

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra kvality a bezpečnosti potravin



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Využití NMR k analýze jogurtů z kravského
a kozího mléka**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Andrea Nosková

Obor studia: Výživa a potravin

Vedoucí práce: Ing. Veronika Legarová, Ph. D.

Konzultant: Ing. Lucie Rysová

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Využití NMR k analýze jogurtů z kravského a kozího mléka" 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 14. 4. 2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Veronice Legarové, Ph.D. za odborné vedení, cenné vědomosti a přátelský přístup v průběhu tvorby diplomové práce a Ing. Lucii Rysové za cenné rady, pravidelné konzultace a neskutečnou ochotu a asistenci při zpracování výsledků. Poděkování patří taktéž mé rodině a přátelům, kteří mi byli oporou po celou dobu studia.

Využití NMR k analýze jogurtů z kravského a kozího mléka

Souhrn

Mléko a mléčné výrobky patří mezi komodity, u kterých produkce i spotřeba stále roste. Výrazná obliba vzrostla u fermentovaných mléčných výrobků, které tvoří velice významnou a širokou škálu výrobků, do kterých spadají produkty lišící se typem použitých mikroorganismů nebo například rozdílnými postupy fermentace. Konzumace těchto výrobků zajišťuje pozitivní vliv na lidské zdraví, obsahuje vysoké množství plnohodnotných bílkovin zahrnující veškeré esenciální aminokyseliny, vysoký obsah vápníku a jiných minerálních látek, dále vitaminů, především skupiny B. Za pomoci bakteriálního rozkladu laktózy vzniká mléčná kyselina, která působí konzervačně a v gastrointestinálním traktu pozitivně ovlivňuje střevní mikrobiotu.

Teoretická část diplomové práce se zabývala charakteristikou složení mlék, popisem procesu kysání mléka, popisem fermentovaných mléčných výrobků, fyzikálně chemických vlastností, technologie výroby jogurtů a jejich probiotických účinků a obecného využití ve výživě. V neposlední řadě byla popsána nukleární magnetická rezonance (NMR), její princip, využití v mlékařském sektoru a charakterizovány byly také výhody a nevýhody, které se s touto metodou pojí.

Cílem praktické části diplomové práce bylo ověření, že ^1H NMR je vhodnou analytickou metodou k identifikaci nízkomolekulárních látek kravských a kozích jogurtů. Analýza hlavních komponent (PCA) a ortogonální diskriminační analýza nejmenších čtverců (OPLS-DA) měly za cíl nalézt biomarkery zodpovědné za klasifikaci těchto dvou skupin jogurtů. Na základě získaných spekter z analýzy NMR a dat z odborné literatury bylo identifikováno dohromady 61 látek v kozích jogurtech a 55 látek v jogurtech kravských. Charakteristickým biomarkerem kravských jogurtů vyšel orotát v oblasti spektra 6,18 ppm. Další významnou látkou diskriminující kravský jogurt byl zřejmě aminocukr s acetylovou skupinou v oblasti spektra 2,06 ppm. V oblastech spektra kozích jogurtů 4,34 ppm; 5,58 ppm; 5,98 ppm; 7,90 ppm a 7,94 ppm byly identifikovány charakteristické UDP-cukry (UDP-glukóza, UDP-galaktóza, UDP-glukuronát a UDP-N-acetylglukosamin), které vykazovaly velmi vysoké VIP skóre a byly tak schopny úspěšně odlišit skupiny kravských a kozích jogurtů. V oblastech 5,94 ppm a 8,26 ppm v kozích jogurtech a 5,34 ppm v kravských jogurtech se nacházely látky, které patřily mezi deset signifikantních binů, avšak tyto látky nebyly prostřednictvím software identifikovány.

^1H NMR analýza se potvrdila jako vhodná metoda při identifikaci nízkomolekulárních látek, je ovšem potřeba, aby tato tematika byla předmětem dalšího zkoumání. Výsledná data lze použít jako podkladový materiál pro další studie, nejlépe cílených analýz.

Klíčová slova: NMR, viskozita, jogurt, kozí mléko, kravské mléko

Use of NMR for the analysis of yoghurts from cow's and goat's milk

Summary

Milk and dairy products are among the commodities where production and consumption are still growing. A significant increase in popularity has been seen in fermented dairy products, which account for a very wide range of products of different beneficial bacteria used or different fermentation processes. Consumption of these products ensures a positive effect on human health, containing high levels of complete protein, including all essential amino acids, high levels of calcium and other minerals and vitamins, especially B vitamins. The bacterial degradation of lactose produces lactic acid, which has a positive effect on the microbiota in the gastrointestinal tract.

The theoretical part of the thesis dealt with the characteristics of milk composition, description of the process of milk fermentation, description of fermented dairy products, physical and chemical properties, technology of yoghurt production, their probiotic effects and general use in nutrition. Last but not least, nuclear magnetic resonance (NMR), its principle, its use in the dairy sector and the advantages and disadvantages associated with this method were described.

The aim of the experimental part of the thesis was to verify that ^1H NMR is a proper analytical method for the identification of low molecular weight substances in cow and goat yoghurt. Principal component analysis (PCA) and orthogonal least square discriminant analysis (OPLS-DA) aimed to find biomarkers responsible for the classification of these two groups of yoghurts. Based on the spectra obtained from NMR analysis and data from the literature, a total of 61 compounds in goat yoghurts and 55 compounds in cow yoghurts were identified. The characteristic biomarker of cow's yoghurt was orotate in the spectral region of 6.18 ppm. Another significant substance discriminating cow yoghurt was probably an amino sugar with an acetyl group at 2.06 ppm. Characteristic UDP-sugars (UDP-glucose, UDP-galactose, UDP-glucuronate and UDP-N-acetylglucosamine) were identified in the spectral regions of goat yoghurt at 4.34 ppm; 5.58 ppm; 5.98 ppm; 7.90 ppm and 7.94 ppm. UDP-sugars showed very high VIP scores and were thus able to successfully distinguish cow and goat yoghurt groups. Substances that were among the ten significant bins were found at 5.94 ppm and 8.26 ppm in the goat yoghurt and 5.34 ppm in the cow yoghurt. These substances were not identified by the software.

^1H NMR analysis was confirmed as a suitable method for the identification of low molecular weight substances but this topic needs further investigation. The resulting data can be used as background material for further studies, preferably targeted analyses.

Keywords: NMR, viscosity, yoghurt, goat's milk, cow's milk

Obsah

1 Úvod	10
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	11
3 Literární rešerše	12
3.1 Mléko	12
3.2 Základní charakteristika mléka	13
3.2.1 CPM, PSB, RIL	13
3.2.2 Režim jakosti Q CZ pro mléko	14
3.2.3 Hlavní složky mléka	16
3.2.3.1 Sacharidy	16
3.2.3.2 Tuky	17
3.2.3.3 Bílkoviny	18
3.2.4 Fyzikálně-chemické vlastnosti mléka	20
3.2.4.1 Kyselost mléka	20
3.2.4.2 Hustota, měrná hmotnost	20
3.2.4.3 Bod mrznutí	20
3.2.5 Hodnocení minoritních složek mléka	21
3.2.5.1 Močovina	21
3.2.5.2 Volné mastné kyseliny	21
3.2.5.3 Citronová kyselina	21
3.2.6 Jakost syrového mléka pro výrobu jogurtů	22
3.3 Základní charakteristika fermentovaných mléčných výrobků	22
3.3.1 Bakterie mléčného kvašení	24
3.3.1.1 Jogurtová a bifidogenní kultura	24
3.3.1.2 Homofermentativní rozklad laktózy	25
3.4 Základní charakteristika jogurtů	26
3.4.1 Rozdíly mezi kravskými a kozími jogurty	27
3.4.2 Technologie výroby jogurtů	28
3.5 Význam FMV ve výživě	32
3.5.1 Probiotické účinky	33
3.6 Nukleární magnetická rezonance	34
3.6.1 Princip NMR	34
3.6.1.1 Chemický posun	36
3.6.2 Výhody a nevýhody NMR analýzy	37
3.6.3 Využití NMR v mlékařském sektoru	39

4	Metodika	41
4.1	Analyzované vzorky mléka.....	41
4.2	Chemikálie	42
4.3	Přístroje a vybavení	42
4.4	Software	44
4.5	Příprava jogurtů.....	44
4.6	Příprava vzorků pro analýzu NMR.....	45
4.7	Parametry měření ^1H NMR spekter.....	45
4.8	Statistické zpracování	45
5	Výsledky	46
6	Diskuze	52
7	Závěr	56
8	Literatura.....	57

1 Úvod

Fermentované mléčné výrobky jsou čím dál více oblíbené mezi spotřebiteli, mají pozitivní vliv na lidské zdraví a taktéž mají zajímavé, sensoricky významné vlastnosti. Literatura uvádí více než 400 názvů fermentovaných mléčných výrobků, se kterými se můžeme ve světě setkat. Jedním z nejznámějších a nejkonsumovanějších z těchto produktů je právě jogurt (Kopáček 2018). Ten si prvenství získal především díky složení, které má pozitivní vliv na lidské zdraví. Toto složení je dáno především vysokým obsahem bílkovin zahrnující esenciální aminokyseliny, vysokým obsahem vápníku, fosforu a dalších minerálních látek, sníženým obsahem mléčného cukru, který jde ruku v ruce s vyšším obsahem mléčné kyseliny, a taktéž přítomností prospěšných živých kultur. Na prvenství tohoto fermentovaného mléčného produktu se rovněž podílí skutečnost, že v tržní síti je portfolio jogurtů skutečně velmi široké. I přestože jogurty z kravského mléka dominují, v posledních letech se stále častěji nabízejí i jogurty z koziho mléka. Větší zájem o tyto produkty zřejmě plyne z odlišnosti kravského a koziho mléka, která se liší nejen v zastoupení kaseinových frakcí, ale i ve struktuře tuku. Nukleární magnetická rezonance je jednou z široce využívaných analytických metod ke studiu nízkomolekulárních látek napříč celým potravinářským průmyslem, mlékárenský sektor nevyjímaje. Prostřednictvím této metody lze klasifikovat i kvantifikovat různé biomarkery v mléku i mléčných výrobcích. Tyto biomarkery mohou být ukazatelem např. metabolického onemocnění zvířete, stupně zrání sýru, stádia laktace, druhu krmiva nebo mohou poskytnout informaci o falšování.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotézou diplomové práce je, že nukleární magnetická rezonance je vhodná analytická metoda k identifikaci nízkomolekulárních látek kozího a kravského jogurtu. Cílem práce je analýza 24 kozích jogurtů a 24 kravských jogurtů pomocí protonové nukleární magnetické rezonance a následná identifikace nízkomolekulárních látek. Získaná databáze spekter bude poté podrobena statistickým metodám (PCA a OPLS-DA) s cílem nalézt biomarkery zodpovědné za klasifikaci těchto dvou skupin.

3 Literární rešerše

3.1 Mléko

Mléko je zcela nepostradatelnou potravinou pro nás už od narození a stejně tak i pro většinu živočichů je základem výživy mláďat. Spotřeba mléka a mléčných výrobků ve světě neustále roste. Největší světové zastoupení má mléko kravské přibližně s 81 %, hned na druhém místě je mléko buvolí s 15 %, dále kozí s 2 %, ovčí s 1 % a zbylé procento patří druhům ostatních zvířat produkujících mléko (FAO 2021).

Celosvětová mléčná produkce za posledních třicet let vzrostla o přibližně 64 %. V roce 1989 byla produkce okolo 538 milionů tun a v roce 2019 narostla na hodnotu 883 milionů tun. V asijských státech narostla produkce mléka o téměř 255 %. Číselně se v roce 1989 jednalo o hodnotu 104 milionů tun a po třiceti letech vzrostla produkce na hodnotu 369 milionů tun (FAO 2021). Od roku 1998 do roku 2017 vzrostla v EU jeho produkce o 10 %, tedy ze 151 milionů tun na 165 milionů tun mléka. V roce 1984 byl zavedený systém kvót, který vznikl s cílem dostat nadprodukcí mléka pod kontrolu. Mezi lety 2002-2005 byly patrné velké poklesy výroby a v roce 2009 začala produkce opět růst. V souvislosti s tím byly kvóty v roce 2015 zrušeny, a to mělo za následek ještě rychlejší nárůst evropské produkce mléka. Velká poptávka po dovozu z EU je především díky přísné legislativě, která zajišťuje produkci bezpečných výrobků od zdravých zvířat (Bórawski et al. 2020). Charakteristickými jakostními ukazateli syrového kravského mléka jsou celkový počet mikroorganismů (CPM), počet somatických buněk (PSB), a rezidua inhibičních látek (RIL), jež jsou v kravském mléce legislativně limitovány a dané hodnoty se musí dodržovat a pravidelně kontrolovat (Bórawski et al. 2020).

Průměrná spotřeba mléka a mléčných výrobků (bez másla) se v České republice v roce 2019 pohybovala okolo 249 kg na osobu a rok. Z toho činilo pouze 0,1 kg mléko a mléčné výrobky kozí, zbylých 248,9 kg zahrnovalo původ kravský. Spotřeba konzumního mléka kravského od roku 2013 stále klesá. V roce 2019 byla hodnota okolo 58,8 kg na osobu a rok, tedy přibližně o 3,4 kg nižší než v roce 2013 (ČSÚ 2019; Straková 2020).

Česká republika se podílí na produkci mléka v Evropské unii přibližně 2 %. Ve světě se na výrobě mléka podílí necelými 0,4 %. Podle studie Kvapilík 2019 o vývoji a perspektivě výroby mléka ve světě se přes velký nárůst světové populace dá očekávat v následujících dvaceti letech zvýšená produkce mléka o 20 až 35 %.

Dopad pandemie COVID-19 na mlékárenský sektor byl relativně mírný, ačkoliv počáteční obavy byly obrovské vzhledem k tomu, že čerstvé mléko a čerstvé mléčné výrobky snadno podléhají zkáze a mohly tak být jedním z hlavních důvodů narušení dodavatelského řetězce. Mlékárenský sektor se však ukázal jako mimořádně odolný a z globálního hlediska nebyl nijak výrazně ovlivněn. Následky pandemie se regionálně lišily a negativní dopady byly znatelné od nedostatku přepravních kontejnerů až po likvidaci přebytečných produktů (OECD & FAO. 2021). Největší vliv měla pandemie na světové ceny másla, které byly přizpůsobeny nižší poptávce po mléčném tuku ze strany gastronomie a pohostinství, jež byly dlouhou dobu zavřené kvůli covidovým opatřením. Indie, jakožto největší světový producent mléka (pokud se hodnotí produkce na úrovni států), dokázala zvýšit svou produkci o 2,1 % na 195 milionů tun mléka a mléčných výrobků. Jejich produkce byla pandemií téměř nedotčena a veškeré přebytečné mléko bylo zpracováno na mléko sušené (OECD & FAO 2021).

Indie zahrnovala v roce 2019 kolem 21 % celkové mléčné produkce na světě. Odhaduje se, že společně s Pákistánem budou do roku 2030 tvořit více než 30 % světové produkce (FAO 2021; OECD & FAO 2021).

3.2 Základní charakteristika mléka

Syrové mléko je mléko, které nebylo zahřáto na více než 40 °C a nebylo technologicky zpracováno. Označením „mléko“ se v lidské spotřebě myslí mléko kravské, každé jiné mléko musí mít uvedený druh zvířete, z něž mléko pochází (Evropský parlament & Rada Evropské unie 2004).

Jakost syrového mléka je důležitým faktorem kvality následně vyrobených mléčných produktů. Pro svůj vysoký obsah vody a živin je mléko ideálním prostředím pro rozvoj mikroorganismů, a tudíž je materiálem, který je vysoce ohrožen kažením (VÚM 2016). Jakost je dána několika ukazateli, které je pro správnou hygienickou a mikrobiální jakost a následné technologické zpracování nutné dodržovat. Mezi tyto ukazatele řadíme například CPM, PSB, RIL, bod mrznutí (BM), dále také množství bílkovin, tuku, tukuprosté sušiny (TPS) aj. (Janštová et al. 2012).

3.2.1 CPM, PSB, RIL

CPM je hodnota charakterizující celkovou hygienickou úroveň kvality syrového mléka (VÚM 2016). Zdrojem CPM v mléce může být například infikovaná mléčná žláza, popřípadě kontaminované ústí strukového kanálku, ale především veškeré pracovní povrchy, které během dojení přijdou s mlékem do styku. CPM nám tedy poskytuje informace o zdravotním stavu mléčné žlázy a současně i informace o dodržování hygienických postupů a zásad při jeho získávání (VÚM 2016; Bursová 2019). Podle nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu, byla stanovena kritéria pro syrové mléko, kde pro kravské syrové mléko platí, že obsah mikroorganismů (CPM) při 30 °C musí být $\leq 100\,000$ KTJ na 1 ml. U syrového mléka kozího a jiných druhů se hodnoty pohybují u obsahu mikroorganismů (CPM) při 30 °C $\leq 1\,500\,000$ KTJ na 1 ml. Pokud je však syrové mléko kozí určeno pro výrobu produktů ze syrového mléka, které neprojde tepelnou úpravou, musí provozovatelé potravinářských podniků zajistit, aby použité syrové mléko splňovalo obsah mikroorganismů při 30 °C $\leq 500\,000$ KTJ na 1 ml (Evropský parlament & Rada Evropské unie 2004).

PSB je taktéž znakem kvality mléka. Hlavní příčinou zvýšení PSB v mléce je zánětlivé onemocnění mléčné žlázy. Somatické buňky pocházejí z krve a epitelu mléčné žlázy (Agropress 2018). Mezi buňky pocházející z krve patří především leukocyty, a to zejména makrofágy, polymorfonukleární leukocyty a lymfocyty. Tyto typy leukocytů mají za cíl ničit cizorodé látky a obnovovat postižené tkáně. Jejich zvýšený počet tedy značí, že je mléčná žláza postižena zánětem. To však neplatí pro mléko kozí. Poměry polymorfonukleárních leukocytů se liší podle živočišného druhu. Kozí mléko obsahuje přirozeně vyšší množství polymorfonukleárních leukocytů ve srovnání s mlékem kravským nebo ovčím, která obsahují převážně makrofágy. Polymorfonukleární leukocyty jsou tak hlavním typem leukocytů v mléce zdravých koz, proto mastitida zvyšuje obsah těchto buněk v mléce kravském a ovčím, nikoli

v kozím. Přirozeně vyšší množství v kozím mléce je i epitelových buněk a jejich fragmentů vznikajících deskvamací epitelu a fyziologickou regenerací mléčných kanálků. Z tohoto důvodu má syrové kozí mléko obvykle vyšší hodnoty PSB ve srovnání s mlékem kravským (Podhorecká et al. 2021). Není však v pořádku, aby tyto hodnoty zůstaly bez limitů. Dle legislativy je stanoven pouze CPM u jiných živočišných druhů než krav, avšak limit PSB chybí a není pro to legislativní znění. Tento fakt by měl být podroben budoucímu zkoumání, aby se zamezilo přebírání mlék s příliš vysokými hodnotami PSB, kde je jasné riziko onemocnění mastitidou. Stejně jako CPM reflektuje PSB zdravotní stav mléčné žlázy krav a koz (Podhorecká et al. 2021). Podle nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu, byla stanovena kritéria pro syrové mléko, kde pro kravské syrové mléko platí, že obsah somatických buněk (PSB) $\leq 400\,000$ na 1 ml (Evropský parlament & Rada Evropské unie 2004).

RIL v mléce souvisí s rozšířeným používáním veterinárních léčiv, s nedodržováním ochranných lhůt či se změnou metabolismu nemocného zvířete. Inhibiční látky znesnadňují nebo zcela znemožňují zpracování mléka na mléčné výrobky za pomoci svých baktericidních případně bacteriostatických účinků. Obecně můžeme říci, že se jedná o látky, které mají tlumivý vliv na rozvoj a aktivitu mlékařských kultur a zákysů (Navrátilová 2002).

3.2.2 Režim jakosti Q CZ pro mléko

Pro zlepšení tržních příležitostí a dosažení přidané hodnoty u mléka a mléčných výrobků byl vytvořen dotační program jakosti Q CZ mléka. Výrobky kvalitní suroviny z welfare chovaných dojníc mají vyšší šanci proniknout na stávající i nový trh, čímž pomůžou firmám zapojeným do programu Q CZ v prosazování produkce vysoké kvality. Certifikace produktů je rozdělena na M1 (syrové kravské mléko) a M2 (mlékárenské produkty). Certifikované zemědělské produkty mají spotřebitelům poskytnout záruku kvality a dosažení sledovaných parametrů svědčí o zajištění welfare zvířat a šetrnosti k životnímu prostředí. Výroba vysoce kvalitních mléčných výrobků vyžaduje dodržování nadstandardních postupů od sběru a převzetí suroviny, přes zpracování suroviny do finálního výrobku, až po vychlazení finálního produktu (ZSČR 2020).

V rámci tohoto dotačního programu byly stanoveny ukazatele: CPM, PSB, obsah bílkovin, RIL, bod mrznutí a TPS. Jejich hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 1. Největší překážku pro vstup do programu představoval a stále představuje u většiny farem především PSB. V tabulce č. 1 je možné vidět, že PSB musí být dle pravidel menší nebo roven 220 000 na 1 ml. Aby této hodnoty bylo dosaženo, je nutné provést změny v hygieně dojení, kvalitě krmné dávky nebo hygienické kvalitě podestýlky (Rysová 2016).

Tabulka č. 1: Podmínky pro produkt M1 (syrové kravské mléko)

Ukazatel	Hodnota	Stanovení
CPM	$\leq 35\ 000$ v 1 ml	Nejméně 2x měsíčně, vyjadřuje se jako klouzavý geometrický průměr za poslední 2 měsíce Celkový průměr: za 12 měsíců se vyjadřuje jako aritmetický průměr zjištěných hodnot klouzavým geometrickým průměrem
PSB	$\leq 220\ 000$ v 1 ml	Nejméně 2x měsíčně, vyjadřuje se jako klouzavý geometrický průměr za poslední 3 měsíce Celkový průměr: za 12 měsíců se vyjadřuje jako aritmetický průměr zjištěných hodnot klouzavým geometrickým průměrem
Obsah bílkovin	$\geq 3,22$ % hm.	Nejméně 2x měsíčně, vyjadřuje se jako aritmetický průměr měsíčních hodnot s přesností na dvě desetinná místa včetně nejistoty měření Celkový průměr: za 12 měsíců se vyjadřuje jako aritmetický průměr zjištěných hodnot
RIL	negativní	Nejméně 2x měsíčně souběžně se stanovením CPM
Bod mrznutí	$\leq -0,515$ °C	Nejméně 1x měsíčně Celkový průměr: za 12 měsíců se vyjadřuje jako aritmetický průměr zjištěných hodnot
TPS	$\geq 8,50$ % hm.	Stejně jako obsah bílkovin se stanovuje nejméně 2x měsíčně a vyjadřuje se jako aritmetický průměr měsíčních hodnot s přesností na dvě desetinná místa včetně nejistoty měření Celkový průměr za 12 měsíců se vyjadřuje jako aritmetický průměr zjištěných hodnot

(zdroj: Věstník MZe 2016, upraveno autorem)

V případě parametrů pro mlékárenský výrobek v režimu jakosti Q CZ (produkt M2) je důležité, aby mlékárenský výrobek, který byl zpracován zpracovatelem, jenž nakoupil a následně zpracoval minimálně 60 % syrového kravského mléka v režimu jakosti Q CZ z celkového množství nakoupeného a následně zpracovaného syrového kravského mléka ve sledovaném období. Podmínkou účasti zpracovatele je nutnost poskytnutí provozních, účetních dokladů a průvodní dokumentace dokládající nákup a užití produktu M1 a celkový nákup syrového kravského mléka následně zpracovaného včetně zpětné dohledatelnosti certifikačnímu orgánu. Laboratorní analýzy sledovaných parametrů musí být prováděny v akreditovaných laboratořích (Ministerstvo zemědělství 2016).

