

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Izolace bakterií mléčného kvašení a stanovení jejich
fermentačních vlastností**

Diplomová práce

Anastázie Paclová

Kvalita a zpracování zemědělských produktů

Ing. Roman Švejstl, Ph.D.

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Izolace bakterií mléčného kvašení a stanovení jejich fermentačních vlastností" jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 24. 7. 2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala mému vedoucímu práce Ing. Romanu Švejtilovi, Ph.D. za odborné vedení práce, trpělivost, všechny připomínky k mé diplomové práci a za všechny zodpovězené dotazy (převážně k mé praktické části diplomové práce). Dále bych mu ráda poděkovala za čas, který mi věnoval a také za rychlou komunikaci. Velký dík patří také mně velmi blízké osobě, která při mně stála v průběhu celého studia a její podpora pro mě znamenala mnoho.

Izolace bakterií mléčného kvašení a stanovení jejich fermentačních vlastností

Souhrn

Cílem této práce bylo porovnat fermentační vlastnosti bakterií mléčného kvašení izolovaných z tradičního domácího kysaného mléčného produktu ze střední Asie s bakteriemi mléčného kvašení typickými pro produkty komerčně dostupné na českém trhu. Z gruzínského výrobku byly vyizolovány čtyři kultury, které byly pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie identifikovány jako *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a tyto izoláty byly porovnány se čtyřmi totožnými druhy izolovanými z různých českých výrobků. Bylo provedeno: stanovení titrační a aktivní kyselosti, množství kyseliny mléčné a také stanovení počtu mikroorganismů kultivačně.

V první části experimentu byly testovány streptokoky ve formě čistých kultur, ve druhé a třetí části experimentu v symbiotické formě s *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, který je spolu se *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* součástí běžné jogurtové kultury. Jako fermentační médium bylo zvoleno polotučné UHT mléko (v první i druhé části experimentu) a polotučné UHT mléko s přídavkem polotučného sušeného mléka (ve třetí části experimentu).

Kysací schopnosti vybraných izolátů byly hodnoceny pomocí titrační kyselosti (metodou dle Soxhlet-Henkela), aktivní kyselosti (pH metrem a reflektometrem) a stanovení obsahu kyseliny mléčné (reflektometrem) ve vybraných hodinách. Zároveň bylo u všech vzorků v průběhu pokusu kultivačně stanoveno množství mikroorganismů.

Ze sledovaných gruzínských vzorků vycházely nejlépe vzorky G3 a G6 ve všech částech experimentu. Zároveň se u všech gruzínských vzorků potvrdilo, že hodnoty titrační kyselosti týchž vzorků, byly daleko vyšší v zahuštěném mléce. Pro posouzení obsahu kyseliny mléčné by bylo vhodné provést opakovaná měření skrz přesnější metody (např. HPLC, NMR). U vzorku G12 vycházela značně vyšší tolerance k nízkým hodnotám pH než u ostatních vzorků, kde i přesto, že výsledné pH bylo 3,90, počet streptokoků zůstal u vzorku G12 stejný – v řádu 10^7 KTJ/ml.

V rámci statistického vyhodnocení dvou sledovaných skupin (skupina 1 reprezentující izoláty streptokoků z Gruzie versus skupina 2 reprezentující izoláty získané na území ČR), nebyly rozdíly v kysacích schopnostech bakterií mléčného kvašení statisticky významné ($P > 0,05$) nebo tomu nebylo možné přisuzovat významnou váhu z hlediska doporučeného opakování měření u některých vzorků. Z tohoto hlediska byla nulová hypotéza přijata, vzorky se mezi sebou významně nelišily. Určité rozdíly mezi gruzínskými vzorky ale pozorovány byly, ať už z hlediska titrační kyselosti, tak z hlediska růstu v mléce. Bylo by vhodné do budoucna tyto izoláty zidentifikovat pomocí molekulárně-genetických metod.

Klíčová slova: bakterie mléčného kvašení, kysaný mléčný výrobek, streptokoky, laktobacily

Isolation of lactic acid bacteria and analysis of their fermentation properties

Summary

The aim of this thesis was to compare the fermentation properties of lactic acid bacteria isolated from traditional home fermented milk product from Central Asia with lactic acid bacteria typical for products commercially available on the Czech market. Four cultures were isolated from the Georgian product and identified by MALDI-TOF mass spectrometry as *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* and these were compared with four identical species isolated from different Czech products. In this work was measured titration acidity, pH and amount of lactic acid and the numbers of microorganisms were determined by cultivation.

In the first part of the experiment, streptococci were tested in the form of pure cultures, in the second and third parts of the experiment with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, which together with *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* is part of a common yogurt culture. Half-fat UHT milk (in the first and second part of the experiment) and half-fat UHT milk with the addition of half-fat milk powder (in the third part of the experiment) were chosen as fermentation medium.

The fermentation capabilities of selected isolates were evaluated by titratable acidity (Soxhlet-Henkell method), active acidity (by pH meter and reflectometer) and determination of lactic acid content (by reflectometer) at selected hours. During the experiment, were at the same time determined cultivation number of microorganisms in all samples.

Samples G3 and G6 had the best results of the observed Georgian samples in all parts of the experiment. At the same time, it was confirmed for all Georgian samples that the titratable acid values of the same samples were much higher in the thickened milk. To assess the lactic acid content, it would be appropriate to perform repeated measurements through more accurate methods (eg HPLC, NMR). The G12 sample showed a much higher tolerance to lower pH values than the other samples, where even the resulting pH was 3.90, the number of streptococci remained the same in the G12 sample - in an amount of 107 CTU / ml.

Within the statistical evaluation of two monitored groups (group 1 representing streptococcal isolates from Georgia versus group 2 representing isolates obtained in the Czech Republic), the differences in fermentation abilities of milk fermentation bacteria were not statistically significant ($P > 0.05$) or it was not significant in terms of the recommended repetition of measurements for some samples. From this point of view, the null hypothesis was rejected. The samples did not significantly differentiate from each other. However, some differences between the Georgian samples were observed in titratable acidity and growth of bacteria in milk. In the future it would be appropriate to identify these isolates by using molecular genetic methods.

Keywords: lactic acid bacteria, fermented milk products, streptococci, lactobacilli

Obsah

1	Úvod	1
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	2
3	Literární rešerše	3
3.1	Obecná charakteristika bakterií mléčného kvašení	3
3.2	Taxonomická klasifikace BMK	4
3.3	Morfologie a charakteristika jednotlivých rodů	6
3.3.1	Čeleď Lactobacillaceae	6
3.3.1.1	Rod Lactobacillus	6
3.3.1.2	Rod Pediococcus	8
3.3.2	Čeleď Aerococcaceae	9
3.3.3	Čeleď Carnobacterium	9
3.3.3.1	Rod Carnobacterium	10
3.3.4	Čeleď Enterococcaceae	10
3.3.4.1	Rod Enterococcus	10
3.3.5	Čeleď Leuconostocaceae	11
3.3.5.1	Rod Leuconostoc	12
3.3.6	Čeleď Streptococcaceae	13
3.3.6.1	Rod Streptococcus	13
3.3.6.2	Rod Lactococcus	14
3.3.7	Čeleď Bifidobacteriaceae	15
3.3.7.1	Rod Bifidobacterium	16
3.3.8	Shrnutí	16
3.4	Fermentace sacharidů bakteriemi mléčného kvašení	17
3.4.1	Homofermentativní rozklad	18
3.4.2	Heterofermentativní rozklad	21
3.5	Proteolytická aktivita	24
3.6	Lipolytická aktivita	27
3.7	Další významné vlastnosti BMK či jejich metabolitů	29
3.7.1	Genové inženýrství	30
3.7.2	Kyselina mléčná a její využití	31
3.7.3	Kyselina polymléčná	32
3.7.4	Protektivní funkce	32
3.7.5	Probiotická funkce	33
3.8	FMV a jejich význam ve výživě člověka	36

3.8.1	Čisté mlékařské kultury	37
3.8.2	Výroba jogurtu.....	38
4	Metodika	41
4.1	Použité kmeny.....	41
4.1.1	Izolace a příprava všech použitých kmenů.....	42
4.2	Výběr a příprava mléka.....	42
4.2.1	První část experimentu – příprava infúzek pro stanovení kysacích schopností streptokoků	43
4.2.2	Druhá část experimentu – příprava infúzek pro stanovení kysacích schopností streptokoků s již přidanými laktobacily	43
4.2.3	Třetí část experimentu – příprava infúzek pro stanovení kysacích schopností streptokoků s již přidanými laktobacily v zahuštěném mléce	43
4.3	Příprava kysaného mléčného výrobku.....	43
4.4	Stanovení růstu mikroorganismů v průběhu kysání	44
4.5	Stanovení obsahu kyseliny mléčné.....	44
4.6	Stanovení aktivní a titrační kyselosti.....	44
4.6.1	Stanovení aktivní kyselosti.....	44
4.6.2	Stanovení titrační kyselosti.....	45
4.6.2.1	Příprava vzorků před stanovením titrační kyselosti	45
4.6.2.2	Příprava titrační aparatury a získání faktoru	45
4.6.2.3	Příprava srovnávacího roztoku.....	45
4.6.2.4	Stanovení titrační kyselosti	45
4.7	Statistické vyhodnocení	46
5	Výsledky.....	47
5.1	První část experimentu – výsledky stanovení kysacích schopností streptokoků	47
5.1.1	Výsledky stanovení hodnoty pH.....	47
5.1.2	Výsledky stanovení titrační kyselosti	48
5.1.3	Výsledky stanovení kyseliny mléčné	49
5.1.4	Výsledky stanovení počtu MO	50
5.1.5	Výsledky statistického vyhodnocení mezi sledovanými skupinami	51
5.1.5.1	Výsledky stanovení rozdílů pH hodnot mezi dvěma skupinami	51
5.1.5.2	Výsledky stanovení rozdílů titrační kyselosti mezi sledovanými skupinami.....	52
5.1.5.3	Výsledky stanovení rozdílů v obsahu kyseliny mléčné mezi sledovanými skupinami.....	52
5.1.5.4	Výsledky stanovení rozdílů v počtu MO mezi sledovanými skupinami.....	52

5.2 Druhá část experimentu – výsledky stanovení kysacích schopností streptokoků s již přidanými laktobacily	53
5.2.1 Výsledky stanovení hodnoty pH	53
5.2.2 Výsledky stanovení titrační kyselosti	54
5.2.3 Výsledky stanovení kyseliny mléčné	55
5.2.4 Výsledky stanovení růstu MO v průběhu kysání	56
5.2.5 Výsledky statistického vyhodnocení mezi sledovanými skupinami	58
5.2.5.1 Výsledky stanovení rozdílů pH hodnot mezi dvěma skupinami.....	58
5.2.5.2 Výsledky stanovení rozdílů titrační kyselosti mezi sledovanými skupinami	59
5.2.5.3 Výsledky stanovení rozdílů v obsahu kyseliny mléčné mezi sledovanými skupinami	59
5.2.5.4 Výsledky stanovení rozdílů v počtu MO mezi sledovanými skupinami	60
5.3 Třetí část experimentu – výsledky stanovení kysacích schopností streptokoků s již přidanými laktobacily v zahuštěném mléce	60
5.3.1 Výsledky stanovení hodnoty pH	60
5.3.2 Výsledky stanovení titrační kyselosti	61
5.3.3 Výsledky stanovení kyseliny mléčné	62
5.3.4 Výsledky stanovení růstu MO v průběhu kysání	63
5.3.5 Výsledky statistického vyhodnocení mezi sledovanými skupinami	64
5.3.5.1 Výsledky stanovení rozdílů pH hodnot mezi dvěma skupinami.....	64
5.3.5.2 Výsledky stanovení rozdílů titrační kyselosti mezi sledovanými skupinami	64
5.3.5.3 Výsledky stanovení rozdílů v obsahu kyseliny mléčné mezi sledovanými skupinami	65
5.3.5.4 Výsledky stanovení rozdílů v počtu MO mezi sledovanými skupinami	65
6 Diskuze	66
6.1 Aktivní a titrační kyselost.....	66
6.2 Obsah kyseliny mléčné.....	69
6.3 Počet mikroorganismů při stanovení kysacích schopností BMK	70
7 Závěr.....	72
8 Literatura	73

1 Úvod

Termín „bakterie mléčného kvašení“ byl poprvé použit na počátku 20. století pro bakterie schopné srážet mléko. Historicky hrály tyto bakterie převažující roli v technologickém využití v rámci potravinářského průmyslu nad ostatními potravinářsky využívanými mikroorganismy. Důležitou vlastností bakterií mléčného kvašení (BMK) je schopnost fermentovat jednoduché sacharidy za vzniku charakteristického produktu – kyseliny mléčné a dalších produktů zastoupených v menším množství.

Rody, které jsou typické pro BMK jsou například rod *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*. Je důležité zmínit i rod *Bifidobacterium*, který někteří autoři řadí do BMK, ačkoliv se liší metabolismem. Jelikož u rodu *Bifidobacterium* dochází k fermentaci sacharidů za vzniku směsi kyseliny octové a mléčné (v poměru 3:2). Obecně se tyto bakterie dělí na základě hlavních a vedlejších produktů fermentace na homofermentativní a heterofermentativní druhy. Některé druhy BMK jsou značně acidotolerantní a také tolerantní ke žluči, díky čemuž jsou i významné pro potravinářský průmysl.

Fermentace je z historického hlediska jedna z nejstarších metod, která byla (a stále je) využívána pro přirozenou konzervaci potravin. V minulosti byla výroba fermentovaných potravin založená spíše na spontánní fermentaci původní tzv. autochtonní mikrobiotou. V současnosti se průmyslová výroba samozřejmě neobejde bez konkrétních a předem připravených mikrobiálních kultur. Nejčastěji používaná jogurtová kultura obsahuje tyto druhy bakterií: *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, a to jak pro výrobu jogurtů, tak i pro výrobu jogurtových mlék. Velmi významná je také smetanová a acidofilní kultura. Technologická funkce BMK souvisí se schopností přeměňovat substráty (sacharidy, bílkoviny, lipidy) na metabolity, které ovlivňují chuť, vůni a konzistenci potravin. V rámci přeměny substrátu si významnou pozornost u těchto bakterií získala i proteolytická aktivita, díky které je podporován růst BMK v mléčných výrobcích a zároveň podporuje rozvoj organoleptických vlastností FMV a zvyšuje i biologickou dostupnost živin. Oproti tomu lipolytická aktivita je u těchto bakterií mnohem méně prostudovaná. Mezi dva významné lipolytické enzymy patří esterázy a lipázy, které přispívají k vývoji aroma a chuti.

Výskyt BMK se obecně pojí s prostředím bohatým na živiny, jako jsou živočišné potraviny (maso, mléko) nebo rostliny (traviny, zelí, olivy). Běžně se používají pro zkvašování potravin i krmiv. BMK jsou považovány za mikroorganismy přinášející řadu benefitů. Některé druhy jsou považovány i za zdraví prospěšné – tzv. probiotické bakterie (zvláště z rodu *Lactobacillus*). BMK hrají důležitou roli v několika průmyslových odvětvích po celém světě a jsou velmi hojně používány. Nejdůležitější uplatnění z hlediska fermentace je v mlékárenském průmyslu (zahrnuje ohromné množství FMV). Další v řadě je průmysl fermentovaných masných či rostlinných produktů. BMK se uplatňují i v řadě dalších průmyslových aplikacích. Typickým příkladem může být výroba kyseliny mléčné, produkce metabolitů podílejících se na vývoji příchutí a textury výrobků (viz exopolysacharidy), zdravotnické prostředky, antimikrobiální peptidy (AMP) a probiotické produkty. Významná je také protektivní funkce BMK, která je spojena s produkcí antimikrobiálně aktivních metabolitů.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Bakterie mléčného kvašení přeměňují živiny na metabolity typicky obsažené v kysaných mléčných výrobcích. Pro každý výrobek jsou charakteristické určité druhy a kmeny bakterií. Předpokládáme, že různé kmeny bakterií mléčného kvašení mohou mít odlišné fermentační vlastnosti, ať už z hlediska rychlosti kysání, tak i výsledné titrační a aktivní kyselosti mléčného produktu.

Cílem této práce je porovnat fermentační vlastnosti bakterií mléčného kvašení typických pro komerční produkt z českého trhu ve srovnání s bakteriemi z tradičního domácího produktu ze střední Asie.

3 Literární rešerše

3.1 Obecná charakteristika bakterií mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení jsou jedinečnou skupinou mikroorganismů, které se vyvíjely skrz využití těchto bakterií člověkem od počátku zemědělských postupů, domestikace zvířat a také během hledání nových postupů konzervace potravin, zlepšení stravitelnosti a organoleptických vlastností. Historicky tyto bakterie hrály v našich potravinách převažující roli v rámci technologického využití nad ostatními potravinářsky využívanými mikroorganismy (Gabrovská et al. 2019).

Termín „bakterie mléčného kvašení“ byl poprvé použit na počátku 20. století pro bakterie schopné srážet mléko. Následně byla nalezena souvislost mezi srážením mléka a tvorbou kyseliny mléčné. Ani dnes však neexistuje jednoznačná a jednoduchá definice pro bakterie mléčného kvašení (BMK). Existuje však výčet charakteristických vlastností těchto bakterií, který je shrnut v této kapitole. BMK jsou mikroorganismy, které jsou tvořeny jednou buňkou a jsou řazeny mezi prokaryota. Rody, které jsou typické pro BMK jsou například rod *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*. Je důležité zmínit i rod *Bifidobacterium*, který někteří autoři řadí do BMK, ačkoliv se liší metabolismem. Důležitou vlastností BMK je schopnost fermentovat jednoduché sacharidy za vzniku charakteristického produktu – kyseliny mléčné a dalších produktů zastoupených v menším množství. Není to však pravidlem. Například u rodu *Bifidobacterium* dochází k fermentaci stejných sacharidů za vzniku směsi kyseliny octové a mléčné. Na základě hlavních a vedlejších produktů fermentace se pak bakterie dělí na homofermentativní a heterofermentativní druhy (Martin & Maurice 2008).

Nejenže tyto bakterie produkují kyseliny, ale také jsou oproti ostatním bakteriím značně acidotolerantní, což jim přináší v daném prostředí zásadní výhodu vůči dalším mikroorganismům. Jsou také tolerantní ke žluči (netýká se všech BMK), díky čemuž jsou velmi významné pro potravinářský průmysl. Jelikož žluč zajišťuje svojí toxicitou silnou antimikrobiální aktivitu vůči všem mikroorganismům, kteří nejsou tolerantní ke žluči, tj. nejsou adaptovány na přítomnost těchto žlučových solí vyskytujících se v gastrointestinálním traktu. Z hlediska optimální teploty pro růst lze BMK rozdělit na mezofilní a termofilní bakterie (Horáčková et al. 2017; Mahesh et al. 2019). Jak uvádí Horáčková et al (2017), tak schopnost tolerance ke žluči je kmenově specifická a nelze říci, který druh BMK je odolnější. Zlepšení růstu v přítomnosti žlučových solí ovlivňuje řada faktorů (pH, teplota atd.).

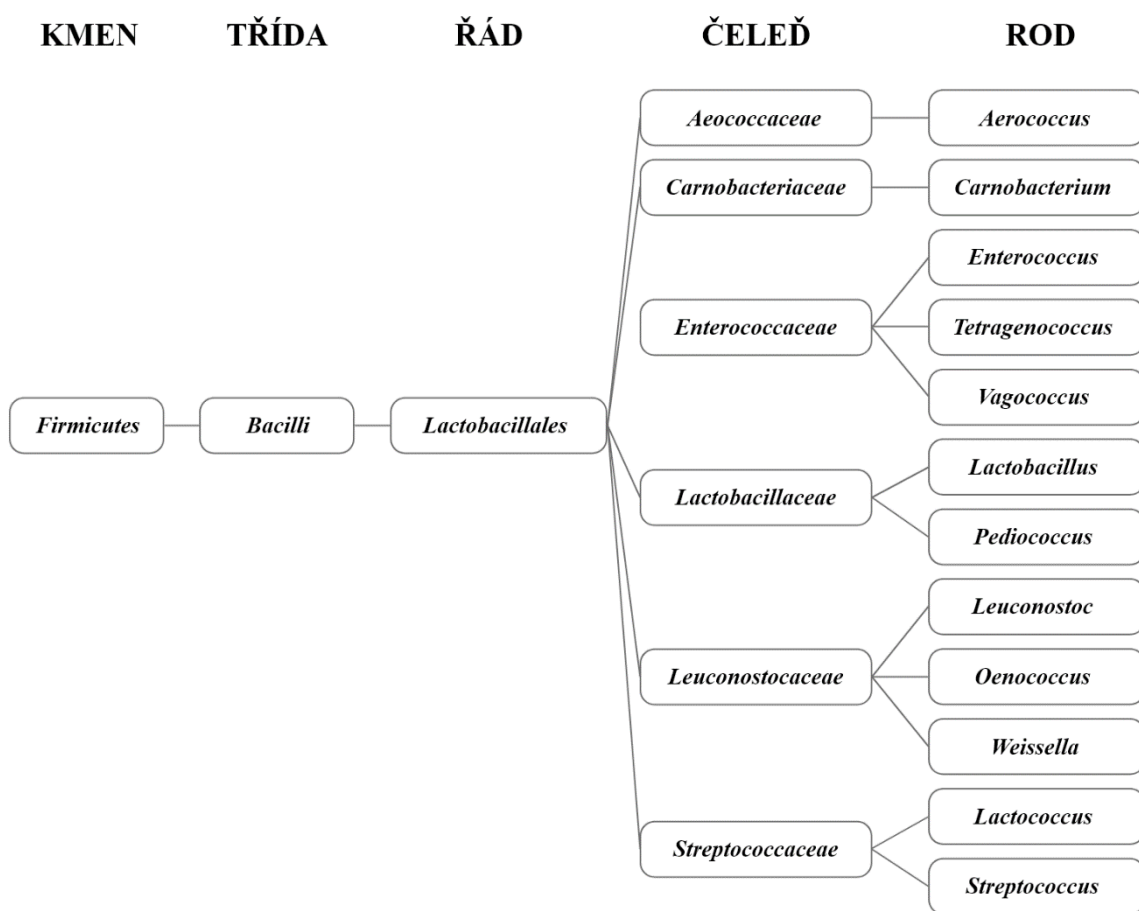
Z morfologického hlediska jsou děleny BMK na koky (diplokoky, tetrakoky, streptokoky), tyčinky a ojedinele tvoří vláknité struktury. Řadí se mezi grampozitivní bakterie, tudíž se za použití Gramovy metody tyto bakterie zbarvují do charakteristické modrofialové barvy. Tento fakt je způsobený vysokým obsahem peptidoglykanu v buněčné stěně, absencí vnější membrány a lipopolysacharidové vrstvy. Tyto bakterie jsou nepohyblivé, nesporulující, kataláza negativní (je možná i produkce pseudokatalázy), postrádající cytochromy. Pro většinu těchto bakterií kyslík není toxický, a proto rostou i za přítomnosti vzduchu. Jsou tedy řazeny mezi aerotolerantní, mikroaerofilní či fakultativně anaerobní. Avšak jsou i výjimky jako například striktně anaerobní bifidobakterie (Klaban 2005; Adams & Moss 2008).

BMK jsou chemoorganotrofní, což znamená, že získávají energii oxidací organických sloučenin. Organické sloučeniny využívají rovněž jako zdroje uhlíku a vodíku, které jsou potřeba k syntéze buněčné hmoty. Ke svému růstu potřebují fermentovatelné sacharidy, peptidy, nukleotidy. Dále potřebují také dusíkaté zdroje, které jsou nejčastěji ve formě aminokyselin. Také vyžadují některé vitaminy skupiny B, minerální soli a růstové látky. BMK jsou obecně velmi náročné na živiny (Šilhánková 2008; Klaban 2005).

3.2 Taxonomická klasifikace BMK

Předchůdci BMK pravděpodobně byli mikroorganismy podobné rodu *Bacillus*, které pocházely z půdy. Ztratily několik genů a s tím i související fyziologické funkce, přičemž se adaptovaly na nutričně bohatá prostředí (Vinderola et al. 2019).

Prof. Orla-Jensen položil základy současné taxonomické klasifikace BMK již na počátku 20. století a zároveň také poprvé popsal tuto skupinu bakterií. Tyto údaje shromáždil ve své monografii *Lactic Acid Bacteria* vydané v roce 1919. Za svou práci získal jako ocenění Nobelovu cenu. Jeho použitá kritéria (morfologie buněk, teplotní rozmezí růstu, způsob fermentace glukózy, rozdílnost fermentovaných sacharidů) jsou doposud považována za důležitá pro klasifikaci těchto bakterií. Postupně se znalosti o vlastnostech BMK rozšířily, a to včetně molekulárně biologických charakteristik. Na základě přibývajících údajů se rozšířil i počet rodů, které vyhovují popisu pro BMK. Původně byly do této skupiny řazeny pouze čtyři rody (rod *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*). V současné době podle taxonomické klasifikace spadá BMK do kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli* a řádu *Lactobacillales*. Patří sem šest čeledí (*Aeococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, *Streptococcaceae*). Do těchto čeledí patří rody *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Lactococcus* a *Streptococcus*. V potravinářském průmyslu se používají hlavně rody *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* a *Streptococcus* (Horáčková et al. 2018). Pro lepší přehlednost je tento výčet znázorněn na obrázku č. 1.



Obrázek 1: Taxonomická klasifikace BMK (inspirováno podle Horáčkové et al. (2018))

Rod *Bifidobacterium* (čeleď *Bifidobacteriaceae*) je historicky považován za patřící do skupiny BMK. Nicméně i přes to, že tyto bakterie odpovídají mnoha typickým vlastnostem pro BMK, najde se zde i několik zásadních rozdílů pro tento rod. Jeden z rozdílů je, že rod *Bifidobacterium* se řadí narozdíl od všech ostatních BMK do kmene *Actinobacteria*, což je druhá hlavní větev grampozitivních bakterií. Následně tedy spadá i do jiného řádu (*Bifidobacteriales*) a třídy (*Actinobacteria*) (Vinderola et al. 2019).

Jednotlivé rody BMK se rozlišují na základě mnoha charakteristických rysů, například morfologie, produkce CO₂ z glukózy, růstu při 10 °C a 45 °C, růstu při koncentraci 6,5 a 18 % NaCl, růstu při pH 4,4 a 9,6 a typu produkované kyseliny mléčné (formy L - pozitivní, D - negativní, DL – pokud tvoří obě dvě formy) (Vinderola et al. 2019).

Typ fermentace je důležitým taxonomickým rozlišovacím znakem. Například čeleď *Leuconostocaceae* zahrnuje rod *Leuconostoc*, *Oenococcus* a *Weissella* a všechny tyto rody jsou obligátně heterofermentativní. Stejně tak jsou i tzv. obligátně heterofermentativní laktobacily (bližší informace o jejich rozdělení do skupin na základě fermentačního metabolismu – viz podkapitola 3.3.1.1) (Vinderola et al. 2019).

3.3 Morfologie a charakteristika jednotlivých rodů

Z morfologického hlediska se u BMK nevyskytuje příliš velká pestrost (tvoří koky nebo tyčinky). Bakterie tvoří převážně grampozitivní koky (bakterie kulovitého tvaru) a tyčinky. Koky jsou buď v párech, v kratších či delších řetízcích a tyčinky jsou buď izolované či také v řetízcích. Nevytváří endospory. Obvykle jsou fakultativně anaerobní a kataláza negativní. Nutriční požadavky jsou obvykle charakteristické pro každý druh, často se nároky liší i pro konkrétní kmeny jednotlivých druhů. Všechny BMK jsou schopné fermentovat sacharidy za vzniku kyseliny mléčné. Rozdíl je pouze v tom, jestli je fermentují homofermentativně či heterofermentativně. Pro homofermentativní mléčné bakterie je typické, že vzniklá kyselina mléčná je pravotočivá a zaujímá hlavní podíl vzniklých metabolitů. Naopak heterofermentativní mléčné bakterie, produkují levotočivou kyselinu mléčnou, ale vedle toho i značný podíl jiných kyselin a látek (kyselina octová, ethanol, CO₂). V podkapitolách je uvedena všeobecná charakteristika všech čeledí BMK (i čeleď *Bifidobacteriaceae*) a podrobnější charakteristika vybraných rodů, které se používají v potravinářském průmyslu (zejména pro mléčné výrobky). V rámci těchto rodů jsou však okrajově zmíněny i druhy, které se používají na výrobu i jiných než jen mléčných výrobků, či mohou být patogenní apod. V poslední podkapitole je uvedeno shrnutí v tabulce č. 1 některých základních charakteristik (tvar buněk, typ fermentace, konfigurace kyseliny mléčné a hlavní produkty) u vybraných rodů (Vos et al. 2009).

3.3.1 Čeleď Lactobacillaceae

Do této čeledi patří tři rody: rod *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* a *Pediococcus*. Charakteristickým tvarem jsou pro tyto bakterie zpravidla dlouhé a štíhlé, ale někdy i ohnuté tyčinky, až po krátké koryneformní kokobacily (kokotyčinky) nebo sférické buňky. Běžné je i vytváření řetízků. Výjimkou je rod *Pediococcus*, který tvoří převážně páry nebo tetrády. Pohyblivost není běžná. Běžně jsou fakultativně anaerobní a kataláza negativní, ale najdou se výjimky. Alespoň polovina konečného produktu z jejich fermentačního metabolismu je laktát. Dalšími produkty mohou být acetát, ethanol, CO₂, formiát nebo sukcinát (Vos et al. 2009).

