z testovaných 23 kmenů nebylo schopných narůst alespoň v množství 10^6 KTJ/ml pouze 3 kmene. V nejvyšších počtech všemi sledovanými kmeny bylo prokysáno mléko kravské, kde se průměrné počty pohybovaly okolo 10^9 KTJ/ml. Úplně Nejlépe bylo prokysáno ovčí mléko kůzlečímí kmeny, kde průměrný nárůst byl $10,28 \pm 0,39$ log KTJ/ml, na druhou stranu lidské a telecí kmeny toto mléko prokysaly v počtech okolo 10^8 KTJ/ml.

Kromě schopnosti prokysání mléka musí být schopny bifidobakterie v daném mléčném produktu i přežít. Podle zákona by bifidobakterie měli být v počtu vyšším než 10^6 KTJ/ml po celou dobu trvanlivosti výrobku. Schopnost přežít může být ovlivněna více faktory a jedním z nich je výsledné pH produktu. Konečným produktem metabolismu bifidobakterií je kyselina mléčná a kyselina octová v poměru 2 : 3 (Biavati et al., 2000). V provozu, se tento poměr mění v závislosti na živné půdě, mnohdy se vytvoří určité množství kyseliny mravenčí a ethanolu, které změní výsledný poměr hlavních konečných produktů (Maxa a Rada, 1996). Bifidobakterie patří mezi acidorezistentní bakterie, to znamená, že optimální pH jejich růstu je mírně kyselé a pohybuje se v rozmezí 6,5 – 7,0, ale jsou schopny přežít i nižší hodnoty.

Například *Bifidobacterium animalis* je schopný přežít i při hodnotách pH 3,0 – 5,0 (Goodfellow et al., 2012). To znamená, že kyselé prostředí fermentovaných mléčných výrobků není překážkou pro jejich přežívání. Ovčí, kozí a kravské mléko mají podobné pH, pH ovčího mléka se pohybuje v rozmezí 6,51 – 6,71, kravské mléko má pH 6,65 - 6,71 a pH kozího mléka je 6,50 – 6,80 (Park et al., 2007). Konečné pH mléčného výrobku, který byl zfermentován, by nemělo klesnout pod hranici 4,6, aby nedošlo ke snížení množství bifidobakterií (Lourens-Hattingh and Viljoen, 2001). Čurda et al. (2004) ve své studii uvádí, že *Bifidobacterium longum* je tolerantnější k nízkému pH než *Bifidobacterium bifidum*. V experimentální části této diplomové práce bylo zjištěno, že špatně přežíval *B. bifidum* JKM izolovaný z trávicího traktu kojence, ve všech třech druzích mlék. Tento kmen je velmi vnímavý na vnější podmínky, mezi které patří i pH. Izolát JKM přežíval v kozím po dobu delší než 50 dní, naopak v mléce kravském nebyl schopný tento kmen přežít déle než 25 dní. Lepší pufrovací schopnost kozího mléka je možný důvod, proč tento kmen *B. bifidum* přežíval déle v mléce kozím než v mléce kravském (Park et al., 2007).

