

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Růst bifidobakterií v mléce přežvýkavců

Bakalářská práce

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

Konzultant práce: Ing. Martina Geigerová

Autor práce: Ondřejka Vološčuková

2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: *Růst bifidobakterií v mléce přežvýkavců*, vypracovala samostatně a použila jsem jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne:

Podpis autora práce:

Poděkování

Za pomoc, užitečné rady a trpělivost při zpracování bakalářské práce a za odborné vedení při plnění praktické části této práce bych ráda poděkovala prof. Ing. Evě Vlkové, Ph.D. a Ing. Martině Geigrové.

Souhrn

Probiotické bakterie se často konzumují v podobě fermentovaných mléčných výrobků. Mezi probiotické rody se řadí i bifidobakterie, které jsou spojovány se zdravou střevní mikrobiotou. V současnosti je tento rod často používán jako probiotikum právě v mléčných výrobcích. Mléko a mléčné výrobky jsou velmi důležité složky výživy. Mléko obsahuje důležité vitamíny a minerály pro správný růst a vývoj savců. Schopnost přežití bifidobakterií v mléce je jednou z nejdůležitějších technologických kritérií, které musí probiotika splňovat. Z hlediska technologie výroby a distribuce mléka a mléčných výrobků s obsahem probiotik by měly bifidobakterie přežívat po celou dobu expirace v zákonem daném počtu 10^6 KTJ/ml.

Proto bylo cílem této bakalářské práce zjistit míru schopnosti růstu bifidobakterií po 24 hodinové kultivaci v různých druzích mlék (kravské, ovčí, kozí) a dlouhodobě v tomto prostředí přežívat. Kmeny bifidobakterií použitých při zaočkování mlék byly izolovány z jehněčích výkalů, telecích výkalů, lidské stolice a z probiotického preparátu. Testování bifidobakterií probíhalo za anaerobních podmínek.

Většina testovaných kmenů bifidobakterií byla schopná dobře prokysat všechna mléka v počtech vyšších než 10^7 KTJ/ml. Schopnost dlouhodobě přežívat v prostředí mléka byla u bifidobakterií kmenově specifická. Po kultivaci byly zaznamenány nejvyšší počty bifidobakterií v prostředí kozího mléka. Většina testovaných kmenů je schopna přežívat v mléce v minimálním požadovaném množství po obvyklou dobu trvanlivosti mléčných fermentovaných výrobků. Z výsledků také jasně vyplývá, že kmeny lidského původu přežívají v mléce kratší dobu než kmeny původu animálního. Kmeny druhu *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis*, prokázaly nejlepší schopnost dlouhodobého přežívání v mléce.

Klíčová slova: mléko, přežvýkavci, bifidobakterie, technologické vlastnosti, probiotika

Summary

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

Therefore the aim of the study was to test growth and survival ability of bifidobacteria from different sources in milks of ruminants (cow, sheep, goat). Bifidobacteria obtained from collections were used for the test. In total 18 bifidobacteria were tested, 3 of human origin, 6 isolated from lambs, 6 from calves, 2 probiotics strains and 1 strain from fermented milk product. Survival ability of bifidobacteria in fermented milks during storage in anaerobic condition was observed.

The most of tested strains were able to ferment all milks and were found in counts higher than 10^7 CFU/ml. According to our results, the survival ability of bifidobacteria in milk is strain specific property. The highest bifidobacterial numbers were founded in goat milk after the fermentation. Majority of tested bifidobacteria survived in all kind of milks for few weeks or even months. The results showed that bifidobacteria of human origin survived shorter than bifidobacteria of animal origin. *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* survived the best.

Key words: milk, ruminants, bifidobacteria, technological qualities, probiotics

Obsah

1.	Úvod.....	8
2.	Literární rešerše	9
2.1.	Mléko	9
2.1.1	Složení mléka	10
2.1.1.1	Voda	10
2.1.1.2	Lipidy	10
2.1.1.3	Sacharidy	10
2.1.1.4	Bílkoviny	11
2.1.1.5	Minerální látky	11
2.1.1.6	Vitamíny	12
2.1.2	Charakteristika mlék vybraných přežvýkavců	13
2.1.2.1.	Mléko kravské	13
2.1.2.2.	Mléko ovčí.....	13
2.1.2.3.	Mléko kozí.....	14
2.2.	Mikrobiota trávicího traktu.....	15
2.3.	Probiotika.....	16
2.3.1.	Probiotika a jejich pozitivní působení	16
2.3.2.	Probiotické mikroorganismy	17
2.3.2.1.	Rod Bifidobacterium	18
2.3.2.2.	Rod Lactobacillus.....	19
2.3.3.	Vlastnosti probiotických mikroorganismů	20
2.4.	Výrobky s obsahem probiotik.....	20
3.	Hypotéza	26
4.	Cíl práce	26
5.	Materiál a metody	27

5.1	Testované kmeny bifidobakterií	27
5.2	Testování růstu a přežívání bifidobakterií v mléce přežvýkavců	28
6.	Výsledky	29
6.1.	Růst a přežívání kmenů druhu <i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>longum</i>	30
6.2.	Růst a přežívání kmenů druhu <i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>animalis a lactis</i>	32
6.3.	Růst a přežívání bifidobakterií izolovaných z lidské stolice a probiotik	35
6.4.	Růst a přežívání bifidobakterií izolovaných z telecích výkalů	38
6.5.	Růst a přežívání bifidobakterií izolovaných z jehněčích výkalů	41
7.	Diskuse.....	44
8.	Závěr	47
9.	Seznam literatury	48
10.	Přílohy.....	1

1. Úvod

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

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

2. Literární rešerše

2.1. Mléko

Mléko je biologicky významná tekutina. V dnešní době je nejčastěji konzumováno kravské mléko, nicméně v některých částech světa má významný podíl i mléko od jiných druhů zvířat. Kravské mléko představuje 85 % z celkové produkce mléka. Významným zdrojem mléka je také mléko bůvolí, které tvoří 11 % ze světové produkce, dále mléko kozí (2,3 %) a ovčí (1,4%). V pouštních oblastech se nejvíce využívá mléko velbloudí, ale ze světové produkce tvoří pouze 0,2 % (Gerosa and Skoet, 2012). Je mnoho dalších druhů zvířat produkujících mléko, které je určeno ke spotřebě člověkem, například koně, jaci a osli, ale není dostupná žádná celosvětová statistika spotřeby mléka těchto druhů savců. Můžeme pouze usuzovat, že tvoří zbylých 0,1 % z globální produkce mléka (Faye and Konuspayeva, 2012).

Mléko je složeno z vody, bílkovin, tuků, sacharidů, vitamínů a minerálních látek. Složení jednotlivých druhů mlék se liší podle toho, jestli jedinec spadá do podřádu přežvýkavců či nepřežvýkavých, avšak množství jednotlivých složek mléka se může lišit v rámci stejného podřádu dokonce i mezi stejnými druhy zvířat. Produkce a složení mléka je ovlivněna nejen druhem zvířete, ale i jeho genetickou výbavou a úrovní šlechtění. Mezi další vlivy, které mohou ovlivnit složení mléka, patří fyziologické faktory daného jedince (věk, interval dojení, etapa kojení), environmentální podmínky (umístění, sezona) a nutriční faktory (množství vitamínů a minerálů, výživová a energetická hodnota krmiva, složení krmiva). Všeobecně jsou rozlišovány dva typy mléka dle bílkovinného složení. Prvním druhem je mléko albuminové, které obsahuje především bílkovinu albumin. Toto mléko je produkováno masožravci, všežravci a nepřežvýkavými býložravci. Druhým typem je mléko kaseinové, které obsahuje minimálně 75 % kaseinu z celkového množství mléčné bílkoviny. Tento druh mléka je produkován především přežvýkavci (Park et al., 2007).

2.1.1 Složení mléka

2.1.1.1 Voda

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

2.1.1.2 Lipidy

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

2.1.1.3 Sacharidy

Hlavním mléčným sacharidem je laktóza. Jedná se o mléčný cukr, který doposud nebyl nalezen v jiných tělních tekutinách. Laktóza patří do skupiny disacharidů, skládá se ze dvou monosacharidů D-galaktózy a D-glukózy, které jsou spojené β-glykosidickou vazbou. Laktóza je triviální název pro 4-0-β-D-galaktopyranosyl-D-glukopyranosu. Kromě laktózy

jsou v mléce obsaženy v nižších koncentracích i jiné sacharidy, jako jsou například glukóza a některé oligosacharidy. Oligosacharidy tvořené 3 – 10 jednotkami monosacharidů se nacházejí ve většině mlék savců a mohou být větvené nebo lineární. Mateřské mléko obsahuje více než 130 různých druhů oligosacharidů při jejich celkové koncentraci 15 g/l. Pro člověka jsou nestravitelné a mají pozitivní vliv na střevní mikrobiotu (Fox and McSweeney, 2006).

2.1.1.4 Bílkoviny

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

2.1.1.5 Minerální látky

Minerální látky jsou významnými prvky pro vývoj a růst kostí, regulaci osmolality a mnohé funkce buněk. Minerální látky obsažené v mléce zahrnují zejména soli, jako jsou chloridy sodné, draselné, vápenaté a hořečnaté dále citráty a fosfáty, které se vyskytují v mléce ve formě koloidních látek v komplexu s kaseiny nebo ve formě iontu v roztoku. Minerální látky jsou esenciální látky a v mléce jsou zastoupeny v nízké avšak důležité koncentraci. Vlastnosti mléka jsou markantně ovlivněny přítomností solí, protože jejich výskyt má vliv na různé koligativní a pufrční vlastnosti, formování a stabilitu kaseinových micel a v neposlední řadě vykonávají klíčové biologické role. Pro udržení osmolarity a extracelulárního objemu plazmy je nezbytná přítomnost chloridového aniontu a sodíkového kationtu. Významným prvkem je také draslík, který je důležitý pro buněčný příjem aminokyselin, udržení krevního a osmotického tlaku. Další nezbytná minerální látka obsažená v mléce je vápník, který je u obratlovců základní součástí kostí a zubů. Zhruba 99 % z

celkového množství v těle obratlovců se nachází právě v kostech a zubech. Zbývající 1 % vápníku je významným poslem mezi extracelulárními signály a intracelulárními odpověďmi buňky, jelikož zprostředkovává přenos nervového signálu, sekreci žláz a svalové kontrakce (Fox and McSweeney, 2009).

2.1.1.6 Vitamíny

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

2.1.2 Charakteristika mlék vybraných přežvýkavců

2.1.2.1 Mléko kravské

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

2.1.2.2 Mléko ovčí

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

2.1.2.3. Mléko kozí

Kozí mléko má svou specifickou vůni a chuť tzv. „kozínu“, což může být nežádoucí při přímé konzumaci mléka, avšak tato specifická chuť kozího mléka dodává kozím sýrům typické aroma. Zvláštní chuť mléka je způsobena vyšším obsahem mastných kyselin s krátkým řetězcem, zejména kyselinou kaprinovou. Tato chuť se mění během laktace (Fantová et al., 2010). Mléko koz má křídově bílou barvu, což je způsobeno absencí β -karotenu. Kozy mění veškerý β -karoten na vitamín A proto je kozí mléko bělejší než mléko kravské (Park et al., 2007). Kozí mléko má sušinu kolem 13 %, z toho je 4,1 % tuku, 3,3 % bílkovin a 4,7 % laktózy (Fantová a kol., 2010). Kozí mléko má vyšší podíl nenasycených mastných kyselin linolenové a linolové oproti kravskému mléku. Tyto nenasycené mastné kyseliny pozitivně působí na navýšení obranyschopnosti organismu proti infekčním chorobám a přirozeně bojují proti ateroskleróze. Kozí mléko je lépe stravitelné než mléko kravské tedy nezatěžuje tolik lidský organismus díky menším kapénkám tuku (Smetana et al., 2009).

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

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

N – nedetekováno

2.2. Mikrobiota trávicího traktu

Gastrointestinální trakt zvířat je osídlen různými mikroorganismy. Mikrobiální komunita je označována jako střevní mikrobiota. Jedná se o symbiotické soužití, kdy hostitel poskytuje své mikrobiotě živiny a stabilní prostředí. Naopak vyvážená mikrobiota pozitivně působí na hostitele nejen tím, že napomáhá trávení a vstřebávání potravy, ale například také podporou imunitního systému (Leser and Molbak, 2009). Součástí střevní mikrobioty jsou bakterie, které jsou nejpočetnější skupinou mikroorganismů, dále jsou zde zastoupeny plísně a kvasinky. Odhaduje se, že mikrobiota trávicího traktu savců je složená z 500 až 1000 druhů bakterií (Kim et al., 2011). Druhové zastoupení bakterií se mění v jednotlivých částech gastrointestinálního traktu, stejně jako jejich celkový počet. Avila a kolektiv (2009) uvádí, že v ústní dutině se nachází přibližně 10^7 KTJ/g bakterií, jedná se zejména o bakterie zubního plaku. Naproti tomu v žaludku se díky nízkému pH nachází méně bakterií a to množství 10^2 - 10^4 KTJ/g (Yuki et al., 2000). Kaudálním směrem se poté počet bakterií zvyšuje. Nejvíce bakterií je přítomno v tlustém střevě, kde se jich nachází až 10^{12} KTJ/g (Leser and Molbak, 2009). U mláďat přežvýkavců včetně telat jsou bakteriální počty v jednotlivých částech trávicího traktu podobné. Mikrobiota trávicího traktu se začíná utvářet během porodu, kdy je aseptické prostředí trávicího traktu mláďate kolonizováno mikroorganismy z prostředí i přirozenou mikrobiotou trávicího traktu matky. Vzhledem k tomu, že bezprostředně po porodu se nachází v trávicím traktu kyslík, jsou první mikroorganismy, které ho osídlí, fakultativně anaerobní bakterie (Conway, 1995). Například u přežvýkavců dominují 8 hodin po porodu bakterie *E. coli*, které jsou však při obvyklém průběhu vývoje mikrobioty do jednoho týdne substituovány bakteriemi mléčného kvašení a bifidobakteriemi (Vlková et al., 2009). Laktobacily, které patří mezi bakterie mléčného kvašení, jsou dominantní skupinou bakterií v trávicím traktu mláďat například u myši, prasat a kuřat. U kojených dětí a telat bylo zjištěno, že dominují bifidobakterie (Rada et al., 2006). Jak rod *Lactobacillus* tak i rod *Bifidobacterium* patří mezi pozitivně působící bakterie a některé kmeny jsou používány jako probiotika.

2.3. Probiotika

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

2.3.1. Probiotika a jejich pozitivní působení

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

osteoporóze, atopického onemocnění, urogenitálních onemocnění, zmírnění zácpy. Mezi další účinky patří, ochrana proti rakovině močového měchýře a tlustého střeva a probiotika se ukázala jako efektivnější při regulaci zánětlivých onemocnění střev (Lourens-Hattingh and Viljoen, 2001). Probiotika se také používají v průběhu nebo po antibiotické léčbě. Antibiotika inhibují bakterie bez ohledu na to, jestli mají negativní účinek nebo prospívají a tím narušují správné složení střevní mikrobioty. Probiotika tak napomáhají obnovit narušenou rovnováhu střevní mikrobioty po probiotické terapii. Doporučuje se pravidelná konzumace výrobků s obsahem probiotik, pro zvýšení obranyschopnosti organismu (Soccol et al., 2010).

