

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2017

Bc. MARTINA ANDRÝSKOVÁ

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav technologie potravin



**Agronomická
fakulta**

**Mendelova
univerzita
v Brně**



Probiotické mikroorganismy
ve fermentovaných mléčných výrobcích
Diplomová práce

Vedoucí práce:
MVDr. Olga Cwиковá, Ph.D.

Vypracovala:
Bc. Martina Andrýsková

Brno 2017

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: „Probiotické mikroorganismy ve fermentovaných mléčných výrobcích“ vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....
podpis

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou ráda bych poděkovala MVDr. Olze Cwиковé, Ph.D. za odborné vedení, čas a trpělivost. Dále chci poděkovat ostatním členům mikrobiologické laboratoře a v neposlední řadě také mojí rodině a nejbližším za velkou podporu během celého studia.

ABSTRAKT

Probiotika jsou živé mikroorganismy s pozitivním vlivem na zdraví konzumenta, jestliže jsou konzumovány v adekvátním množství. Nevýhodou probiotických mikroorganismů je jejich značná nestabilita. Vzhledem ke stále se zvyšující poptávce po probiotických potravinách vzniká tlak na jejich kvalitu. Tato práce s názvem „Probiotické mikroorganismy ve fermentovaných mléčných výrobcích“ zkoumá, do jaké míry je kvalita probiotických potravin ovlivněna nakládáním zákazníka s nimi. Byl proto sledován vliv teploty (4 °C a 10 °C) a doby skladování na počet bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií u fermentovaných mléčných výrobků (jogurt a keřirové mléko), a to pomocí kultivačních metod. Bylo také provedeno stanovení počtu deklarovaných prospěšných bakterií u dětské výživy.

Na základě výsledků tohoto pokusu lze říci, že doba skladování významně ovlivnila počet sledovaných bakterií ve fermentovaných mléčných produktech, avšak legislativní limity byly splněny i na konci jejich trvanlivosti. Počet bifidobakterií u dětské výživy také odpovídal údajům na etiketě. Teplota skladování však neměla, až na jeden případ, na počet sledovaných bakterií vliv. Konzumentovi fermentovaných mléčných výrobků lze tedy doporučit jejich skladování spíše při nižší teplotě. Je také žádoucí konzumovat tyto potraviny co nejčerstvější.

Klíčová slova: stabilita probiotik, probiotické produkty, bifidobakterie

ABSTRACT

Probiotics are living microorganisms with positive impact on consumer's health if consumed in adequate amounts. The disadvantage of probiotic microorganisms is its considerable instability. Due to increasing demand for probiotic foods created pressure on the quality of these products. This thesis called "Probiotic microorganisms in fermented milk products", examines how the quality is affected by customer's behaviour. The effect of temperature (4 °C and 10 °C) and storage time for the number of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk products (yoghurt and kefir milk) was examined by cultivation methods. The number of beneficial bacteria in baby food was also specified.

Based on the results of this experiment it can be said, that the storage time significantly affects the amount of considered bacteria in fermented dairy products, but the legislative limits were met even at their expiration date. The amount of bifidobacteria in the baby food also matched the declared values. The storage temperature didn't affect the amount of considered bacteria observed effect, however there was one exception. Storage of fermented dairy products at lower temperature can be recommended for customers. It is also desirable to consume these foods as fresh as possible.

Key words: probiotics stability, probiotics products, bifidobacteria

OBSAH

1	Úvod.....	9
2	Cíl práce.....	10
3	Literární přehled	11
3.1	Funkční potravina.....	11
3.2	Definice probiotik	11
3.3	Prebiotika	12
3.3.1	Požadavky na prebiotika	12
3.3.2	Působení prebiotik	13
3.4	Synbiotika	13
3.5	Mikroflóra trávicího traktu.....	14
3.5.1	Funkce mikroflóry trávicího traktu.....	14
3.5.2	Mikroflóra trávicího traktu novorozenců a dětí.....	15
3.5.3	Mikroflóra trávicího traktu u dospělých osob.....	15
3.6	Bakterie mléčného kvašení	16
3.6.1	Význam bakterií mléčného kvašení	17
3.7	Probiotické mikroorganismy	18
3.7.1	Rod <i>Lactobacillus</i>	21
3.7.2	Rod <i>Bifidobacterium</i>	22
3.7.3	Analýza probiotik	22
3.7.4	Požadavky na probiotika.....	24
3.7.5	Mechanismus působení probiotik	25
3.7.6	Zdravotní účinky probiotik	26
3.7.6.1	Stimulace imunitního systému	26
3.7.6.2	Gastrointestinální infekce	27
3.7.6.3	Infekce dýchacích cest.....	27
3.7.6.4	Urogenitální infekce	28

3.7.6.5	Rakovina střeva	28
3.7.6.6	Alergie	29
3.7.6.7	Zánětlivá střevní onemocnění.....	29
3.7.6.8	Laktózová intolerace	29
3.8	Stabilita probiotik.....	30
3.8.1	Kombinace probiotických mikroorganismů a zákysových kultur	31
3.8.2	Vodní aktivita	32
3.8.3	Množství rozpuštěného kyslíku	32
3.8.4	Velikost inokula.....	33
3.8.5	Inkubační teplota.....	33
3.8.6	Potravinová matrice	33
3.8.7	pH.....	34
3.8.8	Teplota skladování	34
3.8.9	Enkapsulace probiotik.....	35
3.9	Probiotické produkty	36
3.9.1	Fermentované mléčné výrobky.....	36
3.9.1.1	Výroba fermentovaných mléčných výrobků	36
3.9.1.2	Probiotické kultury	37
3.9.1.3	Fermentované mléčné výrobky s mezofilními bakteriemi	38
3.9.1.4	Fermentované výrobky s termofilními bakteriemi	39
3.9.1.5	Fermentované výrobky s bakteriemi a kvasinkami	39
3.9.2	Kojenecká výživa.....	40
3.9.2.1	Přirozená výživa kojence.....	40
3.9.2.2	Umělá kojenecká výživa.....	41
3.10	Legislativní úprava	42
4	Materiál a metodika	44
4.1	Použitý materiál	44

4.1.1	Přístroje	44
4.1.2	Pomůcky	44
4.1.3	Chemikálie	45
4.1.4	Kultivační média	45
4.1.4.1	MRS médium	45
4.1.4.2	BSM médium	46
4.1.5	Vzorky	47
4.1.5.1	Kefírové mléko	47
4.1.5.2	Jogurt	48
4.1.5.3	Dětská výživa	48
4.2	Použité metody	49
4.2.1	Stanovení počtu bakterií mléčného kvašení a bakterií rodu <i>Bifidobacterium</i> sp. plotnovou metodou	49
4.2.1.1	Příprava kultivační půdy	50
4.2.1.2	Příprava ředění	50
4.2.1.3	Kultivační vyšetření	50
4.2.1.4	Hodnocení	51
4.2.1.5	Vyjádření výsledků	51
4.2.1.6	Zpracování výsledků	52
5	Výsledky	53
5.1	Analýza fermentovaných mléčných výrobků a dětské výživy	53
5.1.1	Kultivace	53
5.1.2	Počty bakterií ve fermentovaných mléčných výrobcích v závislosti na době skladování	55
5.1.3	Počet bakterií v dětské výživě	59
5.1.4	Počty bakterií ve fermentovaných mléčných výrobcích skladovaných při různých teplotách	60

6	Diskuse.....	65
7	Závěr	69
8	Literatura.....	71
9	Seznam obrázků.....	79
10	Seznam tabulek.....	80

1 ÚVOD

Za probiotika jsou považovány živé mikroorganismy, které pozitivně ovlivňují zdraví konzumenta. Možné pozitivní účinky probiotik na lidské zdraví zmínil již na počátku 20. století Ellie Metchnikoff, a i když je koncept probiotik znám téměř století, jejich význam pro medicínské využití byl doceněn teprve nedávno. Konzumovat probiotika spolu s prebiotiky pro zlepšení stavu střevní mikroflóry roste na významu nejen v humánní, ale také ve veterinární medicíně.

Z Asie se probiotika postupně dostala na trh Evropy a Ameriky a v současnosti je trh s probiotiky jedním z nejvíce rostoucích trhů s funkčními potravinami, přičemž více než polovinu trhu s probiotiky tvoří mléčné produkty.

Probiotika jsou charakterizována jako živé mikroorganismy s pozitivním účinkem na lidské zdraví, jsou-li konzumována v adekvátním množství. Probiotické účinky jsou připisovány zejména bakteriím mléčného kvašení a bifidobakteriím.

Zvyšující se poptávka po probiotických potravinách vede k tlaku na výrobce produkovat vysoce kvalitní výrobky s maximálním množstvím živých probiotických mikroorganismů tak, aby měl probiotický výrobek pro konzumenta zdravotní přínos. Stabilita probiotických mikroorganismů je však v průběhu jejich výroby, zpracování a skladování ovlivněna celou řadou faktorů.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo prostudovat problematiku probiotických mikroorganismů a zaměřit se zejména na faktory, které mohou ovlivnit jejich počet v probiotických produktech, následně provést rozbor fermentovaných mléčných výrobků v určitých intervalech skladování a v průběhu skladování sledovat vliv zvolených faktorů na jejich počet. Získané výsledky následně vyhodnotit, porovnat je s legislativními limity a provést zhodnocení vlivu jednotlivých faktorů (teploty a doby skladování) na počet probiotických mikroorganismů v těchto fermentovaných mléčných produktech. Dle získaných výsledků poté navrhnout nejvhodnější dobu konzumace vybraných fermentovaných mléčných produktů, a to s ohledem na pozitivní účinky probiotických mikroorganismů, v nich obsažených, na lidský organismus.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Funkční potravina

Primární funkcí potravin je poskytování živin. Funkční potraviny však také kromě dodávání živin působí příznivě na jednu či více důležitých funkcí v těle a zlepšují tak zdraví konzumenta a/nebo působí preventivně. Jsou určeny pro zdravou populaci a vykazují příznivé účinky již v množství jejich běžné spotřeby. Jedná se o přirozené potraviny, do kterých byly přidány nebo z nich byly odstraněny určité složky. Může jít také o potraviny, u kterých je biologická dostupnost složek upravena technologickými či biotechnologickými metodami (Nagpal et al., 2014). Funkční potraviny tvoří přechodnou skupinu mezi konvenčními potravinami a léky (Kastnerová, 2011). Jedním z hlavních rozdílů mezi funkčními potravinami a léky je doba, za kterou se projeví jejich příznivé účinky. U léků jsou to dny až měsíce, zatímco u funkčních potravin i několik let (Tománková et al., 2006).

Termín funkční potravina byl poprvé použit v Japonsku v roce 1980. První funkční potravinou zde byl fermentovaný mléčný nápoj Yakult s obsahem probiotik (Nagpal et al., 2014). Potraviny obsahující probiotické mikrobiální kultury jsou považovány za potraviny funkční (Horáčková, Šviráková, 2009).

3.2 Definice probiotik

Slovo probiotikum pochází z řečtiny a znamená „pro život“. Jedná se o opak slova antibiotikum, které znamená „proti životu“ (Nagpal et al., 2014). Existuje několik definic probiotik. Ta dle Fullera z roku 1989 říká, že probiotikum je živý mikrobiální doplněk, který pozitivně ovlivňuje zdraví hostitele zlepšením rovnováhy jeho střevní mikroflóry. FAO/WHO (Organizace pro výživu a zemědělství a Světová zdravotnická organizace) označuje probiotika jako živé mikroorganismy, které při příjmu v jejich adekvátním množství poskytují svému konzumentovi zdravotní výhody (Nagpal et al., 2014). Další definice říká, že se jedná o živou kulturu, která je přijímána

s potravinami a má příznivý vliv na střevní mikroflóru konzumenta (Kastnerová, 2011). Jiná studie zase rozšiřuje pojem probiotik o monokultury nebo smíšené kultury živých mikroorganismů, které u člověka či zvířat pozitivně zlepšují vlastnosti střevní mikroflóry (Forsythe, 2000).

Probiotika mohou být konzumována buď ve formě doplňků stravy nebo přímo jako součást některých potravin (Nagpal et al. 2014).

3.3 Prebiotika

Jsou nestravitelnými a neživými složkami potravin, které selektivně podporují růst, případně aktivitu jednoho či více probiotických mikroorganismů tlustého střeva, přičemž mohou působit pozitivně na zdraví konzumenta (Forsythe, 2000).

Mezi prebiotika se řadí fruktooligosacharidy, některé oligosacharidy a určité polysacharidy (Zbořil, 2005). Přírodním potravinovým prebiotikem je vláknina, vyskytující se v zelenině a obilovinách (Beneš, 2009), přičemž prebiotika by měla tvořit asi 20 % objemu přijaté potravy a 10 % celkového energetického příjmu (Frič, 2010).

Jsou většinou získávána extrakcí z rostlin, enzymatickou hydrolýzou rostlinných polysacharidů nebo transgalaktosylací katalyzovanou enzymy za použití mono nebo disacharidů jako substrátu a jsou často začleňována do potravin, aby zlepšovala střevní mikroflóru konzumenta, popřípadě vylepšila organoleptické vlastnosti výrobku (Fu, Wang, 2014). Přidávají se do potravin, jako jsou nápoje, jogurty, sušenky či pomazánky (Nagpal et al., 2014).

3.3.1 Požadavky na prebiotika

Prebiotika nesmí být degradována v horní části trávicího traktu, ale musí proniknout až do tlustého střeva, aby tam byla využita určitými druhy bakterií (Beneš, 2009). Je tedy žádoucí, aby byla odolná k procesům trávení, byla fermentována bakteriemi tlustého střeva a zároveň měla selektivní efekt na mikroorganismy s pozitivními účinky na zdraví. Poslední podmínku je často nejtěžší naplnit. Měla by být také chemicky

stabilní, a to zejména k nízkému pH, vysoké teplotě a podmínkám Maillardovy reakce. Jejich chemická stabilita se snižuje zejména při záhřevu za nízkého pH. Prebiotika jsou obecně považována za bezpečná (Fu, Wang, 2014).

3.3.2 Působení prebiotik

Mezi pozitivní vlastnosti prebiotik patří nízká energetická hodnota a příznivý vliv na složení mikroflóry tlustého střeva. Podporují totiž růst bifidobakterií a potlačují růst a aktivitu patogenních bakterií, zejména pak klostridií. Kromě toho zvětšují objem stolice, čímž klesá výskyt zácpy.

Pravděpodobným přínosem prebiotik je snížení hladiny krevního cholesterolu, posílení imunitního systému, prevence střevních infekcí a průjmů či jejich zmírnění, prevence rakoviny tlustého střeva a konečníku a zvýšení využitelnosti vápníku – působí tedy preventivně proti vzniku osteoporózy (Kalač, 2003; Fu, Wang, 2014).

Mikrobiální enzymy štěpí prebiotika na substráty významné pro střevní mikroflóru i střevní sliznici (Frič, 2010). Mezi tyto substráty patří mastné kyseliny, přičemž některým z nich se přičítá preventivní působení proti vzniku rakoviny tlustého střeva (Tomanová, 2006). Těmito mastnými kyselinami jsou octová, propionová a máselná kyselina (Nagpal et al., 2014).

3.4 Synbiotika

Jako synbiotikum je označována směs probiotik a prebiotik (Nagpal et al., 2014). Pro zlepšení stavu střevní mikroflóry je vhodné konzumovat probiotika zároveň s prebiotiky (Kolářová et al., 2012), protože jejich kombinace může působit synergicky, jelikož probiotika působí v tenkém střevě a prebiotika zase jen v tlustém střevě (Goering et al., 2016).

Konzumace synbiotik je tedy pravděpodobně účinnější než samostatná konzumace probiotik (Kolářová et al., 2012) a prebiotik (Allsopp, Rowland, 2009).

Synbiotika mají velký potenciál, ale jejich použití musí předcházet vhodný výzkum, neboť jednotlivé kmeny probiotických mikroorganismů mají různé požadavky na substrát. Účinné je spojení bifidobakterií s fruktooligosacharidy nebo laktobacilů s laktitoly (Nagpal et al., 2014).

3.5 Mikroflóra trávicího traktu

Mikroflóru trávicího traktu tvoří vyvážený mikrobiální ekosystém s metabolickou aktivitou, který úzce souvisí se zdravím a nemocí (Zbořil, 2005).

Celkový počet střevních mikroorganismů je asi 10^{14} (Frič, 2010), přičemž v žaludku se vyskytuje přibližně $10^1 - 10^2$ KTJ.g⁻¹ mikroorganismů, v tenkém střevě pak $10^4 - 10^8$ KTJ.g⁻¹ mikroorganismů a v tlustém střevě 10^{12} KTJ.g⁻¹ mikroorganismů. Odhaduje se, že v trávicím traktu se nachází kolem 400 druhů bakterií (Opletal, 2010).

Poměrné zastoupení aerobních a anaerobních mikroorganismů se v různých částech trávicího traktu různí, přičemž v žaludku anaerobní mikroorganismy zcela chybí, zatímco v kolonu převládají. Aeroby zajišťují anaerobům podmínky pro růst díky vychytávání volných kyslíkových radikálů (Zbořil, 2005).

Převažujícím rodem je *Bacteroides*, v počtu asi 10^{11} KTJ.g⁻¹. Dalším významným rodem v trávicím traktu je *Bifidobacterium* (*B. bifidum*, *B. breve*), Jeho počet činí asi $10^8 - 10^9$ KTJ.g⁻¹ fekálie. Vyskytuje se zde také rod *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. leichmannii*, *L. minutus*, *L. plantarum*) v počtu asi $10^7 - 10^8$ KTJ.g⁻¹ fekálie. Dalšími mikroorganismy trávicího traktu jsou *Clostridium*, *Enterococcus*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Enterococcus*, *Ruminococcus*, *Proteus*, *Klebsiella* a *Escherichia coli* (Forsythe, 2000).

3.5.1 Funkce mikroflóry trávicího traktu

Základní funkcí střevního mikrobiálního systému je mikrobiální bariéra proti patogenům, tvorba produktů, které mají vliv na prokrvení střevní mukózy a motilitu, stimulace střevního imunitního systému, produkce vitaminů a omezování přestupu

bakterií z trávicího traktu do lymfatického systému a následně do tkání organismu (Zbořil, 2005).

3.5.2 Mikroflóra trávicího traktu novorozenců a dětí

Trávicí trakt plodu je sterilní, a proto dochází k vytvoření gastrointestinální mikroflóry teprve po narození. V prvních dnech po narození je orální cestou osidlován nejdříve žaludek a poté střevní část trávicího traktu. U příjemců náhražek mateřského mléka se vytváří celé spektrum mikroflóry, z níž převažuje Enterobacteriaceae a z anaerobů bakteroidy, zatímco u kojených dětí dominují anaeroby s 90% převahou bifidobakterií, a to až do odstavení od mateřského mléka. Po odstavení se mikroflóra trávicího traktu kojených a nekojených dětí začne velmi rychle podobat. U odstavených dětí začne přibývat počet gramnegativních anaerobních bakterií, koliformních bakterií, enterokoků a klostridií, přičemž podíl bifidobakterií začne klesat. U časně odstavených dětí byl v pozdějších letech prokázán častější výskyt průjmů a potravinových alergií. V 3. – 5. roku věku je struktura mikroflóry trávicího traktu dětí téměř totožná s dospělým organismem (Zbořil, 2005). V 1 g stolice kojenců bylo zjištěno $10^{10} - 10^{11}$ KTJ *Bifidobacterium bifidum*, 10^9 KTJ *Lactobacillus acidophilus*, $10^8 - 10^9$ KTJ *Escherichia coli* a ostatních koliformních bakterií, $10^8 - 10^9$ KTJ enterokoků, 10^7 mikrokoků, 10^2 *Proteus* a 10^3 proteolytických bakterií (Görner, Valík, 2004).