V některých potravinách je vzhledem k citlivosti bifidobakterií na kyslík obtížnější zajistit dostatečný nárůst a jejich následné přežívání. Zvýšení stability bifidobakterií během skladování je možné docílit pomocí přidání prebiotik (většinou oligosacharidy) do výrobku (Lourens-Hattingh and Viljoen, 2001). Dalším faktorem, který může pozitivně nebo negativně ovlivnit přežívání bifidobakterií v mléčném produktu, je teplota, ve které jsou testované vzorky uchovávány. Abe et al. (2009) ve své studii zkoumal vliv dvou teplot v průběhu skladování na *Bifidobacterium longum* v jogurtu. Zjistili, že po dobu 4 týdnů byly počty bifidobakterií jak při 5 °C tak i při 10 °C vyšší než 10^6 KTJ/ml. Přežívání bifidobakterií při 5 °C sledovali dokonce o dva týdny déle a ani v šestém týdnu jejich studie neklesly počty bifidobakterií pod 10^6 KTJ/ml. Raeisi et al. (2013) použili ve svém experimentu skladovací teplotu 4 °C, při této teplotě uchovával 24 mléčných fermentovaných vzorků, obsahující bifidobakterie, po dobu jejich expirace (7-26 dní). Na konci expirace každého vzorku provedl testování a 23 z 24 fermentovaných mléčných produktů obsahovalo počty bifidobakterií vyšších než 10^6 KTJ/g. V této diplomové práci byla též zvolena skladovací teplota 4 °C, a většina testovaných bifidobakterií v kysaných vzorcích mlék přežvýkavců přežívaly v legislativě daným počtem minimálně po dobu 25 dní. V kravském mléce nepřežilo 25 dní v množství vyšším jak 10^6 KTJ/ml 7 kmenů a z toho byly 4 kmeny lidské. V kozím mléce nebyly detekovány v dostatečném množství 5 kmenů a v ovčím mléce 6 kmenů, z toho byly 4 kmeny lidské. Tománková a kol. (2008) uvádí, že bifidobakteriální kmeny původně izolované z trávicího traktu lidí přežívají hůře v prostředí kravského mléka než kmeny animálního

původu. Toto tvrzení je evidentní i z našich výsledků, kde kmeny lidského původu přežívaly v mléce kravském a ovčím kratší dobu než 25 dní.

Kromě skladovací teploty může schopnost přežívání ovlivnit i přítomnost jiných bakteriálních druhů. Abe et al. (2009) uvádí, že přežívání bifidobakterií v kysaném jogurtu je závislé na přítomnosti *Lactococcus lactis*. Při použití startovací kultury, která obsahovala *L. lactis*, byl nárůst a doba přežívání bifidobakterií výrazně větší než v případě, že startovací kultura neobsahovala *L. lactis*. Jeho výzkum dokázal, že přítomnost *L. lactis* zlepšuje přežívání bifidobakterií v jogurtu. Negativní vliv na schopnost přežívání bifidobakterií v mléčných výrobcích může mít obsah ovocného koncentrátu, který může obsahovat různé inhibitory růstu (Raeisi et al., 2013). Dva testované ochucené produkty s obsahem probiotik nesplňovaly deklarované množství bifidobakterií a to množství 10^6 KTJ/g. Naopak Espí'rito Santo et al. (2010) uvádí, že přidáním dužiny ovoce Acai do fermentovaného odtučněného mléka byly zvýšeny počty *Bifidobacterium longum* a *B. animalis* ssp. *lactis* oproti mléku, které nebylo takto obohacené.

Varga et al. (2014) testovali nárůst a dlouhodobé přežívání směs tří bakterií ve velbloudím, kravském, kozím a ovčím mléce. Inokulovaná směs ABT obsahovala *Lactobacillus acidophilus* (A), *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* (B) a *Streptococcus thermophilus* (T). Nejvyšších počtů z testované směsi ABT, po prokysání i během skladování, dosahoval *S. thermophilus*, jehož počty po celou dobu neklesly pod hodnotu 10^8 KTJ/ml. Nárůst zbylých dvou byl odrazem tak vysokého nárůstu *S. thermophilus*, proto počty *B. animalis* ssp. *lactis* byly po prokysání v rozmezí 10^6 - 10^7 KTJ/ml. Tento kmen je pravděpodobně zvířecího původu a je blízký s druhem *B. animalis* ssp. *animalis*. V této diplomové práci bylo sledováno přežívání několika kmenů *B. animalis* ssp. *animalis* izolovaných buď z telat, nebo z jehňat. Všechny sledované kmeny byly schopny přežívat v množství vyšším než 10^6 KTJ/ml v kravském a v kozím mléce po dobu 55 dnů, a v ovčím mléce po dobu 37 dnů. Jedinou výjimkou byl testovaný kmen 017III1 (*B. animalis* ssp. *animalis*), který nebyl schopen prokysat kozí mléko. *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* je běžně používaným kmenem v mlékárenském průmyslu. Je tolerantní k nízkému pH a přítomnosti kyslíku, proto je vhodný do fermentovaných mléčných výrobků (Goodfellow et al., 2012).