2.3.2. Probiotické mikroorganismy

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

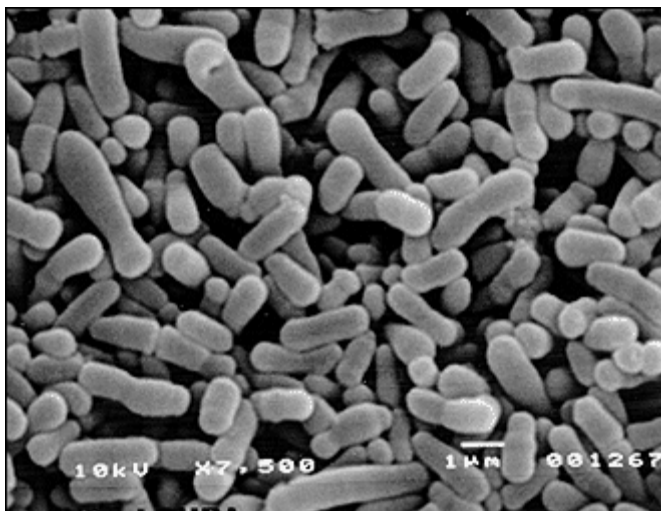
2.3.2.1. Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterie byly poprvé popsány a izolovány v trávicím traktu kojenců v letech 1899-1900 vědcem Tissierem, který je pojmenoval *Bacillus bifidus*. Tento rod bakterií je obecně charakterizován jako nesporulující, nepohyblivé, anaerobní, gram-pozitivní, kataláza negativní tyčinky (Sgorbati a kol.,1995). Bifidobakterie mají nepravidelný tvar, který připomíná písmeno Y nebo V, některé druhy se mohou shlukovat.

Nejvhodnější, pro růst bifidobakterií izolovaných z lidského těla je uváděna teplota mezi 36 – 38°C , u druhů živočišného původu se optimální teplota pohybuje mezi 41°C až 43°C (Dong et al., 2000). I přes to, že jsou bifidobakterie anaerobní, existují druhy, které jsou ke kyslíku tolerantnější. U dvou zvířecích druhů *B. thermophilus* a *B. boum* bylo zjištěno, že jsou schopné růst při 20% koncentraci kyslíku (Kawasaki et al., 2006). U druhu *B. psychroaerophilum*, který byl izolován ze slepého střeva prasat, byl zaznamenán dokonce i jeho růst za přítomnosti kyslíku (Simpson et al., 2004). Druh *B. scardovi*, izolovaný z lidské krve, byl charakterizován jako fakultativně anaerobní druh bifidobakterie (Hoyles et al., 2002). Nejvhodnější pH pro růst a množení bifidobakterií je mezi hodnotou 6,5-7,0. Inhibice růstu nastává při hodnotě pH pod 4,5-5,0 a nad 8,0-8,5 (Biavati a Mattarelli, 2012). Některé druhy, jsou schopné přežít i při hodnotě pH 3,5, například druh používaný do kysaných probiotických výrobků *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb12 dobře přežívá v kyselém prostředí (Maus a Ingham, 2003). Tolerance k nízkému pH je velmi důležitá při výběru bifidobakterií pro probiotické účely.

Bifidobakterie jsou sacharolytické a pro štěpení monosacharidů využívají enzym fruktózo-6-fosfát fosfoketolázu (F6PPK). Jedná se o enzym specifický pro tento rod bakterií a stanovení jeho aktivity se používá pro rodovou identifikaci bifidobakterií. Enzym F6PPK štěpí fruktózo-fosfát na acetylfosfát a erytrózo-4-fosfát, které jsou dále metabolizovány až na kyselinu octvou a mléčnou, které vznikají v molárním poměru 3:2 (Doleyres and Lacroix, 2005). V dnešní době je popsáno 48 druhů a poddruhů bifidobakterií. Většina bifidobakterií byla původně izolována z trávicího traktu či trusu zvířat. Byly také izolovány z lidské krve, moči, střev, zubního plaku, zubního kazu. Dále byly tři druhy bifidobakterií nalezeny v mléčných výrobcích (Gomes and Malcata,1999). Bifidobakterie jsou významné mikroorganismy, které jsou součástí střevní mikrobioty teplokrevných živočichů a hmyzu se sociálním způsobem života. U kojenců na mléčné výživě je počet bifidobakterií nejvyšší ze všech bakterií nacházejících se ve střevním traktu, s věkem jejich počet klesá (Finegold a kol.1983).

Obrázek č. 1: *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (<http://probioticsdb.com/probiotic-strains/bifidobacterium-lactis/>)



2.3.2.2. Rod *Lactobacillus*

Jako první popsal tento rod v roce 1990, byl Moro. Laktobacily jsou nesporulující, nepochyblivé, pravidelné, fakultativně anaerobní, gram-pozitivní, tyčinky, které se řadí mezi bakterie mléčného kvašení (BMK). Tyto bakterie fermentují glukózu za vzniku kyseliny mléčné. Dle produktů fermentace jsou popsány dvě základní skupiny laktobacilů. První skupinou jsou laktobacily s homofermentativním metabolismem, kdy vzniká pouze kyselina mléčná. Druhá je skupina laktobacilů s heterofermentativním metabolismem, kde vznikají kromě kyseliny mléčné i jiné produkty například ethanol, oxid uhličitý a další. Dnes je uznáno 212 druhů a 29 poddruhů laktobacilů (Hammes and Hertel, 2009). Laktobacily jsou běžnou součástí mikrobioty člověka a vyšších živočichů. Běžně se vyskytují jako součást také mikroflóry vagíny. Některé druhy laktobacilů se používají na výrobu sýrů, jogurtů, vína, kyselého zelí a dalších fermentovaných produktů. Přítomnost laktobacilů v trávicím traktu ovlivňují různé faktory, jako jsou například pH, dostupnost kyslíku, míra specifických substrátů, přítomnost sekretů a možnost interakce s ostatními mikroorganismy. Rod *Lactobacillus* je vzácně spojován s onemocněním gastrointestinálního traktu. Laktobacily používané při výrobě probiotik jsou nepatogenní a bezpečné (Salminen a kol., 1997).

Obrázek č. 2: *Lactobacillus acidophilus* (<http://probioticsdb.com/probiotic-strains/lactobacillus-acidophilus/>)



2.3.3. Vlastnosti probiotických mikroorganismů

Vybrané probiotické mikroorganismy by měly splňovat tato kritéria: odolnost proti kyselosti žaludku a sekretům slinivky břišní, adheze na epitelové buňky, antimikrobiální aktivitu, omezovat adhezi nežádoucích bakterií, musí být rezistentní vůči antibiotikům. Dále by měly být absolutně bezpečné pro hostitele, tolerantní k přídatným potravinářským látkám a v neposlední řadě by měly být stabilní v potravinářských výrobcích (Ventura and Perozzi, 2011).

2.4. Výrobky s obsahem probiotik

V dnešní době mohou být probiotika pro komerční použití distribuována v různých formách, které zahrnují sprejové sušení, mraženou, tekutou nebo lyofilizovanou formou. Všechny tyto formy jsou vhodné jako inokulanty do fermentovaných mléčných výrobků. Kromě fermentovaných mléčných výrobků mohou být probiotika přijímána jako doplněk stravy ve formě prášku, tablet nebo kapslí, kde jsou mikroorganismy nejčastěji obsaženy v lyofilizované formě. Lyofilizace je vhodná metoda pro uchování mikroorganismů, protože umožňuje uchovávat bakterie až po dobu několika let (Sandine and Vedamthu, 1980). Před samotnou lyofilizací se probiotické bakterie kultivují v médiu s obsahem lyoprotektantu.

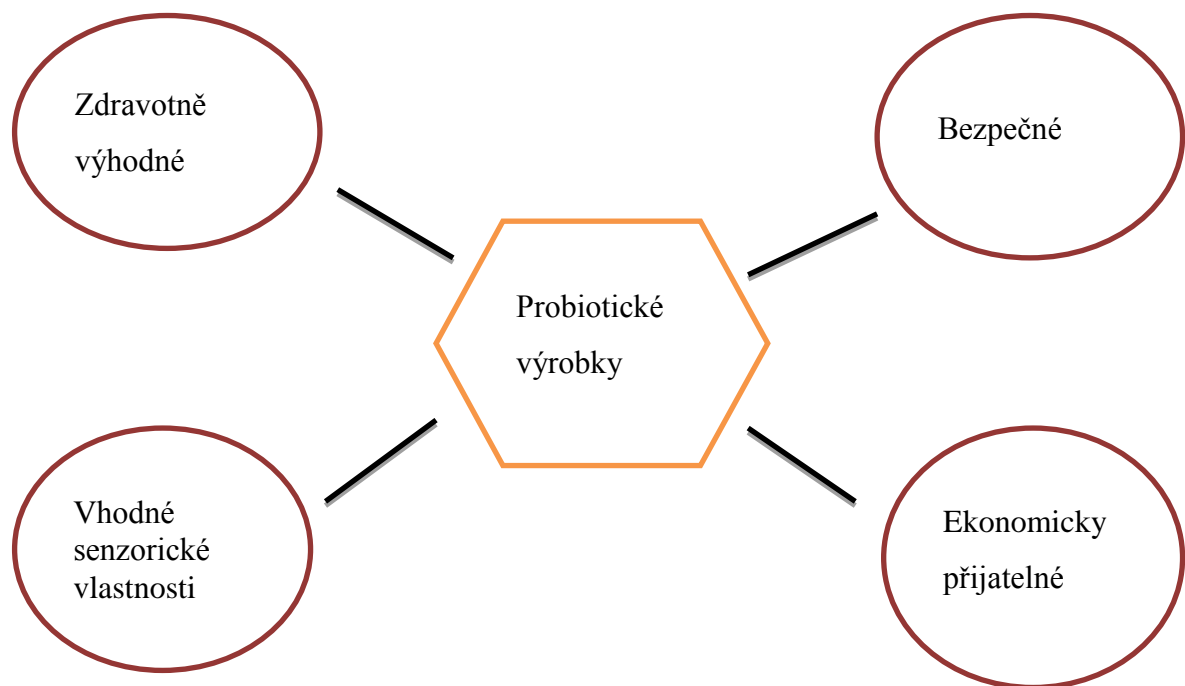
Lyoprotektant je látka, která chrání bakteriální buňku před poškozením mrazem. Samotná lyofilizace je proces, při kterém se materiál zamrazí, následně vloží do lyofilizátoru, kde se odsaje vzduch a tím se vytvoří vakuum. Vzorek se začne zahřívat a díky zvyšující se teplotě dochází k sublimaci vody ze vzorku a tím se vzorek vysuší. Poté se kultura hermeticky uzavře, aby nedošlo k absorpci vody z okolí (Date et al., 2000).

Nejvíce jsou probiotické mikroorganismy konzumovány v rámci fermentovaných produktů (Steer et al., 2000). Fermentované mléčné výrobky jako je podmáslí, kefir, acidofilní mléko, jogurty, jogurtové nápoje a další výrobky, například tvarohy, tvrdé sýry, některé tvrdé salámy a kysané zelí se řadí mezi alimentární probiotika. Pojmem alimentární probiotika jsou míněny probiotické kultury určené pro využití při samotné fermentaci nebo při potravinářské produkci (Rush et al., 2001). Například při technologii výroby jogurtů se lyofilizované kultury probiotických organismů přidávají do jogurtů s jogurtovými kulturami již ve finálním množství. Z důvodu produkce velkého množství kyseliny octové, je množení a růst bifidobakterií při procesu výroby jogurtů nežádoucí (Forman, 1996).

Vlivem rozšiřující se intolerance na laktózu se v posledních letech zvýšila výroba potravin s obsahem probiotik, které nemají mléčný původ. Základem těchto potravin jsou například obiloviny, sója a ovocné šťávy (Granato et al., 2010). Výrobky s obsahem probiotik by měly obsahovat bezpečné a vhodné probiotické organismy, v takovém počtu, aby mikroorganismy byly v dostatečném množství v době spotřeby. Z tohoto důvodu by měly být vybrané probiotické kmeny schopné přežít a udržet si svou funkčnost po dobu jejich zpracování a skladování. Prvním požadavkem při technologii výroby probiotických produktů je volba vhodného probiotického kmene. Každý kmen i druh je specifický svými probiotickými vlastnostmi tolerancí ke kyslíku, substrátovými preferencemi, atd. Obecně je, z hlediska odolnosti probiotických organismů, rod *Lactobacillus* odolnější než rod *Bifidobacterium* a to kvůli vztahu ke kyslíku. Laktobacily jsou fakultativně anaerobní bakterie, to znamená, že přežívají jak za přítomnosti kyslíku tak i bez něj. Zato bifidobakterie patří mezi anaerobní mikroorganismy, takže pro ně je kyslík toxický. Navíc, laktobacily se vyskytují v mléčných fermentovaných výrobcích přirozeně, jsou přizpůsobené životu v mléku a dalších potravinových substrátech a také jsou odolnější vůči nižšímu pH oproti ostatním probiotickým organismům (Lee and Salminen, 2009). Během posledních několika desetiletí, se na trhu objevilo více než 500 produktů s obsahem probiotik, trh s těmito potravinami se stále rozšiřuje (Sveje, 2007). Při vývoji funkčních potravin jsou probiotické kultury uměle zavedeny do potravin. Tyto probiotické kultury jsou komerčně dostupné ve vysoce koncentrované formě, jako lyofilizovaný prášek či zmrazené formě. Každá společnost

vyrábějící probiotika používá své probiotické mikroorganismy (viz. tabulka č. 2), které si sama vyrábí nebo je nakupuje. Lyofilizované kultury by měly obsahovat více než 10^{11} KTJ/g a zmražené vysoce koncentrované kultury by měly obsahovat více než 10^{10} KTJ/g (Oberman a Libudzisz, 1998). Přidáním probiotik do potravin může být pozměněna chuť těchto potravin v důsledku produkovaných metabolitů daných probiotik během kvašení a v průběhu skladování. Například kyselina octová produkovaná rodem *Bifidobacterium* významně ovlivňuje organoleptické vlastnosti výrobku, ale přítomnost probiotických kultur by neměla mít vliv na smyslové a kvalitativní vlastnosti produktu (Stanton et al., 2003). Potraviny s obsahem probiotik by měly splňovat kritéria na obr. 3 (Ross et al., 2005).