V České republice je vyráběno a zpracováváno jakostně vysoce kvalitní mléko. Jeho parametry řadí Českou republiku mezi země s nejlepší kvalitou mléka v Evropě. Do nejvyšších tříd jakosti, tj. Q a I. jakostní třídy, je u nás zařazeno 97 % vyráběného mléka, přičemž v nově nastaveném režimu jakosti Q CZ mléka je z české výroby dnes přibližně 80 % produkovaného mléka u nás (Svoboda 2019).

3.2.3 Hlavní složky mléka

Majoritní komponentou mléka je voda, která činí průměrně 87,3 % a zbytek tvoří sušina okolo 12,7 %. Sušina mléka se liší u různých druhů zvířat v množství tuku, bílkovin, laktózy, minerálních látek a vitaminů (viz tabulka č. 2 a č. 3). Dále se v mléku vyskytují organické kyseliny, enzymy, hormony, fosfolipidy, plyny a somatické buňky (Park 2010). Složení mléka ovlivňuje mnoho faktorů jako např. plemeno, věk zvířete, zdravotní stav zvířete, stádium laktace, změny v krmné dávce a způsob krmení, podmínky prostředí, roční období nebo třeba umístění farmy (Lad et al. 2017).

3.2.3.1 Sacharidy

Laktóza (jinak také mléčný cukr) je hlavním sacharidem mléka. Jedná se o disacharid (α -D-glukóza a α -D-galaktóza), který se tvoří v sekrečních buňkách mléčných žláz, tudíž se jinde než v mléce a mléčných výrobcích nevyskytuje. Kravské mléko obsahuje běžně kolem 3-5 % laktózy, kozí mléko okolo 4,0-4,6 %, zpravidla má kozí mléko o 0,2-0,5 % méně laktózy než mléko kravské (Park 2017; Rysová 2018). Laktóza je nejjednodušším substrátem, a především hlavním zdrojem energie pro mikroorganismy, které ji procesem homofermentativního nebo heterofermentativního kvašení rozkládají na jednodušší látky (Šnirc & Golian et al. 2016). Podrobněji je proces mléčného kvašení rozepsán v pozdější kapitole s názvem „Princip kysání mléka“. V trávicím traktu laktózu štěpí na jednodušší cukry enzym β -galaktosidáza. Tento enzym je syntetizován v mikroklicích tenkého střeva. V případě, že je enzymu syntetizováno málo, popřípadě není syntetizován vůbec, jedná se o tzv. laktózovou intoleranci (Costa et al. 2019). Vzhledem k částečné nebo úplné absenci enzymu není laktóza po požití a přechodu trávicím traktem štěpena na glukózu a galaktózu, zůstává v původním stavu a putuje traktem dál. Voda se z krevního řečiště přesouvá do střevního traktu, aby se vyrovnala osmotická rovnováha, a způsobuje tak průjemy, nadýmání, bolesti žaludku a další travicí potíže. Léčbou bývá snížení nebo úplné vyloučení mléčných výrobků ze stravy, avšak záleží na individuální toleranci laktózy konkrétního jedince. Snížený příjem laktózy nebo její vyloučení, tedy kupříkladu konzumace bezlaktózových výrobků, může částečně řešit problematiku laktózové intolerance, avšak ta je často spojena s dalšími onemocněními, jako je např. syndrom dráždivého tračníku, kde je nutno snížit nejen příjem laktózy, ale i tzv. fermentovatelných oligosacharidů, disacharidů, monosacharidů a polyolů (FODMAPs) pro zlepšení gastrointestinálních potíží (Deng et al. 2015; Costa et al. 2019).

Obsah laktózy je kravském a kozím mléce podobný. Laktóza dodává mléku nasládlou chuť, přispívá k fyzikálním vlastnostem, jako je například osmotický tlak, bod varu nebo mrznutí, dále pozitivně ovlivňuje nutriční hodnotu mléka a mléčných výrobků a je nezbytnou součástí výroby fermentovaných mléčných výrobků. (Navrátilová et al. 2012)

3.2.3.2 Tuky

Lipidová frakce mléka je složena převážně z triacylglycerolů, s menším podílem diacylglycerolů, volných mastných kyselin, fosfolipidů a sterolů. Přítomna jsou taktéž stopová množství vitaminů rozpustných v tucích, β -karotenu a aromatických látek rozpustných v tucích (MacGibbon 2020). V mléce existují lipidy ve formě tukových kuliček (kapének) jejichž velikost se pohybuje okolo 0,1-15 μm a jsou obklopeny speciální membránou, která je složena z dvojvrstvy fosfolipidů a proteinů. Membrána je odborně označována v angličtině Milk Fat Globule Membrane (MFGM), volně přeloženo jako membrána tukových částic mléka (Fox et al. 2015; Štolcová 2020). Nasycené mastné kyseliny představují 70 % všech mastných kyselin v kravském mléce. Co se kvantitativně týče nejvýznamnější nasycené mastné kyseliny, která zahrnuje 30 % všech mastných kyselin v mléce, je palmitová kyselina (C16:0), hned po ní následuje stearová (C18:0) s 11 % a myristová kyselina (C14:0) také s cca 11 % (Štolcová 2020). Mezi další významné mastné kyseliny patří máselná (C4:0), kapronová (C6:0), kaprylová (C8:0) a kaprinová kyselina (C10:0). Obsah kapronové, kaprylové a kaprinové kyseliny je přirozeně vyšší u kozích a ovčích mlék, což způsobuje charakteristické aroma těchto druhů mlék (Ceballos et al. 2009; Siefarth & Buettner 2014; Djordjevic et al. 2019).

Při porovnání tukové složky kozího mléka a mléka kravského, kozí alternativa obsahuje menší tukové kuličky a vyšší množství mastných kyselin s krátkým řetězcem (Almaas et al. 2006). Průměr tukových globulí bývá v kozím mléce okolo 1,5-2 μm ve srovnání s mlékem kravským, kde průměr bývá 2,5-3,5 μm . Celkově je tedy průměrná velikost kuliček v kozím mléce mnohem menší, kolem 65 % tukových kuliček má velikost menší než 3 μm ve srovnání s mlékem kravským (Lad et al. 2017). Menší tukové kuličky vytvářejí lepší disperzi a homogenitu směsi tuku v kozím mléce. Malá velikost kapének usnadňuje přístup lipázám, enzymům štěpícím tuky, které zlepšují následné trávení a tím je z hlediska lidského zdraví dána lepší vstřebatelnost kozího mléka oproti kravskému (Almaas et al. 2006; Slačanac et al. 2010; Park 2017). Snadnější trávení kozího mléka je rovněž dáno vysokým množstvím nasycených mastných kyselin, které jsou v naší stravě často považovány za spíše škodlivé, jelikož některé z nich zvyšují tvorbu cholesterolu v krvi a tím tak i riziko vzniku aterosklerózy, hypertenze, obezity aj., avšak v našem organismu se mohou jednotlivé nasycené mastné kyseliny chovat různě (Markiewicz-Kęszycka et al. 2013). Kyseliny s nízkým počtem uhlíků v molekule (4-10) se výborně vstřebávají střevní stěnou, ale netvoří se z nich tuky jako z vyšších nasycených kyselin. Namísto toho přechází dál do jater, kde se přeměňují na CO_2 a vodu za tvorby značné energie, dvojnásobné, než ze stejného množství cukru (Pokorný 2015). Dalším velice důležitým faktorem lepší stravitelnosti je absence aglutininu, bílkoviny, která je zodpovědná za shlukování kapének tuku v mléce. Díky tomu je kozí mléko přirozeně homogenizované, tedy tuk je rovnoměrně rozptýlen v mléce a kapénky se neshlukují. Stravitelnost kozího mléka a ošetřeného kravského mléka je však podobná. Homogenizace je obvykle zařazeným krokem v technologickém postupu zpracování mléka (Getaneh et al. 2016; Pal et al. 2017).

3.2.3.3 Bílkoviny

Hlavní bílkovinnou složkou mléka je kasein, který u kravského mléka tvoří 80 % celkové mléčné bílkoviny, zbytek tvoří syrovátkové bílkoviny s přibližným obsahem 20 % celkové mléčné bílkoviny (Dalglish & Corredig 2012). Kozí mléko obsahuje kasein v zastoupení 75 % a syrovátkové bílkoviny tvořící 25 % celkové mléčné bílkoviny (St-Gelais et al. 2000). Rozlišujeme 4 hlavní typy kaseinových frakcí: α_{S1} -kasein, α_{S2} -kasein, β -kasein, κ -kasein. Mezi hlavní syrovátkové bílkoviny řadíme α -laktalbumin, β -laktoglobulin, sérový albumin a imunoglobuliny (Dalglish & Corredig 2012; Navrátilová et al. 2012).

Kaseiny se chemicky řadí mezi fosfoproteiny. Jsou schopné vázat vápník, jehož obsah závisí na množství fosfoserinových zbytků v molekule. Na základě toho vytváří kaseiny agregáty známé jako kaseinové micely. Kaseinové micely jsou schopny vázat vysoké množství vody téměř 3 kg vody na 1 kg bílkovin (Dalglish & Corredig 2012). Již od 60. let 20. století je struktura kaseinových micel podrobena důkladnému zkoumání. Bylo navrženo několik variant struktury, z nichž nejznámějším modelem je tzv. submicelární model, který je také jedním z nejčastěji popisovaných. Teorie je založena na faktu, že mikrostruktura kaseinové micely je složena z tzv. submicel. Submicely se vzájemně spojují za pomoci výše zmíněných fosfoserinových zbytků a vápenatých iontů. Nepolární části molekul se soustředí uvnitř submicely, kde probíhají hydrofobní reakce. Polární části jsou naopak na povrchu, kde probíhají hydrofilní reakce. Submicely, které neobsahují κ -kasein, se hromadí uvnitř micely, naopak submicely, které κ -kasein obsahují, bývají na povrchu. A právě κ -kasein na povrchu zajišťuje stabilitu micely, není totiž citlivý na přítomnost vápenatých iontů (Dalglish & Corredig 2012; De Kruif et al. 2012; Navrátilová et al. 2012).

U mléka kravského má nejvyšší procentuální zastoupení α_{S1} -kasein. Kozí mléko má hlavní kaseinovou frakci β -kasein. Obsahuje tedy nižší množství α_{S1} -kaseinu a vyšší množství β -kaseinu oproti mléku kravskému. Nízký obsah α_{S1} -kaseinu udává horší technologické vlastnosti mléka a tím tak i horší zpracovatelnost. To má za následek méně pevnou sýřeninu a konkrétně při výrobě sýra je nízkým obsahem ovlivněna i jeho výsledná výtěžnost. α_{S1} -kasein bývá silným alergenem pro jedince trpící alergií na mléčnou bílkovinu, proto díky jeho nízkému obsahu v kozím mléce může být vhodnou alternativou (Konečná et al. 2014; Lad et al. 2017; Park 2017). Záleží však na stupni alergie, protože ji mohou způsobovat i jiné frakce bílkovin. Neznamená tedy v každém případě, že když kozí mléko nebude obsahovat α_{S1} -kasein, tak je automaticky vhodné pro alergiky na mléčnou bílkovinu (Lisson et al. 2014; Clark & García 2017). U nás v České republice jsou nejčastěji chována dvě plemena koz: bílá krátkosrstá a hnědá krátkosrstá. Obě tato plemena produkují mléko s α_{S1} -kaseinem (Staněk 2009; Mátlová & Sztankóová 2010).

Tabulka č. 2: Procentuální zastoupení látek v různých druzích mléka

Komponenty (%)	Kravné mléko	Kozí mléko
Sušina	12,3	13,2
Tuky	3,4	4,0
Celkový protein	3,2	3,6
Kasein	2,5	2,9
Syrovátkový protein	0,65	0,61
Laktóza	4,6	4,1
Minerální látky	0,7	0,8

Komponenty (mg/100 g)	Kravné mléko	Kozí mléko
Ca	134	122
P	121	119
Mg	16	12
K	181	152
Na	41	58
Cl	150	100
S	28	32
Fe	0,07	0,08
Cu	0,05	0,06
Mn	0,03	0,02
Zn	0,56	0,53

(zdroj: Lad et al. 2017, upraveno autorem)

Tabulka č. 3: Obsah vitaminů kravného a kozího mléka na 100 g

Rozpustné v tucích (mg)	Kravné mléko	Kozí mléko
Retinol	0,04	0,04
Beta-karoten	0,02	0,00
D (µg)	0,08	0,06
Tokoferol	0,11	0,04

Rozpustné ve vodě (mg)	Kravné mléko	Kozí mléko
B1 Thiamin	0,04	0,05
B2 Riboflavin	0,17	0,14
B3 Niacin PP	0,09	0,20
B5 Pantothenová kyselina	0,34	0,31
B6 Pyridoxin	0,04	0,05
B8 Biotin (µg)	2,00	2,00
B9 Listová kyselina (µg)	5,30	1,00
B12 Kobalamin (µg)	0,35	0,06
C Askorbová kyselina	1,00	1,30

(zdroj: Lima et al. 2018, upraveno autorem)

3.2.4 Fyzikálně-chemické vlastnosti mléka

Mléko je komplexní koloidní disperze, jejíž fyzikálně-chemické vlastnosti závisí na vnitřních faktorech (složení, struktura složek a jejich vzájemné působení) a na vnějších faktorech (teplota, ošetření po nadojení) (McCarthy & Singh 2009). Mezi některé fyzikálně-chemické vlastnosti řadíme: kyselost mléka, hustotu, měrnou hmotnost, bod mrznutí a další (Fox et al. 2015).

3.2.4.1 Kyselost mléka

Stanovení pH se využívá v mlékárenském průmyslu především při výrobě sýrů a fermentovaných mléčných výrobků. Rozlišujeme dva typy kyselosti: aktivní a titrační kyselost. U čerstvého mléka má technologický význam měření titrační kyselosti spíše než měření pH jako ukazatel jakosti. Mléko má tzv. pufrací systém, pomocí kterého dokáže do jisté míry vyrovnávat změny pH. Součástí tohoto systému jsou např. fosfáty, citráty, uhličitany, kalcium-fosfát, proteiny a další (McCarthy & Singh 2009). Aktivní kyselost je dána hodnotou pH, která se při 25 °C pohybuje v rozmezí 6,5-6,7, s průměrnou hodnotou 6,6. Titrační kyselost se udává ve °SH a hodnota se pohybuje mezi 6,2-7,8 °SH. Titrační kyselost je indikátorem kvality čerstvého mléka a je také vhodnou kontrolou technologického postupu při výrobě fermentovaných mléčných výrobků (McCarthy & Singh 2009; Fox et al. 2015).

3.2.4.2 Hustota, měrná hmotnost

Hustota je definována jako hmotnost na jednotku objemu. Udává se v jednotkách $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ nebo v $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$. Měrná hmotnost je následně definována jako hmotnost objemové jednotky mléka dělená hmotností objemové jednotky vody, jednoduše hustota mléka dělena hustotou vody. Hodnota hustoty se pohybuje nejčastěji v rozmezí 1,027-1,033 $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$, měrná hmotnost činí 0,930-0,933 $\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ při teplotě 20 °C (McCarthy & Singh 2009). Hustota mléka je dána hustotou tří hlavních složek a tj. vody, tukuprosté sušiny a tuku. S jakoukoliv změnou jedné ze tří složek se hustota mléka mění. Největší vliv na hustotu má obsah tuku a podíl tuku v kapalném stavu, kdy je hustota nižší, a v tuhém stavu, kdy je hustota vyšší. Poměr kapalného vůči tuhému tuku závisí na teplotě. S rostoucí teplotou hustota mléka klesá (Snášelová et al. 2009).

3.2.4.3 Bod mrznutí

Bod mrznutí mléka je důležitým ukazatelem kvality mléka. Pomáhá při prokázání falšování mléka vodou a ke stanovení množství vody v něm (Zagorska & Ciprova 2013). Bod mrznutí je nižší oproti bodu mrznutí vody. Jeho hodnota je stanovena v rozmezí -0,512 až -0,550 °C (McCarthy & Singh 2009). Bod mrznutí je úměrný koncentraci ve vodě rozpustných složek mléka, tudíž jeho chemické složení a vlastnosti, tepelné zpracování či přítomnost jakékoliv látky mohou ovlivnit bod mrznutí produktu (McCarthy & Singh 2009; Zagorska & Ciprova 2013; Fox et al. 2015).

3.2.5 Hodnocení minoritních složek mléka

3.2.5.1 Močovina

Močovina je konečným metabolitem bílkovin v organismu a její hodnota je jedním z důležitých ukazatelů vyrovnanosti sestavené krmné dávky (Hanuš et al. 2011). Řadí se mezi nebílkovinné dusíkaté látky, které v mléku zahrnují přibližně 5-7 % celkového dusíku (Navrátilová et al. 2012). Koncentrace močoviny je uváděna v mg na 100 g mléka (Munyaneza et al. 2017). Fyziologické množství močoviny je uváděno od 18 do 35 mg na 100 ml mléka (Hanuš et al. 2011). Nadbytek dusíkatých látek v krmné dávce způsobují vyšší tvorbu amoniaku, který nestačí bachorová mikrobiota zpracovat. Přebytečný amoniak přechází stěnou bachoru do krve a v játrech je detoxikován na močovinu (Munyaneza et al. 2017). Močovina je kromě jater zpracovávána také v ledvinách, kam je transportována a následně vylučována močí. Močovina je transportována z krve také do mléka. (Hanuš et al. 2011).

3.2.5.2 Volné mastné kyseliny

Důležitým ukazatelem kvality při zpeněžování mléka je koncentrace volných mastných kyselin v mléčném tuku. Zvýšená koncentrace způsobuje horší technologické vlastnosti mléka a jeho vlastnosti senzoričné (chuť a aroma; Hanuš 2014). Obsah volných mastných kyselin je podmíněn lipolýzou mléčného tuku kontaminujícími lipázami nebo nativně vyskytujícími se lipázami v mléce. Faktorem urychlující rozklad tuku je jeho struktura, především kvalita tukových kapének. Defektní kapénky vznikají mechanickým zatížením mléka, nevhodným skladováním mléka nebo jeho špatným transportem (Hanuš 2014; Kautská et al. 2018). Mezi biologické faktory ovlivňující lipolýzu mléčného tuku je řazena např. produkční zátěž dojníc, který způsobuje energetický deficit zvířete a tím tak odbourávání tělesného tuku, dále četnější dojení a záněty mléčné žlázy (Kautská et al. 2018).

Hodnoty obsahu volných mastných kyselin v mléce se pohybují okolo 0,1-0,4 % mléčného tuku. Vyjádření hodnoty obsahu volných mastných kyselin je v mmol na 100 g mléčného tuku (Kautská et al. 2018).

Kozí mléko, jak již bylo v kapitole „Tuky“ zmíněno, se vyznačuje menším průměrem tukových kuliček, než je tomu u mléka kravského. Tuk kozího mléka se sice rychleji a snadněji tráví, ale je také mnohem náchylnější k lipolýze. Nejen velikost, ale i struktura tuku kozího mléka ovlivňuje výslednou rychlost a úroveň lipolýzy, která je vzhledem k vysokému množství mastných kyselin s krátkým a středně dlouhým řetězcem výraznější než u kyselin s řetězcem dlouhým (Strzałkowska et al. 2010).

3.2.5.3 Citronová kyselina

Obecně je složení mléka citlivé na množství a kvalitu krmné dávky a na zdravotní stav dojníc. V mléce jsou stanovovány parametry k hodnocení metabolismu dojníc, a právě jedním z nich je hodnota kyseliny citronové. Její fyziologická hodnota se pohybuje v rozmezí koncentrací 8,0-10,0 mmol.l⁻¹ při fotometrickém stanovení. Citronová kyselina je součástí pufrčního systému, který byl již zmiňován v podkapitole „Kyselost mléka“ (Navrátilová et al. 2012), a souvisí s efektivitou citrátového cyklu (Hanuš et al. 2011).

Nižší hodnoty, než je fyziologické rozmezí, indikují energetický nadbytek metabolismu krav a vyšší naopak přebytek. Hodnoty citronové kyseliny mohou sloužit v poradenském servisu ke zlepšení výživy dojníc, jejich reprodukce či zpracování mléka. Proto mléčné laboratoře zavádějí určení citronové kyseliny (Hanuš et al. 2011). Některé druhy streptokoků mléčného kvašení a *Leuconostoc cremoris* mohou fermentovat citronovou kyselinu za vzniku řady aromatických látek, mezi které patří například acetaldehyd, diacetyl, octová nebo mléčná kyselina a CO₂. Pro výrobu jogurtů je charakteristickou sensorickou látkou acetaldehyd v rozmezí koncentrací 13-16 µg.kg⁻¹. Ve fermentovaných mléčných výrobcích ovlivňuje obsah citronové kyseliny obsah diacetylu. Pro sensorickou jakost fermentovaných mléčných výrobků je důležité dodržovat poměr diacetyl/acetaldehyd, který by se měl pohybovat okolo 4. Hodnota 3 a méně souvisí se sensorickými vadami. (Janštová et al. 2012).

3.2.6 Jakost syrového mléka pro výrobu jogurtů

Pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků musí mléko vytvořit vhodné podmínky pro růst bakterií mléčného kvašení. Musí být splněny požadavky na jakost syrového mléka podle platné legislativy. Vysoká hodnota CPM a vysoký počet psychrotrofních organismů působí negativně na kysací schopnost mléka. Psychrotrofní organismy způsobují vady u finálních výrobků za pomoci termorezistentních enzymů (lipáz, proteáz) a taktéž produkují metabolity (mastné kyseliny), jež inhibují růst bakterií mléčného kvašení. Rovněž produkují enzym diacetylreduktázu, která snižuje hladinu diacetylu ve fermentovaných mléčných výrobcích. Pozornost je třeba mít nejen na hodnotu CPM, ale i RIL, která působí bakteriostaticky nebo baktericidně na růst bakterií mléčného kvašení a tím výrazně zabraňuje výrobě fermentovaných mléčných výrobků. Nežádoucí je samozřejmě také vysoká hodnota PSB. Z dalších významných složek mléka je laktóza, která je základním substrátem pro bakterie mléčného kvašení, a citronová kyselina, která koriguje obsah diacetylu ve fermentovaných mléčných výrobcích (Navrátilová 2002; Janštová et al. 2012; Navrátilová et al. 2012; Bursová 2019).