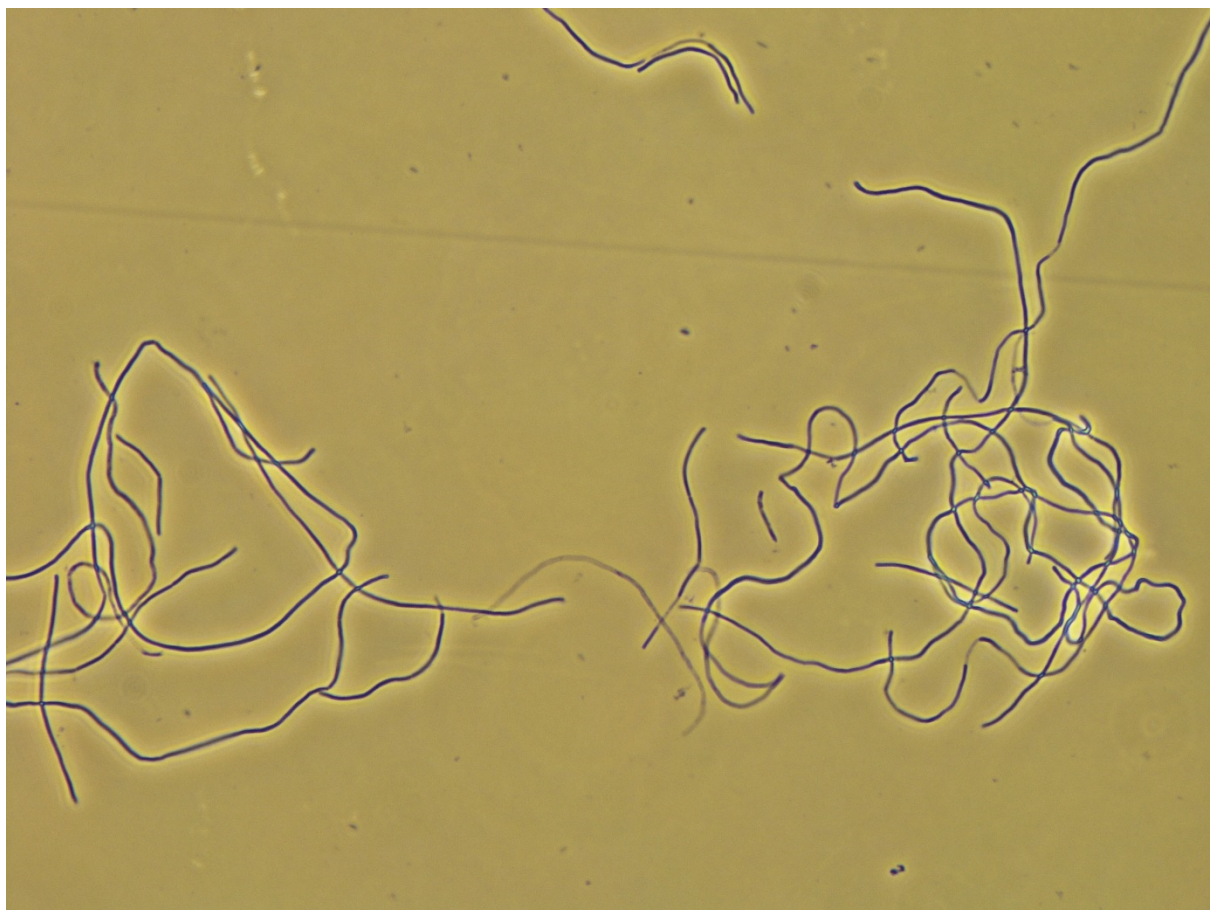
3.3.1.1 Rod Lactobacillus

U laktobacilů je povrchový růst na pevných médiích obecně zesílený bezkyslíkatým prostředím nebo sníženým parciálním tlakem kyslíku a 5 – 10 % CO₂. Přísně aerobní podmínky jsou obvykle inhibiční pro růst těchto bakterií. Redukce dusičnanů je neobvyklá a kasein není tráven. Bakterie jsou buď kataláza negativní, nebo může docházet k produkci pseudokatalázy či dokonce i skutečné katalázy. To se potvrdilo u několika kmenů (z různých druhů), které mohou rozkládat peroxid vodíku. Tvorba pigmentů je vzácná. Pokud jsou však přítomny, tak vytváří barvu žlutou, oranžovou, rezavě až cihlově červenou. Jsou schopné produkovat velké množství kyseliny mléčné (ve formě DL či D(-)) (Vos et al. 2009). Na základě finálních produktů, vzniklých fermentací sacharidů, lze laktobacily rozdělit do tří skupin. Do první skupiny patří obligátně homofermentativní laktobacily, které fermentují hexózy téměř výlučně na kyselinu mléčnou (více jak 90 %) a pentózy ani glukonát nefermentují. Do této skupiny patří *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius* a *Lactobacillus*

delbrueckii. Do druhé skupiny patří fakultativně heterofermentativní laktobacily, které fermentují hexózy na kyselinu mléčnou (jako u homofermentativních bakterií), ale při nedostatku hexóz fermentují další sacharidy (pentózy) za vzniku kyseliny mléčné, octové, CO₂ a ethanolu. Do této skupiny patří *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus alimentarius* a *Lactobacillus plantarum*. Poslední a třetí skupinou jsou obligátně heterofermentativní laktobacily, které fermentují hexózy na kyselinu mléčnou (více jak 50 %), octovou, CO₂ a za určitých okolností vzniká i ethanol. Dokáží fermentovat pentózy na kyselinu mléčnou a octovou. Do této skupiny patří např. *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis* a *Lactobacillus kefir* (Sedláček 2007).

Jejich výhodou je, že jsou acidotolerantní až acidofilní. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* je velmi významný pro výrobu mléčných produktů společně s druhem *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Rozdíl je mezi nimi ten, že laktobacily dokážou snášet nižší pH a díky tomu snižují kyselost výrobku až na izoelektrický bod. Snížené pH působí inhibičně až mikrobicidně, proto má tento fakt pozitivní vliv nejen při výrobě a konzervaci potravin ale i v intestinálním traktu lidí. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* je tedy homofermentativní a dokáže produkovat v malém množství i heteropolysacharidy, které jsou velmi užitečné při výrobě mléčných výrobků. Týká se to hlavně jogurtů, kde dochází k ovlivnění konzistence, zvýšení viskozity a stabilizaci sraženiny. Dalším velmi významným druhem je *Lactobacillus acidophilus*, který se používá k výrobě acidofilního mléka, acidofilního podmáslí a smetany. Nicméně zaujímá i významnou roli, co se týče střevní mikrobioty a pozitivních vlivů na lidské zdraví. *Lactobacillus kefir* a *L. parakefir* jsou součástí směsných kefirových kultur a používají se tedy při výrobě kefiru a kefirového mléka. Rozsah růstové teploty je poměrně velký (2 – 53 °C), optimální teplota se však pohybuje obvykle v rozsahu 30 – 40 °C. Tyto bakterie upřednostňují tedy mezofilní teploty až mírně termofilní. Optimální pH pro přežití je mírně kyselé, obvykle okolo 5,5 – 6,2. Růstová hodnota pH je běžně při pH 5,0 nebo méně. Rychlost růstu je často snížena kvůli neutrálním nebo zpočátku alkalickým podmínkám. Z potravinářského hlediska je tento rod velmi významný a rozšířený. Obvyklý výskyt je v mléčných výrobcích, obilných výrobcích, produktech z masa a ryb, pivu, víně, ovocných šťávách, nakládané zelenině, kaši, zelí, silážích, kvásku, půdě, vodě či odpadních vodách. Tyto bakterie jsou součástí normální mikrobioty v dutině ústní, střevním traktu, vagině lidí a mnoha zvířat. Nejsou patogenní, pouze ve vzácných případech pro osoby s nějakou chorobou (Šilhánková 2008; Vos et al. 2009).

Morfologická variabilita laktobacilů je poměrně značná. Ale všeobecně se jedná o dlouhé, rovné nebo mírně zakřivené tyčinky či kokotyčinky (viz obrázek č. 2). Délka tyčinek a stupeň zakřivení závisí na věku dané kultury, složení média apod. Hlavní morfologické rozdíly mezi druhy však obvykle zůstávají jasně rozpoznatelné. Některé druhy laktobacilů produkují plyn (např. *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*). Takové druhy se pak vždy vykazují směsí dlouhých a krátkých tyčinek. K dělení buněk dochází pouze v jedné rovině. Tendence k vytváření řetízků se liší mezi druhy, a dokonce i kmeny. Závisí to na růstové fázi a pH média. Asymetrický vývoj buněk během buněčného dělení vede ke vzniku vrásčitých řetízků nebo dokonce k tvorbě kruhů. Kolonie na agarovém médiu jsou obvykle kolem 2 – 5 mm s celými okraji, konvexní, hladké, lesklé a běžně neprůhledné bez pigmentu. Ve vzácných případech, jak již bylo řečeno, jsou nažloutlé nebo načervenalé (Vos et al. 2009).



Obrázek č. 2: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* – mikroskopováno s fázovým kontrastem, zvětšení 400 (foto: Švejstl 2019)

3.3.1.2 Rod *Pediococcus*

Buňky typických zástupců jsou nepohyblivé, převážně dokonale kulovité, příležitostně vejčité na rozdíl od jiných BMK. Vyskytují se buď samostatně nebo v párech či tetradách. Jednotlivé buňky měří cca 0,5 – 1,0 μm . Buněčná morfologie druhů pocházejících z tohoto rodu je podobná morfologii druhů z rodu *Tetragenococcus* a bakterie z těchto dvou rodů jsou zároveň jedinými BMK, které se mohou dělit ve dvou rovinách. Důsledkem dělení ve dvou na sebe kolmých rovinách je vznik tetrad (tzv. tetrakoků), nikoliv však typických řetězků. Buňky jsou oxidáza negativní, cytochromy chybí a kataláza není produkována, ačkoliv opět se najde výjimka u některých druhů (či kmenů), jako např. *Pediococcus pentosaceus* u kterého bylo hlášeno, že produkuje katalázu nebo pseudokatalázu. U více než 50 % kmenů *Pediococcus pentosaceus* izolovaných z kozího mléka, sýru Feta a sýru Kaseri bylo hlášeno, že mají slabou katalázovou aktivitu. Jsou homofermentativní, produkují kyselinu mléčnou, ale bez CO_2 z glukózy. Růst je běžný při pH 5, ale již ne při pH 9. Opět existuje výjimka a tou je např. druh *Pediococcus stilesii*. Optimální růstová teplota je v rozmezí 25 – 35 $^{\circ}\text{C}$, ale závisí na druhu (klidně může být i 37 $^{\circ}\text{C}$) a musí probíhat za anaerobních podmínek. Všechny druhy kromě *Pediococcus claussenii* produkují DL nebo L(+) kyselinu mléčnou z glukózy. Dusičnan není redukován (Görner & Valík 2004; Vos et al. 2009).

Glukóza je metabolizována homofermentativně na kyselinu mléčnou. U typických druhů z rodu *Pediococcus* se zdá, že CO_2 není produkován z fermentace glukózy. Výjimkou je druh

Pediococcus dextrinicus, který je však považován za atypický. Některé kmeny pocházející z rodu *Pediococcus* byly spojeny s výskytem infekcí u lidí, a proto je lze považovat za příležitostné patogeny. Mohou způsobit infekce u oslabených jedinců, a to v důsledku traumatu nebo nějakého základního onemocnění. Některé kmeny jsou rezistentní na vankomycin a teikoplanin, což jsou účinné látky používané ve výrobcích lékařské péče. Obecně jsou však tyto bakterie citlivé na antibiotika, jako je penicilin, ampicilin a aminoglykosidy a středně citlivé na chloramfenikol (Vos et al. 2009).

Bakterie z tohoto rodu jsou přirozeně spojovány s ovocem a rostlinami a jejich fermentací. Jedná se např. o siláž, kukuřici, okurky, olivy a cereálie. Některé kmeny přispívají také k fermentaci masa. Jiné druhy jsou zase často spojovány s prostředím, kde dochází k výrobě alkoholických nápojů (např. pivo). Tyto bakterie jsou zároveň i velmi důležité pro výrobu sýrů, kde se účastní jejich zrání. V těle člověka se vyskytují v zažívacím traktu běžně (Šilhánková 2008; Vos et al. 2009).

3.3.2 Čeleď Aerococcaceae

Tato čeleď zahrnuje rod *Aerococcus* a jeho blízké příbuzné (rod *Abiotrophia*, *Dolosicoccus*, *Eremecoccus*, *Facklamia*, *Globicatella*, *Ignavigranum*). Skládá se z nepohyblivých, vejčitých koků nebo kokobacilů. Jsou fakultativně anaerobní, kataláza negativní (některé kmeny jsou ale opět schopny produkovat pseudokatalázu). Obvyklý průměr buněk je 1 – 2 μm . Dělení probíhá na dvou rovinách v pravém úhlu, což vede ke vzniku tetrad a shluků. Někdy je možný výskyt buněk i samostatně nebo v párech. Obvykle tvoří malé nepigmentované kolonie (cca 1 mm nebo méně). Ale opět jsou výjimky jako např. druh *Aerococcus viridans*, který produkuje žlutý pigment. Jsou typicky chemoroganotrofní, ale žádný plyn z glukózy nevzniká. Bakterie neredukují dusičnany na dusitany. Bylo zjištěno, že buněčné stěny těchto bakterií obsahují aminokyselinu lysin. Bakterie jsou citlivé na vankomycin a na širokou škálu dalších antimikrobiálních látek. Mohou růst v médiu, které obsahuje až 6,5 % NaCl – to platí pro všechny bakterie z tohoto rodu. Je zde opět výjimka (např. *Aerococcus viridans*), kdy jsou bakterie schopny růst až při 10 % NaCl. Optimální teplota pro růst je dosti variabilní. Kupříkladu *Aerococcus urinae* roste při poměrně vysokých teplotách (až 45 °C), ale pro jiné druhy se teplota běžně pohybuje kolem 37 °C (Sedláček 2007; Vos et al. 2009).

3.3.3 Čeleď Carnobacterium

Do této čeledi patří rod *Carnobacterium* a blízce příbuzné rody (*Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Alloiococcus*, *Atopobacter*, *Atopococcus*, *Atopostipes*, *Desemzia*, *Dolosigranulum*, *Granulicatella*, *Isobaculum*, *Marinilactibacillus* a *Trichococcus*). Skládá se z grampozitivních tyčinek nebo koků. Obvykle jsou fakultativně anaerobní, ale některé druhy rostou při aerobních či mikroaerofilních podmínkách. Obvykle jsou kataláza negativní. Bakterie jsou pohyblivé i nepohyblivé. Buněčná stěna může obsahovat aminokyseliny lysin a ornithin. Různé druhy mohou být psychrotolerantní (dokáží žít v prostředí s velmi nízkou teplotou), halotolerantní (jsou schopné snášet prostředí s vysokou koncentrací soli) nebo alkalifilní (žijí v prostředí s vysokou hodnotou pH) (Vos et al. 2009).

3.3.3.1 Rod *Carnobacterium*

Buňky těchto bakterií jsou tvarově typicky krátké, relativně úzké tyčinky, které mohou být někdy i zakřivené. Obvykle se bakterie vyskytují samostatně nebo v párech, někdy vytváří také krátké řetízky. Bakterie mohou být pohyblivé, ale nemusí. Jsou fakultativně anaerobní, avšak dobře rostou v přítomnosti kyslíku a růstový výnos u druhu *Carnobacterium maltaromaticus* se zvyšuje desetkrát, když se do aerobně rostoucí kultury přidá hem. Morfologie buněk je odlišná v závislosti na druhu a stáří, ale vyskytují se třeba o velikosti 13 – 20 µm. Nicméně jsou velmi podobné bakteriím z rodu *Lactobacillus*. Kolonie na agaru jsou běžně bílé až krémové, konvexní a lesklé. Průměr kolonií se pohybuje v rozmezí od 0,5 – 2 mm v závislosti na typu média. Některé druhy produkují světle žlutý pigment rozpustný ve vodě. Z glukózy produkují převážně kyselinu mléčnou ve formě L(+). Avšak jeden druh (*Carnobacterium pleistocenium*) nevytváří žádný laktát, ale pouze ethanol či kyselinu octovou a CO₂. Obecně platí, že jsou fakultativně heterofermentativní, protože dokáží fermentovat jak hexózy, tak i pentózy. Produkce plynu z glukózy je variabilní (v závislosti na substrátu), nicméně často je negativní. Řadí se mezi psychrotolerantní mikroorganismy. Většina kmenů roste při 0 °C, ale většinou žádný kmen neroste při 45 °C. Žádné kmeny nerostou již při 8 % NaCl. Dobrý růst se vykazuje při pH 9. Jsou negativní na katalázu i oxidázu, nicméně najdou se výjimky s výskytem katalázy. Dusičnany nejsou redukovány na dusitany (Görner & Valík 2004; Vos et al. 2009). Nachází se ve vakuově baleném masu a souvisejících výrobcích živočišného původu, sýrech a rybách z chladného prostředí. Maso je ideálním prostředím pro tyto bakterie, má neutrální pH, vysoký obsah živin a také vysokou vodní aktivitu. Ve chvíli, kdy jejich počet výrazně stoupá, mohou způsobit zkažení masa. Pokud jsou tyto bakterie spojeny s potravinami, obvykle se v tomto prostředí nachází i bakterie z rodu *Lactobacillus* a *Leuconostoc*. Zkažené výrobky se vyznačují změnou barvy, kyselou vůní či chutí, anebo můžou být naopak bez chuti (př. nezpracované maso, párek, klobása). Mezi mléčné výrobky, u kterých lze zaručeně nalézt tyto bakterie patří měkké zrající sýry s plísní na povrchu vyrobené z nepasterizovaného mléka. Kupříkladu sýr Brie, který má pH kolem 6,8 – 7,6. Dalším typickým příkladem je i sýr mozzarella. Bakterie z rodu *Carnobacterium* se prokázaly jako patogenní pouze pro ryby, nikoliv však pro člověka či jiná zvířata (Sedláček 2007; Šilhánková 2008; Vos et al. 2009)

3.3.4 Čeleď *Enterococcaceae*

Tato čeleď zahrnuje čtyři rody, a to rod *Enterococcus*, *Melissococcus*, *Tetragenococcus* a *Vagococcus*. Pro potravinářský průmysl je významný pouze rod *Enterococcus*. Jedná se o vejčité koky, které jsou běžně kataláza negativní. Bakterie jsou fakultativně anaerobní, anaerobní nebo mikroaerofilní. Některé druhy jsou halofilní a mohou být odolné vůči žluči (Vos et al. 2009).

3.3.4.1 Rod *Enterococcus*

Bakterie se vyskytují se jednotlivě, v párech nebo vytváří krátké řetízky a jsou často protaženy ve směru vytvořeného řetízku. Kmeny některých druhů mohou být pohyblivé, jelikož mají bičíky. Některé druhy bakterií mohou vytvářet žlutý pigment nebo mohou být karboxyfilní, tedy závislé na CO₂. Obecně bývají oxidáza negativní i kataláza negativní, ale

některé kmeny jsou schopné vytvářet aktivní pseudokatalázu, pokud jsou kultivovány na agarovém médiu obsahující krev. Hemolytická aktivita těchto bakterií je variabilní a do značné míry druhově závislá. Neredukují dusičnany na dusitany. Optimální růst většiny druhů se pohybuje kolem 35 – 37 °C. Avšak mnoho druhů je schopno růst při 42 °C, a dokonce i při 45 °C. Pomalý růst je možný i při 10 °C. Jsou velmi odolné vůči vysychání. Obecně mají náročné požadavky na živiny. Jsou homofermentativní, tudíž převládajícím konečným produktem fermentace glukózy je kyselina L(+)-mléčná, ale bez tvorby plynu. Tyto bakterie mohou fermentovat širokou škálu substrátů. Za aerobních podmínek je ovšem glukóza metabolizována na kyselinu octovou, acetoin a CO₂. Pyruvát se běžně převádí na laktát např. u *Enterococcus faecalis*, pokud je pH 5,0 – 6,0. Nicméně při neutrálním nebo mírně alkalickém pH se pyruvát přeměňuje na formiát, ethanol a acetát v poměru 2:1:1. Při nedostatku živin se ale pyruvát přeměňuje na ethanol a acetát. energii lze získat i jinými způsoby, např. degradací některých aminokyselin. Jsou schopné snášet NaCl do 6,5 %, což znamená že jsou i odolné vůči snížené aktivitě vody. Mohou přežívat i nižší pasterační a termizační teploty. Jsou fakultativně anaerobní, avšak s preferencí anaerobních podmínek (Vos et al. 2009). Většina druhů je součástí střevní mikrobioty savců a ptáků. Jiné druhy jsou spojeny s rostlinami nebo jsou izolovány z vody. Již dříve bylo několik druhů z rodu *Streptococcus*, které se vyskytovaly ve střevním traktu lidí i zvířat, vyjmuto a přeřazeno do rodu *Enterococcus*. Ačkoliv tyto bakterie mají složité nutriční požadavky, jejich růst na běžně používaných kultivačních médiích je obvykle bohatý. Vyžadují několik aminokyselin, vitaminy skupiny B a purinové a pyrimidinové báze. Vytváří kolonie, které jsou vždy pravidelné a kruhovitěho tvaru s hladkým povrchem až do průměru 5 mm. Některé druhy produkují žlutý až oranžový pigment na agarovém médiu. Ačkoliv se tyto bakterie běžně vyskytují v těle člověka, aniž by ho nějak ohrožovaly, tak zároveň existují i druhy, které jsou patogenní a jsou často izolovány z různých infekcí. Kupříkladu ve stolici je jejich výskyt normální, ale v močovém měchýři už ne. Způsobují infekci močových cest a jsou často rezistentní na různá antibiotika. Nebezpečné bakterie z tohoto rodu jsou zejména ty, které mají rezistenci na vankomycin. *Enterococcus faecalis* představuje nejčastěji izolovaný druh z lidského klinického materiálu (80 – 90 %). Enterokoky jsou běžnou součástí mnoha druhů potravin (ačkoliv se nepoužívají jako technické mikroorganismy), a to zejména potravin živočišného původu, jako je mléko a mléčné výrobky nebo maso. Obecně se považují za sekundární kontaminanty potravin, které často hrají roli v jeho kažení. Nicméně některé kmeny neškodí, neboť pozitivně ovlivňují zrání a vývoj aroma některých typů sýrů. V některých produktech se dokonce používají i jako probiotické kultury. Na druhé straně byla prokázána přítomnost faktorů virulence v potravinářských enterokokových kmenech, stejně tak i přenos virulence na startovací kmeny (Sedláček 2007; Vos et al. 2009).

3.3.5 Čeleď Leuconostocaceae

Čeleď zahrnuje rody *Leuconostoc*, *Oenococcus* a *Weissella*. Pro potravinářský průmysl je významný pouze rod *Leuconostoc*. Bakterie jsou nepohyblivé. Tvar buněk je obvykle elipsoidní, často protáhlý. Bakterie z rodu *Weissella* jsou buď krátké tyčinky nebo mají vejčitý tvar. Vyskytují se v párech nebo krátkých řetězcích. Jsou fakultativně anaerobní, kataláza negativní, bez cytochromů. Glukózu rozkládají heterofermentativně za vzniku laktátu, CO₂,

ethanolu či acetátu. D(-) laktát je typickým konečným produktem fermentace glukózy, výjimkou je pouze rod *Weissella*, jehož konečným produktem je DL-laktát (Vos et al. 2009).

3.3.5.1 Rod *Leuconostoc*

U tohoto rodu je značná variabilita, co se týče morfologie buněk a použitím kultivačním médiu. Bakterie, které jsou kultivované na glukózovém médiu jsou protáhlé a mají morfologicky blíže k tyčinkám než ke kokům. Naopak většina kmenů při kultivaci v mléce vytváří kokovité buňky. Buňky se mohou vyskytovat samostatně, v párech nebo tvoří krátké až středně dlouhé řetízky. Když jsou kultivovány na pevném médiu, tak jsou buňky protáhlé a mohou být lehce zaměněny za tyčinky. Nicméně obecně tyto bakterie vyžadují bohaté a komplexní médium pro svůj růst. Nejlepšího růstu se dosáhne za fakultativně anaerobních podmínek. Doporučují se mikroaerofilní až anaerobní podmínky pro většinu druhů. Proteolytická aktivita u těchto bakterií chybí. Dusičnany nejsou redukovány. Některé kmeny mají i oxidativní mechanismus a dokáží proto produkovat místo ethanolu kyselinu octovou. Tyto bakterie obvykle neokyselují mléko ani ho nesrážejí. A ačkoliv růst může nastat až při pH 4,5, tak se tento druh řadí mezi neacidofilní a upřednostňuje počáteční pH 6,5 daného média či potravinové matrice. Optimální růstová teplota je mezi 20 – 30 °C, ale růst může probíhat i při 5 °C. Dokonce byl zaznamenán růst i při 1 °C. Kolonie se vytváří obvykle až po 3 – 5 dnech a jsou hladké, kulaté, šedivé či bílé a jejich průměr je menší než 1 mm. Glukóza je fermentována na ekvimolární množství kyseliny mléčné ve formě D(-), CO₂ a ethanol nebo acetát. Fruktóza-1,6-difosfátaldoláza chybí. Avšak všechny druhy obsahují aktivní glukóza-6-fosfátdehydrogenázu (G-6-P-DH). Tento rod se řadí mezi nepatogenní, a to jak pro člověka, tak i pro zvířata a rostliny (Vos et al. 2009). Druhy rodu *Leuconostoc* jsou spojovány s celou řadou masných výrobků, včetně čerstvého a vakuově baleného masa či fermentovaného masa. Druhy jako je *Leuconostoc mesenteroides* a *Leuconostoc lactis* se běžně používají jako startovací kultury při výrobě kysaného podmásli, smetanových sýrů, Goudy nebo Eidamu. *Leuconostoc lactis* fermentuje laktózu rychleji než ostatní druhy a zřejmě i rychleji okyseluje a sráží neobohacené mléko. Při nižším pH vytváří bakterie rodu *Leuconostoc* velmi důležité aromatické látky, které plní svůj význam při použití základních smetanových kultur. Tyto dva druhy jsou důležité kvůli produkci diacetylu a CO₂. Produkce diacetylu je důležitá při výrobě másla, jelikož mu dodává příjemné aroma. Potravinářsky významné jsou druhy *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* a *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. Jako startovací kultura mohou být použity i pro výrobu kefiru. Druh *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* hraje důležitou roli při kvašení zeleniny, jako je zelí a okurky. Ačkoliv to není dominantní druh, tak je důležitý při zahájení fermentace zelí při výrobě a poté následuje použití bakterií z rodu *Lactobacillus*. Obecně pro všechny bakterie z tohoto rodu je mléko pro jejich růst nevhodné. Ovšem když se mléko obohatí o další látky, rostou v něm tyto bakterie již dobře. I tak ale existují druhy/kmeny, které mají tak vysoké nároky na obsah aminokyselin, že nebude docházet ke srážení mléka. Většina těchto bakterií produkuje diacetyl, který je v mlékařství velmi důležitou aromatickou látkou (Görner & Valík 2004; Vos et al. 2009).

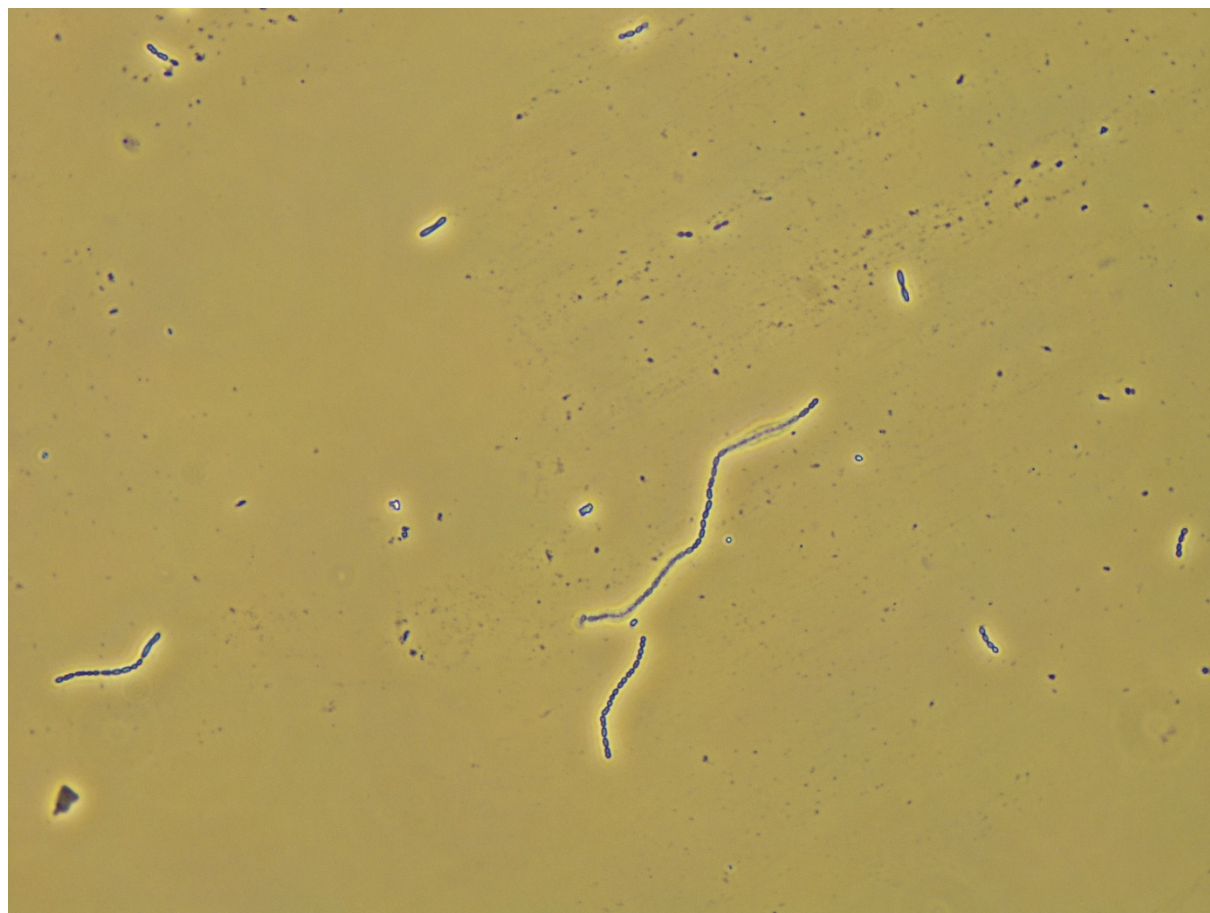
3.3.6 Čeleď Streptococcaceae

Zahrnuje rody *Streptococcus*, *Lactococcus* a *Lactovum*. Pro potravinářský průmysl jsou rody *Streptococcus* a *Lactococcus* velmi významné. Skládají se z grampozitivních, vejčitých nebo sférických koků. Buněčné stěny obsahují aminokyselinu lysin. Jsou typicky fakultativně anaerobní, ale mohou vyžadovat přísadu CO₂ pro růst. Běžně jsou kataláza negativní (Vos et al. 2009).