Z výsledků diplomové práce vyplývá, že přežívání bifidobakterií v mléce přežvýkavců je kmenově specifickou vlastností. S ohledem na druhovou příslušnost bylo porovnáno dlouhodobé přežívání pěti bifidobakteriálních kmenů druhu *B. animalis* ssp. *animalis* a čtyř bifidobakteriálních kmenů druhu *B. choerinum*. Při porovnání jednotlivých grafů přežívání ve

třech různých druhích mlék v rámci jednoho druhu, je vidět, že každý kmen je schopný jinak prokysávat a jinak dlouhou dobu přežívat v jednotlivých mlékách. Z toho důvodu je vhodné, aby v případě zavedení nového probiotického bifidobakteriálního kmene na trh, který má být podáván v mléčných výrobcích, byla otestována jeho schopnost fermentace a dlouhodobého přežívání v mléčných výrobcích.

7.2 Růst bifidobakterií v mléčných krmných směsích pro telata

Mléčné náhrady pro přežvýkavce na rozdíl od nativního mléka obsahují i jiné sacharidy než je laktóza a od ní odvezené oligosacharidy. Mléčné nápoje jsou obohaceny o sojoproteinový koncentrát, který mimo bílkovinné složky obsahuje i potravní vlákninu sóji. Potravní vláknina sóji je kromě jiného složena i z nestavitelných oligosacharidů jako jsou rafinóza, stachyóza a verbaskóza (Prugar et al., 2008). Oligosacharidy rafinózové řady mohou být některými probiotickými bakteriemi využívány jako zdroj energie (Touhy et al., 2005). Rada et al. (2008) uvádí, že některé bifidobakterie jsou schopny růst na těchto oligosacharidech. V této studii testovali růst bifidobakterií na stachyóze a rafinóze. Ačkoli bifidobakterie byly schopné růst na obou oligosacharidech, v případě použití stachyózy byl evidován vyšší nárůst bifidobakterií. Všechny testované bifidobakteriální kmeny byly schopné jako zdroj energie využívat tyto oligosacharidy. Výjimkou byl kmen *B. bifidum* JKM (Rada et al., 2008, Goodfellow et al., 2012). V této diplomové práci kmen JKM (*B. bifidum*) narostl v mléčných krmných směsích v poměrně vysokých počtech a to průměrně $8,96 \pm 0,10 \log$ KTJ/ml. Z tohoto poznatku lze usuzovat, že hlavním zdrojem uhlíku v mléčných náhradách je laktóza a že RSO jsou obsaženy v náhražkách v minoritním množství. Obsah oligosacharidů bohužel není deklarován výrobcem, ale je možné usuzovat přítomnost oligosacharidů na základě přítomnosti sojoproteinového koncentráту ve směsi pro telata. Výhodou RSO je, že nejsou strávené v horní části trávicího traktu přežvýkavců a mohou sloužit jako zdroj energie pro bifidobakterie, které jsou již přítomné v intestinálním traktu mláďat přežvýkavců.

Mléčné náhrady pro mláďata přežvýkavců jsou podobně jako mléko přežvýkavců taky vhodným zdrojem pro růst bifidobakterií. Většina testovaných kmenů prokysala MKS ve vysokých počtech v rozmezí $10^8 - 10^9$ KTJ/ml.

8 Závěr

Na základě výsledků této diplomové práce je vyvozen závěr, že schopnost prokysat mléko a dlouhodobě v něm přežívat je kmenově specifické. Výsledky vyvrátily hypotézu, že kmeny izolované z daného animálního druhu budou nejlépe přežívat v mléce téhož zvířete. Mléko je dobrým substrátem pro růst a přežívání bifidobakterií, většina splnila legislativní nařízení a to, že byly přítomny v množství vyšším 10^6 KTJ/ml po dobu minimálně jednoho měsíce. Výsledky zároveň potvrdily hypotézu, že mléčné krmné směsi pro telata jsou vhodným substrátem pro růst bifidobakterií.