Obrázek č. 3: Schéma kritérií probiotických výrobků (Ross et al., 2005)



Pozitivní účinky probiotických potravin závisí na množství aktivních a životaschopných buněk v přepočtu na mililitr či gram výrobku v době spotřeby. Tedy, aby se zajistila důvěra v probiotické výrobky, je nutné dohlížet na to, aby během výroby i skladování přežil co nevyšší počet buněk (Saxelin et al., 1999). Množství bakterií, které by mělo být obsaženo v jednotlivých mléčných kysaných výrobcích je vymezeno vyhláškou Ministerstva zemědělství č.77/2003Sb. Tyto hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 3. Přežití probiotik při technologii výroby závisí na teplem zpracování, rychlosti ochlazování produktu, inkubační době, dále na vlastnostech substrátu (potravině) jako například pH, přítomnost cukrů a solí, umělých látek určených jako barvivo nebo k aromatizaci (Desmond et al., 2001). Jedním z hlavních faktorů ovlivňujících přežívání probiotických organismů je teplota kvašení (fermentace). Vhodná teplota pro růst většiny probiotik je mezi 37-43 °C, ačkoli druh *Lactobacillus acidophilus* je schopen růst i při teplotě 45 °C, optimální teplota kultivace je v rozmezí 40-42 °C (Lee and Salmien, 2009).

Tabulka č. 2: Komerční druhy probiotik (Tripathi and Giri, 2014)

Chr. Hansen	<i>L.acidophilus</i> LA1/LA5 <i>L.delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> Lb12 <i>L.paracasei</i> CRL431 <i>B.animalis</i> ssp. <i>lactic</i> Bb12
Danisco	<i>L.acidophilus</i> NCFMs <i>L.acidophilus</i> La <i>L.paracasei</i> Lpc <i>B.lactis</i> HOWARUTM/B1
DSM Food Specialties	<i>L.acidophilus</i> LAFTIs L10 <i>B.lactis</i> LAFTIs B94 <i>L.paracasei</i> LAFTIs L26
Nestle	<i>L.johnsonii</i> La1
Snow Brand Milk Products Co. Ltd.	<i>L.acidophilus</i> STB-220621 <i>B.longum</i> STB-29281
Institute Rosell	<i>L.rhamnosus</i> R0011 <i>L.acidophilus</i> R0052
Yakult	<i>L. casei</i> Shirota <i>B. breve</i> strain Yaku
Foneterra	<i>B. lactis</i> HN019 (DR10) <i>L. rhamnosus</i> HN001 (DR20)
Probi AB	<i>L. plantarum</i> 299V <i>L. rhamnosus</i> 271
Danone	<i>L. casei</i> Immunitas <i>B. animalis</i> DN173010 (Bioactiva)
Essum AB	<i>L. rhamnosus</i> LB21 <i>Lactococcus lactis</i> L1A
Biogaia	<i>L. reuteri</i> SD2110
Morinaga Milk Industry Co. Ltd.	<i>B. longum</i> BB536
Lacteol Laboratory	<i>L. acidophilus</i> LB
Medipharm	<i>L. paracasei</i> F19

Tabulka č. 3: Minimální počty a druhy mikroorganismů v kysaných mléčných výrobcích
(Příloha č. 2 k Vyhlášce Ministerstva zemědělství ČR č. 77/2003Sb.)

Druh výrobku	Použité mikroorganismy	Počet bakterií v 1 g výrobku
Acidofilní mléko	<i>Lactobacillus acidophilus</i> a další mezofilní, příp. termofilní kultury bakterií mléčného kvašení	10^6 <i>Lactobacillus acidophilus</i>
Jogurty	protosymbiotická směs <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> a <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	10^7
Kysané mléko, vč. smetanového zákysu, podmásli a kysané smetany	monokultury nebo směsné kultury bakterií mléčného kvašení	10^6
Kefir	zákys připravený z keřirových zrn, jehož mikrobiota se skládá z kvasinek zkvašující laktózu <i>Kluyveromyces marxianus</i> i nezkvašující laktózu <i>Sacharomyces unisporus</i> , <i>Sacharomyces cerevisiae</i> , <i>Sacharomyces exginus</i> a déle <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 bifidobakterie

3. Hypotéza

Pro úpravu rovnováhy mikrobioty gastrointestinálního traktu jsou často používány probiotické bakterie, které mohou být přijímány ve formě fermentovaných mléčných výrobků. Probiotika musí splňovat celou řadu fyziologických a technologických vlastností. Jednou z důležitých technologických vlastností je přežívání v mléce. Předpokládáme, že bifidobakterie budou růst nejlépe v mléce živočišného druhu, ze kterého byly izolovány.

4. Cíl práce

Mléko je vhodným substrátem pro růst probiotických bakterií. Cílem bakalářské práce je testování a porovnání schopnosti bifidobakterií prokysávat různé druhy mlék přežvýkavců a přežít v tomto prostředí. Bifidobakterie byly izolovány z různých druhů zvířat, lidí a probiotických výrobků.

5. Materiál a metody

5.1 Testované kmeny bifidobakterií

Bifidobakterie patří mezi probiotické bakterie, které se přidávají do různých mléčných výrobků. Pro sledování přežívání různých kmenů bifidobakterií v mléce přežvýkavců byly použity izoláty z výkalů telat, jehňat, ze stolice kojenců a dospělého jedince a také kmeny izolované z probiotik. Celkem bylo použito 18 kmenů bifidobakterií. Použité bifidobakterie jsou uloženy ve sbírce mikroorganismů katedry Mikrobiologie, výživy a dietetiky na ČZU. Testované kmeny jsou uvedené v tabulce číslo 4.

Tabulka č. 4: Použité kmeny bifidobakterií

Zkratka	celý název	původ kmene
TP1	<i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>longum</i>	izolát ze stolice kojence
JOV	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	izolát ze stolice kojence
EV2	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	izolát ze stolice dospělého
DAN	<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>lactis</i>	izolát z mléčného výrobku
BV	<i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>longum</i>	probiotikum
BM	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	probiotikum
25II	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	izolát z výkalů telete
17III1	<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>animalis</i>	izolát z výkalů telete
22II	<i>Bifidobacterium longum</i> ssp. <i>suis</i>	izolát z výkalů telete
17III2	<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	izolát z výkalů telete
23I2	<i>Bifidobacterium choerinum</i>	izolát z výkalů telete
805III2	<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>animalis</i>	izolát z výkalů telete
7VIA	<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>animalis</i>	izolát z výkalů jehněte
5IIA	<i>Bifidobacterium choerinum</i>	izolát z výkalů jehněte
14V	<i>Bifidobacterium choerinum</i>	izolát z výkalů jehněte
5VB	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> ssp. <i>globosum</i>	izolát z výkalů jehněte
3II	<i>Bifidobacterium animalis</i> ssp. <i>animalis</i>	izolát z výkalů jehněte
9VIB	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	izolát z výkalů jehněte

5.2 Testování růstu a přežívání bifidobakterií v mléce přežvýkavců

Pro testování byly vybrány 3 druhy mléka, a to kravské, kozí a ovčí. Kravské mléko bylo připraveno z 10 g sušeného odtučněného mléka rozmíchaného ve 100 ml vody. Kozí a ovčí mléko bylo získáno v tekuté formě nadojením. Každý vzorek byl rozdělen po 10 ml do osmnácti penicilínek. Ty byly poté sterilovány po dobu 1 hodiny. Po vychladnutí byla sterilovaná mléka zaočkována zvolenými kmeny bifidobakterií. Čerstvě narostlé kultury vybraných bifidobakterií byly zaočkovány do mlék přežvýkavců v množství 0,5 ml. Takto zaočkované penicilínky byly vloženy do termostatu, kde byly kultivovány při 37 °C po dobu 24 hodin. Po 24 hodinách bylo mléko prokysáno a bylo možné stanovit počáteční počet bifidobakterií. Pro stanovení počtů bifidobakterií bylo použito kultivační metody. Ke kultivačnímu stanovení bylo nejprve nutné vytvoření ředících řad. Vialky, které byly použity pro vytvoření ředící řady, byly připraveny pomocí metody roll-tube z Wilkins-Chalgren bujonu (Oxoid). Ředící řady byly sestaveny od ředění 10^{-1} až po poslední ředění 10^{-8} . Naředěné vzorky byly zaočkovány na malé Petriho misky a to v množství 0,5 ml. Jako kultivační medium pro bifidobakterie byl použit Wilkins-Chalgren agar, do kterého byl přidán sojový pepton (5 g/l), cystein (0,5 g/l), tween 80 (1 ml/l), kyselina octová (1 ml/l) a antibiotikum mupirocin (100 mg/l). Podle Rada a Petr (2000) je takto připravené kultivační médium označováno jako WSPMup. Anaerobní podmínky pro správný růst bifidobakterií byly zajištěny pomocí anaerostatu, v němž bylo vytvořené vakuum a poté byl naplněn vodíkem a oxidem uhličitým v poměru 90 : 10. Bifidobakterie byly kultivovány 48 hodin při 37 °C v termostatu. Po 48 hodinách byly spočítány kolonie a počet bifidobakterií byl vyjádřen v log KTJ/ml mléka. Rozbor metodou kultivačního stanovení byl opakován v různých časových intervalech.

6. Výsledky

Vybrané izoláty bifidobakterií byly testovány na růst a přežívání v kravském, kozím a ovčím mléce. První rozbor, kdy byly zjištěny počty bifidobakterií, byl proveden po prokysání mléka tedy ve dni námi stanoveným jako den 0. Den 0 je nulovým dnem skladování. Po prokysání mléka byl nejnižší nárůst lidských izolátů a izolátů z probiotik zjištěn v mléce kozím a to v průměrných počtech $8,02 \pm 2,68$ log KTJ/ml, naopak nejvyšší nárůst těchto izolátů byl v kravském mléce, a to v počtech $8,94 \pm 0,65$ log KTJ/ml. V mléce ovčím dosahoval nárůst těchto izolátů v průměru $8,07 \pm 0,98$ log KTJ/ml. Izoláty bifidobakterií z jehněčích výkalů byly schopné narůst nejvíce v mléce kozím, kde byl jejich počet $9,49 \pm 1,33$ log KTJ/ml. V nejnižším počtu ($9,03 \pm 0,44$ log KTJ/ml) narostly v mléce ovčím. Průměrný nárůst jehněčích izolátů byl v množství $9,27 \pm 0,25$ log KTJ /ml v mléce kravském. Bifidobakterie izolované z výkalů telat dosahovaly nejvyšších počtů v mléce kravském ($8,12 \pm 0,63$ log KTJ/ml). Naopak v nejnižším počtu ($7,65 \pm 2,56$ log KTJ/ml) narostly v mléce kozím. V ovčím mléce byly schopné narůst v počtu $8,10 \pm 2,13$ log KTJ/ ml. Průměrné výsledky počtu bifidobakterií po prokysání mléka jsou uvedené v tabulce číslo 5.

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

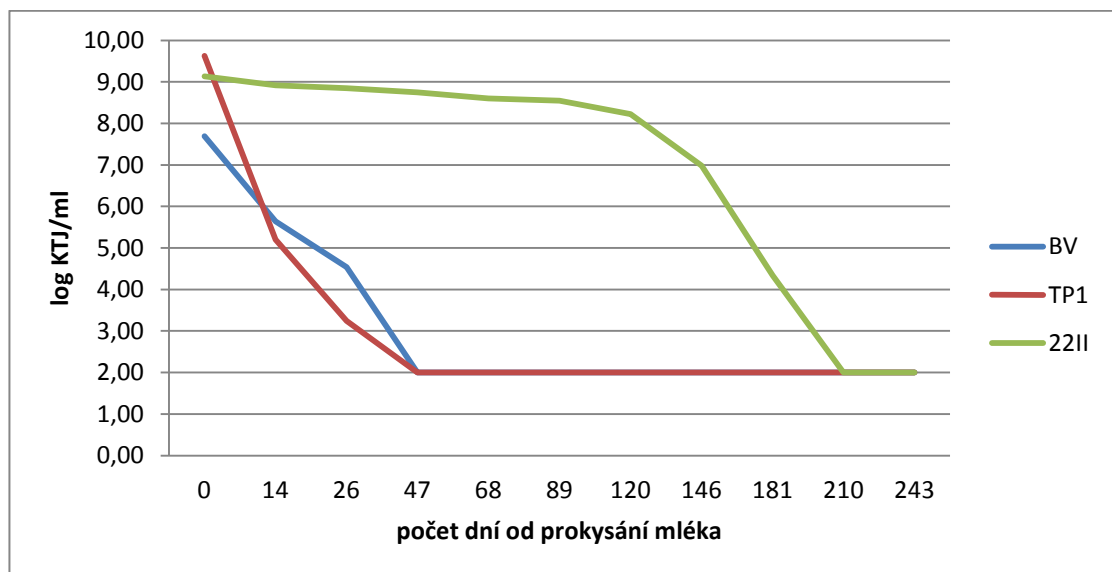
původ bifidobakterií	kravské mléko	kozí mléko	ovčí mléko
lidské + probiotika	$8,94 \pm 0,65$	$8,02 \pm 2,68$	$8,07 \pm 0,98$
jehněčí	$9,27 \pm 0,25$	$9,49 \pm 1,33$	$9,03 \pm 0,44$
telecí	$8,12 \pm 0,63$	$7,65 \pm 2,56$	$8,10 \pm 2,13$

6.1. Růst a přežívání kmenů druhu *Bifidobacterium longum* ssp. *longum*

Pro sledování přežívání bakteriálního druhu *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* byly vybrány 3 izoláty. TP1 izolát ze stolice kojence, BV izolát z probiotika a 22II izolát z výkalu telete.