3.3.6.1 Rod Streptococcus

Buňky těchto bakterií mají obvykle průměr menší než 2 μm a vyskytují se v párech nebo vytváří řetízky. Délka těchto řetízků se značně liší mezi druhy i kmeny (viz obrázek č. 3). Mohou být vytvářeny dlouhé řetízky z více než padesáti buněk. Pro některé druhy, jako je např. druh *Streptococcus pneumoniae*, je typické vytváření diplokoků. Jsou nepohyblivé a prakticky všechny druhy jsou fakultativně anaerobní, nicméně některé vyžadují pro růst přísadu CO₂ (cca 5 %). Jsou charakteristicky citlivé na vankomycin. Sacharidy jsou fermentovány převážně na pravotočivou kyselinu mléčnou, ale bez vzniku plynu. Řadí se mezi homofermentativní bakterie. Dále produkují menší množství kyseliny octové a mravenčí, ethanol a CO₂. Neredukují dusičnany na dusitany. Nutriční požadavky jsou variabilní, ale většinou vysoké. Optimální teplota se pohybuje obvykle kolem 37 °C, ale maximální a minimální teploty jsou mezi jednotlivými druhy různé. Kolonie mají obvykle průměr 0,5 – 1,0 mm již po 24 hodinách při 37 °C. Prakticky všechny druhy jsou nepigmentované, s výjimkou některých kmenů např. *Streptococcus agalactiae*. U tohoto druhu se může vyskytovat žlutý, oranžový nebo cihlově červený pigment. Charakteristickým znakem některých druhů orálních streptokoků je produkce extracelulárních polysacharidů, tj. glukanu (dextranu) a fruktanu (levanu) ze sacharózy. Mnoho druhů je součástí neškodné komenzální mikrobioty v těle člověka či zvířat. Nicméně, najdou se i vysoce patogenní druhy. Některé druhy streptokoků jsou nositeli vysokého množství bakteriofágů, čímž mohou přispívat k patogennímu potenciálu (stav profága). Ukázalo se, že několik druhů streptokoků je schopno inhibovat úzce příbuzné druhy bakterií produkcí bakteriocinu. Má se za to, že schopnost konkrétního kmene *Streptococcus mutans* inhibovat jiné bakterie hraje důležitou roli v jeho úspěšném přenosu a následné kolonizaci nového hostitele. Mezi další jeho důležitou roli patří ochrana proti infekci způsobené bakteriemi druhu *Streptococcus pyogenes*. Pro výrobu mléčných výrobků je velmi důležitý druh *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Používá se na výrobu jogurtů či sýrů typu mozzarella a cheddar. Dokáže přežít i zahřátí na 65 °C po dobu třiceti minut. Tudíž se může vyskytovat v pasterizovaném mléku. Dokáže růst při teplotách dosahujících až 45 °C, zastavení růstu je již při 15 °C. Je velmi citlivý na obsah NaCl (odumírá při obsahu větším než 2 %). Je také velmi citlivý na antibiotika a další inhibiční látky, a proto se často používá pro zjišťování přítomnosti inhibičních látek v mléce. Buňky jsou o průměru 0,7 – 1,0 μm a vyskytují se v párech či vytváří řetízky (Vos et al. 2009; Šilhánková 2008). Má symbiotický vztah s druhem *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Spolu dokáží velmi rychle produkovat kyselinu mléčnou, při optimální teplotě zhruba kolem 40 – 43 °C dokáží koagulovat kasein za 2 – 3 hodiny. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* zahajuje produkci kyseliny mléčné a zároveň tak snižuje množství O₂ a hlavně pH, čímž stimuluje růst laktobacilů. Streptokoky jsou citlivější na

kyselé pH oproti laktobacilům, což vede k jejich možnému zániku během delšího skladování mléčných výrobků (Robinson 2002).



Obrázek 3: *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* – mikroskopováno s fázovým kontrastem, zvětšení 400 (foto: Švejstl 2019)

3.3.6.2 Rod *Lactococcus*

Hlavním produktem bakterií z rodu *Lactococcus* je pravotočivá kyselina mléčná. Tudiž se řadí mezi homofermentativní mikroorganismy. Žádný plyn nevzniká. Optimální růstová teplota se pohybuje kolem 37 °C, dokážou růst i při 10 °C, ale při 45 °C už ne. Řadí se tedy mezi mezofilní mikroorganismy. Avšak za aerobních podmínek jsou např. u *Lactococcus lactis* produkovány vysoce toxické kyslíkové sloučeniny (superoxid, peroxid vodíku a hydroxylové radikály). Laktokoky jsou mikroaerofilní a růst bakterií není nijak zvlášť ovlivněn při provzdušňování. Rostou nejlépe při téměř neutrálních hodnotách pH a přestávají růst při přibližné hodnotě pH 4,5. Obvykle rostou ve 4 % NaCl, s výjimkou *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, který toleruje pouze 2 % NaCl. Mají kulovitý nebo oválný tvar buněk o průměru 0,5–1 μm, obvykle jsou v párech nebo v řetězcích. Pro mlékárenský průmysl jsou velmi významné druhy *Lactococcus lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Jsou součástí základní smetanové kultury, kde tvoří převážně kyselinu mléčnou. Jsou důležitou součástí tzv. čistých mlékařských kultur a používají se k zakysání smetany, výrobě sýrů (tvrdé, polotvrdé, měkké a čerstvé sýry) a některých kyselých mlék. Rozdíl mezi nimi je v optimální růstové teplotě a množství vyprodukovaného CO₂. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* se

z morfologického hlediska odlišuje vytvářením větších buněk a následně delších řetízků, které jsou charakteristické jen pro čerstvé kultury pěstované v mléce (u starších kultur se řetízky rozpadnou). Produkce významného množství exopolysacharidů (EPS) je u laktokoků zcela běžná. Jedná se o důležitý technologický znak pro výrobu kyselých mlék nebo sýrů. Kmeny lze na základě jejich produkce roztrždit do tří hlavních skupin. První skupina obsahuje kmeny, které produkují EPS obsahující galaktózu, glukózu a rhamnózu. Druhá skupina kmenů produkuje EPS sestávající pouze z galaktózy a EPS třetí skupiny obsahují galaktózu a glukózu. Pro člověka jsou všechny kmeny laktokoků nepatogenní. Některé kmeny laktokoků, jako např. právě *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* produkují bakteriocin nisin, který dokáže inhibovat řadu bakterií a může být použit ke konzervaci některých potravin (pod označením E234). Tato konzervační látka se používá v mnoha zemích k ochraně potravin s vysokou vlhkostí. Produkce nisinu je vždy spojena se schopností fermentace sacharózy. Do mezofilních čistých mlékařských kultur je řazen i *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, který je významný pro vytváření aroma výrobku pomocí produkce diacetylu. Má podobnou charakteristiku jako *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Ale liší se například tím, že za přítomnosti fruktózy vytváří hlavně kyselinu octovou a CO₂ (Görner & Valík 2004; Vos et al. 2009).

Protože se kyselé mléko a sýr normálně nevyrábějí ze sterilizovaného mléka jsou bakteriofágy běžnou hrozbou. Protože i pasterizované mléko může stále obsahovat virulentní bakteriofágy a reziduální BMK. Proto byly fágy mezofilních mléčných laktokoků podrobně prozkoumány. Mnoho kmenů nese profágy, které se mohou uvolňovat během kysání mléka a výroby sýrů. Existuje již mnoho obecně přijímaných technologických opatření, která snižují nebo se vyhýbají problémům s bakteriofágy (Vos et al. 2009).

Co se týče biochemických a technologických funkcí laktokoků, které jsou nezbytné pro kysání mléka a výrobu sýrů, dají se shrnout následovně. První důležitou funkcí je tvorba kyseliny mléčné a výsledné snížení hodnoty pH (4,0 – 5,6) ve srovnání s mlékem (6,6 – 6,7), což zabraňuje nebo zpomaluje růst nežádoucích bakterií. Druhou významnou funkcí je tvorba diacetylu, což je nejcharakterističtější aromatická sloučenina poskytovaná druhem *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*. Třetí funkcí je omezená proteolýza laktokoků během zrání sýrů (Vos et al. 2009).

3.3.7 Čeleď Bifidobacteriaceae

Významné fylogenetické (zároveň i biochemické) kritérium je pro čeleď *Bifidobacteriaceae* aktivita fosfoketolázy. Do této čeledi patří rody *Bifidobacterium* (32 druhů), *Alloscardovia* (jeden druh), *Aeriscardovia* (jeden druh), *Metascardovia* (jeden druh), *Parascardovia* (jeden druh), *Scardovia* (jeden druh), které jsou úzce fylogeneticky propojené a rod *Gardnerella* (jeden druh). Buňky těchto rodů jsou pleomorfní, vytvářející dlouhé i krátké tyčinky bez specifických rysů, které se vyskytují jednotlivě nebo v mnohočetných řetězcích či vytváří shluky. Buňky jsou grampozitivní (s výjimkou *Gardnerella vaginalis*), nesporeující a nepohyblivé. Jsou převážně anaerobní, avšak některé druhy rodu *Bifidobacterium* mohou tolerovat O₂, ale pouze v přítomnosti CO₂ – *Bifidobacterium psychraerophilum*, *Bifidobacterium scardovii* a *Bifidobacterium tsurumiense*. Další výjimkou jsou i bakterie z rodu *Gardnerella*, které mohou být fakultativně anaerobní či bakterie z rodu *Aeriscardovia*, které mohou růst v aerobních podmínkách. Obecně bývají oxidáza negativní, ale jsou schopné

produkovat enzym zvaný fruktóza-6-fosfoketoláza, který štěpí fruktózu-6-fosfát na acetylfosfát. Jsou to chemoorganotrofní mikroorganismy, které mají fermentační metabolismus a produkují kyseliny, ale nikoliv plyn, z různých uhlohydrátů. Optimální růstová teplota je 30 – 39 °C. Nejsou patogenní, s výjimkou *Bifidobacterium dentium*, *Scardovia inopinata* a *Parascardovia denticolens*, které byly izolovány ze zubního kazu a pravděpodobně se podílejí na vzniku zubního kazu. Dále také *Gardnerella vaginalis*, která může způsobit infekci urogenitálního traktu u obou pohlaví člověka (Whitman 2015).

3.3.7.1 Rod Bifidobacterium

Buňky jsou velmi nepravidelné, často se větvící a zpravidla striktně anaerobní tyčinky (na Petriho miskách nerostou za aerobních podmínek). Jsou heterofermentativní a nevytváří CO₂. Vyskytují se jednotlivě, v řetězcích, ve hvězdicovém nebo palisádovém uspořádání. Typické pro jejich tvarové seskupení buněk je také formování do písmene „V“ nebo „Y“. Vytváří kolonie, které jsou na polotuhých médiích hladké, vypouklé, s hladkými okraji, smetanově bílé, lesklé a s měkkou konzistencí. Jejich optimální růst se pohybuje v rozmezí 37 – 41 °C, avšak hraniční teploty jsou v rozmezí 25 – 28 °C pro minimum a 43 – 45 °C pro maximum. Jsou nepohyblivé a nesnáší dobře prostředí, které je hodně kyselé (nerostou při pH 4,5 – 5). Jejich optimální růst je při pH 6,5 – 7. Proto je jejich životaschopnost v mléčných výrobcích značně omezená. Látky, které posilují jejich přežití ve výrobcích je např. κ-kasein, α-laktalbumin, β-laktoglobulin a hydrolyzáty kaseinu. Další významné růstové faktory, které se zároveň řadí mezi probiotika, jsou galaktooligosacharidy (GOS), fruktooligosacharidy (FOS), inulin nebo rafinóza. Výborným médiem pro růst bifidobakterií je sójové mléko obsahující sacharózu, rafinózu a stachyózu. Proto se vyrábí jogurt ze sójového mléka, u kterého se použije k zakysání standardní jogurtová kultura s přídavkem bifidobakterií. Výsledek má dvojitý pozitivní vliv, konzument přijímá probiotika a zároveň sensorické vlastnosti sójového mléka se fermentací výrazně zlepší (Görner & Valík 2004; Rudolfová & Čurda 2005).

Bifidobakterie mají významnou úlohu v intestinálním traktu člověka (a hlavně u kojenců). Ze sacharidů jsou schopné skrz fermentační metabolismus produkovat kyselinu octovou a mléčnou (v poměru 3:2), které inhibují nežádoucí bakterie a také stimulují intestinální peristaltiku. Z těchto dvou kyselin, představuje kyselina octová silnější antagonistický účinek na nežádoucí gramnegativní bakterie. Protože mají příznivý vliv na zdraví konzumenta, řasí se mezi probiotika (Görner & Valík 2004). Klíčovým enzymem bifidobakterií je fruktózo-6-fosfát-fosfoketoláza (Sedláček 2007).

3.3.8 Shrnutí

V následující tabulce č. 1 je uvedený souhrn vybraných charakteristických znaků u konkrétních rodů.

Tabulka 1: Výčet charakteristických znaků u konkrétních rodů

Rod	Tvar buněk	Typ fermentace	Konfigurace	Hlavní produkty
<i>Lactobacillus</i>	tyčinky	homofermentativní heterofermentativní	DL, D(-)	laktát, diacetyl, acetaldehyd, CO ₂ variabilní
<i>Pediococcus</i>	koky (tetrády)	homofermentativní	DL, L(+)	laktát
<i>Enterococcus</i>	koky	homofermentativní	L(+)	laktát
<i>Leuconostoc</i>	koky	heterofermentativní	D(-)	laktát, acetát, diacetyl, CO ₂
<i>Streptococcus</i>	koky	homofermentativní	L(+)	laktát
<i>Lactococcus</i>	koky	homofermentativní	L(+)	laktát, diacetyl, CO ₂ variabilní
<i>Bifidobacterium</i>	tyčinky	heterofermentativní	L(+)	laktát, acetát

Inspirováno podle Šilhánkové (2008); Vinderola et al. (2019) a Gabrovské (2019).

3.4 Fermentace sacharidů bakteriemi mléčného kvašení

Z historického hlediska je fermentace jedna z nejstarších metod, která byla (a stále je) používána pro přirozenou konzervaci potravin. Nelze určit přesný počátek využívání spontánní fermentace mléka, nicméně odhadovaná doba je kolem 10 000 – 5 000 let př.n.l. Doba, kdy se měnil způsob život lidí a jejich orientace směřovala více k zemědělství a výrobě potravin. Na tuto změnu navázala i domestikace zvířat (ovce, kozy, skot a další). Archeologické nálezy prokázaly, že některé civilizace měly velmi vyspělé zemědělství a už tehdy znaly metody výroby fermentovaných mléčných výrobků (dále už jen FMV). Většina historiků sdílí názor o tom, že způsob výroby jogurtů a FMV byl objeven náhodně, tedy jako výsledek uchovávání mléka v teplých klimatických podmínkách. To mělo za důsledek zvýšení biochemické aktivity mikroorganismů tvořících přirozenou mikrobiotu syrového mléka, což způsobilo samovolnou fermentaci mléka (Gabrovská et al. 2019).

V minulosti byla výroba fermentovaných potravin založená spíše na spontánní fermentaci původní tzv. autochtonní mikrobiotou, která se přirozeně nacházela v surovině. Tento způsob byl později vylepšen přidáváním části dané potraviny pocházející již z předešlé fermentace, což je charakteristické například i pro výrobu chleba a některých sýrů. V současnosti se však průmyslová výroba neobejde bez konkrétních a předem připravených mikrobiálních kultur. Takto připravené čisté mlékařské kultury mají řadu výhod. Jedna z nich je zamezení kontaminací, ke kterým může dojít při zaočkování již zfermentovanými surovinami. Další výhodou je zkrácení doby fermentace (Rakická et al. 2015).

Jedna z funkcí těchto bakterií je funkce technologická, která byla jako první známa a žádána. Souvisí se schopností BMK přeměňovat substráty (sacharidy, lipidy, bílkoviny) na metabolity, které ovlivňují chuť, vůni a konzistenci potravin. Především je ale spojena s metabolismem sacharidů, který je u BMK zároveň spřažen i s fosforylací na úrovni substrátu, čímž poskytuje buňkám adenosintrifosfát (ATP) potřebný pro biosyntézu. Nejčastějšími výchozími substráty jsou sacharidy či jejich deriváty a také meziprodukty jejich metabolismu. Hned na začátku se veškeré sacharidy štěpí na monosacharidy, které se jednotlivými kroky

přeměňují na glukózu, která je důležitá pro průběh fermentačního procesu. Konečnými produkty jsou vždy organické kyseliny (např. kyselina mléčná a octová) a dále alkoholy (např. ethanol), plyny (CO₂). Protože BMK nemají schopnost respirace, musí získávat energii touto cestou. Fermentace hexóz je realizována pomocí dvou základních metabolických drah – homofermentativní a heterofermentativní rozklad (Martin & Maurice 2008; Vinderola et al. 2019).

3.4.1 Homofermentativní rozklad

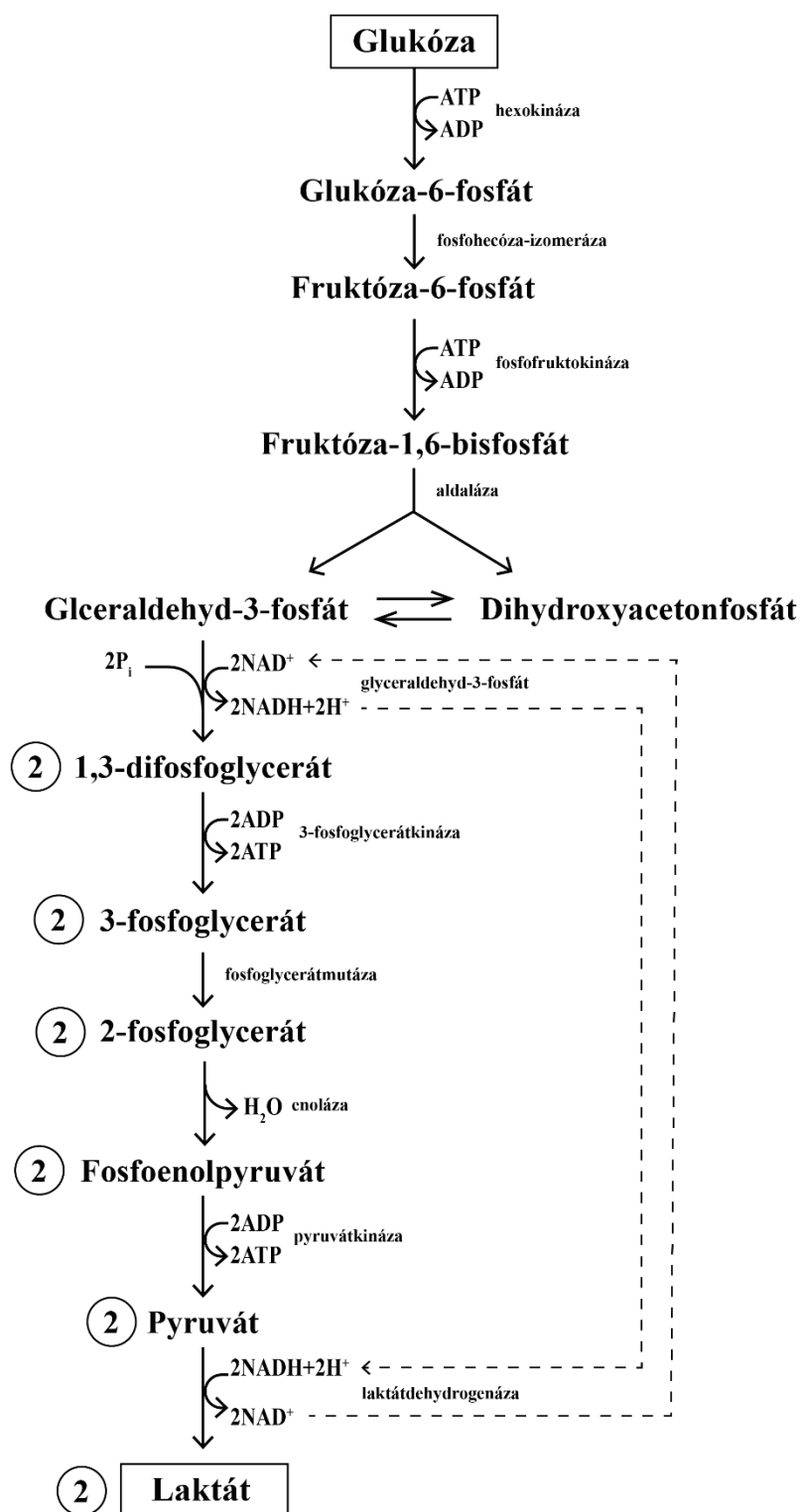
Homofermentativní rozklad je založen na glykolytickém rozkladu neboli glykolýze. Pomocí homofermentativního rozkladu se z 1 molu glukózy vyprodukuje 2 moly ATP. Jedná se o proces zvaný Embden-Meyerhof-Parnasova dráha (EMP), při němž vzniká teoreticky pouze kyselina mléčná jakožto hlavní produkt (Vinderola et al. 2019). Glykolýza je proces, který zahrnuje sled reakcí, díky kterým se glukóza přeměňuje na energeticky bohatou sloučeninu – pyruvát za současné produkce ATP. U aerobních mikroorganismů schopných respirace po glykolytických reakcích následuje citrátový cyklus a dýchací řetězec. Pyruvát je takto zcela úplně oxidován až na CO₂ a H₂O, což zajistí maximální zisk ATP. Ovšem za anaerobních podmínek je pyruvát přeměňován na kyselinu mléčnou a případně i další látky (kyselina octová, ethanol, CO₂ atd.). Cílem přeměny pyruvátu je vždy i současná přeměna redukovaného kofaktoru NADH na formu (NAD⁺) schopnou znovu dehydrogenovat další molekulu substrátu při glykolýze (Sorfová et al. 2005; Martin & Maurice 2008).

Hexózy jsou pro glykolýzu důležité kvůli tomu, že zdroj energie (fermentovaná látka) musí být rozložitelný na dvě sloučeniny v ekvimolárním poměru a musí docházet ke vzniku molekuly ATP, což glukóza splňuje. Zároveň je také důležité pro tento proces, aby každá dehydrogenace byla vyvážena redukcí. Každé NADH musí být schopné reoxidace na NAD⁺. K tomu, aby tento proces mohl proběhnout musí být bakterie vybavené enzymy, které jsou nezbytné pro katalýzu každé reakce (Martin & Maurice 2008; Vinderola et al. 2019).

Nicméně celý proces glykolýzy lze rozdělit do tří hlavních fází: aktivace glukózy dvojnásobnou fosforylací, dehydrogenace glycerinaldehyd-3-fosfátu a vznik pyruvátu. V první fázi se na glukózu spotřebují 2 moly ATP, aby mohlo dojít k aktivování dvojnásobnou fosforylací. První fosforylací (spotřeba 1 molu ATP) dojde ke vzniku glukóza-6-fosfátu. Reakci katalyzuje enzym hexokináza. Poté následuje izomerace za pomoci enzymu fosfohexózaizomeráza. Díky tomu dojde ke vzniku fruktóza-6-fosfátu. Druhá fosforylace se považuje za nejpomalejší reakci celého řetězce a slouží tak k jeho regulaci. Reakci katalyzuje fosfofruktokináza. Dojde tedy ke vzniku hexózabisfosfátu (fruktóza-1,6-bisfosfátu), který se následně rozpadne na fosforečné estery dvou trióz. Vzniklé triózy se nazývají dihydroxyacetonfosfát a glycerinaldehyd-3-fosfát. Tyto sloučeniny jsou ve vzájemné rovnováze. Následuje dehydrogenace glycerinaldehyd-3-fosfátu, který je oxidován glycerinaldehyd-3-fosfát-dehydrogenázou za vzniku 1,3-bisfosfoglycerát. Tento děj je jediný oxidační děj celé glykolýzy, který je uskutečňován pouze odebráním atomů vodíku. Jedná se tedy stále o proces probíhající za anaerobních podmínek. Molekula vody poskytuje kyslík a druhý atom vodíku. Uvolněná energie je použita na syntézu molekuly ATP. Dochází k regeneraci redukované formy koenzymu (NADH → NAD⁺). Je to proto, aby mohla probíhat dehydrogenace dalšího glycerinaldehydu. Následuje přeměna na 3-fosfoglycerát za pomoci katalyzátoru 3-

fosfoglycerátkináza. Touto přeměnou dochází ke vzniku ATP. Poté dochází k přeměně na 2-fosfoglycerát za účasti fosfoglycerátmutázy. Dále za účasti enolázy vzniká fosfoenolpyruvát a uvolňuje se voda. Z fosfoenolpyruvátu vzniká už konečný produkt glykolýzy a to pyruvát. Za účasti pyruvátkinázy a současného vzniku 1 molu ATP (Vodrážka 1996; Sorfová et al. 2005; Martin & Maurice 2008).

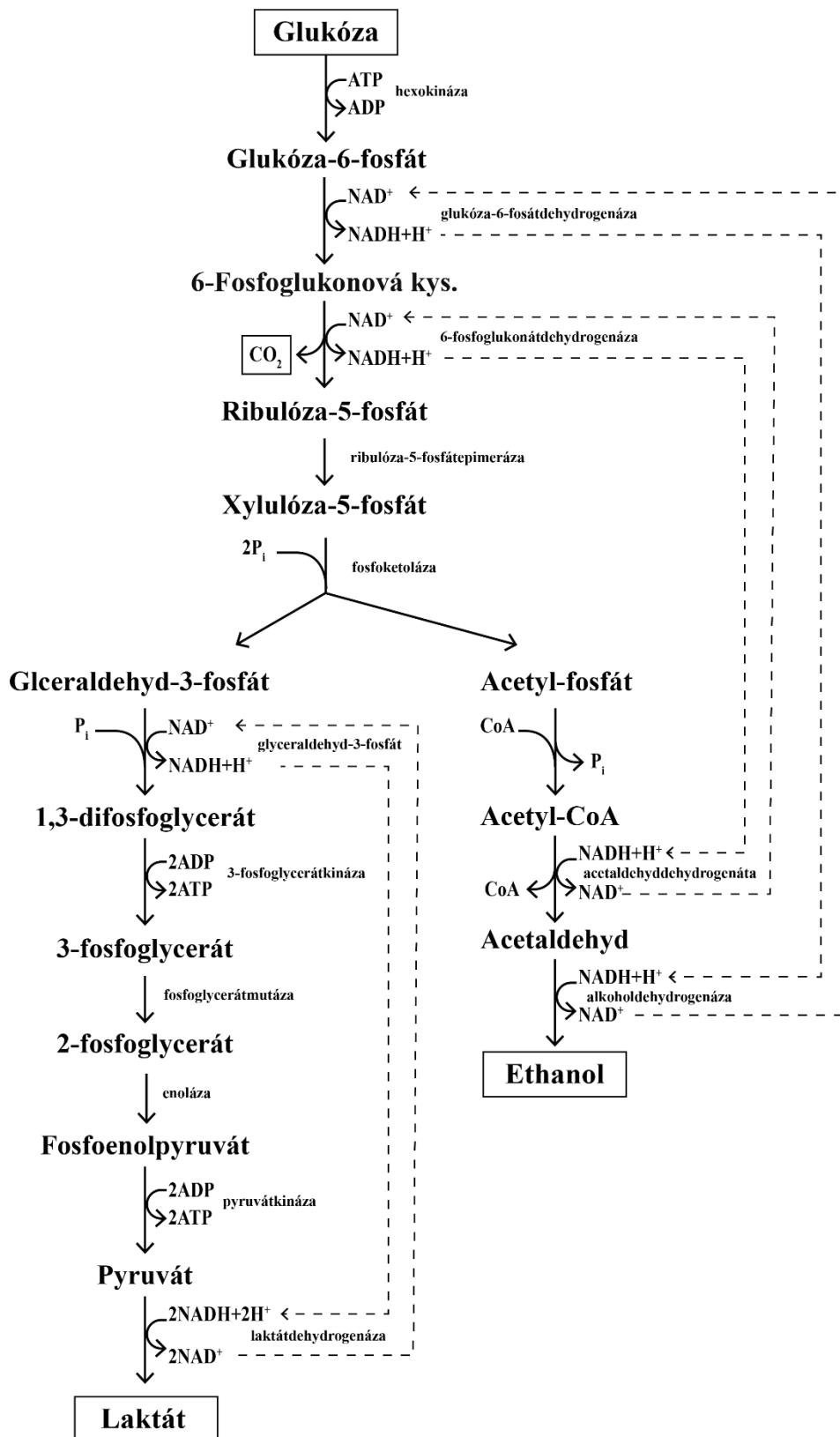
Pyruvát je dále redukován na anion kyseliny mléčné (α -hydroxypropanové), tzv. laktát. Proces přeměny začíná přechodem redukováného koenzymu NADH z glyceraldehyd-3-fosfát na apoenzym laktátdehydrogenázu. Apoenzym se reakcí s pyruvátem reoxiduje a pyruvát se naopak redukuje na laktát. Od té doby, kdy se se glyceraldehyd-3-fosfát přemění na 2 moly 1,3,-difosfátglycerátu, jsou veškeré další meziprodukty i finální produkt laktát po dvou molech. Konečným produktem jsou tedy 2 moly laktátu a získáno jsou 2 moly ATP (Vodrážka 1996; Sorfová et al. 2005; Martin & Maurice 2008). Celý tento proces je popsán na obrázku č. 4.



Obrázek 4: Homofermentativní rozklad (inspirováno podle Klabana (2005); Martin & Maurice (2008) a Lahtinen et al. (2012))

3.4.2 Heterofermentativní rozklad

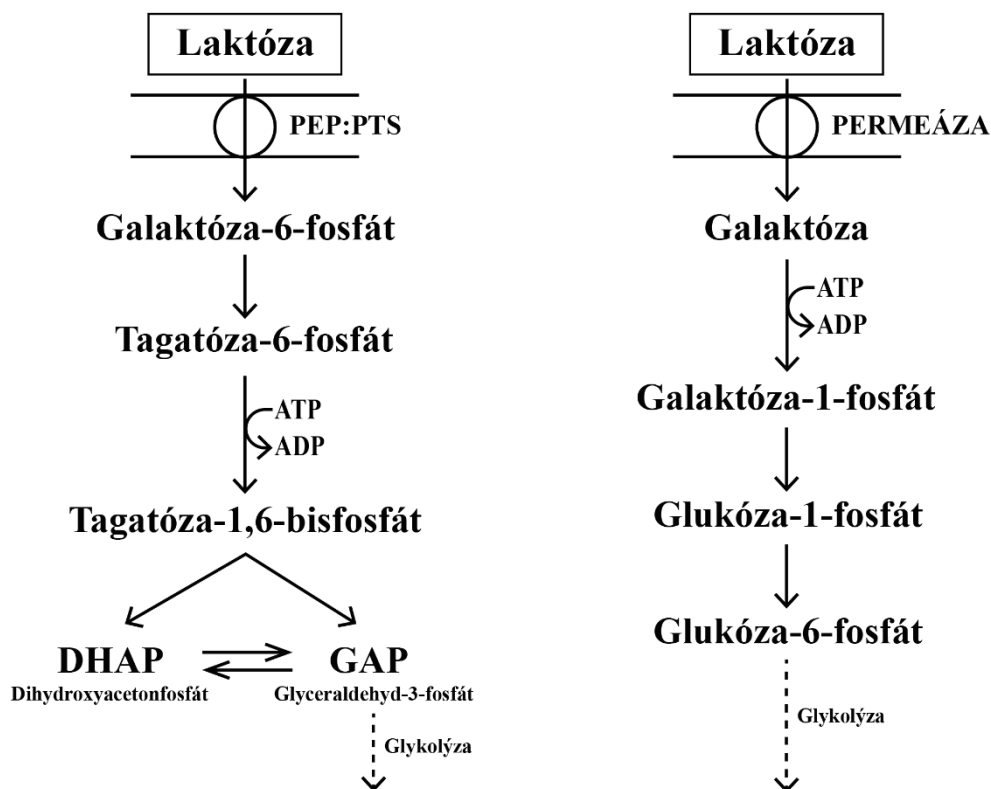
Naproti tomu heterofermentativní rozklad, též známý jako pentózo-fosfoketolázová dráha či 6-fosfoglukonátová dráha, produkuje kromě kyseliny mléčné i významné množství oxidu uhličitého (CO₂), ethanolu či kyseliny octové. Touto cestou se z 1 molu glukózy vyprodukuje 1 mol ATP, 1 mol CO₂, 1 mol kyseliny mléčné a 1 mol ethanolu, pokud se tedy acetylfosfát vytvořený jako meziprodukt, redukuje na ethanol. Když se vytvořený acetylfosfát přemění na kyselinu octovou a v přítomnosti jsou dané akceptory elektronů, tak se vytvoří další ATP. A také platí, že pokud látky, které do reakce vstupují, nejsou hexózami nýbrž pentózami (ribulosa-5-fosfat, xylulosa-5-fosfat), tak samozřejmě nebude vznikat žádný oxid uhličitý (Vinderola et al. 2019). U zástupců heterofermentativního kvašení chybí základní enzymy glykolytické dráhy, kterými jsou aldoláza a triózofosfátizomeráza. Proto je průběh fermentace odlišný. Aldoláza je totiž glykolytický enzym, který štěpí hexóza-1,6-bisfosfát na dva vzniklé triózafosfáty. Tudíž musí zvolit jinou cestu přeměny hexóza a tou je přeměna skrz oxidační mechanismus hexózafosfátového zkratu v pentóza-5-fosfát za vzniku CO₂. Pentóza-5-fosfát se poté enzymově štěpí na acetylfosfát a glycerinaldehyd-3-fosfát. Z acetylfosfátu vzniká acetaldehyd, který se dále přeměňuje na ethanol. Obě tyto přeměny probíhají opět za spolupráce redukováného kofaktoru. U glycerinaldehyd-3-fosfát dochází pomocí glykolýzy k přeměně na pyruvát a následně na laktát. Tento sled reakcí a vzniklé meziprodukty probíhají za účasti stejných enzymů, jako tomu bylo u homofermentativního procesu. S tím rozdílem, že nevznikají 2 moly ale pouze 1 mol. Shrnutím tohoto celého procesu je tedy zisk 1 molu ATP, jelikož 2 moly ATP jsou během procesu spotřebovány a 1 mol ATP vzniká během přeměny 1,3-difosfoglycerátu na 3-fosfoglycerát za účasti katalyzátoru 3-fosfoglycerátkinázy (Vodrážka 1996; Sorfová et al. 2005; Šilhánková 2008). Celý tento proces je popsán na obrázku č. 5.