9 Seznam literatury

- Abe, F., Tomita, S., Yeashima, T., Iwatsuki, K. 2009. Effect of production conditions on the stability of human bifidobacterial species *Bifidobacterium longum* in yogurt. *Letters in Applied Microbiology*. 49. 715-720.
- Bayram, B., Yanar, M., Guler, C., Metin, J. 2007. Growth performance, health and behavioural characteristics of Brown Swiss calves fed a limited amount of acidified whole milk. *Italian journal of animal science*. 273-279.
- Biavati, B. and Mattarelli, P., 2012. Genus I. *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924, 472AL. In: De Vos, P. Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H. and Whitman, W.B. (eds.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Volume 5. The Actinobacteria, Part A. Springer, New York, NY, USA, pp. 171-224.
- Biavati, B., Vescovo, M., Torriani, S., Bottazzi, V. 2000. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. *Annals of Mikrobiology*. 50. 117 – 131.
- Březina, P., Komár, A., Hrabě, J. *Technologie, zbožiznalství a hygiena potravin; Technologie, zbožiznalství a hygiena potravin živočišného původu*. Vyškov, 2001. 182 s. ISBN 80-7231-079-8. centrum, 2004. 528 s. první vydání, ISBN 80-967064-9-7.
- Bunešová, V., Domig, K.J., Killer, J., Vlková, E., Kopečný, J., Mrázek, J., Ročková, Š., Rada, V., 2012. Characterization of bifidobacteria suitable for probiotic use in calves. *Anaerobe* 18, 166–168. doi:10.1016/j.anaerobe.2011.09.008
- Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X., Gibbs, P., 2004. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 14, 835–847. doi:10.1016/j.idairyj.2004.02.001
- Czerucka, D.; Piche, T.; Rampal, P. 2007. *Alimentary Pharmacology and therapeutics*. Volume: 26 Issue: 6 p 767-778
- Čurda, L., Holubová, J., Rudolfová, J., Němečková, I. 2004. Stabilita galaktooligosacharidů ve fermentovaných mléčných výrobcích a jejich vliv na fermentované mléčné výrobky. Odborná studie pro institut Danone. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. 55 s.

D'Aimmo, M. R., Modesto, M., Biavati, B. 2007. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and Bifidobacterium spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. International Journal of food microbiology .Volume: 115 Issue: 1 Pages: 35-42

Doleyres Y., Lacroix C. 2005. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. International Dairy Journal., vol. 15, s. 973-988.

Dong, X.Z., Xin, Y.H., Jian, W.Y., Liu, X.L. and Ling, D.W., 2000. Bifidobacterium thermacidophilum sp nov., isolated from an anaerobic digester. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 50: 119-125.

Donoghue, S., Kronfeld, D.S, Berkowitz, S.J. Vitamin A nutrition of the equine: growth, serum biochemistry and hematology, J. Nutr., 111 (1981), pp. 365–374 . Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/:ELX_SESSIONID=pGJYJQzQPINKL2mK9vBRh4VLBVNGhdL6f5P37QMrxzTY98CF7FxL!-1876212400?uri=CELEX:32006R1924>

Espírito Santo, A.P., Silva, R.C. , Soares, F.A.S.M., Anjos, D., Gioielli, L.A., Oliveira, M.N. 2010. Açai pulp addition improves fatty acid profile and probiotic viability in yoghurt. International Dairy Journal. 20. 415 – 422.

Evropská komise (online), Evropský registr nutričních a zdravotních tvrzení. [cit. 2017-02-20]. Dostupné z <http://ec.europa.eu/food/safety/labelling_nutrition/claims/register/public/?event=search>

Ewing, W.N., Cole, D.J.A. 1994. The living gut. Context. Carrycastle Road, Dungannon, N. Ireland.