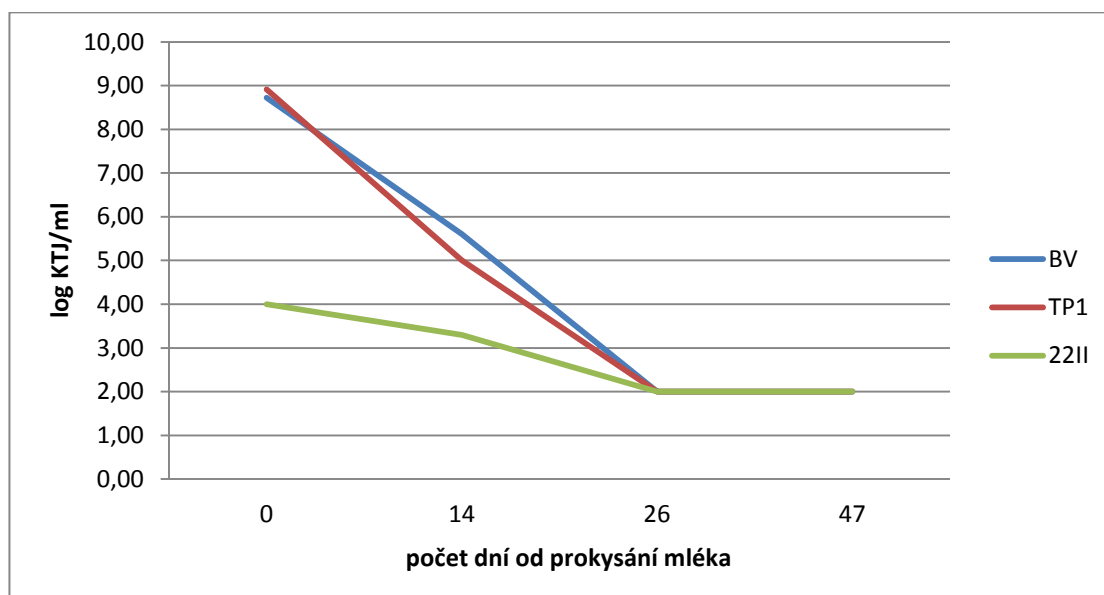
Na grafu č. 1 je znázorněno přežívání těchto izolátů v kravském mléce. V kravském mléce nejdéle přežíval izolát z telete označen zkratkou 22II a to 181 dní. Nejlépe narostl v kravském mléce izolát TP1, a to v počtu 9,63 log KTJ/ml. Izolát BV byl detekován ze všech tří kmenů v nejnižším množství a to 7,69 log KTJ/ml. Izolát BV a TP1 přežívaly v kravském mléce v množství vyšším než 10^2 log KTJ/ml minimálně po dobu 26 dnů

Graf č. 1: Růst a přežívání *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* v kravském mléce



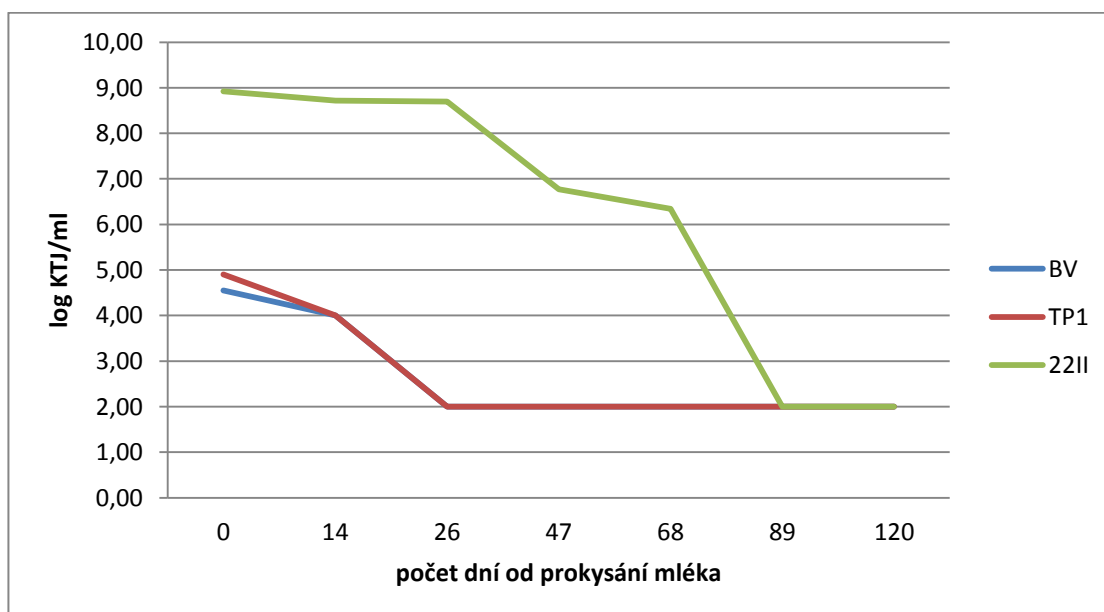
Na grafu č. 2 je zachyceno přežívání těchto tří izolátů v mléce ovčím. V ovčím mléce v nejnižším počtu narostl izolát 22II (4,00 log KTJ/ml), naopak izoláty BV a TP1 narostly v ovčím mléce v téměř dvojnásobném počtu (8,72 log KTJ/ml a 8,91 log KTJ/ml). Všechny tři sledované kmeny přežívaly v ovčím mléce po stejnou dobu, a to po dobu čtrnácti dní.

Graf č. 2: Růst a přežívání *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* v ovčím mléce



Na Grafu č. 3 je zobrazeno přežívání izolátů BV, TP1 a 22II v kozím mléce. Kozí mléko nejlépe prokysal izolát 22II a to v počtu 8,92 log KTJ/ml. Izolát TP1 narostl v množství 4,90 log KTJ/ml. V nejnižším počtu byl zachycen po prokysání mléka izolát z probiotik BV (4,55 log KTJ/ml). Asi 14 dní přežívaly izoláty BV a TP1. Izolát 22II přežíval déle v množství vyšším než 10^2 KTJ/ml minimálně po dobu 68 dnů.

Graf č. 3: Růst a přežívání *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* v kozím mléce

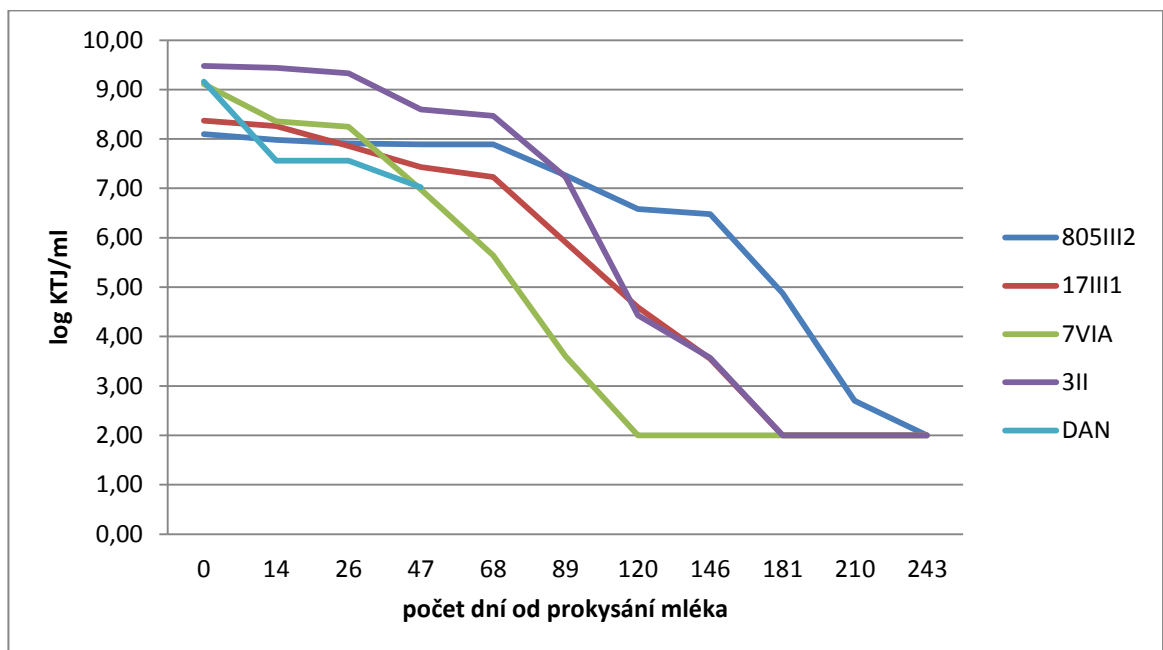


6.2. Růst a přežívání kmenů druhu *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* a *lactis*

Pro detekci délky přežívání a schopnosti nárůstu v různých druzích mlék, druhem *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* byly vybrány 4 izoláty 805III2 (telecí výkaly), 17III1 (telecí výkaly), 7VIA (jehněčí výkaly) a 3II (jehněčí výkaly).

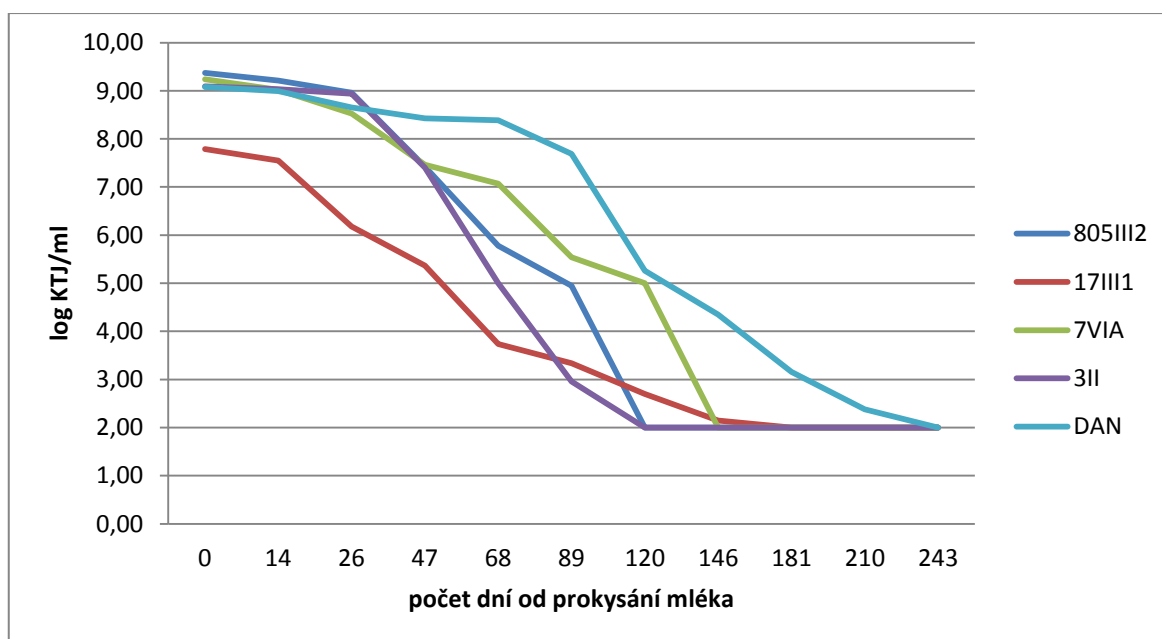
Na grafu č. 4 je zobrazené přežívání těchto izolátů v kravském mléce. V kravském mléce nejlépe rostl izolát 3II a to v počtu 9,48 log KTJ/ml. Izolát 7VIA byl ve vzorku mléka nalezen v počtu 9,11 log KTJ/ml. V množství 8,37 log KTJ/ml narostl v mléce izolát 17III1. V nejnižším počtu (8,10 log KTJ/ml) byl v mléce detekován kmen 805III2 a však přežíval nejdéle a to déle než 210 dnů, ostatní kmeny přežívaly méně než 210 dnů. Kmen DAN narostl v počtu 9,16 log KTJ/ml a po dobu 47 dní přežíval v počtech vyšších než 10^6 KJT/ml, testování tohoto kmenu stále probíhá.

Graf č. 4: Růst a přežívání *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* a *lactis* v kravském mléce



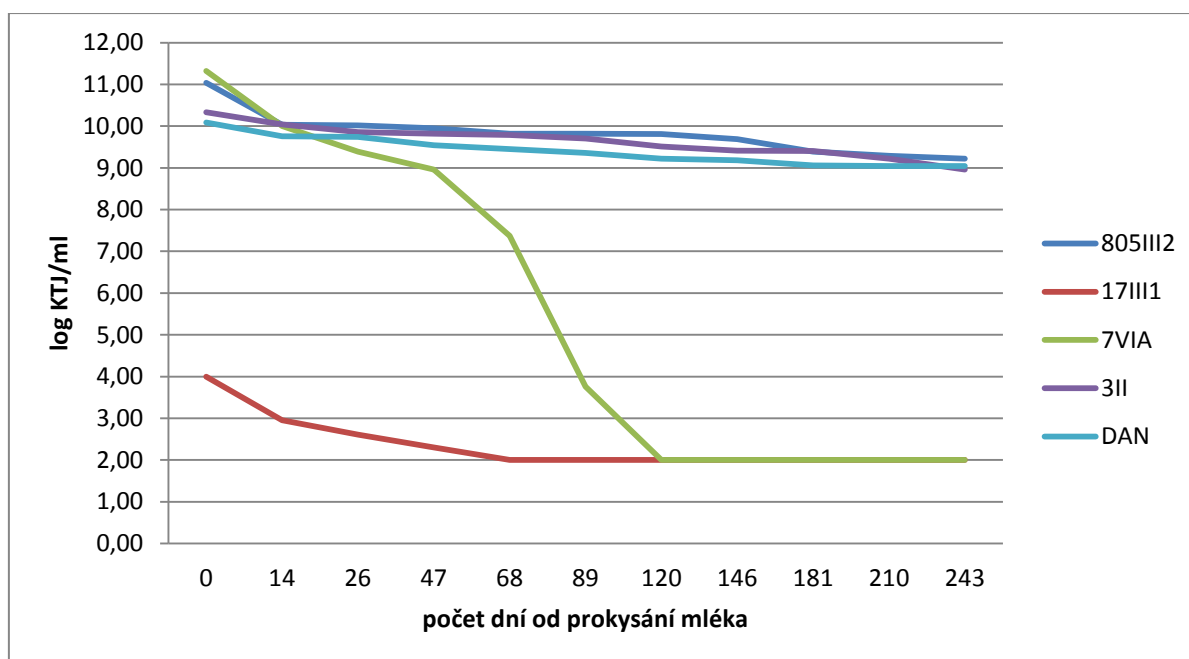
V případě ovčího mléka (graf č.5), byl detekován nejvyšší nárůst (9,37 log KTJ/ml) u kmene 805III2, který přežíval minimálně po dobu 89 dní. Stejnou dobu přežíval i izolát 3II, který po prokysání mléka narostl v množství 9,09 log KTJ/ml. Izolát 7VIA dosáhl počtu 9,24 log KTJ/ml a přežíval déle než 120 dní. Kmen 17III1 přežíval asi 146 dní a zároveň byl tento kmen zaznamenán mléce v nejnižším množství a to v počtu 7,79 log KTJ/ml. Druhý nejnižší nárůst v ovčím mléce po kultivaci byl zaznamenán u izolátu DAN a to 9,08 log KTJ/ml, i přesto byl tento kmen nejdéle žijícím izolátem v tomto prostředí a to po dobu 210 dní.

Graf č. 5: Růst a přežívání *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* a *lactis* v ovčím mléce



Z grafu č. 6 je zřejmé, že většina izolátů, vyjma 17III1, dosáhla vyššího nárůstu než v mléce kravském a ovčím. Nejvyšší nárůst byl zaznamenán u izolátu 7VIA a to v počtu 11,32 log KTJ/ml. Tento izolát přežíval minimálně po dobu 89 dní. Naopak nejnižší hodnoty byly zjištěny u izolátu 17III1, kde nárůst toho izolátu byl v počtu 4,00 log KTJ/ml a přežíval nejkratší dobu a to méně než 68 dní. Izolát 3II narostl v počtu 10,33 log KTJ/ml. V množství 11,04 log KTJ/ml byl v mléce zachycen kmen 805III2. Kmen DAN byl po kultivaci detekován v počtu 10,09 log KTJ/ml. Tyto tři izoláty stále přežívají.