3.3 Základní charakteristika fermentovaných mléčných výrobků

Fermentované potraviny konzumují lidé již tisíce let. Ještě před mnoha staletími, kdy téměř neexistovala věda o výživě, byly fermentované potraviny vyráběny především jako stabilní zdroj vitaminů, minerálních látek a dalších nepostradatelných živin. Zajímavostí je, že objev procesu fermentace a jeho vlivu na konzervaci potravin, zlepšení kvality a funkčnosti potravin se odehrál nezávisle na každém kontinentě téměř současně v historii lidstva. Na Blízkém východě, v Asii a na Dálném východě byly nalezeny důkazy o výrobě vína v období neolitu, později bylo vinařství rozšířeno do středomořských oblastí Evropy. Podobný původ byl zjištěn u piva, chlebu a fermentované zeleniny (Tamang et al. 2020).

Základní biotechnologickou úpravou pro vznik fermentovaných výrobků je proces fermentace. Tento druh úpravy se nevyužívá pouze u mléčných výrobků - jogurtů, tvarohů, při zrání sýrů, ale lze ji použít i pro výrobu fermentované zeleniny, octa, alkoholických nápojů, droždí, dále fermentovaných uzenin, organických kyselin a dalších.

Pokud je fermentace žádoucím procesem, cílem bývá získání určitých sensorických vlastností výsledné potraviny (aromatické a chuťové změny, změny konzistence, tvorba plynů

při kynutí apod.), dále zvýšení nutriční hodnoty potravin (tvorba vitaminů nebo zvýšení stravitelnosti) a v neposlední řadě se může jednat i o záměr prodloužení trvanlivosti daného produktu, kdy se sníží pH a vznikají látky, které následně působí jako konzervační prostředky. Fermentace může být však i nežádoucím procesem, kdy dochází k tzv. mikrobiálnímu kažení, které způsobuje např. fermentaci vína na ocet. Dalším nežádoucím jevem může být máselné kvašení je spojené s významnými druhy *Clostridium butyricum* a *Clostridium tyrobutyricum*, jež způsobují vznik máselné kyseliny, octové kyseliny a plynů CO₂ a H₂, které způsobují duření sýrů a tím tak mění senzorické vlastnosti, tedy hlavně chuť a vůni výrobků (Navrátilová et al. 2012; Widyastuti & Febrisiantosa 2014; Gemechu 2015).

Kravské, kozí a ovčí mléko jsou celosvětově nejrozšířenější surovinou používanou k výrobě ekonomicky hodnotných fermentovaných mléčných výrobků (FMV; Widyastuti & Febrisiantosa 2014).

Dle vyhlášky č. 274/2019 Sb., kterou se mění vyhláška č. 397/2016 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy, tuky a oleje, se kysaným nebo zakysaným mléčným výrobkem rozumí mléčný výrobek získaný kysáním mléka, smetany, podmáslí, syrovátky nebo jejich směsi za použití mikroorganismů uvedených v příloze č. 1 k vyhlášce č. 397/2016 Sb, tepelně neošetřený po kysacím procesu. V příloze č. 1 je uvedena tabulka popisující mikrobiologické požadavky na jednotlivé mléčné výrobky a na druhy živých mikroorganismů mléčného kysání v kysaných mléčných výrobcích. V tabulce č. 4 jsou shrnuty mikrobiologické požadavky na několik vybraných výrobků.

Tabulka č. 4: Mikrobiologické požadavky na mléčné výrobky a druhy živých mikroorganismů v kysaných mléčných výrobcích

Výrobek	Mikroorganismy	Počet mikroorganismů na 1 g výrobku
Kysané či zakysané mléčné výrobky a dále neuvedené kysané mléko, smetanový zákys, zakysané podmáslí, zakysaná smetana, kysané mléčné nápoje	Monokultury nebo směsné kultury bakterií mléčného kysání	10 ⁶
Jogurty včetně jogurtového mléka	Symbiotická směs <i>Streptococcus thermophilus</i> a <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	10 ⁷
Kysaný mléčný výrobek s bifidokulturou	<i>Bifidobacterium</i> sp. v kombinaci s mezofilními a termofilními bakteriemi mléčného kysání	10 ⁶ bifidobakterie

(zdroj: Ministerstvo zemědělství 2016, Ministerstvo zemědělství 2019; upraveno autorem)

3.3.1 Bakterie mléčného kvašení

Při procesu kysání (sražení) dochází k přeměně struktury mléka ze stavu roztoku do podoby gelu, jinak řečené sraženiny (Navrátilová et al. 2012). Hlavní funkci mléčného kvašení přebírají tzv. bakterie mléčného kvašení (BMK). BMK jsou v přírodě široce rozšířené a pro člověka mají nepostradatelnou funkci v trávicím traktu (Ibrahim et al. 2021). Podle vzniklých produktů se rozlišují BMK na homofermentativní druhy, které způsobují fermentaci sacharidů nejméně z 90 % na mléčnou kyselinu a dále na druhy heterofermentativní, které při fermentaci mění laktosu na mléčnou kyselinu minimálně z 50 % a další látky jako jsou např. octová kyselina, CO₂, ethanol, acetaldehyd aj. Některé druhy BMK jsou využívány jako významné startovací kultury pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků (Janštová et al. 2012; Navrátilová et al. 2012).

Mezi BMK homofermentativního kvašení patří rody *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* a některé druhy rodu *Lactobacillus*. Mezi heterofermentativní druhy mikroorganismů patří např. *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* a některé druhy rodu *Lactobacillus* (Šnirc et al. 2016). Velice důležité jsou v mléčném průmyslu i bifidobakterie, které se však mezi BMK neřadí. Výše zmíněné druhy BMK se charakterizují jako skupina fakultativně anaerobních, gram pozitivních, nepohyblivých, nesporulujících koků nebo tyčinek, které při fermentaci laktosy produkují mléčnou kyselinu jako hlavní konečný produkt spolu s dalšími produkty (Gemechu 2015).

3.3.1.1 Jogurtová a bifidogenní kultura

Při výrobě FMV jsou využívány mezofilní a termofilní bakteriální kultury. Pro výrobu jogurtů je využívána jogurtová kultura, která se řadí do skupiny termofilních, mezi které dále patří kultury acidofilní, bifidogenní a pediokoková. Tyto druhy mají optimální teplotu pro růst a rozmnožování v rozpětí 35-45 °C (Šnirc et al. 2016).

Jogurtová kultura je tvořena bakteriálními druhy *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Poměr mezi streptokoky a laktobacily bývá 1:1. Streptokoky rozkládají laktózu homofermentativně za vzniku L (+) mléčné kyseliny (její produkce bývá okolo 0,6-0,8 %). Společně s ní vzniká ve stopovém množství mravenčí kyselina, CO₂, acetaldehyd, aceton, acetoin, diacetyl. Laktobacily rozkládají laktózu taktéž homofermentativně, avšak za vzniku D (-) mléčné kyseliny, jejíž produkce bývá okolo 1,7-1,8 %. Mimo to se vytváří spolu s mléčnou kyselinou ještě další karbonylové sloučeniny jako například acetaldehyd, aceton, diacetyl, acetoin. Za typické jogurtové aroma je zodpovědný především acetaldehyd. Pro kultivaci jogurtové kultury je nejvhodnější teplota okolo 42-45 °C, inokulum 1-2 % obj. a doba kultivace 3-3,5 hodin.

Po fermentaci by se měla vytvořit hustá homogenní sraženina, která má titrační hodnotu 50-60 °SH (Mahdalová & Janštová 2016; Šnirc et al. 2016). Laktobacily a streptokoky žijí ve společné symbióze. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* uvolňuje z mléčných bílkovin aminokyseliny (valin, glycin, histidin aj), které stimulují růst *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Tento druh okyseluje dané prostředí, produkuje amoniak a CO₂, čímž vytváří podmínky pro růst laktobacilů. K tomu všemu produkuje i mravenčí kyselinu, která růst laktobacilů stimuluje. Výsledkem symbiózy je výrobek se specifickými sensorickými

vlastnostmi, které se odlišují od ostatní FMV (Walstra et al. 2005; Janštová 2012; Šnirc et al 2016).

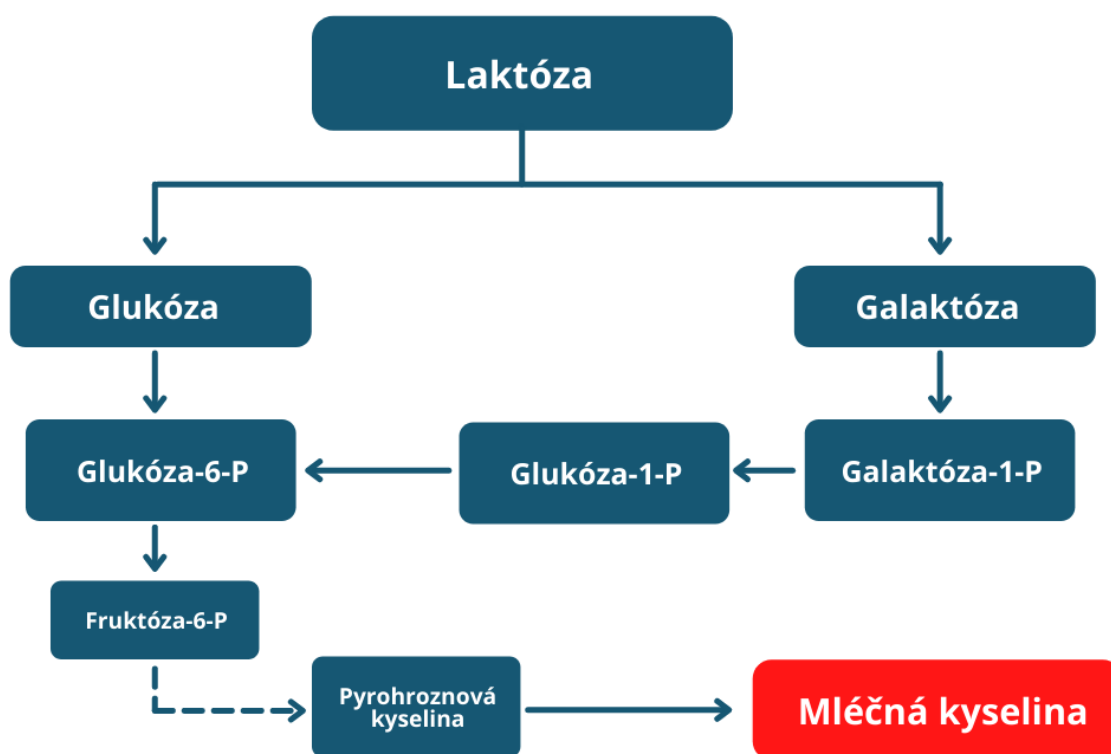
Bifidogenní bakterie jsou častým fortifikačním přídatkem FMV. Svoji metabolickou aktivitou zajišťují dieteticko-léčebné a probiotické účinky. Mají pozitivní vliv na střevní bakteriální populaci nárůstem prospěšných bakterií a zároveň potenciálním snížením patogenních bakterií, jakými mohou být například enterokoky. Probiotika hrají hlavní roli při udržování rovnováhy a stability střevní mikrobioty, která obecně napomáhá ke správnému fungování gastrointestinálního traktu (Ashraf & Shah 2011; Savard et al. 2011). Svůj pozitivní vliv umocňují i tím, že jsou bifidobakterie samy izolovány z trávicího traktu (Ashraf & Shah 2011). Mezi další pozitivní účinky řadíme zmírnění poruch zažívání, inaktivace bakteriálních toxinů, lepší trávení laktózy a resorpce vápníku, snížení rizika rakoviny střev a má taktéž pozitivní vliv na hladinu cholesterolu v krvi (Mahdalová & Janštová 2016). Nejčastěji používanými druhy jsou *Bifidobacterium bifidum*, dále *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve* a *Bifidobacterium infantum*. Bifidobakterie jsou velice náročné na růstové podmínky. Pro svůj růst potřebují např. volné aminokyseliny a peptidy, proto je pro ně nejlepší prostředí společně s proteolytickými bakteriemi mléčného kvašení (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus casei*). Zároveň je vhodné přidat prebiotika jako růstový faktor, kde se nejvíce vyhovujícími ukázaly fruktooligosacharidy. Doporučuje se snižovat obsah kyslíku ve fermentovaném mléku za pomoci deaerace, jelikož se jedná o anaerobní bakterie. Koagulát po fermentaci by měl dosahovat titrační kyselosti v rozmezí 35-55 °SH podle použité bifidogenní kultury (Mahdalová & Janštová 2016; Šnirc et al. 2016). Probiotické účinky na zdraví člověka jsou podrobněji popsány v kapitole „Probiotické účinky“.

3.3.1.2 Homofermentativní rozklad laktózy

Hlavním zdrojem energie v mléku je pro mikroorganismy laktóza. Nejčastějším katabolickým rozkladem laktózy je homofermentativní mléčné kvašení, které probíhá po hydrolyze laktózy na glukózu a galaktózu. Podrobný popis je vidět na obrázku č. 1. Glukóza je fermentovaná přímo na mléčnou kyselinu. Galaktóza se mění až po své enzymatické přeměně na glukózu. Následně pak v závislosti na účinku dehydrogenáz a racemáz vznikají různé optické izomery mléčné kyseliny (Šnirc et al. 2016)

Díky produkci mléčné kyseliny dochází k žádoucímu snižování pH. Tato kyselina způsobuje srážení kaseinu při jeho izoelektrickém bodě pH 4,6. Izoelektrický bod je hodnota pH roztoku, při kterém je vyrovnán počet kladných a záporných nábojů, amfoterní látka má nulový celkový náboj – tedy nulovou pohyblivost v elektrickém poli (Šnirc et al. 2016; Troch et al. 2017). Z koloidního komplexu kaseinátu vápenatého vzniká sražený kasein. Z komplexu se následně uvolňuje mléčnan a fosforečnan vápenatý. Při homofermentativním kvašení vzniká celistvá sraženina kaseinu. Mimo vysrážení může být kasein v některých fermentovaných mléčných výrobcích i částečně hydrolyzovaný. Slabá proteolytická aktivita je zajišťována ve výrobcích, ve kterých jsou aktivní bakterie rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Typickým příkladem je právě proteolytické působení jogurtových kultur (Fox et al. 2017; Troch et al. 2017; Šnirc et al. 2016).

Syrovátkové bílkoviny jsou obecně pro výrobu jogurtů velice důležité. Zvýšením teploty na 85-90 °C 3-5 minut se syrovátkové bílkoviny zdenaturují (z 80-85 %) a následně se ochotně naváží přes disulfidické můstky na κ -kasein, se kterým společně vytváří jemnou, měkkou, gelovitou konzistenci. Vysoká pasteurace je tak nezbytným krokem k vytvoření pevného koagulátu jogurtu. (Fox et al. 2017; Troch et al. 2017).



Obrázek č. 1: Homofermentativní rozklad laktózy
(zdroj: Šnirc et al. 2016, upraveno autorem)

3.4 Základní charakteristika jogurtů

Jogurt je dle vyhlášky č. 274/2019 Sb., kterou se mění vyhláška č. 397/2016 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy, tuky a oleje, definován jako kysaný mléčný výrobek získaný kysáním mléka, smetany, podmásli nebo jejich směsi pomocí mikroorganismů uvedených v upravené tabulce č. 4, u kterého lze zvýšit obsah sušiny pouze přidáním mléčné bílkoviny, sušeného nebo zahuštěného mléka nebo odebráním syrovátky, tepelně neošetřený po kysacím procesu. Označení „bílý jogurt“ může mít pouze produkt, který neobsahuje žádnou přidanou ochucující složku.

Jogurt, jako kysaný mléčný výrobek, vznikl již v období 10 000 př. n. l. a po tisíce let si udržel dostatečnou popularitu na to, abychom ho i dnes konzumovali jako běžnou součást našich jídelníků. Jogurt je jednou z nejuniverzálnějších potravin, která se dá použít nejen jako přísada do jídel, ale i jako samostatné jídlo. V období neolitu byl jogurt jednou z transformačních potravin. I přestože složitý proces fermentace nebyl v tehdejší době dostatečně probádán, zjistilo se, že se po konzumaci jogurtu cítí lidé lépe a plní sil. Proto je jogurt zmiňován a uctíván ve starověkých spisech téměř všech světových náboženství (Hersh 2021). Největší rozvoj FMV byl v lokalitách, kde převládalo pastevectví a chov zvířat a byla tak častá dostupnost mléka od krav, koz, ovcí a dalších zvířat. Mléko, sýry a FMV se tak vyvinuly na celém Blízkém východě, v Evropě a Indii (Tamang et al. 2020).

Jogurty jsou celosvětově nejoblíbenějším FMV. Tradičně se vyrábí jogurty z kravského mléka. V průběhu let se však začalo využívat mléko i jiných zdrojů, obzvláště kozí mléko je díky svému chemickému složení nejen doslova vhodné pro výrobu jogurtů, ale zároveň poskytuje řadu pozitivních zdravotních účinků. Kozí jogurty mají díky výrazné poptávce čím dál větší sílu na trhu (Jia et al. 2016; De Santis et al. 2019). Kromě kravského a kozího mléka se můžou využívat jako zdroje čerstvého mléka ovce nebo velbloud (Ibrahim et al. 2021). Průměrná spotřeba jogurtů v ČR činila v roce 2019 okolo 10,2 kg na osobu a rok a k tomu 5 kg ostatních zakysaných výrobků (Akademie kvality 2020).

3.4.1 Rozdíly mezi kravskými a kozími jogurty

Jednou z výborných alternativ, která nabývá stále větší oblíbenosti mezi konzumenty, je kozí mléko a výrobky z něj ať už FMV nebo sýry (Lad et al. 2017). Ve srovnání s mlékem kravským je technologická výroba kozích jogurtů s optimální konzistencí, vůní a chutí obtížná. Hlavním důvodem méně pevné struktury koagulátu kozích jogurtů je nižší procento nebo celková absence α_{S1} -kaseinu, který je u kravského mléka důležitým faktorem pevnosti a tuhosti gelu. Přidávky probiotických mikroorganismů za účelem prospěchu na lidské zdraví by taktéž mohly mít mírný pozitivní vliv na konzistenci výsledného produktu (Costa et al. 2015). V literatuře nejsou jejich účinky na texturu příliš popsány, je potřeba více podrobnějších výzkumů zaměřené na tuto tematiku. Některé kmeny jako například *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tuto schopnost mají (Shihata & Shah 2002; Costa et al. 2015).

Kozí mléko co do složení obsahuje kaseinové micely, které vykazují vyšší množství vápníku a anorganického fosforu, jsou méně solvatované, méně tepelně stabilní a ztrácejí β -kasein snadněji než micely kravského mléka (Park et al. 2007). Ve studii Costa et al. 2015 zjišťovali technologické parametry kozích jogurtů a zároveň se jejich sensoriku snažili zlepšit za pomoci přídatku kakovníku velkokvětého (tzv. cupuassu). Viskozita všech kozích jogurtů zůstala po dobu 7 dnů konstantní, následně se snížila. Toto snížení mohlo být způsobeno postupnou separací syrovátky s prodlužující se dobou skladování. Přirozené kolísání obsahu kaseinu v mléce může mít výrazný účinek na výslednou pevnost jogurtu. Odpařením, přidáním sušeného odstředěného mléka nebo částečnou ultrafiltrací je možno zvýšit pevnost koagulátu. Tepelnou úpravou mléka lze výrazně zvýšit pevnost gelu (Walstra et al. 2005).

Texturu kozích jogurtů se snažili podrobně popsat a vylepšit ve studii Wang et al. 2012. Jedním z přídatků byl stabilizátor pektin. Pektin se často přidává do jogurtů pro zlepšení konzistence, zvýšení viskozity a snížení synereze. I přesto, že řada stabilizátorů dokáže zlepšit

výslednou viskozitu, textura se často vůbec nezlepší. Texturní vady v jogurtu zahrnují slabé tělo, separaci syrovátky a gumovitost. Kombinací polymerizovaného syrovátkového proteinu (0,4 %) a pektinu (0,3 %) bylo dosaženo optimální viskozity i vhodné textury, koagulát byl pevný a synereze byla minimální.

Ve studii Machado et al. 2017 byl analyzován vliv přídavku medu na technologické, fyzikálně-chemické a sensorické vlastnosti kozích jogurtů obsahující probiotické mikroorganismy rodu *Lactobacillus acidophilus*. Výsledky prokázaly pozitivní vliv na barvu, synerezi, viskozitu a sensorické vlastnosti jogurtů. Přídavek medu dokonce zvýšil množství bakterií *Lactobacillus acidophilus* a jogurtových startovacích bakterií.

Studie Ranadheera et al. 2012 zahrnovala výzkum zabývající se životaschopností bakteriálních kultur *Lactobacillus acidophilus* (LA-5), *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (BB-12) a *Propionibacterium jensenii* (702) a možným zlepšením sensorické přijatelnosti charakteristiky aromatických kozích jogurtů za pomoci přídavku ovocné složky. Výzkum prokázal, že ačkoliv se zdál přídavek ovocné složky pozitivní na růst bakterií *Lactobacillus acidophilus*, výsledky vyšly neuspokojivě pro všechny zkoumané jogurty. Vzhledem k tomu, že jako startovací kultury byly použity *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, jež produkují peroxid vodíku, mohly mít výrazně negativní vliv na přidanou probiotickou kulturu. Synereze jogurtů byla zjištěna výrazně nižší v čistých neochucených jogurtech, na rozdíl od jogurtů s přídavkem ochucující složky. Za narušení struktury koagulátu mohlo být zodpovědné i míchání s ochucující složkou. Sensoricky (chuť, aroma) byly všechny jogurty s ovocnou složkou hodnoceny lépe než jogurty čisté.

3.4.2 Technologie výroby jogurtů

Výroba jogurtu začíná správným výběrem surovin a přesným složením, aby se dosáhlo požadované a konzistentní kvality koagulátu, který bude odpovídat konkrétnímu druhu vyráběného jogurtu. Všechny mléčné suroviny by měly být zvoleny tak, aby měly správnou mikrobiologickou kvalitu pro zajištění nejlepšího chuťového potenciálu výsledného výrobku (Chandan 2017).