Obrázek 5: Heterofermentativní rozklad (inspirováno podle Klabana (2005), Martin & Maurice (2008) a Vinderola et al. (2019))

I tak ale neznamená, že homofermentativní či heterofermentativní rozklad bude probíhat vždy stejně. Jinými slovy finální produkty i jejich zastoupení je odlišné pro jednotlivé mikroorganismy. A zároveň i u stejného mikroorganismu je pozorovatelná odchylka fermentačního metabolismu, pokud se jedná například o různé substráty pro fermentaci (galaktóza versus maltóza) (Papagianni 2012). Existují třeba i výjimky, jako například homofermentativní přeměna pentózy či fruktózy určitým obligátně heterofermentativním laktobacilem (Vinderola et al. 2019).

Při rozkladu jiné hexózy, než je glukóza (například manóza, galaktóza, fruktóza), vstupují tyto látky do dvou hlavních cest rozkladu až po přeměnách pomocí izomerace a fosforylace jako glukóza-6-fosfát nebo fruktóza-6-fosfát. U galaktózy existují dvě cesty přeměn v závislosti na tom, zda vstoupí do buňky jako galaktóza-6-fosfát prostřednictvím PEP:PTS (fosfoenolpyruvát fosfotransferázový systém), nebo ve formě volné galaktózy importované do buňky pomocí specifického přenašeče tzv. permeázy. V prvním případě PEP:PTS transportu je laktóza nejdříve fosforylována a následně štěpena enzymem fosfo- β -D-galaktosidázou na galaktózu-6-fosfát a glukózu. Glukóza pak dále pokračuje do hlavních fermentačních drah a galaktóza-6-fosfát je dále metabolizována prostřednictvím tagatóza-6-fosfátové dráhy. Bylo zjištěno, že některé kmeny *Streptococcus thermophilus* a termofilních laktobacilů nejsou schopné metabolizovat galaktózu, a tak ji vrací zpět do vnějšího prostředí. Druhý případ je ten, kdy laktóza vstupuje do mikrobiálních buněk skrz specifickou bílkovinu – permeázu. Tento proces se nazývá Leloirova dráha. Laktóza je poté hydrolyzována uvnitř buňky na glukózu a galaktózu pomocí enzymu β -galaktosidázy a vzniklé hexózy jsou v dalších krocích metabolizovány obvyklými drahami (Horáčková et al. 2018; Vinderola et al. 2019). Tento proces je znázorněn na obrázku č. 6.



Obrázek 6: Proces přeměny galaktózy – Tagatóza-6-fosfátová dráha (vlevo) a Leloirova dráha (vpravo) (inspirováno podle Vinderola et al. (2019))

BMK nefermentují pouze sacharidy, ale některé mohou rozkládat i proteiny a lipidy. Díky proteolýze zvyšují biologickou dostupnost živin, kterými jsou například esenciální aminokyseliny lysin, methionin a tryptofan pro optimální růst a vývoj. Enzymy obsažené v těchto metabolických reakcích posléze hrají klíčovou roli i v charakteristikách daného produktu. Mezi nejvýznamnější enzymy, které jsou produkovány BMK, patří mimo jiné proteázy, lipázy, bakteriociny, glukoamylázy, peptidoglykanové hydrolázy, ureázy a fenenoxidázy. BMK se již mnoho let používají v potravinářském a nápojovém průmyslu. Není to pouze proto, že produkují žádoucí chuťové a senzorycké vlastnosti, ale také zvyšují bezpečnost produktů, protože produkují různé sloučeniny (viz již zmíněný nisin), které inhibují nežádoucí bakterie včetně patogenů (García-Cano et al. 2020). V následujícím kapitolech je proteolytická i lipolytická aktivita blíže popsána.

3.5 Proteolytická aktivita

BMK mají velmi dlouhou historii v použití ve výrobních procesech fermentovaných potravin. Díky tomu bylo vynaloženo i velké úsilí k prozkoumání a manipulaci metabolických procesů BMK. V současnosti tato rozmanitá skupina bakterií zahrnuje druhy, které patří mezi

nejlépe prostudované mikroorganismy. Významnou pozornost u těchto bakterií získala i jejich proteolytická aktivita, která je jedním ze zvláštních fyziologických znaků BMK, o nichž byly získány podrobné znalosti. Proteolytický systém zapojený do využití kaseinu poskytuje buňkám esenciální aminokyseliny důležité pro jejich růst v mléčných výrobcích. Pro BMK je důležitá hydrolýza proteinových substrátů kvůli jejich omezené kapacitě pro syntézu aminokyselin s využitím anorganických zdrojů dusíku. Kasein v mléce je štěpen na oligopeptidy o různé velikosti pomocí serinové proteázy, která je vázaná na buněčnou stěnu. Velké peptidy (složené z více jak tří aminokyselin) jsou přeneseny do buňky transportním systémem pro oligopeptidy, pro dipeptidy a tripeptidy existují odlišné transportní systémy. Samozřejmě má proteolýza i další průmyslový význam, a to například díky svému podpoře k rozvoji organoleptických vlastností FMV. Za nejvíce prostudovaný mikroorganismus z BMK je nyní stanoven *Lactococcus lactis*. Používá se jako modelový organismus pro proteolýzu kaseinu, transport, peptidolýzu a její regulaci. Kromě zpracování živin hraje buněčná proteolýza klíčovou roli i při kontrole kvality polypeptidů. V rámci průmyslových procesů jsou tyto bakterie vystaveny různým stresovým podmínkám, to má pravděpodobně za následek i ovlivnění metabolické aktivity, včetně proteolýzy. I když v posledních letech vzrostl zájem o působení stresových podmínek a jejich následků na BMK, tak i přesto jsou současné znalosti v této oblasti, i co se týče proteolýzy související se stresem, založeny převážně na studiích s *L. lactis* (Savijoki et al. 2006).

Nicméně díky této schopnosti dochází ke zvýšení mnoha žádoucích vlastností potravin jako alternativ k negativně vnímaným geneticky modifikovaným organismům (GMO). Různý průběh hydrolýzy proteinů je zaznamenán podle jejich druhově a kmenově specifických rozdílů v proteolytických systémech. Jejich proteolytický systém je složen ze tří hlavních složek. První složkou jsou extracelulární proteinázy, které hydrolyzují velké proteiny na di-, tri- a oligopeptidy. Druhou složkou jsou specifické transportéry vyskytující se v buněčné stěně, které pak přenášejí tyto peptidy do buňky. Poslední složkou jsou intracelulární peptidázy, které již vytvářejí jednotlivé aminokyseliny pro splnění metabolických požadavků těchto bakterií a pro splnění jejich rozmanitých auxotrofií. Bylo prokázáno, že sekretované bakteriální proteázy degradují kasein (ovlivňující vývoj textury výrobku) a zároveň způsobují uvolnění antimikrobiálních peptidů v jiných grampozitivních bakteriích, což vede ke konkurenčním výhodám v potravinových matricích. Intracelulární peptidázy přispívají k produkci aminokyselin, které pak mohou být enzymaticky přeměněny na aromatické sloučeniny. Samozřejmě vše závisí na typu (endopeptidáza nebo exopeptidáza) a specifčnosti peptidáz (García-Cano et al. 2020).

Kromě rozdílů mezi kmenově a druhově odlišnými bakteriemi může být proteolytická aktivita ovlivněna i dalšími faktory. Jelikož regulace proteolytické aktivity závisí na více podmínkách, jako je např. složení potravinové matrice, dostupnost proteinového substrátu, pH, teplota a bakteriální růstová fáze. Díky poměrně velkému výběru z různých kmenů a druhů BMK s odlišným proteolytickým systémem a jeho aktivitou se v potravinářském průmyslu nabízí obrovské příležitosti, pokud jde o chuť, biologickou dostupnost živin a antigenicitu proteinů. Je prokázáno, že proteázová aktivita BMK hraje významnou roli v organoleptických vlastnostech fermentovaných mléčných výrobků a dalších potravin, včetně chuti a pocitu v ústech (García-Cano et al. 2020).

Aminokyseliny, produkované intracelulární peptidázovou aktivitou, jsou dále přeměněny na alkoholy, aldehydy, karboxylové kyseliny, estery a sloučeniny síry. Tyto přeměněné sloučeniny jsou obzvláště silné, pokud jsou odvozeny od specifických aminokyselin (včetně methioninu a fenylalaninu), nebo aminokyselin s rozvětveným řetězcem (BCAA). Odlišné nutriční požadavky jednotlivých kmenů přispívají ke vzniku chuťového profilu daného výrobku. Pokud se vyskytují ve výrobku dva kmeny využívající různé metabolické dráhy, může docházet tzv. k protokooperaci. Jedná se o dočasný, vzájemně výhodný vztah, ve kterém si tyto kmeny mohou navzájem vypomáhat a vyplňovat tak své mezery ve schopnostech jejich metabolismu. Díky této možnosti dochází ke vzniku vyváženějších chuťových profilů. Například u některých kmenů byly hlášeny vady chuti způsobené hořkostí. Tyto vady se vyvinuly z hydrofobních peptidů obsažených v sýrech (typu čedar a gouda). Nicméně následnou kombinací kmenů (např. *L. lactis*) s vysokou aktivitou PepN (intracelulární peptidáza), došlo k degradaci hořkých peptidů a k zániku nežádoucích příchutí (Smit et al. 2005; van Hylekama Vlieg & Hugenholtz 2007).

Příchut' způsobená proteolýzou BMK hraje roli i v jiných potravinách než pouze v mléčných výrobcích. Jedná se třeba o víno, potraviny získané z obilovin či fermentovaných uzenin. Například během vinifikace (především pomocí *Lactobacilů*) dochází ke vzniku aminokyselin, jako je methionin, které se následně přeměňují na těkavé sloučeniny síry a ovlivňují tak výslednou chuť i vůni vína. Pomocí BMK se může zamezit i tvorbě zákalu, což je jedna z možných vad vína vyplývajících ze srážení hroznového proteinu během fermentace kvasinek. Výrobky na bázi obilovin, jako je například kváskový chléb, se významně spoléhají na BMK nejen kvůli okyselení, ale i kvůli proteolýze, která má také svůj význam pro vývoj chuti. Již bylo provedeno spoustu studií, které prokázaly, že BMK a jejich schopnost fermentace a proteolýzy vytváří žádoucí chuť potravin. S rostoucí poptávkou po bezpečných výrobcích jsou BMK také používány ke snížení lepku v potravinách, jako jsou těstoviny či chleba. Je důležité znát různé metabolické procesy těchto bakterií pro správný výběr startovacích kultur k dosažení požadovaných vlastností výsledného produktu (García-Cano et al. 2020).

Význam biotechnologické aplikace proteolytické aktivity BMK spočívá i ve zvýšení biologické dostupnosti živin. K tomu může dojít například skrze transformaci špatně absorbovaných živin. Třeba kostní prášek, který je bohatým zdrojem kolagenového proteinu a vápníku, je velmi obtížně vstřebatelný pro lidi kvůli složité struktuře kolagenu s trojitou šroubovicí (triple helix). Pomocí fermentace BMK s proteolytickou aktivitou se nejen zlepšuje biologická dostupnost těchto živin, ale zároveň dochází i k produkci bioaktivních peptidů a dalších možných antioxidačních látek (Han et al. 2018). Bioaktivní peptidy se vyznačují celou řadou pozoruhodných vlastností. Mezi jejich hlavní klady patří třeba schopnost snížit krevní tlak, nebo příznivě ovlivňovat imunitní systém prostřednictvím antimikrobiálního působení isracidinu na přítomnost *Staphylococcus aureus* a *Candida albicans*. Bylo prokázáno, že bioaktivní peptidy získané z lyofilizovaného extraktu ze sýru typu Gouda, dokázaly zbrzdit množení buněk způsobujících leukémii. Tyto peptidy jsou všeobecně přirozenou součástí sýrů, a proto se nabízí ideální možnost pro výrobce dodávat na trh produkty se zvýšeným obsahem těchto cenných látek. Samozřejmě se tím zvýší i cena těchto produktů. Velmi významný je v tomto ohledu *Lactobacillus helveticus*, který se používá při výrobě sýrů. Ve srovnání s ostatními BMK se vyznačuje vyšším potenciálem pro tvorbu bioaktivních peptidů. Jeho použití je výhodné i z ekonomického hlediska, jelikož urychluje proces proteolýzy (více

informací je uvedeno na webové adrese <https://www.bezpecnostpotravin.cz/bioaktivni-peptidy-v-syrech.aspx>).

Dokonce i v průmyslu pro zpracování ryb se může využít proteolytická aktivita těchto bakterií pro zhodnocení velkého množství odpadu nebo ke zlepšení biologické dostupnosti současných produktů z rybí moučky a ke snížení výrobních nákladů na chov ryb (Lukic et al. 2019). Podobné návrhy pro využití BMK jsou aplikovány také v oblasti doplňkových krmiv pro zvířata, která vyžadují přesnou rovnováhu aminokyselin pro optimální vývoj zvířat. Jedná se o aminokyseliny jako je lysin, methionin nebo threonin, což jsou zároveň i hlavní aminokyseliny produkované proteolýzou těchto bakterií (Lim et al. 2019).

3.6 Lipolytická aktivita

Lipolytická aktivita je oproti dvěma předchozím metabolickým procesům velmi nízká, méně známá, a tudíž i mnohem méně prostudovaná. Nicméně mezi dva významné enzymy pro rozklad lipidů těmito bakteriemi patří esterázy a lipázy. Mezi esterázami a lipázami neexistuje žádný zásadní biochemický rozdíl, jelikož oba dva enzymy mají společný katalytický mechanismus (Esteban-Torres et al. 2016). Lipázy a esterázy hrají významnou roli ve výrobě fermentovaných potravin. Jedná se například o masné výrobky, sýry, víno nebo o vývoj nových potravinářských výrobků. Tyto enzymy přispívají k vývoji aroma a chuti (García-Cano et al. 2020). Byli to Meyers a kol. (1996), kteří zjistili, že lipázy jsou produkovány BMK jako intracelulární enzymy, které vykazují slabou lipolytickou aktivitu ve srovnání s lipázami z jiných mikroorganismů (bakterie z rodů *Pseudomonas*, *Acinetobacter* a *Candida*). Z více než 100 různých BMK (představující rody *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* a *Streptococcus*), které byly testovány na produkci lipázy, byl tento enzym nalezen pouze u 29 kmenů těchto bakterií. Pro průmyslové využití je tedy pravděpodobně tento enzym získáván z jiných mikroorganismů kvůli účinnější a vyšší produkci tohoto enzymu, a i větší aktivitě. Zároveň však platí, že širší uplatnění v potravinářském průmyslu mají enzymy získávané z bakterií se statusem GRAS (Generally Recognised As Safe) – používaný v USA (Meyers et al. 1996). Pár let byly provedeny další studie, které potvrdily přítomnost intracelulárních enzymů u rodů *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* a *Leuconostoc*. Enzymovou hydrolýzou triacylglycerolů vznikají volné mastné kyseliny (volné MK), které pak mohou být dále přeměněny za vzniku hydroxykyselin, ethylesterů, thioesterů, laktonů, alkan-2-onů nebo alkan-2-olů. Volné mastné kyseliny tvořené ze 4 – 10 atomů uhlíku mají značný vliv na sensorické vlastnosti potravin. Podobně je tomu i u těkavých sloučenin vznikajících při katabolismu mastných kyselin (Horáčková et al. 2018).

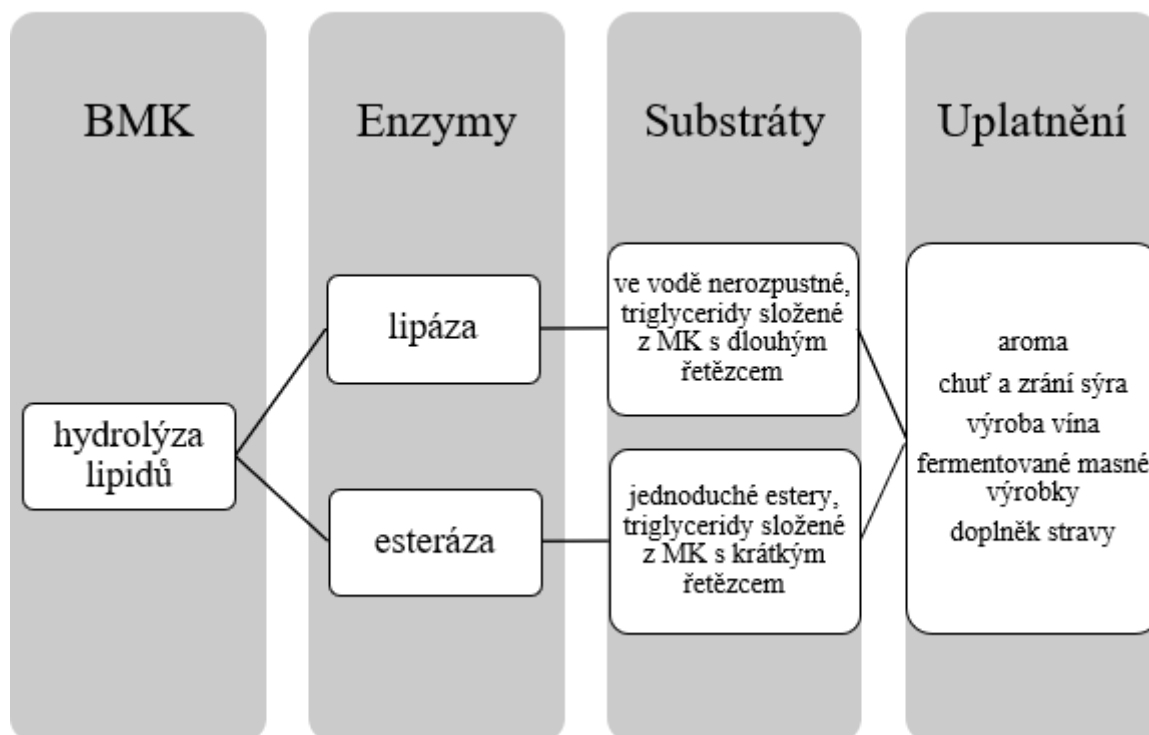
Nicméně v nedávné studii vykazovalo lipolytickou aktivitu až 50,3 % ze 137 BMK izolovaných z mléčných výrobků. Opět se jednalo o intracelulární lipázy. V mléčných výrobcích hydrolyzují lipázy, jež jsou uvolňovány do potravinových matic, mléčný tuk (triacylglycerol) na volné MK a přispívají tak k vývoji chuti a také k úpravě struktury FMV (García-Cano et al. 2020). Kupříkladu během zrání sýrů tento děj zásadně ovlivňuje výslednou chuť výrobku (Esteban-Torres et al. 2016). V jiné studii se zas zaměřili na zkoumání esterázy ovlivňující tvorbu ethylesterů v sýrech typu Camembert. U BMK byla pozorována opět značná variabilita aktivity tohoto enzymu. Například startovací kultura *Lactococcus lactis* se vyznačovala vysokou esterázovou aktivitou. Stejně tomu bylo i u kmene *Lactobacillus*

plantarum. Díky vysoké aktivitě tohoto enzymu pak dochází ke zvýšené tvorbě ethylesterů a odpovídající ovocné chuti v sýru Camembert. A to bez dramatických změn ve fyzikálně-chemických ukazatelích a mikrobiologickém profilu (Hong et al. 2017).

Tím se potvrdila i předcházející studie, kde byl druh *Lactobacillus plantarum* popsán jako významný zdroj esterázy a zároveň i lipolytické aktivity. Je to významný druh pro průmyslovou výrobu FMV. Díky velkému obsahu esterázy vzniká řada produktů, které pak významně ovlivňují organoleptické vlastnosti výrobku. I přesto, že už je k dispozici řada genomových sekvencí z *L. plantarum*, stále existují celkem omezené informace o funkci genů kódujících esterázy. Již byla provedena řada rozsáhlých studií, které byly zaměřené na rozbor komplexního souboru esterázových aktivit v *L. plantarum* WCFS1. Bylo objeveno několik typů esterázových proteinů, které vykazovaly různou specifickou aktivitu. Z tohoto kmene byla získána lipáza, která je zvláště atraktivní pro použití v potravinářském průmyslu. Má několik velmi důležitých vlastností, mezi které patří stabilita až do 25 % NaCl, největší aktivita při 40 °C, dobrá aktivita při teplotě chlazení a dobrá aktivita i za kyselého pH, což je typické pro fermentované potraviny. U kmenů *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 a *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum* 2742 byla také zjištěna význačná lipolytická aktivita. Tyto kmeny tak mohou být potencionálními kandidáty na doplňkové kultury ve výrobě sýrů, čímž se zlepší chuť sýra a urychlí zrání (Esteban-Torres et al. 2016).

Jak lipolytická, tak i esterázová aktivita výrazně ovlivňují vývoj příchutě a aroma výrobků. A nejen, že zlepšují chuť, ale také ovlivňují kvalitu výrobků a urychlují zrání. Tento fakt platí pro mléčné i masné výrobky (př. konzervované maso) (García-Cano et al. 2020). BMK s vysokou esterázovou aktivitou se také používají při výrobě nových potravin či doplňků stravy. Guglielmetti et al. (2008) prověřovali potravinářské startovací bakterie vyznačující se vysokou esterázovou aktivitou. Následně byly tyto bakterie použity k fermentaci potravinářského produktu obsahujícího velké množství kyseliny chlorogenové přirozeně přítomné v potravě. Kyselina chlorogenová je velmi efektivní antioxidant řadící a je řazena mezi hydroxyskořicové kyseliny (polyfenoly) (více informací je na webové adrese <https://www.bezpecnostpotravin.cz/ucinnny-antioxidant-z-kavovych-zrn.aspx>). V důsledku přidání těchto studovaných bakterií byla kyselina chlorogenová hydrolyzována esterázou za vzniku velkého množství kyseliny kofeové (fenolická sloučenina), což je také významný antioxidant. Výsledkem byl tedy produkt, vykazující se velmi silnou antioxidační aktivitou, ale navíc ještě s probiotickým potenciálem. Pro tuto studii byl vybrán kmen *Lactobacillus helveticus* MIMLh5 pro svou silnou esterázovou aktivitu (Guglielmetti et al. 2008).

Další využití lipolytické aktivity je třeba k produkci konjugovaných mastných kyselin (CLA) prostřednictvím lipázy, která katalyzuje hydrolýzu triacylglycerolu. Některé izomery CLA se používají například v doplňcích stravy, medicíně a nutraceutikách. CLA jsou využívány v těchto odvětvích díky jejich fyziologickým vlastnostem. CLA chrání před aterosklerózou, redukuje tělesný tuk a mají antikarcinogenní účinky. Samozřejmě vše jen do určité míry. BMK jsou schopné produkovat CLA z kyseliny linolové (García-Cano et al. 2020). Jak zde bylo popsáno, lipolytická aktivita BMK je využívána v řadě průmyslových aplikacích. Oba enzymy jsou specifické a vážou se na odlišné substráty. Typ substrátů a použití těchto enzymů pro různé účely je shrnuto v následujícím obrázku č. 7.



Obrázek 7: Hydrolyza lipidů (inspirováno podle García-Cano et al. (2020))

3.7 Další významné vlastnosti BMK či jejich metabolitů

Výskyt BMK se obecně pojí s prostředím bohatým na živiny, jako jsou živočišné potraviny (maso, mléko) nebo rostliny (traviny, zelí, olivy). Jak již bylo zmíněno, BMK využívají ke svému růstu fermentovatelné sacharidy, vitaminy, nukleotidy, peptidy a aminokyseliny. Některé druhy jsou součástí přirozené mikroflóry zažívacího traktu a vagíny lidí i zvířat. Tradičně se používají pro zkvašování potravin i krmiv (Horáčková et al. 2018). Typickými příklady fermentovaných potravin a krmiv je rozsáhlý sortiment fermentovaných mléčných výrobků, maso, kváskový chléb, víno, zelenina a siláž (Fernández et al. 2015).

BMK jsou všeobecně považovány za mikroorganismy přinášející řadu benefitů. Některé druhy jsou považovány i za zdraví prospěšné – tzv. probiotické bakterie (zvláště z rodu *Lactobacillus*). Ale existují i rody (rod *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus* a *Carnobacterium*) obsahující druhy/kmeny, které jsou pro lidi i zvířata prokazatelně patogenní. Z tohoto důvodu je důležité znát přesné taxonomické zařazení, molekulární biologii a metabolismus BMK tak, aby bylo možné využít pouze kladných vlastností a vyvarovat se negativním účinkům na zdraví způsobených patogenními mikroorganismy (Lahtinen et al. 2012).

BMK hrají důležitou roli v několika průmyslových odvětvích po celém světě. Poskytují přirozený způsob výroby bezpečných, udržitelných a ekologických produktů pro řadu průmyslových odvětví. Inovace těchto produktů je klíčovým požadavkem, aby tato odvětví přežila a rostla globálně (Johansen 2017). Pro průmyslovou výrobu fermentovaných potravin se BMK používají velmi hojně. Nejdůležitější uplatnění z hlediska fermentace je v mlékárenském průmyslu. V tomto odvětví je ohromné množství FMV. Další v řadě je průmysl fermentovaných masných produktů a fermentovaných rostlinných produktů. BMK se nepoužívají pouze pro produkci potravin, ale také v řadě dalších průmyslových aplikacích. Jako zejména pro výrobu kyseliny mléčné, produkce metabolitů podílejících se na vývoji příchutí a textury výrobků, zdravotnické prostředky, antimikrobiální peptidy (AMP) a probiotické

produkty. Tudiž je již zřejmé, že BMK mají několik funkcí, mezi které patří funkce technologická, nutriční, protektivní a probiotická. Díky tomu, že mají BMK poměrně jednoduchý metabolismus a malou velikost genomu (celkový genový obsah haploidní sady chromozomů jádra buňky) ~ 2 – 3 Mb, se stávají významnými kandidáty pro metabolické inženýrství (Papagianni 2012).

Pro potravinářské aplikace využívající tyto bakterie má význam i syntéza texturně důležitých látek jako jsou exopolysacharidy. Tyto látky mohou být syntetizovány vybranými kmeny BMK z galaktózových, glukózových či rhamnózových jednotek. Jejich produkce se pozitivně osvědčila např. při ovlivnění textury fermentovaných výrobků nebo ochraně buněk BMK před napadením virem infikující bakterie (bakteriofág). Senzoricky významné látky produkované BMK jsou tvořeny hlavně organickými kyselinami (kyselina mléčná, kyselina octová), aldehydy a ketony (acetaldehyd, diacetyl) a směsí těkavých metabolitů vznikajících rozkladem sacharidů, bílkovin či lipidů a jejich vzájemnými reakcemi (Horáčková et al. 2018).

3.7.1 Genové inženýrství

Mikrotovary či takzvané buněčné továrny využívají BMK pro produkci metabolitů, které jsou využívány v potravinářském, chemickém, farmaceutickém i kosmetickém průmyslu. V tomto odvětví se specialisté zaměřují hlavně na přeměrování pyruvátového metabolismu za účelem produkce důležitých konečných fermentačních produktů, např. na látky ovlivňující příchutě či aromatické sloučeniny. Využívají se i složitější biosyntetické dráhy k produkci různých vitaminů a exopolysacharidů (EPS). EPS jsou vysokomolekulární látky, které jsou složeny z monosacharidů a necukerné složky. Tyto látky jsou specifické pro jednotlivé mikroorganismy. Jako jeden z modelových organismů pro metabolické inženýrství je *Lactococcus lactis*, u kterého již byla získána kompletní znalost genomové sekvence. Regulace glykolýzy a následné zvýšení úrovně produkce kyseliny mléčné je zjevný cíl metabolického inženýrství. V tomto případě hraje významnou roli enzym zvaný fosfofruktokináza, který ovlivňuje tento děj. Pokud se zvýší aktivita PFK, zvýší se zároveň i produkce laktátu. Jelikož je cílem získat co největší množství laktátu, bude metabolické inženýrství zaměřeno na homofermentativní mikroorganismy. Inaktivace genu D-laktátdehydrogenázy vede ke tvorbě čisté kyseliny L(+) mléčné (Papagianni 2012).