3.5.3 Mikroflóra trávicího traktu u dospělých osob

V dospělosti jsou rozdíly ve složení mikroflóry dány zejména etnicky, geograficky a v neposlední řadě stravovacími návyky (Zbořil, 2005). V dospělosti se počet bifidobakterií ve střevě snižuje asi na 10 %. Zdravý člověk má střevní mikroflóru vyváženou. K jejímu narušení může dojít zejména vlivem stresu, nekvalitní stravy či léčby antibiotiky. Dochází pak ke střevní dysmikrobii, která se projevuje nadýmáním, průjmy a bolestmi břicha (Beneš, 2009). Nevyvážená střevní mikroflóra znamená

dominanci škodlivých bakterií ve střevě, čímž je ovlivněna produkce esenciálních složek a ve střevě dochází k postupnému hromadění škodlivých sloučenin, jako jsou karcinogeny, hnilobné produkty a toxiny (Nagpal et al., 2014). Ve stáří dochází k významnému poklesu bifidobakterií a nárůstu grampozitivních anaerobů, sulfbakterií, bakteroidů a metanogenů (Zbořil, 2005).

3.6 Bakterie mléčného kvašení

Jedná se o skupinu grampozitivních a nesporulujících koků a tyčinek, které za fakultativně anaerobních podmínek fermentují sacharidy, a to zejména na kyselinu mléčnou (Wright 2012). Patří zde rody *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissell* (Vibha, 2016). Mezi bakterie mléčného kvašení se v širším slova smyslu počítají i větvíci se zástupci rodu *Bifidobacterium* (Görner, Valík, 2004). Obecně jsou bakterie mléčného kvašení považovány za prospěšné mikroorganismy, i když některé rody, kterými jsou *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* a *Carnobacterium*, mohou obsahovat patogenní druhy nebo kmeny (Wright, 2012).

S výjimkou některých termofilních druhů se většinou jedná o mezofilní druhy. Jsou schopné růstu při 5 – 45 °C a při pH až 3,8 (Forsythe, 2000).

Bakterie mléčného kvašení získávají adenosintrifosfát pouze fermentací (Vibha, 2016). Typ fermentace je důležitým taxonomickým kritériem, přičemž dva základní typy fermentace cukrů jsou homofermentativní a heterofermentativní fermentace. Homofermentativní cesta je založena na glykolýze a jejím výsledným produktem je kyselina mléčná. Při heterofermentativní fermentaci vzniká kromě kyseliny mléčné také CO₂, kyselina octová a případně alkohol (Wright, 2012). Homofermentativní rody jsou *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* a někteří zástupci rodu *Lactobacillus*. Heterofermentativní je rod *Weissella*, *Leuconostoc* a také někteří zástupci rodu *Lactobacillus* (Forsythe, 2000).

3.6.1 Význam bakterií mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení jsou součástí lidské výživy již od starověku (Gueimonde, 2012). Vyskytují se v potravinách bohatých na živiny, jako je mléko, maso a zelenina, a jsou přítomné také ve střevech a sliznicích savců (Vibha, 2016). Jsou zodpovědné za spontánní fermentaci potravin. Lidé usilovali o ovlivnění těchto spontánních fermentací, což vedlo k postupnému vzniku potravinářské mikrobiologie (Gueimonde, 2012). Dnes jsou bakterie mléčného kvašení nezbytné pro řadu procesů v potravinářském průmyslu, zejména pak v mlékárenském průmyslu, ale také v průmyslu masném a průmyslu zpracovávajícím zeleninu (Vibha, 2016). Bakterie mléčného kvašení jsou nejčastěji používanými mikroorganismy pro fermentaci mléka, protože dávají mléčným výrobkům charakteristickou konzistenci a chuť. Fermentovaná mléka jsou součástí stravovací kultury mnoha národů po celém světě. V minulosti se fermentované mléčné výrobky vyráběly pomocí směsí různých kmenů, zatímco v moderním fermentačním průmyslu je využíváno pouze několik kmenů, aby byla zajištěna reprodukovatelnost výrobků (Antoine, 2012).

Bakterie mléčného kvašení jsou obecně považované za bezpečné, neboť jejich dlouhodobé užívání prokázalo, že nejsou patogenní, což se dnes navíc testuje prostřednictvím genetických metod (Forsythe, 2000).

Fermentace je jedním z nejstarších způsobů zpracování potravin (Forsythe, 2000) a způsobem prodloužení trvanlivosti výrobku biologickou konzervací (Kadlec et al., 2009).

Bakterie mléčného kvašení produkují průmyslově významné sloučeniny, kterými jsou vitaminy, polyoly, organické kyseliny, aromatické sloučeniny či exopolysacharidy. Těmito složkami ovlivňují nejen chuť a konzistenci potravin, ale také jejich nutriční hodnotu. Produkce těchto látek může být ovlivněna metabolickým inženýrstvím (Vibha, 2016). U bakterií mléčného kvašení jsou totiž informace o jednotlivých metabolických krocích uloženy na plazmidech (Görner, Valík, 2004).

3.7 Probiotické mikroorganismy

Probiotickými mikroorganismy jsou většinou fermentující, obligátně nebo fakultativně anaerobní mikroorganismy. Tyto mikroorganismy produkují metabolické produkty, které mají prospěšné účinky na biologické funkce konzumenta. Biologicky se odlišují od gramnegativních a pohyblivých mikroorganismů, které neprodukují kyselinu mléčnou (*Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Serratia* a *Proteus*), a které mohou být také součástí trávicího traktu (Otleš, Ozyurt, 2014).

Nejběžnějšími probiotiky jsou bakterie mléčného kvašení. Mikroorganismy, které jsou běžně používané jako probiotika, jsou příslušníci rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (Goering et al., 2016) a v menším rozsahu pak zástupci rodu *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus* a *Saccharomyces* (Muller et al., 2009). Mikroorganismy, využívané jako probiotika, jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Zástupci rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* jsou považováni za klasické probiotické mikroorganismy. Jsou používáni v potravinách, krmivech i jako léčiva (Dima et al., 2014). Vyskytují se v trávicím traktu lidí i zvířat, přičemž se předpokládá, že laktobacily jsou důležité pro funkci tenkého střeva, zatímco bifidobakterie pro funkci tlustého střeva. Laktobacily patří do kmene *Firmicutes* a bifidobakterie do kmene *Actinobacteria*. Laktobacily a bifidobakterie jsou tedy geneticky odlišné, avšak mají mnoho fenotypových podobností, jako je produkce kyseliny mléčné, a proto jsou bifidobakterie často zařazovány do bakterií mléčného kvašení. Ty však tvoří skupinu geneticky podobných bakterií, a proto zde bifidobakterie z taxonomického hlediska zařadit nelze (O'Sullivan, Halami, 2014). Některé jejich kmeny vykazují odolnost ke stresovým podmínkám trávicího traktu a navíc mají žádané technologické vlastnosti pro jejich využití v potravinářství (Vinderola et al., 2011). Nejvíce klinických studií bylo provedeno u kmenů *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus johnsonii* LA1, *Lactobacillus acidophilus* NCFB1478 a *Bifidobacterium animalis* Bb-12.

Propionibakterie jsou potenciálně vhodnými probiotiky, avšak nejsou zdaleka tak prozkoumané, jako bakterie mléčného kvašení a bifidobakterie. Také nejsou součástí typické mikroflóry trávicího traktu, avšak v určitých potravinách se vyskytují přirozeně. Některé jejich kmeny mohou přežívat i při nízkých hodnotách pH, přičemž tuto

schopnost lze ovlivnit použitím vhodné potravinové matrice (Dima et al., 2014). Mohou produkovat krátké řetězce mastných kyselin, jako je propionová, octová či máselná kyselina, které mají pravděpodobně protizánětlivý efekt a snižují riziko rakoviny. Pro dosažení tohoto efektu je však důležité, aby byly v tlustém střevě přítomny vysoké počty metabolicky aktivních propionibakterií. Důležitý je také přísun vhodného substrátu, jako je škrob a dietní vláknina (Otlés, Ozyurt, 2014).

Sporulující bakterie, jako jsou *Bacillus cereus*, *Bacillus clausii*, *Bacillus pumilis* či *Clostridium butyricum*, jsou také zařazovány mezi probiotika. Díky endosporám přežívají průchod žaludkem a dvanáctníkem, avšak střevo kolonizovat nedokážou (Dima et al., 2014). Hlavní výhodou použití sporulujících mikroorganismů jako probiotik, je záruka jejich stability ve výrobcích. Vystává však u nich otázka bezpečnosti. Je nutné u nich prokázat nepřítomnost enterotoxické aktivity, toxinů kazících potraviny a nepřítomnost aktivity povrchově aktivní látky. Problematická je také germinace spor v trávicím traktu (Horáčková, 2010).

Probiotické vlastnosti mají i *Escherichia coli* Nissle 1917 a *Sporolactobacillus* (Dima et al., 2014). *Bacillus coagulans* a *Sacharomyces boulardii* jsou také zařazovány mezi probiotika, i když běžně nejsou součástí mikroflóry střeva, a proto je otázkou, jakou mají ve střevě funkci (O'Sullivan, Halami, 2014).

Tabulka č. 1: Mikroorganismy využívané jako probiotika (Dima et al., 2014).

Mikroorganismus	Rod	Druh
Bakterie mléčného kvašení	<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>L. acidophilus</i> <i>L. amylovorus</i> <i>L. brevis</i> <i>L. bulgaricus</i> <i>L. casei</i> <i>L. crispatus</i> <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. gallinarum</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. lactis</i> <i>L. paracasei</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. salivarius</i>
	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>
	<i>Lactococcus</i> spp.	<i>L. lactis</i>
	<i>Leuconostoc</i> spp.	<i>Lc. mesenteroides</i>
	<i>Pediococcus</i> spp.	<i>P. pentosaceus</i> <i>P. acidilactici</i>
Bifidobakterie	<i>Bifidobacterium</i> spp.	<i>B. adolescentis</i>
		<i>B. animalis</i> (<i>lactis</i>)
		<i>B. bifidum</i>
		<i>B. breve</i>
		<i>B. essensis</i>
		<i>B. infantis</i>
		<i>B. laterosporus</i>
<i>B. longum</i>		
Propionibakterie	<i>Propionibacterium</i> spp.	<i>P. acidipropionici</i>
		<i>P. freudenreichii</i>
		<i>P. jensenii</i>
		<i>P. thoenii</i>
Enterobakterie	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>
Sporulující bakterie	<i>Bacillus</i> spp.	<i>B. alcalophilus</i> <i>B. cereus</i> <i>B. clausii</i> <i>B. coagulans</i> <i>B. subtilis</i>
Jiné bakterie	<i>Escherichia</i> spp.	<i>E. coli</i>
	<i>Sporolactobacillus</i> spp.	<i>S. inulinus</i>
Kvasinky	<i>Saccharomyces</i> spp.	<i>S. cerevisiae</i> (<i>boulardii</i>)

3.7.1 Rod *Lactobacillus*

Jedná se o fakultativně anaerobní, popřípadě mikroaerofilní nepohyblivé bakterie. Přestože jsou laktobacily tolerantní ke kyslíku, k růstu vyžadují spíše jeho nižší koncentraci (Muller et al., 2009). Dobře rostou v půdách s počáteční hodnotou pH 4,5 – 6,4.

Laktobacily se dle typu fermentace dělí do tří skupin (Görner, Valík, 2004). První skupina laktobacilů je obligátně homofermentativní a tvoří ji *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus* či *Lactobacillus salivarius* a další. Druhou skupinu laktobacilů jsou fakultativně heterofermentativní laktobacily, jako je *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* nebo *Lactobacillus sakei*. Obligátně heterofermentativní laktobacily třetí skupiny jsou *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum* či *Lactobacillus reuteri* (Wright, 2012).

Obligátně heterofermentativní skupiny laktobacilů fermentují hexózy na kyselinu mléčnou. Nefermentují však pentózy a glukonáty. Jedná o skupinu tvořenou grampozitivními, mikroaerofilními tyčinkami. Optimální teplota růstu pro většinu z nich je 30 – 45 °C a pH 5,5 – 6,2.

Fakultativně heterofermentativní laktobacily fermentují hexózy také na kyselinu mléčnou, avšak při nedostatku glukózy některé z nich produkují octovou a mravenčí kyselinu a etanol. Pentózy fermentují pomocí fosfoketolázy. Opět se jedná o skupinu tvořenou grampozitivními a mikroaerofilními paličkami. Optimální teplota jejich růstu je 28 – 32 °C.

Obligátně heterofermentativní skupina laktobacilů fermentuje hexózy na kyselinu mléčnou, octovou, etanol a CO₂, pentózy pak na kyselinu mléčnou a octovou. Jedná se o grampozitivní tyčinky či koky. Optimální teplota jejich růstu je 28 – 32 °C.

Nacházejí se ve fermentovaných potravinách rostlinného i živočišného původu a trávicím traktu lidí i zvířat. Tvoří typickou chuť a vůni potravin díky produkci acetaldehydu, diacetylu, kyseliny octové a aminokyselin (Görner, Valík, 2004).

3.7.2 Rod *Bifidobacterium*

Jedná se o grampozitivní, nesporulující a nepohyblivé tyčinky. Tyto tyčinky jsou nepravidelné a často se větví. Fermentací hexózy produkují octovou a mléčnou kyselinu. Tyto kyseliny inhibují gramnegativní bakterie a také stimulují intestinální peristaltiku. Jejich vedlejším metabolitem je mravenčí a jantarová kyselina a ethanol. Některé kmeny jsou v mléce proteolyticky aktivní. Optimální teplota růstu je 37 – 41 °C a pH 6,5 – 7,0. Jejich teplotní rozmezí je 25 – 45 °C a rozmezí pH 4,5 – 8,0. Ve velmi kyselém prostředí tedy nepřežívají (Görner, Valík, 2004). K růstu v médiu vyžadují prostředí s nízkým redukčním potenciálem a bohaté na živiny (Muller et al., 2009).

Jsou striktně anaerobní, avšak některé druhy tolerují kyslík v prostředí, je-li současně přítomen oxid uhličitý v mléce a rostou-li spolu s *Lactobacillus acidophilus*. Optimální pro jejich růst je 10 % CO₂ v atmosféře.

Přidávají se do řady fermentovaných produktů a farmaceutických preparátů (Görner, Valík, 2004). Problémem bifidobakterí je, že vykazují sníženou aktivitu v mléce (Gueimonde et al., 2012). *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* je odolnější ke stresovým faktorům a více stabilní než jiné druhy bifidobakterií, a proto je velmi často používán po celém světě (Gueimonde et al., 2012). Díky svým výhodným technologickým vlastnostem bývá hojně využíván v mlékárenském průmyslu, avšak na úkor ostatních druhů bifidobakterií, které mohou mít lepší zdravotní přínos (Raeisi et al., 2013). *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* vykazuje toleranci k nižšímu pH a k přítomnosti kyslíku a na konci trvanlivosti produktu tak vykazuje vysoké počty buněk (Souza et al., 2011). *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (Chr. Hansen) a DN-17310 (Danone) jsou nejčastěji používanými kmeny v potravinářském průmyslu (Souza et al., 2011).

3.7.3 Analýza probiotik

V současné době je analýza probiotik založena zejména na metodách kultivace a vyžaduje použití specifických médií. Tyto metody jsou pracné a časově náročné

(Otles, Ozyurt, 2014). Zahrnují izolaci, kultivaci a identifikaci mikroorganismů podle morfoloických, biochemických či genetických znaků (Otles, Ozyurt, 2014).

Pro stanovení počtu probiotických mikroorganismů ve fermentovaném mléce jsou v praxi stále nejvíce rozšířené plotnové metody. Neexistuje však žádná standardizovaná technika pro stanovení počtu všech probiotických kmenů (Gueimonde et al., 2012). V současnosti existuje pouze ISO/IDF norma pro selektivní stanovení druhu *Lactobacillus acidophilus* a pro rod *Bifidobacterium*, přičemž dosud není možné rozlišit jednotlivé druhy bifidobakterií (Pechar et al., 2013). Každý probiotický kmen má totiž specifické požadavky na prostředí pro svůj růst. Kultivační metody jsou založené na předpokladu, že kultivační média a kultivační podmínky jsou optimální pro hledané kmény a dovolují růst všech buněk. To však nemusí být vždy pravda a živé buňky, které nejsou schopné tvořit kolonie za standardních podmínek, tak nejsou spočítané. K poškození buněk či změně z aktivního stavu na stav přežívání může dojít ve fermentovaných mléčných produktech s nízkou hodnotou pH (Gueimonde et al., 2012).

Kromě kultivačních metod se využívají také molekulární metody, a to buď jako alternativa kultivačních metod nebo jako doplňkové metody kontroly kvality probiotických přípravků (Otles, Ozyurt, 2014). Kultivační metody jsou totiž v mnoha směrech limitovány a nekultivační metody je mohou v lecčems předčit. Tyto metody jsou založeny na přímé analýze DNA (deoxyribonukleová kyselina), která je extrahována ze vzorku a následně identifikována. Oproti běžné kultivaci jsou molekulární metody pro identifikaci mikroorganismů poměrně jednoduché a poskytují detailnější analýzu. Pro rychlou a specifickou detekci bakteriálních druhů se využívá DNA microarray, PCR (polymerázová řetězová reakce), teplotní gradientová gelová elektroforéza a denaturační gradientová gelová elektroforéza. Poslední dvě jmenované jsou vhodné pro kvalitativní analýzu, neposkytují však přesnou kvantitativní analýzu. PCR v reálném čase a fluorescenční *in situ* hybridizace jsou nejpoužívanější metody pro kvantitativní analýzu. Fluorescenční *in situ* hybridizací však není možné stanovit počet jen životaschopných buněk, stejně jako pomocí většiny molekulárních metod. Pro tento účel existují speciální metody. Jednou takovou metodou je modifikovaná PCR v reálném čase s využitím propidium monoazidu, který inhibuje amplifikaci u mrtvých buněk. Další metodou je PCR spojená s reverzní transkripcí a amplifikací nukleových kyselin. Nejrozšířenější molekulární metodou pro počítání

živých bakteriálních buněk jsou však fluorescenční metody, které využívají fluorescenční barviva. Ta umožní rozlišení buněk živých a poškozených od buněk mrtvých. Fluorescence je následně zaznamenávána pomocí vhodného zařízení, jako je fluorescenční mikroskop, fluorometr či průtokový cytometr (Gueimonde et al., 2012).

Nezbytná je identifikace probiotik na úrovni kmenů (Dima et al., 2014). Přesná klasifikace nových probiotických kmenů je usnadněna díky vytváření velkých databází sekvencí 16S/23S rRNA (ribozomální ribonukleová kyselina) prostřednictvím moderních metod molekulární biologie (Horáčková, Šviráková, 2009). Mnohé analýzy ukázaly, že totožnost mikroorganismů se často neshodovala s údaji na výrobku (Otlés, Ozyurt, 2014).

3.7.4 Požadavky na probiotika

Při výběru probiotik hrají roli ekologické, genetické a biochemické aspekty (původ, identita, biochemické vlastnosti, metabolismus a genetická stabilita), technologické aspekty (stabilita během výroby a skladování, senzorké vlastnosti), fyziologické aspekty (odolnost ke stresu způsobeného prostředím při průchodu trávicím traktem a adheze k epitelu střevního traktu), funkční aspekty a zdraví prospěšné vlastnosti (adheze ke střevu a jeho kolonizace, konkurenceschopnost, potlačování patogenů, stimulace imunitní odpovědi, stimulace růstu prospěšné mikroflóry) a bezpečnostní aspekty (nemají invazivní potenciál, žádné faktory virulence, bez schopnosti získat rezistenci vůči antibiotikům), (Dima et al., 2014).