Graf č. 6: Růst a přežívání *Bifidobacterium animalis ssp. animalis* a *lactis* v kozím mléce

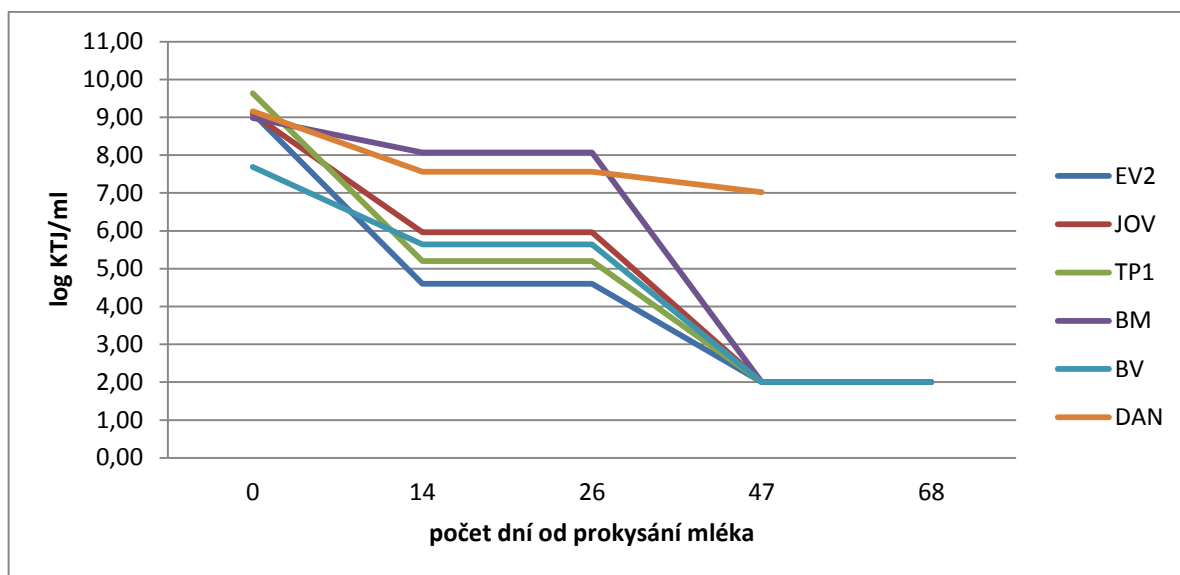


6.3. Růst a přežívání bifidobakterií izolovaných z lidské stolice a probiotik

Pro sledování přežívání a růstu bifidobakterií izolovaných z lidské stolice a probiotik v mléce kravském, ovčím a kozím, bylo vybráno 6 izolátů. Dva izoláty ze stolice kojenců (TP1 a JOV), jeden byl izolován ze stolice dospělého jedince (EV2), jeden z mléčného výrobku (DAN) a dva které byly izolovány z probiotika (BV a BM).

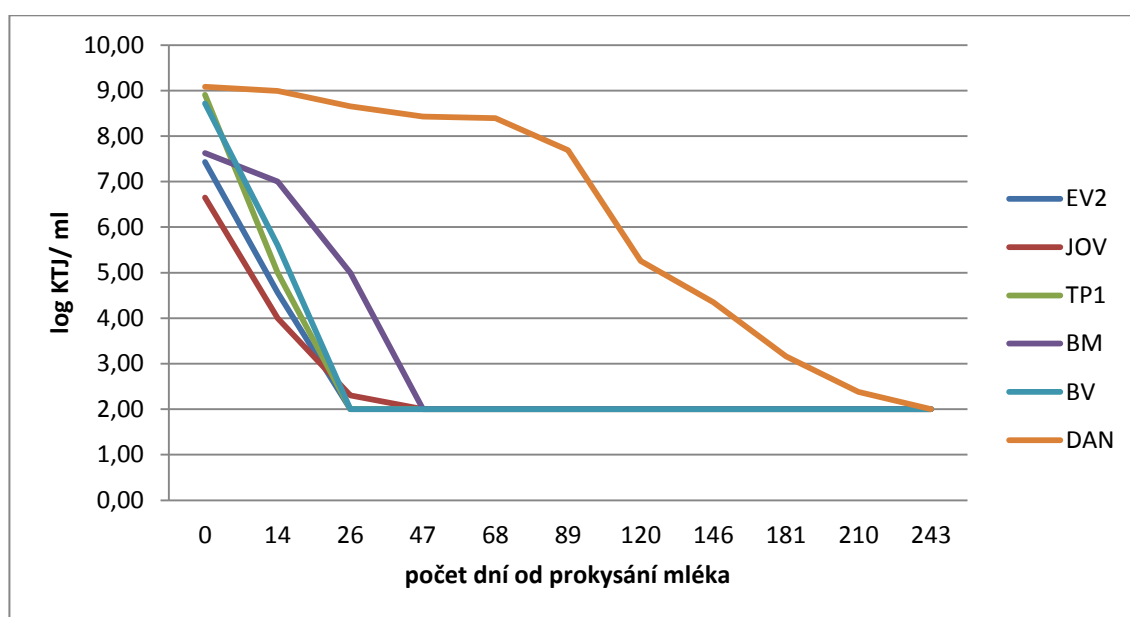
Na grafu č. 7 je zachycen růst a přežívání bifidobakterií izolovaných z lidské stolice a probiotik v mléce kravském. Množství sledovaných izolátů byl menší než 10^2 KTJ/ml ve 42. dnu, kromě kmenu DAN, který přežíval v počtech vyšších než 7 log KTJ/ml více než 47 dní. Kmen DAN byl detekován po prokysání kravského mléka v množství 9,16 log KTJ/ml. V nejvyšším počtu byl zachycen izolát TP1 (9,63 log KTJ/ml). Kmen EV2 narostl v prostředí kravského mléka v množství 9,11 log KTJ/ml. V množství 9,08 log KTJ/ml narostl izolát JOV a izolát BM byl po prokysání mléka v počtu 8,98 log KTJ/ml. Nejnižší počet bifidobakterií izolovaných z lidské stolice a probiotik byl detekován u izolátu BV a to 7,69 log KTJ/ml.

Graf č. 7: Růst a přežívání bifidobakterií izolovaných z lidské stolice a probiotik v kravském mléce



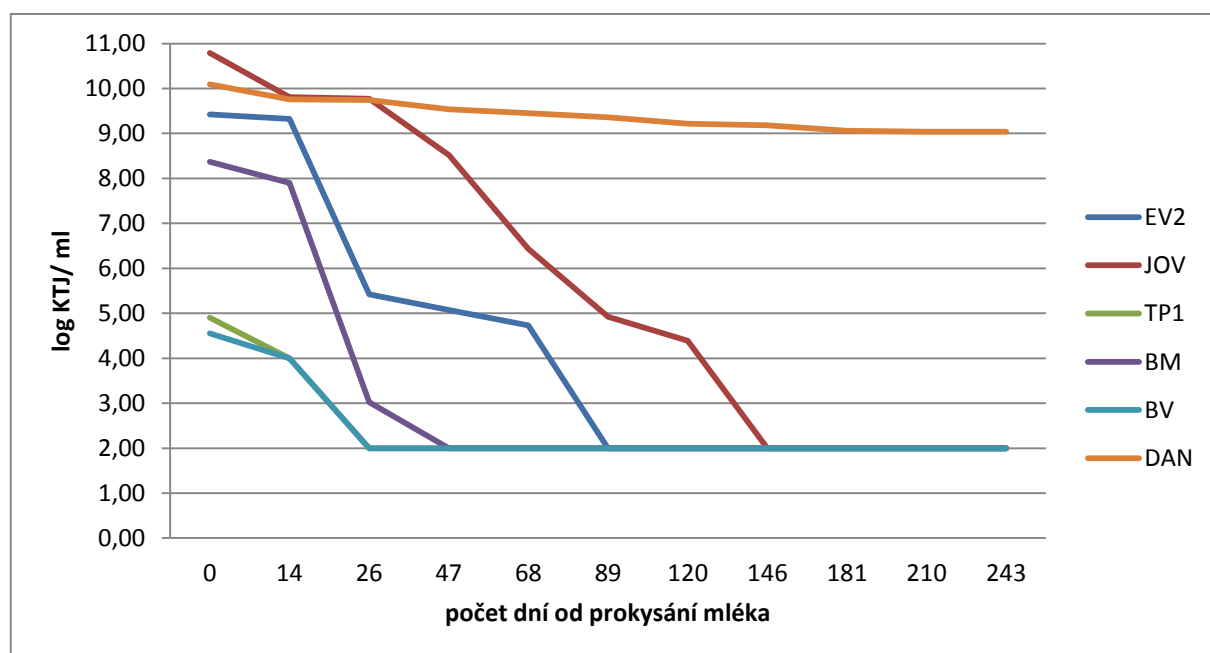
Na Grafu č. 8 je zobrazeno přežívání a růst těchto bifidobakterií v mléce ovčím. V nejvyšším počtu narostl izolát DAN (9,08 log KTJ/ml) a rovněž přežíval nejdelší dobu a to minimálně 210 dní. Kmen TP1 narostl v množství 8,91 log KTJ/ml a přežíval asi 14 dní. Takto krátce přežívaly i izoláty EV2 a BV. Izolát BV narostl v poměrně vysokém počtu a to 8,72 log KTJ/ml. Kmen EV2 byl nalezen v ovčím mléce v množství 7,43 log KTJ/ml. BM narostl v počtu 7,63 log KTJ/ml a přežíval déle než 26 dní a méně než 47 dní. Stejně tak přežíval kmen JOV. U kmene JOV byl zachycen nejnižší nárůst, a to 6,65 log KTJ/ml.

Graf č. 8: Růst a přežívání bifidobakterií izolovaných z lidské stolice a probiotik v ovčím mléce



Na Grafu č. 9 je znázorněn růst a přežívání těchto izolátů v kozím mléce. Nejlépe v kozím mléce narostl kmen JOV (10,47 log KTJ/ml), který přežíval asi 120 dní. Bakteriální kmen označen jako DAN byl zachycen po prokysání mléka v počtu 10,09 log KTJ/ml a po celou dobu sledování přežíval v počtu vyšším než 9,04 log KTJ/ml. Izolát EV2 narostl v množství 9,42 log KTJ/ml a přežíval kratší dobu než 89 dní. V počtu 8,37 log KTJ/ml narostl izolát BM. Tento kmen přežíval v mléce minimálně 26 dní. Kratší dobu než 26 dní přežívaly v mléce kmeny TP1 a BV. Kmen TP1 byl ve vzorku mléka nalezen v množství 4,90 log KTJ/ml. Nejnižší schopnost narůst v kozím mléce projevil izolát BV, byl detekován v počtu 4,55 log KTJ/ml.

Graf č. 9: Růst a přežívání bifidobakterií izolovaných z lidské stolice a probiotik v kozím mléce

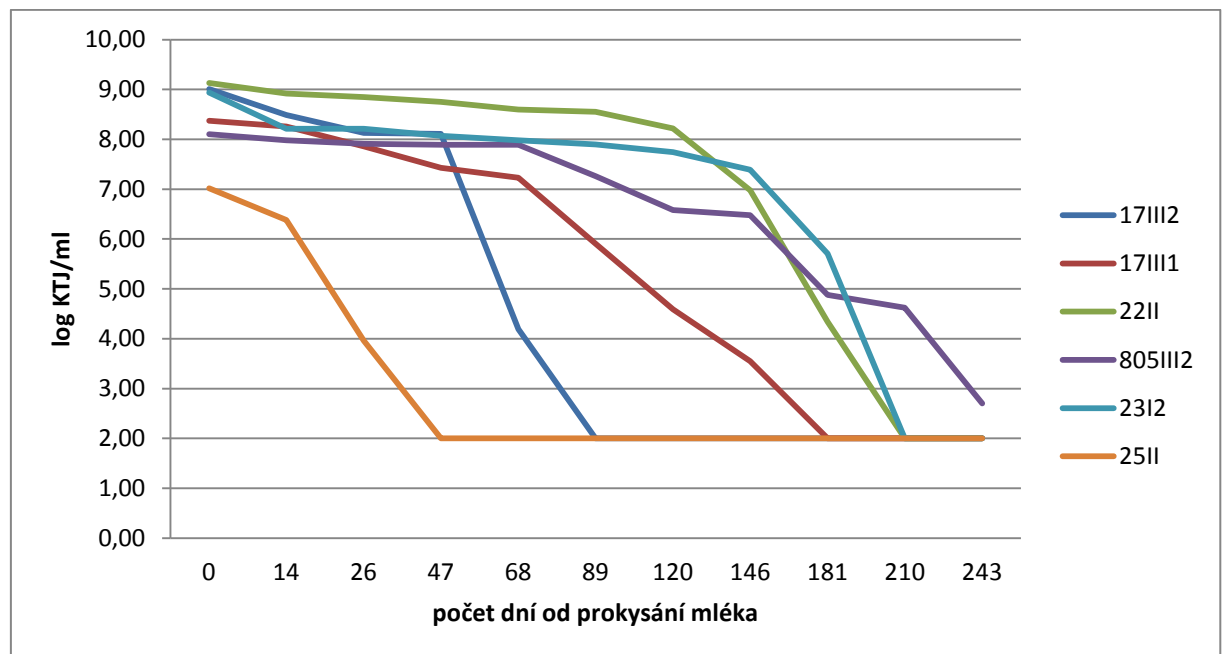


6.4. Růst a přežívání bifidobakterií izolovaných z telecích výkalů

Pro stanovení schopnosti bifidobakterií izolovaných z telecích výkalů narůst a přežít v mléce přežvýkavců bylo izolováno 6 druhů bifidobakterií z telecích výkalů. Byly vybrány dva druhy *Bifidobacterium thermophilum* označené jako 25II a 17III2, dva druhy *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis* označené jako 17III1 a 805III2, kmen *Bifidobacterium longum* ssp. *suis* 22II a kmen *Bifidobacterium choerium* 23II.

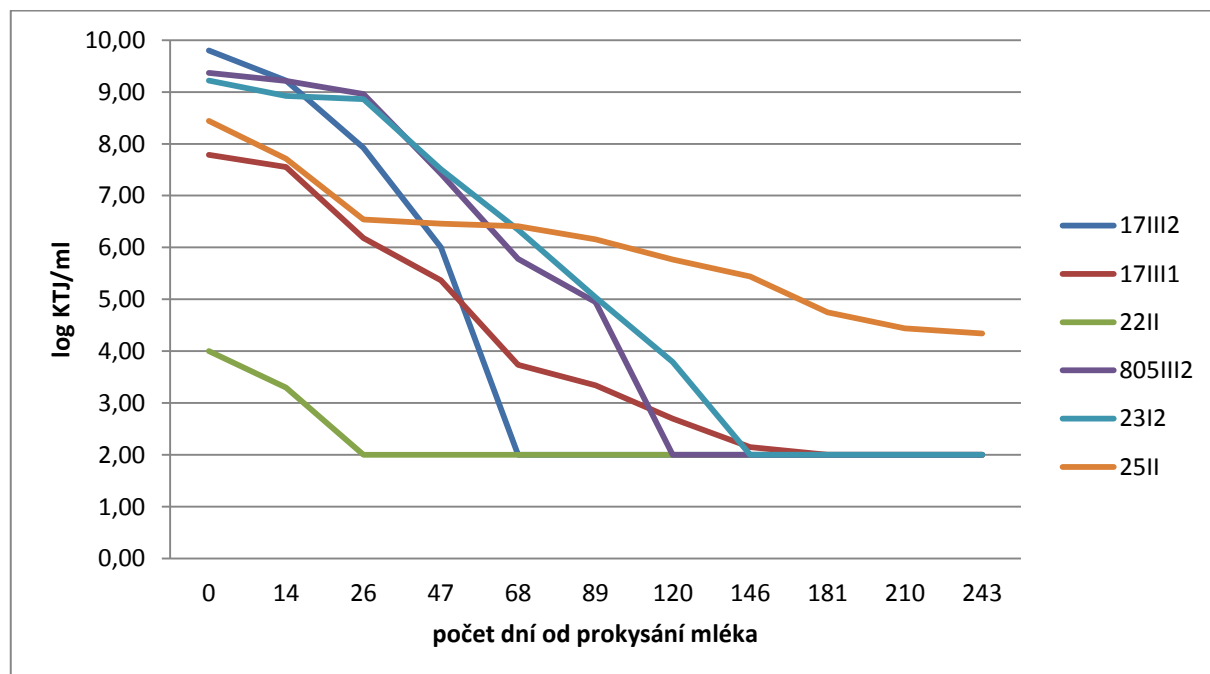
Na grafu č. 10 je zobrazen růst a přežívání těchto izolátů v kravském mléce. Nejlépe narostl v kravském mléce kmen 22II a to v počtu 9,13 log KTJ/ml, přežíval asi 181 dní. Schopnost narůst v kravském mléce byla nejnižší u izolátu 25II (7,02 log KTJ/ml). Tento izolát také přežíval v kravském mléce nejkratší dobu a to kratší dobu než 47 dní. Téměř ve stejném počtu prokysaly mléko kmen 17III2 (9,01 log KTJ/ml), který přežíval asi 68 dní a kmen 23II (8,94 log KTJ/ml), který přežíval asi 210 dní. V množství 8,37 log KTJ/ml narostl kmen 17III1 a přežíval asi 146 dní. V počtu 8,10 log KTJ/ml narostl kmen 805III2. Tento kmen přežíval v počtech vyšších než 2,70 log KTJ/ml více než 243 dní.