Vůbec základním a prvním krokem pro výrobu jogurtů je výběr mléka, které je do mlékárny přivezeno. Při přejímce mléka se kontroluje jeho teplota a je odebírán cisternový vzorek mléka, který musí vykazovat záporné hodnoty při kontrole RIL a je podroben dalším laboratorním krokům pro samotné přijetí mléka. Po přijetí musí být mléko rychle zchlazeno na teplotu max 6 °C (Janštová et al. 2012).

Následně je pro vhodné zpracování mléka nutné jeho základní ošetření. To se skládá z odstředění a tepelného ošetření s následným zchlazením. Vše probíhá v tzv. pasterační stanici, kde podle dalšího cíle zpracování mléka probíhá např. standardizace obsahu tuku v mléce, deaerace, homogenizace mléčného tuku a další (Varnam & Sutherland 2001).

Odstředování mléka probíhá na odstředivkách, kde na bázi rozdílu měrné hmotnosti rozdělujeme za pomoci odstředivé síly smetanu (tuk) a odstředěné mléko. Společně s těmito částmi odchází i nečistoty, mikroorganismy a buněčné částice, jež jsou hnací silou vytlačeny ke stěně bubnu, kde odcházejí ve formě kalu (Dhungana et al. 2017). Odstředěné mléko (těžší složka) se při otáčení soustřeďuje blízko stěny bubnu a naopak smetana (lehčí složka) je vytlačována do středu bubnu k ose otáčení. Vhodná teplota pro tento proces je 40-50 °C

(Janštová et al. 2012). U FMV mohou být používány i různé druhy stabilizátorů. Mezi ně řadíme např. rostlinné stabilizátory (pektiny, arabská guma, agar, algináty, karagenany, škrob, atd), biosyntetické stabilizátory (xantanová guma) a modifikované stabilizátory (modifikované škroby, maltodextriny, modifikovaná celulóza). Stabilizátory zabraňují uvolňování syrovátky v průběhu skladování výrobků a zároveň vytvářejí a stabilizují texturu finálního výrobku (Šnirc et al. 2016). Na obrázku č. 2 je shrnutý postup technologie výroby jogurtu od výběru mléka po přidávek kultur a zchlazení na teplotu vhodnou pro použité druhy mikroorganismů.

Homogenizace mléka pro výrobu FMV zajišťuje rovnoměrné rozdělení tukové složky a tím zlepšuje pevnost koagulátu, zvyšuje viskozitu, zlepšuje chuť a stravitelnost tuku. Homogenizace může být zařazena buď před, a nebo po tepelném ošetření. Umístění před eliminuje riziko kontaminace, na druhou stranu může vést ke sloučení tukových kuliček do celků (Varnam & Sutherland 2001; Massoud et al. 2016).

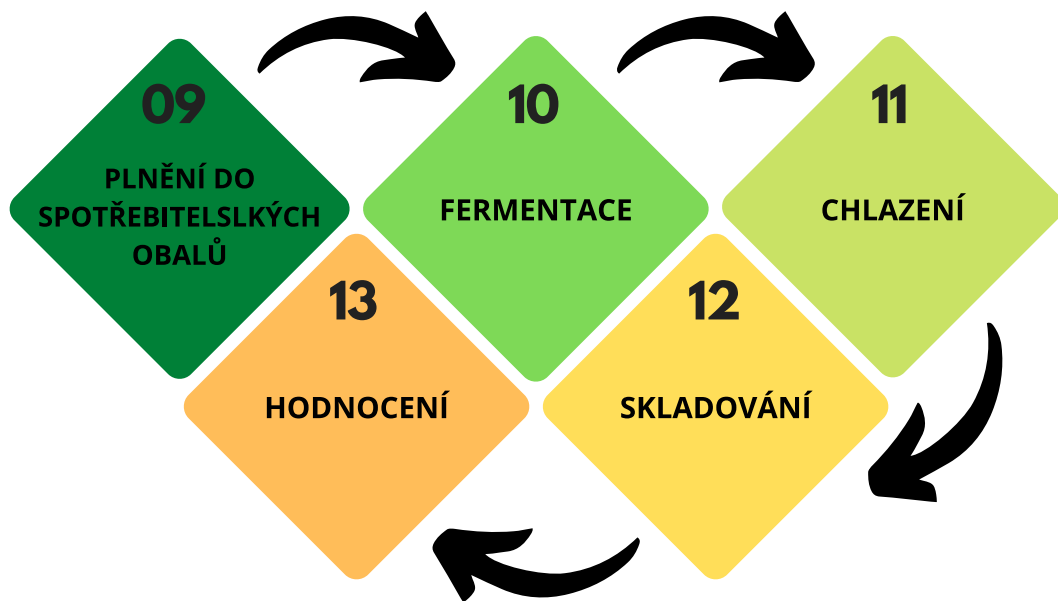
Tepelné ošetření (pasterace) je definována jako proces aplikovaný při výrobě mléka s cílem minimalizovat možná zdravotní rizika způsobené patogenními mikroorganismy s minimálními chemickými, fyzikálními a organoleptickými změnami mléka (Varnam & Sutherland 2001; Motarjemi et al. 2014). Pasterace patří mezi technologické kroky, které u výroby jogurtů významně ovlivňují snižování synereze (vyloučení kapaliny z gelu). Teplota vhodná pro ošetření jogurtů záleží na množství sušiny, na stupni denaturace syrovátkových bílkovin (β -laktoglobulin, α -laktalbumin) a na obsahu tuku. Část denaturovaných syrovátkových bílkovin se váže na kasein a vytvořený komplex eliminuje výše zmíněnou synerezi. Pro výrobky se sušinou do 12 % se doporučuje záhřev na 95 °C po dobu 5 minut, kde denaturace syrovátkových bílkovin dosáhne 80-85 %. Pro výrobky se sušinou více než 14 % je vhodný záhřev na 90 °C po dobu 1-3 minut, kde se denaturuje přibližně 70-75 % syrovátkových bílkovin. Tepelné ošetření vysokou pasterací (85 °C, 3-4 s) se nedoporučuje vzhledem k nízkému stupni denaturace. Tuk zde hraje roli takovou, že s jeho rostoucím obsahem, stejně tak se zvyšující se sušinou mléka, je potřeba úměrně zvyšovat intenzitu tepelného záhřevu (Varnam & Sutherland 2001; Martin et al. 2012; Šnirc et al. 2016).

Na obrázku č. 2 je shrnutý postup technologie výroby jogurtu od výběru mléka po přidávek kultur a zchlazení na teplotu vhodnou pro použité druhy mikroorganismů.

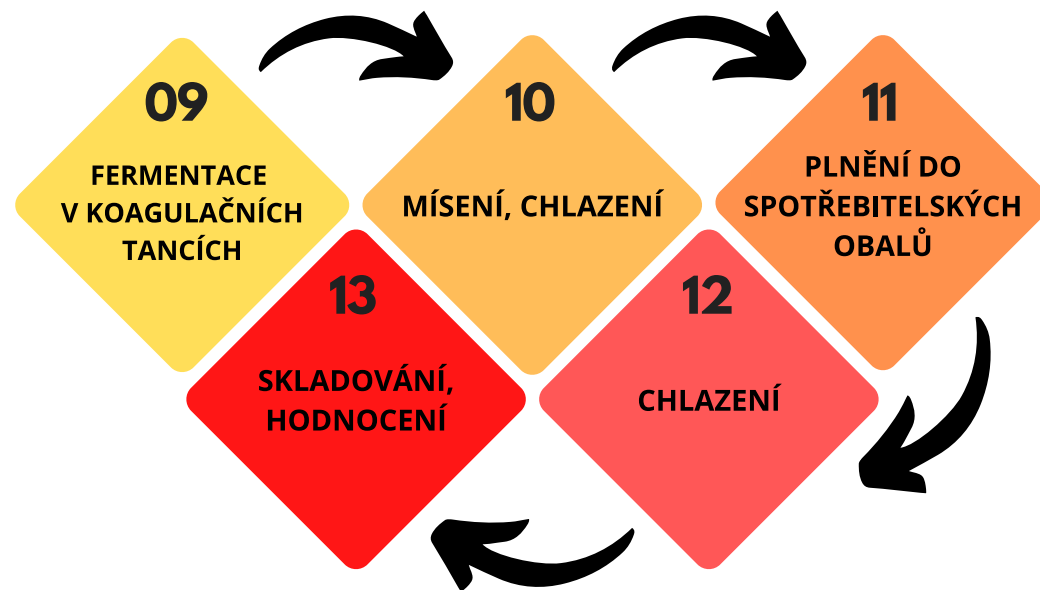


Obrázek č. 2: Úvodní kroky zpracování mléka pro výrobu FMV
(zdroj: Šnirc et al. 2016, upraveno autorem)

Po tepelném záhřevu následuje zchlazení na fermentační teplotu 42-45 °C vhodnou pro termofilní jogurtovou kulturu po dobu kultivace 3-3,5 hodin. Teplota se může lišit i podle použití různých metod fermentace mléka tzv. termostatovou metodou nebo tankovou metodou. U termostatové metody se používá teplota 42-45 °C nejméně 4 hodiny. U metody tankové bývá teplota nižší okolo 35-37 °C po dobu 7-8 hodin. Do mléka se přidává čistá mlékárenská kultura, kterou je potřeba dobře rozptýlit v celém objemu mléka, jinak hrozí nepravidelné srážení a vznik hrudkovité konzistence výrobku (Šnirc et al. 2016). Na obrázcích č. 3 a č. 4 pokračuje technologický proces termostatové a tankové metody výroby jogurtů.



Obrázek č. 3: Termostatová metoda
(zdroj: Šnirc et al. 2016, upraveno autorem)



Obrázek č. 4: Tanková metoda
(zdroj: Šnirc et al. 2016, upraveno autorem)

V případě termostátové metody se mléko s naočkovanou kulturou dávkuje do spotřebitelského obalu, ve kterém následně fermentuje a vzniká tím jogurt s pevnou, tuhou konzistencí (SET TYPE). Koagulát je nerozmíchaný a jeho pevnost můžeme otestovat formou stojící lžičky v koagulátu (Robinson et al. 2006; Glibowski & Rybak 2016; Wang et al. 2020). V případě ochucených výrobků se nejdříve dávkuje ochucující složka, která je zalita naočkovanou směsí mléka. Po uzavření obalu se nechává směs fermentovat ve speciálních zracích tunelech nebo místnostech, kde jsou optimální podmínky pro použitou kulturu. Při dosažení kyselosti pH 5,3-5,4 se brzdí metabolická aktivita zchlazením pod teplotu 10 °C. Výrobky jsou přesunuty do chladících komor (Robinson et al. 2006; Glibowski & Rybak 2016; Šnirc et al. 2016; Wang et al. 2020).

Tanková metoda je využívána při výrobě jogurtů s krémovou konzistencí (STIRRED TYPE) nebo jogurtového mléka (DRINK TYPE). Tento typ využívá pro fermentační proces koagulační tanky. Při dosažení pH 4,5-4,7 se koagulát zchladí cirkulující vodou kolem tanku (Šnirc et al. 2016). V průběhu chlazení je směs promíchávána. Následně je směs přečerpána do vyrovnávacího tanku, kde se uchovává do doby, než se výrobek zabalí, popřípadě ještě předtím smíchá s ochucující složkou. Výrobek je perfektně rozmíchaný a jeho konzistence je velice jemná a krémovitá. V případě DRINK TYPE se využívá šetrná homogenizace, která je zařazena až po fermentaci v tanku. Výsledný výrobek je často ředěný ovocným koncentrátem, má nízkou viskozitu a je určen k pití (Robinson et al. 2006; Glibowski & Rybak 2016; Wang et al. 2020).

Tyto typy můžeme doplnit ještě dvěma dalšími technologickými postupy a tj. takzvaný „FROZEN TYPE“, který je svou výrobou podobný jogurtům krémovitým. Liší se po fázi fermentace, kdy jsou koaguláty zpracovány jako zmrzliny a následně uchovávány a skladovány v hlubokozmraženém stavu. Posledním typem je „CONCENTRATE TYPE“, jenž je charakteristický svým zahuštěním na vyšší obsah sušiny. Jinak se tomuto typu říká „strained yoghurt“, tedy jogurt, který byl zbaven většiny syrovátky (Janštová et al. 2012).

3.5 Význam FMV ve výživě

Pozitivní význam FMV v lidské výživě se přebírá již po mnoho generacích. Obecný význam mléka a mléčných výrobků ve výživě člověka zahrnuje jejich nutriční vyváženost, jsou výborným zdrojem vápníku, mají detoxikační vliv při otravách, jsou dobře stravitelnou potravinou a dobrým substrátem pro kulturní mikroorganismy (Navrátilová et al. 2012).

Fyziologická a nutriční hodnota bílkovin je dána obsahem esenciálních aminokyselin. Mléčné bílkoviny mají výhodu své plnohodnotnosti, obsahují pro člověka všechny esenciální aminokyseliny. Ve FMV jsou zastoupeny především kaseiny a syrovátkové bílkoviny.

FMV obsahují kromě mléčného cukru také jiné sacharidy např. sacharidy z ovocné složky, stabilizátory (agar, karagenany) a další. Laktóza má v gastrointestinálním traktu stimulační funkci a ve FMV je hlavní látkou, jejímž rozkladem umožňuje vznik mléčné a octové kyseliny při procesu fermentace. Díky částečné fermentaci laktózy je umožněna konzumace FMV lidem trpící intolerancí na laktózu. Významnou složkou jsou oligosacharidy, které jsou přítomny ve výrazně vyšších množstvích v kozím mléce. Díky přítomným oligosacharidům vykazuje kozí mléko probiotický potenciál, který se uplatňuje zejména při stimulaci růstu bifidobakterií v tlustém střevě (Navrátilová et al. 2012; Šnirc et al. 2016; van Leeuwen et al. 2020).

Mléčná kyselina je hlavním finálním produktem fermentace laktózy. Její obsah ve FMV bývá okolo 0,7-1,5 %. Nutriční význam této kyseliny spočívá v její schopnosti stimulace sekrece žaludečních šťáv, je prekursorem tvorby tělní glukózy a glykogenu, dále zvyšuje využití vápníku, fosforu a železa a působí příznivě na aktivitu pepsinu. Ve FMV má i technologický význam, protože pozitivně ovlivňuje texturu mléčných bílkovin, snižuje pH a inhibuje tak růst nežádoucích organismů ve výrobku. Díky mléčné kyselině se prodlužuje trvanlivost finálního produktu (Walstra et al. 2005; Janštová et al. 2012).

BMK mohou tvořit antibiotické sloučeniny, které poškozují možné vyskytující se patogeny a tím tak uplatňují svoje antimikrobiální účinky. Podrobnější význam je však stále studován (Walstra et al. 2005).

Dle vyhlášky č. 274/2019 Sb., kterou se mění vyhláška č. 397/2016 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy, tuky a oleje, je stanoven obsah tuku v sušině v jogurtu bílém od 0 do 10 % a v jogurtu bílém smetanovém minimálně 10 % (Ministerstvo zemědělství 2019). Na tuk má velký význam technologická operace homogenizace, která způsobí zmenšení tukových kuliček a tím tak zvětšení jejich povrchu a následně lepší přístupnost lipázám a trávicím enzymům. Důležitým faktorem je pozitivní vliv cholinu na rovnováhu koncentrace cholesterolu (Janštová et al. 2012).

Konzumace FMV způsobuje pouze mírnější zvýšení pH obsahu žaludku a tím je sníženo riziko průchodu patogenních organismů. To je zvláště důležité pro jedince trpící sníženou sekrecí žaludečních šťáv např. senioři nebo kojenci (Walstra et al. 2005).

Mezi důležité dieteticko-léčebné vlastnosti FMV patří například tvorba a vstřebávání některých vitaminů B-komplexu ve střevě, zejména vitaminu B₁₂ a jejich využití lidským organismem. Ve stejné míře to platí i pro většinu minerálních látek především vápník, fosfor spolu s železem, zinkem a mědí, které jsou významné při imunologických reakcích organismu (Šnirc et al. 2016).

3.5.1 Probiotické účinky

Probiotické kultury jsou celosvětově vyžadovanými doplňujícími mikroorganismy, které se do FMV přidávají za účelem pozitivního vlivu na lidský organismus. Jde o aktivní potravinový doplněk, který zlepšuje složení a zajišťuje rovnováhu střevní mikrobioty člověka. Místo, kde organismy nejvíce působí, je střevo, ve kterém mají požadovaný prospěšný účinek jen v případě, že je jich v konzumovaném výrobku 10⁶ KTJ na 1 ml (Walstra et al. 2005; Janštová et al. 2012; Šnirc et al. 2016; Meybodi et al. 2020).

Mezi probiotické mikroorganismy řadíme například skupinu bifidobakterií (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*) a dále bakterie mléčného kvašení (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, aj.) (Walstra et al. 2005; Šnirc et al. 2016; Meybodi et al. 2020). Abychom mohli mluvit o mikroorganismech probiotických, musí splňovat různá kritéria. Je důležité, aby probiotické bakterie byly schopny přežít v podmínkách gastrointestinálního traktu, aby tolerovaly žaludeční kyseliny a žlučové soli. Dále je nutné, aby byly schopné přežít technologický a skladovací proces, aby dokázaly příznivě ovlivňovat zdraví člověka a podporovaly funkci přirozené střevní mikrobioty.

Probiotické bakterie nesmějí být přenašeči genu zodpovědného za přenos antibiotické rezistence, nesmějí být zároveň patogenní a neměly by produkovat biogenní aminy (Walstra et al. 2005; Šnirc et al. 2016; Ranadheera et al. 2019; Meybodi et al. 2020).

Vybrané bifidobakterie a laktobacily potlačují růst mikroorganismů redukujících dusičnany na dusitany, čímž se předchází vzniku karcinogenních nitrosaminů. FMV mají schopnost redukovat zvýšené hladiny cholesterolu a triacylglycerolů, čehož se využívá při léčbě kardiovaskulárních onemocnění. Taktéž upravují narušenou střevní mikrobiotu po užívání antibiotik, chemoterapeutik a jiných léčiv. Napomáhají ke snadnějšímu a lepšímu vyprazdňování, čímž se zabraňuje vzniku nežádoucích metabolitů, které by mohly střevní sliznici nepříznivě dráždit. Podpora imunity je stejně tak důležitým účinkem konzumace FMV (Šnirc et al. 2016).

Probiotika spolu s jinými aditivami, které se do jogurtů přidávají, mohou mít výrazný vliv na výslednou sensoriku či fyzikálně chemické vlastnosti jogurtů (Farag et al. 2021).

Podle studie Chatelaine et al. 2021 bylo potvrzeno, že konzumace probiotických jogurtů je spojena se zdravím prospěšnou modulací střevního mikrobiomu. Výzkum byl založen na kombinaci metod NMR (nukleární magnetická rezonance) a UHPLC-HRMS (ultra účinná kapalinová chromatografie s vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrií), které jasně vymezipily a detekovaly všechny metabolity. Po třech týdnech konzumace probiotických jogurtů se významně změnil metabolom tlustého střeva oproti kontrolním vzorkům. Do budoucna je zapotřebí dalších studií zaměřujících se na tematiku, jak konzumace probiotických jogurtů může ovlivnit gastrointestinální trakt a celkové zdraví dětí.

3.6 Nukleární magnetická rezonance

Nukleární magnetická rezonance (angl. Nuclear Magnetic Resonance) je metoda, která je rozšířeně používána k detekci původu potravin a objevu nových biomarkerů. Výrazné pokroky v technologii digitálních spektrometrů zajistily NMR spektroskopii lepší kvantifikace a identifikace sloučenin spolu s možností rutinních analýz. Zpracování signálu byl jeden ze zaznamenaných pokroků, při kterém jsou odstraněny protony vody, které by mohly přehlušit spektra molekul zastoupených v menším množství. Dále byly pokroky zaznamenány při zpracování výsledného spektra, kde je využíváno technik vícerozměrné analýzy dat (Kuballa et al. 2018).

3.6.1 Princip NMR

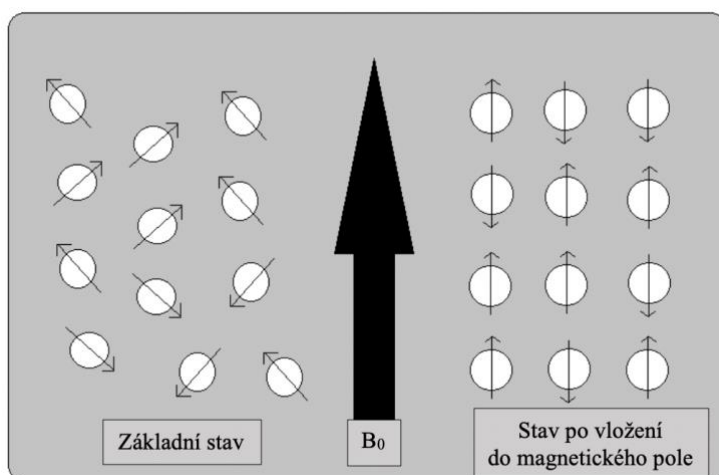
Jedná se o výkonnou analytickou spektroskopickou techniku, která je schopna poskytnout kvantitativní informace o chemickém složení kapalných, ale i pevných rozpustných směsí organických sloučenin. Provedením komplexnějších jednodimenzionálních (1D) a dvoudimenzionálních (2D) experimentů NMR analýzy je možné detekovat a identifikovat i sloučeniny doposud neznámé (Ralli et al. 2018). Moderní spektrometry dnes využívají výhradně pulzní metodu, jejíž princip je popsán níže.

Principem jsou základní stavební částice atomů, tedy protony, neutrony a elektrony rotující kolem své vlastní osy, tzn. mají svůj moment hybnosti (magnetický moment), který je označován jako spin (značení: I; Buděšínský & Pelnař 2000). Pokud je v jádrech izotopů sudý počet protonů a neutronů, jsou spárovány spiny částic. Hovoříme tedy o tzv. spinovém

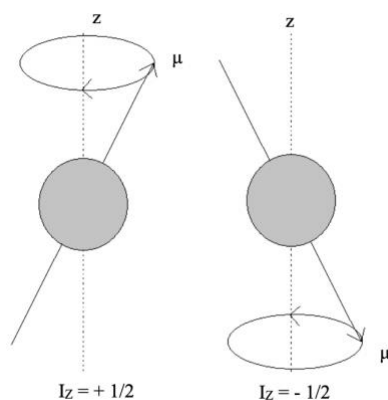
kvantovém čísle 0 ($I=0$). Jedná se například o izotopy ^{12}C , ^{16}O , tedy jádra, která nemají magnetický moment, čímž neposkytují signály NMR. Jádra obsahující lichý počet protonů a neutronů či obou typů částic, nemají spárovány spiny a jejich spinové kvantové číslo je $I=1/2$. Jedná se například o izotopy ^1H , ^{13}C , ^{31}P (Buděšinský & Pelnař 2000). Vodík ^1H je nejběžnější formou a má výjimečné postavení v NMR spektroskopii organických sloučenin především díky vhodným vlastnostem, tedy vysokému přirozenému zastoupení činícím přes 99 %, vysokou citlivostí a rozsáhlým výskytem (Popa & Novotná 2012).