Ačkoliv v přírodě existuje mnoho zdrojů enzymů, tak jsou v průmyslu nejpoužívanější právě ty, které pocházejí z mikroorganismů. Je to samozřejmě hlavně díky nízkým nákladům a vysokému výtěžku produkce. Navíc mikroorganismy jsou jedním z mála zdrojů, které splňují většinu nebo dokonce všechny žádoucí vlastnosti a průmyslové požadavky na enzymy. V průmyslu je jedním z nejžádanějších rysů hlavně termostabilita enzymů. Takové enzymy se vyskytují hlavně u extremofilních bakterií. Avšak izolace a kultivace těchto mikroorganismů nejsou vůbec snadné. Proto bylo vyvinuto mnoho biotechnologických nástrojů vedoucích ke zvýšení termostability i těchto enzymů, které nepocházejí z těchto extremofilních bakterií. Mikrobiální enzymy mohou být modifikovány proteinovým inženýrstvím, chemickými a genetickými modifikacemi, imobilizací (např. pomocí adsorpce, kovalentního připojení, zachycení, zesílení a enkapsulace) (Dey et al. 2016).

Úspěšná produkce enzymů z BMK vyžaduje řadu procesů včetně optimalizace, čištění, charakterizace enzymů, stabilizace, imobilizace apod. V mnoha případech je množství sledovaného enzymu produkovaného BMK velmi nízké. Účinnost produkce totiž závisí na několika faktorech, jako jsou kultivační podmínky, přítomnost antibiotik, metabolický stres a další. Použití technik molekulární biologie (př. klonování, exprese a konjugace) v heterologních systémech otevírá příležitosti dalším studiím a potenciálně novým aplikacím v potravinách. Přenos genetické informace je jedna z možností, jak zlepšit účinnost produkce enzymů a tím zvýšit i aktivitu. V jedné studii se pro přenos genetické informace u BMK použily tři procesy: transformace, transdukce a konjugace. Všechny tyto procesy vedou k vyšší

produkcí a většímu využití bakteriálních enzymů. Konjugace je přirozený mechanismus, pomocí kterého mohou být geny přenášeny z jedné bakterie do druhé. Například pro rod *Lactococcus* se běžně pro konjugaci používají plazmidy (konkrétně typ Pmrc01). *Lactococcus lactis* je celosvětově používaný druh k výrobě FMV. Schopnost *L. lactis* rychlého růstu a okyselování mléka je již dlouho známa a je zkoumána v závislosti na řadě znaků kódovaných právě plazmidy. Transformace je na rozdíl od konjugace pomalejší metoda, která vyžaduje pro příjem volnou DNA (Lacroix 2010; Ainsworth et al. 2014).

Existuje několik společností, které vedou trh s průmyslovými enzymy a poté je prodávají. Tyto enzymy, které jsou modifikovány, geneticky a chemicky vybrány díky vylepšeným vlastnostem, jako je specifčnost substrátů, specifická aktivita, stabilita vůči pH a teplotě. V potravinářském průmyslu se enzymy používají například pro výrobu krystalické glukózy či různých glukózových a fruktózových sirupů. Nicméně pro průmyslové aplikace je nutné zvýšit produkci těchto enzymů a přibližně 90 % použitých průmyslových enzymů je exprimováno pomocí technologií rekombinantní DNA. Jedná se o obecný postup, při kterém se z buněk izolují jednoduché geny a následně se zavádějí zpět do buněk stejného či odlišného druhu organismu (García-Cano et al. 2020).

BMK jsou významným potravinářským zdrojem laktázy (β -galaktosidázy). Tento enzym se získává z bakterií bez nutnosti enzymatického čištění, což je pro průmysl velice efektivní a ekonomické. Významné kmeny, ze kterých enzym získává jsou např. *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus reuteri* a *Carnobacterium piscicola*. Laktáza je jeden z nejvýznamnějších enzymů pro biotechnologické zpracování v potravinářském průmyslu. Hlavním účelem tohoto enzymu je vyrábět produkty neobsahující laktózu pro spotřebitele trpící laktózovou intolerancí, tzn. Neschopnost organismu strávit mléčný cukr (laktózu). Její dalším využitím může být pro zlepšení krémovitosti zmrzlin. Jelikož laktóza je hygroskopická, může v některých produktech tvořit krystaly. V tomto případě se použije laktáza, která zabrání nežádoucí krystalizaci a navíc zvyšuje sladkost produktů (García-Cano et al. 2020).

3.7.2 Kyselina mléčná a její využití

Kyselina mléčná se používá jako konzervační (okyselující) prostředek či jako aromatická látka v potravinářském průmyslu. Pokud se jedná o okyselující prostředek, lze ho najít pod číslem E-270. Pokud bude mít přídatná látka toto označení a bude se jednat o kyselinu mléčnou pouze v L(+) formě, je povolena při výrobě pokračující kojenecké výživy. Okyselující prostředek způsobuje kyselou chuť výrobku, ale také zabraňuje množení zárodků. Udržuje tak výrobek na původní požadované úrovni. Dále může být kyselina mléčná využívána například jako emulgátor. V tomto případě je její označení pod číslem E 472. Konkrétně se jedná o estery mono- a diacylglycerolu s kyselinou mléčnou. Emulgátory jsou povrchově aktivní látky umožňující vznik emulzí (zejména dispergování tuků ve výrobku). Pokud bude označení pouze E 472 jedná se o přídatné látky z hlediska stabilizace důležitých fyzikálních vlastností potravin (Babička 2012). Jako emulgátor se může využívat i v kosmetickém průmyslu. Významné je i její využití pro syntézu opticky čistých léčivých látek či jako meziprojektu ve farmaceutických procesech (Papagianni 2012).

3.7.3 Kyselina polymléčná

Kyselina mléčná je velmi rozšířenou organickou kyselinou používanou v průmyslových výrobcích. Její využití je mnohostranné a důležitou roli hraje v průmyslu i jako výchozí materiál pro výrobu cenných „syntetických“ biopolymerů. Jedná se o vysokomolekulární látku zvanou kyselina polymléčná (PLA). Kyselina L(+)-mléčná, jejíž systematický název je poly[oxy(1-methyl-2-oxo-1,2-ethandiyl)], je získávána fermentací polysacharidů. Ekonomická dostupnost této kyseliny i technologický proces polymerace přispívají k atraktivitě polymeru, který se začíná uplatňovat v řadě zajímavých oblastí. Očekává se, že PLA nahradí různé polymery, které jsou tradičně vyráběny z fosilních (neobnovitelných) zdrojů, jako je ropa. Po tomto polymeru rychle roste poptávka, a to v celosvětovém měřítku. Zařazuje se mezi biopolymery, což je tzv. bioplast, který je vyroben z monomerů získávaných z biomasy (Brožek et al. 2015).

Nakládání s odpady kvůli enormní výrobě a spotřebě plastů je bohužel velký a stále se rozšiřující problém 21. století. Díky své biologické rozložitelnosti a dobrým vlastnostem je PLA velmi významnou alternativou pro polymery na bázi fosilních paliv. Avšak rostoucí produkce se zvýšenou mírou degradace by mohla způsobovat problémy s nakládáním s odpady. V tomto ohledu je důležitá recyklace. Již byly zjištěny jednoduché a přijatelné kroky recyklace toho biopolymeru. Například tepelné zpracování zbytků PLA představuje jednoduchý, efektivní a šetrný způsob k životnímu prostředí a vede tak ke zlepšení recyklovatelnosti (Beltrán et al. 2020).

3.7.4 Protektivní funkce

Protektivní funkce BMK je spojena s produkcí antimikrobiálně aktivních metabolitů, kterými jsou organické kyseliny, diacetyl, acetaldehyd, peroxid vodíku, bakteriociny, deriváty aminokyselin a oxid uhličitý (Kadlec et al. 2012). Organické kyseliny v nedisociované formě efektivně potlačují růst hnilobných bakterií (jako jsou např. bakterie z rodu *Enterobacteriaceae* či *Pseudomonadaceae*), bakterií způsobujících onemocnění z potravin (bakterie z rodu *Shigella*, *Salmonella*, enteropatogenní *Escherichia coli*, *Listeria*) a dokáží potlačovat i toxigenní mikroorganismy (jako je *Staphylococcus aureus* a plísně potenciálně produkující mykotoxiny). Mezi další antimikrobiální látky se mohou řadit i enzymy (lysozym a peroxidáza) a mastné kyseliny (Horáčková et al. 2018). Všechny tyto sloučeniny se v praxi využívají k inhibici růstu a přežívání potenciálně přítomných a technologicky nežádoucích bakterií a různých patogenů způsobujících alimentární onemocnění. Zvyšuje se tak bezpečnost potravin a prodlužuje se tím i jejich trvanlivost. Protektivní kmeny BMK musí působit svou antimikrobiální aktivitou cíleně, tedy pouze na nežádoucí mikroorganismy, nikoliv na technologicky žádoucí. Stejně tak nesmí docházet k přenosu rezistence k antibiotikům na tyto nežádoucí mikroorganismy. V posledních letech se zvýšil zájem o přirozené konzervační prostředky (Kadlec et al. 2012).

Antimikrobiální peptidy jsou skupinou látek s obrovským potenciálem využití jako prostředku mikrobiologické kontroly díky jejich širokému spektru aktivity a také nízké kapacitě pro vyvinutí rezistence. Tyto peptidy nejsou přítomny pouze v bakteriích, ale i v houbách, rostlinách, hmyzu, zvířatech atd (Maria-Neto et al. 2015). Pokud tyto antimikrobiální peptidy pocházejí z bakterií, nazývají se bakteriociny. Jsou používány k inhibici patogenních bakterií a produkují je především BMK. Od antibiotik se liší několika způsoby. Zaprvé, bakteriociny

jsou syntetizovány ribozomálně, naproti tomu antibiotika jsou syntetizována pomocí enzymů. Zadruhé, bakteriociny působí inhibičně již v nanomolárních a mikromolárních koncentracích, zatímco antibiotika se musí používat ve vyšších koncentracích, aby měla inhibiční účinek (μM a mM). Další rozdíl je třeba v použití. Bakteriociny lze použít v klinickém i v potravinářském odvětví, kdežto antibiotika lze použít pouze klinicky (Cotter et al. 2013).

Bakteriociny dokáže syntetizovat všech sedm rodů využívaných pro potravinářský průmysl, které jsou již zmíněny v kapitole 3.2. Pokud pocházejí z bakterií, které mají status GRAS (používaným v USA), není jejich použití limitované. Bakteriociny jsou inaktivovány až proteolytickými enzymy pocházejícími z žaludku (pepsin) a ze slinivky břišní (trypsin a alfa-chymotrypsin). To je velice žádoucí při použití v potravinách, protože jsou inaktivovány gastrointestinálními podmínkami. Bakteriociny produkované gram pozitivními bakteriemi (převážně produkované BMK), byly již podrobně studovány (García-Cano et al. 2020).

Mezi antimikrobiální proteiny se řadí enzym zvaný peptidoglykanová hydroláza (PGH). Jedná se o termolabilní protein. Jeho působení je zaměřeno přímo na buněčnou stěnu, kde dochází prostřednictvím hydrolýzy glykosidických či peptidových vazeb k narušení peptidoglykanu. To má samozřejmě za následek, že exprese tohoto enzymu musí být vysoce regulována, aby nedošlo k buněčné lýze vlastní buňky. Tento typ enzymu může být použit v klinických i potravinářských aplikacích. Navrhované použití tohoto enzymu je buď k inhibici bakterií *Clostridium tyrobutyricum* nacházející se ve zrajících sýrech (způsobují pozdní duření sýrů) nebo ke kontrole růstu nežádoucích bakterií ve vínech. PGH se obecně dělí do čtyř skupin: N-acetylmuramidázy (muramidázy), N-acetylglukosaminidázy (glukosaminidázy), N-acetylmural-L-alanin amidázy (amidázy) a endopeptidázy (García-Cano et al. 2020).

Dalším významným zástupcem antimikrobiálních proteinů jsou glykosidové hydrolázy či glykosidázy (GH), které štěpí glykosidické vazby. GH se nacházejí prakticky ve všech živých organismech. Mezi nejvýznamnější zástupce se řadí amylázy a glukoamylázy (García-Cano et al. 2020).

3.7.5 Probiotická funkce

Slizniční a kožní mikrobiota (dříve mikroflóra) je souhrnný pojem pro všechny přítomné buňky žijících v/na lidském těle. Tato skupina mikroorganismů osidlující vnější či vnitřní povrchy těla obsahuje nejen převažující pozitivní bakterie ale i viry, plísňe, prvoky a parazity. Bakterie se vyskytují tam, kde mají vhodné podmínky pro svoje přežití, růst a reprodukci. Na kůži lze bakterie nalézt především na místech jako jsou kožní záhyby. Nicméně co se týče největšího množství bakterií v lidském těle, tak to lze nalézt určitě v trávicí soustavě. Více než 99 % bakterií (10^{12} v g střevního obsahu) se vyskytuje v tlustém střevě. Celkově se ve střevech člověka nachází více než 10^{14} bakterií. Vznik a následný rozvoj molekulárně-biologických metod znamenal velmi podstatný posun jak pro mikrobiologii, tak i pro medicínu. Získala se řada nových informací o mikrobiotě a jejích funkcích a výrazně se tak změnil pohled co se týče důležitosti těchto mikroorganismů pro lidské tělo. Nové přístupy ke zkoumání těchto mikroorganismů prokázaly, že většina tohoto mikrobiálního světa ve střevě člověka (tj. kolem 70 %) je tvořena bakteriemi, které se zatím nedají běžnými mikrobiologickými metodami kultivovat. I přes značnou variabilitu v těle člověka je střevní mikrobiota tvořena z převažující části zástupci z kmene *Firmicutes* (zahrnující např. rod *Lactobacillus*, *Enterococcus*,

Clostridium atd.) a *Bacteroidetes* (rod *Bacteroides*). Podstatně menší část střevní mikrobioty je pak tvořena zástupci z kmenů: *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Cyanobacteria*, *Fusobacteria* a *Verucomicrobia*. Střevní mikrobiota je složena z více než tisíce bakteriálních druhů, a zřejmě ještě z mnoha více bakteriálních kmenů. Střevní problémy jsou většinou spojeny se změnami v základním složení mikrobioty. Složení mikrobioty je jedinečné pro každého člověka, tedy je zde velká individuální variabilita. Bylo zjištěno, že některé druhy bakterií, s prospěšnými účinky pro organismus, lze nalézt především u zdravých lidí (Gabrovská et al. 2019; Macchione et al. 2019).

Kromě známé úlohy střevních bakterií při štěpení nestravitelných polysacharidů bylo zjištěno, že komenzální bakterie hrají významnou úlohu v mnoha fyziologických procesech, jako např. v metabolismu. V posledních letech se hodně studií zaměřuje na prozkoumání vztahu mezi složením mikrobioty a metabolickými nemocemi (poruchami) např. obezitou. Byly prokázány značné rozdíly u hubených a obézních jedinců ve složení střevní mikrobioty, a to především podíly dvou hlavních bakteriálních skupin (*Firmicutes* a *Bacteroidetes*). Pracovníci různých výzkumných laboratoří se v poslední době snaží analyzovat mechanismy, kterými tyto bakterie ovlivňují využití energie získané z potravy. Snaží se charakterizovat nejvhodnější složení mikrobioty a eventuálně najít takové kmeny bakterií, jejichž podávání by pomohlo při „léčbě“ obezity a jiných metabolických onemocnění, které ohrožují zdraví milionů lidí (Gabrovská et al. 2019; Langella et al. 2019)

Metabolické poruchy spojené s obezitou a kardiometabolickými poruchami jsou totiž celosvětovým problémem. Ač je hodně faktorů, které mohou zapříčinit tato onemocnění, střevní mikrobiota je nyní považována za klíčový faktor narušující energetický metabolismus a zároveň i náchylnost hostitele k těmto několika nepřenositelným chorobám. Nicméně stále dochází k nově objeveným druhům prospěšných bakterií. Mezi relativně nově identifikované a slibné kandidáty nové generace mikrobů patří například druh *Akkermansia muciniphila* slibným kandidátem. Zajímavý poznatek o tomto druhu je, že pasterizace *A. muciniphila* nejen zvyšuje jeho stabilitu, ale co je důležitější, zvyšuje i jeho výkonnost. To je zajímavé pro vývoj nových jak potravinových, tak i farmaceutických doplňků s příznivými účinky. A konečně, specifický protein přítomný na vnější membráně *A. muciniphila*, nazvaný Amuc_1100, by mohl být silným kandidátem pro budoucí vývoj léčiv. Všechny tyto nové poznatky vedou k tomu, že střevní mikrobiota se může stát novým zdrojem budoucích terapií (Cani & Vos 2017).

Jedním z nejzajímavějších zjištění poslední doby je, že tato skupina mikroorganismů zasahuje výrazně i do vývoje funkcí nervového systému a má tak vliv i na naše chování. Úzké soužití lidí a mikrobioty je výsledkem dlouhodobého vyvíjení a vzájemné adaptace obou těchto neoddělitelných složek. Určují naši schopnost adaptace na prostředí, ve kterém žijeme a schopnost bránit se proti neustálému vývoji nemocí. V posledních desetiletích došlo k velmi rychlému nárůstu výskytu alergických a jiných chronických, imunologických nemocí, a to převážně v ekonomicky vyvinutých zemích. Pravidelným nálezem u pacientů zasažených těmito chorobami jsou změny ve složení střevní mikrobioty (Gabrovská et al. 2019). Předpokládá se tedy, že porucha složení a aktivita střevní mikrobioty, známá též jako dysbióza, se podílí na vzniku těchto metabolických syndromů. Již mnoho studií v dnešní době prokázalo, že stravovací návyky lidí silně ovlivňují složení i funkci střevní mikrobioty. To má za následek buď nástup nebo naopak ochranu před metabolickými poruchami (Cani & Vos 2017).

Existuje mnoho studií o úloze střevní mikrobioty a celkového střevního prostředí pro podporu zdraví a prevenci proti nemocem. Bylo prokázáno, že prospěšné bakterie, jako jsou bakterie z rodu *Bifidobacterium* a všeobecně bakterie produkující kyselinu mléčnou, zlepšují střevní prostředí a poskytují tak pozitivní účinek nejen na metabolismus, ale i na imunitu a nervovou reakci. Již několik studií oznámilo, že druh *Akkermansia muciniphila* ovlivňuje metabolismus glukózy, metabolismus lipidů a i imunitu střeva, a že některé složky potravin (např. polyfenoly), mohou značně zvýšit počet *Akkermansia muciniphila* ve střevech (Naito et al. 2018).

Probiotická funkce vyplývá z mnoha aktivit těchto bakterií. Ať už se hovoří o kladných vlastnostech na bázi chemické, biochemické či mikrobiologické povahy, výsledkem je pozitivní působení na zdravotní stav a tudíž i kvalitu života lidí nebo zvířat (Kadlec et al. 2012). Mnoho kmenů, zejména z rodu *Lactobacillus*, mají potvrzeny probiotické vlastnosti. To znamená, že u nich byl vědeckými studiemi opravdu prokázán zdravotní přínos pro konzumenta (Horáčková et al. 2018). Díky zvýšené konzumaci těchto bakterií skrz potravinové výrobky či krmiva dochází k regulaci mikrobioty v těle lidí i zvířat (Fernández et al. 2015).

Mezi charakteristické rysy dysbiózy patří např. ztráta různorodosti (snížení diverzity), nepřítomnost prospěšných bakterií či zvýšený výskyt potenciálně patogenních mikrobů (tzv. patobiontů). Co však zůstává neobjasněno je, zda změny ve složení mikrobioty jsou příčinou nebo důsledkem asociací s patologickými stavy. V poslední době se intenzivně zkoumá spojení mezi střevní mikrobiotou a psychickými poruchami. Osa střeva – mozek je obousměrný komunikační systém, kde jsou zapojeny různé mechanismy, tudíž mikrobiota hraje při poruchách regulace nervového systému celkem významnou roli. Po zjištění, že mikrobiota ovlivňuje efektivitu léčby nádorů, následně stoupl velký zájem u onkologů o tyto mikroorganismy, a to především v moderní imunoterapii. Díky schopnosti mikrobioty ovlivňovat imunitní systém se předpokládá i schopnost mikrobioty ovlivňovat citlivost jedince ke vzniku nádoru, tedy karcinogenezi (Gabrovská et al. 2019).

Ve spojení s potenciálním ovlivněním střevní mikrobioty je dobře prozkoumána skupina vybraných mikrobů, které jsou uváděny na trh jako probiotika. Probiotika jsou definovaná jako živé mikroorganismy, které při podávání v dostatečném množství poskytují hostiteli zdravotní přínos. Stojí za zmínku, že současná většina probiotik prodávaných na trhu zahrnuje převážně mikroorganismy pocházejících z rodů *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Během posledních třiceti let však získaly značnou pozornost i jiné způsoby, jako je třeba konzumace prebiotik. Prebiotika jsou definovaná jako substrát, který je selektivně využíván hostitelskými mikroorganismy, které poskytují zdravotní přínos. Avšak navzdory mnoha objevům molekulárních mechanismů vysvětlujících, jak prebiotika a střevní mikrobiota interagují s hostitelem, je stále obtížné identifikovat bakteriální kandidáty, kteří se zapojují do prospěšných účinků pozorovaných na energii, glukózu, metabolismus lipidů a imunitu (Cani & Vos 2017; Langella et al. 2019).

Rozšiřující se poznatky o významu a důležitosti těchto bakterií vedly ke snaze ovlivnit střevní mikrobiotu nejen změnami ve stravování (což je nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím složení mikrobioty), ale i přímými zásahy (doplňky stravy). Probiotické bakterie se přirozeně nachází v potravinách jako jsou jogurty, sýry atd. Jako probiotika slouží hlavně BMK (bakterie rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*), ale i další druhy bakterií (bakterie rodu *Enterococcus* a některé kmeny *Escherichia coli*) a kvasinky. V tomto ohledu je významný i příjem probiotik.

Prebiotika jsou látky přímo nestravitelné pro člověka (obvykle oligosacharidy), které podporují množení a růst zdravých prospěšných bakterií ve střevě. Patří mezi ně některé sacharidové složky rostlinného původu (např. inulin) nebo uměle vyrobeného pomocí enzymů (např. galaktooligosacharidy). Synbiotika jsou ideálním produktem, jelikož obsahují jak probiotika, tak i prebiotika. Efekty podávání probiotik i prebiotik se stále intenzivně zkoumají po celém světě stejně tak, jako účinky střevní mikrobioty (Gabrovská et al. 2019; Langella et al. 2019).

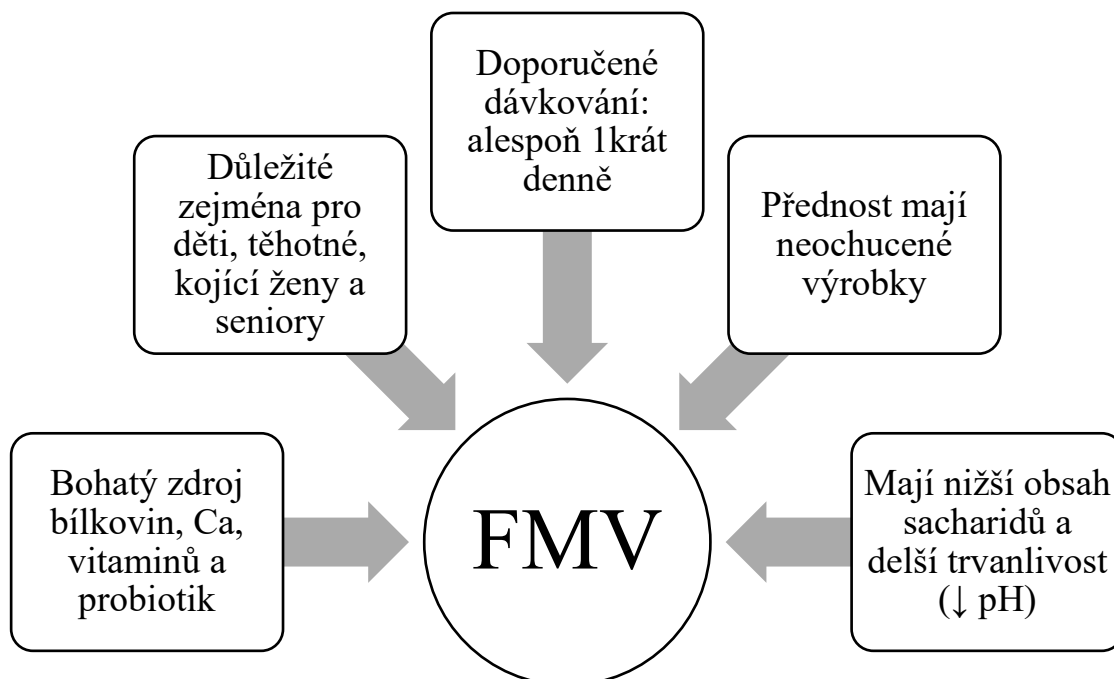
3.8 FMV a jejich význam ve výživě člověka

Lidé konzumují mléko již téměř 10 000 let (tedy od neolitu). Následný vznik a konzumace FMV má už také tisíciletou tradici a je dokonce spojována s dlouhověkostí. Mléko a FMV jsou zdrojem řady důležitých živin a zároveň mají i charakteristicky příjemné sensorické vlastnosti. FMV mají navíc velkou výhodu v obsahu zdravých prospěšných mléčných bakterií, případně i kvasinek. V současné době je z hlediska výživového na mléku a mléčných výrobcích nejdůležitější vysoký obsah dobře využitelného vápníku. Vápník (Ca) obsažený v mléce je využitelný z více než 30 %, kdežto u většiny rostlinných zdrojů je využitelnost pouze 5 – 10 %, u některých výrobků i méně. Je obecně známo, že mléko obsahuje v průměru 120 mg Ca/100 g (Gabrovská et al. 2019).

Mléko obsahuje plnohodnotné bílkoviny, jejichž průměrné zastoupení činí 3,3 %, z toho 2,8 % je množství kaseinu, zbytek je tvořen syrovátkovými bílkoviny. FMV mívají oproti mléku obsah bílkovin většinou o něco vyšší, čehož se docílí samozřejmě zahuštěním či přidáním sušeného mléka. Vysokou výživovou hodnotu (nejvyšší ze všech bílkovin) mají syrovátkové bílkoviny, které se vyznačují pro svůj vysoký obsah rozvětvených aminokyselin – leucinu, izoleucinu a valinu. Z hlediska výživového nemá mléčný tuk příliš vhodné složení, protože obsahuje skoro 2/3 nasycených mastných kyselin. Nasycené mastné kyseliny jsou známé tím, že působí negativně na zdraví člověka, a to zejména z hlediska vzniku kardiovaskulárních onemocnění. Dle výživových doporučení by měl být příjem nasycených mastných kyselin maximálně 10 % z celkového denního energetického příjmu, což vychází na cca 20 g těchto kyselin denně. Nicméně obsah polyenových mastných kyselin se pohybuje v mléčném tuku pouze okolo 2 – 6 % z celkových mastných kyselin. Pozitivní účinky na lidské zdraví mají i mléčné fosfolipidy, které tvoří až 1 % z celkového obsahu tuku. Mléko obsahuje samozřejmě i cholesterol, ale jeho obsah značně závisí na obsahu tuku (pohybuje se od 2 mg/100 g v odstředěném mléce do 240 mg/100g v másle) (Fernández et al. 2015; Gabrovská et al. 2019).

Co se týče sacharidů v mléce je přítomna téměř výhradně laktóza (4,7 %), která je také příčinou trávicích potíží u lidí s laktózovou intolerancí. Právě proto je z tohoto hlediska ideální konzumace FMV, které obsahují laktózy méně (pokud nejsou zahuštěné), protože je laktóza již z velké části fermentována BMK. Mléko je také dobrým zdrojem vitaminů, obzvláště významný je obsah vitaminů skupiny B. Jedná se zejména o vitamin B2 (riboflavin) a vitamin B12. Obecně výrobky s vyšším obsahem tuku jsou zároveň i významnějším zdrojem vitaminů rozpustných v tucích (zejména vitaminu D, A a také karotenů), než je tomu u výrobků nízkotučných. Mimo Ca obsahují FMV i řadu dalších prospěšných minerálních látek (např. jód a zinek). Z hlediska výživy jsou FMV spolu se sýry nejvýznamnější. Bílkoviny obsažené ve FMV jsou mnohem lépe stravitelné než v mléku, a to z důvodu jemného vysrážení

a částečného rozštěpení pomocí BMK. Stejně tak i v nich obsažený mléčný tuk je lépe stravitelný. BMK tedy obecně zvyšují nutriční hodnotu výrobku, protože zvyšují stravitelnost jednotlivých složek a také dochází ke tvorbě vitaminů skupiny B. Nehledě na to, že v kyselém prostředí je lépe využitelný i Ca. Při fermentaci dochází také ke vzniku levotočivé kyseliny mléčné. Pro tuto kyselinu je typické, že se neštěpí v tenkém střevě a může tak okyselovat prostředí tlustého střeva. Což samozřejmě vede k zabránění již zmiňovaných hnilobných procesů (Fernández et al. 2015; Gabrovská et al. 2019). Souhrn významných bodů k FMV je znázorněn na obrázku č. 8.



Obrázek 8: Základní informace o FMV (inspirováno podle Gabrovské (2019))

3.8.1 Čisté mlékařské kultury

Z hlediska technologie má pro výrobu FMV (z již uvedených vlastností BMK) největší význam metabolismus laktózy a v menší míře také rozklad bílkovin, tj. proteolýza. BMK se v průmyslu běžně používají ve formě čistých mlékařských kultur, které mohou být buď tekuté, lyofilizované (sušené mrazem) nebo hluboce mražené. Nejčastěji používaná jogurtová kultura obsahuje tyto druhy bakterií: *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, a to jak pro výrobu jogurtů, tak i pro výrobu jogurtových mlék. Smetanová kultura obsahuje naopak charakteristickou směs druhů z rodu *Lactococcus* a *Leuconostoc*, která se používá pro výrobu kysaných mlék, smetanových zákysů, zakysaných smetan a kysaných podmásli. Pak je velmi důležitá také acidofilní kultura (*Lactobacillus acidophilus*) či tzv. ABT kultura (acidofilní probiotická kultura), která kromě *L. acidophilus* obsahuje ještě druh *Streptococcus thermophilus* a prospěšné bifidobakterie. BMK jsou využívány také pro výrobu kefirů a kefirových mlék (ovšem tradičně ve spojení s kvasinkami). V této době již řada výrobců používá zvláště do jogurtů přídatnou kulturu – probiotické kmeny bifidobakterií nebo laktobacilů, u nichž byl testován a potvrzen jejich zdravotně prospěšný účinek. Výhody FMV

byly prokázány už v mnoha studiích, a proto je možné jejich konzumaci jednoznačně doporučit (Horáčková et al. 2018).