Graf č. 10: Růst a přežívání bifidobakterií izolovaných z telecích výkalů v kravském mléce



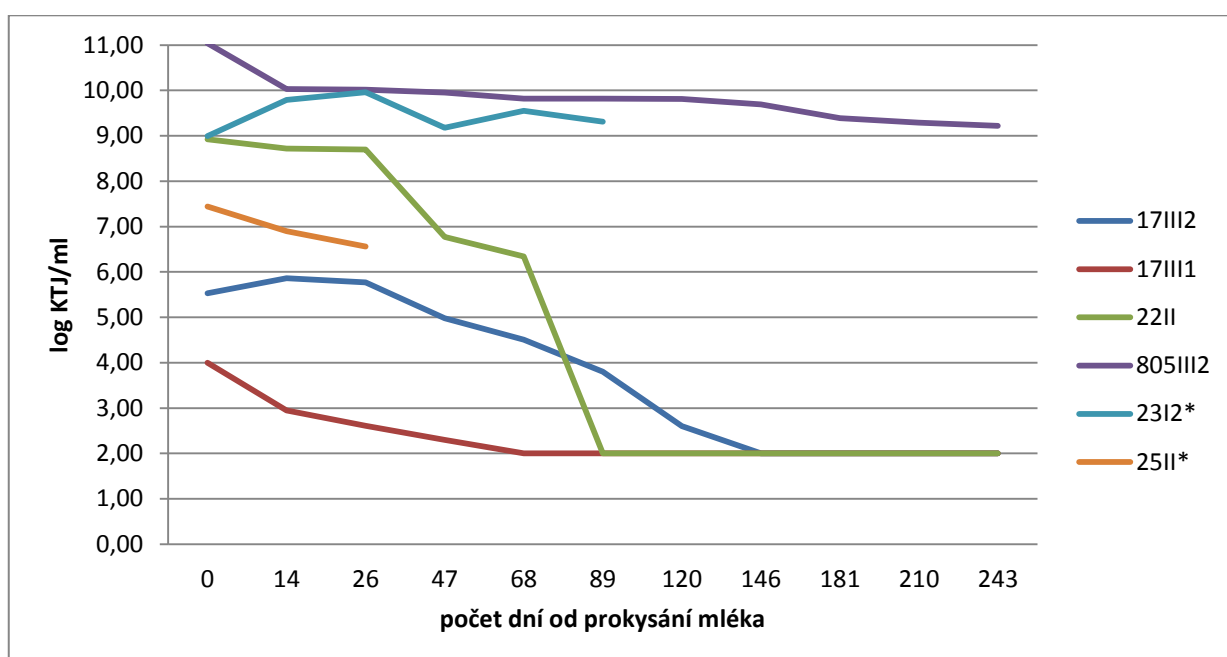
Na grafu č. 11 je znázorněno přežívání 6 kmenů bifidobakterií v ovčím mléce. Izolát 22II byl po prokysání zachycen v nejnižším počtu a to 4,00 log KTJ/ml a přežíval přibližně 14 dní. Naopak nejlépe narostl v ovčím mléce kmen 17III2 v množství 9,80 log KTJ/ml, avšak přežíval kratší dobu než 68 dní. Izolát 25II narostl v počtu 8,44 log KTJ/ml a přežíval v množství 4,34 log KTJ/ml i poslední rozbor, který byl proveden ve 243. dni. V počtu 7,79 log KTJ/ml byl nalezen kmen 17III1, který přežíval déle než 120 dní. Stejnou dobu přežíval také izolát 23I2, jenž narostl v prostředí ovčího mléka v množství 9,22 log KTJ/ml. Kmen 805III2 byl ve vzorku mléka nalezen v množství 9,37 log KTJ/ml. Tento izolát přežíval minimálně 89 dní.

Graf č. 11: Růst a přežívání bifidobakterií izolovaných z telecích výkalů v ovčím mléce



V kozím mléce (graf č.12) došlo v případě izolátů 25II a 23I2 ke kontaminaci během (sledování), proto jejich záznam není kompletní. Nejvyšší nárůst byl pozorován u izolátu 805III2 (11,04 log KTJ/ml), který byl zároveň nejdéle přežívajícím. Naopak nejnižší schopnost narůst ve vzorku mléka byl zaznamenán u kmene 17III1 a to v množství 4,00 log KTJ/ml, tento izolát přežíval minimálně 68 dní. Stejnou dobu přežíval i kmen 22II, ačkoli jeho schopnost narůst ve vzorku byla vyšší, a to v počtu 8,92 log KTJ/ml. Izolát 17III2 narostl v množství 5,53 log KTJ/ml, nicméně přežíval relativně dlouho a to déle než 120 dní.

Graf č. 12: Růst a přežívání bifidobakterií izolovaných z telecích výkalů v kozím mléce



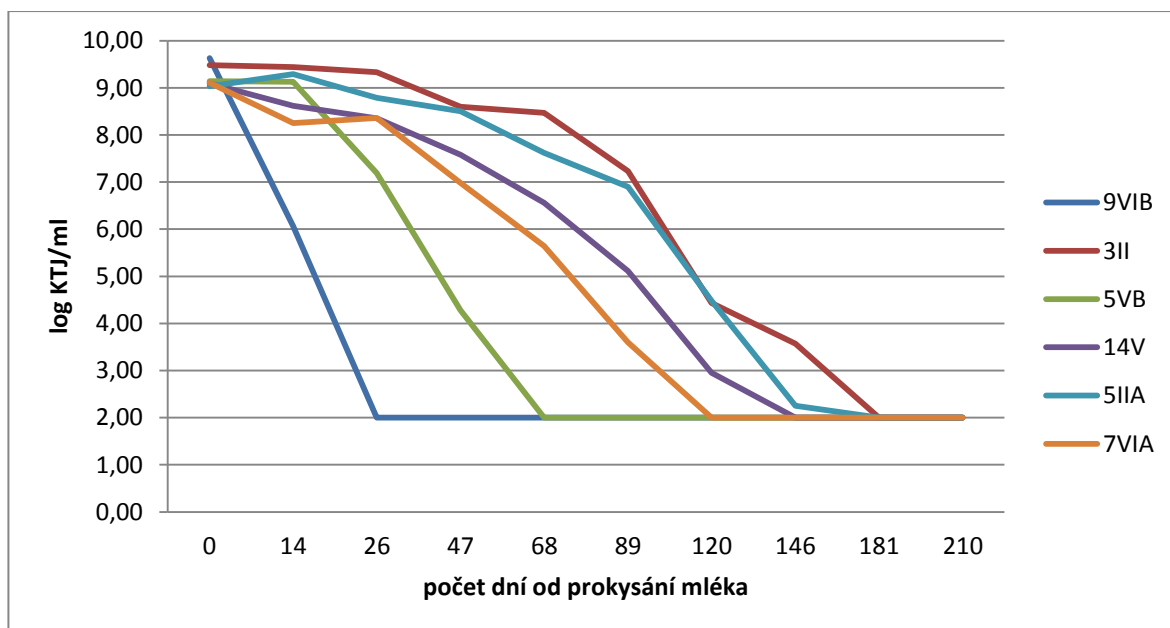
*nt- kontaminace

6.5. Růst a přežívání bifidobakterií izolovaných z jehněčích výkalů

Sledování schopnosti růstu a přežití bifidobakterií izolovaných z jehněčích výkalů byl založen na sledování izolátů 9VIB (*Bifidobacterium pseudocatenulatum*), 3II (*Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis*), 5VB (*Bifidobacterium pseudolongum* ssp. *globosum*), 14V (*Bifidobacterium choerinum*), 5IIA (*Bifidobacterium choerinum*), 7VIA (*Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis*) v jednotlivých vzorcích mléka.

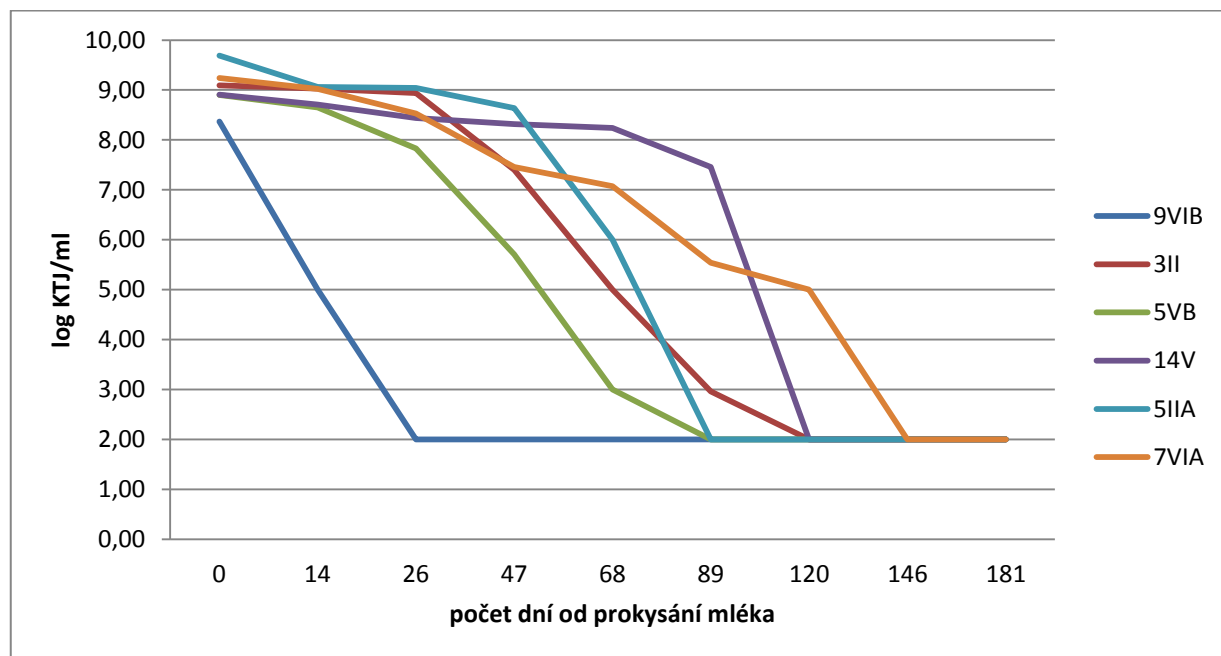
Na grafu č. 13 je zobrazen růst a přežívání bifidobakterií izolovaných z jehněčích výkalů v kravském mléce. Kmen 9VIB byl po prokysání vzorku nalezen v nejvyšším počtu (9,63 log KTJ/ml) a zároveň přežíval nejkratší období a to méně než 26 dní. Další kmen 3II narostl v množství 9,48 log KTJ/ml a zároveň přežíval nejkratší období a to méně než 26 dní. Další kmen 3II narostl v množství 9,48 log KTJ/ml a současně tento kmen přežíval déle než 146 dní. Izoláty 14V a 5IIA prokázaly poměrně stejnou schopnost narůst v prostředí kravského mléka a to v hodnotách 9,09 log KTJ/ml a 9,03 log KTJ/ml. Kmen 14V přežíval asi 120 dní. Kmen 5IIA přežíval déle než 146 dní. V počtu 9,14 log KTJ/ml narostl po prokysání mléka izolát 5VB, tento kmen přežíval kratší dobu než 68 dní. Déle než 89 dní přežíval kmen 7VIA. Izolát 7VIA byl ve vzorku mléka nalezen v množství 9,11 log KTJ/ml.

Graf č. 13: Růst a přežívání bifidobakterií izolovaných z jehněčích výkalů v kravském mléce



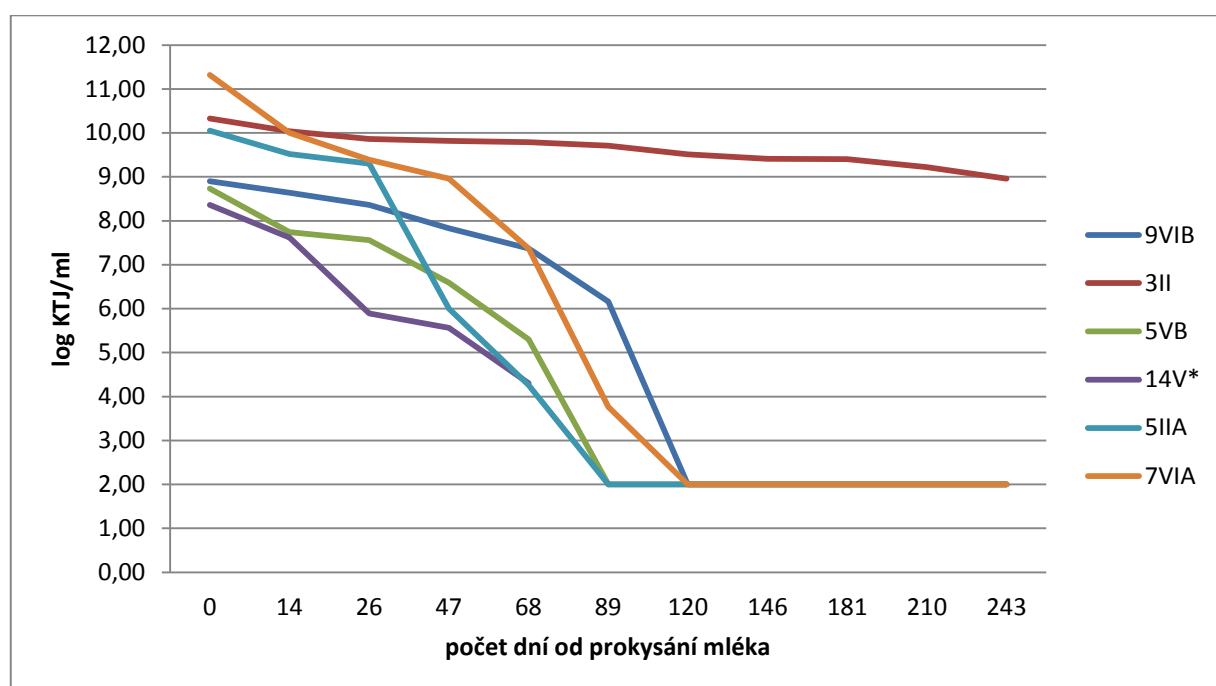
Na grafu č. 14 je zachycen růst a přežívání výše uvedených bifidobakterií v ovčím mléce. V ovčím mléce nejhůře narostl izolát 9VIB a to v hodnotě 8,37 log KTJ/ml, který rovněž přežíval nejkratší dobu a to méně než 26 dní. Naopak kmen 5IIA narostl v mléce v nejvyšší hodnotě (9,69 log KTJ/ml), nepřežíval v mléce déle jak 89 dní. Méně než 89 dní přežíval také kmen 5VB, který byl zachycen v počtu 8,90 log KTJ/ml. Nejdéle přežíval izolát 7VIA a to déle než 120 dní. Izolát 7VIA byl v mléce detekován v množství 9,24 log KTJ/ml. V počtu 8,91 log KTJ/ml byl ve vzorku mléka nalezen kmen 14V, který přežíval kratší dobu než 120 dní. Stejnou dobu přežíval také izolát 3II, který byl schopný narůst v prostředí ovčího mléka v množství 9,09 log KTJ/ml.