Základní stav je tehdy, když spiny nejsou uspořádány a nenajdeme mezi nimi energetický rozdíl. Ve chvíli, kdy jsou jádra vložena do magnetického pole B_0 , jsou vychýlena z rovnovážné polohy, dojde k uspořádání magnetických momentů ve směru a proti směru magnetického pole, a tím začíná NMR experiment (Günther 2013; Dračínský 2021). Tento stav je znázorněn na obrázku č. 5. Při získávání NMR spekter pak nedetekujeme magnetické momenty jednotlivých jader, ale jejich vektorový součet, který nazýváme jako magnetizace M . Mimo rotační pohyb kolem své osy vytvářejí jádra ještě pohyb precesní tzv. Larmorovu precesi. Frekvence tohoto pohybu je pak vyjádřena tzv. Larmorovou frekvencí, která je dána gyromagnetickým poměrem jádra atomu a intenzitou magnetického pole B_0 . Precesní pohyb je znázorněn na obrázku č. 6 (Brus 2007). Při pulzní metodě je pak na všechna jádra jednoho izotopu aplikován krátký radiofrekvenční pulz, který je vychýlí z jejich rovnovážného stavu do stavu excitovaného. Tato pulzní frekvence musí být shodná s precesí magnetického momentu měřeného jádra. Díky tomu dojde ke vzniku tzv. rezonance, která zapříčiní vychýlení a precesi magnetizace M . Při ukončení pulzu dochází k návratu jádra do rovnovážné polohy, tzv. relaxaci, tento návrat indukuje v cívce proud, který se označuje jako volné dozívání indukce (Free induction decay; FID). FID signál tedy představuje závislost elektrického proudu indukovaného ve snímací cívce na čase. Důležitým krokem je matematická konverze FID signálu za pomoci Fourierovy transformace (FT), která je spektrum schopna znázornit v závislosti intenzity signálu na frekvenci a získat tak z časového záznamu (FID) požadované spektrum (Dračínský 2021).

Výhodou FT-NMR analýzy je možnost rychlého opakování po sobě stejných měření a výsledné FID signály sčítat. Zvýší se tím citlivost měření a je díky tomu možné měřit i zředěné vzorky, jádra s malým gyromagnetickým poměrem nebo s nízkým izotopovým zastoupením (Dračínský 2021).



Obrázek č. 5: Uspořádání a orientace spinů
(zdroj: Buděšinský & Pelnář 2000, upraveno autorem)



Obrázek č. 6: Rotující jádra s externím magnetickým polem B_0 (z)
(zdroj: Brus 2007, upraveno autorem)

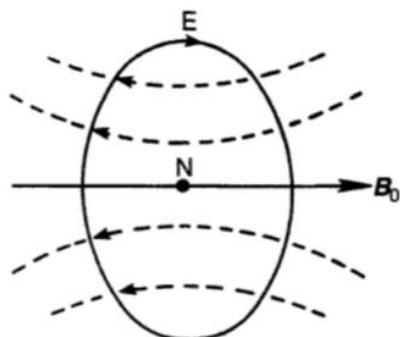
U jader s $I=1/2$ jsou možné pouze dvě orientace (+z, -z). Orientace +z mírně převažuje nad -z, proto vykazuje nižší energii. V magnetickém poli tedy vznikají dva spinové stavy: $I = +1/2$ a $I = -1/2$.

3.6.1.1 Chemický posun

Chemický posun je jev, který nám pomáhá odlišit jednotlivé látky a jejich struktury na základě odlišného okolí a jejich reakce s ním spojené. Jinými slovy rezonanční frekvence jednotlivých jader je ovlivněna elektrony v chemických vazbách molekuly. Kdyby neexistoval chemický posun, jádra by rezonovala při stejné frekvenci a nebylo by možné jednotlivé látky v rámci NMR analýzy rozlišit.

Principem tzv. magnetického stínění jádra (angl. shielding) je změna B_0 vlivem okolních elektronů. Po vystavení molekuly nebo směsi molekul magnetickému poli B_0 vzniká cirkulující pohyb elektronů v elektronovém obalu, které obklopuje jádro. Na základě tohoto pohybu vzniká slabší lokální pole B_{local} , které směřuje proti vnějšímu magnetickému poli B_0 . Tento jev je znázorněn na obrázku č. 7 (Akitt & Mann 2017).

Díky odlišnosti magnetických polí jednotlivých látek dochází k rozdílným chemickým posunům a rozdílnému stínění a na základě toho jsme schopni rozlišit i různé frekvence, ve kterých látky rezonují (Wishart et al. 1995; Günther 2013).



Obrázek č. 7: Pohyb elektronového oblaku E okolo jádra N
(zdroj: Akitt & Mann 2017, upraveno autorem)

Absolutní hodnoty frekvencí rezonancí jsou v MHz, ale výše zmíněný posun (rozdíl rezonančních frekvencí) způsobený stíněním je v Hz, proto se používají bezrozměrné jednotky ppm (angl. parts per million; Popa & Novotná 2012). Pro snazší znázornění začátku stupnice využívající jednotky ppm se používají standardy, nejčastěji tetramethylsilan (TMS) nebo 3-trimethylsilylpropionan sodný (TSP). Tyto standardy dávají ostrý a silný signál, který je vždy zaznamenáván spolu se spektrem zkoumaného vzorku. Jedná se o látky v podstatě inertní a po záznamu spektra se dají snadno ze vzorku odstranit (Hoffman 2006; Popa & Novotná 2012; Günther 2013).

3.6.2 Výhody a nevýhody NMR analýzy

NMR spektroskopie je robustní metoda, která je schopna rychle analyzovat směsi na molekulární úrovni bez nutnosti separace či purifikace vzorku. Díky tomu je ideální metodou při detekci látek v potravinářství. Navzdory rostoucí popularitě je NMR v oblasti potravinářství stále nedostatečně využívanou metodou a to především kvůli své vysoké ceně a náročnosti odborných znalostí pro její používání (Hatzakis 2019). Většina analytických metod, které byly využívány v historii a dají se používat i dnes, jsou časově náročné. Proto kontrolní orgány hledají rychlé a pokud možno snadno použitelné analytické techniky, které tyto identifikace zajišťují, přičemž NMR se jeví jako vhodná metoda (Roussel et al. 2003). Účinnost a využití analytických technologií se odvíjí od druhu, původu a povahy vzorku, a především na cílech dané studie. Výběr metody by měl probíhat na základě těchto faktorů, i přesto se však povětšinou určí dle nákladů, dostupnosti přístrojů a technologie a odborné znalosti zmíněných technik (Emwas et al. 2019). Obecně existují tři základní analytické techniky, které dominují metodologiím metabolomiky ^1H NMR spektroskopie, kapalinová (LC) a plynová (GC) chromatografie s hmotnostní spektrometrií (MS) (Sundekilde et al. 2013). Hmotnostní spektrometrie kapalinové (LC-MS) i plynové (GC-MS) jsou přirozeně citlivější než analýza NMR (Emwas et al. 2019). NMR data jsou vysoce reprodukovatelná a kvantitativní v širokém

rozsahu a jsou bezkonkurenční metodou pro analýzu a stanovení neznámých sloučenin. Obě metody NMR a MS jsou k sobě komplementární a synergicky fungující (Markley et al. 2017).

Vzhledem k jednotlivým zaměřením daných analytických platforem je nejlepší a nejúčinnější variantou společné využití metabolomických studií pro úplné identifikování a kvantifikaci všech metabolitů typických pro biologický vzorek (Emwas et al. 2019).

V tabulce č. 5 jsou shrnuty vlastnosti metod NMR a MS pro jejich vzájemné porovnání.

Tabulka č. 5: Porovnání metod NMR a MS

Vlastnost	NMR	MS
Reprodukovatelnost	Vysoká	Malá (v porovnání s NMR)
Citlivost	Vnitřně nízká, dá se zlepšit vyšším počtem skenů, vyšší intenzitou magnetického pole	Vysoká (snadná detekce velice nízkých koncentrací)
Selektivita	Zpravidla neselektivní analýza	Selektivní analýza, v kombinace s chromatografií = cílená analýza
Měření vzorku	Rychlé měření pomocí ^1H NMR, všechny metabolity v jednom měření	Nutná spolupráce s jinými metodami k maximalizaci počtu detekovaných metabolitů (ionizační metody)
Počet detekovatelných metabolitů	V jednom měření lze detekovat a identifikovat méně než 200 metabolitů	Pomocí různých technik MS lze detekovat tisíce různých metabolitů a identifikovat několik stovek
Příprava vzorků	Minimální příprava, lze automatizovat (zpravidla přenos vzorku do zkumavky a přidání deuterovaného rozpouštědla)	Náročnější příprava, vyžadovaná deprivatizace pro GC-MS
Zotavení vzorku	Nedestruktivní metoda, na jednom vzorku lze provést několik analýz, možné izolování vzorku, jeho dlouhodobé uložení	Destruktivní metoda, vzorek nelze získat zpět
Kvantitativní analýza	Kvantitativní (intenzita signálu přímo úměrná koncentraci metabolitů)	Intenzita často nekoreluje s koncentracemi metabolitů

Vlastnost	NMR	MS
Cílená analýza	Ne tak časté využití, ale lze použít v cílené i necílené analýze	GC-MS i LC-MS jsou vhodné pro cílené analýzy
In vivo studie	Využívána, nejčastěji s využitím jader ^1H a ^{31}P	Nevyužívá se

(zdroj: Emwas et al. 2019, upraveno autorem)

3.6.3 Využití NMR v mlékařském sektoru

Nutriční kvalita a technologické zpracování mléka úzce souvisí s jeho složením. Velice vhodnou metodou pro podrobnější výzkum nízkomolekulárních látek je právě NMR, která se zaměřuje nejen na profil látek, ale i jejich spojení s různými fyzikálními vlastnostmi mléka a mléčných produktů (Sundekilde et al. 2013). Využití NMR spektroskopie k analýze mléka se datuje již od 50. let 20. století, kdy byly identifikovány tři odlišné „složky“ v ^1H NMR rezonančním signálu v mateřském mléku. Tyto složky byly označeny jako W, T a F. Složky W a T byly přiřazeny mléčné plazmě, přičemž složka W byla identifikována jako rezonance vody, zatímco složka T byla přisuzována látkám z laktózy ve vzorku. Složka F pocházela z mléčného tuku (Maher & Rochfort 2014). V roce 1972 byla publikována studie, která se zabývala využitím ^1H NMR spektroskopie ke zkoumání struktury membrány tukové kuličky (MFGM). Měření v různých rozpouštědlech byli autoři schopni identifikovat charakteristické rezonance lipidů v porovnání s rezonancemi aminokyselin z denaturovaných proteinů za pomoci přiřazení protonů v jednotlivých řetězcích mastných kyselin. Bylo zjištěno, že je MFGM strukturálně a funkčně odlišná od plazmatické membrány (Chandan et al. 1972). S použitím komerčně dostupných standardů byly ve studii Andreotti et al. 2006 identifikovány a porovnány triacylglyceroly (TAG) v buvolím a kravském mléku. Hlavní rozdíl byl v obsahu kaprinové kyseliny (C10:0), přičemž buvolí mléka měla téměř dvojnásobný obsah kaprinových acylů ve srovnání s kravskými mléky.

Studie Trimigno et al. 2020 zahrnovala použití ^1H NMR pro sledování změn v mléce během fermentace probíhající 24 hodin. Pro výzkum byly použity 3 startovací kultury: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* a jejich kombinace. Na mléko byla aplikována dvě různá tepelná ošetření (99 °C, 105 °C). Výsledky prokázaly jasný rozklad bílkovin a laktózy během fermentace za současného zvýšení obsahu acetátu, laktátu a citrátu. Bakterie rodu *Streptococcus* byly schopny produkovat z pyruvátu formiát, který potřebují laktobacily ke svému růstu a byl tak podpořen jejich symbiotický vztah. Laktobacily dokáží hydrolyzovat bílkoviny na jednotlivé aminokyseliny, čímž obohacují kvalitu výsledného produktu. Touto studií byl získán lepší pohled do symbiotického vztahu jednotlivých kmenů BMK a NMR analýza byla potvrzena jako klíčová pro výrobce startovacích kultur.

Použití NMR se prokázalo jako účinné ve studii Lu et al. 2018, ve které se autoři zabývali chemickými změnami ve třech druzích FMV (bulharský jogurt, jogurt z oblasti Kaspického moře, kefir). Změny byly sledovány u devíti sloučenin: laktózy (α ; β), galaktózy (α ; β), mléčné kyseliny, citrátu, ethanolu, lecitinu a karnitinu. Výsledky prokázaly, že ethanol byl pozorován pouze v kefiru, galaktóza se nacházela v kefiru a bulharském jogurtu, kdežto u jogurtu z oblasti

Kaspického moře nebyla pozorována vůbec. Změny v koncentracích lecitinu a karnitinu nebyly pozorovány u žádných ze zkoumaných výrobků. V pozorovaném období nebyly u bulharských jogurtů pozorovány žádné signály glukózy, což naznačovalo, že byla glukóza hned spotřebována v glykolytických rozkladech. Načez koncentrace α - i β -galaktózy se během fermentace značně zvyšovaly. Zvýšené množství galaktózy navíc neodpovídalo spotřebovanému množství laktózy, tudíž zde existovala možnost vzniku galaktózy z rozkladu např. galaktooligosacharidů. U kefirů byl jasný růst koncentrace mléčné kyseliny během fermentace. Koncentrace citronové kyseliny během fermentace prudce klesla až k nule. S delší dobou fermentací výrazně vzrostl obsah ethanolu. U jogurtů z oblasti Kaspického moře nebyly pozorovány žádné signály galaktózy, což mohlo být způsobeno tím, že se během fermentace vytvářely expopolysacharidy, na jejichž stavbu se galaktóza spotřebovává.

Metabolity, které se v mléku nachází, mohou pocházet z různých typů tělních buněk organismu. Zánětlivé stavy (mastitidy), březost, involuce mají výrazný vliv na metabolický profil mléka (Sundekilde et al. 2013). Ve studii Klein et al. 2012 se autoři zabývali ketózou, častým metabolickým onemocněním u dojníc. Výsledky prokázaly, že vysoké hladiny glycerofosfocholinu a vysoké poměry glycerofosfocholinu k fosfocholinu (GPC/PC) umožňují spolehlivou selekci zdravých krav pro chovné účely. V průběhu laktace byly vysoké hodnoty glycerofosfocholinu spojeny s nízkým výskytem ketózy.

Několik studií se zaměřilo na využití ^1H NMR spektroskopie při zkoumání sýrů. NMR spektra byla získána postupně v procesu zrání a prokázala systematické změny v průběhu času, přičemž laktóza do 60. dne byla téměř úplně přeměněna na mléčnou kyselinu a ketolátky. Taktéž bylo za pomoci OPLS-DA analýzy (česky ortogonální diskriminační analýzy nejmenších čtverců) zjištěno, že vliv měl i přídavek bakterií (konkrétně *Bifidobacterium lactis* a *Lactobacillus casei*), které stejnětak ovlivňují finální metabolický profil těchto produktů (Rodrigues et al. 2011). Studie Mazzei & Piccolo 2012 prokázala, že určité techniky NMR lze použít k rozlišení oblasti původu buvolího sýra zvaného mozzarella. Kombinací GC-MS a ^1H NMR metod dokázaly společně identifikovat látky cyklopropyl a cyklohexyl mastné kyseliny, které byly pouze ve vzorcích mléka krav krmených kukuřičnou siláží. Tyto lipidy lze detekovat i v sýru vyrobeného z mléka od krav stejně krmených. Je to jedno z významných zjištění proto, že při výrobě sýru Parmigiano-Reggiano nesmí být použito mléko od krav krmených kukuřičnou siláží. Tato studie demonstruje užitečnost metabolických přístupů pro sledování účinků výživy zvířat na metabolický profil výsledného produktu, stejně jako určení proveniencence (Brescia et al. 2005; Consonni & Cagliani 2008; Maher & Rochfort 2014).

4 Metodika

Vzorky kozích a kravských jogurtů byly analyzovány pomocí ^1H NMR, konkrétně pomocí jednodimenzonálního experimentu s použitím pulzní sekvence „*noesypr1d*“. Získaná data byla následně statisticky zpracována pomocí multivariačních analýz zahrnující analýzu hlavních komponent (PCA) a ortogonální diskriminační analýzu nejmenších čtverců (OPLS-DA). Následovala identifikace nízkomolekulárních látek v obou maticích.

4.1 Analyzované vzorky mléka

K výrobě jogurtů bylo odebráno 24 kozích a 24 kravských vzorků mléka. Vzorky kozího a kravského mléka byly odebírány v průběhu celé laktace koz z farem v Olomouckém, Moravskoslezském a Zlínském kraji v České republice. Celkově byly testovány vzorky mléka od pěti plemen, konkrétně:

- plemena koz
 - koza bílá krátkosrstá
 - koza hnědá krátkosrstá
 - koza anglonúbijská
- plemena krav
 - skot holštýnský
 - skot český strakatý

Bazénové vzorky syrového mléka byly odebrány z chladicích tanků na farmách při teplotě 8 °C a dále byly do 24 hodin transportovány do laboratoře Výzkumného ústavu mlékárenského, instituce sídlící v Šumperku. Transport proběhl v termoboxech s chladicími vložkami. U všech vzorků syrového mléka byl stanoven celkový počet mikroorganismů, počet somatických buněk, obsah tuku, bílkovin, mléčného cukru, sušiny a pH. Tyto mikrobiální, hygienické a složkové ukazatele jsou uvedeny v tabulce č. 6 a č. 7.

Následně bylo 250 ml každého vzorku mléka ošetřeno vysokou pasterací (85 °C po dobu 15 s), vzorky byly uloženy při teplotě 5 °C a transportovány v chladicích boxech do laboratoře České zemědělské univerzity v Praze.

Tabulka č. 6: Mikrobiální, hygienické a složkové ukazatele syrového kravského mléka použitého k výrobě jogurtů (n = 24)

Celkový počet mikroorganismů (KTJ* v 1 ml)	Počet somatických buněk (počet v 1 ml)	Tuk (%)	Bílkoviny (%)	Laktóza (%)	Celková sušina (%)	pH
9292	195	4,29	3,34	5,05	13,18	6,7

*KTJ = kolonie tvořící jednotky

Tabulka č. 7: Mikrobiální, hygienické a složkové ukazatele syrového kozího mléka použitého k výrobě jogurtů (n = 24)

Celkový počet mikroorganismů (KTJ* v 1 ml)	Počet somatických buněk (počet v 1 ml)	Tuk (%)	Bílkoviny (%)	Laktóza (%)	Celková sušina (%)	pH
646,583	1062	3,35	2,96	4,54	11,65	6,57

*KTJ = kolonie tvořící jednotky

4.2 Chemikálie

- CHCl_3 (stabilizovaný 1% ethanolem) (Penta s.r.o.; Česká republika)
- pufr – pH 7,4; 0,2 % NaN_3 , 1,5 M fosfátový pufr, 5mM 3-(trimethylsilyl)propionová kyselina (TSP) (Sigma Aldrich; USA)

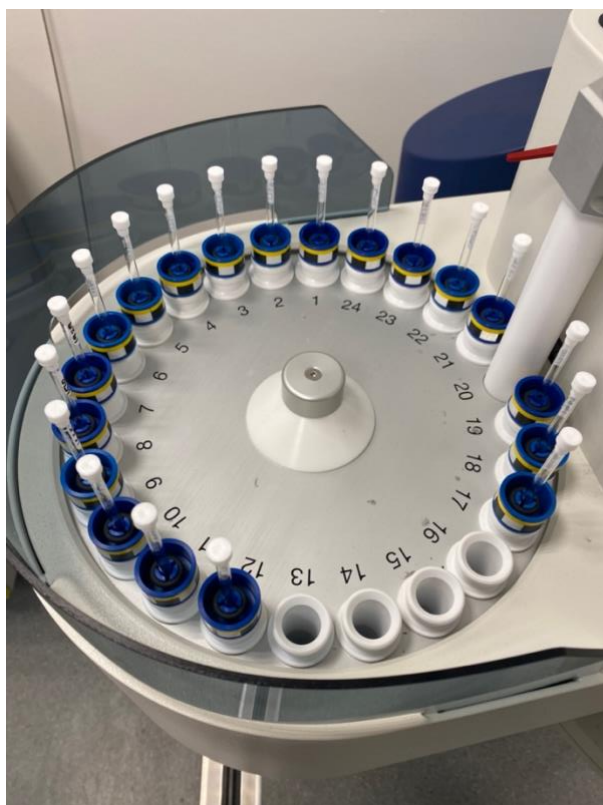
4.3 Přístroje a vybavení

- IKA® VORTEX 3; IKA® (Werke GmbH & Co. KG; Německo)
- Centrifuga Rotanta 460 R (Andreas Hettich GmbH & Co. KG; Německo)
- NMR spektrometr: Bruker Avance III HD 500 MHz NMR Spectrometer vybavený širokopásmovou sondou (5 mm BBFO SmarProbe); Bruker BioSpin; Německo) (viz. obrázek č. 8)
- Pipety 100-1000 μl a 500-5000 μl (VWR International s.r.o.; Česká republika)
- Centrifugační zkumavky (kónická, PP, 15 ml, plastové šroubovací víčko) (VWR International s.r.o.; Česká republika)
- Mikrozukmavky EASY-LOCK® MICROTUBE (kónická, PP, 1,5 ml) (FL Medical s.r.l.; Itálie)
- NMR kyvety (5 mm, Norell ST500) (Norell Inc.; NC, USA)

Na obrázku č. 8 je vidět NMR spektrometr, který byl využit k analýze vzorků kozích a kravských jogurtů. NMR spektrometr je vybaven autosamplrem kyvet, který je znázorněn na obrázku č. 9.