Obecně se bakterie používané pro výrobu FMV nazývají zákysové kultury. Jedná se o čisté kultury živých mikroorganismů či jejich směsi. Používají se jako očkovací dávka k nastartování fermentace pro zajištění požadovaných funkčních vlastností (chuť, vůně, trvanlivost atd.). Zákysové kultury, které jsou na bázi bakteriální (mohou být totiž i kvasinkové, plísňové či smíšené) jsou děleny podle teploty růstu na mezofilní (20 – 30 °C) a termofilní (40 – 45 °C). Mezi mezofilní se řadí bakterie z rodu *Leuconostoc* a *Lactococcus*, které se dále dělí na aromatické (*Lactococcus lactis* subs. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* a *Leuconostoc lactis*) a nearomatické kultury (*Lactococcus lactis* subs. *lactis* a *Lactococcus lactis* subs. *Cremoris*). Mezi termofilní se řadí bakterie z rodu *Lactobacillus*, *Streptococcus* a *Bifidobacterium*. Mezi nejrozšířenější výrobky s termofilními bakteriemi patří právě jogurty (Kadlec et al. 2009).

Avšak pokud se dělí zákysové kultury podle funkce, tak jsou děleny do tří skupin. První skupinou jsou startovací kultury, což jsou mikroorganismy schopné přeměňovat substrát (sacharidy, lipidy, bílkoviny) na produkty ovlivňující chuť, vůni a konzistenci. Druhou skupinou jsou protektivní kultury, což jsou mikroorganismy produkující antimikrobiální látky potlačující růst patogenních mikroorganismů. Do třetí skupiny se řadí probiotické kultury, což jsou mikroorganismy, jejichž výsledkem je pozitivní působení na zdravotní stav lidí i zvířat (Kadlec et al. 2009).

3.8.2 Výroba jogurtu

Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, fermentace se používá k uchování potravin již po tisíce let. Jelikož má za následek prodloužení trvanlivosti výrobku a spoustu dalších již zmiňovaných vlastností. Zmínky o FMV se objevují poměrně rychle po vzniku zemědělství (kolem roku 8 000 př. n. l.) v Turecku a východní Evropě (Yang et al. 2014). Konkrétní nálezy potvrzující konzumaci jogurtu se objevují kolem 5 000 BC, kdy byl jogurt objeven pravděpodobně kočovnými lidmi žijícími na Středním východě. Tudíž je konzumován již tisíce let. Slovo „Yogurt“ pochází z tureckého slova „yogurtmak“, což znamená zahušťování, koagulaci či tuhnutí. Ve Francii se jogurt objevuje kolem roku 1542, kdy král František I. trpěl chronickým průjmem a byl léčen jogurtem. Nicméně až v roce 1905 bulharský student medicíny studující ve Švýcarsku – Stamen Grigorov, byl první, kdo popsal kulovité a tyčinkovité BMK, které se nachází v bulharském jogurtu. Tento druh bakterií pojmenoval jako *Bacillus bulgaricus* (nynějši *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) (Ray & Montet 2017).

O mnoho let později bylo zjištěno, že se na této přeměně podílí i další druh bakterií, a to *Streptococcus thermophilus*. Tak došlo ke vzniku definice jogurtu jakožto nového druhu mléčného výrobku. Samozřejmě je možné využít i další kultury k výrobě jogurtu, které jsou legislativně schváleny. Nicméně tyto dva druhy bakterií jsou nejznámější a nejtypičtější pro výrobu jogurtů. Dnešní výroba jogurtu se v základních rysech nijak neliší od té, která byla známá již před stovkami let. Hlavním principem stále zůstává fermentace mléka pomocí přesně definovaných mikroorganismů. Podle definice jogurtu, jež je charakterizována v legislativě, musí výrobek (tedy jogurt) obsahovat živou jogurtovou kulturu v přesně definovaném množství i na konci data trvanlivosti daného výrobku. To činí nejméně 10⁷ celkového počtu

mikroorganismů (CPM) na jeden gram výrobku. Aktuální definice jogurtu pochází z relativně nové vyhlášky č. 397/2016 Sb. o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje a zní takto: „Jogurt je kysaný mléčný výrobek získaný kysáním mléka, smetany, podmásli nebo jejich směsi pomocí mikroorganismů – symbiotické směsi *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, u kterého lze zvýšit obsah sušiny pouze přidáním mléčné bílkoviny, sušeného nebo zahuštěného mléka, nebo odebráním syrovátky a je tepelně neošetřený po kysacím procesu.“. Tento tzv. symbiotický poměr obou druhů těchto mikroorganismů, by měl být 1:1, popř. 1:2 či 2:1. Tento požadavek je respektován i dodržován všemi českými výrobci. Poměr laktobacilů a streptokoků ovlivňuje i konečnou chuť výrobku. Pokud převažují laktobacily, chuť výrobku je kyselejší, a naopak (Caballero et al. 2003; Kopáček 2014).

V současné době se používají v podstatě dva technologické postupy na výrobu jogurtů. První způsob se používá na výrobu jogurtů s nerozmíchaným koagulátem, tzv. Set type. Tento způsob je založen na fermentaci, která probíhá přímo ve spotřebitelském obalu. Při využití této technologie zrání se jogurtová kultura přidává do mléka a tento polotovar se ihned stáčí do spotřebitelských obalů, kde následně probíhá fermentace a zrání. Takto vyrobený jogurt má strukturu, která je pevná, lámavá, gelovitá a na lomu nepravidelná. Pravděpodobné je mírné vyvstávání syrovátky, které ovšem není na závadu. Druhý způsob přípravy se používá na výrobu jogurtů s rozmíchaným koagulátem, tzv. Stirred type. U tohoto způsobu výroby probíhá fermentace v procesním tanku. Tento postup zrání je novější a v současné době i mnohem více používanější, co se týče průmyslové výroby. Hotový produkt je následně plněn do spotřebitelských obalů, tedy až po dokončené fermentaci a rozmíchání koagulátu. Uplatňují se zde i další technologické operace, jako např. homogenizace a chlazení (většinou v aseptické atmosféře). Takto vyrobený jogurt má obvykle krémovitou, hladkou a lesklou konzistenci (Kopáček 2014; Ray & Montet 2017).

Ať už se jedná o první či druhý způsob výroby jogurtů, tak výživové vlastnosti jsou při stejném složení naprosto identické. Samozřejmě platí, že oba typy jogurtů musí splňovat základní kritérium pro označení výrobku jako jogurt, což znamená, že musí dodržovat určený počet CPM/1 g výrobku. Tato skutečnost, jež je uváděna v legislativě, rovněž vyvrací i známý mýtus o tom, že jediné „jogurt ve skle“ je ten pravý a poctivý, zatímco jogurt s „řidší“ konzistencí je šizený. S výrobou jogurtů je vždy spjata i standardizace tuku ve výrobku, což se provádí přidávkem smetany nebo naopak odtučněného mléka. Dále se vždy provádí i standardizace sušiny (obvykle okolo 8 %), a to přidávkem sušeného odtučněného mléka, což má za následek zvýšení pevnosti koagulátu fermentovaného výrobku a také snížení podílu oddělené syrovátky. Obecně platí, že mezi faktory ovlivňující výsledné vlastnosti jogurtu patří například celková sušina, ošetření mléka tepelným zpracováním, homogenizace mléka, vliv teploty fermentace, vliv tlaku na jogurt, vliv použitých aditiv a vliv skladování (krátkodobé versus dlouhodobé) (Kopáček 2014; Fernández et al. 2015).

Další mýtus je spojen s použitím konzervantů ve výrobcích, avšak v případě bílého (přírodního) jogurtu nejsou povoleny naprosto žádné přídavné látky. Nepoužívají se dokonce ani zahušňovadla. Požadované vysoké viskozity se v jogurtech dosahuje výhradně objemem mléčné sušiny a také způsobem fermentace. Nicméně ostatní jogurty (tedy ochucené nebo ovocné) mohou kromě složek mléčné sušiny obsahovat také přidané sacharidy, sladidla nebo stabilizátory (hydrokoloidy v množství 0,1 – 0,5 %). Jejich význam je v úpravě chuti

a konzistence. Při výrobě jogurtů s ochucující složkou se mohou ve výrobku vyskytovat přídavné látky, ale dostávají se do výrobku pouze přenosem z použité ochucující složky, pro kterou byly povoleny. Jedná se o barviva, sladidla, aromata a další podobné látky (Kopáček 2014).

4 Metodika

4.1 Použité kmeny

Pro vlastní experiment byly vybrány izoláty čistých kultur streptokoků izolované z tradičního gruzínského kysaného mléčného výrobku jogurtového typu získaného v osadě Mestia v regionu Horní Svanetie. Ke srovnání kysacích schopností těchto izolátů byly v pokusu použity izoláty streptokoků z bílých jogurtů komerčně dostupných na českém trhu. V první části experimentu byly testovány streptokoky ve formě čistých kultur, ve druhé a třetí části experimentu v symbiotické formě s *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, který je spolu se *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* součástí běžné jogurtové kultury. Přehled všech použitých izolátů a jejich původ je uveden v tabulce č. 2. Čistota izolátů byla ověřena mikroskopicky a druhová identita byla potvrzena MALDI-TOF hmotnostní spektrometrií.

Byla testována kysací schopnost vybraných izolátů, a to pomocí titrační kyselosti (metodou dle Soxhlet-Henkela), aktivní kyselosti (pH metrem a reflektometrem) a měření množství vytvořeného laktátu (reflektometrem) ve vybraných hodinách. Zároveň bylo u všech vzorků v průběhu pokusu kultivačně stanoveno množství mikroorganismů. Použité metody jsou blíže popsány v následujících kapitolách. Testování proběhlo u jednotlivých izolátů samostatně a poté i v symbiotické formě s laktobacily.

Tabulka 2: Přehled všech použitých izolátů

Zkratka	Bakteriální druh	Typ jogurtu	Výrobce
G3	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	Kysaný mléčný výrobek	fyzická osoba
G6	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	Kysaný mléčný výrobek	fyzická osoba
G8	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	Kysaný mléčný výrobek	fyzická osoba
G12	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	Kysaný mléčný výrobek	fyzická osoba
CZ1	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	Jogurt bílý	mlékárna Valašské Meziříčí s. r. o.
CZ2	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	Klasik jogurt bílý	Olma a. s.
CZ3	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	Choceňský smetanový jogurt bílý	Choceňská mlékárna s. r. o.
CZ4	<i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i>	Jogurt bílý	Agro-la s. r. o.
RA	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Jogurt bílý	Agro-la s. r. o.

4.1.1 Izolace a příprava všech použitých kmenů

Odběr vzorků proběhl dle normy ČSN EN ISO 707 (57 0003) (2009), a to i v následujících částech experimentu. Izolace streptokoků z kysaných mléčných výrobků proběhla následovně. Bylo asepticky odebráno 0,1 ml vzorku do fyziologického roztoku (0,9% NaCl) a ihned rozředěno decimální ředící řadou až do koncentrace 10^{-8} . Jednotlivá ředění byla asepticky nanášena na Petriho misky (0,5 ml na miskou) a ihned přelita živným médiem. Misky pro izolaci laktobacilů byly po zatuhnutí přelity podruhé pro zajištění mikroaerofilní kultivace vhodné pro laktobacily. Byla použita následující selektivní média: M17 agar s přidavkem 10% roztoku laktózy (50 ml/l) pro izolaci streptokoků a Rogosa agar s přidavkem kyseliny octové pro izolaci laktobacilů (1,32 ml/l). Oba typy agarových půd byly připraveny ze sušených ingrediencí dle návodu od výrobce (Oxoid, Velká Británie). Poté byly vzorky kultivovány 2 – 3 dny v termostatu při teplotě 43 °C. Po kultivaci bylo vybráno několik kolonií z každého vzorku, u kterých proběhlo mikroskopické vyšetření a byla tak zkontrolována jejich čistota. Vyloučila se tím i přítomnost případných kontaminujících mikroorganismů. Kolonie vybraných izolátů byly asepticky sebrány očkovací kličkou a přeneseny do kultivačního média Trypton soya broth (v případě streptokoků) nebo do Wilkins Chalgren anaerobe broth (v případě laktobacilů) a pomnoženy ve vodní lázni při teplotě 43 °C. Pomnožené kultury byly skladovány v lednici při 5 °C.

Druhá identita získaných izolátů byla ověřena pomocí MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie na přístroji Autoflex Speed (Bruker Daltonik, Německo). Získaná data byla vyhodnocena skrz software MALDI Biotyper RTC (Bruker Daltonik, Německo). Tato metoda je založena na porovnávání profilových hmotnostních spekter vzorků získaných pomocí MALDI-TOF MS se spektry uloženými ve specifické databázi (knihovně spekter) naměřenými identickým způsobem. Pro přípravu vzorku k vyhodnocení bylo použito několik čistých mikroskopických vzorků typu Eppendorf (1,5 ml), do kterých byl přenesen 1 ml narostlé kultury z bujónu, poté byl vzorek centrifugován po dobu 2 min při 14 500 RPM. Následovalo slítí supernatantu a přidání 70% ethanolu, ve kterém byl pelet resuspendován. Poté opět proběhla centrifugace a slítí supernatantu. Pelet se nechal několik minut schnout při laboratorní teplotě. K peletu se poté přidalo 30 μ l 80% kys. mravenčí a směs byla důkladně promíchána pipetou a vortexem, poté bylo přidáno 30 μ l acetonitrilu (opět proběhlo důkladné promíchání). Následně proběhla centrifugace po dobu 2 min, načež byl 1 μ l supernatantu přidán na MALDI destičku MTP 384 polished steel (Bruker Daltonik, Německo) a ponechán uschnout při laboratorní teplotě. Ihned po zaschnutí byl supernatant překryt stejným množstvím roztoku matrice – α -kyano-4-hydroxyskořicové kyseliny (HCCA) (Sigma-Aldrich (Spojené státy americké)). Po zaschnutí byla provedena analýza.

4.2 Výběr a příprava mléka

Bylo zvoleno běžně dostupné UHT mléko (Jihočeské mléko polotučné, Madeta a. s.). Příprava mléka se lišila v závislosti na experimentu.

4.2.1 První část experimentu – příprava infúzek pro stanovení kysacích schopností streptokoků

Infúzky byly naplněny 50 ml UHT mléka. Po naplnění byly všechny infúzky pasterovány (85 °C/10 min). Počet infúzek odpovídal počtu sledovaných hodin, tzn., že se připravilo 9 infúzek s mlékem (0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h a 24 h) pro každý izolát streptokoků. Infúzky s mlékem se před vlastním pokusem vždy nechaly vychladnout na pokojovou teplotu.

4.2.2 Druhá část experimentu – příprava infúzek pro stanovení kysacích schopností streptokoků s již přidanými laktobacily

Postup přípravy infúzek je shodný s postupem v předchozí části experimentu.

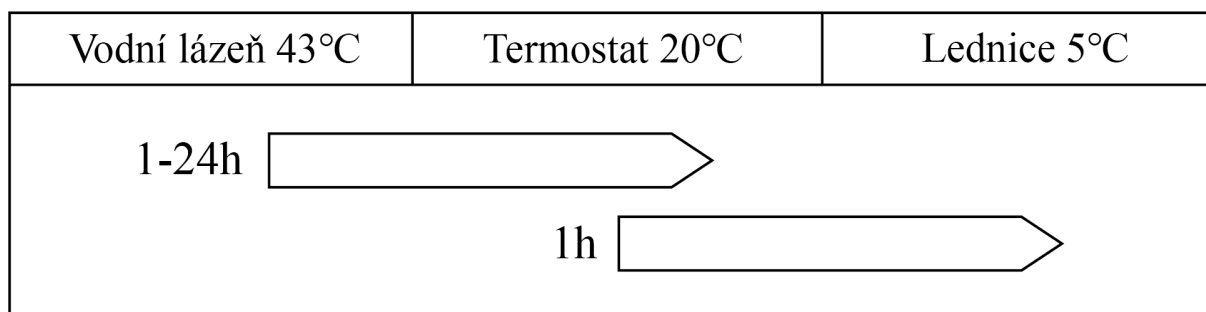
4.2.3 Třetí část experimentu – příprava infúzek pro stanovení kysacích schopností streptokoků s již přidanými laktobacily v zahuštěném mléce

Infúzky byly naplněny 50 ml zahuštěného UHT mléka. Zahuštěné UHT mléko bylo připraveno přidáním polotučného sušeného mléka do UHT mléka (100 g/l). Po rozmíchání a naplnění byly infúzky pasterovány (85 °C/10 min). V této části experimentu se sledovala pouze čtvrtá a šestá hodina. Infúzky s mlékem byly před vlastním pokusem ponechány při pokojové teplotě. V této části experimentu šlo o posouzení rozdílů v rychlosti růstu a kysacích schopností jogurtové kultury v zahuštěném UHT mléku oproti UHT mléku.

4.3 Příprava kysaného mléčného výrobku

Opět se postupovalo dle normy ČSN ISO 9232 (57 1421) (2004). Před vlastním pokusem byly izoláty přeočkovány do výše zmíněných kultivačních médií a pomnoženy kultivací při 43 °C přes noc. Pomnožené kultury byly asepticky očkovány do infúzek s již připraveným mlékem o různé koncentraci KTJ/ml, která byla v případě očkování z TSB a W živného média určena denzitometricky a v případě očkování z mléka 2% inokulem odhadem. Z inokula byl následně proveden rozbor pro zjištění přesného počtu zaočkovaných bakterií. Vzorky byly inkubovány při 43 °C ve vodní lázni (kromě vzorku 0 h) a v hodinových odstupech postupně přemísťovány na 1 h do termostatu o 20 °C a následně do lednice při teplotě 5 °C. Tím bylo zajištěno dvoufázové chlazení vhodné pro zrání kysaných mléčných výrobků (Early 1998; Fernandes et al. 2005). Tento postup byl použit ve všech částech experimentu a je znázorněn níže na obrázku č. 9.

Obrázek 9: Postup přípravy vzorků k měření



4.4 Stanovení růstu mikroorganismů v průběhu kysání

Stanovení počtu mikroorganismů charakteristických pro výskyt v mléčných výrobcích pomocí techniky počítání kolonií proběhlo při 43 °C. Růst mikroorganismů byl stanoven kultivačně za pomoci selektivních médií (viz podkapitola 4.3). Toto stanovení se provádělo u všech vzorků, avšak pouze v konkrétní čas, tzn. u 3 h, 6 h a 24 h a také u inokula. Opět je výjimka u vzorků se zahuštěným mlékem, kde se měření provádělo pouze v čase 4 h a 6 h. Postup přípravy byl obdobný jako u izolace BMK. Po uplynutí doby kultivace (2 – 3 dny) byly spočítány všechny narostlé a viditelné kolonie a množství byla přepočtena na log KTJ/ml pomocí níže uvedeného vzorce:

$$N = \log \left[\left(\frac{n_1 + n_2}{11} \right) \times d \right]$$

kde

„N“ je celkový počet KTJ v 1 ml mléka

„n1, n2“ je počet kolonií ve dvou po sobě jdoucích ředěních

„d“ je převrácená hodnota vyššího ředění

4.5 Stanovení obsahu kyseliny mléčné

Stanovení obsahu kyseliny mléčné proběhlo pomocí reflektometrické metody za použití přístroje reflektometru RQFlex[®] 10 (Sigma-Aldrich, Spojené státy americké) a testovacích proužků Reflectoquant[®] Lactic Acid Test (Sigma-Aldrich, Spojené státy americké). Některé testované vzorky byly kvůli omezené citlivosti metody naředěny v závislosti na stupni fermentace. Stanovení proběhlo u všech izolátů, avšak pouze v konkrétní čas, tzn. u 0 h, 3 h, 6 h a 24 h. U všech vzorků se zahuštěným mlékem proběhlo stanovení laktátu pouze v čase 4 h a 6 h.

4.6 Stanovení aktivní a titrační kyselosti

4.6.1 Stanovení aktivní kyselosti

Aktivní kyselost je dána koncentrací vodíkových iontů a vyjadřuje se v hodnotách pH. Aktivní kyselost byla stanovena dle normy ČSN 57 0530 (1972) a měřena pH metrem HI 98103 (Hanna Instruments, Itálie) a v první části experimentu pomocí přístroje reflektometru RQFlex[®] 10 (Sigma-Aldrich, Spojené státy americké). U pH metru byla provedena kalibrace v rozsahu 4 – 7 pH na roztoky o známé hodnotě pH (pufry) a při teplotě doporučené výrobcem (cca 20 °C). Při vlastním měření bylo postupováno podle pokynů výrobce v návodu k pH metru. Při měření byla elektroda ponořena do daného vzorku a vyčkalo se na stabilní odečet. Po každém měření vzorku byla elektroda vždy očištěna, tzn. opláchnuta destilovanou vodou a osušena buničitou vatou. Hodnota pH byla měřena u všech vzorků.

4.6.2 Stanovení titrační kyselosti

Titrační kyselost (TK) byla stanovena dle normy ČSN 57 0530 (1972). Byla použita metoda dle Soxhlet-Henkela, která udává spotřebu roztoku hydroxidu sodného (NaOH) o koncentraci 0,25 mol/l potřebného k neutralizaci kyselých reakčních látek ve 100 ml mléka na indikátor fenolftalein. Tato kyselost se uvádí v Soxhlet-Henkelových stupních (°SH).

4.6.2.1 Příprava vzorků před stanovením titrační kyselosti

Před rozbohem byly všechny vzorky promíchány při pokojové teplotě, aby došlo ke vzniku homogenního vzorku. Důkladné promíchání je velmi důležité, jelikož u kysaných mléčných výrobků se často odděluje mléčné sérum.

4.6.2.2 Příprava titrační aparatury a získání faktoru

Připravená titrační aparatura (byreta), byla naplněna NaOH o koncentraci 0,25 mol/l. Poté byl stanoven faktor (f) pro zjištění přesné koncentrace NaOH. Faktor byl stanoven titrací kyseliny šťavelové o koncentraci 0,25 mol/l za přídavku indikátoru fenolftaleinu (2% ethanolového roztoku) do růžového zbarvení. Výpočet faktoru byl stanoven dle níže popsaného vzorce:

Výpočet faktoru (f):

$$f = 2(a/b)$$

kde

„a“ je počet ml roztoku $C_2H_2O_4$ o koncentraci 0,25 mol/l odměřených pipetou na titraci (10ml)

„b“ je počet ml roztoku NaOH o koncentraci 0,25 mol/l spotřebovaných při titraci.

Tímto způsobem byl získán faktor, kterým se vždy vynásobilo spotřebované množství NaOH o přibližné koncentraci 0,25 mol/l u měřených vzorků.

4.6.2.3 Příprava srovnávacího roztoku

Následovala příprava srovnávacího roztoku, který měl světle růžovou barvu. Srovnávací roztok byl důležitý pro porovnání odstínu růžové barvy titrovaného vzorku. Byl připraven odměřením 50 ml mléka a přidáním 1 ml 5% roztoku síranu kobaltnatého. Zabarvení srovnávacího roztoku mléka se síranem kobaltnatým bylo stálé asi 3 hodiny.

4.6.2.4 Stanovení titrační kyselosti

Posledním krokem byla samotná titrace vzorků za přidání úměrného množství indikátoru fenolftaleinu (2% ethanolového roztoku), kdy se vychází z poměru – 2 ml roztoku fenolftaleinu na 50 ml mléka. Vzorky se titrovaly do slabě růžového zbarvení odpovídající srovnávacímu roztoku. Zabarvení muselo vždy vydržet alespoň 30 sekund. Ze získaných hodnot se dle

následujícího vzorce vypočítala kyselost (x) ve stupních Soxhlet-Henkela (SH) na 100 ml mléka.

Výpočet titrační kyselosti (x):

$$x = 2 \times a \times f \text{ (v případě, že na titraci bylo použito 50 ml vzorku)}$$

kde

„a“ je množství roztoku NaOH o přibližné koncentraci 0,25 mol/l spotřebovaného při titraci vzorku

„f“ je faktor titrace.

4.7 Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení výsledků této diplomové práce bylo provedeno prostřednictvím softwaru STATGRAPHICS Centurion XV (StatPoint, USA). Tento software byl použit pro vyhodnocení ve všech částech experimentu, a to pro všechny zjištěné hodnoty: aktivní a titrační kyselost, obsah kyseliny mléčné a stanovení počtu MO. Vzorky byly rozděleny na dvě skupiny, tj. vzorky s obsahem izolátů streptokoků z tradičního gruzínského kysaného mléčného výrobku jogurtového typu (skupina 1) a vzorky zastupující izoláty streptokoků z komerčně dostupných jogurtů na českém trhu (skupina 2). Pro porovnání a statistické vyhodnocení průměrných hodnot všech vzorků v konkrétním čase byl zvolen dvouvýběrový t-test na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ (95% statistická průkaznost).

5 Výsledky

5.1 První část experimentu – výsledky stanovení kysacích schopností streptokoků

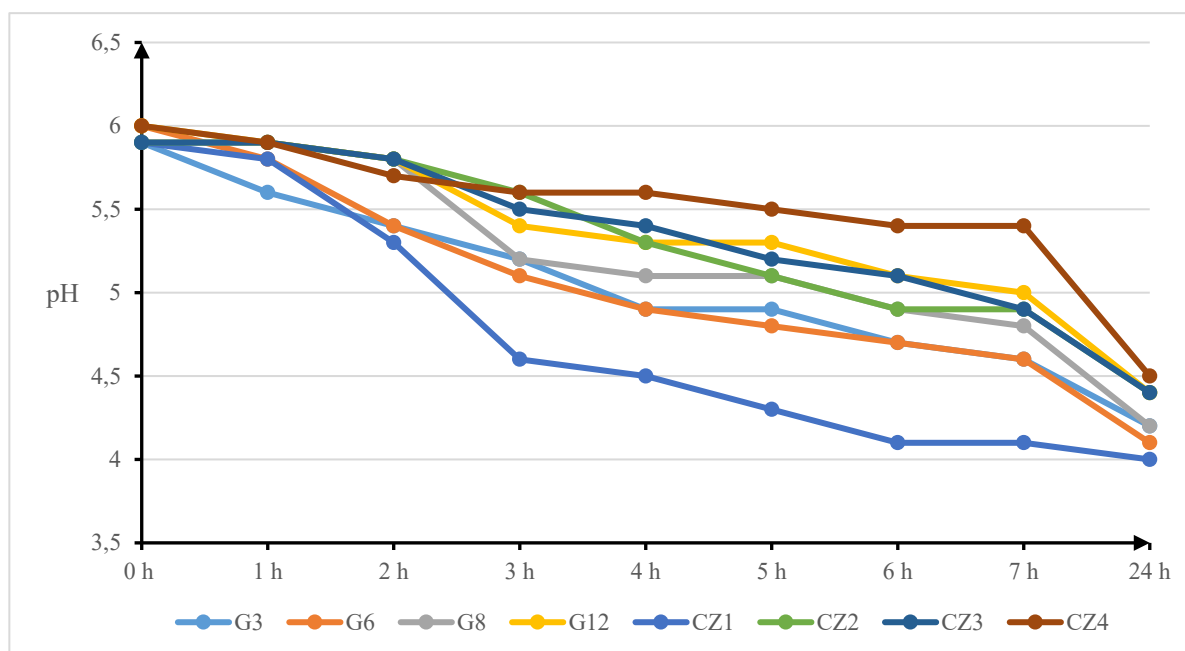
Kysací schopnost vybraných izolátů byla testována pomocí aktivní kyselosti, titrační kyselosti a stanovení obsahu kyseliny mléčné. Zároveň proběhlo i kultivační stanovení počtu MO ve vybraných hodinách. Přehled všech použitých izolátů byl již uveden v tabulce č. 2.

5.1.1 Výsledky stanovení hodnoty pH

Hodnota pH byla změřena u všech sledovaných vzorků v konkrétních časech a klesala soustavně. Nejrychleji ve všech sledovaných hodinách klesal vzorek s označením CZ1 a to až na nejnižší hodnotu pH (4,00) za 24 h. Nejpomaleji naopak klesal vzorek se zkratkou CZ4, který za 24 h skončil s nejvyšší hodnotou pH (4,5). Z gruzínských vzorků vycházely nejlépe vzorky se zkratkou G3 a G6 v průběhu všech sledovaných hodin. Data všech vzorků v konkrétních hodinách jsou uvedena v tabulce č. 3 a také graficky znázorněna (graf č. 1).

Tabulka 3: Hodnoty pH u všech sledovaných vzorků v konkrétních časech

t	G3	G6	G8	G12	CZ1	CZ2	CZ3	CZ4
0 h	5,90	6,00	5,90	6,00	5,90	5,90	5,90	6,00
1 h	5,60	5,80	5,90	5,90	5,80	5,90	5,90	5,90
2 h	5,40	5,40	5,80	5,80	5,30	5,80	5,80	5,70
3 h	5,20	5,10	5,20	5,40	4,60	5,60	5,50	5,60
4 h	4,90	4,90	5,10	5,30	4,50	5,30	5,40	5,60
5 h	4,90	4,80	5,10	5,30	4,30	5,10	5,20	5,50
6 h	4,70	4,70	4,90	5,10	4,10	4,90	5,10	5,40
7 h	4,60	4,60	4,80	5,00	4,10	4,90	4,90	5,40
24 h	4,20	4,10	4,20	4,40	4,00	4,40	4,40	4,50



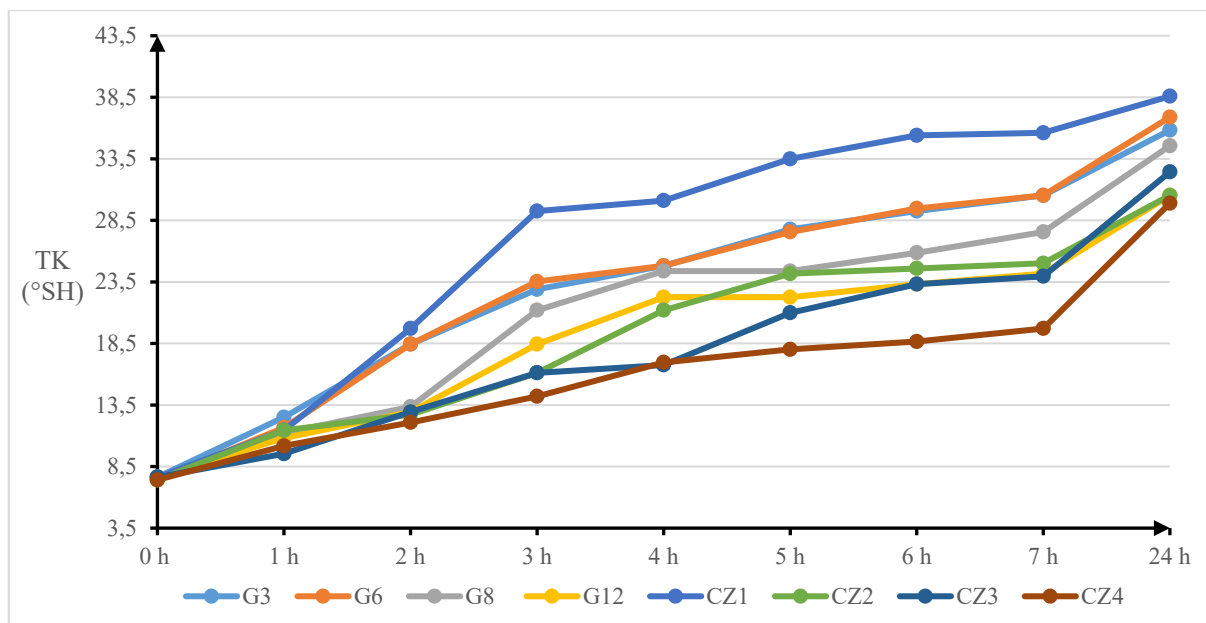
Graf 1: Grafické znázornění hodnot pH pro všechny sledované vzorky

5.1.2 Výsledky stanovení titrační kyselosti

Titrační kyselost rostla u všech vzorků v závislosti na čase. Ačkoliv neexistuje přímý vztah mezi aktivní a titrační kyselostí hned od počátku měření, tak po vyčerpání pufrčního systému lze pozorovat nepřímou úměrnost mezi pH a TK. Nejvyšší titrační kyselosti dosáhl vzorek CZ1 (38,58 °SH), který dosáhl rovněž i nejnižšího pH ze všech vzorků. Stejně tomu je i v opačném směru, kdy vzorek CZ4 dosáhl nejnižší titrační kyselosti (29,89 °SH) a zároveň i nejvyššího pH v předchozím měření. Z gruzínských vzorků jsou opět nejlépe hodnoceny vzorky G3 (35,83 °SH) a G6 (36,89 °SH). Data pro všechny vzorky ve sledovaných hodinách se nachází v tabulce č. 4 a pro lepší přehlednost jsou graficky znázorněna v grafu č. 2.