Graf č. 14: Růst a přežívání bifidobakterií izolovaných z jehněčích výkalů v ovčím mléce



V prostředí mléka kozího (viz graf č. 15) nejlépe narostl izolát 7VIA (11,32 log KTJ/ml). Tento izolát přežíval také poměrně dlouhou dobu a to déle než 89 dní. Také kmen 9VIB přežíval déle než 89 dní, který byl po prokysání mléka zachycen v počtu 8,90 log KTJ/ml. U izolátu 14V byla detekována kontaminace, proto u tohoto izolátu nejsou výsledky kompletní. V množství 10,33 log KTJ/ml narostl izolát 3II. Počty tohoto izolátu po dobu sledování (243 dní) neklesly pod množství 8,96 log KTJ/ml. Izolát 5VB byl nalezen ve vzorku mléka v počtu 8,73 log KTJ/ml a přežíval asi 68 dní. Kmen 5IIA přežíval v mléce déle než 68 dní, který byl po prokysání mléka detekován v množství 10,05 log KTJ/ml.

Graf č. 15: Růst a přežívání bifidobakterií izolovaných z jehněčích výkalů kozím mléce



*nt- kontaminace

7. Diskuse

Prostředí střevní mikrobioty u lidí i zvířat je osídleno mnoha různými mikroorganismy. Složení mikrobioty trávicího traktu ovlivňuje zdraví a podporuje dobrý zdravotní stav lidí i zvířat. Rod *Bifidobacterium* zahrnuje i některé druhy, které se běžně používají jako probiotika. Tyto bakterie mají mnoho pozitivních přínosů pro hostitele. Mezi hlavní zdravotní a terapeutické účinky patří prevence proti průjemovým onemocněním a zvýšení imunity proti patogenům způsobující střevní infekce. Dále stabilizují střevní slizniční bariéru, zvyšují prevenci proti rakovině tlustého střeva a zlepšují využití laktózy (Kalailasapathy et Chin, 2000). Bifidobakterie jsou dominantní a přirozenou složkou gastrointestinálního traktu lidí i zvířat, z tohoto důvodu jsou vybírány jako probiotické kultury, které mohou být zaočkovány do mléčných kysaných výrobků či do samotného mléka. Probiotické mikroorganismy by měly splňovat nejen mikrobiologicko-bezpečnostní požadavky ale i požadavky technologické. Mezi technologická kritéria se řadí: dobré senzorycké vlastnosti, rezistence vůči bakteriofágům, životaschopnost během procesu výroby a jejich stabilita v produktu během skladování (Rada et al., 2006). Z pohledu výrobců je nejdůležitější, aby probiotické mikroorganismy přežily po dobu expirace v zákonem daném množství, které udává minimální množství bifidobakterií v mléčných produktech v počtu 10^6 KTJ/ml(g). Probiotické a technologické vlastnosti bifidobakterií jsou kmenově specifické v současné době se pro výrobu mléčných kysaných výrobků využívá jen úzké množství kmenů.

Cílem této bakalářské práce bylo testování schopnosti růstu bifidobakterií v různých druzích mlék vybraných přežvýkavců. Dalším cílem bylo sledování přežívání bakterií v tomto prostředí. Testované kmeny bifidobakterií byly izolovány z výkalů telat a jehňat, ze stolice kojenců a dospělých jedinců a z probiotického výrobku. Tyto kmeny byly zaočkovány do kravského, ovčího a kozího mléka. V případě bifidobakterií izolovaných z telecích výkalů testovaných, bylo po 48 hodinové kultivaci zjištěno, že tyto kmeny narostly nejlépe v kravském mléce a to v průměru $8,12 \pm 0,63$ log KTJ/ml. Výsledky také ukázaly, že nejdéle přežíval v kravském mléce kmen 805III2 (*Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis*) a to déle než 243 dní (déle než 34 týdnů). Tento kmen přežíval nejdéle a po stejnou dobu i v mléce kozím. Stejnou dobu přežíval také kmen 25II (*Bifidobacterium thermophilum*) v ovčím mléce. Podle Kawasaki et. al. (2006) animální druh *Bifidobacterium thermophilus* odoláva přítomnosti kyslíku v prostředí a je schopný přežít i při 20% koncentraci kyslíku. Tato vlastnost může být důvodem, že i kmeny druhu *Bifidobacterium thermophilum* testované

v této práci vykazovaly dobrou schopnost přežívat v kysaném mléce, kam během skladování mohl pronikat kyslík. V počtu vyšším než 10^6 KTJ/ml přežíval nejdéle telecí izolát 805III2 v kozím mléce a to po celou dobu sledování, tedy déle než 243 dní. Dále také v ovčím mléce, kmen 25II přežíval dlouho a to 89 dní v počtu vyšším než 10^6 KTJ/ml. V mléce kravském přežívaly izoláty v tomto počtu minimálně po dobu 47 dní vyjma kmenu 25II, který v počtu 10^6 KTJ/ml přežíval pouze 14 dní. V prostředí kravského mléka nejdéle, v zákonem daném počtu, přežívaly izoláty 23I2 (*Bifidobacterium choerinum*), 805III2 (*Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis*) a 22II (*Bifidobacterium longum* ssp. *suus*) a to po dobu 146 dní. V tomto substrátu mají největší potenciál splňovat všechna technologická kritéria kmény 22II, 805III2 a 23I2. Expirační doba u jogurtových výrobků zpravidla bývá 30 dní. Datum použitelnosti si stanoví výrobce (Zákon 110/1997Sb.). Po dobu 30 dní přežívala většina izolátů, tudíž je z technologického hlediska většina vhodná k použití do probiotických výrobků.

Jako další byly testovány kmény bifidobakterií izolovaných z jehněčích výkalů. Při vyhodnocování výsledků bylo zjištěno, že tyto kmény mají nejlepší schopnost narůst ve všech vybraných mlékách. Průměr nárůstu jehněčích izolátů v kravském mléce byl v hodnotě $9,27 \pm 0,25$ log KTJ/ml. V průměru nejlépe narostly izoláty v mléce kozím, kde byly detekovány v počtu $9,49 \pm 1,33$ log KJT/ml. Překvapivě nejméně v porovnání s ostatními mléky tyto izoláty narostly v mléce ovčím, kde po kultivaci dosahovaly průměrné hodnoty $9,03 \pm 0,44$ log KTJ/ml. Nejdéle přežíval kmen 3II (*Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis*) v mléce kozím, a to déle než 243 dní v počtu vyšším než 10^8 KTJ/ml. V kravském mléce přežíval tento kmen 89 dní, také v počtu vyšším než 10^6 KTJ/ml. Dalším jehněčím izolátem, byl kmen 14V (*Bifidobacterium choerinum*), který v substrátu ovčího mléka přežíval v deklarovaném počtu nejdéle a to 89 dní. V případě substrátu mléka ovčího a kravského je nejméně vhodný kmen 9VIB (*Bifidobacterium pseudocatenulatum*), který zde přežíval pouze 14 dní.

V případě bifidobakterií izolovaných z lidské stolice a probiotika, výsledky ukázaly, že tyto bifidobakterie jsou schopné prokysat mléko. V prostředí kravského mléka byly po 24 hodinové kultivaci schopné nejlépe narůst, a to v průměrné hodnotě $8,94 \pm 0,65$ log KTJ/ml. V substrátu mléka ovčího byla průměrná hodnota nárůstu po kultivaci $8,07 \pm 0,98$ log KTJ/ml. Ve vzorku mléka kozího byl detekován průměrně nejnižší nárůst a to $8,02 \pm 2,68$ log KTJ/ml. Ačkoli izoláty bifidobakterií z lidské stolice a probiotika byly nejméně schopné nárůstu v prostředí kozího mléka, přežívaly zde nejlépe. Kmény EV2 (*Bifidobacterium bifidum*), který byl izolovaný ze stolice dospělého, JOV (*Bifidobacterium bifidum*), který byl izolovaný ze stolice kojence a DAN (*Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*), který byl izolovaný z mléčného výrobku, prokázaly nejlepší schopnost přežívání v kozím mléce, déle

než 68 dní. Avšak v počtu vyšším než 10^6 KTJ/ml, přežíval nejlépe kmen DAN (*Bifidobacterium animalis* ssp.*lactis*) a to po celou dobu sledování, tedy déle než 243 dní. Druhým nejdéle přežívajícím v deklarovaném počtu byl kmen JOV (*Bifidobacterium bifidum*) a to 68 dní. V ovčím mléce se jako nejlepší kmen prokázal DAN (*Bifidobacterium animalis* ssp.*lactis*), přežíval zde 89 dní v počtu vyšším než 10^6 KTJ/ml. V kravském mléce, které je nejčastějším substrátem užívaným k výrobě probiotických produktů, je většina kmenů lidského původu testovaných v této práci schopná přežít jen krátce a to po dobu kratší než 14 dní. Tedy nejsou schopné plnit technologický požadavek a tím je přežít v počtu 10^6 KTJ/ml po celou dobu expirace. Tento požadavek splnil v kravském mléce pouze kmen DAN, který přežíval déle než 47 dní. Tento kmen byl izolován z jogurtu Danone, proto je tento kmen již adaptovaný na laboratorní podmínky a mléčné prostředí. Podle Maus a Ingham (2003) existují druhy, které jsou schopné přežít v kyselém prostředí, kde je hodnota pH 3,5. Mezi druhy, které jsou schopné snášet takto nízké pH jen řazen i kmen *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* (DAN), ale i ostatní animální kmeny testované v této práci. Díky této adaptaci na nízké pH je schopný v mléce přežít velmi dlouho. Toto tvrzení potvrzují i naše výsledky, kde kmen DAN, který je využíván pro lidskou výživu přežíval ve všech mlékách nejdéle v zákonem daném počtu. Podobně ovšem přežívaly i kmeny blízké příbuzného druhu *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis*, ale i ostatní kmeny animálního původu. Studie Tománková a kol. (2008) uvádí, že kmeny původně izolované z gastrointestinálního traktu lidí přežívají hůře v prostředí kravského mléka než kmeny animálního původu. Tato studie také uvádí, že kmen *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* izolovaný z jogurtu, který byl pravděpodobně původně izolován z gastrointestinálního traktu zvířat, přežíval v aerobních i anaerobních podmínkách skladování po dobu 12 týdnů v počtech vyšších než 10^6 KTJ/ml. V rámci této bakalářské práce proběhlo testování přežívání bifidobakterií izolovaných z lidské stolice a probiotika, výsledky se shodují s výše uvedeným tvrzením. Ačkoli byl po 24 hodinové kultivaci nejvyšší průměrný nárůst bifidobakterií lidského původu zachycen v kravském mléce, výsledky prokázaly lepší schopnost dlouhodobějšího přežívání v prostředí mléka kozího.

8. Závěr

Z výsledků vyplývá, že vhodným substrátem pro kmeny izolované z jehněčích výkalů je mléko kozí a kravské. Prostředí kravského mléka bylo nejvhodnější pro kmeny izolované z výkalů telat. Mléko kozí se ukázalo jako nejlepší pro růst a přežívání kmenů izolovaných z lidské stolice a probiotika. Z tohoto důvodu lze doporučit aplikaci probiotických bifidobakterií do kozího mléka.

9. Seznam literatury

Alexandros, A., Guillaume, H., Clairé, Y., Guillaume, Y., Gharbi, T., 2011: Simple method for detection of extremely diluted anti beta-casein antibodies from glass bead based receptors. *Talanta*, 8 (5), 632-637.

Avila, M., Ojcius, D. M., Yilmaz, O. 2009. The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA and Cell Biology*. 28. 405-411.

Benešová, L. a kol. 1996. *Potravinářství 94. Ústav zemědělských a potravinářských informací Praha*. 159 s.

Biavati, B., Mattarelli, P., 2012. Genus I. *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924, 472AL. In: De Vos, P. Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K. H. and Whitman, W. B. (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 5. The Actinobacteria, Part A*. Springer, New York, NY, USA, pp. 171-224.

Březina, P., Komár, A., Hrabě, J. 2001. *Technologie, zbožiznalství a hygiena potravin; Technologie, zbožiznalství a hygiena potravin živočišného původu*. Vyškov. ISBN 80-7231-079-8. 182 s.

Conway, P. L. 1995. Microbial ecology of the human large intestine, In: Gibson G. R., Macfarlane G. T. (eds.), *Human Colonic Bacteria*, Boca Raton, CRC Press. pp. 1-24.

Czerucka, D., Piche, T., Rampal, P. 2007. Review article: yeast as probiotics –*Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology and therapeutics*. 26 (6). 767-778 .

D'Aimmo, M. R., Modesto, M., Biavati, B. 2007. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal of Food Microbiology*. 115(1). 35–42.

Date, P. V., Samad, A., Devarajan, P. V. 2010. Freeze Thaw: A Simple Approach for Prediction of Optimal Cryoprotectant for Freeze Drying. *AAPS Pharmaceutical science and Technology*. 11(1). 304 – 313.

Desmond, C., Stanton, C., Fitzgerald, G. F., Collins, K., Ross, R. P. 2001. Environmental adaptation of probiotic Lactobacilli towards improved performance during spray drying. *International Dairy Journal*, 11. 801–808.

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

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

Donoghue, S., Kronfeld, D. S., Berkowitz, S. J. 1981. Vitamin A nutrition of the equine: growth, serum biochemistry and hematology. *Journal of Nutrition*. 111. 365–374.