Obrázek č. 8: NMR spektrometr (Bruker BioSpin, Německo)
(zdroj: autor)

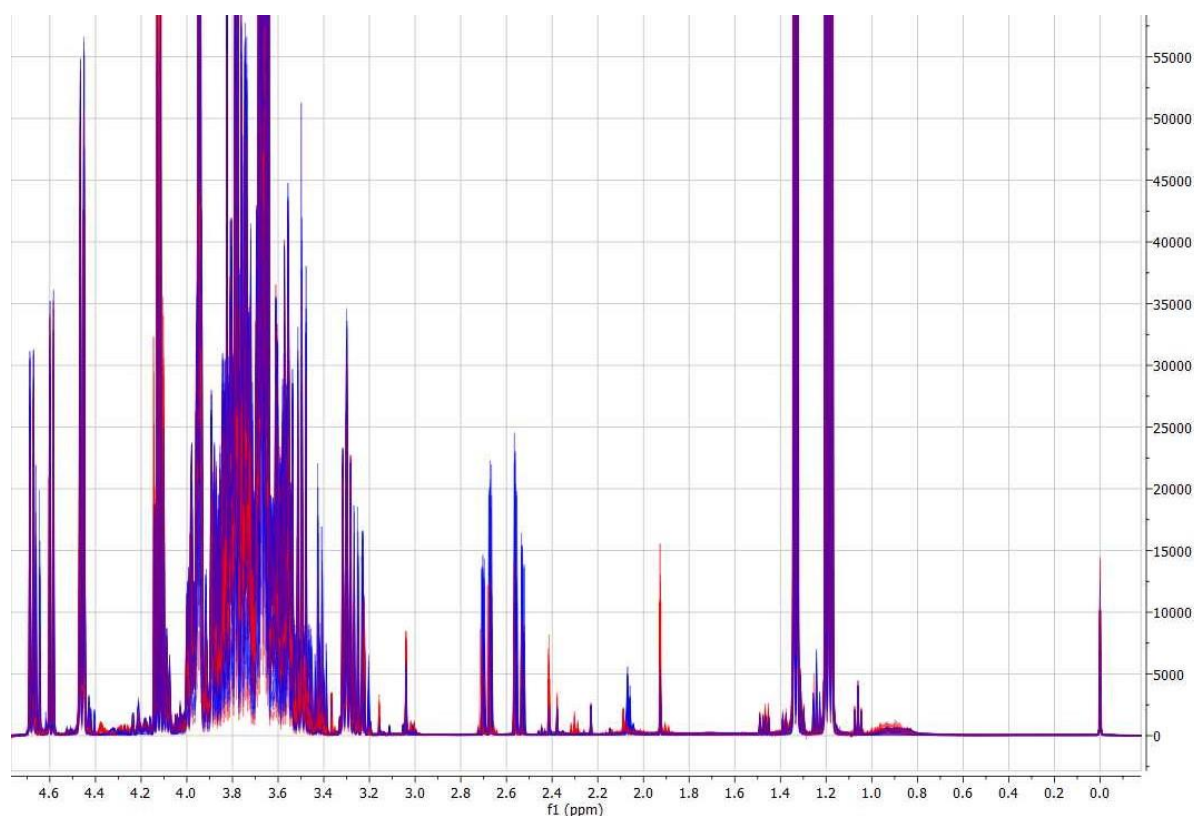


Obrázek č. 9: Autosampler NMR kvyet (Norell Inc.; NC, USA)
(zdroj: autor)

4.4 Software

- Topspin (3.57; Bruker BioSpin; Německo)
- MestReNova 14.0.1 Software (Mestrelab Research; Španělsko)
- Online statistický software MetaboAnalyst 5.0 (metaboanalyst.ca; CA)
- Chenomx NMR suite 9.0 (Chenomx Inc.; CA) (Chong et al. 2019)

Na obrázku č. 10 je znázorněna ukázka zpracování spekter ve výše zmíněném programu MestReNova 14.0.1.



Obrázek č. 10: Ukázka zpracování spekter v programu MestReNova 14.0.1

(zdroj: autor)

4.5 Příprava jogurtů

Požadovaný obsah kozího a kravského mléka byl zaočkován jogurtovou kulturou dle pokynů výrobce (YC-180, 50U; Chr. Hansen, Dánsko), která obsahovala ušlechtilé mikroorganismy: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Následně byly vzorky inkubovány při teplotě 43 °C po dobu 4 hodin. Po uplynutí této doby proběhla kontrola konzistence. Po ukončení inkubace byly všechny vzorky jogurtů zchlazeny na teplotu 6 °C a skladovány minimálně 24 hodin.

4.6 Příprava vzorků pro analýzu NMR

Jednotlivé vzorky jogurtů byly míchány v centrifugačních zkumavkách v poměru 1:1 s CHCl_3 , který se přidal za účelem oddělení tukové frakce. Obsah zkumavek se řádně zvortexoval minimálně po dobu 1 minuty, následně zcentrifugoval v laboratorní odstředivce po dobu 15 minut, při 11 500 otáčkách za minutu při teplotě 4 °C. Po ukončení centrifugace bylo odebráno 720 μl mléčné plazmy do mikrozkušavky, do níž se následně přidalo 80 μl pufru. Mikrozkušavky se opět řádně zvortexovaly a následně se odstřeďovaly po dobu 15 minut, při 14 500 otáčkách za minutu při teplotě 4 °C. Čistý supernatan byl z mikrozkušavky odpipetován v objemu 600 μl do NMR kyvety. Tímto způsobem byl vzorek připraven k analýze.

4.7 Parametry měření ^1H NMR spekter

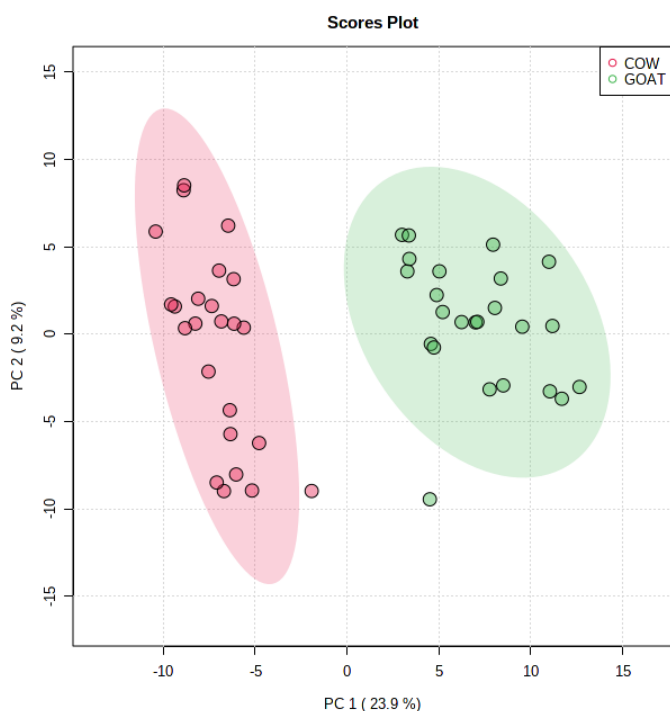
Analýza vzorků proběhla formou základního 1D experimentu s použitím „*noesypr1d*” pulsní sekvence se supresí vody na spektrometru Bruker AVANCE III HD NMR pracující při 500,23 MHz při teplotě 298 K. Snímání spekter bylo realizováno s následujícími parametry: počet skenů 128, 32k datových bodů, šířka spektra 16 ppm, relaxační prodleva 1 s, směšovací čas 100 ms a akviziční čas 4,00 s. Ladění, zamykání, kalibrace 90° pulzu a shimming byly automaticky optimalizovány dle nastavení spektrometru. Všechna spektra kozích a kravských jogurtů byla zpracována pomocí softwaru Topspin. Další manuální úprava a zpracování spekter (např. úprava základní linie) bylo provedeno v software MestReNova. Identifikace nízkomolekulárních látek přítomných v kozích i kravských jogurtech proběhla v softwaru Chenomx NMR suite.

4.8 Statistické zpracování

Metoda NMR poskytuje velké datové soubory, které jsou tvořeny velkým množstvím nejen vzorků, ale i proměnných. Z tohoto důvodu se k vyhodnocení dat používají zejména pokročilé statistické analýzy. Pro účely této práce byly k vyhodnocení použity biny o velikosti 0,04 ppm. Celkově bylo získáno 250 binů z jednoho spektra. Tyto biny byly získány tzv. binningem ze spekter zpracovaných v softwaru MestReNova, díky čemuž byl výrazně zredukován počet proměnných. Následně byly biny v softwaru MetaboAnalyst normalizovány na vybrané referenční spektrum, logaritmičticky transformována a automaticky škálována. Prvně byla provedena analýza PCA, která byla využita pro zkoumání celkového uspořádání dvou testovaných skupin kravských a kozích jogurtů, jak spolu vzorky souvisejí nebo naopak jak se od sebe odlišují. Poté byla použita OPLS-DA pro identifikaci statisticky významných proměnných, odlišností mezi dvěma skupinami vzorků (Sundekilde et al. 2013). Data byla opět normalizována na vybrané referenční spektrum, logaritmičticky transformována a automaticky škálována. Validace tohoto modelu byla provedena při 1000 permutacích. V rámci OPLS-DA analýzy bylo získáno také tzv. VIP skóre (variable importance in projection), které nám poskytlo informace o binech, jež jsou mezi testovanými skupinami nejvíce diskriminující.

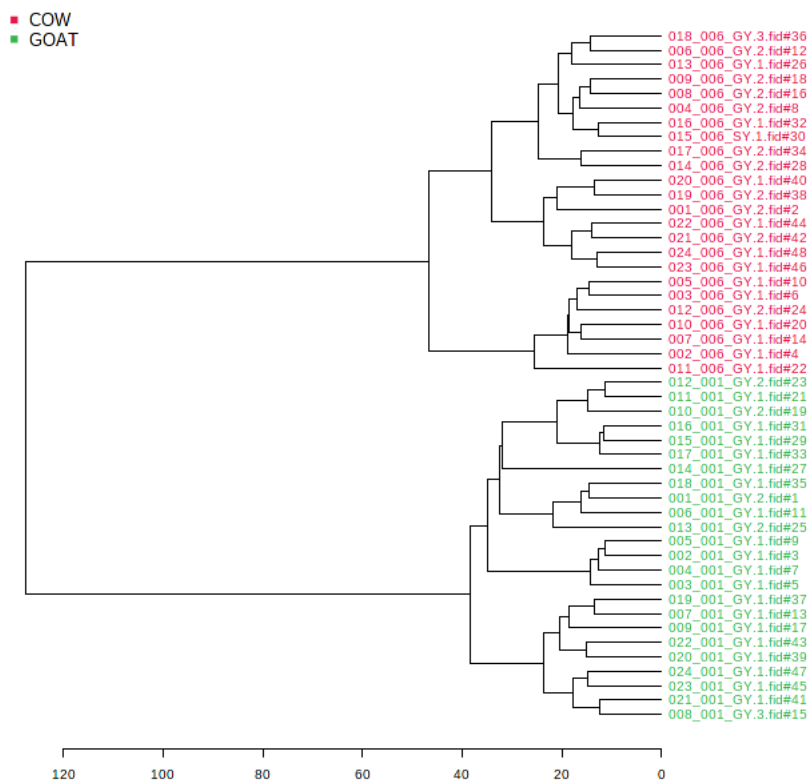
5 Výsledky

Výsledky nesupervizované PCA analýzy dat vzorků kravských a kozích jogurtů jsou vyobrazeny na obrázku č. 11. Tato statistická analýza byla schopna úspěšně a jasně oddělit jogurty různého druhu mléka a vytvořila tak na základě získaných dat dvě zřetelné skupiny. Hlavní komponenta PC 1 interpretovala 23,9 % variace, komponenta PC 2 se na variabilitě tříd podílela z 9,2 %.



Obrázek č. 11: PCA analýza spekter kozích (zelená barva, n = 24) a kravských (červená barva, n = 24) jogurtů

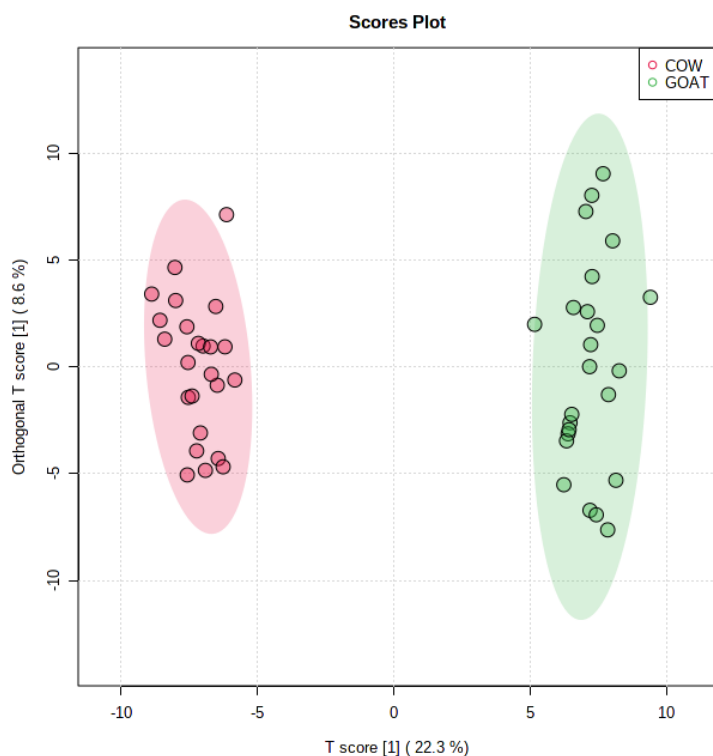
Na obrázku č. 12 je znázorněn dendrogram, ve kterém bylo rozděleno 48 vzorků kravských a kozích jogurtů do dvou hlavních skupin. Dendrogram je druh diagramu, který se používá ve spojení se shlukovou analýzou a pomáhá znázornit její jednotlivé kroky. Abstraktní vertikální osy v bodech spojení znázorňují jeden prvek samostatně, horizontální osy vyjadřují vzdálenost mezi jednotlivými shluky. Základem pro shlukovou analýzu jsou odhadované podobnosti mezi odpovídajícími vzorky (Kim et al. 2007; Caliński 2014). Na dendrogramu jsou zřetelně znázorněny vzorky vzájemně si podobné a stejně tak je viditelné odlišení obou skupin kravských (červeně znázorněných) i kozích (zeleně znázorněných) jogurtů.



Obrázek č. 12: Dendrogram rozdělující 24 kravských a 24 kozích jogurtů do dvou skupin

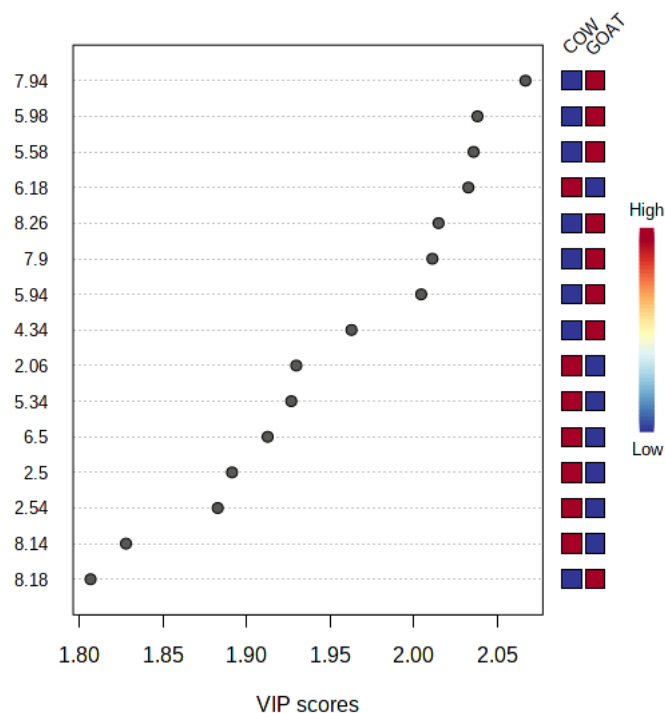
Výsledky OPLS-DA jsou znázorněny na obrázku č. 13. OPLS-DA potvrzuje výsledky získané z PCA analýzy, dokonce vykázala lepší separaci kozích a kravských jogurtů oproti PCA analýze, klastry testovaných skupin jsou lépe odděleny. Lze také pozorovat lépe semknutý klastrování kravských jogurtů, což naznačuje menší variace uvnitř testované skupiny, naopak u kozích jogurtů je variace větší.

Modely OPLS-DA byl charakterizován hodnotami R^2 a Q^2 . Hodnota R^2 kvantifikuje, kolik původních dat bylo v modelu popsáno. Hodnota Q^2 představuje míru správnosti modelu vypočtenou křížovou validací (Kew et al. 2019). Náš model vykázal $R^2Y = 98,7\%$ ($p < 0,001$) a $Q^2 = 97\%$ ($p < 0,001$). Pomocí permutačních testů při 1000 permutacích byl model vyhodnocen jako validní.



Obrázek č. 13: OPLS-DA analýza spekter kozích (zelená barva, n = 24) a kravských (červená barva, n = 24) jogurtů, $Q^2 = 0,97$ ($p < 0,001$) a $R^2Y = 0,987$ ($p < 0,001$)

Na obrázku č. 14 je vyobrazeno VIP skóre indentifikující biny, které přispívají k rozdílům mezi skupinami zařazené do modelu OPLS-DA, tudíž kozí a kravské jogurty. Barva čtverců uvedených podél grafu znázorňuje, zdali je konkrétní bin větší v kozím či kravském jogurtu. Čím vyšší VIP skóre u daného binu je, tím má větší vliv na diskriminaci skupin.



Obrázek č. 14: Seznam významných diskriminujících binů dle VIP skóre nacházející se o různé velikosti v kozím či kravském mléku, jak je uvedeno vpravo podle grafu

Za nejvýznamnější biny podílející se na diskriminaci dvou testovaných skupin byly dle VIP skóre označeny tyto: 7,94; 5,98; 5,58; 6,18; 8,26; 7,9; 5,94; 4,34; 2,06 a 5,34 ppm. Biny nacházející se na pozici 7,94; 5,98; 5,58; 8,26; 7,9; 5,94 a 4,34 ppm vykazují větší intenzitu v kozím jogurtu, naopak biny nacházející se na pozici 6,18; 2,06 a 5,34 ppm vykazují větší intenzitu v kravském jogurtu. Pro účely této diplomové práce však nebyly dostatečné informace o diskriminujících binech, ale bylo zapotřebí určit i o jaké nízkomolekulární metabolity se jedná, a proto byla provedena identifikace metabolitů ve spektrech všech kozích i kravských jogurtů v softwaru Chenomx NMR suite. Seznamy identifikovaných metabolitů v kozích a kravských jogurtech jsou uvedeny v tabulce č. 8 a č. 9. Celkově bylo identifikováno 61 látek v kozích jogurtech a 55 látek v kravských jogurtech. Tyto seznamy byly následně využity pro identifikaci látek, které se nacházející na pozici deseti významných binů, jak je uvedeno na obrázku č. 14.

V oblastech spektra kozích jogurtů 4,34 ppm; 5,58 ppm; 5,98 ppm; 7,90 ppm a 7,94 ppm se nacházejí UDP cukry zahrnující UDP-glukózu, UDP-galaktózu, UDP-glukuronát a UDP-N-acetylglukosamin, které patří mezi nejvíce signifikantní látky s velmi vysokým VIP skóre a jsou schopny úspěšně odlišit tyto dvě skupiny jogurtů. Významnou látkou, která je charakteristickým biomarkerem kravských jogurtů je orotát, jenž je v oblasti spektra na 6,18 ppm. Orotát je látka se čtvrtým nejvyšším VIP skóre. Další důležitou látkou, která je schopna charakterizovat kravský jogurt je zřejmě některý z aminocukrů s acetylovou skupinou nacházející se na 2,06 ppm.

V oblastech 5,94 ppm a 8,26 ppm v kozích jogurtech a 5,34 ppm v kravských jogurtech se nacházely látky, které nebyly prostřednictvím software identifikovány.

Tabulka č. 8: Souhrn látek obsažených v kozích jogurtech

Název sloučeniny	Vzorec	Název sloučeniny	Vzorec
Acetát	C ₂ H ₄ O ₂	Laktát	C ₃ H ₆ O ₃
Aceton	C ₃ H ₆ O	Laktóza	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
Adenin	C ₅ H ₅ N ₅	Laktulóza	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
Alanin	C ₃ H ₇ NO ₂	Leucin	C ₆ H ₁₃ NO ₂
Arginin	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	Malát	C ₄ H ₆ O ₅
Aspartát	C ₄ H ₇ NO ₄	Malonát	C ₃ H ₄ O ₄
Betain	C ₅ H ₁₁ NO ₂	Maltóza	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
Butyrát	C ₄ H ₈ O ₂	Methionin	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S
Kaprát	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	N-acetylkarbohydráty	C ₈ H ₁₅ NO ₆
Kaprylát	C ₈ H ₁₆ O ₂		C ₁₄ H ₂₅ NO ₁₁
Karnitin	C ₇ H ₁₅ NO ₃	O-fosfocholin	C ₅ H ₁₅ NO ₄ P
Cholin	C ₅ H ₁₄ NO	Orotát	C ₅ H ₄ N ₂ O ₄
Citrát	C ₆ H ₈ O ₇	Fenylalanin	C ₉ H ₁₁ NO ₂
Kreatin	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	Prolin	C ₅ H ₉ NO ₂
Kreatin-fosfát	C ₄ H ₁₀ N ₃ O ₅ P	Propionát	C ₃ H ₆ O ₂
Kreatinin	C ₄ H ₇ N ₃ O	Pyruvát	C ₃ H ₄ O ₃
Dimethylsulfon	C ₂ H ₆ O ₂ S	Serin	C ₃ H ₇ NO ₃
Ethanolamin	C ₂ H ₇ NO	Sukcinát	C ₄ H ₆ O ₄
Formiát	CH ₂ O ₂	Sacharóza	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
Galaktóza	C ₆ H ₁₂ O ₆	Taurin	C ₂ H ₇ NO ₃ S
Glukonát	C ₆ H ₁₂ O ₇	Threonin	C ₄ H ₉ NO ₃
Glukóza	C ₆ H ₁₂ O ₆	Tyrosin	C ₉ H ₁₁ NO ₃
Glukóza-1-fosfát	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	UDP-N-acetylglukosamin	C ₁₇ H ₂₇ N ₃ O ₁₇ P ₂
Glukóza-6-fosfát	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	UDP-galaktóza	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₁₇ P ₂
Glutamát	C ₅ H ₉ NO ₄	UDP-glukóza	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₁₇ P ₂
Glutamin	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	UDP-glukuronát	C ₁₅ H ₂₂ N ₂ O ₁₈ P ₂
Glycin	C ₂ H ₅ NO ₂	Uracil	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂
Hippurát	C ₉ H ₉ NO ₃	Uridin	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆
Isobutyřát	C ₄ H ₈ O ₂	Valin	C ₅ H ₁₁ NO ₂
Isocitrát	C ₆ H ₈ O ₇	sn-Glycero-3-fosfocholin	C ₈ H ₂₁ NO ₆ P
Isoleucin	C ₆ H ₁₃ NO ₂	4-aminobutyřát	C ₄ H ₉ NO ₂