Tabulka 4: Hodnoty titrační kyselosti (°SH) u všech sledovaných vzorků v konkrétním čase

t	G3	G6	G8	G12	CZ1	CZ2	CZ3	CZ4
0 h	7,63	7,42	7,63	7,63	7,63	7,42	7,63	7,42
1 h	12,51	11,66	11,24	10,81	11,45	11,45	9,54	10,18
2 h	18,44	18,44	13,36	12,93	19,72	12,72	12,93	12,08
3 h	22,90	23,53	21,20	18,44	29,26	16,11	16,11	14,20
4 h	24,80	24,80	24,38	22,26	30,10	21,20	16,75	16,96
5 h	27,77	27,56	24,38	22,26	33,50	24,17	20,99	18,02
6 h	29,26	29,47	25,86	23,32	35,40	24,59	23,32	18,66
7 h	30,53	30,53	27,56	24,17	35,62	25,02	23,96	19,72
24 h	35,83	36,89	34,56	30,53	38,58	30,53	32,44	29,89



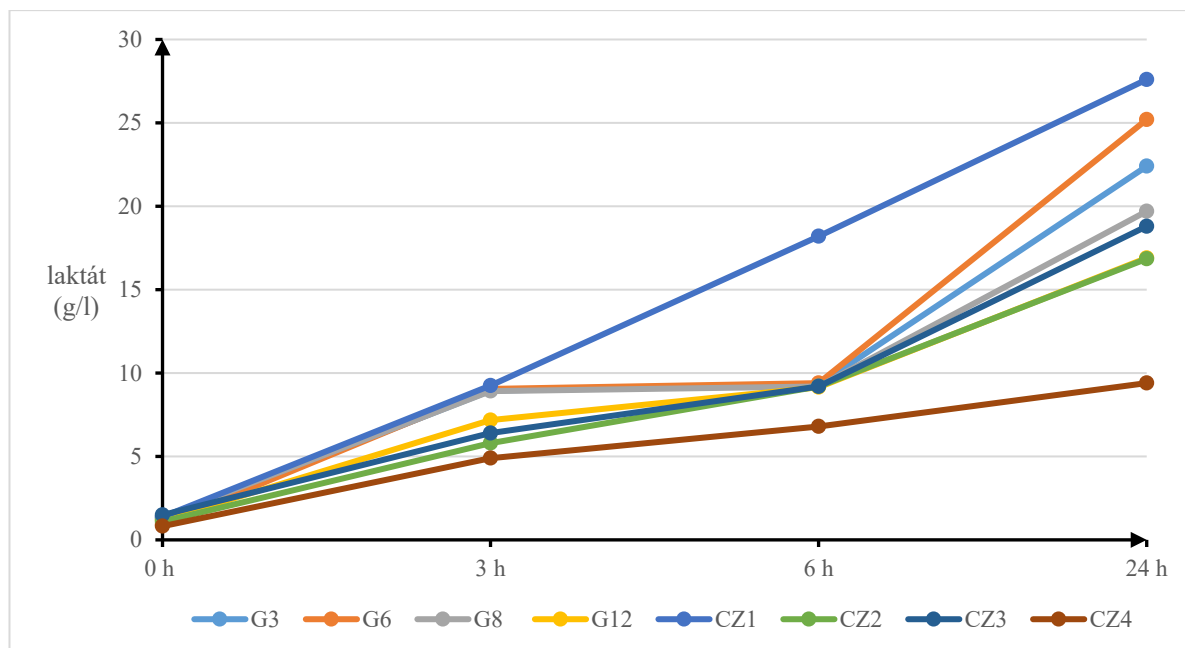
Graf 2: Grafické znázornění titrační kyselosti pro všechny sledované vzorky

5.1.3 Výsledky stanovení kyseliny mléčné

Z naměřených hodnot lze vypočítat přímou úměrnost mezi zvyšující se titrační kyselostí a soustavně se zvyšujícím obsahem laktátu. Hodnoty získané z reflektometru byly v jednotkách mg/l a následně byly převedeny na g/l. Opět tedy vyšel vzorek CZ1 jako vzorek s nejvyšším obsahem kyseliny mléčné a vzorek CZ4 s nejnižším obsahem kyseliny mléčné. Všechny naměřené hodnoty jsou uvedené v tabulce č. 5 a následně i graficky znázorněné v grafu č. 3.

Tabulka 5: Obsah kyseliny mléčné (v g/l) u všech vzorků v konkrétním čase

t	G3	G6	G8	G12	CZ1	CZ2	CZ3	CZ4
0 h	1,25	0,92	1,36	1,19	1,38	1,10	1,49	0,82
3 h	8,95	9,05	8,92	7,18	9,25	5,80	6,40	4,90
6 h	9,30	9,40	9,20	9,15	18,20	9,20	9,20	6,80
24 h	22,40	25,20	19,70	16,90	27,60	16,85	18,80	9,40



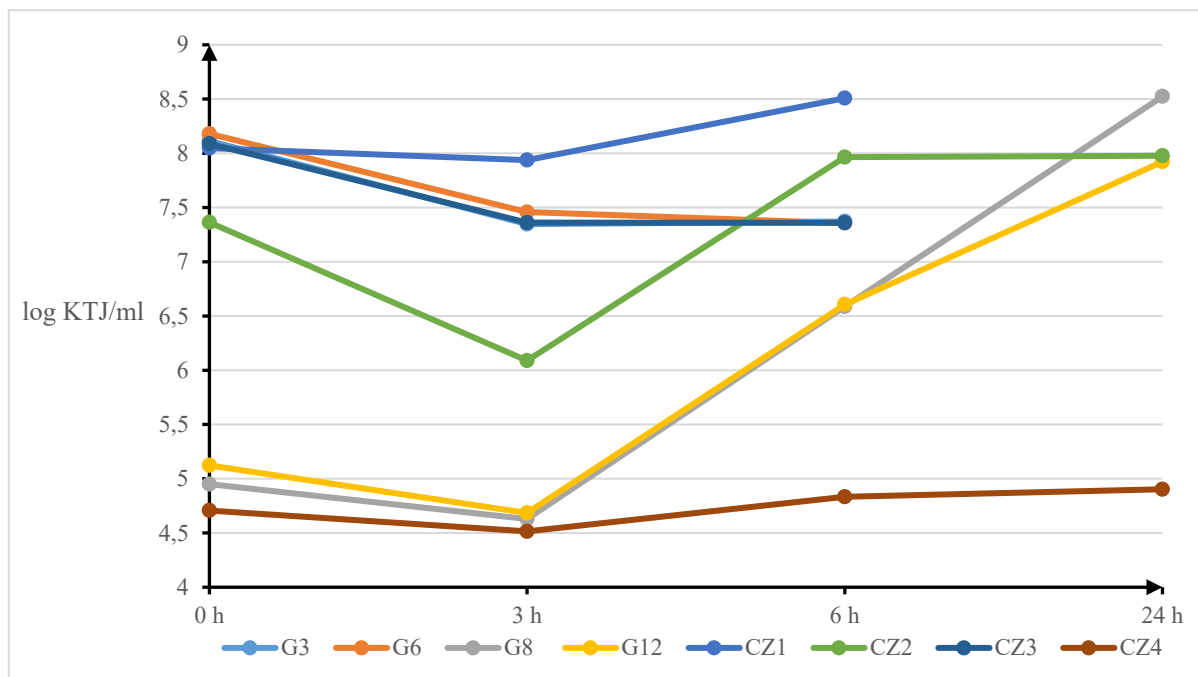
Graf 3: Grafické znázornění naměřených hodnot kyseliny mléčné pro všechny vzorky (v g/l)

5.1.4 Výsledky stanovení počtu MO

V této části experimentu se očkovalo 2% inokulem, tj. 1 ml inokula na 50 ml vzorku, a proto jsou všechny uvedené hodnoty v log KTJ/ml. Z inokulační dávky bylo zjištěno, že u vzorků G3, G6, CZ1, CZ2 a CZ3 byl počet MO v řádě 10^7 a více. U zbylých vzorků (tj. G8, G12 a CZ4) byl počet MO v inokulační dávce nižší. Tento fakt se projevil i v následujících hodinách, ačkoliv neměl negativní vliv na předešlá měření (tj. stanovení pH a TK). Ve 24. hodině došlo ke kontaminaci vzorků G3, G6, CZ1 a CZ3. Jelikož je stanovení počtu MO v průběhu kysání spjato s předešlými měřeními, tak z časových důvodů nebylo možné všechna měření opakovat a tyto hodnoty (počet MO ve 24. hodině) chybí. Ve všech měřených hodinách měl vzorek CZ4 nejnižší počet MO. Všechny získané hodnoty jsou vypočteny dle vzorce uvedeného v podkapitole 4.4 a uvedeny v tabulce č. 6 a následně i graficky znázorněny v grafu č. 4.

Tabulka 6: Výsledky stanovení počtu MO v konkrétních časech (uvedené v log KTJ/ml)

t	G3	G6	G8	G12	CZ1	CZ2	CZ3	CZ4
0 h (inokulum)*	8,11	8,18	4,95	5,12	8,05	7,36	8,09	4,71
3 h	7,35	7,46	4,63	4,69	7,94	6,09	7,36	4,52
6 h	7,37	7,36	6,59	6,61	8,51	7,96	7,36	4,83
24 h	–	–	8,52	7,92	–	7,98	–	4,90



*Poznámka: jedná se o inokulační dávku do vzorků v 0 h.

Graf 4: Grafické znázornění stanovení počtu MO v konkrétních časech (v log KTJ/ml)

5.1.5 Výsledky statistického vyhodnocení mezi sledovanými skupinami

V této fázi vyhodnocení se porovnávaly dvě skupiny vzorků. Skupina 1 byla reprezentována izoláty čistých kultur streptokoků z tradičního gruzínského kysaného mléčného výrobku jogurtového typu a skupina 2 byla reprezentována izoláty streptokoků z komerčně dostupných mléčných výrobků na území ČR. Statistické vyhodnocení se provedlo pro stanovení hodnoty pH, titrační kyselosti, obsahu kyseliny mléčné a rovněž i pro stanovení počtu MO.

5.1.5.1 Výsledky stanovení rozdílů pH hodnoty mezi dvěma skupinami

Z hlediska stanovení rozdílných hodnot pH nebyl shledán žádný statisticky významný rozdíl mezi těmito dvěma skupinami (na hladině pravděpodobnosti 0,05). Statistické vyhodnocení průměrných hodnot pH a výsledných p-hodnot je uvedeno v tabulce č. 7.

Tabulka 7: Statistické vyhodnocení pH hodnoty mezi sledovanými skupinami

t	Skupina 1 – průměry	Skupina 2 – průměry	p-hodnota
0 h	5,95	5,93	0,536963
1 h	5,80	5,88	0,355918
2 h	5,60	5,65	0,773201
3 h	5,23	5,33	0,703935
4 h	5,05	5,20	0,584700
5 h	5,03	5,03	1,000000
6 h	4,85	4,88	0,935009
7 h	4,75	4,83	0,801510
24 h	4,23	4,33	0,376929

5.1.5.2 Výsledky stanovení rozdílů titrační kyselosti mezi sledovanými skupinami

Z průměrných hodnot titrační kyselosti ze dvou porovnávaných skupin byl nalezen statisticky významný rozdíl pouze ve čtvrté hodině ($p = 0,016510$). V následující hodině se již tento statisticky významný rozdíl neprojevil. Rovněž nebyl shledán žádný statisticky významný rozdíl i u všech ostatních průměrných hodnot titrační kyselosti mezi skupinami 1 a 2 (na hladině pravděpodobnosti 0,05). Všechny získané průměrné hodnoty titrační kyselosti jsou uvedeny v tabulce č. 8.

Tabulka 8: Statistické vyhodnocení titrační kyselosti ($^{\circ}\text{SH}$) mezi sledovanými skupinami

t	Skupina 1 – průměry	Skupina 2 – průměry	p-hodnota
0 h	7,53	7,58	0,536963
1 h	11,56	10,66	0,183853
2 h	15,79	14,36	0,566638
3 h	21,52	16,42	0,016510
4 h	24,06	21,25	0,411407
5 h	25,49	24,17	0,726470
6 h	26,98	25,49	0,711906
7 h	28,20	26,08	0,588246
24 h	31,95	32,86	0,801588

5.1.5.3 Výsledky stanovení rozdílů v obsahu kyseliny mléčné mezi sledovanými skupinami

Z tabulky č. 9 nejsou patrné žádné statisticky významné rozdíly v obsahu kyseliny mléčné mezi skupinami 1 a 2 (na hladině pravděpodobnosti 0,05).

Tabulka 9: Statistické vyhodnocení obsahu kyseliny mléčné (v g/l) mezi skupinami 1 a 2

t	Skupina 1 – průměry	Skupina 2 – průměry	p-hodnota
0 h	1,18	1,20	0,924455
3 h	8,53	6,59	0,112139
6 h	9,26	10,85	0,551185
24 h	21,05	18,16	0,512006

5.1.5.4 Výsledky stanovení rozdílů v počtu MO mezi sledovanými skupinami

Ze získaných výsledků nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl (na hladině pravděpodobnosti 0,05). Následující údaje jsou uvedeny v tabulce č. 10. Výsledky po 24 hodinách měření nemohou být vyhodnoceny, protože u některých vzorků došlo ke kontaminaci.

Tabulka 10: Statistické vyhodnocení průměrného počtu MO mezi sledovanými skupinami

t	Skupina 1 – průměry*	Skupina 2 – průměry*	p-hodnota
0 h	6,59	7,05	0,713709
3 h	6,03	6,48	0,699084
6 h	6,98	7,17	0,835676

*Poznámka: Všechny uvedené hodnoty jsou v log KTJ/ml.

5.2 Druhá část experimentu – výsledky stanovení kysacích schopností streptokoků s již přidanými laktobacily

V této části experimentu se prováděla stejná měření jako v předchozí části experimentu, nicméně už se nejednalo o sledování čistých izolátů streptokoků, nýbrž o sledování symbiotického vztahu těchto izolátů s již přidanými laktobacily. V této části experimentu byl použit denzitometr pro přesnější určení růstu MO v inokulu. Hodnoty pocházející z denzitometru a odebraná množství inokula sloužící k zaočkování vzorků jsou zobrazeny v následujícím tabulkách: tabulka č. 11 a tabulka č. 12.

Tabulka 11: Hodnoty získané z denzitometru a množství odebraného inokula k zaočkování

Denzitometr	Hodnota	Množství (ml)
G3	5,60	0,125
G6	6,04	0,115
CZ1	1,68	0,400
CZ2	4,05	0,175
RA	2,60	0,290

Tabulka 12: Hodnoty vzaté z denzitometru a množství odebraného inokula k zaočkování

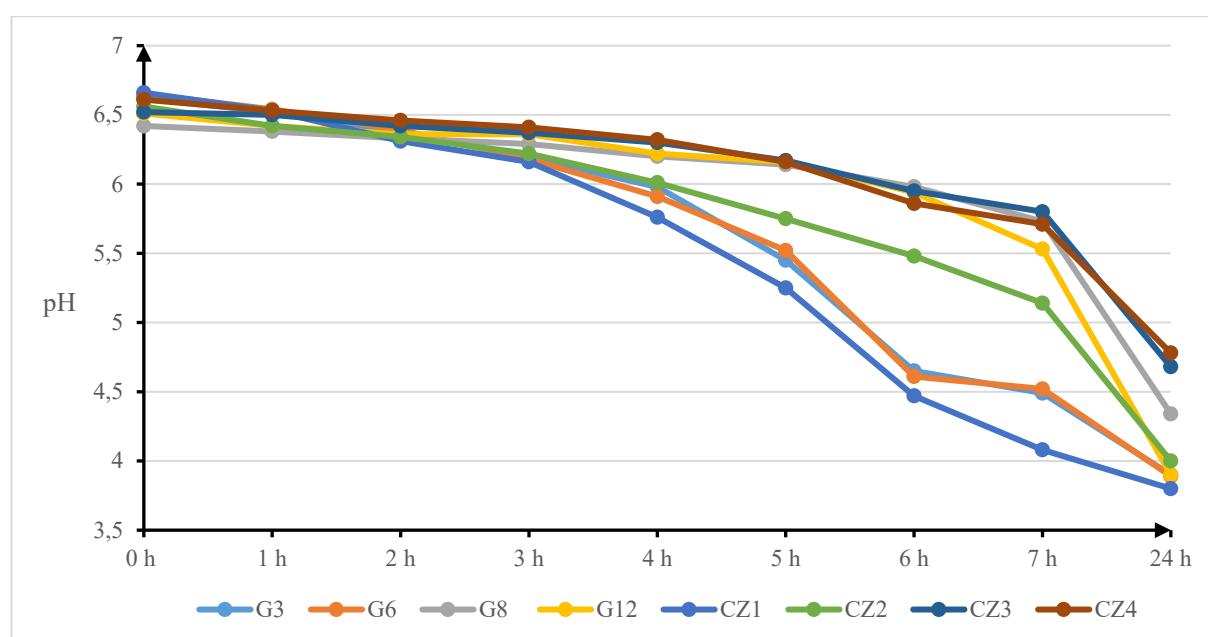
Denzitometr	Hodnota	Množství (ml)
G8	6,15	0,115
G12	5,44	0,125
CZ3	5,80	0,125
CZ4	4,85	0,150
RA	4,81	0,150

5.2.1 Výsledky stanovení hodnoty pH

Z naměřených hodnot pH uvedených v tabulce č. 13 lze vypožorovat, že opět u všech vzorků klesala hodnota pH soustavně. Dále bylo zjištěno, že vzorek CZ4 neměl příliš optimální finální hodnotu pH jako ostatní vzorky. Konečná hodnota pH byla u vzorku CZ4 4,78. Jako druhý vzorek s nejvyšší hodnotou pH ve většině sledovaných hodinách byl vyhodnocen vzorek se zkratkou CZ3. Z gruzínských vzorků od 4. hodiny měření klesala hodnota pH nejrychleji u vzorků G3 a G6. Všechny naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 13 a graficky znázorněny v grafu č. 5.

Tabulka 13: Hodnoty pH u všech sledovaných vzorků v konkrétním čase

t	G3	G6	G8	G12	CZ1	CZ2	CZ3	CZ4
0 h	6,62	6,65	6,42	6,51	6,66	6,56	6,52	6,61
1 h	6,52	6,54	6,38	6,42	6,53	6,42	6,50	6,53
2 h	6,38	6,39	6,33	6,36	6,31	6,34	6,42	6,46
3 h	6,19	6,18	6,29	6,36	6,16	6,22	6,37	6,41
4 h	5,98	5,91	6,20	6,22	5,76	6,01	6,30	6,32
5 h	5,45	5,52	6,14	6,16	5,25	5,75	6,17	6,16
6 h	4,65	4,61	5,98	5,94	4,47	5,48	5,95	5,86
7 h	4,49	4,52	5,73	5,53	4,08	5,14	5,80	5,71
24 h	3,90	3,89	4,34	3,90	3,80	4,00	4,68	4,78



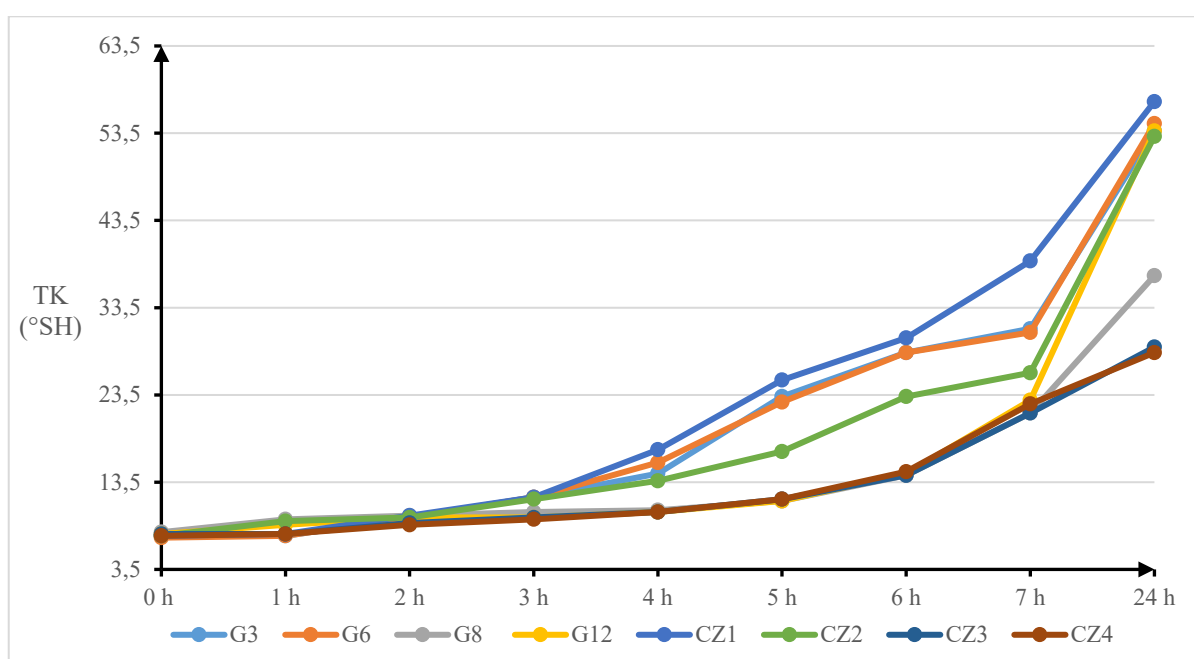
Graf 5: Grafické znázornění hodnot pH pro všechny sledované vzorky

5.2.2 Výsledky stanovení titrační kyselosti

Opět nelze hovořit o přímém vztahu mezi aktivní a titrační kyselostí, ačkoliv lze říct, že po vyčerpání pufracího systému existuje nepřímá úměrnost mezi pH a TK. Což znamená, že se snižující hodnotou pH roste TK. Tomu odpovídají i výsledné hodnoty titrační kyselosti pro vzorky CZ3 a CZ4, jelikož tyto vzorky dosáhly nejnižších hodnot titrační kyselosti. A zároveň vzorek CZ1, který měl v předešlé tabulce nejnižší hodnotu pH (3,8), dosáhl nejvyšší hodnoty titrační kyselosti. Hodnoty titrační kyselosti všech vzorků v konkrétních časech jsou uvedeny v tabulce č. 14 a následně graficky znázorněny v grafu č. 6.

Tabulka 14: Hodnoty titrační kyselosti (°SH) u všech sledovaných vzorků v konkrétních časech

t	G3	G6	G8	G12	CZ1	CZ2	CZ3	CZ4
0 h	7,35	7,14	7,77	7,56	7,35	7,35	7,56	7,35
1 h	7,35	7,35	9,24	8,61	7,56	9,03	7,56	7,56
2 h	9,45	9,45	9,66	9,45	9,66	9,45	8,82	8,61
3 h	11,76	11,76	10,08	9,45	11,76	11,55	9,45	9,24
4 h	14,49	15,75	10,29	10,08	17,22	13,65	10,08	10,08
5 h	23,31	22,68	11,34	11,34	25,20	17,01	11,55	11,55
6 h	28,35	28,35	14,28	14,49	30,03	23,31	14,28	14,70
7 h	31,08	30,66	21,42	22,89	38,85	26,04	21,42	22,47
24 h	53,76	54,60	37,17	53,76	57,12	53,13	28,98	28,35



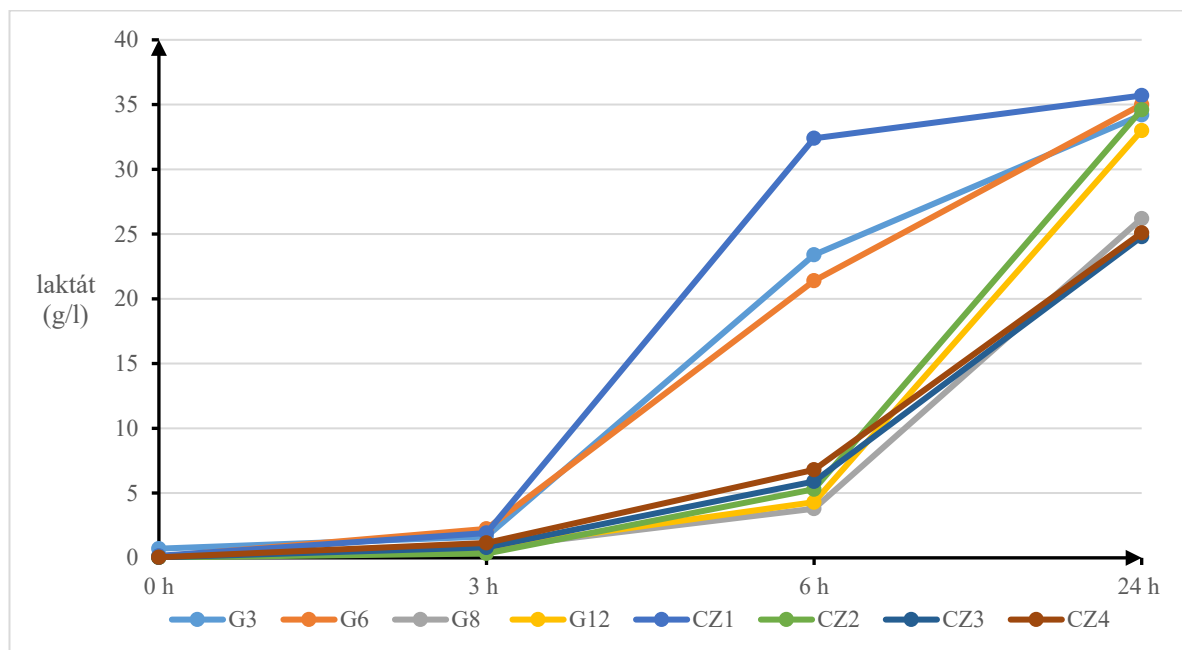
Graf 6: Grafické znázornění titrační kyselosti (°SH) pro všechny sledované vzorky

5.2.3 Výsledky stanovení kyseliny mléčné

Z tabulky č. 15 lze odvodit přímou úměrnost mezi titrační kyselostí a obsahem kyseliny mléčné. Tedy při zvyšující se hodnotě TK, se zvyšuje i obsah kyseliny mléčné. Tudíž vzorky CZ3 a CZ4, které měly v předchozí tabulce č. 14 nejnižší TK, měly i nejnižší obsah kyseliny mléčné (24,80 a 25,10) v konečném čase 24 h. Hodnoty kyseliny mléčné v 0 h byly očekávané velmi nízké, a to u všech vzorků. Všechny naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 15 a níže graficky znázorněné v grafu č. 7.

Tabulka 15: Obsah kyseliny mléčné (v g/l) u všech vzorků v konkrétním čase

t	G3	G6	G8	G12	CZ1	CZ2	CZ3	CZ4
0 h	0,71	0,09	0,04	0,03	0,16	0,03	0,03	0,04
3 h	1,64	2,24	0,74	0,76	1,92	0,34	0,80	1,15
6 h	23,40	21,40	3,80	4,30	32,40	5,30	5,90	6,80
24 h	34,20	35,00	26,20	33,00	35,70	34,60	24,80	25,10



Graf 7: Grafické znázornění naměřených hodnot kyseliny mléčné (v g/l) pro všechny vzorky

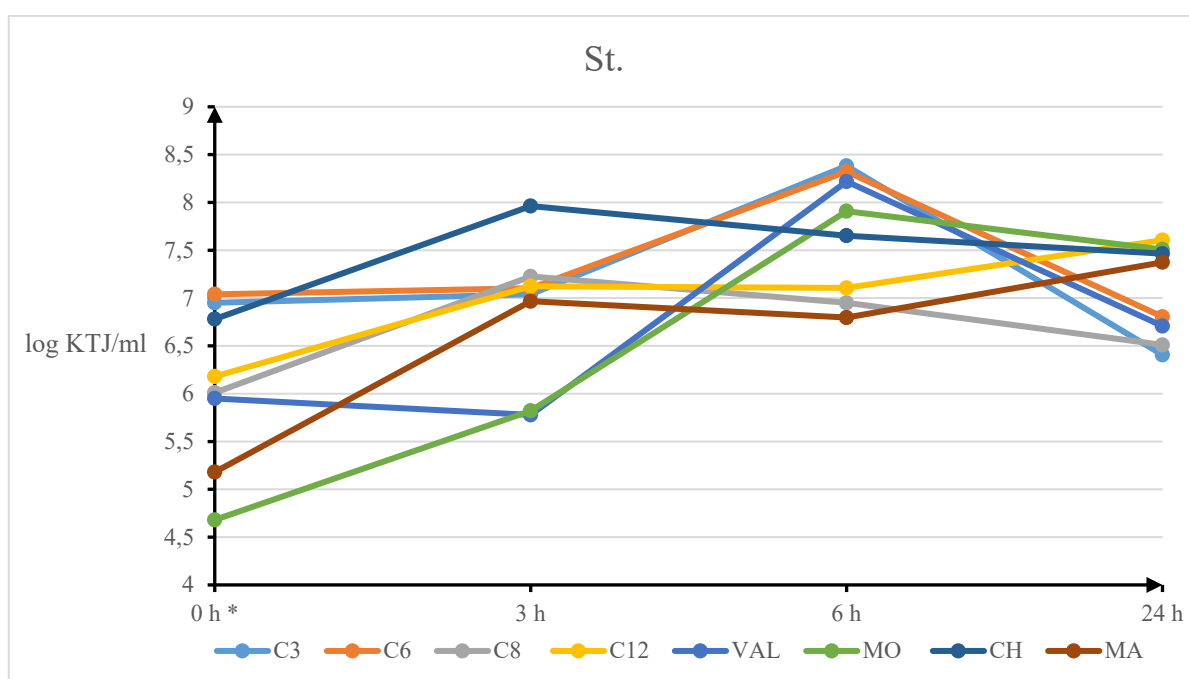
5.2.4 Výsledky stanovení růstu MO v průběhu kysání

Ze získaných hodnot bylo zjištěno následující: inokulum obsahovalo 10^6 a více MO (po součtu streptokoků a laktobacilů) pro všechny vzorky vyjma vzorku CZ2 ($4,68 \log$ KTJ na inokulační dávku). Tento fakt se odrazil i ve třetí hodině měření, kdy u ostatních vzorků byl zjištěn počet MO v řádě 10^7 a u vzorku CZ2 byl počet MO v řádě 10^6 ($5,82 \log$ KTJ/ml). Druhou výjimkou byl vzorek CZ1, u kterého byl počet MO ve třetí hodině stále v řádě 10^6 ($5,78 \log$ KTJ/ml). V následujících hodinách už počet MO rapidně vzrostl u všech vzorků (10^7 a více), a to obzvláště u vzorku CZ1 ($8,22 \log$ KTJ/ml v 6 h). Po 24 h je u některých vzorků patrný pokles v počtu MO, nicméně naměřené hodnoty se stále pohybují v řádě 10^7 a více. V následující tabulce (tabulka č. 16) jsou uvedené počty MO (\log KTJ/ml), které byly vypočteny pomocí vzorce uvedeného v podkapitole 4.4. V tabulce jsou uvedeny počty MO v inokulu a v následujících měřených hodinách zvláště pro streptokoky a zvláště pro laktobacily. Pro lepší přehled je stejně tak provedeno i grafické znázornění těchto naměřených hodnot (graf č. 8 a 9).