Mikroorganismy, které jsou využívány jako probiotika v potravinářství, by měly nést označení „Generally Regarded as Safe“ (GRAS), (Muller et al., 2009), tedy být lidského původu a pro organismus zcela neškodné (Görne, Valík, 2004). Toto označení vydává americký úřad Food and Drug Administration. V Evropě zase funguje koncept Qualified Presumption of Safety (QPS), který byl představen úřadem European Food Safety Authority v roce 2002. QPS systém hodnotí bezpečnost mikroorganismů, které jsou záměrně přidávány do potravinového řetězce (Horáčková, 2010). Nejčastěji používané probiotické mikroorganismy, kterými jsou *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*,

jsou považované za bezpečné. Ne všechna probiotika dostupná na trhu však splňují požadavky FAO/WHO (Nagpal et al., 2014).

Probiotický mikroorganismus by měl být izolován z trávicího traktu zdravého člověka, být odolný k žaludečním kyselinám a žlučovým solím, být schopný přilnout ke střevní stěně a přežít zde, neměl by být přenašečem genů pro rezistenci k antibiotikům a neměl by produkovat toxické biogenní aminy.

Z technologického hlediska musí přežít skladovací a technologický proces v dostatečném množství ($10^6 - 10^9$ KTJ.g⁻¹) a být tolerantní vůči kyslíku

FAO/WHO požaduje identifikaci probiotického kmene fenotypovými i genotypovými metodami. Zdravotní tvrzení by se měla opírat o klinické studie, které jsou dvojité zaslepené, placebem kontrolované a předchází jim in vitro studie, popřípadě studie prováděné na zvířatech (Horáčková, Šviráková, 2009).

Výrobek, který obsahuje probiotické mikroorganismy, má nést označení rodu, druhu a kmene a také údaj o minimální koncentraci probiotických mikroorganismů na konci doby trvanlivosti (Pechar et al., 2013).

Kromě druhu probiotického mikroorganismu je třeba definovat i kmen, protože zdravotní vlastnosti probiotik nejsou shodné pro všechny kmeny daného druhu (Dima et al., 2014). Častým důvodem pro zamítnutí nových probiotik je právě nedostatečná charakterizace kmene (O'Sullivan, Halami, 2014).

3.7.5 Mechanismus působení probiotik

Mechanismus jejich působení spočívá zejména v tvorbě konečných produktů jejich metabolismu. Těmito produkty jsou organické kyseliny, peroxid vodíku a bakteriociny. Tyto metabolické produkty inhibují růst jak gram pozitivních, tak gram negativních bakterií. Další jejich významnou funkcí je blokování míst adheze, kdy soutěží s patogenními mikroorganismy o tato místa, neboť nepřilnuté patogeny nemohou uplatňovat svůj škodlivý potenciál. S patogenními mikroorganismy soutěží také o živiny. Probiotické mikroorganismy stimulují jak specifickou, tak nespecifickou imunitu a degradují receptory pro toxiny. Tvorbu toxinů také potlačují snížením střevního pH (Nagpal et al., 2014).

3.7.6 Zdravotní účinky probiotik

Probiotické mikroorganismy mají celou řadu zdravotních účinků. Celkově podporují vyváženou mikroflóru tlustého střeva, protože soutěží s patogeny o epiteliální adhezi a potlačují růst těchto patogenů, a to zejména díky tvorbě metabolitů (bakteriostatické a bakteriocidní peptidy) s žádoucími fyziologickými účinky. Stimulují funkci střevní bariéry proti patogenům a potenciálním patogenům a zabraňují mikrobiální translokaci. Mají imunostimulační a imunomodulační funkci (Forsythe, 2000, Frič, 2010), produkují vitamíny (Tománková et al., 2006), zmírňují intoleranci na laktózu a snižují výskyt alergických příznaků (Nagpal et al., 2014). Mají také antikarcinogenní a antimutagenní aktivitu, neboť inhibují růst hnilobných bakterií a tím uvolňování karcinogenů. Spolu s vlákninou působí preventivně proti rakovině konečníku a tlustého střeva (Kalač, 2003, Forsythe 2000), zmírňují problémy doprovázející dráždivý tračník či střevní záněty a zvyšují účinnost léčby infekce způsobené *Helicobacter pylori*. Bakterie mléčného kvašení mohou zmírnit či odstranit nadýmání, plynatost, průjem, a zácpu a podpořit pravidelnou stolicí (Martinča, 2015). Ovlivňují také sekreci hlenu a vstřebávání a motilitu střeva (Frič, 2010). Snižují koncentraci celkového krevního cholesterolu díky rozkladu solí žlučových kyselin, čímž brání zpětnému vstřebání cholesterolu (Beneš, 2009) a LDL cholesterolu. Mají také příznivé účinky na metabolismus minerálů (Nagpal et al., 2014), kdy například podporují vstřebávání vápníku (Kalač, 2003), čímž zpomalují úbytek kostní tkáně. Kromě toho působí také proti vzniku zubního kazu.

Probiotika však na druhou stranu mohou způsobovat systémové infekce, negativně působit na metabolismus a nadměrně stimulovat imunitní systém u citlivých jedinců (Opletal, 2010).

3.7.6.1 Stimulace imunitního systému

Řada *in vivo* a *in vitro* studií prokázala, že určité kmeny probiotických mikroorganismů jsou schopny ovlivňovat funkci imunitního systému a chránit tak před

infekčními onemocněními, rakovinou, alergiemi a zánětlivými onemocněními střev (Gill et al., 2009).

Imunitní systém mohou probiotické mikroorganismy ovlivnit zvýšenou produkcí cytokininů, stimulací makrofágů a zvyšováním sekrece imunoglobulinu A (Nagpal et al., 2014).

3.7.6.2 Gastrointestinální infekce

Podávání probiotik se osvědčilo při léčbě průjmu způsobeného rotaviry, při cestovatelském průjmu a průjmu spojeném s užíváním antibiotik. Užívání probiotik snižuje četnost výskytu průjmů a zkracuje dobu trvání průjmu.

Osvědčilo se podávání *Lactobacillus acidophilus* LB1, *Bifidobacterium lactis* a *Lactobacillus reuteri* (Nagpal et al., 2014). Léčba probiotiky je navíc účinnější pokud je zahájena co nejdříve (Gill et al., 2009).

Při léčbě průjmu způsobeného rotaviry pomáhá *Lactobacillus rhamnosus* GG (Nagpal et al., 2014).

Antibiotickou léčbou dochází k nerovnováze v mikroflóře střevního traktu, což může mít za následek rozvoj patogenních kmenů, které způsobují průjem. Aby se při léčbě antibiotiky předešlo tomuto stavu, osvědčilo se podávání *Sacharomyces boulardii*, *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (Nagpal et al., 2014).

3.7.6.3 Infekce dýchacích cest

Užívání probiotických mikroorganismů snižuje četnost výskytu a dobu trvání infekcí dýchacích cest pravděpodobně v důsledku zvýšené fagocytární aktivity krevních leukocytů. Modulují také zánětlivé procesy redukcí hladiny jistých cytokinů v krvi. U dětí s akutními virovými a bakteriálními infekcemi dýchacích cest upravují narušenou mikroflóru střevního traktu, stimulují funkci T – a B – buněk a NK buněk. Navíc podporují produkci interferonů, které chrání před virovými infekcemi a aktivují

produkci Th1 cytokinů, které působí proti intracelulárním patogenům, včetně virů (Gill et al., 2009).

3.7.6.4 Urogenitální infekce

Zdravé ženy mají pochvu běžně osídlenou zástupci rodu *Lactobacillus* a jejich vymizení je spojováno se zvýšenou pravděpodobností výskytu vaginálních infekcí a infekcí močového traktu (Gill et al., 2009).

Probiotika mohou obnovit poševní mikroflóru, a vytlačit tak patogeny a potenciální patogeny. *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 a *Lactobacillus reuteri* RC-14 jsou nejlépe zdokumentovaná probiotika v oblasti ochrany zdraví urogenitálního traktu (Reid, 2009).

3.7.6.5 Rakovina střeva

Bylo provedeno několik *in vivo* i *in vitro* studií, které dokazují potlačení rakoviny působením probiotik, a to nejen u zvířat, ale také u lidí. Záleží však na kmenu probiotik a také na jejich dávce.

Studie na zvířatech byly úspěšné a většina z nich dokazuje vliv probiotik na snížení výskytu a velikosti nádorů, včetně některých zhoubných nádorů (Allsopp, Rowland, 2009). *Lactobacillus acidophilus* významně inhiboval nádory v krysím tlustém střevě. U potkanů orálně podávané bakterie mléčného kvašení snížily poškození DNA způsobené chemickými karcinogeny v jejich střevech a žaludku a také zlepšily pohyblivost střeva (Nagpal et al., 2014). Některé kmeny laktobacilů měly antitumorový a antimetastázový efekt u myši (Forsythe, 2000).

Důkazy epidemiologických studií pro vliv probiotik a prebiotik na potlačování vzniku nádorů jsou však nedostatečné, a to zejména vzhledem k dlouhé době vývoje nádoru a teprve nedávným zjištěním o těchto vlastnostech probiotik. Některé studie na lidech, které využívají biomarkery, však zjistily vliv probiotik a prebiotik na snižování rizika rakoviny střeva.

Probiotika a prebiotika vážou karcinogeny, mění střevní mikroflóru, mění metabolismus karcinogenů, stimulují imunitní systém při potlačování nádoru, zlepšují funkce bariér sliznic, působí protizánětlivě a indukují apoptózu a ochranné enzymy.

Studie na buněčných kulturách a u zvířat ukázaly, že probiotika v kombinaci s prebiotiky mohou působit na růst nádoru v různém stádiu.

Snižují poškození DNA v tkáni střeva, potlačují rozvoj nádoru a inhibují změny vedoucí k přeměně benigního nádoru na maligní (Allsopp, Rowland, 2009).

3.7.6.6 Alergie

Existuje mnoho důkazů, kdy jsou odchylky ve složení střevní mikroflóry spojeny s alergickými onemocněními. Kromě toho byly zaznamenány významné rozdíly ve střevní mikroflóře u alergických a nealergických jedinců. U dětí, které trpěly alergiemi, bylo zjištěno méně bifidobakterií a enterokoků než u dětí nealergických.

Probiotika pravděpodobně mohou pomoci při léčbě a prevenci atopického ekzému, zásadní je ale výběr vhodného kmene a správná kombinace kmenů (Salminen, Isolauri, 2009).

3.7.6.7 Zánětlivá střevní onemocnění

Užívání probiotických mikroorganismů působí preventivně vůči vzniku pouchitidy. Stejně tak je pravděpodobně účinná proti ulcerózní kolitidě. Důkazy pro jejich pozitivní působení vůči Crohnově chorobě jsou však nedostatečné (Gill et al., 2009).

3.7.6.8 Laktózová intolerance

Lidé s tímto onemocněním nejsou schopni metabolizovat laktózu z důvodu nedostatečné tvorby enzymu beta-galaktosidázy nebo jeho úplné absence. Konzumací fermentovaných mléčných výrobků s obsahem probiotické kultury dochází ke zlepšení

symptomů laktóзовé intolerance. V těchto mléčných výrobcích totiž dochází k poklesu obsahu laktózy v důsledku vysoké aktivity laktázy mikroorganismů použitých při výrobě těchto produktů. Laktóza je díky bakteriálnímu enzymu beta-galaktosidáza metabolizována na kyselinu mléčnou. Z tohoto důvodu je pro lidi trpící laktóзовou intolerancí vhodnější konzumovat fermentované mléčné výrobky (Nagpal et al, 2014).

3.8 Stabilita probiotik

Probiotický produkt by měl pro jeho pozitivní účinek obsahovat minimálně 10^6 KTJ.ml⁻¹ živých buněk. Toto množství probiotických mikroorganismů by se mělo udržet ve výrobku po celou dobu jeho trvanlivosti, i když prováděné analýzy často potvrdily, že počet zjištěných mikroorganismů se ne vždy shodoval s údaji na výrobku, čímž se snížila hodnota dané funkční potraviny (Otles, Ozyurt, 2014). Není však zřejmé, zda musí být probiotické mikroorganismy živé za každých okolností, aby měly pozitivní vliv na zdraví člověka, protože v některých případech měly pozitivní účinek na zdraví konzumenta i v neživém stavu (Gueimonde et al., 2012).

Kvalita probiotické kultury závisí na mnoha faktorech, kterými jsou zvolený probiotický kmen, prostředí potraviny, podmínky zpracování, skladování a balení (Dima et al., 2014, Bakr, 2015). Přednostně jsou používány ty kmeny probiotických bakterií, které jsou schopné růst v mléce a zároveň jsou životaschopné po celou dobu skladování produktu (Kadlec et al., 2009). Pro výběr vhodných probiotických kmenů je nezbytná znalost jejich vlastností (Gueimonde et al., 2012).

Klíčová je tolerance probiotického kmene ke stresovým faktorům. Je proto důležité identifikovat ty kmeny, které vykazují vysokou toleranci ke stresu nebo zvýšit jejich odolnost genovou modifikací či jinými metodami (Gueimonde, 2012). Jednou z metod zvýšení tolerance mikroorganismů ke stresu je působení subletálních stresových faktorů. Jsou-li probiotické mikroorganismy vystaveny působení subletálních stresových faktorů, mohou pak být odolnější vůči následnému působení stresových faktorů. Existují dva obranné mechanismy proti působení vnějších stresových faktorů. U prvního mechanismu dochází u mikroorganismů vystaveným subletálnímu stresu k produkci určitých látek, morfologickým změnám a dalším pochodům, které mají

za následek zvýšení odolnosti těchto mikroorganismů vůči následnému a stejnému, avšak většímu stresovému faktoru. U druhého mechanismu zvýšení tolerance mikroorganismů vůči stresu dochází u mikroorganismů k pochodům, které je chrání vůči nadcházejícímu jinému stresovému faktoru, než jaký byl původní. Druhý mechanismus je označován jako křížový mechanismus. Technikou působení subletálního stresu na probiotické mikroorganismy tak může dojít ke zlepšení jejich přežívání během produkce, zpracování a skladování (Muller et al., 2009).

Probiotické mikroorganismy musí v organismu jejich konzumenta přežít působení kyseliny chlorovodíkové, enzymů, žlučových kyselin, imunitních složek organismu, peristaltiky střev a nízkého povrchového napětí (Görner, Valík, 2004). *Lactobacillus delbruckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus* nepřežívají průchod horní částí trávicího traktu, ačkoliv jsou uváděny jako probiotické mikroorganismy (Opletal, 2010). Záleží také na potravině, se kterou jsou probiotické mikroorganismy konzumovány, a to zejména na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech a obsažených složkách. Mléčné výrobky jsou díky fyzikálně-chemickým vlastnostem považovány za ideální zdroj probiotik (Vinderola, 2011), neboť konzumace probiotik v mléčných výrobcích pravděpodobně snižuje účinek žaludečních kyselin, čímž se zvyšuje šance, že se probiotické bakterie dostanou až do střeva (Nagpal et al., 2014).

3.8.1 Kombinace probiotických mikroorganismů a zákysových kultur

Různé mikroorganismy použité při výrobě fermentovaných produktů se mohou vzájemně různě ovlivňovat. Důležité je proto posoudit jejich vlastnosti a kompatibilitu mezi nimi při jejich současném použití.

Některé bakterie mléčného kvašení mohou inhibovat určité kmeny probiotických mikroorganismů díky produkci bakteriocinů (Gueimonde et al., 2012).

Mezi bifidobakteriemi a *Lactobacillus acidophilus* existuje symbiotický vztah, a proto se do mléka pro výrobu probiotických produktů přidávají spolu. *Lactobacillus acidophilus* tvoří produkty bílkovin, které podporují růst bifidobakterií (Görner, Valík, 2004) a některé kmeny bifidobakterií produkují zase více kyseliny

octové, která stimuluje růst *Lactobacillus acidophilus*. Na druhou stranu však octová kyselina negativně ovlivňuje chuť a vůni produktu.

Lactobacillus debrueckii subsp. *bulgaricus* stimuluje *Bifidobacterium* produkci valinu, glycinu a histidinu při proteolýze kaseinu. Svou nadprodukcí kyseliny mléčné a peroxidu vodíku však inhibuje jak *Bifidobacterium* sp., tak *Lactobacillus acidophilus* (Kadlec et al., 2009).

Streptococcus thermophilus může stimulovat růst a životaschopnost anaerobních probiotických mikroorganismů v důsledku jeho schopnosti vychytávat kyslík.

Také kombinované užití kvasinek spolu s bakteriemi může vést ke zlepšení stability bakterií (Gueimonde et al., 2012).

3.8.2 Vodní aktivita

Vyjadřuje dostupnost vody pro mikroorganismy, přičemž může dosahovat hodnot od 0 do 1, kdy hodnota 1 dopovídá čisté vodě. Mléko a fermentované mléčné produkty mají vysokou hodnotu vodní aktivity a jejich trvanlivost je jen několik týdnů. Produkty s vodní aktivitou nižší než 0,25 mají oproti tomu trvanlivost několik měsíců, a proto má vodní aktivita význam zejména u těchto produktů.

U probiotických kultur stabilizovaných sprejovým sušením může hodnota vodní aktivity kolísat mezi 0,03 – 0,25 bez negativního dopadu na stabilitu probiotických mikroorganismů. Obecně platí, že čím vyšší je vodní aktivita, tím nižší je stabilita probiotických mikroorganismů v produktu (Gueimonde, 2012).

3.8.3 Množství rozpuštěného kyslíku

Nízký obsah kyslíku prospívá jak bifidobakteriím, které jsou obligátně anaerobní, tak laktobacilům, které jsou mikroaerofilní (Kadlec et al., 2009).

Kyslík způsobuje poškození v důsledku oxidace. Bakterie se často chrání proti jeho působení produkcí glutathionu, antioxidantních enzymů či peroxidu vodíku (Gueimonde et al., 2012). Některé probiotické kultury jsou však na přítomnost kyslíku

velmi citlivé, protože produkují malé množství peroxidázy, která snižuje jeho obsah. Vyloučení *Lactobacillus bulgaricus*, který produkuje peroxid vodíku, ze startovací kultury může vést ke zlepšení přežívání *Lactobacillus acidophilus* ve fermentovaných mléčných výrobcích.

Kromě úpravy obsahu *Lactobacillus. bulgaricus* ve startovací kultuře má významný vliv na obsah kyslíku také přidavek antioxidantů, jako je askorbová kyselina, a také balení do obalů minimálně propustných pro kyslík (Champagne, 2009). Skleněné obaly jsou dobrou bariérou pro plyny, a je v nich tak dosahováno vyššího počtu probiotických mikroorganismů (Horáčková, Šviráková, 2009). Krok deaerace mléka také vede ke snížení obsahu kyslíku ve výrobku (Kadlec et al., 2009). Dále je vhodné použití bakterií tolerantních ke kyslíku, enkapsulačních technik či metod adaptace na oxidační stres, (Ebel et al., 2011).

3.8.4 Velikost inokula

U tradičních kultur se pro zaočkování používá 1% inokulum, avšak u probiotických kultur je nutné použít 5 – 10% inokulum kvůli jejich špatnému růstu v mléce (Kadlec et al., 2009). Při použití 1 – 10% inokula by měl nárůst buněk za 24 hodin dosahovat denzitu $10^8 - 10^9$ KTJ.ml⁻¹ (Horáčková, Šviráková, 2009).

3.8.5 Inkubační teplota

Lactobacily a bifidobakterie, které jsou intestinálního původu, mají teplotní optimum okolo 37 °C (Kadlec et al., 2009).

3.8.6 Potravinová matrice

Při skladování výrobku závisí životaschopnost probiotických kultur na druhu potraviny, tedy na dostupnosti živin (Horáčková, Šviráková, 2009). Na stabilitu

probiotických mikroorganismů může mít vliv obsah tuku, sacharidů, proteinů a potravinová aditiva (Gueimonde et al., 2012).

Růst a přežívání probiotických mikroorganismů může stimulovat přidavek kaseinu, hydrolyzátu syrovátkových bílkovin, kvasničného extraktu, glukosy, vitamínů, minerálních látek (Kadlec et al., 2009), peptidů, prebiotik, medu, manitolu, glycerolu a antioxidantů (Champagne, 2009). Barviva a látky určené pro aromatizaci mohou stabilitu probiotických mikroorganismů ovlivnit naopak negativně (Gueimonde et al., 2012).