Fantová, M. A KOLEKTIV., 2010: Chov koz. 2. vyd. Brázda, Praha, 214 s.

FAO/WHO. 2002. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food [cit. 2017-02-09]. Dostupné z: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.

Faye, B., & Konuspayeva, G. (2012). The sustainability challenge to the dairy sector e the growing importance of non-cattle milk production worldwide. International Dairy Journal, 24, 50-56.

Felis, G.E. and Dellaglio, F. 2007. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. Current Issue in International Microbiology 8: 44-61.

Forman, L., Čurda, L. Význam základních a doplňkových znaků kvality mléka pro jakost mlékárenských výrobků a pro ekonomiku mlékařství [online]. [cit. 2014-11-29]. Dostupný z WWW: <http://www.agris.cz/vyzkum/detail.php?id=108668&iSub=566&PHPSESSID=3e>

Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. Advanced dairy chemistry : Volume 2: Lipids. 3rd ed. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2006. 801 pp. ISBN 978-0-387-26364-9.

Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H.: Advanced dairy chemistry : Volume 1: Proteins. 3rd ed. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2003. 603 pp. ISBN 0-306-47271-6

Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H.: Advanced dairy chemistry : Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents. 3rd ed. New York : Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2009. 778 pp. ISBN 978-0-387-84864-8.

Fox, P. F.; McSweeney, P. L. H.: Dairy Chemistry and Biochemistry. 1st ed. London: Blackie Academic & Professional, 1998. 478 pp. ISBN 0-412-72000-0.

Fuller, R. 1997. Probiotics 2: Applications and practical aspects. London. Chapman and Hall, 212

Gaggiá, F., Mattarelli, P., Biavati, B. 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. International Journal of Food Microbiology. 141 . 15-28

Gaggiá, F., Mattarelli, P., Biavati, B., 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. International Journal of Food Microbiology. S15-28.

Gajdůšek, S. Laktologie. Brno: MZLU, 2003, 78 s., ISBN 8071576573

Gavini, F., Pourcher, A.M., Neut, C., Monget, D., Romond, C., Oger, C., Izard, D. 1991. Phenotypic differentiation of bifidobacteria of human and animal origin. International Journal of Systematic Bacteriology 41: 548-557.

Gerosa, S., & Skoet, J. (2012). Milk availability e Trends in production and demand and medium-term outlook. Rome (Italy): FAO, United Nations. <http://www.fao.org/docrep/015/an450e/an450e00.pdf>.

- Gilliland, S. E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 87(1–2), 175–188.
- Gomes, A.M.P. , Malcata, F.X. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics, *Trends Food Sci. Technol.* 10 139–157.
- Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H., Trujillo, M. E., Suzuki, K., Ludwig, W., Whitman, W. B. 2012. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Second edition. 185 – 205.
- Higashi, T., Shimada, K., Toyo'oka T. 2010. Advances in determination of vitamin D related compounds in biological samples using liquid chromatography–mass spectrometry: A review, *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878 (20). p. 1654–1661
- Hoyles, L., Inganas, E., Falsen, E., Drancourt, M., Weiss, N., McCartney, A.L. and Collins, M.D., 2002. *Bifidobacterium scardovii* sp nov., from human sources. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 995-999.
- Isolauri, E., Salminen, S., Ouwehand, A.C., *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 18 (2004) 299–313.
- Jandal, J. M. 1996. Comparative aspect of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. 22. 177 – 185.
- Kawasaki, S., Mimura, T., Satoh, T., Takeda, K. and Niimura, Y., 2006. Response of the microaerophilic *Bifidobacterium* species, *B. boum* and *B. thermophilum*, to oxygen. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 6854-6858.
- Leahy, S.C., Higgins, D.C., Fitzgerald, G.F., Van Sinderen, D. 2005. Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology* 98: 1303-1315.
- Leser, T. D., Amenuvor, J. Z., Jensen, T. K., Lindecrona, R. H., Boye, M., Moller, K. 2002. Culture-independent analysis of gut bacteria: the pig gastrointestinal tract microbiota revisited. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:673-690.