* červeně zvýrazněné jsou identifikované biomarkery v kozích jogurtech

Tabulka č. 9: Souhrn látek obsažených v kravských jogurtech

Název sloučeniny	Vzorec	Název sloučeniny	Vzorec
Acetát	C ₂ H ₄ O ₂	Isocitrát	C ₆ H ₈ O ₇
Aceton	C ₃ H ₆ O	Isoleucin	C ₆ H ₁₃ NO ₂
Alanin	C ₃ H ₇ NO ₂	Laktát	C ₃ H ₆ O ₃
Arginin	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	Laktóza	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
Aspartát	C ₄ H ₇ NO ₄	Laktulóza	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
Betain	C ₅ H ₁₁ NO ₂	Leucin	C ₆ H ₁₃ NO ₂
Butyrát	C ₄ H ₈ O ₂	Malát	C ₄ H ₆ O ₅
Kaprát	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	Malonát	C ₃ H ₄ O ₄
Kaprylát	C ₈ H ₁₆ O ₂	Maltóza	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
Karnitin	C ₇ H ₁₅ NO ₃	Methionin	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S
Cholin	C ₅ H ₁₄ NO	N-acetylkarbohydráty	C₈H₁₅NO₆
Citrát	C ₆ H ₈ O ₇		C₁₄H₂₅NO₁₁
Kreatin	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂	O-fosfocholin	C ₅ H ₁₅ NO ₄ P
Kreatin-fosfát	C ₄ H ₁₀ N ₃ O ₅ P	Orotát	C₅H₄N₂O₄
Kreatinin	C ₄ H ₇ N ₃ O	Prolin	C ₅ H ₉ NO ₂
Dimethylsulfon	C ₂ H ₆ O ₂ S	Propionát	C ₃ H ₆ O ₂
Ethanolamin	C ₂ H ₇ NO	Pyruvát	C ₃ H ₄ O ₃
Fumarát	C ₄ H ₄ O ₄	Serin	C ₃ H ₇ NO ₃
Formiát	CH ₂ O ₂	Sukcinát	C ₄ H ₆ O ₄
Galaktóza	C ₆ H ₁₂ O ₆	Sacharóza	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
Glukonát	C ₆ H ₁₂ O ₇	Taurin	C ₂ H ₇ NO ₃ S
Glukóza	C ₆ H ₁₂ O ₆	Threonin	C ₄ H ₉ NO ₃
Glukóza-1-fosfát	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	Tyrosin	C ₉ H ₁₁ NO ₃
Glukóza-6-fosfát	C ₆ H ₁₃ O ₉ P	Uracil	C ₄ H ₄ N ₂ O ₂
Glutamát	C ₅ H ₉ NO ₄	Uridin	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆
Glutamin	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	Valin	C ₅ H ₁₁ NO ₂
Glycin	C ₂ H ₅ NO ₂	sn-Glycero-3-fosfocholin	C ₈ H ₂₁ NO ₆ P
Isobutyřát	C ₄ H ₈ O ₂		

* červeně zvýrazněné jsou identifikované biomarkery v kravských jogurtech

6 Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo zjištění a potvrzení účinnosti ^1H NMR metody, jakožto spolehlivé analýzy pro charakteristiku nízkomolekulárních látek, které mohou být zároveň typickými biomarkery kravských a kozích jogurtů. Provedením NMR analýzy byla získána NMR spektra jednotlivých druhů jogurtů. Tato data byla mezi sebou následně porovnávána prostřednictvím vícerozměrných statistických analýz PCA a OPLS-DA. Finálním statistickým výsledkem byly významné metabolity, které byly zodpovědné za druhovou variabilitu, díky čemuž lze za pomoci jejich přítomnosti či nepřítomnosti dokázat možnou adulteraci. Statisticky významné látky byly na základě chemických posunů charakterizovány a identifikovány za pomoci dostupné odborné literatury. Za druhovou specifitu kravských jogurtů byly zodpovědné N-acetylkarbohydráty, orotát a neznámá látka v oblasti 5,34 ppm. Látky charakteristické pro kozí jogurty byly UDP-sacharidy (UDP-glukóza, UDP-galaktóza, UDP-glukuronát, UDP-N-acetylglukosamin) a neznámé látky v oblastech spektra 5,94 a 8,26 ppm. Z výsledků je taktéž viditelné, že mají oba druhy jogurtů mnoho látek společných, tyto látky se však mohou lišit jejich koncentracemi. Příkladem lze uvést orotát, který byl identifikován v kozím i kravském mléku a zároveň byl označen jako specifický biomarker kravského jogurtu. Identifikováno bylo dohromady 61 látek u kozích jogurtů a 55 látek u jogurtů kravských, z toho deset látek bylo diskriminujících dle vysokého VIP skóre. Tři důležité biomarkery nebyly prostřednictvím software identifikovány, čímž se vytváří prostor pro navazující výzkum.

Ve studii Indy & Woollar 2004 je popsáno stanovení orotové kyseliny, močové kyseliny a kreatininu v mléce za pomoci kapalinové chromatografie s reverzní fází a UV detekcí fotodiodovým polem. Výsledky jasně prokázaly, že močová kyselina a kreatinin byly přítomny ve všech analyzovaných mlékách, přičemž orotová kyselina v podstatě chyběla v mlékách nepřežvýkavců. Naprosto dominující byla orotová kyselina u skotu. V kozím a ovčím mléce se objevovaly četné (nukleosidové, nukleotidové) deriváty, z nichž orotát byl relativně minoritní složkou. Studie potvrzuje, že se koncentrace orotové kyseliny, močové kyseliny i kreatininu lišily podle živočišného druhu a vykazovaly významnou závislost na laktaci zvířete. V našem výzkumu kravských a kozích jogurtů vyšel signifikantní taktéž orotát, který se sice nachází u obou druhů zvířat, ale významnější koncentrace jsou u kravských jogurtů. Více se orotovou kyselinou zabývali ve studii Zaalberg et al. 2020, kde se ji snažili podrobně prozkoumat za pomoci infračervené spektrální analýzy s Fourierovou transformací. Výsledná koncentrace orotové kyseliny byla stanovena NMR analýzou. Rozdíly v hladinách orotové kyseliny u krav a jiných živočišných druhů lze částečně vysvětlit genetikou, rozdíly mezi plemeny, fází laktace nebo paritou (počtem porodů). Genetická příčina zvýšených hladin orotové kyseliny v mléce je metabolická porucha deficitu uridinmonofosfátsyntetázy. U krav heterozygotních je snížena metabolická přeměna orotové kyseliny na pyrimidinové nukleotidy a tím je dána její vyšší hladina v kravském mléce. Pozitivní funkcí orotové kyseliny může být například ustálení mikrobiomu v žaludku telete tím, že může fungovat jako růstový faktor pro laktobacily. Teoreticky by tato funkce mohla mít stejně pozitivní vliv i na lidské zdraví při konzumaci kravských mléčných výrobků z hlediska stálosti mikrobiomu gastrointestinálního traktu.

Fermentace laktózy a produkce organických kyselin za přítomnosti startovacích kultur a probiotických bakterií jsou běžnými procesy při výrobě jogurtů. Ve studii da Costa et al. 2016 byla validována jednoduchá, citlivá a reprodukovatelná vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) při analýze sacharidů a organických kyselin v jogurtech z kozího mléka. Mezi zkoumané sacharidy patřily laktóza, glukóza, galaktóza a mezi organické kyseliny byly zařazeny mléčná, citronová a mravenčí kyselina. V porovnání s naší studií, ve které byly kromě mravenčí kyseliny identifikovány v kozích i kravských jogurtech stejné látky (sacharidy laktóza, glukóza a galaktóza společně s deriváty mléčné a citronové kyseliny), byla ve studii Costa et al. 2016 zvolena odlišná metoda detekce (HPLC), která však byla schopna jednotlivé metabolity v kozích jogurtech úspěšně identifikovat stejně jako v této studii NMR spektroskopie. Obě metody NMR i HPLC se tedy jeví jako přesné, robustní, vhodné a účinné při analýze jogurtů. Ve studii Costa et al. 2016 byla metoda HPLC rovněž úspěšně aplikována ke sledování doby fermentace u různých kozích jogurtů, přičemž byla mléčná kyselina prokázána jako hlavní organická kyselina produkovaná v průběhu fermentace. V naší studii byl taktéž charakterizován derivát mléčné kyseliny (laktát), jehož koncentrace byly prokazatelné jak u kravských, tak u kozích jogurtů. Nejednalo se tedy o charakteristický biomarker ani jednoho druhu jogurtů. Stejnětak sacharidy laktóza, glukóza i galaktóza byly v této studii charakterizovány u obou živočišných druhů jogurtů a nejednalo se tak o signifikantní diskriminanty.

Při kvašení mléka produkují BMK přes 400 těkavých sloučenin, které vycházejí z chemického složení různých druhů mlék, mohou být ovlivněny typem a poměrem použité startovací kultury, inkubační dobou nebo podmínkami zpracování (Farag et al. 2021). V této studii byla použita analýza NMR pro detekci nízkomolekulárních látek, která je schopna detekovat velké množství metabolitů v jednom měření. Pro analýzu např. těkavých sloučenin v jogurtu se jeví taktéž vhodná GC, popřípadě již výše zmíněná HPLC (Cheng 2010). V této studii byly charakterizovány látky patřící do skupiny derivátů netěkavých karboxylových kyselin (např. laktát, pyruvát, sukcinát), derivátů těkavých karboxylových kyselin (např. acetát, butyrát, propionát) a derivátů hlavních těkavých karboxylových kyselin (např. aceton), které přispívají k chuti typického jogurtu. Dalšími složkami byly různé sloučeniny např. aminokyseliny a sloučeniny vzniklé tepelnou degradací. Aceton, který byl identifikován v obou skupinách kravských i kozích jogurtů, je znám pro své sladké, ovocné aroma, které ovlivňuje celkové chuťové vlastnosti jogurtů. Malá množství acetonu pocházejí obvykle z mléka, ale určitá množství jsou produkována jogurtovými kulturami. Podle studie Cheng 2010 je charakteristická chuť sloučeniny 2-butanonu v jogurtu výrazně podobná chuti acetonu. Sloučenina 2-butanon však nebyla zahrnuta mezi identifikovanými látkami v této studii.

Ve studii Lu et al. 2016 byla v jogurtech kompletně charakterizována řada látek analýzou 2D NMR. Mezi tyto sloučeniny patřily například laktát (1,23 ppm; 4,08 ppm), acetát (1,93 ppm), alanin (1,35 ppm; 3,65 ppm), citrát (2,53 ppm; 2,69 ppm) a kreatin (3,81 ppm). Všechny tyto látky byly taktéž identifikovány v této studii u kravských i kozích jogurtů. Ve studii Lu et al. 2016 charakterizovali autoři dále látky lecitin (3,55 ppm; 3,74 ppm; 3,80 ppm; 4,19 ppm) a cefalin (3,74 ppm; 3,97 ppm), hlavní fosfolipidy v mléce. Tyto sloučeniny nebyly v této studii identifikovány. Další látkou, která byla ve studii Lu et al. 2016 charakterizována a podrobně popsána byl N-acetyl-d-glukosamin-1-fosfát (3,83 ppm; 5,30 ppm). Tato látka je syntetizována z d-glukosamin-1-fosfátu, který je produktem BMK a je potřebný pro syntézu

UDP- α -N-acetyl-d-glukosamin-1-fosfátu, jenž je nezbytný pro syntézu UDP-N-acetyl-d-glukosaminu. V této studii byla však sloučenina UDP-N-acetylglukosamin identifikována jako charakteristický biomarker kozích jogurtů. V kravských jogurtech nebyl naopak identifikovaný vůbec.

Ve studii Silanikove et al. 2010 byla identifikována sloučenina taurin, jejíž koncentrace v kozím mléce byla 20-40x vyšší než v mléce kravském. V této studii byl taurin identifikovaný v obou kravských i kozích jogurtech. Nevykazoval však žádné diskriminační vlastnosti v rámci charakterizace specifických biomarkerů. Taurin pomáhá regulovat krevní tlak a může mít pozitivní vliv na kardiovaskulární onemocnění (Silanikove et al. 2010). Taurin se také často používá v kombinaci s doplňky zvyšující výkon (kreatin, anabolické steroidy). Podle studie Silanikove et al. 2010 by kozí mléko mohlo být cenným zdrojem taurinu z hlediska stimulace lidského organismu při cvičení.

Různé druhy mlék mají vliv na fyzikální vlastnosti jogurtu a jeho sensorické přijetí konzumenty. V posledních letech se z důvodu zvýšené prevalence alergií na kravskou bílkovinu zvýšil zájem o výrobky z mlék jiných živočišných druhů. Kozí jogurty mají prokázanou vyšší nutriční hodnotu oproti kravským jogurtům, díky čemuž mohou přispět ke zvýšení nabídky těchto mléčných výrobků. Spotřebitelská akceptace těchto produktů je však nízká kvůli charakteristickému kozímu aroma a chuti, jež jsou způsobeny vysokým obsahem kapronových, kaprylových a kaprinových mastných kyselin (De Santis et al. 2019). Cílem studie Ceballos et al. 2009 byla identifikace mezidruhových rozdílů tuků a minerálních látek v kozím a kravském mléce. Autoři potvrdili z hlediska složení tuku dobrou diferenciaci zejména v obsahu mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (C6-C14), které byly potvrzeny vyšší v kozím mléce. V této studii byly charakterizovány deriváty kaprylové a kaprinové kyseliny u obou skupin kravských i kozích jogurtů. Tyto látky nebyly považovány za charakteristické biomarkery kozích jogurtů na rozdíl od orotátu, který byl taktéž identifikovaný v obou skupinách jogurtů, avšak jeho hodnoty vyšly signifikantní ve prospěch kravských jogurtů. Domníváme se, že na koncentraci kaprylové a kaprinové kyseliny v kozích jogurtech mohly mít vliv faktory zahrnující plemeno a genetika zvířete, zdravotní stav, stádium laktace a významným faktorem mohla být taktéž výživa koz.

Senzorika kozích jogurtů je stále podrobována řadě výzkumů, které se snaží najít vhodnou přísadu zmírňující kozí chuť a aroma, jež jsou pro některé konzumenty zajímavé, pro některé naopak. Ve studii Farag et al. 2021 se jako možné přídavky uváděla probiotika, různé druhy ochucujících složek (tropické ovoce, plody kakaovníku) či med. Některé další studie potvrdily významné zlepšení barvy, viskozity a sensorických vlastností jogurtů po přídavku bakterií *Leuconostoc lactis*, dále po přídavku medu nebo hroznového vína společně s probiotickou kulturou *Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. Přídavek probiotických kultur měl pozitivní vliv na aromatické tóny a přijatelnější, méně kyselou chuť pro spotřebitele. V této studii byly použity při výrobě jogurtů kultury *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* spolu s probiotickou kulturou *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. Další alternativou, jak zlepšit fyzikálně-chemické a sensorické vlastnosti kozích jogurtů, je fermentovaný produkt ze směsi kozího a kravského mléka. Díky míchání těchto dvou druhů mlék by mohlo dojít ke zvýšení spotřeby kozích jogurtů. Pro mnohé spotřebitele to může být zajímavá možnost, jak konzumovat tyto jogurty bez toho, aniž by se báli typického kozího aroma a chuti.

Ve studii Costa et al. 2016 vyšly nejlépe poměry 50:50 (kozí:kravské), přičemž u přídavku 75 % kozího mléka a čistého kozího mléka vycházely výrazně nižší průměrná skóre ve srovnání s ostatními poměry. Přídavkem minimálně 50 % kravského mléka se zřejmě potlačily mastné kyseliny (kapronová, kaprylová, kaprinová) zodpovědné za kozí aroma a chuť. Co se týkalo kyselosti jogurtů, nezáleželo tolik na živočišném původu mléka, jako spíš na termofilních mikroorganismech, které produkovaly již výše zmíněné těkavé sloučeniny zodpovědné za vnímanou kyselost. Nebyly tedy pozorovány rozdíly v kyselosti mezi poměry kravských a kozích jogurtů ve studii Costa et al. 2016.

V této studii byla identifikována poměrně rozsáhlá paleta látek v kravských a kozích jogurtech, tyto poznatky mohou být následně využity jako podklad pro další výzkum, který by se mohl hlouběji zaměřit na identifikaci různých biomarkerů, jako příklad lze uvést detekci biomarkerů falšování či sensorických vlastností. Není doposud známo mnoho studií zabývajících se zkoumáním rozdílů kravských a kozích jogurtů za pomoci analytické metody NMR.

7 Závěr

V teoretické části diplomové práce byly popsány principy výroby FMV, taktéž byla charakterizována hygienická a mikrobiální jakost mléka pro výrobu FMV, byly popsány rozdíly mezi kravskými a kozími jogurty a jejich využití v lidské výživě a v neposlední řadě byl shrnut princip NMR spektroskopie, její výhody a nevýhody použití a následné využití v mlékařském sektoru.

Praktická část diplomové práce byla zaměřena na hledání a identifikaci charakteristických látek tzv. biomarkerů, které diskriminují jednotlivé druhy zkoumaných kravských a kozích jogurtů.

Za pomoci PCA analýzy se podařilo úspěšně oddělit dvě testované skupiny jogurtů různého živočišného původu. Statistická analýza OPLS-DA byla schopna potvrdit výsledky získané z PCA analýzy, a dokonce výrazně lépe oddělila vzorky kravských a kozích jogurtů, kde jednotlivé klastry byly lépe oddáleny od sebe. Za pomoci shlukové analýzy (dendrogramu) bylo na základě podobností a odlišností mezi vzorky úspěšně rozděleno 24 kravských a 24 kozích jogurtů. Posledním významným výsledkem bylo VIP skóre, které poskytlo informace o binech, jež se nejvíce podílely na diskriminaci jednotlivých druhů jogurtů. Na základě těchto binů byly identifikovány konkrétní biomarkery. Nejvýznamnějšími látkami kravských jogurtů vyšly N-acetylkarbohydráty, orotát a neznámá látka. Pro kozí jogurty byly nejvýznamnější UDP-sacharidy společně se dvěma biomarkery, které nebylo možné pomocí dostupného softwaru identifikovat.

NMR spektroskopická analýza se jeví jako vhodná metoda pro detekci nízkomolekulárních látek, které jsou zodpovědné za charakterizaci a diskriminaci různých druhů mlék a mléčných výrobků. Tato studie dává základy pro navazující výzkum, který by se mohl zaměřovat na identifikaci dalších charakteristických látek pro snazší diskriminaci jednotlivých jogurtů.

8 Literatura

Agropress. 2018. Somatické buňky v mléce. Agropress. Available from: <https://www.agropress.cz/somaticke-bunky-v-mlece/> (accessed 2022)

Akademie kvality. 2020. Jogurt – jeden denně dokáže zázraky. Státní zemědělský intervenční fond. Available from: <https://www.akademiekvality.cz/clanek/jogurt-jeden-denne-dokaze-zazraky> (accessed May 2020)

Akitt JW, Mann BE. 2017. NMR and Chemistry: An introduction to modern NMR spectroscopy. Crc Press.

Almaas H, Cases AL, Devold TG, Holm H, Langsrud T, Aabakken L, Aadnoey T, Vegarud GE. 2006. In vitro digestion of bovine and caprine milk by human gastric and duodenal enzymes. *International dairy journal* 16:961–968. Elsevier.

Andreotti G, Trivellone E, Motta A. 2006. Characterization of buffalo milk by ³¹P-nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis* 19:843–849. Elsevier.

Ashraf R, Shah NP. 2011. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt—A review. *International journal of food microbiology* 149:194–208. Elsevier.

Bórawski P, Pawlewicz A, Parzonko A, Harper J, Holden L. 2020. Factors shaping cow's milk production in the EU. *Sustainability* 12:420. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

Brescia MA, Monfreda M, Buccolieri A, Carrino C. 2005. Characterisation of the geographical origin of buffalo milk and mozzarella cheese by means of analytical and spectroscopic determinations. *Food Chemistry* 89:139–147. Elsevier.

Brožková. 2015. Výskyt reziduí inhibičních látek (RIL) v surovinách a potravinách živočišného původu. Univerzita Pardubice – Fakulta chemicko-technologická. Available from: https://www.upce.cz/sites/default/binary_www_old/fcht/uechi/crp-msmt-2015/ril-zp.pdf (accessed 2022)

Buděšínský M, Pelnař J. 2000. Fyzikálně-chemické metody (Nukleární magnetická rezonance). Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Praha.

Bursová. 2019. Mikrobiologie syrového mléka a mléčných výrobků. MUNI. Available from: https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjg7dGtmtX1AhXRO-wKHbdrAiwQFnoECBgQAQ&url=https%3A%2F%2Fis.muni.cz%2Ffel%2Fmed%2Fjaro2020%2FMNHV0822p%2Fum%2FPrednaska_NaMSP_LF_MU_mleko_a_mlecne_vyrobky_2018-2019.ppt%3Flang%3Dcs%3Bverze%3D2017&usg=AOvVaw1URb9fh5mCSZcZIJPvhdp8 (accessed 2019)

Caliński T. 2014. Dendrogram. Wiley StatsRef: Statistics Reference Online.

Ceballos LS, Morales ER, de la Torre Adarve G, Castro JD, Martínez LP, Sampelayo MRS. 2009. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *Journal of food Composition and Analysis* 22:322–329. Elsevier.

Chandan RC. 2017. An overview of yogurt production and composition. *Yogurt in health and disease prevention*:31–47. Elsevier.

Chandan RC, Cullen J, Chapman D. 1972. Physicochemical analyses of the bovine milk fat globule membrane. III. Proton magnetic resonance spectroscopy. *Journal of dairy science* 55:1232–1236. Elsevier.

Chatelaine H, Tober K, Yu Z, Hatzakis E, Kopec R. 2021. LC-MS and 1H-NMR Untargeted Metabolomic Profiling of Probiotic Yogurt Consumption in C56BL6/N Mice. *Current Developments in Nutrition*, 5(Supplement_2): 1153-1153.

Cheng H. 2010. Volatile flavor compounds in yogurt: a review. *Critical reviews in food science and nutrition* 50:938–950. Taylor & Francis.

Chong J, Yamamoto M, Xia J. 2019. *MetaboAnalystR 2.0: from raw spectra to biological insights*. *Metabolites* 9:57. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

Clark S, García MBM. 2017. A 100-year review: Advances in goat milk research. *Journal of Dairy Science* 100:10026–10044. Elsevier.

Consonni R, Cagliani LR. 2008. Ripening and geographical characterization of Parmigiano Reggiano cheese by 1H NMR spectroscopy. *Talanta* 76:200–205. Elsevier.

Costa A, Lopez-Villalobos N, Sneddon NW, Shalloo L, Franzoi M, De Marchi M, Penasa M. 2019. Invited review: Milk lactose—Current status and future challenges in dairy cattle. *Journal of dairy science* 102:5883–5898. Elsevier.

Costa MP, Frasco BS, Silva ACO, Freitas MQ, Franco RM, Conte-Junior CA. 2015. Cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) pulp, probiotic, and prebiotic: Influence on color, apparent viscosity, and texture of goat milk yogurts. *Journal of Dairy Science* 98:5995–6003. Elsevier.

Costa RG, Beltrão Filho EM, de Sousa S, da Cruz GRB, Queiroga R de CR do E, da Cruz EN. 2016. Physicochemical and sensory characteristics of yoghurts made from goat and cow milk. *Animal Science Journal* 87:703–709. Wiley Online Library.