3.8.7 pH

Nízké pH je významným negativním faktorem působícím na životnost probiotických bakterií. Ve fermentovaných mléčných produktech je hlavním důvodem vzniku nízkého pH přidavek ovocné složky a dodatečné prokysávání během skladování. Řešením je balit ovocnou složkou v případě jogurtů zvlášť a vybírat laktobacily s oslabenou schopností prokysávání během skladování (Champagne, 2009).

Ve výrobku by pH nemělo klesnout pod hodnotu 4,6. *Bifidobacterium bifidum* je k nízkému pH citlivější, než *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium pseudolongum*. *Bifidobacterium lactis* je více tolerantní k nízkému pH než většina bifidobakterií (Opletal, 2010).

3.8.8 Teplota skladování

Skladovací teplota, která je nižší než 4 °C zlepšuje přežívání bifidobakterií, neboť zabraňuje produkci kyselin u *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Kadlec et al., 2009). *Bifidobacterium lactis* je v porovnání s ostatními bifidobakteriemi tolerantnější k vyšším teplotám (Opletal, 2010).

3.8.9 Enkapsulace probiotik

Technologie enkapsulace, tedy zapouzdření, má zajistit životnost probiotik během zpracování, skladování a průchodu trávicím traktem a umožnit jejich uvolnění v aktivní oblasti trávicího traktu, tedy tam, kde se trávicí trakt stýká s lymfatickou tkání, která má stěžejní roli ve stimulaci imunitního systému. Zapouzdření je fyzikálně chemický proces, při kterém jsou pevné látky nebo kapaliny či plyny obklopeny povlakem z homogenních či heterogenních částic a tvoří tak kapsle o velikosti nm až mm. Zapouzdření probíhá ve dvou fázích – vnitřní a vnější fáze a existují dva typy kapslí. U prvního typu kapslí je účinná složka v jádře a je obklopená ochrannou membránou. Kapsle druhého typu má účinnou složku rozptýlenou v prostoru kapsle.

Materiál pro enkapsulaci by měl být vhodný pro použití v potravinářství, měl by chránit biologicky aktivní složku vůči vnějšímu prostředí, mít dobré reologické vlastnosti při vyšší koncentraci, dobré emulzifikační vlastnosti, představovat nízké výrobní náklady a být snadno dostupný. Běžně používanými materiály jsou sacharidy (například škrob a jeho deriváty či celulóza a její deriváty) a proteiny (například proteiny mléčné a syrovátkové).

Pro enkapsulaci se používají techniky sprejového sušení, lyofilizace, fluidní vrstvy, extruze nebo emulzifikace.

Enkapsulace probiotik má potenciál pro využití v oblasti funkčních potravin. Důležitým krokem v tomto procesu bude optimalizace metod enkapsulace pro dosažení žádoucí velikosti kapslí (Dima et al., 2014).

Předpokládalo se, že enkapsulace by měla zlepšit přežívání buněk v přítomnosti nízkého pH a kyslíku, avšak ukázalo se, že zapouzdřené probiotické bakterie v jogurtu měly odolnost spíše vůči působení kyslíku než vůči nízkému pH. Zapouzdření probiotických mikroorganismů při výrobě sýrů však nemělo žádný vliv na jejich stabilitu (Champagne, 2009).

3.9 Probiotické produkty

V současnosti je vysoká poptávka po produktech s probiotiky. Kromě fermentovaných mléčných výrobků jsou probiotika přidávána také do nemléčných produktů a krmiv (Muller et al., 2009). Fermentovaná mléka však stále zůstávají hlavním zdrojem probiotických mikroorganismů pro člověka (Kadlec et al., 2009).

3.9.1 Fermentované mléčné výrobky

Fermentované potraviny byly konzumovány již ve starověkém Řecku a Římě. Ellie Metchnikoff, nositel Nobelovy ceny, na počátku 19. století tvrdil, že probiotika mají pozitivní účinky na lidské zdraví, přičemž odkazoval na dlouhověkost Bulharů, kteří fermentované mléčné výrobky dříve konzumovali běžně (Nagpal et al, 2014).

Fermentovaným mléčným produktům se přisuzují četné benefity, mezi které patří zvýšení stravitelnosti a nutriční hodnoty mléka, nižší obsah laktózy, podpora lepšího vstřebání vápníku a železa, obsah některých vitaminů skupiny B, pozitivní ovlivnění střevní mikroflóry, zabránění rozvoji patogenních mikroorganismů a snížení hladiny krevního cholesterolu (Forsythe, 2000).

3.9.1.1 Výroba fermentovaných mléčných výrobků

Prvním důležitým krokem je výběr mléka, které obsahuje nízký počet mikroorganismů a nesmí obsahovat inhibiční faktory, které negativně ovlivňují růst zákysových kultur.

Následuje standardizace tuku přidavkem smetany nebo odstředěného mléka, přičemž obsah tuku u fermentovaných mlék je 0,5 – 3,5 %. Standardizuje se také tukuprostá sušina. Její minimální obsah ve fermentovaném mléce je 8,2 % (Kadlec et al, 2009). Zvýšení obsahu tukuprosté sušiny mléka na 12 – 14 % vede ke zvýšení počtu živých bakterií ve fermentovaných produktech. Avšak vysoký obsah tukuprosté sušiny zvyšuje osmotický tlak, který je pro mikroorganismy nepříznivý

(Champagne, 2009). Sušina je standardizována přidavkem kaseinu a bílkovin syrovátky. Kromě nich se mohou do výrobků přidávat i sacharidy, umělá sladidla, stabilizátory a hydrokoloidy. Přidavkem sacharidů před zaočkováním zákysovou kulturou se zvýší osmotický tlak, což negativně ovlivňuje vlastní fermentaci.

Krok deaerace je důležitý zvláště v případě, pokud jsou pro fermentaci použity striktně anaerobní mikroorganismy. Deaerace také zlepšuje proces homogenizace, jejímž cílem je zabránit vystávání mléčného tuku a zlepšit stabilitu a konzistenci fermentovaných mlék (Kadlec et al, 2009). Následuje tepelné ošetření mléka, čímž se zlepší vlastnosti mléka jako substrátu pro zákysové kultury. Záhřevem totiž dochází ke zničení antibakteriálních složek, vyloučení kyslíku, snížení redoxního potenciálu a částečné proteolýze (Champagne 2009). Mléko se dále zchladí na teplotu inokulace.

Fermentace probíhá buď ve spotřebitelských obalech, nebo ve fermentačním tanku (Kadlec et al, 2009). Při jejich výrobě jsou použity mléčné kultury. Typickými mléčnými kulturami jsou mezofilní *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* nebo termofilní *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* či *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Forsythe, 2000). Mohou být ve stavu tekutém nebo lyofilizovaném. Výrobky, které jsou po fermentaci tepelně ošetřeny, se významně liší od výrobků po fermentaci tepelně neošetřených tím, že neobsahují živé mikroorganismy.

Plnění fermentových mléčných výrobků do obalu probíhá asepticky. Výrobky jsou následně zchlazeny na teplotu okolo 5 °C (Kadlec et al, 2009).

3.9.1.2 Probiotické kultury

Nejčastěji používané probiotické bakterie jsou *Lactobacillus acidophilus* LA5, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Lactobacillus johnsonii* LA1, *Lactobacillus casei* Shirota, *Lactobacillus casei* DN114-001, *Lactobacillus paracasei* St11, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus reuteri* ATTC 55730, *Lactobacillus plantarum* 299V, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, *Bifidobacterium longum* BB 536 a *Bifidobacterium breve* Yakult (Kadlec et al., 2009).

Do výrobku jsou tyto kultury přidávány až po jeho okyselení, které je způsobeno činností bakterií mléčného kvašení, a to před zráním výrobku nebo v průběhu jeho zrání. Kultury jsou přidávány v takovém množství, aby měly na konci trvanlivosti výrobku požadovanou koncentraci (Görner, Valík, 2004).

Probiotické mikroorganismy jsou nejčastěji uchovávány v sušené podobě. Nejběžnějšími technikami pro získání sušených probiotických mikroorganismů je technika lyofilizace a sprejového sušení (Champagne et al., 2009). Sušené dehydratované kultury jsou stabilní, snadno skladovatelné a transportovatelné (Gueimonde et al., 2012).

Probiotické mikroorganismy jsou schopné růst v mléce, ale většinou jen velmi pomalu (Champagne et al., 2009). Přirozeným prostředím většiny probiotických bakterií je totiž střevo, nikoliv mléko. (Görner, Valík, 2004). Záleží však také na použitém probiotickém kmenu (Champagne et al., 2009). Například *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* přežívá v mléčném výrobku mnohem delší dobu než druh *Bifidobacterium longum*, pro něhož mléčné prostředí není přirozené, neboť byl izolován z trávicího traktu lidí (Tománková et al., 2006). Pomalý růst bifidobakterií a *Lactobacillus rhamnosus* v mléce je částečně způsoben malým množstvím laktázy. Probiotické mikroorganismy lépe rostou ve starším mléce, které je skladované až 5 dnů při teplotě 4 °C, protože v takovém mléce dochází k rozvoji psychrotrofních bakterií s proteolytickou a lipolytickou aktivitou. Právě proteolytická a lipolytická aktivita stimuluje růst probiotických bakterií. Intenzivní lipolytická aktivita však může mít také opačný efekt. Pro probiotické i startovací kultury může být limitujícím faktorem redoxní potenciál, a proto je důležitá deaerace mléka (Champagne et al., 2009). Pro zlepšení jejich růstu a přežívání jsou do mléka pro výrobu jogurtů často přidávány prebiotické složky, rostlinné extrakty, mléčné proteiny, inulin či laktulosa, které zlepšují růst probiotických bakterií (Bakr, 2015).

3.9.1.3 Fermentované mléčné výrobky s mezofilními bakteriemi

Do této skupiny výrobků spadají kysaná mléka, kysané smetany a kysané podmásli. Pro fermentaci kysaných mlék se užívá 0,5 – 1,5 % provozní zákys tvořený aromatickou

mezofilní kulturou a fermentace probíhá při 18 – 21 °C. Pro fermentaci kysané smetany se užívá také mezofilních aromatických kultur. Fermentační podmínky ve smetaně jsou méně vhodné, a proto se používá teplota 18 – 21 °C po dobu 18 – 20 hodin. Biologicky hodnotným vedlejším produktem při výrobě másla je podmáslo, které se pro zlepšení jeho sensorických vlastností také fermentuje (Kadlec, et al., 2009).

3.9.1.4 Fermentované výrobky s termofilními bakteriemi

Nejrozšířenějším produktem s termofilními bakteriemi je jogurt, který může být jak přírodní, tak ochucený (Kadlec et al., 2009). Pro výrobu jogurtu se využívá *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus bulgaricus* ve stejném poměru (Forsythe 2000). Mezi *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus bulgaricus* je synergický vztah (Görner, Valík, 2004). Jogurt je vyráběn ze syrového mléka, které projde pasterací při 80 – 95 °C po dobu 1 – 30 minut a dále je zchlazeno a homogenizováno při 50 – 70 °C tlakem 100 – 200 kg/cm². Mléčné laktobacily rostou lépe v mléce, které bylo ošetřeno při 95 °C po dobu 5 min, na rozdíl od mléčných streptokoků, kterým vyhovovala spíše nižší teplota tepelného záhřevu (Champagne, 2009). Do mléka jsou dále přidány jogurtové kultury a následně probíhá inkubace, a to 4 – 16 h při teplotě 30 – 45 °C. Po inkubaci je jogurt zchlazen, případně je do něj přidána příchut' či ovoce. Nakonec je jogurt balen a skladován (Forsythe, 2000). Teplota skladování jogurtu by z hygienických důvodů neměla přesáhnout 8 °C (Görner, Valík, 2004).

Do skupiny výrobků s termofilními bakteriemi jsou někdy zařazována i acidofilní mléka (Kadlec et al., 2009).

3.9.1.5 Fermentované výrobky s bakteriemi a kvasinkami

Těmito výrobky jsou kefir a kumys (Kadlec et al., 2009). Pro výrobu kefiru a kefírových mlék se používají kefírová zrna, která jsou tvořena mléčnými kvasinkami (*Kluyveromyces fragilis*, *Candida kefir*), laktokoky (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*,

Lactococcus lactis subsp. *cremoris*) a laktobacily (*Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus kefir*). V mlékárenském průmyslu se pro výrobu kefiru často místo kefirových zrn používají čisté kefirové kultury, aby byla dodržena standardnost produktu (Görner, Valík, 2004). Při výrobě kefiru se uplatňuje homofermentativní a heterofermentativní mléčné kvašení a také etanolové kvašení (Kadlec et al., 2009). Kefirové laktobacily rostou v mléku samy špatně, avšak spolu s kefirovými kvasinkami se jim daří lépe, neboť spolu tvoří symbiózu. Kvasinky fermentují laktózu a produkují tak asi 1 % etanolu a oxid uhličitý. Mléko s kefirovou kulturou se fermentuje 14 – 18 hodin při 18 – 22 °C (Görner, Valík, 2004).

3.9.2 Kojenecká výživa

Světová zdravotnická organizace doporučuje do 6 měsíců stáří dítěte výhradně kojit a teprve poté zavádět nemléčné příkrmy a dále pokračovat s příkrmem v kombinaci s kojením až do dvou let věku dítěte a dokonce i déle, přičemž poškození v důsledku nesprávné výživy před druhým rokem života je pravděpodobně nevratné (Nevoral, 2013).

3.9.2.1 Přirozená výživa kojence

Složení mateřského mléka se mění v závislosti na potřebách rostoucího dítěte. Dělí se na kolostrum, mléko přechodové a mléko zralé. Kolostrum má vysoký obsah bílkovin, které mají zejména imunoprotektivní význam. Směrem ke zralému mléku koncentrace bílkovin klesá a naopak se zvyšuje obsah tuků a sacharidů. Složení mateřského mléka se mění také během dne a dokonce i během jednoho kojení (Svačina et al. 2013).

Kojení je důležité jak pro zdraví a vývoj dítěte, tak pro zdraví matky. Je mimo jiné také důležité z hlediska psychologického, sociálního, ekonomického a ekologického (Nevoral, 2013).

3.9.2.2 Umělá kojenecká výživa

Na umělou kojeneckou výživu se přistupuje v případě, že matka nemůže ze závažných důvodů dítě kojít. V prvních 6 měsících života pak přichází v úvahu umělá výživa pro kojence ve formě počáteční mléčné výživy a od 6. měsíce pak pokračovací mléčná výživa. Umělá kojenecká výživa však i přes veškerou snahu nedokáže zcela nahradit mateřské mléko (Svačina et al. 2013).

Složení umělé mléčné výživy pro kojence a děti do jednoho roku věku se upravuje tak, aby se podobalo mateřskému mléku. Ke kravskému mléku se přidávají deficitní složky, kterými jsou sérové bílkoviny, nenasycené mastné kyseliny a laktóza. Směs se ošetřuje vysokou teplotou a následně se homogenizuje, suší a fortifikuje vitaminy a železem (Kadlec et al., 2009).

Umělé kojenecké výživy jsou v posledních letech stále častěji obohacovány právě o probiotika, prebiotika a synbiotika. Jsou do nich přidávány *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus helveticus*, *Bifidobacterium longum* BL 999 a *Lactobacillus rhamnosus* LPR.

Výbor pro výživu Evropské společnosti pro pediatrickou gastroenterologii, hepatologii a výživu prohlásil, že tato probiotika podporují růst a stolici dětí do 4 – 6 měsíců věku. U starších kojenců krměných kojeneckou mléčnou výživou obohacenou o *Bifidobacterium lactis* samotným nebo v kombinaci se *Streptococcus thermophilus*, se snižuje riziko nespecifických gastrointestinálních infekcí a nutnost častého užití antibiotik. Laktobacily pravděpodobně snižují riziko gastroenteritidy u kojenců způsobenou rotaviry (Forsythe, 2004).

Probiotika v dětských výživách nejsou považována za nebezpečná, nicméně důkazy o jejich prospěšnosti jsou nedostačující, a proto dosud nebylo doporučeno jejich rutinní používání (Nevoral, 2013).

Prebiotické oligosacharidy jsou třetí největší složkou mateřského mléka hned po laktóze a lipidech, a proto je zvýšená snaha produkovat přípravky dětské mléčné výživy s prebiotickou vlákninou a přiblížit tak strukturu mikroflóry trávicího traktu nekojených dětí co nejvíce přirozené flóře dětí kojených (Zbořil, 2005).

3.10 Legislativní úprava

Požadavky na potraviny upravuje zákon č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů v platném znění.

Vyhláška č. 397/2016 Sb. upravuje požadavky na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. V tabulce č. 2 jsou uvedeny mikrobiologické požadavky na jednotlivé kysané mléčné výrobky a na druhy živých mikroorganismů mléčného kysání v těchto výrobcích obsažených.

Nařízením Evropské komise č. 432/2012, kterým se zřizuje seznam schválených zdravotních tvrzení při označování potravin jiných než tvrzení o snížení rizika onemocnění a o vývoji a zdraví dětí, obsahuje jediné zdravotní tvrzení, které se týká bakterií mléčného kvašení. Toto tvrzení říká, že živé kultury v jogurtu nebo kysaném mléce zlepšují trávení laktózy z daného výrobku u osob, které laktózu špatně tráví. Toto tvrzení může nést pouze ten jogurt či kysané mléko, které obsahuje nejméně 10^8 kolonií tvořících jednotek živých mikroorganismů kyselobuňkové kultury (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*) na 1 gram výrobku.

Vyhláška č. 54/2004 Sb. reguluje potraviny určené pro zvláštní výživu a způsob jejich použití. Do kategorie potravin pro zvláštní výživu spadají i potraviny pro počáteční a pokračovací kojeneckou výživu a výživu malých dětí.

Tabulka č. 2: Mikrobiologické požadavky na jednotlivé kysané mléčné výrobky a na druhy živých mikroorganismů mléčného kysání v těchto výrobcích obsažených dle vyhlášky č. 397/2016 Sb.

Druh výrobku	Použité mikroorganismy	Mléčná mikroflóra výrobku v 1 g
Kysané či zakysané mléčné výrobky dále neuvedené	monokultury nebo směsné kultury bakterií mléčného kvašení	10^6
Acidofilní mléko	<i>Lactobacillus acidophilus</i> a další mezofilní, příp. termofilní kultury bakterií mléčného kvašení	10^6 <i>Lactobacillus acidophilus</i>
Jogurty, jogurtová mléka	protosymbiotická směs <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> a <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	10^7
Kefír	zákys připravený z kefirových zrn nebo kefirové kultury, jehož mikroflóra se skládá z kvasinek zkvašujících laktózu <i>Kluyveromyces marxianus</i> i nezksašujících laktózu <i>Sacharomyces unisporus</i> , <i>Sacharomyces cerevisiae</i> , <i>Sacharomyces exiguus</i> a dále <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> a <i>Aerobacter</i> , rostoucí ve vzájemném společenství	bakterie mléčného kvašení 10^6 a kvasinky 10^4
Kefirové mléko	zákys skládající se z kvasinkových kultur rodu <i>Kluyveromyces</i> , <i>Torulopsis</i> nebo <i>Candida valida</i> a mezofilních a termofilních kultur bakterií mléčného kvašení v symbióze	bakterie mléčného kvašení 10^6 a kvasinky 10^2
Kysaný mléčný výrobek s bifidokulturou	<i>Bifidobacterium</i> sp. v kombinaci s mezofilními a termofilními bakteriemi mléčného kvašení	10^6 bifidobaktérie

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Použitý materiál

Použitý materiál zahrnuje všechny přístroje, laboratorní pomůcky, chemikálie, kultivační média a vzorky využitě pro mikrobiologický rozbor. Všeobecně platí, že veškeré vybavení mikrobiologické laboratoře musí být udržováno v čistotě a perfektním provozním stavu. U přístrojů a pomůcek musí být zaručena jejich čistota a sterilita až do doby jejich použití.