Li, Q., Chen, Q., Ruan, H., Zhu, D., He, G. 2010. Isolation and characterisation of an oxygen, acid and bile resistant *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Qq08. *Journal of the science of Food and Agriculture* 90: 1340-1346

Lilly, D.M., Stillwell, R.H., Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms, *Science*, 147 (1965) 747–748.

List of prokaryotic names with standing in nomenclature (online). [cit. 2017-02-20]. Dostupné z <<http://www.bacterio.net/bifidobacterium.html> >

Lourens-Hattingh, A. and Viljoen, B. C. 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*. 11(1–2), 1–17.

MÄTTÖ, J., MALINEN, E., SUIHKO, M.-L., ALANDER, M., PALVA, A., SAARELA, M. 2004. Genetic heterogeneity and functional properties of intestinal bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 97, 459 – 470

Maus, J.E. and Ingham, S.C., 2003. Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold- and acid- tolerance of bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology* 95: 146-154.

Maxa, V., Rada, V. 1996. Význam bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení pro výživu a zdraví. Ústav zemědělských a potravinářských informací. Praha. 42 s.

Moore, P.R., Evenson, A., Luckey, T.D., McCoy, E., Elvehjem, C.A., Hart, E.B. 1946. Use of sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick. *The Journal of Biological Chemistry*. 16: 437.

Nářízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1774/2002 o hygienických pravidlech pro vedlejší produkty živočišného původu, které nejsou určeny pro lidskou spotřebu. 2002. [cit. 2017-02-01]. Dostupné z <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/ALL/?uri=CELEX:32002R1774>>

Nářízení evropského parlamentu a rady (ES) č. 1924/2006 , o výživových a zdravotních tvrzeních při označování potravin, 2006 [cit. 2017-02-01]. Dostupné z < <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:012:0003:0018:CS:PDF> >

- Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M., & Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, 88e113.
- Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M., & Haenlein, G. F. W. (2007). Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, 88e113.
- Parker, R.B., Probiotics, the other half of the antibiotic story, *Animal Nutrition Health*, 29 (1974) 4–8.
- Paturi, G., Butts, C.A., Bentley-Hewitt, K.L., Hedderley, D., Stoklosinski, H., Ansell, J., 2015. Differential effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on gut microbiota and gene expression in rats. *J. Funct. Foods* 13, 204–213. doi:10.1016/j.jff.2014.12.034
- Prokš, J. *Mlékařství*. 1. vyd. Státní nakladatelství technické literatury Praha, 1969. 224 s
- Prugar, J. 2008. Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. Tisíciletí. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., ve spolupráci s Komisí jakosti rostlinných produktů ČAZV. Praha. 326 s.
- Rada V., Vlková E., Nevoral J., Trojanová I. 2006. Comparison of bacterial flora and enzymatic activity in faeces of infants and calves. *FEMS Microbiology Letters*. 2. 258(1), 25–28
- Rada, V., Nevoral, J., Trojanová, I., Tománková, E., Šmehilová, M., Killer, J. 2008. Growth of infant faecal bifidobacteria and clostridia on prebiotic oligosaccharides in in vitro conditions. *Clinical microbiology. Anaerobe* 14. 205 – 208.
- Rada, V., Petr, J. 2000. A new selective medium for the isolation of glucose non-fermenting bifidobacteria from hen caeca. *Journal of Microbiology Methods*. 43. 127 – 132.
- Raesi, S. N., Ouba, L. I. I., Farahmand, N., Sutherland, J., Ghoddusi, H. B. 2013. Variation, viability and validity of bifidobacteria in fermented milk products. *Food Control*. 34. 691 – 697
- Rasic, J. L. 2003. Microflora of the intestine probiotics. In B. Caballero, L. Trugo, & P. Finglas (Eds.), *Encyclopedia of food sciences and nutrition* (pp. 3911–3916). Oxford: Academic Press.