ČSÚ. 2019. Spotřeba mléka a mléčných výrobků. Český statistický úřad. Available from: <https://www.czso.cz/csu/czso/spotreba-potravin-2019> (accessed December 2020)

da Costa MP, da Silva Frasco B, da Costa Lima BRC, Rodrigues BL, Junior CAC. 2016. Simultaneous analysis of carbohydrates and organic acids by HPLC-DAD-RI for monitoring goat's milk yogurts fermentation. *Talanta* 152:162–170. Elsevier.

Dalgleish DG, Corredig M. 2012. The structure of the casein micelle of milk and its changes during processing. *Annual review of food science and technology* 3:449–467. Annual Reviews.

De Kruif CG, Huppertz T, Urban VS, Petukhov A V. 2012. Casein micelles and their internal structure. *Advances in colloid and interface science* 171:36–52. Elsevier.

De Santis D, Giacinti G, Chemello G, Frangipane MT. 2019. Improvement of the sensory characteristics of goat milk yogurt. *Journal of food science* 84:2289–2296. Wiley Online Library.

Deng Y, Misselwitz B, Dai N, Fox M. 2015. Lactose intolerance in adults: biological mechanism and dietary management. *Nutrients* 7:8020–8035. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

Dhungana P, Truong T, Palmer M, Bansal N, Bhandari B. 2017. Size-based fractionation of native milk fat globules by two-stage centrifugal separation. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 41:235–243. Elsevier.

Djordjevic J, Ledina T, Baltic MZ, Trbovic D, Babic M, Bulajic S. 2019. Fatty acid profile of milk. *Strana 12057 IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing. Dostálová. 2019. Vývoj a perspektivy výroby mléka ve světě. VÚŽV. Available from: <https://vuzv.cz/2019/07/15/vyvoj-a-perspektivy-vyroby-mleka-ve-svete/> (accessed July 2019)

Dračínský M. 2021. NMR spektroskopie pro chemiky. Univerzita Karlova v Praze, Praha.

Emwas AH, Roy R, McKay RT, Tenori L, Saccenti E, Gowda GA, Raftery D, Alahmari F, Jaremko L, Jaremko M. 2019. NMR spectroscopy for metabolomics research. *Metabolites* 9:123. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

Evropský parlament, Rada Evropské unie. 2004. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 ze dne 29 dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. Oddíl IX – kapitola I-V. Česká republika.

FAO. 1999. Codex General Standard for the Use of Dairy Terms. Milk and milk products. CXS 206 – 1999. Available from: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FStandards%252FCXS%2B206-1999%252FCXS_206e.pdf (accessed May 2021)

FAO. 2021. Milk facts. FAO. Available from: <https://www.fao.org/3/I9966EN/i9966en.pdf> (accessed May 2021)

Farag MA, Saleh HA, El Ahmady S, Elmassry MM. 2021. Dissecting yogurt: The impact of milk types, probiotics, and selected additives on yogurt quality. *Food Reviews International*:1–17. Taylor & Francis.

Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, McSweeney PLH. 2017. Enzymatic coagulation of milk. Strany 185–229 *Fundamentals of cheese science*. Springer.

Fox PF, Uniacke-Lowe T, McSweeney PLH, O'Mahony JA. 2015a. Milk lipids. Strany 69–144 *Dairy chemistry and biochemistry*. Springer.

Fox PF, Uniacke-Lowe T, McSweeney PLH, O'Mahony JA. 2015b. Physical properties of milk. Strany 321–343 *Dairy chemistry and biochemistry*. Springer.

Gemechu T. 2015. Review on lactic acid bacteria function in milk fermentation and preservation. *African Journal of Food Science* 9:170–175. Academic Journals.

Getaneh G, Mebrat A, Wubie A, Kendie H. 2016. Review on goat milk composition and its nutritive value. *J. Nutr. Health Sci* 3:401–410.

Glibowski P, Rybak P. 2016. Rheological and sensory properties of stirred yoghurt with inulin-type fructans. *International Journal of Dairy Technology* 69:122–128. Wiley Online Library.

Günther H. 2013. *NMR spectroscopy: basic principles, concepts and applications in chemistry*. John Wiley & Sons.

Hanuš O, Manga I, Vyletělová M, Genčurová V, Kopecký J, Jedelská R. 2011. Význam sledování minoritních složek mléka pro zdraví zvířat a analytické možnosti jejich monitoringu. *Mlékařské listy* 127: 14-19.

Hanuš O. 2014. Volné mastné kyseliny v mléce jako ukazatel kvality se vztahem ke zdravotnímu stavu krav. Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha. Available from: <https://www.mastitis.cz/store/12-volne-mastne-kyseliny-v-mlece-jako-ukazatel-kvality-se-vztahem-ke-zdravotnimu-stavu-krav.pdf> (accessed February 2022)

Hatzakis E. 2019. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy in food science: A comprehensive review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 18:189–220. Wiley Online Library.

Hersh J. 2021. *Yoghurt: A Global History*. Reaktion Books.

Hoffman RE. 2006. Standardization of chemical shifts of TMS and solvent signals in NMR solvents. *Magnetic Resonance in Chemistry* 44:606–616. Wiley Online Library.

Ibrahim A, Naufalin R, Muryatmo E, Dwiyantri H. 2021. Comparative study between cow and goat milk yogurt based on composition and sensory evaluation. *Strana 12001 IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing.

Indy HE, Woollar DC. 2004. Determination of orotic acid, uric acid, and creatinine in milk by liquid chromatography. *Journal of AOAC International* 87:116–122. Oxford University Press.

Janštová B, Vorlová L, Navrátilová P, Králová M, Necidová L, Mařicová E. 2012. *Technologie mléka a mléčných výrobků*. Brno, Veterinární a farmaceutická univerzita.

Jia R, Chen H, Chen H, Ding W. 2016. Effects of fermentation with *Lactobacillus rhamnosus* GG on product quality and fatty acids of goat milk yogurt. *Journal of dairy science* 99:221–227. Elsevier.

Jirě B. 2007. Minulost a současnost NMR spektrometrie - pohled od nitra molekul a člověka. *Chemické listy* 101:122–130.

Kautská J, Křížová Z, Samková E, Konečný R, Trávníček J. 2018. Vztah obsahu volných mastných kyselin v mléce a ukazatelů energetického deficitu u dojnic v první fázi laktace. *Mlékařské listy* 169, Vol. 29, No. 4.

Kew W, Goodall I, Uhrin D. 2019. Analysis of Scotch Whisky by ¹H NMR and chemometrics yields insight into its complex chemistry. *Food chemistry* 298:125052. Elsevier.

Kim SW, Ban SH, Jeong SC, Chung HJ, Ko SM, Yoo OJ, Liu JR. 2007. Genetic discrimination between *Catharanthus roseus* cultivars by metabolic fingerprinting using ¹H NMR spectra of aromatic compounds. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 12(6), 646–652.

Klein MS, Buttchereit N, Miemczyk SP, Immervoll A-K, Louis C, Wiedemann S, Junge W, Thaller G, Oefner PJ, Gronwald W. 2012. NMR metabolomic analysis of dairy cows reveals milk glycerophosphocholine to phosphocholine ratio as prognostic biomarker for risk of ketosis. *Journal of proteome research* 11:1373–1381. ACS Publications.

Konečná H, Strnadová D, Šustová K, Kuchtík J. 2014. Vliv způsobu skladování kozího mléka na jeho syřitelnost. *Mlékařské listy* 147: 34-38.

Kopáček J. 2018. Fermentované mléčné výrobky a vývoj jejich spotřeby v Evropě, v ČR a ve světě. *Mlékařské listy* 170: Vol. 29, No. 5.

Kuballa T, Brunner TS, Thongpanchang T, Walch SG, Lachenmeier DW. 2018. Application of NMR for authentication of honey, beer and spices. *Current opinion in food science* 19:57–62. Elsevier.

Kvapilík, J., Syrůček, J. 2019. Vývoj a perspektivy výroby mléka ve světě. *Náš chov*, roč. 79, č. 2, str. 90-94.

Lad SS, Aparnathi KD, Mehta B, Velpula S. 2017. Goat milk in human nutrition and health –a review. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 6:1781–1792.

Lisson M, Novak N, Erhardt G. 2014. Immunoglobulin E epitope mapping by microarray immunoassay reveals differences in immune response to genetic variants of caseins from different ruminant species. *Journal of dairy science* 97:1939–1954. Elsevier.

Lu Y, Hu F, Miyakawa T, Tanokura M. 2016. Complex mixture analysis of organic compounds in yogurt by NMR spectroscopy. *Metabolites* 6:19. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

Lu Y, Ishikawa H, Kwon Y, Hu F, Miyakawa T, Tanokura M. 2018. Real-time monitoring of chemical changes in three kinds of fermented milk products during fermentation using quantitative difference nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of agricultural and food chemistry* 66:1479–1487. ACS Publications.

MacGibbon AKH. 2020. Composition and structure of bovine milk lipids. Pages 1–32 *Advanced Dairy Chemistry, Volume 2*. Springer.

Machado TADG, de Oliveira MEG, Campos MIF, de Assis POA, de Souza EL, Madruga MS, Pacheco MTB, Pintado MME, do Egypto R de CR. 2017. Impact of honey on quality characteristics of goat yogurt containing probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Lwt* 80:221–229. Elsevier.

Mahdalová P, Janštová B. 2016. Mlékařské mikrobiální kultury – čisté mlékařské kultury (ČMK). Veterinární univerzita Brno. Available from: https://www.vfu.cz/files/2340_56_mlekarske-mikrobialni-kultury.pdf (accessed March 2022)

Maher AD, Rochfort SJ. 2014. Applications of NMR in dairy research. *Metabolites* 4:131–141. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

Markiewicz-Kęszycka M, Czyżak-Runowska G, Lipińska P, Wójtowski J. 2013. Fatty acid profile of milk-a review. *Journal of Veterinary Research* 57:135–139.

Markley JL, Brüschweiler R, Edison AS, Eghbalnia HR, Powers R, Raftery D, Wishart DS. 2017. The future of NMR-based metabolomics. *Current opinion in biotechnology* 43:34–40. Elsevier.

Martin NH, Ranieri ML, Wiedmann M, Boor KJ. 2012. Reduction of pasteurization temperature leads to lower bacterial outgrowth in pasteurized fluid milk during refrigerated storage: A case study. *Journal of dairy science* 95:471–475. Elsevier.

Massoud R, Belgheisi S, Massoud A. 2016. Effect of high pressure homogenization on improving the quality of milk and sensory properties of yogurt: a review. *International Journal of Chemical Engineering and Applications* 7:66. IACSIT Press.

Mazzei P, Piccolo A. 2012. ¹H HRMAS-NMR metabolomic to assess quality and traceability of mozzarella cheese from Campania buffalo milk. *Food Chemistry* 132:1620–1627. Elsevier.

Mátlová V, Sztankóová Z. 2010. Využití polymorfismu genů mléčných bílkovin pro zlepšení kvalitativních a technologických vlastností mléka koz. *Výzkumný ústav živočišné výroby. Praha Uhřetěves*.

McCarthy OJ, Singh H. 2009. Physico-chemical properties of milk. Strany 691–758 *Advanced dairy chemistry*. Springer.

Meybodi NM, Mortazavian AM, Arab M, Nematollahi A. 2020. Probiotic viability in yoghurt: A review of influential factors. *International Dairy Journal* 109:104793. Elsevier.

Ministerstvo zemědělství. 2016. Věstník Ministerstva zemědělství ČR– Zpřesnění pravidel certifikace produktů v režimu jakosti Q1 u producentů a zpracovatelů zemědělských produktů. Částka 1. Česká republika.

Ministerstvo zemědělství. 2016. Vyhláška č. 397/2016 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy, jedlé tuky a oleje. Page 6261 in *Sbírka zákonů České republiky, 2016, částka 162*. Česká republika.

Ministerstvo zemědělství. 2019. Vyhláška č. 274/2019 Sb., kterou se mění vyhláška č. 397/2016 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy, tuky a oleje. Page 2795–2801 in Sbírka zákonů České republiky, 2019, částka 119. Česká republika.

Mohan A, Hadi J, Gutierrez-Maddox N, Li Y, Leung IK, Gao Y, Shu Q, Quek SY. 2020. Sensory, microbiological and physicochemical characterisation of functional manuka honey yogurts containing probiotic *Lactobacillus reuteri* DPC16. *Foods*, 9.1: 106.

Motarjemi Y, Moy GG, Jooste PJ, Anelich LE. 2014. Milk and dairy products. Strany 83–117 *Food safety management*. Elsevier.

Munyaneza N, Niyukuri J, El Hachimi Y. 2017. Milk urea nitrogen as an indicator of nitrogen metabolism efficiency in dairy cows: a review. *Theriogenology Insight* 7:145–159. New Delhi Publishers.

Navrátilová P. 2002. Problematika reziduí inhibičních látek v syrovém kravském mléce. *J. Veterinářství* 52:478–481.

Navrátilová P, Králová M, Janštová B, Přidalová H, Cupáková Š, Vorlová L. 2012. Hygiena produkce mléka. Brno, Veterinární a farmaceutická univerzita.

OECD & FAO. 2021. Dairy and dairy products. OECD & FAO. Available from: <https://www.fao.org/3/CB5332EN/Dairy.pdf> (accessed 2021)

Pal M, Dudhrejya TP, Pinto S, Brahamani D, Vijayageetha V, Reddy YK, Roy P, Chhetri A, Sarkar S, Kate P. 2017. Goat milk products and their significance. *Beverage & food world* 44:21–25.

Park YW. 2010. Goat milk: composition, characteristics. *Encyclopedia of animal science*. CRC Press, Boca Raton.

Park YW. 2017. Goat milk—chemistry and nutrition. *Handbook of milk of non-bovine mammals*:42–83. Wiley Online Library.

Park YW, Juárez M, Ramos M, Haenlein GFW. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small ruminant research* 68:88–113. Elsevier.

Podhorecká K, Borková M, Šulc M, Seydlová R, Dragounová H, Švejcarová M, Peroutková J, Elich O. 2021. Somatic Cell Count in Goat Milk: An Indirect Quality Indicator. *Foods* 10:1046. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

Pokorný J. 2015. Nasycené mastné kyseliny v tucích: nepůsobí všechny stejně. Společnost pro výživu. *Výživa a potraviny* 2006/4. Available from: <https://www.vyzivaspol.cz/nasycene-mastne-kyseliny-v-tucich-nepusobi-vsechny-stejne/> (accessed February 2022)

Popa I, Novotná R. 2012. Základy NMR spektroskopie. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Olomouc.

Ralli E, Amargianitaki M, Manolopoulou E, Misiak M, Markakis G, Tachtalidou S, Kolesnikova A, Dais P, Spyros A. 2018. NMR Spectroscopy Protocols for Food Metabolomics Applications. Strany 203–211 Metabolic Profiling. Springer.

Ranadheera CS, Evans CA, Adams MC, Baines SK. 2012. Probiotic viability and physico-chemical and sensory properties of plain and stirred fruit yogurts made from goat's milk. Food chemistry 135:1411–1418. Elsevier.

Ranadheera CS, Evans CA, Baines SK, Balthazar CF, Cruz AG, Esmerino EA, Freitas MQ, Pimentel TC, Wittwer AE, Naumovski N. 2019. Probiotics in goat milk products: Delivery capacity and ability to improve sensory attributes. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 18:867–882. Wiley Online Library.

Robinson RK, Lucey JA, Tamime AY. 2006. Manufacture of yoghurt. Fermented milks:53–75. Blackwell Publishing, London.

Rodrigues D, Santos CH, Rocha-Santos TAP, Gomes AM, Goodfellow BJ, Freitas AC. 2011. Metabolic profiling of potential probiotic or synbiotic cheeses by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. Journal of agricultural and food chemistry 59:4955–4961. ACS Publications.

Roussel S, Bellon-Maurel V, Roger JM, Grenier P. 2003. Authenticating white grape must variety with classification models based on aroma sensors, FT-IR and UV spectrometry. Journal of Food Engineering 60:407–419. Elsevier.

Rysová L. 2016. Dotace na Q CZ mléko – kdy přijdou první miliony. Agropress. Available from: <https://www.agropress.cz/dotace-na-q-cz-mleko-kdy-prijdou-prvni-miliony/> (accessed October 2016)

Rysová L. 2018. Druhy mléka a jeho složení. Agropress. Available from: <https://www.agropress.cz/druhy-mleka-a-slozeni/> (accessed April 2018)

Savard P, Lamarche B, Paradis ME, Thiboutot H, Laurin É, Roy D. 2011. Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and, *Lactobacillus acidophilus* LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. International journal of food microbiology 149:50–57. Elsevier.

Shihata A, Shah NP. 2002. Influence of addition of proteolytic strains of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to commercial ABT starter cultures on texture of yoghurt, exopolysaccharide production and survival of bacteria. *International Dairy Journal* 12:765–772. Elsevier.

Siefarth C, Buettner A. 2014. The aroma of goat milk: Seasonal effects and changes through heat treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62:11805–11817. ACS Publications.

Silanikove N, Leitner G, Merin U, Prosser CG. 2010. Recent advances in exploiting goat's milk: quality, safety and production aspects. *Small Ruminant Research* 89:110–124. Elsevier.

Slačanac V, Božanić R, Hardi J, Rezessyné Szabó J, Lučan M, Krstanović V. 2010. Nutritional and therapeutic value of fermented caprine milk. *International Journal of Dairy Technology* 63:171–189. Wiley Online Library.

Snášelová J, Motyčková M, Zikán V. 2009. Hustota mléka a smetany v závislosti na teplotě a obsahu tuku. *Mlékařské listy* 113/114: 18-21.

St-Gelais D, Ali OB, Turcot S. 2000. Composition of goat's milk and processing suitability.

Staněk S. 2009. Dojená plemena koz. Available from: <https://www.zootechnika.cz/clanky/chov-koz/plemena-koz/dojena-plemena-koz.html> (accessed February 2022)

Straková K. 2020. Komoditní karta – Spotřeba mléka a mléčných výrobků. Český statistický úřad. Available from: http://eagri.cz/public/web/file/665908/Komoditni_karta_Mleko_zari_2020.pdf (accessed November 2020)

Strzałkowska N, Józwiak A, Bagnicka E, Krzyżewski J, Horbańczuk K, Pyzel B, Słoniewska D, Horbańczuk JO. 2010. The concentration of free fatty acids in goat milk as related to the stage of lactation, age and somatic cell count. *Animal Science Papers and Reports* 28:389–395. Polish Academy of Sciences, Institute of Genetics and Animal Breeding.

Sundekilde UK, Larsen LB, Bertram HC. 2013. NMR-based milk metabolomics. *Metabolites* 3:204–222. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

Svoboda M. 2019. Do nejvyšších tříd jakosti, tj. Q a 1. jakostní třída, je v České republice zařazeno 97 % vyráběného mléka!. Agrární komora, Českomoravský svaz mlékárenský. Available from: <https://www.odbory.info/obsah/5/do-nejvyssich-trid-jakosti-tj-q-1-jakostni-trida-je-v-ceske/111993> (accessed August 2019)

Šnirc J, Golian J, Buňka F, Buňková L, Čanigová M, Herian K, Černíková M, Pachlová V. 2016. Mlieko a mliečne výrobky. II. diel – Technológia výroby mliečnych výrobkov. Garmond Nitra, Nitra.

Štolcová M. 2020. Mastné kyseliny v kravském mléce: význam, syntéza, metabolismus a vztah k energetické bilanci dojníc. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i. Available from: <https://www.ctpz.cz/vyzkum/masne-kyseliny-v-kravskem-mlece-vyznam-synteza-metabolismus-a-vztah-k-energeticke-bilanci-dojnic-1042> (accessed December 2020)

Tamang JP, Cotter PD, Endo A, Han NS, Kort R, Liu SQ, Mayo B, Westerik N, Hutkins R. 2020. Fermented foods in a global age: East meets West. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19:184–217. Wiley Online Library.

Trimigno A, Bøge Lyndgaard C, Atladóttir GA, Aru V, Balling Engelsen S, Harder Clemmensen LK. 2020. An NMR metabolomics approach to investigate factors affecting the yoghurt fermentation process and quality. *Metabolites* 10:293. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.

Troch T, Lefébure É, Baeten V, Colinet F, Gengler N, Sindic M. 2017. Cow milk coagulation: process description, variation factors and evaluation methodologies. A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 21. Presses Agronomiques de Gembloux.

van Leeuwen SS, Te Poele EM, Chatziioannou AC, Benjamins E, Haandrikman A, Dijkhuizen L. 2020. Goat milk oligosaccharides: their diversity, quantity, and functional properties in comparison to human milk oligosaccharides. *Journal of agricultural and food chemistry* 68:13469–13485. ACS Publications.

Varnam A, Sutherland JP. 2001. *Milk and milk products: technology, chemistry and microbiology*. Springer Science & Business Media.

VÚM. 2016. Úskalí referenčního a instrumentálního stanovení CPM v syrovém mléce při kontrole kvality. Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o. Available from: <https://www.mastitis.cz/store/03-uskali-referencniho-a-instrumentalniho-stanoveni-cpm-v-syrovem-mlece-pri-kontrole-kvality.pdf> (accessed 2021)

Walstra P, Walstra P, Wouters JTM, Geurts TJ. 2005. *Dairy science and technology*. CRC press.

Wang W, Bao Y, Hendricks GM, Guo M. 2012. Consistency, microstructure and probiotic survivability of goats' milk yoghurt using polymerized whey protein as a co-thickening agent. *International Dairy Journal* 24:113–119. Elsevier.

Wang X, Kristo E, LaPointe G. 2020. Adding apple pomace as a functional ingredient in stirred-type yogurt and yogurt drinks. *Food Hydrocolloids* 100:105453. Elsevier.

Widyastuti Y, Febrisiantosa A. 2014. The role of lactic acid bacteria in milk fermentation. Food and Nutrition Sciences 2014. Scientific Research Publishing.

Wishart DS, Bigam CG, Yao J, Abildgaard F, Dyson HJ, Oldfield E, Markley JL, Sykes BD. 1995. 1 H, 13 C and 15 N chemical shift referencing in biomolecular NMR. Journal of biomolecular NMR 6:135–140. Springer.

Zaalberg RM, Buitenhuis AJ, Sundekilde UK, Poulsen NA, Bovenhuis H. 2020. Genetic analysis of orotic acid predicted with Fourier transform infrared milk spectra. Journal of Dairy Science 103:3334–3348. Elsevier.

Zagorska J, Ciprovica I. 2013. Evaluation of factors affecting freezing point of milk. International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering 7:106–111. Citeseer.

ZSČR. 2020. Manuál k programu Q CZ. Zemědělský svaz České republiky. Ministerstvo zemědělství. Available from: <https://www.zscr.cz/clanek/manual-k-programu-q-cz-4793> (accessed 2022)