4.1.1 Přístroje

- Laboratorní váhy (Biotech, Česká republika)
- Biologický termostat (Biotech, Česká republika)
- Chladničky (Liebherr, SRN/Rakousko)
- Autokláv (Schoeller Instruments, Česká republika)
- Vodní lázeň (Schoeller Instruments, Česká republika)
- Homogenizátor (Biotech, Česká republika)
- Automatické pipety (Biotech, Česká republika)
- Vortex (Biotech, Česká republika)

4.1.2 Pomůcky

- Laboratorní sklo (zkumavky, odměrný válec, reagenční lahve, Petriho misky), (Merci, Česká republika)
- Vytváječe anaerobního prostředí (Merck, Německo)
- Anaerostaty (Oxoid, UK)

4.1.3 Chemikálie

- BSM suplement (Sigma Aldrich, USA)
- Fyziologický roztok (Noack, Francie)
 - o Chlorid sodný 8,5 g
 - o Destilovaná voda 1000 ml

4.1.4 Kultivační média

- MRS médium (Lab M Limited, UK)
- BSM médium (Sigma Aldrich, USA)

Pro stanovení počtu bakterií rodu *Bifidobacterium* bylo použito selektivní BSM médium (Bifidus selektivní agar) a pro bakterie mléčného kvašení pak MRS agar (Man, Rogosa a Sharp).

4.1.4.1 MRS médium

MRS médium je tuhá selektivní půda pro stanovení počtu bakterií mléčného kvašení. Dehydratovaná MRS půda obsahuje polypepton, masový extrakt, kvasničný extrakt, glukózu, Tween 80, fosforečnan draselný, octan sodný, citrát amonný, síran hořečnatý, síran manganatý a bakteriologický agar. Složení MRS média je uvedeno v tabulce č. 3. Připravené médium má při 25 °C pH 5,7±0,1.

Tabulka č. 3: Složení MRS média

Složení MRS média	
Polypepton	10 g
Masový extrakt	10 g
Kvasničný extrakt	4 g
Citrát amonný	2 g
Octan sodný	5 g
Síran hořečnatý	0,2 g
Síran manganatý	0,05 g
Fosforečnan draselný	2 g
Glukóza	20 g
Tween 80	1,08 g
Bakteriologický agar	15,5 g
Destilovaná voda	1000 ml

4.1.4.2 BSM médium

BSM agar je vhodný pro stanovení bakterií rodu *Bifidobacterium* ve vzorcích mléčných produktů. Dehydratovaná půda BSM obsahuje pepton, masový extrakt, kvasničný extrakt, dextrózu, chlorid sodný, látky pro detoxikaci vedlejších metabolických produktů, redukční a pufrovací činidla, selektivní soli, které inhibují plísně a gramnegativní bakterie, látky inhibující glykolýzu a antibiotika. Připravené médium má pH $6,8 \pm 0,2$ při 25 °C. Do média byl navíc přidán BSM suplement, což je směs antibiotik (výrobce blíže nespecifikovaná), který inhibuje růst doprovodné mikroflóry v kysaných mléčných výrobcích a umožňuje selektivní stanovení bakterií rodu *Bifidobacterium*.

4.1.5 Vzorky

- Jogurt
- Kefír
- Dětská výživa

Vzorky byly zakoupeny v běžné tržní síti tak, aby jejich šarže byly ve všech případech co nejčerstvější a mohly být podrobeny mikrobiologickému rozboru vždy ve stejném intervalu skladování. U vzorku dětské výživy byl proveden jednorázový mikrobiologický rozbor. Pro experiment byly vybrány takové produkty, u nichž výrobce na obale deklaroval obsah probiotických mikroorganismů.

4.1.5.1 Kefírové mléko

Jedná se o nízkotučné kefírové mléko, které obsahuje mléko, mléčné kultury a probiotickou kulturu ABT: *Lactobacillus acidophilus* 10⁶/g, *Bifidobacterium* 10⁶/g a *Streptococcus thermophilus* 10⁶/g. Výrobce doporučuje skladovat při teplotě 2 °C – 8 °C. V tabulce č. 4 jsou uvedeny výživové údaje kefírového mléka na 100 g.

Tabulka č. 4: Výživové údaje u kefírového mléka

Výživové údaje na 100 g	
Energie	170 kJ/40 kcal
Tuk	1,1 g
z toho nasycené mastné kyseliny	0,8 g
Sacharidy	4,1 g
z toho cukry	4,1 g
Bílkoviny	3,3 g
Sůl	0,1 g

4.1.5.2 Jogurt

Jde o vzorek bílého jogurtu, který kromě mléka, mléčných bílkovin a jogurtových kultur obsahuje živou kulturu *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 v počtu minimálně $4 \times 10^9/100$ g. Výrobce doporučuje skladovat při teplotě 2 °C – 8 °C. Výživové údaje tohoto bílého jogurtu jsou uvedeny v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: Výživové údaje u jogurtu

Výživové údaje na 100 g	
Energie	288 kJ/69 kcal
Tuky	3,4 g
z toho nasycené kyseliny	2,1 g
Sacharidy	5,1 g
z toho cukry	5,1 g
Bílkoviny	4,5 g
Sůl	0,15 g
Vápník	145 mg

4.1.5.3 Dětská výživa

Jde o výživu vhodnou pro děti od ukončeného 15. měsíce. Obsahuje sušené odtučněné mléko, maltodextrin, laktózu, rostlinné oleje, bílkoviny mléčné syrovátky, sójový lecitin, vitamíny, minerální látky, rybí olej a bakterie mléčného kvašení: *Bifidobacterium longum* ATCC BAA-999 v počtu 10^6 KTJ.g⁻¹ prášku na konci minimální trvanlivosti a *Lactobacillus rhamnosus* GGMCC 1.3724 v počtu 10^6 KTJ.g⁻¹ prášku na konci minimální trvanlivosti. Výrobce doporučuje skladovat v suchu při pokojové teplotě.

4.2 Použité metody

Analyzované vzorky kefirového mléka i jogurtu byly jedné šarže. Analýza probíhala po celou dobu jejich trvanlivosti. První stanovení počtu bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií bylo provedeno v den jejich zakoupení. Pro stanovení byly použity tři stejné vzorky jedné šarže daného výrobku. Ostatní vzorky stejné šarže daného výrobku byly skladovány při dvou různých teplotách: 4 °C a 10 °C. Další stanovení bylo u jogurtu i kefirového mléka provedeno po 7 dnech skladování, kdy byly pro rozbor použity tři stejné vzorky jedné šarže daného výrobku skladované při teplotě 4 °C a tři stejné vzorky jedné šarže skladované při teplotě 10 °C. Poslední stanovení počtu bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií bylo provedeno u kefirového mléka po 21 dnech skladování a u jogurtu po 14 dnech skladování, a to obdobným způsobem, jako u stanovení po 7 dnech skladování. Celkem tedy bylo analyzováno 45 vzorků jogurtu a 45 vzorků kefirového mléka. Intervaly mikrobiologického rozboru byly zvoleny s ohledem na dobu trvanlivosti analyzovaných vzorků. Kromě stanovení počtu bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií v kefirovém mléku a jogurtu bylo také provedeno stanovení těchto bakterií ve třech vzorcích dětské výživy stejné šarže, a to na konci doby její trvanlivosti.

4.2.1 Stanovení počtu bakterií mléčného kvašení a bakterií rodu

Bifidobacterium sp. plotnovou metodou

Stanovení počtu bakterií mléčného kvašení bylo provedeno dle ČSN EN ISO 15214 a stanovení rodu *Bifidobacterium* sp. pak dle Burdychová (2007) a Burdychová, Sládková (2007). Pro stanovení počtu bakterií mléčného kvašení a bakterií rodu *Bifidobacterium* sp. byla pro očkování vzorku použita metoda zalévání inokula kultivační půdou.

4.2.1.1 Příprava kultivační půdy

Do reagenční lahve bylo nejprve naváženo potřebné množství příslušné dehydratované půdy, přičemž dle návodu výrobce mělo být v jednom litru destilované vody rozpuštěno 55,5 g BSM agarů a 70 g MRS agarů. Dehydratovaná půda byla rozmíchána s destilovanou vodou a ponechána 10 minut bobtnat. Reagenční lahev s dehydratovanou půdou a destilovanou vodou byla sterilizována při 121 °C po dobu 15 minut a po sterilizaci vložena do vodní lázně vytemperované na 45 °C. V BSM agarů byl těsně před jeho použitím řádně rozmíchán BSM suplement v množství 116 mg na 1 litr BSM agarů.

4.2.1.2 Příprava ředění

Příprava výchozí suspenze a desetinásobných ředění byla provedena dle ČSN EN ISO 6887-1. Místo odběru u vzorku potravin bylo dezinfikováno tampónem namočeným v 70% etanolu. U jogurtu a dětské výživy byla pomocí sterilních pomůcek odvážena navážka $10,0 \pm 0,1$ g do označeného sáčku. Navážka jogurtu byla asepticky zalita pomocí odměrného válce s 90 ml fyziologického roztoku, který byl připraven dle návodu výrobce. Obsah byl následně ponechán v homogenizátoru 60 s, čímž byla získána výchozí suspenze. Výchozí suspenze u keřirového mléka byla získána tak, že 10 ml keřirového mléka bylo přeneseno do sáčku s 90 ml fyziologického roztoku. Další desetinásobné ředění bylo získáno přenesením 1 ml výchozí suspenze sterilní pipetou do sterilní zkumavky s 9 ml fyziologického roztoku. Obsah ve zkumavce byl promíchán 5 – 10 s pomocí vortexu. Byl volen takový stupeň ředění, aby výsledný počet kolonií na jedné plotně byl 15 – 300.

4.2.1.3 Kultivační vyšetření

Dna Petriho misek byly označeny názvem vzorku a do každé z těchto Petriho misek bylo sterilní pipetou přeneseno množství 1 ml suspenze příslušného ředění a zalito asi

20 ml půdy o teplotě 45 °C. Inokulum s agarem bylo krouživým pohybem promícháno a ponecháno zatuhnout. Naočkované plotny pro stanovení bakterií mléčného kvašení byly v termostatu inkubovány dnem vzhůru při 30 °C aerobně po dobu 72 hodin. Misky naočkované pro stanovení počtu bakterií rodu *Bifidobacterium* sp. byly vloženy do anaerostatu, do kterého byl dále přidán vyvíječ anaerobní atmosféry, a byly dále inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 72 hodin.

4.2.1.4 Hodnocení

Počítání kolonií proběhlo dle ČSN ISO 7218. Pro výpočet byly použity misky, které obsahovaly maximálně 300 KTJ ve dvou po sobě jdoucích ředěních.

4.2.1.5 Vyjádření výsledků

Počet mikroorganismů přítomných ve vzorku se spočítal jako vážený průměr dvou po sobě následujících ředění podle vzorce:

$$N = \frac{\Sigma C}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

ΣC ...součet kolonií mikroorganismů ve vybraných miskách

n_1 ...počet vybraných misek z prvního měření

n_2 ...počet vybraných misek z druhého ředění

d ...ředicí faktor odpovídající prvnímu pro výpočet použitému ředění

V ...objem inokula v ml očkovaného na každou plotnu

Výsledek byl zaokrouhlen na dvě platné číslice a vyjádřen jako počet kolonií tvořících jednotek v gramu výrobku (KTJ.g⁻¹).

4.2.1.6 Zpracování výsledků

Získané výsledky byly statisticky zpracovány prostřednictvím programu STATISTICA 12, kde byla provedena regresní analýza pro vyjádření změn počtů probiotických mikroorganismů v průběhu skladování. Pro zjištění statistické průkaznosti vlivu různých teplot skladování na počty probiotických mikroorganismů byla v tomto programu provedena analýza rozptylu, pro kterou byl použit Tukeyův test. Byly také vypočítány základní popisné statistiky (průměr, směrodatná chyba průměru).

5 VÝSLEDKY

5.1 Analýza fermentovaných mléčných výrobků a dětské výživy

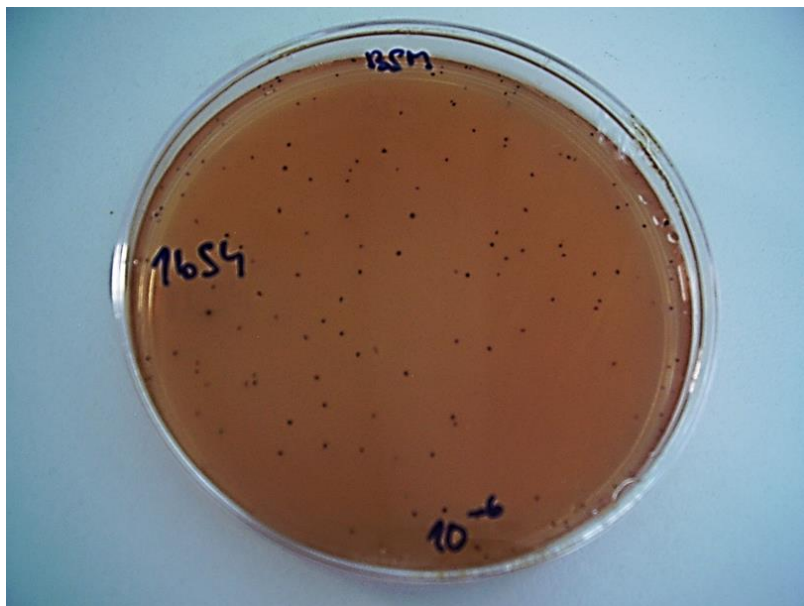
Rozbor fermentovaných mléčných výrobků a dětské výživy byl proveden dle metody uvedené v kapitole 4.2.1. Vzorčky byly naočkovány na kultivační půdy, které jsou uvedeny v kapitole 4.1.4, metodou uvedenou v kapitole 4.2.1.3 a po kultivaci byly odečteny kolonie dle postupu uvedeného v kapitole 4.2.1.4.

5.1.1 Kultivace

Bakterie mléčného kvašení měly po inkubaci na tuhé selektivní MRS půdě podobu tečkovitých bílých kolonií (obrázek č. 2). *Bifidobacterium* sp. tvořily na selektivním BSM médiu po anaerobní kultivaci fialové vypouklé kolonie (obrázek č. 1). Narostlé kolonie měly charakteristický vzhled. V tabulce č. 6 jsou shrnuty podmínky kultivace a morfologie kolonií sledovaných bakterií.

Tabulka č. 6: Podmínky kultivace a morfologie kolonií zkoumaných bakterií

Stanovení	Podmínky kultivace	Morfologie kolonie
Bakterie mléčného kvašení	aerobně 30°C, 72 hodin	tečkovité, bílé, lesklé kolonie
<i>Bifidobacterium</i> sp.	anaerobně 37°C, 72 hodin	2 mm fialové kolonie



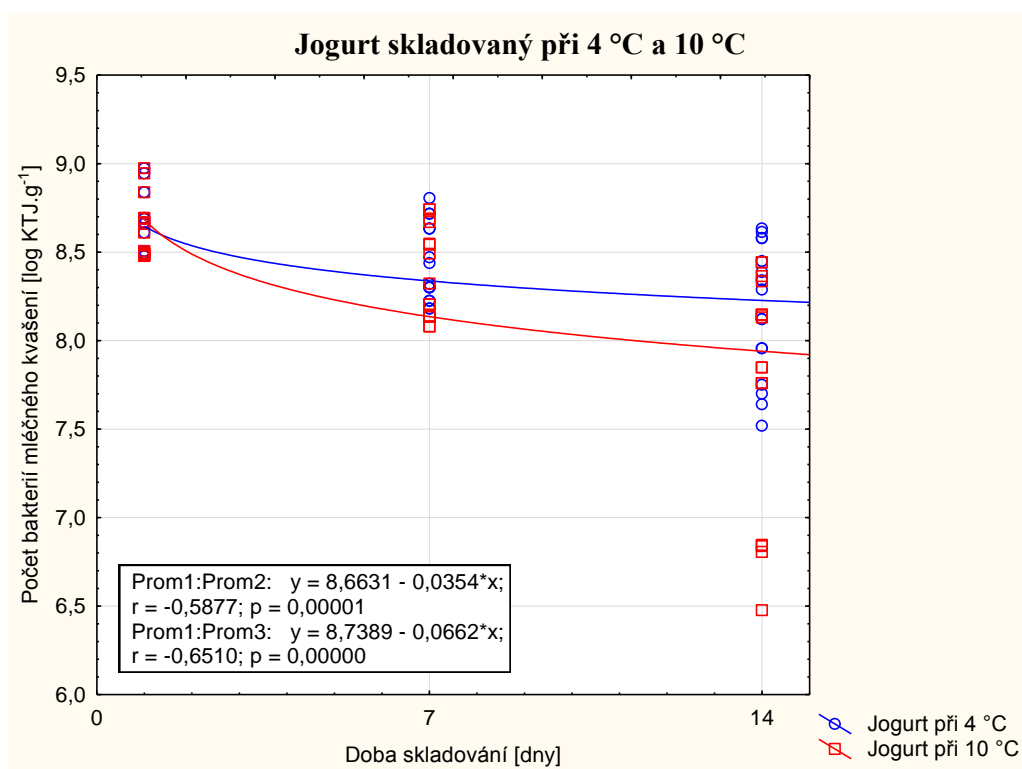
Obr. 1: *Bifidobacterium* sp. na půdě BSM



Obr. 2: Bakterie mléčného kvašení na půdě MRS

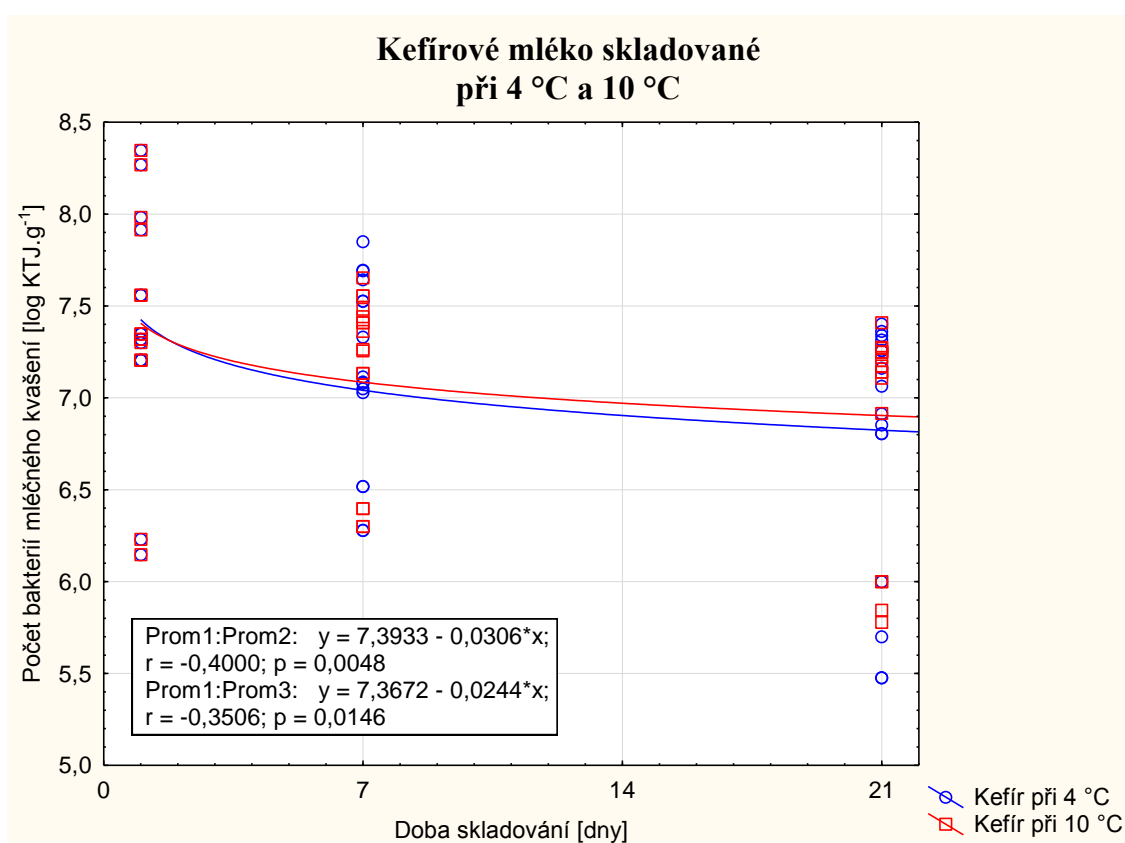
5.1.2 Počty bakterií ve fermentovaných mléčných výrobcích v závislosti na době skladování

V průběhu skladování jogurtu při 4 °C došlo ke statisticky průkaznému poklesu počtu bakterií mléčného kvašení ($p < 0,05$) na průměrnou hodnotu $8,16 \pm 0,09$ KTJ.g⁻¹, a to při počátečním průměrném počtu $8,62 \pm 0,04$ KTJ.g⁻¹, stejně jako u jogurtu skladovaného při 10 °C, u něhož byl průměrný počet bakterií na konci doby trvanlivosti $7,77 \pm 0,16$ KTJ.g⁻¹. Rychlejší pokles v počtu bakterií mléčného kvašení nastal u jogurtu skladovaného při 10 °C. Vývoj počtu bakterií mléčného kvašení (log KTJ.g⁻¹) ve vzorku jogurtu skladovaného při 4 °C a 10 °C v závislosti na době skladování ukazuje obrázek č. 3. Dle vyhlášky č. 397/2016 Sb., by měly jogurty na konci trvanlivosti obsahovat 7,00 KTJ.g⁻¹ protosymbiotické směsi *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.