Fantová, M. a kolektiv. 2010. Chov koz. Brázda. Praha. 2. 214 s.

FAO/WHO. 2002. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food [cit. 2015-01-19]. Dostupné z: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>.

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

Finegold, S. M., Sutter, V. L., Mathisen, G. E. 1983. Normal Indigenous Intestinal Flora. *Human Intestinal Microflora in Health and Disease*. Academic Press. New York. NY. USA .3–31.

Forman, L. 1996. *Mlékárenská technologie II.*, 2. vyd. Praha: Vysoká škola chemickotechnologická v Praze. ISBN 80-7080-250-2. 228 s.

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

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

- Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. 1998. Dairy Chemistry and Biochemistry. 1st ed. London: Blackie Academic & Professional. 1. ISBN 0-412-72000-0. 478.
- Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. 2003. Advanced dairy chemistry: Proteins. 3rd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 1. ISBN 0-306-47271-6. 603.
- Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. 2009. Advanced dairy chemistry: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents. 3rd ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 3. ISBN 978-0-387-84864-8. 778.
- Gajdůšek, S. 2003. Laktologie. Brno: Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. 78 s.
- Gerosa, S., Skoet, J. 2012. Milk availability: Trends in production and demand and medium-term outlook. Milk and dairy products in human nutrition. FAO, Rome. Dostupné z: <<http://www.fao.org/docrep/015/an450e/an450e00.pdf>>.
- Gilliland, S. E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters. 87(1–2). 175–188.
- Gomes, A. M. P., Malcata, F. X. 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, biochemical, technological and therapeutic properties relevant for use as probiotics. Trends Food Science Technology. 10. 139–157.
- Granato, D., Branco, G. F., Cruz, A. G., Faria, J. A. F., Nazzaro, F. 2010. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts and products. Comprehensive, Reviews in Food Science and Food Safety. 9. 292–302.
- Görner, F., Valík, L. 2004. Aplikovaná mikrobiológia potravín. Bratislava: Malé centrum. 1. 300 s.
- Hammes W. P., Hertel Ch. 2009. Genus *Lactobacillus* in in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, De Vos p., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H., Whitman W. B., (ed). Springer. 3. 465-483.

- Higashi, T., Shimada, K., Toyo'oka T. 2010. Advances in determination of vitamin D related compounds in biological samples using liquid chromatography–mass spectrometry: a review. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 878 (20). 1654–1661.
- Hopkins, M. J., Sharp, R., Macfarlane, G. T. 2001. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut*. 48. 198-205.
- Hoyles, L., Inganas, E., Falsen, E., Drancourt, M., Weiss, N., McCartney, A. L., Collins, M.D., 2002. *Bifidobacterium scardovii* sp nov., from human sources. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52. 995-999.
- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L., Collins, J. K. 1997. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. *International Journal of Food Microbiol.* 35. 1–27.
- Isolauri, E., Salminen, S., Ouwehand, A. C. 2004. Probiotics. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*. 18. 299-313.
- Jandal, J. M. 1996. Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. 22. 177 – 185.
- Kailasapathy, K., Chin, J. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotics organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* ssp. *Immunology and Cell Biology* 78. 80-88.
- Kanis, J. A., 1982. Vitamin-D metabolism and its clinical-application, *Journal of Bone and Joint Surgery-British*, 64 (5). 542–560.
- Kawasaki, S., Mimura, T., Satoh, T., Takeda, K. and Niimura, Y., 2006. Response of the microaerophilic *Bifidobacterium* species, *B. boum* and *B. thermophilum*, to oxygen. *Applied and Environmental Microbiology*. 72. 6854-6858.
- Kim, H. B., Borewicz, K., White, B. A., Singer, R. S., Tu, Z. J., Isaacson, R. E. 2011. Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the feces of commercial pigs. *Veterinary Microbiology*. 153. 124-133.

- Lee, Y. K., Salminen, S. 2009. Handbook of probiotics and prebiotics (2nd ed.). John Wiley and Sons, Inc. ISBN 978-0-470-13544-0. 14-24.
- Leser, T. D., Molbak, L. 2009. Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environmental Microbiology*. 11. 2194-2206.
- Lilly, D.M., Stillwell, R.H. 1965. Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*. 147. 747–748.
- Lourens-Hattingh, A., Viljoen, B. C. 2001. Yogurt as probiotic carrier food. *International Dairy Journal*, 11(1–2). 1–17.
- Marteau, P.R., de Vrese, M., Cellier, C. J., Schrezenmeir, J. 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics, *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73. 430–436.
- Maus, J.E. Ingham, S.C., 2003. Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold- and acid- tolerance of bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 95. 146-154.
- Mohammadi, R., Mortazavian, A. M. 2011. Technological aspects of prebiotics in probiotic fermented milks. *Food Reviews International*. 27. 192–212.
- Nařízení evropského parlamentu a rady (ES) č. 1924/2006, o výživových a zdravotních tvrzeních při označování potravin, 2006 [cit. 2015-01-20]. Dostupné z: < <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:012:0003:0018:CS:PDF>>
- Oberman, H., Libudzisz, Z. 1998. Fermented milks. In: B. J. B. Wood (Ed.), *Microbiology of fermented foods*, London, Blackie Academic and Professional. pp. 308–350.
- Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M., Haenlein, G. F. W. 2007. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*. 68. 88-113.
- Parker, R.B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story, *Animal Nutrition and Health*. 29. 4–8.

- Picard, C., Ioramont, J., Francois, A., Robinson, T., Neant, F., Matuchansky, C. 2005. Bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 22. 495–512.
- Prokš, J. 1969. *Mlékařství*. Státní nakladatelství technické literatury Praha, 1. ISBN 04-820-82. 224 s.
- Rada, V., Vlková, E., Nevoral, J., Trojanová, I. 2006. Comparison of bacterial flora and enzymatic activity in faeces of infants and calves. *FEMS Microbiology Letters*. 258(1). 25-28.
- Rasic, J. L. 2003. Microflora of the intestine probiotics. In: B. Caballero, L. Trugo, P. Finglas (Eds.), *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Oxford, Academic Press. pp. 3911–3916.
- Ross, R. P., Desmond, C., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. 2005. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *Journal of Applied Microbiology*. 98. 1410–1417.
- Rush, V., Ottendorfer, D., Zimmermann, K., Gebauer, F., Schödl, W., Nowak, P., Skarabis, H., Kunze, R. 2001. Results of an open, non-placebo controlled pilot study investigating the immunomodulatory potential of autovaccine. *Arzneimittelforschung/Drug Research*. 51(2). 690 – 697.
- Salminen, A., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassart, D., de Vos, W.M., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E., Mattila-Sandholm, T. 1998. Demonstration of safety of probiotics : A review. *International Journal of Food Microbiology*. 44. 93–106.
- Salminen, S., Isolauri, E., Salminen, E. 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: Successful strains and future challenges, *Antonie van Leeuwenhoek*, 70. 347–358.
- Sandine, W. E., Vedamuthu, E. R. 1980. Lyophilization of bacteria. *United States Patent*. 4. 205. 132.
- Saxelin, B., Grenov, U., Svensson, R., Fonden, R., Reniero, T., Mattila-Sandholm, T. 1999. The technology of probiotics. *Trends in Food Science and Technology*. 10. 387–392.

- Sgorbati, B., Biavati, B., Palenzona, D. 1995. The Genus *Bifidobacterium*. In: B.J.B. Wood, Holzapfel, W.H.(Eds.), The Lactic Acid Bacteria, Chapman and Hall, London, 2. pp. 279–306.
- Simpson, P.J., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F. and Stanton, C. 2004. *Bifidobacterium psychraerophilum* sp nov. and *Aeriscardovia aeriphila* gen. nov., sp nov., isolated from a porcine caecum. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 54. 401–406.
- Smetana, P., Hlaváček, J., Samková, E., Rozsýval, R., 2009: Faremní zpracování mléka v ekologickém zemědělství. Bioinstitut, Olomouc, 63 s.
- Soccol, C.R., Porto de Souza Vandenberghe, L., Rigon Spier, M., Bianchi Pedroni Medeiros, A., Tiemi Yamaguishi, C., De Dea Lindner, J., Pandey, A. and Soccol, V.T. 2010. The potential of probiotics: a review. Food Technology and Biotechnology. 48. 413–434.
- Stanton, C., Desmond, C., Coakley, M., Collins, J. K., Fitzgerald, G., & Ross, R. P. 2003. Challenges facing development of probiotic containing functional foods. In: Farnworth, E. R. (Ed.), Handbook of functional fermented foods . Boca Raton, FL: CRC Press. pp. 27–58.
- Steer, T., Carpenter, H., Tuohy, K., Gibson, R. 2000. Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro and prebiotics. Nutrition Research Reviews. 13. 229 – 254.
- Sveje, M. 2007. Probiotic and prebiotics – improving consumer health through food consumption. Nutracos. 28–31.
- Tománková, E., Homutová, I., Šmehilová, M., Dubná, S., Rada, V. 2008. Přežívání bifidobakterií v kravském mléce. Sborník přednášek semináře mléko a sýry. Praha. 1-4.
- Tripathi, M. K., Giri, S. K. 2014. Probiotics functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. Journal of functional foods. 9. 225 – 241.
- Velišek, J., Hajšlová, J. 2009. Chemie potravin. Osis, Havlíčkův Brod, ISBN 978-80-86659-15-2 602 s.
- Ventura, M., Perozzi, G. 2011. Probiotic bacteria and huma gut microbiota. Genes and Nutrition. 6. 203–204.

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

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

Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 77/2003Sb. kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. (online) [cit. 2015-02-21]. Dostupné z <http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_vyhlaska-2003-77-potravinovy.html>

Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 289/2007Sb. o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropských společenství. (online) [cit. 2014-11-15]. Dostupné z <http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_vyhlaska-2007-289-veterinaripece.html>

Yuki, N., Shimazaki, T., Kushiro, T., Watanabe, K., Uchida, K., Yuyama, T., Morotomi, M. 2000. Colonization of the stratified squamous epithelium of the nonsecreting area of horse stomach by lactobacilli. *Applied Environmental Microbiology*. 66. 5030-5034.

Zákon 110/1997Sb. o potravinách a tabákových výrobcích. (online) [cit. 2015-03-28]. Dostupné z: <<http://www.szpi.gov.cz/docDetail.aspx?docid=1006039>>

10. Přílohy

Příloha č. 1. Přežívání bifidobakterií v kravském mléce. Hodnoty jsou uvedené v log KTJ/ml

testované kmeny bifidobakterií	Počet dní od prokysání mléka										
	0	14	26	47	68	89	120	146	181	210	243
EV2	9,11	4,60	4,60	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
9VIB	9,63	6,06	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
25II	7,02	6,38	3,96	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
DAN	9,16	7,56	7,56	7,02							
BV	7,69	5,64	5,64	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
17III1	8,37	8,26	7,86	7,43	7,23	5,91	4,59	3,55	2,00	2,00	2,00
22II	9,13	8,92	8,85	8,75	8,60	8,55	8,22	6,98	4,34	2,00	2,00
3II	9,48	9,44	9,33	8,60	8,47	7,23	4,43	3,57	2,00	2,00	2,00
17III2	9,01	8,49	8,13	8,11	4,19	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
5VB	9,14	9,13	7,19	4,28	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
TP1	9,63	5,20	5,20	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
BM	8,98	8,07	8,07	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
14V	9,09	8,62	8,35	7,58	6,56	5,11	2,95	2,00	2,00	2,00	2,00
23I2	8,94	8,21	8,21	8,07	7,98	7,90	7,74	7,39	5,71	2,00	2,00
JOV	9,08	5,96	5,96	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
805III2	8,10	7,98	7,91	7,89	7,89	7,26	6,58	6,48	4,88	4,62	2,70
5IIA	9,03	9,29	8,79	8,50	7,62	6,90	4,48	2,25	2,00	2,00	2,00
7VIA	9,11	8,25	8,36	6,98	5,64	3,60	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00

Příloha č. 2. Přežívání bifidobakterií v ovčím mléce. Hodnoty jsou uvedeny v log KTJ/ml

testované kmeny bifidobakterií	Počet dní od prokysání mléka										
	0	14	26	47	68	89	120	146	181	210	243
EV2	7,43	4,56	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
9VIB	8,37	5,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
25II	8,44	7,71	6,54	6,46	6,41	6,16	5,77	5,44	4,75	4,44	4,34
DAN	9,08	8,99	8,65	8,43	8,39	7,69	5,26	4,35	3,16	2,38	2,00
BV	8,72	5,60	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
17III1	7,79	7,55	6,18	5,37	3,74	2,15	3,34	2,70	2,00	2,00	2,00
22II	4,00	3,30	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
3II	9,09	9,03	8,94	7,40	5,00	2,96	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
17III2	9,80	9,22	7,92	6,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
5VB	8,90	8,65	7,83	5,71	3,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
TP1	8,91	5,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
BM	7,63	7,00	5,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
14V*	8,91	8,71	8,44	8,32	8,24	7,46	nt	nt	nt	nt	nt
23I2	9,22	8,92	8,86	7,51	6,34	5,04	3,79	2,00	2,00	2,00	2,00
JOV	6,65	4,00	2,30	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
805III2	9,37	9,21	8,96	7,42	5,78	4,95	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
5IIA	9,69	9,06	9,04	8,64	6,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
7VIA	9,24	9,02	8,53	7,46	7,07	5,54	5,00	2,00	2,00	2,00	2,00

*nedetekováno

Příloha č. 3. Přežívání bifidobakterií v kozím mléce. Hodnoty jsou uvedeny v log KTJ/ml

testované kmeny bifidobakterií	Počet dní od prokysání mléka										
	0	14	26	47	68	89	120	146	181	210	243
EV2	9,42	9,32	4,73	5,07	5,42	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
9VIB	8,90	8,64	8,36	7,83	7,37	6,16	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
25II	7,44	6,90	6,56	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
DAN	10,09	9,76	9,74	9,54	9,45	9,36	9,22	9,18	9,06	9,04	9,04
BV	4,55	4,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
17III1	4,00	2,95	2,61	2,30	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
22II	8,92	8,72	8,70	6,77	6,34	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
3II	10,33	10,04	9,86	9,82	9,79	9,71	9,51	9,41	9,40	9,22	8,96
17III2	5,53	5,86	5,77	4,98	4,51	3,80	2,60	2,00	2,00	2,00	2,00
5VB	8,73	7,74	7,56	6,59	5,30	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
TP1	4,90	4,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
BM	8,37	7,90	3,02	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
14V	8,36	7,62	5,89	5,56	4,30	nt	nt	nt	nt	nt	nt
23I2	9,96	9,79	9,55	9,31	9,18	8,99	nt	nt	nt	nt	nt
JOV	10,79	9,81	9,77	8,52	6,43	4,92	4,39	2,00	2,00	2,00	2,00
805III2	11,04	10,03	10,02	9,95	9,82	9,82	9,81	9,69	9,39	9,29	9,22
5IIA	10,05	9,52	9,30	6,00	4,26	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
7VIA	11,32	10,00	9,39	8,96	7,37	3,76	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00

*nedetekováno