Reuter, G., 1963. Comparative studies on the bifidus flora in the feces of infants and adults. with a contribution to classification and nomenclature of bifidus strains. *Zentralblatt Für Bacteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene* 1 191:486-507.

Rosell, V. 1987. Acidification and probiotics in Spanish pig and calf rearing. In: *Biotechnology in the Feed Industry*, p. 177-180. (Ed: TP Lyons). Alltech Techn. Publ. Nicholasville, Kentucky.

Sanchez, B., Ruiz, L., Gueimonde, M., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A. 2013. Adaptation of bifidobacteria to the gastrointestinal tract and functional consequences. *Pharmacological Research* 69:127-136.

Servin, A.L., 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28, 405–440. doi:10.1016/j.femsre.2004.01.003

Sgorbati, B., Biavati, B., Palenzona, D. 1995. The Genus *Bifidobacterium*. In: *The Lactic Acid Bacteria*, Vol. 2, B.J.B. Wood, W.H. Holzapel (Eds.), Chapman and Hall, London, UK, pp. 279–306.

Simpson, P.J., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. and Stanton, C., 2004a. *Bifidobacterium psychraerophilum* sp nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp nov., isolated from a porcine caecum. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 401-406.

Smetana, P., Hlaváček, J., Samková, E., Rozsyval, R., 2009: *Faremní zpracování mléka v ekologickém zemědělství*. Bioinstitut, Olomouc, 63 s.

Socol, C.R., Porto de Souza Vandenberghe, L., Rigon Spier, M., Bianchi Pedroni Medeiros, A., Tiemi Yamaguishi, C., De Dea Lindner, J., Pandey, A. and Socol, V.T. 2010. The potential of probiotics: a review. *Food Technology and Biotechnology* 48, p. 413–434.

Staněk, S. 2012. Mléčná krmná směs [online]. [cit. 2012-10-13]. Dostupné z <<http://www.zootechnika.cz/clanky/chov-skotu--buvalu/odchov-telat/mlecna-vyziva-telat/mlecna-krmna-smes.html>>

Staněk, S. 2015. Faktory ovlivňující trávení mléčných nápojů [online]. [cit. 2016-11-12]. Dostupné z <<http://www.zootechnika.cz/clanky/chov-skotu/odchov-telat/mlecna-vyziva-telat/faktory-ovlivnujici-traveni-mlecnych-napoju.html>>

Timmerman, H. M., Konig, C. J. M., Mulde, L., et al. 2004. Monostrain, multistain and multispecies probiotics – a comparison of functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology*.153:88-93

Tománková, E., Homutová, I., Šmehilová, M., Dubná, S., Rada, V. 2008. Přežívání bifidobakterií v kravském mléce. Sborník přednášek semináře mléko a sýry. Česká zemědělská univerzita. Praha.

Uyeno, Y., Shigemori, S., Shimosato, T., 2015. Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity. *Microbes and Environment*. 30, 126–32

Varga, L., Süle, J., Nagy, P. 2014. Short communication: Survival of the characteristic microbiota in probiotic fermented camel, cow, goat, and sheep milks during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*. 97/4. 2039 – 2044.

Velíšek, J., Hajšlová, J., 2009: *Chemie potravin*. Osis, Havlíčkův Brod, 602 s.

Vinderola, C. G., & Reinheimer, J. A. 2003. Lactic acid bacteria: A comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36, 895–904.

Vlková, E., Grmanová, M., Rada V., Homoutová, I., Dubná, S. 2009. Selection of probiotic bifidobacteria for lambs. *Czech Journal of Animal Science*. 12. 552 – 565.

Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 289/2007 Sb., o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropských společenství. (online) [cit. 2017-02-09]. Dostupné z <http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_vyhlaska-2007-289-veterinaripece.html>