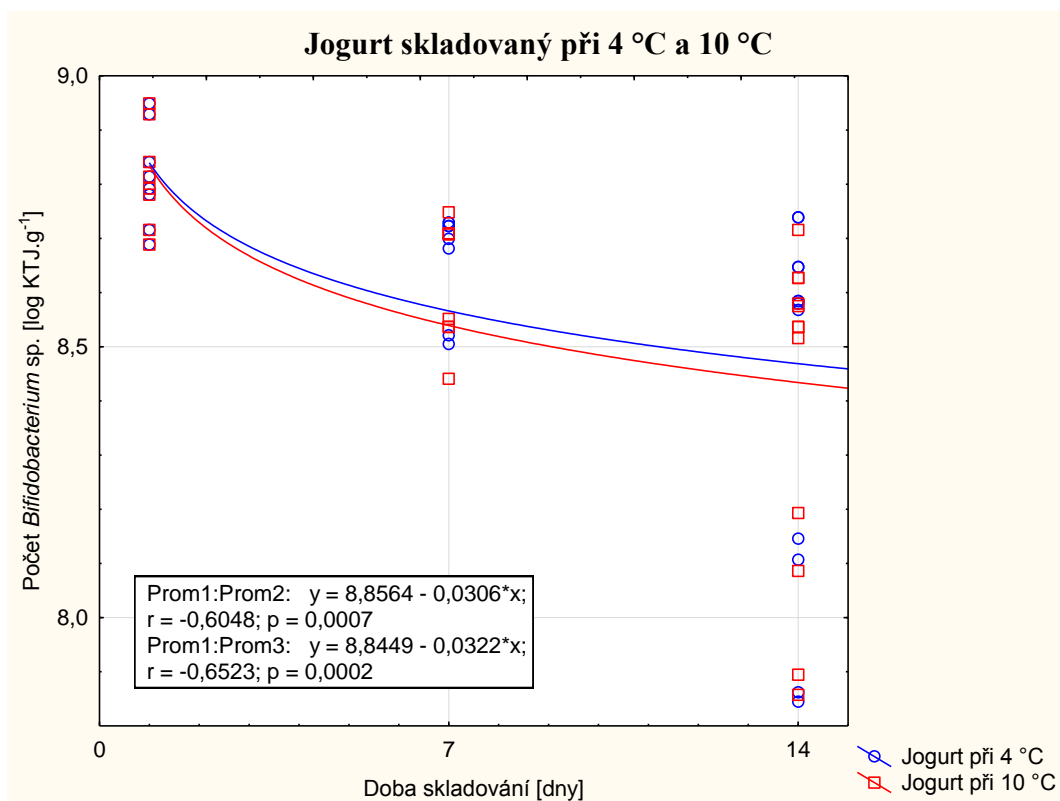
Obr. 3: Počet bakterií mléčného kvašení (log KTJ.g⁻¹) ve vzorku jogurtu skladovaného při 4 °C a 10 °C v závislosti na době skladování

U keřirového mléka, skladovaného při 4 °C, došlo v průběhu skladování také ke statisticky průkaznému poklesu počtu bakterií mléčného kvašení ($p < 0,05$) na průměrnou hodnotu $6,76 \pm 0,17 \text{ KTJ.g}^{-1}$, obdobně jako u keřirového mléka skladovaného při 10 °C, a to na průměrnou hodnotu $6,88 \pm 0,15 \text{ KTJ.g}^{-1}$. Průměrný počet bakterií mléčného kvašení na počátku skladování byl $7,39 \pm 0,15 \text{ KTJ.g}^{-1}$. K rychlejšímu poklesu bakterií mléčného kvašení došlo u keřirového mléka skladovaného při 4 °C. Počet bakterií mléčného kvašení ($\log \text{ KTJ.g}^{-1}$) ve vzorku keřirového mléka skladovaného při 4 °C a 10 °C v závislosti na době skladování ukazuje obrázek č. 4. Dle legislativy musí keřirová mléka na konci trvanlivosti obsahovat $6,00 \text{ KTJ.g}^{-1}$ bakterií mléčného kvašení.



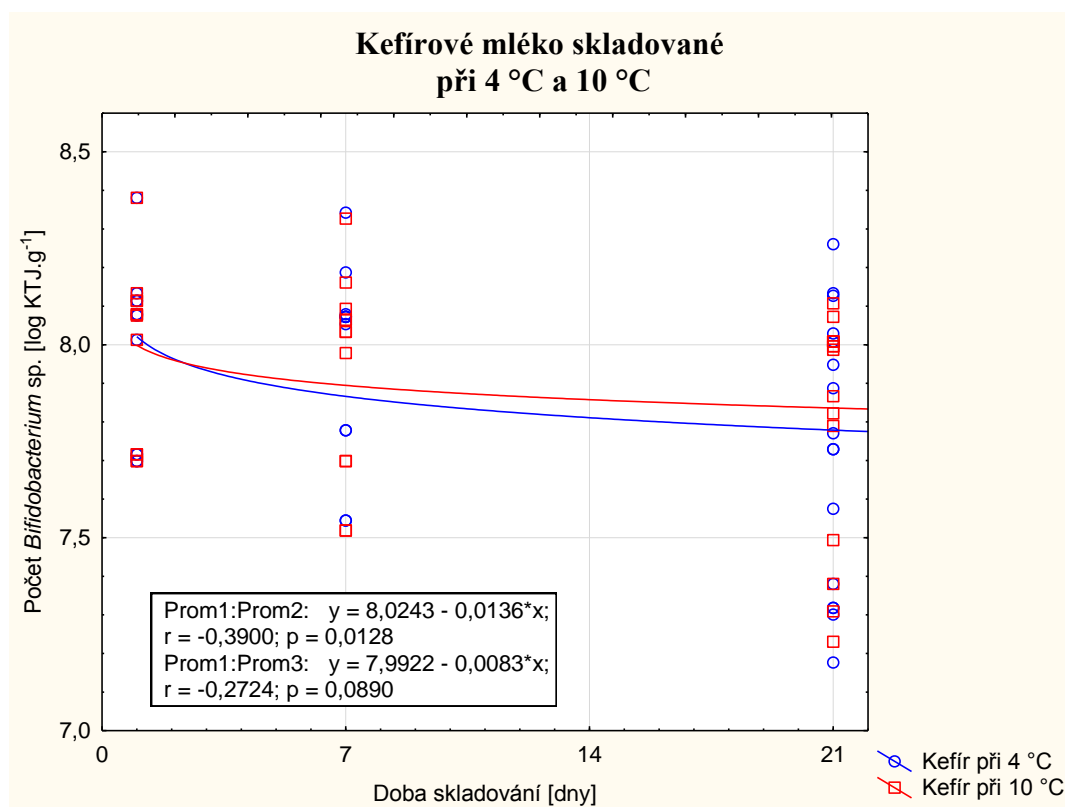
Obr. 4: Počet bakterií mléčného kvašení ($\log \text{ KTJ.g}^{-1}$) ve vzorku keřirového mléka skladovaného při 4 °C a 10 °C v závislosti na době skladování

Počet *Bifidobacterium* sp. u jogurtu skladovaného při 4 °C se průkazně snížil ($p < 0,05$) na průměrnou hodnotu $8,42 \pm 0,1$ KTJ.g⁻¹. Ke statisticky průkaznému snížení počtu *Bifidobacterium* sp. došlo také u jogurtu skladovaného při 10 °C ($p < 0,05$), a to na průměrnou hodnotu $8,40 \pm 0,09$ KTJ.g⁻¹, přičemž průměrná hodnota počtu *Bifidobacterium* sp. na počátku skladování byla $8,81 \pm 0,03$ KTJ.g⁻¹. Počet *Bifidobacterium* sp. se snižoval o málo rychleji u jogurtu skladovaného při 10 °C, než u jogurtu skladovaného při 4 °C, což ukazuje obrázek č. 5. Legislativně předepsaný počet bifidobakterií v kysaných mléčných výrobcích s bifidokulturou na konci jejich trvanlivosti je $6,00$ KTJ.g⁻¹ a výrobce tohoto jogurtu zaručuje minimální počet $7,60$ KTJ.g⁻¹.



Obr. 5: Počet *Bifidobacterium* sp. (log KTJ.g⁻¹) ve vzorku jogurtu skladovaného při 4 °C a 10 °C v závislosti na době skladování

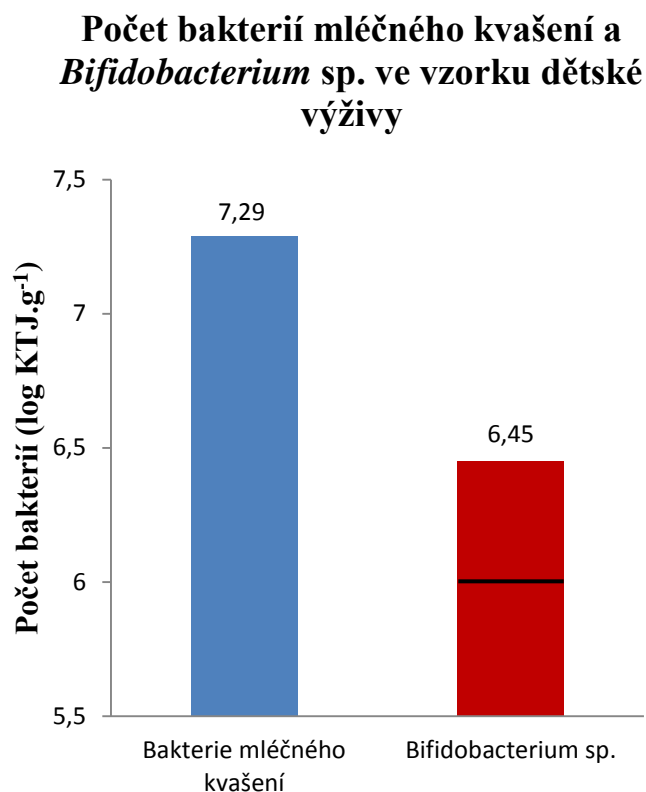
U keřirového mléka byla průměrná počáteční hodnota počtu *Bifidobacterium* sp. $7,98 \pm 0,06$ KTJ.g⁻¹. Na konci skladování byl u keřirového mléka skladovaného při 4 °C průměrný počet *Bifidobacterium* sp. $7,73 \pm 0,09$ KTJ.g⁻¹ a u keřirového mléka skladovaného při 10 °C pak $7,82 \pm 0,07$ KTJ.g⁻¹. U keřirového mléka skladovaného při 10 °C, na rozdíl od keřirového mléka skladovaného při 4 °C, nedošlo k průkaznému snížení počtu *Bifidobacterium* sp. ($p > 0,05$), i když zde mírná tendence poklesu byla, jak je ukázáno na obrázku č. 6. V tomto případě byl také splněn požadavek legislativy, a to, že na konci skladování má být v kysaných mléčných výrobcích s bifidokulturou $6,00$ KTJ.g⁻¹ bifidobakterií.



Obr. 6: Počet *Bifidobacterium* sp. (log KTJ.g⁻¹) ve vzorku keřirového mléka skladovaného při 4 °C a 10 °C v závislosti na době skladování

5.1.3 Počet bakterií v dětské výživě

Ve vzorku dětské výživy bylo $7,29 \pm 0,04$ log KTJ.g⁻¹ bakterií mléčného kvašení a $6,45 \pm 0,08$ log KTJ.g⁻¹ *Bifidobacterium* sp., což je také ukazuje obrázek č. 7. Výrobce uvádí, že produkt má obsahovat minimálně 10^6 KTJ.g⁻¹ prášku *Bifidobacterium longum* na konci doby trvanlivosti. Tento minimální počet *Bifidobacterium* sp. znázorňuje v obrázku č. 7 černá vodorovná čára.

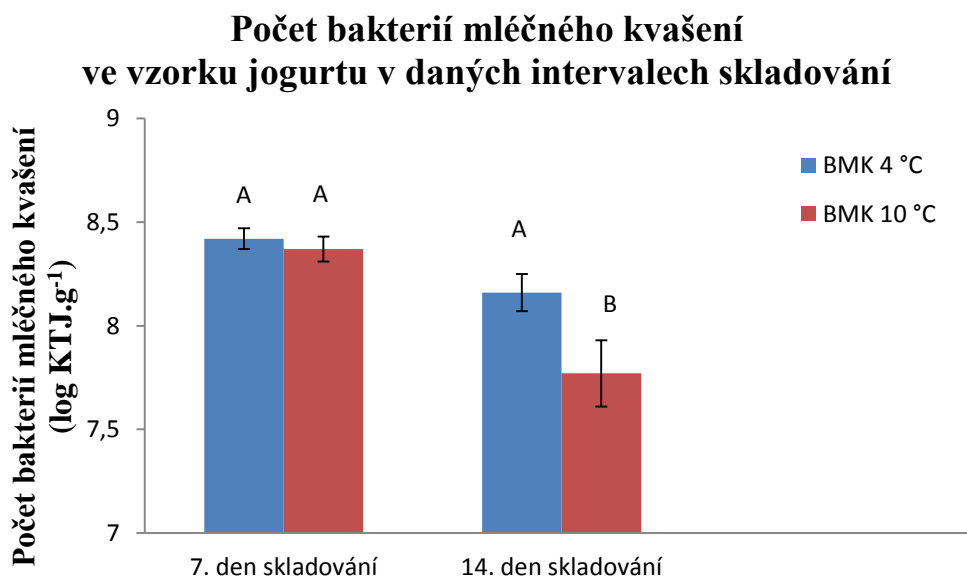


Obr. 7: Počet bakterií mléčného kvašení a *Bifidobacterium* sp. (log KTJ.g⁻¹) ve vzorku dětské výživy

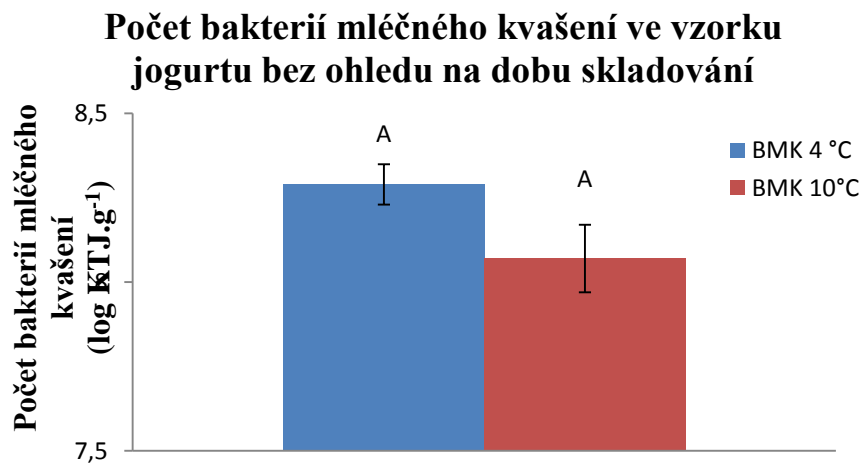
5.1.4 Počty bakterií ve fermentovaných mléčných výrobcích skladovaných při různých teplotách

V počtech bakterií mléčného kvašení u jogurtů skladovaných při dvou různých teplotách nebyl po sedmi dnech skladování zaznamenán statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$). Tento rozdíl byl zaznamenán až po 14 dnech skladování ($p < 0,05$), což ukazuje obrázek č. 8.

Vliv dvou různých skladovacích teplot na počet bakterií mléčného kvašení v jogurtech bez ohledu na dobu skladování však byl statisticky neprůkazný ($p > 0,05$), jak je vidět na obrázku č. 9.

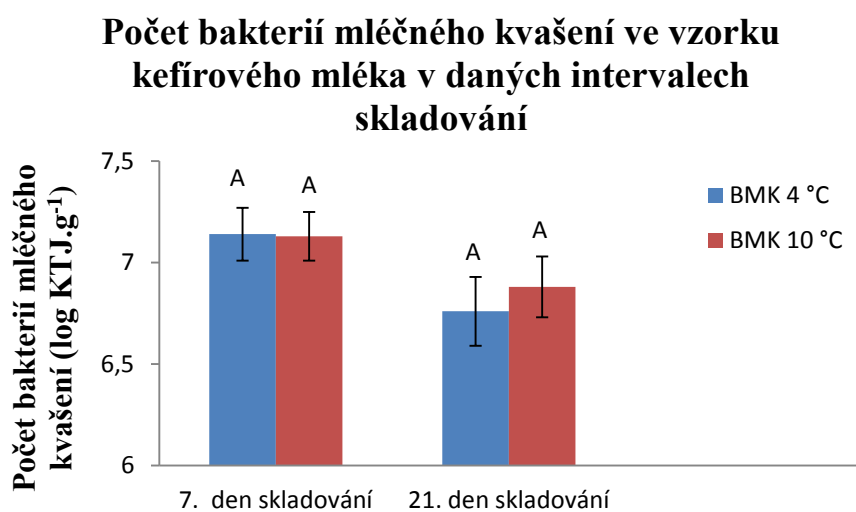


Obr. 8: Počet bakterií mléčného kvašení ($\log \text{KTJ.g}^{-1}$) ve vzorku jogurtu skladovaného při teplotě 4 °C a 10 °C v daných intervalech skladování. Průměry označené různými písmeny se v rámci sledovaného faktoru, kterým byla teplota skladování, statisticky liší ($p < 0,05$)



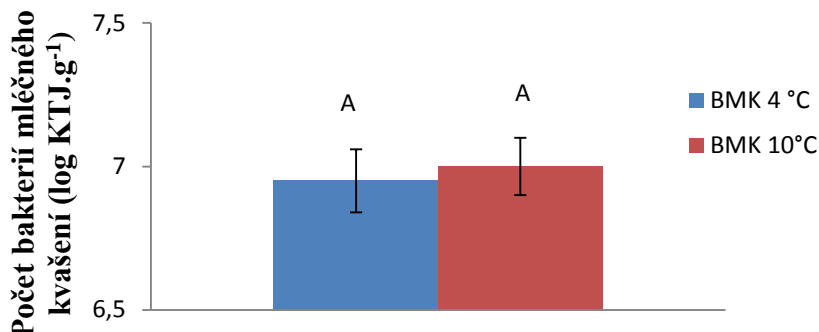
Obr. 9: Počet bakterií mléčného kvašení (log KTJ.g⁻¹) ve vzorku jogurtu, skladovaného při teplotě 4 °C a 10 °C, bez ohledu na dobu skladování

U keřirového mléka, které bylo obdobně jako jogurt skladováno při dvou různých teplotách, nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$) v počtech bakterií mléčného kvašení (obrázek č. 10), a to ani na konci jeho doby trvanlivosti, jako tomu bylo v případě jogurtu. Vliv dvou různých skladovacích teplot na počet bakterií mléčného kvašení v keřirovém mléce bez ohledu na dobu skladování byl také statisticky neprůkazný ($p > 0,05$), jak je vidět na obrázku č. 11.



Obr. 10: Počet bakterií mléčného kvašení (log KTJ.g⁻¹) ve vzorku keřirového mléka skladovaného při teplotě 4 °C a 10 °C v daných intervalech skladování

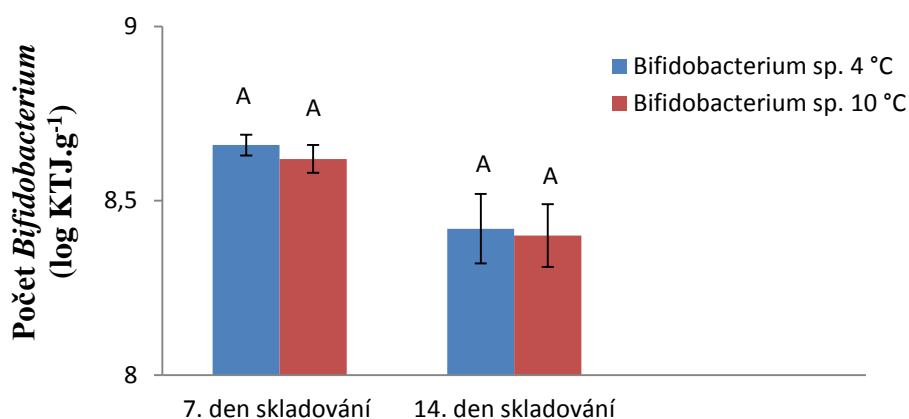
Počet bakterií mléčného kvašení ve vzorku keřirového mléka bez ohledu na dobu skladování



Obr. 11: Počet bakterií mléčného kvašení (log KTJ.g⁻¹) ve vzorku keřirového mléka, skladovaného při teplotě 4 °C a 10 °C, bez ohledu na dobu skladování

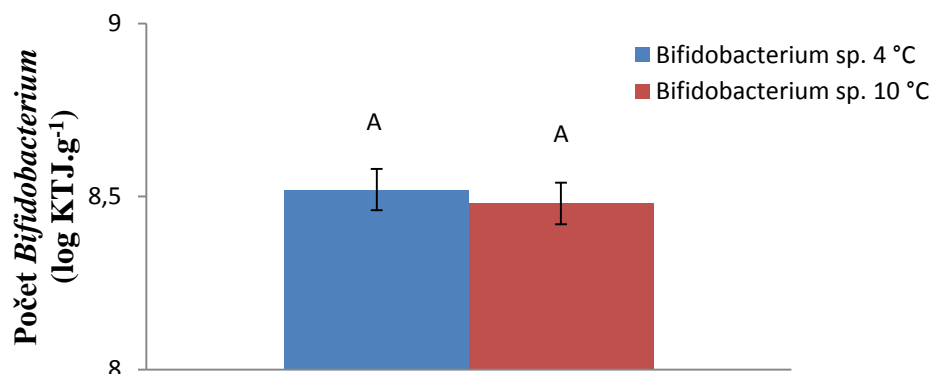
Na počet *Bifidobacterium* sp. v jogurtech, nemělo skladování při dvou různých teplotách průkazný vliv ($p > 0,05$), a to ani na konci doby trvanlivosti jogurtu (obrázek č. 12). Vliv dvou různých skladovacích teplot na počet *Bifidobacterium* sp. v jogurtu bez ohledu na dobu skladování byl také statisticky neprůkazný ($p > 0,05$), což je vidět na obrázku č. 13.

Počet *Bifidobacterium* sp. ve vzorku jogurtu v daných intervalech skladování



Obr. 12: Počet *Bifidobacterium* sp. (log KTJ.g⁻¹) ve vzorku jogurtu skladovaného při teplotě 4 °C a 10 °C v daných intervalech skladování

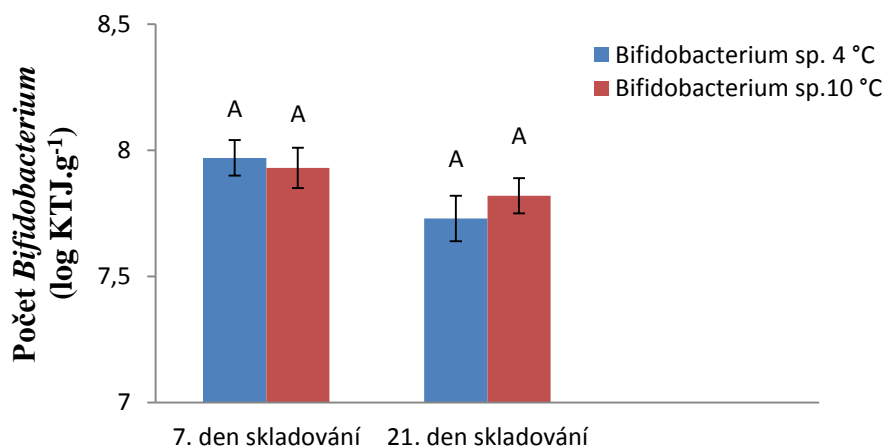
Počet *Bifidobacterium* sp. ve vzorku jogurtu bez ohledu na dobu skladování



Obr. 13: Počet *Bifidobacterium* sp. (log KTJ.g⁻¹) ve vzorku jogurtu skladovaného při teplotě 4 °C a 10 °C bez ohledu na dobu skladování

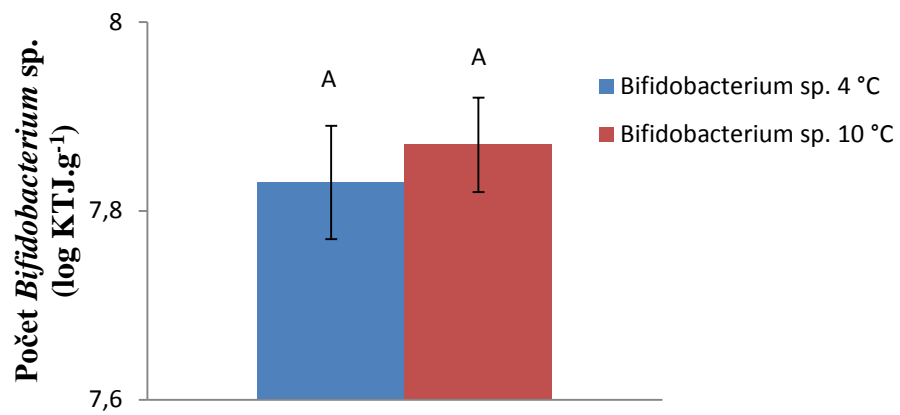
Obdobně jako v případě jogurtu, ani u kefirového mléka nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$) v počtech *Bifidobacterium* sp. mezi kefirovým mlékem skladovaným při 4 °C a kefirovým mlékem skladovaným při 10 °C (obrázek č. 14). Vliv dvou různých skladovacích teplot na počet *Bifidobacterium* sp. v kefirovém mléce bez ohledu na dobu skladování byl také statisticky neprůkazný ($p > 0,05$), což ukazuje obrázek č. 15.

Počet *Bifidobacterium* sp. ve vzorku kefirového mléka v daných intervalech skladování



Obr. 14: Počet *Bifidobacterium* sp. (log KTJ.g⁻¹) ve vzorku kefirového mléka skladovaného při teplotě 4 °C a 10 °C v daných intervalech skladování

Počet *Bifidobacterium* sp. ve vzorku kefirového mléka bez ohledu na dobu skladování



Obr. 15: Počet *Bifidobacterium* sp. (log KTJ.g⁻¹) ve vzorku kefirového mléka skladovaného při teplotě 4 °C a 10 °C bez ohledu na dobu skladování

6 DISKUSE

Životaschopnost probiotických mikroorganismů při skladování závisí zejména na druhu potraviny, tvorbě inhibičních látek, teplotě skladování, obsahu kyslíku (Horáčková, Šviráková, 2009), oxidačně-redukčním potenciálu, ostatních kulturních mikroorganismech, době skladování, vodní aktivitě a pH (Champagne, 2009).

V této diplomové práci byly prostřednictvím kultivačních metod kvantifikovány bakterie mléčného kvašení a zdraví prospěšné probiotické bakterie *Bifidobacterium* sp. ve vzorcích dětské výživy a ve fermentovaných mléčných výrobcích (jogurt a kefirové mléko). Jednalo se o běžně dostupné produkty v tržní síti, u nichž výrobce na etiketě deklaroval obsah probiotických bakterií.

U jogurtu a kefirového mléka byly sledovány počty bakterií mléčného kvašení a *Bifidobacterium* sp. v závislosti na době skladování a také rozdíly v počtech prospěšných bakterií mezi těmito výrobky skladovanými jednak při 4 °C a jednak při 10 °C, a to od okamžiku zakoupení, až do konce jejich trvanlivosti. U dětské výživy bylo provedeno stanovení počtu deklarovaných probiotických bakterií bez ohledu na dobu či teplotu skladování. Jogurt byl spolu s kefirovým mlékem analyzován v den zakoupení, po sedmi dnech skladování a na konci doby trvanlivosti.

V případě dětské výživy byl zjištěn výskyt bakterií mléčného kvašení i *Bifidobacterium* sp., přičemž počet *Bifidobacterium* sp. odpovídal údajům na etiketě o jejich minimálním počtu na konci trvanlivosti.

Počty bakterií mléčného kvašení u jogurtu i kefirového mléka v průběhu skladování průkazně poklesly, a to v případě produktů skladovaných jak při 10 °C, tak při 4 °C ($p < 0,05$). Obdobně tomu bylo u *Bifidobacterium* sp. Výjimkou byl počet *Bifidobacterium* sp. u kefirového mléka skladovaného při 10 °C, kdy nedošlo k průkaznému snížení počtu těchto bakterií ($p > 0,05$), i když mírná tendence k poklesu jejich počtu zde byla.

Výsledky experimentu u fermentovaných mléčných výrobků odpovídají předpokladu, že počet probiotických mikroorganismů se při skladování zpravidla snižuje. Závisí však také na kmenu a druhu mikroorganismu (Champagne, 2009). Ve studii Mani-Lopéz et al. (2014) počty *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* v jogurtech, skladovaných při 5 °C po dobu 35 dní, poklesly, podobně jako u jogurtů skladovaných při 4 °C, u kterých došlo k mírnému

snížení počtu bifidobakterií na konci doby jejich trvanlivosti (Raeisi et al. 2013). Uvádí se, že potravinová matrice má rozhodující vliv na životaschopnost a funkčnost probiotik (Souza et al., 2011). Jogurty mají kyselost 60 – 65 °SH, zatímco keřirové mléko 35 – 50 °SH (Görner, Valík, 2004). Na přežívání bifidobakterií během skladování negativně působí kromě nízké skladovací teploty také nízké pH (González-Sánchez et al., 2010).

Při sledování vlivu dvou různých skladovacích teplot (4 °C a 10 °C) na počet sledovaných bakterií, nebyl zaznamenán žádný statisticky významný rozdíl v jejich počtech ($p > 0,05$). Výjimkou byly bakterie mléčného kvašení v jogurtu na konci jeho doby trvanlivosti, kdy byl počet bakterií mléčného kvašení prokazatelně vyšší u jogurtu skladovaného při 4 °C ($p < 0,05$), než u jogurtu skladovaného při 10 °C. V literatuře je také doporučováno snížit skladovací teploty na 4 °C, aby se tak podpořilo přežívání kultur během skladování (Casarotti et al., 2014).

U jogurtu klesal počet bakterií mléčného kvašení a *Bifidobacterium* sp. rychleji při 10 °C, než při 4 °C. Mezofilní bakterie mají minimální teplotu vyšší než 5 °C, avšak většina bakterií přežívá poměrně dlouhou dobu i při teplotě nižší, než je jejich minimální teplota (Šilhánková, 2002). Přežívání bifidobakterií v jogurtu může zlepšit skladovací teplota, která je nižší než 4 °C, protože při této teplotě dochází k potlačení produkce kyselin u *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Kadlec et al., 2009), a i když *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* může za určitých podmínek stimulovat růst *Bifidobacterium* sp., svou nadprodukcí kyseliny mléčné a peroxidu vodíku bifidobakterie naopak inhibuje (Gueimonde et al., 2012).

U keřirového mléka se počet *Bifidobacterium* sp. a bakterií mléčného kvašení zase naopak snižoval mírně rychleji při 4 °C, než při 10 °C. Kvasinky v keřirovém mléce mohou zlepšovat stabilitu přítomných bakterií (Gueimonde et al., 2012). Mezi keřirovými kulturami totiž existuje symbiotický vztah. Bakterie mléčného kvašení okyselují prostředí, které je vhodné pro kvasinky, a ty zase dodávají do prostředí určité růstové látky (Šilhánková, 2002). Kvasinky rostou v širokém teplotním rozmezí (0 °C – 45 °C), ale jejich teplotní optimum je okolo 30 °C. V anaerobním prostředí mají kvasinky fermentační metabolismus, kdy tvoří omezené množství buněčné hmoty a produkují etanol spolu s CO₂. Bifidobakterie v přítomnosti CO₂ v mléce lépe tolerují přítomnost O₂, jestliže zároveň rostou s jejich přirozeným střevním partnerem, *Lactobacillus acidophilus*. Většina mezofilních bakterií má teplotní minimum

při 5 °C až 15 °C a při této teplotě se nerozmnožují. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, které jsou také součástí mlékárenských kultur pro výrobu kefírových mlék, rostou však již při teplotě 10 °C, stejně, jako některé další laktobacily. Kefírové laktobacily rostou v mléku samostatně špatně, ale v symbióze s kefírovými kvasinkami se jim daří lépe (Görner, Valík, 2004).

Pro podporu růstu a zlepšení přežívání probiotických mikroorganismů při skladování je doporučováno snížit inkubační teplotu na 37 °C, obohatovat mléko syrovátkovými bílkoviny, aplikovat prebiotické složky, používat techniky enkapsulace a snížit skladovací teploty na 4 °C (Casarotti et al., 2014). Enkapsulace může zlepšit stabilitu probiotických bakterií vůči podmínkám trávicího traktu. U enkapsulovaných bifidobakterií navíc dochází ke snížení produkce kyseliny octové, která negativně ovlivňuje chuť a vůni (Horáčková et al., 2014). Neenkapsulované bifidobakterie ztratily podle studie González-Sánchez et al. (2010) během skladování životnost 3x rychleji, než enkapsulované, které byly navíc odolnější vůči negativním podmínkám trávicího traktu.

V této diplomové práci splňovaly všechny výrobky na konci své trvanlivosti legislativní požadavky na minimální počet mléčné mikroflóry ve výrobku, které jsou dány vyhláškou č. 397/2016 Sb. V případě jogurtu a dětské výživy bylo naplněno také tvrzení výrobce o minimálním počtu probiotických bakterií. Podnětem pro další výzkum může být sledování počtu probiotik v dětských výživách v závislosti na době, popřípadě teplotě skladování, jelikož výrobce doporučuje skladování pouze při pokojové teplotě.

Probiotika jsou charakterizovány jako živé mikroorganismy s pozitivním účinkem na lidské zdraví, jsou-li konzumovány v adekvátním množství. Doposud však nebyla navržena optimální terapeutická dávka živých probiotických mikroorganismů ve výrobku v okamžiku spotřeby, i když v literatuře je často citována minimální terapeutická dávka $10^6 - 10^7$ KTJ.g⁻¹. Původ tohoto tvrzení není jasný, ale první zmínka o minimální terapeutické dávce 10^6 KTJ.g⁻¹ pochází z roku 1990 a vychází z předpokladu denní spotřeby 100 g probiotického produktu (Raeisi et al., 2013).

Na základě tohoto experimentu může být pro zvýšení účinnosti probiotik doporučeno skladovat fermentované mléčné výrobky, spíše při nižší skladovací teplotě, která je doporučena výrobcem a vzhledem ke snižování počtu prospěšných bakterií během skladování je také vhodné je konzumovat pokud možno co nejčerstvěji. S dobou skladování se navíc u probiotických produktů pravděpodobně snižuje odolnost

probiotik vůči stresovým podmínkám v trávicím traktu (Casarotti et al., 2014). Gueimonde et al. (2012) uvádí, že stejný probiotický kmen uchovávaný za různých skladovacích podmínek, může vykazovat různou citlivost k nepříznivým podmínkám trávicího traktu.

Kolonizace střeva probiotickými mikroorganismy je však dočasná a jejich počet ve střevě po příjmu probiotika časem klesá (Opletal, 2010). Množství probiotických mikroorganismů ve střevě klesá také s věkem (Nagpal et al., 2014). Z hlediska naplnění žádoucích účinků probiotik je proto obecně doporučováno jíst je dlouhodobě a pravidelně (Martinča, 2015). Je také vhodné konzumovat je ideálně spolu s potravinami, které obsahují zároveň prebiotika (Nagpal et al., 2014).

Kontrola životaschopnosti však vždy nestačí k tomu, aby bylo prokázáno zachování funkčnosti kmene, protože podstatné je zachovat nejen životaschopnost probiotik během výroby, skladování a v trávicím traktu, i když v některých případech mohou mít na konzumenta příznivý vliv také neživé probiotické mikroorganismy (Souza et al., 2011), ale také jejich vlastnosti, které dle definice dělají probiotika probiotiky (Vinderola et al., 2011).

7 ZÁVĚR

Probiotika jsou dle definice živé mikroorganismy, které při příjmu v adekvátním množství přinášejí konzumentovi zdravotní výhody. Jsou však značně nestabilní. Než se dostanou na místo působení ve střevech konzumenta, ztrácí svou životnost během výroby, skladování a při průchodu trávicím traktem.

Problém se značnou nestabilitou během skladování může řešit například výběr vhodného kmene, enkapsulace probiotik či působení subletálních stresových faktorů. Pro stabilitu probiotických bakterií je také důležitá potravinová matrice, přičemž mléčná potravina je vhodným vektorem. Mléko je kromě toho také přirozeným dobrým zdrojem bílkovin a vápníku. Přestože v současné době existuje na trhu celá řada potravin s probiotiky, fermentované mléčné výrobky mezi probiotickými potravinami stále dominují.

Zajištění stability probiotik ve výrobku je naléhavým tématem, a to i vzhledem ke zvyšujícímu se zájmu spotřebitelů o probiotické mléčné produkty. Mnoho spotřebitelů navíc nakupuje potraviny ve velkém množství do zásoby a často pak potraviny konzumuje těsně před koncem jejich doby údržnosti. Spotřebitel také vždy nedodrží doporučenou teplotu v chladničkách, která by měla být do 5 °C, protože šetří spotřebu energie. Teplota v chladničkách také kolísá v jejich jednotlivých částech a při zdlouhavém naskladňování a vyskladňování potravin. Může také nekontrolovatelně vzrůst v důsledku přeplnění chladničky či při chlazení teplých pokrmů. Často pak přesáhne hygienické teplotní maximum pro skladování mléčných výrobků, tedy 8 °C, a proto byla pro skladování vzorků kromě teploty 4 °C zvolena také teplota 10 °C.

Tato práce měla proto za cíl experimentálně zhodnotit vliv skladovacích faktorů, kterými v této práci byly doba a teplota skladování, na počet prospěšných mikroorganismů v probiotických produktech. Vzorky byly zakoupeny co nejčerstvější tak, aby mohl být sledován počet probiotik po většinu doby trvanlivosti těchto probiotických výrobků.

Počty bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií v jogurtu a keřirovém mléce splňovaly legislativní limity jak v den nákupu, tak na konci doby jejich trvanlivosti.

Počty bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií u jogurtu i keřirového mléka v průběhu skladování prokazatelně poklesly jak při 10 °C, tak při 4 °C ($p < 0,05$).

Výjimkou byl počet *Bifidobacterium* sp. u keřirového mléka skladovaného při 10 °C, kdy nedošlo k průkaznému snížení jeho počtu ($p > 0,05$).

U fermentovaných mléčných produktů nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v počtech bakterií mléčného kvašení a bifidobakterií mezi jogurtem a keřirovým mlékem skladovaným při 4 °C a jogurtem a keřirovým mlékem skladovaným při 10 °C ($p > 0,05$). Výjimkou byly bakterie mléčného kvašení v jogurtu na konci jeho doby trvanlivosti, kdy byl počet bakterií mléčného kvašení prokazatelně vyšší u jogurtu skladovaného při 4 °C ($p < 0,05$).

V případě dětské výživy zjištěný počet *Bifidobacterium* sp. odpovídal údajům na etiketě o jejich minimálním počtu na konci doby trvanlivosti.

Zkoušené vzorky probiotických produktů splňovaly legislativní limity a výrobcem deklarované počty prospěšných bakterií na konci doby jejich údržnosti a mohou být tedy považovány za možné funkční potraviny s preventivním účinkem, jestliže budeme brát v úvahu často zmiňovanou minimální terapeutickou dávku 10^6 KTJ.g⁻¹. Na základě této diplomové práce může být doporučeno skladování fermentovaných mléčných výrobků při teplotě dané výrobcem, u jogurtu však při nižší doporučené teplotě (okolo 4 °C). Je také žádoucí konzumovat probiotické produkty co nejčerstvější, a to kvůli jejich snižujícímu se počtu během skladování.

8 LITERATURA

ALLSOPP P., ROWLAND I., 2009: Potential Protective Effects of Probiotics and Prebiotics against Colorectal Cancer, s. 998 – 1048. In: CHARALAMPOPOULOS D., RASTALL R. A. (ed.): *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. Volume 2. New York: Springer, 1247 s.

BAKR A.S., 2015: The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4: 423–431. ISSN 1878-8181

BENEŠ J., 2009: *Infekční lékařství*. Praha: Galén. 651 s. ISBN 978-80-7262-644-1.

BURDYCHOVÁ R., 2007: Mikrobiologická detekce probiotických mikroorganismů ve fermentovaných mléčných výrobcích. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis.*, 2: 15 – 20. ISSN 1211-8516.

BURDYCHOVÁ R., SLÁDKOVÁ P., 2007: *Mikrobiologická analýza potravin*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 218 s. ISBN 978-80-7375-116-6.

CASAROTTI S. N., MONTEIRO D. A., MORETTI M. M. S., PENNA A., L. B., 2014: Influence of the combination of probiotic cultures during fermentation and storage of fermented milk. *Food Research International*, 59: 67–75. ISSN 0963-9969.

ČSN EN ISO 6887-1 (560102) A Mikrobiologie potravin a krmiv – Úprava analytických vzorků, příprava výchozí suspenze a desetinásobných ředění. Část 1, Všeobecné pokyny pro přípravu výchozí suspenze a desetinásobných ředění.

ČSN ISO 15214 (560117) A Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu mezofilních bakterií mléčného kvašení – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C.

ČSN EN ISO 7218 (560103) A Mikrobiologie potravin a krmiv – Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiologické zkoušení.

DONKOR O. N., HENRIKSSON A., VASILJEVIC T., SHAH N. P., 2005: Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, 16: 1181–1189. ISSN 0958-6946.

EBEL B., MARTIN F., LE L. D. T., GERVAIS P., CACHON R., 2011: Use of gases to improve survival of *Bifidobacterium bifidum* by modifying redox potential in fermented milk. *Journal of Dairy Science*, 94(5): 2185–2191. ISSN: 0022-0302.

FORSYTHE S. J., 2000: *The microbiology of safe food*. London: Blackwell Science. 412 s. ISBN 0-632-05487-5.

FORSYTHE S. J., HAYES P. R., 1998: *Food Hygiene, Microbiology and HACCP*. 3rd ed. Gaithersburg: An Aspen Publications, 499 s. ISBN 0-7514-04550-0.

FRIČ P., 2010: Střevní mikroflóra, probiotika, prebiotika a synbiotika, s. 86 – 96. In KOHOUT P. (ed.): *Potraviny – součást zdravého životního stylu*. Olomouc: Solen, 106 s. ISBN 978-80-87327-39-5.

GILL H. S., GROVER S., BATISH V. K., GILL P., 2009: Immunological Effects of probiotics and their Significance to Human Health, s. 902 – 948. In: CHARALAMPOPOULOS D., RASTALL R. A. (eds): *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. Volume 2. New York: Springer, 1247 s.

GOERING R. V., DOCKRELL H. M., ZUCKERMAN M., ROITT I. M., CHIODINI P. L., 2016: *Mimsova lékařská mikrobiologie*. Praha: TRITON, 568 s. ISBN 978-80-7387-928-0.

GONZÁLEZ-SÁNCHEZ F., AZAOLA A., GUTIÉRREZ-LÓPEZ G., HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ H., 2010: Viability of microencapsulated *Bifidobacterium*

animalis ssp. *lactis* BB12 in kefir during refrigerated storage. International Journal of Dairy Technology, 63(3): 431 – 436. ISSN: 1471-0307.

GÖRNER F., VALÍK L., 2004: *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. Bratislava: Malé Centrum, 527 s. ISBN 80-967064-9-7.

CHAMPAGNE C. P., 2009: Some Technological Challenges in the Addition of Probiotic Bacteria to Food, s. 762 – 804. In: CHARALAMPOPOULOS D., RASTALL R. A. (eds): *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. Volume 2. New York: Springer, 1247 s.

JULÁK J., 2015: *Úvod do lékařské bakteriologie*, 2. vydání. Praha: Karolinum, 404 s. ISBN 978-80-246-3210-0.

KADLEC P., MELZUCH K., VOLDŘICH M. (eds), 2009: *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 536 s. ISBN 978-80-7418-051-4.

KALACĚ P., 2003: *Funkční potraviny – kroky ke zdraví*. České Budějovice, DONA s.r.o., 130 s. ISBN 80-7322-029-6.

KASTNEROVÁ M., 2011: *Poradce pro výživu*. České Budějovice: Nová Forma, 377 s. ISBN 978-80-7453-177-4.

MARTINČA J., 2015: *Výživa*, 2. vydání. Praha: PALESTRA spol. s.r.o., 211 s. ISBN 978-80-87723-20-3.

MANI-LÓPEZ E., PALOU E., LÓPEZ-MALO A., 2014: Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. Journal of Dairy Science, 97(5): 2578–2590. ISSN: 0022-0302.

MULLER J. A., ROSS R. P., FITZGERALD G. F., STANTON C., 2009: Manufacture of Probiotic Bacteria, s. 726 – 759. In: CHARALAMPOPOULOS D.,

RASTALL R. A. (eds): *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. Volume 2. New York: Springer, 1247 s.

NEVORAL J., 2013: *Praktická pediatrická gastroenterologie, hepatologie a výživa*. Praha: Mladá Fronta a. s., 677 s., ISBN 978-80-204-2863-9.

OPLETAL L., 2010: *Přírodní látky a jejich biologická aktivita*. Praha: Karolinum, 378 s. ISBN 978-80-246-1884-5.

RAEISI S. N., OUOBA L. I. I., FARAHMMAND N., SUTHERLAND J., GHODUSSI H. B., 2013: Variation, viability and validity of bifidobacteria in fermented milk products. *Food Control*, 34: 691 – 697. ISSN 0956-7135.

REID G., 2009: Urogenital Applications of Probiotic Bacteria, s. 1050 – 1065. In: CHARALAMPOPOULOS D., RASTALL R. A. (eds): *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. Volume 2. New York: Springer, 1247 s.

SALMINEN S., ISOLAURI E., 2009: Probiotics and Allergy, s. 978 – 995. In: CHARALAMPOPOULOS D., RASTALL R. A. (eds): *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. Volume 2. New York: Springer, 1247 s.

SOUZA T. C., ZACARIÁS M. F., SILVA A. M., BINETTI A., REINHEIMER J., NICOLI J. R., VINDEROLA G., 2011: Cell viability and immunostimulating and protective capacities of *Bifidobacterium longum* 51A are differentially affected by technological variables in fermented milks. *Journal of Applied Microbiology*, 112: 1184–1192. ISSN 1364-5072.

SVAČINA Š., MÜLLEROVÁ D., BRETŠNAJDROVÁ A., 2013: *Dietologie pro lékaře, farmaceuty, zdravotní sestry a nutriční terapeuty*. Praha: TRITON, 341 s. ISBN 978-80-7387-699-9.

TOMÁNKOVÁ E., RADA V., KILLER J., 2006: *Potravinářská mikrobiologie*. Praha: ČZU v Praze, 168 s. ISBN 80-213-1583-0.

VIBHA D. T., VIMAL M. R., 2016: Recent application of lactic acid bacteria as source of industrially important compounds. *Journal of pure and applied microbiology*, 10 (1): 497-506. ISSN 0973-7510.

VINDEROLA G., BINETTI A., BURNS P., REINHAIMER J., 2011: Cell viability and functionality of probiotic bacteria in dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 2 (70): 1-6. ISSN 1664-302X.

VLČEK J., VYTRŽSKALOVÁ M., 2014: *Klinická farmacie*. Praha: Grada Publishing, a.s., 256 s. ISBN 978-80-247-4532-9.

ZBOŘIL V., 2005: *Mikroflóra trávicího traktu*. Praha: Grada Publishing a.s., 153 s. ISBN 80-247-0584-2.

Online zdroje

ANTOINE J., 2012. Current challenges for probiotics in food. In: SALMINEN S., WRIGHT A., OUWEHAND A., eds. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspect* [online]. 3rd ed. Marcel Dekker, s. 2 – 14. ISBN: 978-0-8247-5203-3. [vid. 19. 1. 2017]. Dostupné z:
<http://www.crcnetbase.com/doi/book/10.1201/9780824752033>

DIMA S., BAHRIM G.E., IORDACHESCU G., 2014. Sources, production and microencapsulation of probiotics. In: ÖTLES S., ed. *Probiotics and prebiotics in food, nutrition and health* [online]. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis, s. 25 – 49. ISBN: 978-1-4665-8624-6. [vid. 1. 2. 2017]. Dostupné z:
<http://www.crcnetbase.com/doi/book/10.1201/b15561>

FU L., WANG Y., 2014. Sources and production of prebiotics. In: ÖTLES S., ed. *Probiotics and prebiotics in food, nutrition and health* [online]. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis, s. 25 – 49. ISBN: 978-1-4665-8624-6. [vid. 1. 2. 2017]. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/book/10.1201/b15561>

GUEIMONDE M., LOS REYES- GAVILÁN C. G., SÁNCHEZ B., 2012. Stability of lactic acid bacteria in food and supplements. In: SALMINEN S., WRIGHT A., OUWEHAND A., eds. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspect* [online]. 3rd ed. Marcel Dekker, s. 2 – 14. ISBN: 978-0-8247-5203-3. [vid. 19. 1. 2017]. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/book/10.1201/9780824752033>

HORÁČKOVÁ Š., ŠVIRÁKOVÁ E., 2009: Probiotické mikroorganismy v mlékařenském průmyslu. In: Mlékařské listy [online]. MILCOM a.s. – Výzkumný ústav mlékařenský v Praze ve spolupráci s Českomoravským svazem mlékařenským a s Českým národním komitétém IDF [vid. 2017_3_19]. Dostupné z: <http://www.mlekarskelisty.cz/archiv/rok-2009.html>

HORÁČKOVÁ Š., 2010: Nové trendy v probiotikách. In: Mlékařské listy [online]. MILCOM a.s. – Výzkumný ústav mlékařenský v Praze ve spolupráci s Českomoravským svazem mlékařenským a s Českým národním komitétém IDF [vid. 2017_3_19]. Dostupné z: <http://www.mlekarskelisty.cz/archiv/rok-2010.html>

HORÁČKOVÁ Š., MARTÍNKOVÁ K., SLUKOVÁ M., PLOCKOVÁ M., 2014: Životaschopnost a metabolická aktivita volných a enkapsulovaných bifidobakterií. In: Mlékařské listy [online]. MILCOM a. s. – Výzkumný ústav mlékařenský v Praze ve spolupráci s Českomoravským svazem mlékařenským a s Českým národním komitétém IDF [vid. 2017_3_19]. Dostupné z: <http://www.mlekarskelisty.cz/archiv/rok-2014.html>

KOLÁŘOVÁ M., SLÁDKOVÁ P., SLÁDEK Z., ROŽNOVSKÁ D., KOMPRDA T., 2012: The effects of prebiotics and synbiotics on Clostridium and Escherichia coli counts in human intestinal tract. In: Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendeliana Brunensis [online]. Mendel University Press [vid. 2017_2_23]. Dostupné z: <https://acta.mendelu.cz/60/3/>

NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 432/2012 ze dne 16. Května 2012, kterým se zřizuje seznam schválených zdravotních tvrzení při označování potravin jiných než tvrzení

o snížení rizika onemocnění a o vývoji a zdraví dětí. In: EUR-Lex [online]. European Union [vid. 2017_3_5]. Dostupné z: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:136:0001:0040:CS:PDF>

NAGPAL R., YADAV H., KUMAR M., JAIN S., YAMASHIRO Y., MAROTTA F., 2014. Probiotics, prebiotics and synbiotics: An introduction. In: ÖTLES S., ed. *Probiotics and prebiotics in food, nutrition and health* [online]. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis, s. 25 – 49. ISBN: 978-1-4665-8624-6. [vid. 1. 2. 2017]. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/book/10.1201/b15561>

ÖTLES S., OZYURT V. H., 2014. Analysis of probiotics and prebiotics. In: ÖTLES S., ed. *Probiotics and prebiotics in food, nutrition and health* [online]. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis, s. 25 – 49. ISBN: 978-1-4665-8624-6. [vid. 1. 2. 2017]. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/book/10.1201/b15561>

PECHAR R., RADA V., MUSILOVÁ Š., BUNEŠOVÁ V., VLKOVÁ E., KMET V., KILLER J., 2013: Hodnocení probiotických výrobků společností pro probiotika a prebiotika. In: *Mlékařské listy* [online]. MILCOM a.s. – Výzkumný ústav mlékárenský v Praze ve spolupráci s Českomoravským svazem mlékárenským a s Českým národním komitétem IDF [vid. 2017_3_19]. Dostupné z: <http://www.mlekarskelisty.cz/archiv/rok-2013.html>

ŠALAKOVÁ A., BÁRTOVÁ J., DRBOHLAV J., ROUBAL P., 2012. Imunomodulační charakteristiky vybraných kmenů bifidobakterií. In: *Mlékařské listy* [online]. MILCOM a. s. – Výzkumný ústav mlékárenský v Praze ve spolupráci s Českomoravským svazem mlékárenským a s Českým národním komitétem IDF [vid. 2017_3_19]. Dostupné z: <http://www.mlekarskelisty.cz/archiv/rok-2012.html>

Vyhláška č. 397/2016 Sb. o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. In: *Zákony pro lidi* [online]. AION CS, s.r.o. [vid. 2017_3_15]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2016-397/zneni-20170101>

Vyhláška č. 54/2004 Sb., o potravinách určených pro zvláštní výživu a o způsobu jejich použití. In: *Zákony pro lidi* [online]. AION CS, s.r.o. [vid. 2017_20_3]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2004-54>

WRIGHT A., AXELSSONL, 2012. Lactic acid bacteria. In: SALMINEN S., WRIGHT A., OUWEHAND A., eds. *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspect* [online]. 3rd ed. Marcel Dekker, s. 2 – 14. ISBN: 978-0-8247-5203-3. [vid. 19. 1. 2017]. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/doi/book/10.1201/9780824752033>

Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. In: *Zákony pro lidi* [online]. AION CS, s.r.o. [vid. 2017_15_3]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1997-110>

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: *Bifidobacterium* sp. na půdě BSM

Obr. 2: Bakterie mléčného kvašení na půdě MRS

Obr. 3: Počet bakterií mléčného kvašení ($\log \text{KTJ.g}^{-1}$) ve vzorku jogurtu skladovaného při 4 °C a 10 °C v závislosti na době skladování

Obr. 4: Počet bakterií mléčného kvašení ($\log \text{KTJ.g}^{-1}$) ve vzorku keřirového mléka skladovaného při 4 °C a 10 °C v závislosti na době skladování

Obr. 5: Počet *Bifidobacterium* sp. ($\log \text{KTJ.g}^{-1}$) ve vzorku jogurtu skladovaného při 4 °C a 10 °C v závislosti na době skladování

Obr. 6: Počet *Bifidobacterium* sp. ($\log \text{KTJ.g}^{-1}$) ve vzorku keřirového mléka skladovaného při 4 °C a 10 °C v závislosti na době skladování

Obr. 7: Počet bakterií mléčného kvašení a *Bifidobacterium* sp. ($\log \text{KTJ.g}^{-1}$) ve vzorku dětské výživy

Obr. 8: Počet bakterií mléčného kvašení ($\log \text{KTJ.g}^{-1}$) ve vzorku jogurtu skladovaného při teplotě 4 °C a 10 °C v daných intervalech skladování. Průměry označené různými písmeny se v rámci sledovaného faktoru, kterým byla teplota skladování, statisticky liší ($p < 0,05$).

Obr. 9: Počet bakterií mléčného kvašení ($\log \text{KTJ.g}^{-1}$) ve vzorku jogurtu, skladovaného při teplotě 4 °C a 10 °C, bez ohledu na dobu skladování

Obr. 10: Počet bakterií mléčného kvašení ($\log \text{KTJ.g}^{-1}$) ve vzorku keřirového mléka skladovaného při teplotě 4 °C a 10 °C v daných intervalech skladování

Obr. 11: Počet bakterií mléčného kvašení ($\log \text{KTJ.g}^{-1}$) ve vzorku keřirového mléka, skladovaného při teplotě 4 °C a 10 °C, bez ohledu na dobu skladování

Obr. 12: Počet *Bifidobacterium* sp. ($\log \text{KTJ.g}^{-1}$) ve vzorku jogurtu skladovaného při teplotě 4 °C a 10 °C v daných intervalech skladování

Obr. 13: Počet *Bifidobacterium* sp. ($\log \text{KTJ.g}^{-1}$) ve vzorku jogurtu skladovaného při teplotě 4 °C a 10 °C bez ohledu na dobu skladování

Obr. 14: Počet *Bifidobacterium* sp. ($\log \text{KTJ.g}^{-1}$) ve vzorku keřirového mléka skladovaného při teplotě 4 °C a 10 °C v daných intervalech skladování

Obr. 15: Počet *Bifidobacterium* sp. ($\log \text{KTJ.g}^{-1}$) ve vzorku keřirového mléka skladovaného při teplotě 4 °C a 10 °C bez ohledu na dobu skladování

10 SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1: Mikroorganismy využívané jako probiotika

Tabulka č. 2: Mikrobiologické požadavky na jednotlivé kysané mléčné výrobky a na druhy živých mikroorganismů mléčného kysání v těchto výrobcích obsažených dle vyhlášky č. 397/2016 Sb.

Tabulka č. 3: Složení MRS média

Tabulka č. 4: Výživové údaje u keřirového mléka

Tabulka č. 5: Výživové údaje u jogurtu

Tabulka č. 6: Podmínky kultivace a morfologie kolonií zkoumaných bakterií