Tabulka 16: Výsledky stanovení počtu MO v konkrétních časech (uvedené v log KTJ/ml)

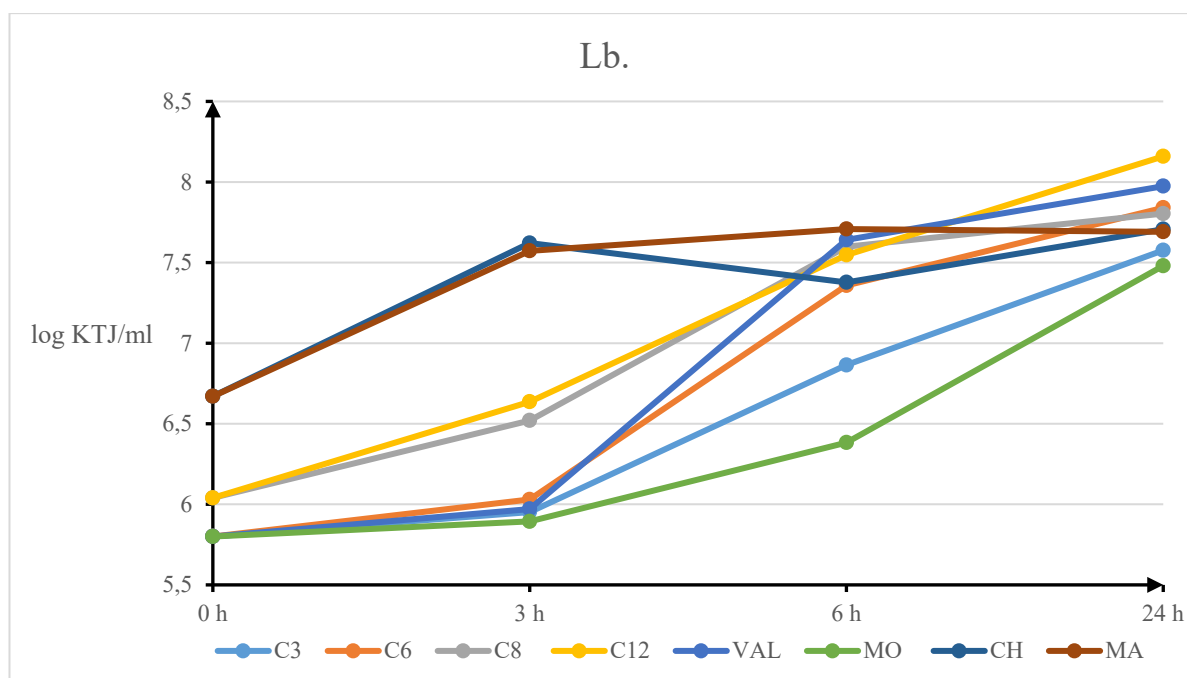
t		G3	G6	G8	G12	CZ1	CZ2	CZ3	CZ4
St.	0 h (inokulum)*	6,95	7,04	6,01	7,18	5,95	4,68	6,78	5,18
	3 h	7,04	7,10	7,23	7,12	5,78	5,82	7,96	6,97
	6 h	8,38	8,32	6,95	7,11	8,22	7,91	7,65	6,80
	24 h	6,41	6,80	6,51	7,61	6,71	7,51	7,46	7,37
Lb.	0 h (inokulum)*	5,80	5,80	6,04	6,04	5,80	5,80	6,67	6,67
	3 h	5,95	6,03	6,52	6,64	5,97	5,89	7,62	7,57
	6 h	6,86	7,36	7,60	7,55	7,64	6,38	7,38	7,71
	24 h	7,58	7,84	7,80	8,16	7,97	7,48	7,71	7,69

*Poznámka: jedná se o inokulační dávku přidanou do vzorků v 0 h, tj. log KTJ na inokulační dávku.



*Poznámka: jedná se o inokulační dávku přidanou do vzorků v 0 h, tj. log KTJ na inokulační dávku.

Graf 8: Grafické znázornění stanovení počtu streptokoků v konkrétních časech (log KTJ/ml)



*Poznámka: jedná se o inokulační dávku přidanou do vzorků v 0 h, tj. log KTJ na inokulační dávku.

Graf 9: Grafické znázornění stanovení počtu laktobacilů v konkrétních časech (log KTJ/ml)

5.2.5 Výsledky statistického vyhodnocení mezi sledovanými skupinami

V této fázi vyhodnocení se opět porovnávaly dvě skupiny: skupina 1 a 2. Skupiny jsou zastoupeny stejnými izoláty streptokoků, jak již bylo popsáno v podkapitole 5.1.5. K oběma skupinám byly přidány ještě izoláty laktobacilů (stejně pro všechny vzorky).

5.2.5.1 Výsledky stanovení rozdílů pH hodnot mezi dvěma skupinami

Mezi sledovanými skupinami nebyl nalezen žádný statisticky významný rozdíl v průměrných hodnotách pH (na hladině pravděpodobnosti 0,05). Data všech průměrných hodnot pH pro obě skupiny jsou uvedeny v tabulce č. 16.

Tabulka 17: Statistické vyhodnocení pH hodnoty mezi sledovanými skupinami

pH	Skupina 1 – průměry	Skupina 2 – průměry	p-hodnota
0 h	6,55	6,59	0,560536
1 h	6,47	6,50	0,543088
2 h	6,37	6,38	0,654364
3 h	6,26	6,29	0,650469
4 h	6,08	6,10	0,900976
5 h	5,82	5,83	0,960485
6 h	5,30	5,44	0,786663
7 h	5,12	5,18	0,900184
24 h	4,01	4,32	0,294774

5.2.5.2 Výsledky stanovení rozdílů titrační kyselosti mezi sledovanými skupinami

Průměry titračních hodnot neprokázaly ve sledovaných hodinách mezi skupinami 1 a 2 žádné statisticky významné rozdíly (na hladině pravděpodobnosti 0,05). Jelikož nevznikly žádné statisticky významné rozdíly mezi těmito dvěma skupinami v hodnotách pH, dalo se očekávat, že ani v titrační kyselosti nebude nalezen žádný statisticky významný rozdíl. Všechny zjištěné hodnoty jsou uvedeny v tabulce č. 17.

Tabulka 18: Statistické vyhodnocení titrační kyselosti (°SH) mezi sledovanými skupinami

t	Skupina 1 – průměry	Skupina 2 – průměry	p-hodnota
0 h	7,46	7,40	0,730358
1 h	8,14	7,93	0,737710
2 h	9,50	9,14	0,200233
3 h	10,76	10,50	0,778578
4 h	12,65	12,76	0,964136
5 h	17,17	16,33	0,862959
6 h	21,37	20,58	0,891288
7 h	26,51	27,20	0,890297
24 h	49,82	41,90	0,400687

5.2.5.3 Výsledky stanovení rozdílů v obsahu kyseliny mléčné mezi sledovanými skupinami

Průměrné hodnoty obsahu kyseliny mléčné v jednotlivých hodinách neprokázaly mezi hodnocenými skupinami žádné statisticky významné rozdíly (na hladině pravděpodobnosti 0,05). Jelikož obsah kyseliny mléčné ve vzorcích úzce souvisí s hodnotou titrační kyselosti, dal se tento výsledek předpokládat v porovnávání průměrných hodnot mezi těmito dvěma skupinami. Všechny hodnoty jsou uvedeny níže v tabulce č. 18.

Tabulka 19: Statistické vyhodnocení obsahu kyseliny mléčné (g/l) ve sledovaných skupinách

t	Skupina 1 – průměry	Skupina 2 – průměry	p-hodnota
0 h	0,22	0,07	0,398277
3 h	1,35	1,05	0,575483
6 h	13,23	12,60	0,943635
24 h	32,10	30,05	0,586907

5.2.5.4 Výsledky stanovení rozdílů v počtu MO mezi sledovanými skupinami

V tabulce č. 19 nelze pozorovat žádné statisticky významné rozdíly na hladině pravděpodobnosti 0,05 ve všech sledovaných hodinách.

Tabulka 20: Statistické vyhodnocení průměrného počtu MO mezi sledovanými skupinami

t	Skupina 1 – průměry	Skupina 2 – průměry	p-hodnota
0 h*	5,92	6,24	0,272110
3 h	6,29	6,76	0,386262
6 h	7,34	7,28	0,859116
24 h	7,85	7,71	0,428520

*Poznámka: jedná se o inokulační dávku přidanou do vzorků v 0 h, tj. log KTJ na inokulační dávku. Všechny ostatní hodnoty jsou v log KTJ/ml.

5.3 Třetí část experimentu – výsledky stanovení kysacích schopností streptokoků s již přidanými laktobacily v zahuštěném mléce

Tato část experimentu je téměř shodná s výše uvedenou druhou částí experimentu, zásadní rozdíl je v použití zahuštěného mléka a v měřených hodinách. Opět byl použit denzitometr na přesnější odhad růstu MO v inokulu a všechny hodnoty se nacházejí v níže uvedených tabulkách (tabulka č. 21 a 22).

Tabulka 21: Hodnoty získané z denzitometru a množství odebraného inokula k zaočkování

Denzitometr	Hodnota	Množství (ml)
G3	6,70	0,100
G6	5,60	0,125
G12	6,02	0,125
CZ1	5,49	0,125
RA	4,30	0,175

Tabulka 22: Hodnoty získané z denzitometru a množství odebraného inokula k zaočkování

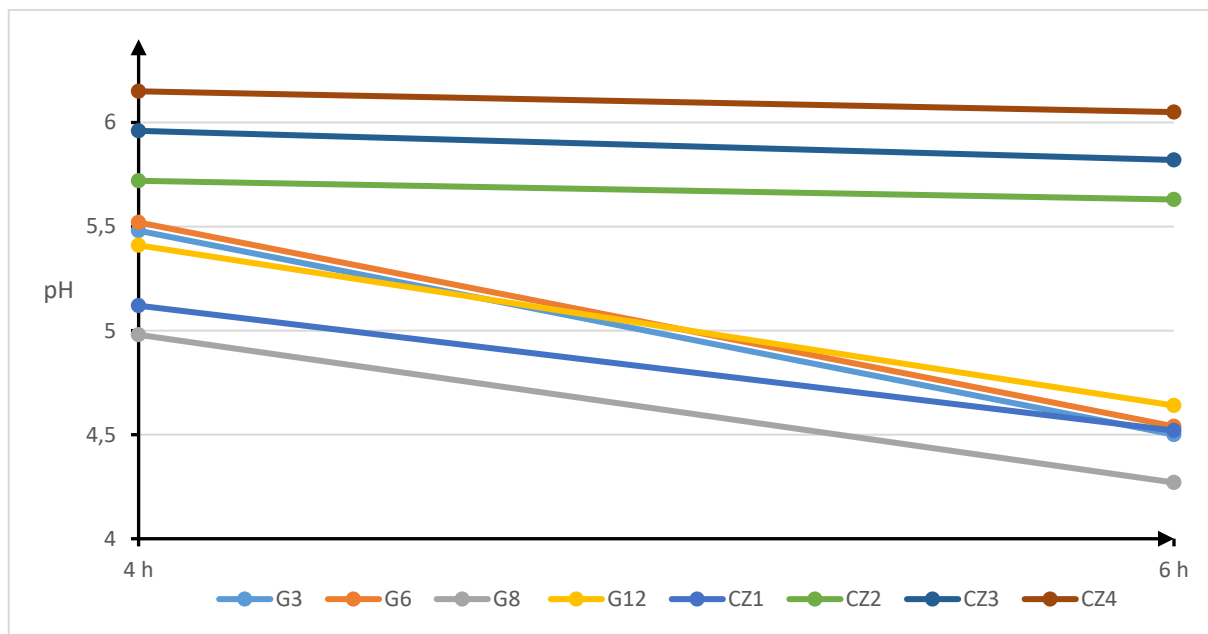
Denzitometr	Hodnota	Množství (ml)
G8	5,85	0,125
CZ2	5,90	0,125
CZ3	5,80	0,125
CZ3	5,11	0,150
RA	2,60	0,290

5.3.1 Výsledky stanovení hodnoty pH

Měření probíhala pouze ve čtvrté a šesté hodině. Bylo vyhodnoceno, že vzorky CZ2, CZ3 a CZ4 by bylo vhodné opakovat, jelikož nedosáhly tak nízkých hodnot pH jako ostatní vzorky v šesté hodině, které mají optimální hodnotu pH. Data naměřená ve čtvrté a šesté hodině jsou uvedena v tabulce č. 23 a graficky znázorněna v grafu č. 10.

Tabulka 23: Hodnoty pH u všech sledovaných vzorků v konkrétním čase

t	G3	G6	G8	G12	CZ1	CZ2	CZ3	CZ4
4 h	5,48	5,52	4,98	5,41	5,12	5,72	5,96	6,15
6 h	4,50	4,54	4,27	4,64	4,52	5,63	5,82	6,05



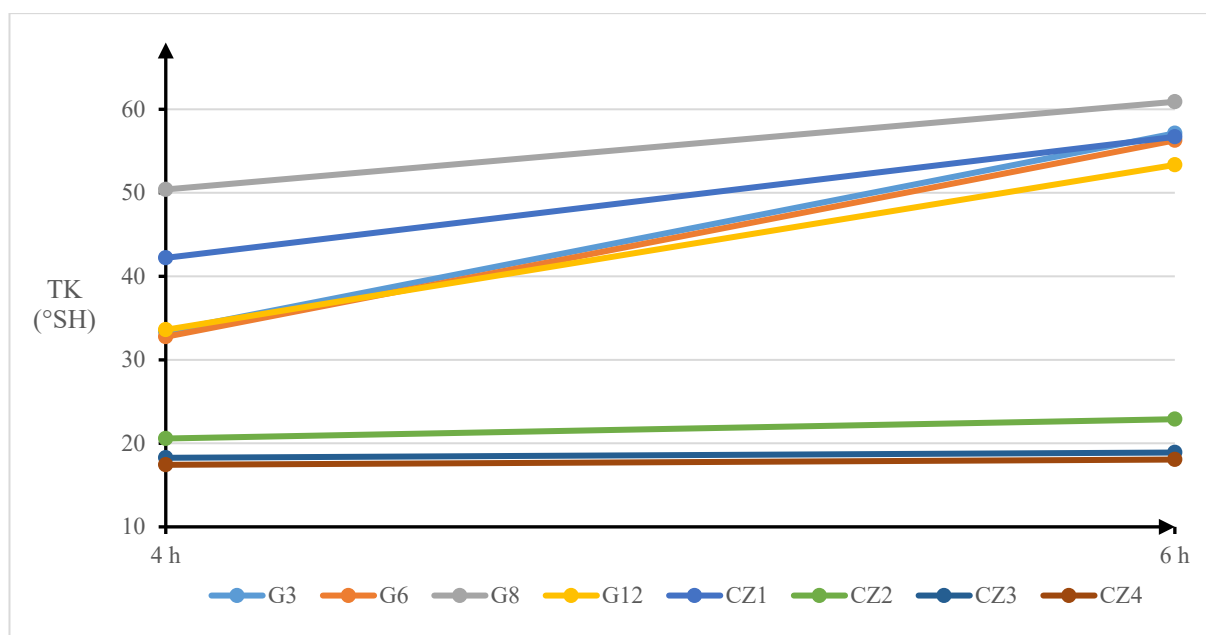
Graf 10: Grafické znázornění hodnot pH pro všechny sledované vzorky

5.3.2 Výsledky stanovení titrační kyselosti

Po vyčerpání pufracího systému je mezi pH a TK nepřímá úměrnost, tudíž se vysoké hodnoty pH u již zmiňovaných vzorků (CZ2, CZ3 a CZ4) projeví i nižšími hodnotami titrační kyselosti. Ostatní vzorky mají odpovídající titrační kyselost. Celkově nejvyšších hodnot titrační kyselosti dosáhly gruzínské vzorky. Hodnoty titrační kyselosti získané v této části experimentu jsou nejvyššími hodnotami ze všech částí experimentu. Data naměřená ve čtvrté a šesté hodině jsou uvedena níže v tabulce č. 24 a následně i graficky znázorněna v grafu č. 11.

Tabulka 24: Hodnoty titrační kyselosti (°SH) u všech sledovaných vzorků v konkrétním čase

t	G3	G6	G8	G12	CZ1	CZ2	CZ3	CZ4
4 h	33,39	32,76	50,40	33,60	42,21	20,58	18,27	17,43
6 h	57,12	56,28	60,90	53,34	56,70	22,89	18,90	18,06



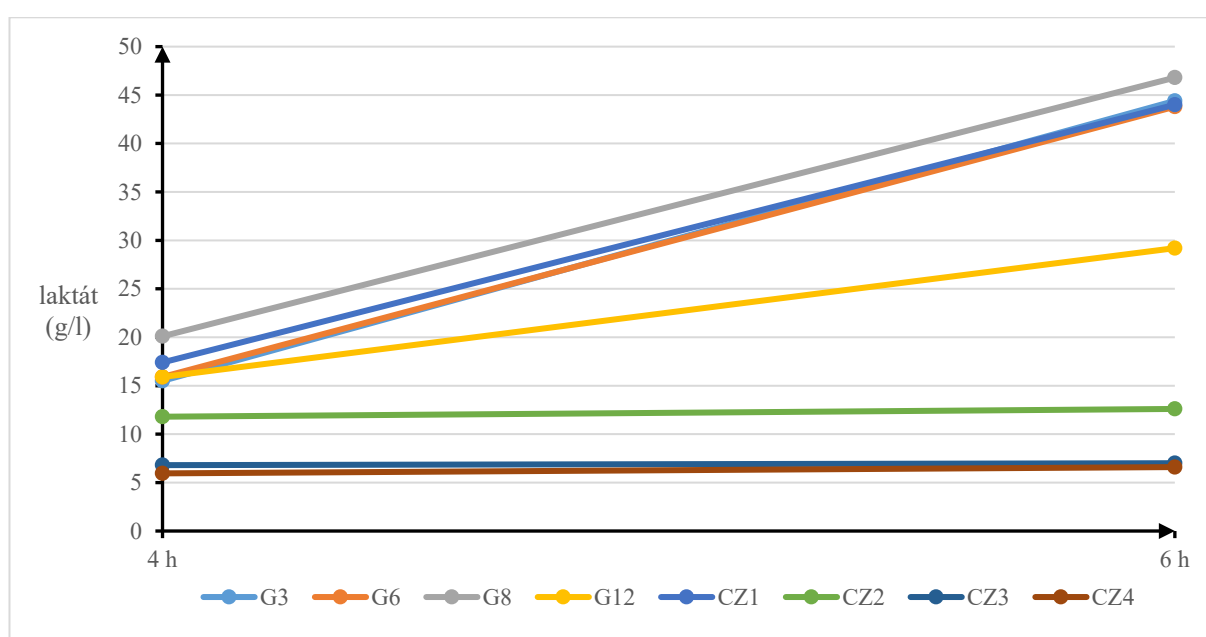
Graf 11: Grafické znázornění titrační kyselosti (°SH) pro všechny sledované vzorky

5.3.3 Výsledky stanovení kyseliny mléčné

Obsah kyseliny mléčné byl opět nejnižší u již zmiňovaných vzorků (CZ2, CZ3 a CZ4), jelikož je spojitost mezi obsahem kyseliny mléčné a hodnotou titrační kyselosti. Nejvyšší obsah kyseliny mléčné měly celkově gruzínské vzorky. Naměřená data všech vzorků jsou uvedeny níže v tabulce č. 25 a následně graficky znázorněna v grafu č. 12.

Tabulka 25: Obsah kyseliny mléčné (v g/l) u všech vzorků v konkrétním čase

t	G3	G6	G8	G12	CZ1	CZ2	CZ3	CZ4
4 h	15,50	15,90	20,10	15,90	17,40	11,80	6,80	5,95
6 h	44,40	43,80	46,80	29,20	44,00	12,60	7,00	6,60



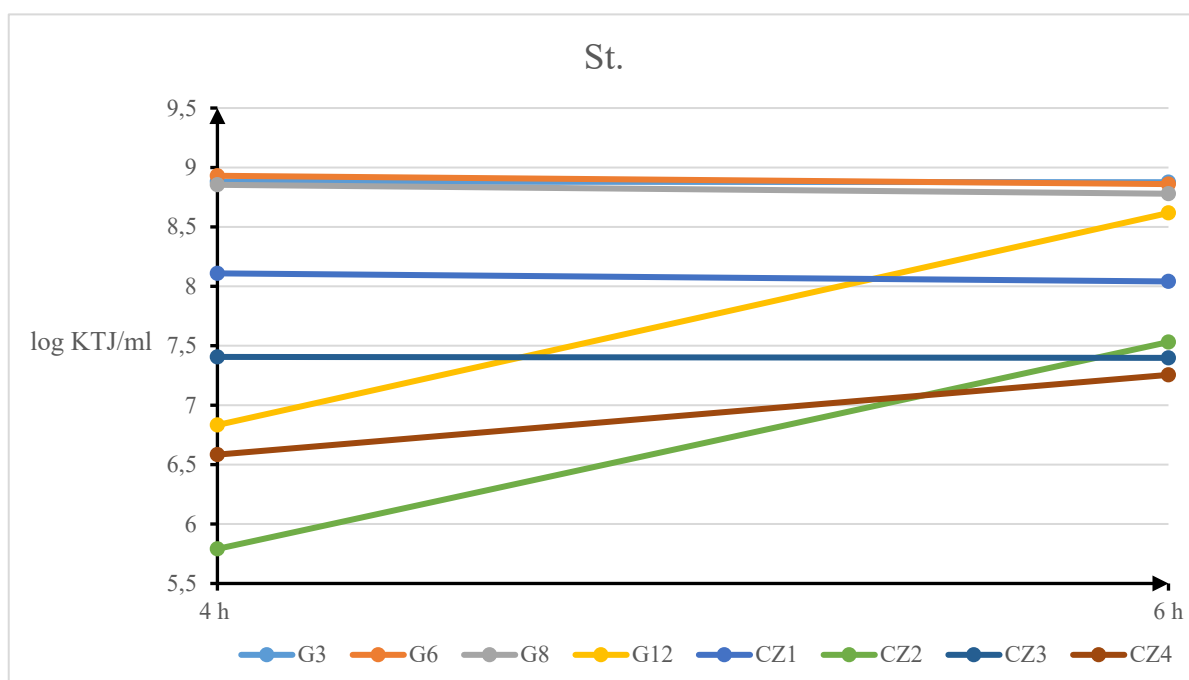
Graf 12: Grafické znázornění naměřených hodnot kyseliny mléčné (v g/l) pro všechny vzorky

5.3.4 Výsledky stanovení růstu MO v průběhu kysání

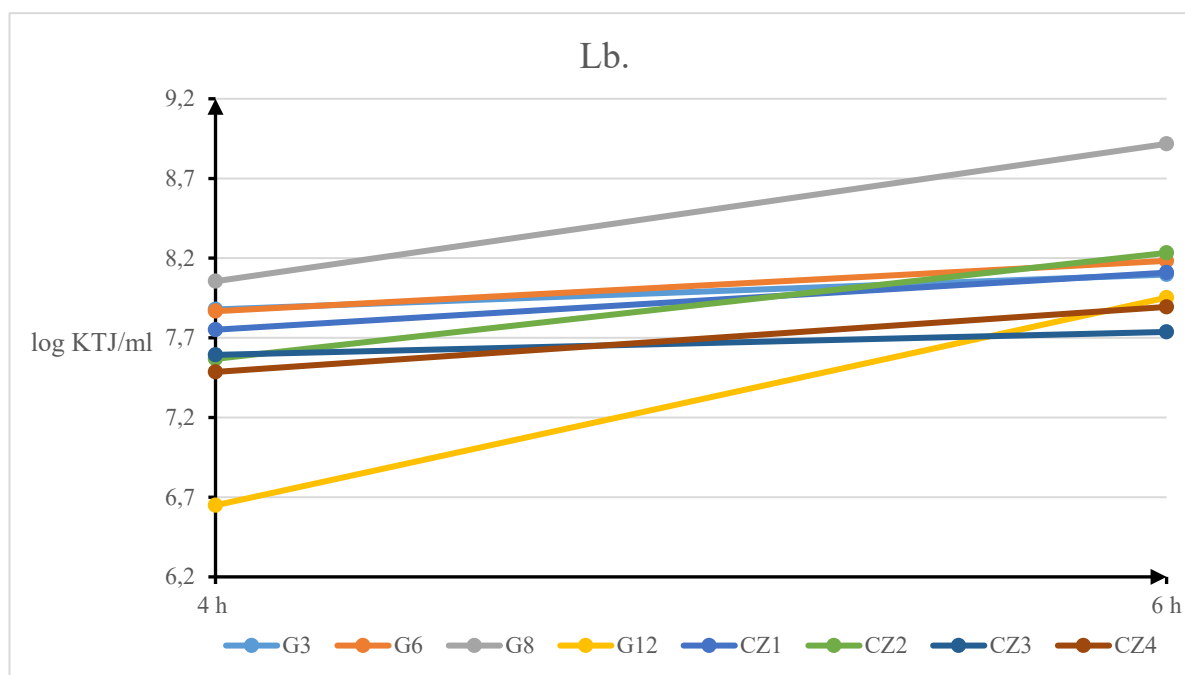
Z výsledků bylo zjištěno, že všechny vzorky měly již ve čtvrté hodině počet MO v řádě 10^7 a více (po sečtení počtu streptokoků a laktobacilů v dané hodině). Nejmenší počet streptokoků byl zjištěn u vzorků CZ2 (5,79 a 7,53 log KTJ/ml) a CZ4 (6,58 a 7,26 log KTJ/ml) ve čtvrté i v šesté hodině. Nejvyšší počty streptokoků byly nalezeny ve čtvrté i v šesté hodině u vzorků G3, G6 a G8. Vzorek G12 se vykazoval nejmenším počtem laktobacilů ve čtvrté hodině (6,65 log KTJ/ml). V šesté hodině byl nejmenší počet laktobacilů zjištěn u vzorků CZ3 (7,74 log KTJ/ml), CZ4 (7,89 log KTJ/ml) a G12 (7,95 log KTJ/ml). Všechny výsledky stanovení růstu MO byly získány podle již zmíněného vzorce a jsou uvedeny v log KTJ/ml v následující tabulce č. 26. Pro lepší přehlednost jsou následující hodnoty graficky znázorněny zvlášť pro streptokoky a laktobacily níže v grafu č. 13 a 14.

Tabulka 26: Výsledky stanovení růstu MO v průběhu kysání (uvedené v log KTJ/ml)

	t	G3	G6	G8	G12	CZ1	CZ2	CZ3	CZ4
St.	4 h	8,88	8,93	8,85	6,83	8,11	5,79	7,41	6,58
	6 h	8,88	8,86	8,78	8,62	8,04	7,53	7,40	7,26
Lb.	4 h	7,88	7,87	8,06	6,65	7,75	7,57	7,59	7,49
	6 h	8,10	8,18	8,92	7,95	8,11	8,23	7,74	7,89



Graf 13: Grafické znázornění stanovení počtu streptokoků (log KTJ/ml) v konkrétních časech



Graf 14: Grafické znázornění stanovení počtu laktobacilů (v log KTJ/ml) v konkrétních časech

5.3.5 Výsledky statistického vyhodnocení mezi sledovanými skupinami

V této fázi vyhodnocení se znovu porovnávaly dvě skupiny (respektive jejich průměrné hodnoty) s označením: skupina 1 a 2. Obě skupiny jsou zastoupeny stejnými izoláty streptokoků, jak již bylo zmíněno v podkapitole 5.1.5. K oběma skupinám byly přidány ještě izoláty laktobacilů (stejně pro všechny vzorky).

5.3.5.1 Výsledky stanovení rozdílů pH hodnot mezi dvěma skupinami

Mezi skupinami 1 a 2 byl nalezen statisticky významný rozdíl ($p = 0,026579$) v šesté hodině. Nicméně nelze tomu přisuzovat významnou váhu, jelikož již bylo zmíněno (viz podkapitola 5.3.1), že u některých vzorků ze skupiny 2 (pouze v této části experimentu) by bylo vhodné opakovat měření. Výsledky statistického vyhodnocení jsou uvedeny v tabulce č. 27.

Tabulka 27: Statistické vyhodnocení pH hodnot mezi sledovanými skupinami

t	Skupina 1 – průměry	Skupina 2 – průměry	p-hodnota
4 h	5,35	5,74	0,178746
6 h	4,49	5,51	0,026579

5.3.5.2 Výsledky stanovení rozdílů titrační kyselosti mezi sledovanými skupinami

Statisticky významný rozdíl ($p = 0,025235$) v šesté hodině byl zjištěn mezi těmito dvěma skupinami i u titrační kyselosti. Avšak opět tomu nelze přisuzovat významnou váhu z již zmiňovaných důvodů v předchozí podkapitole (5.3.1). Statistické vyhodnocení je uvedeno v tabulce č. 28.

Tabulka 28: Statistické vyhodnocení titrační kyselosti (°SH) mezi sledovanými skupinami

t	Skupina 1 – průměry	Skupina 2 – průměry	p-hodnota
4 h	37,54	24,62	0,127084
6 h	56,91	29,14	0,025235

5.3.5.3 Výsledky stanovení rozdílů v obsahu kyseliny mléčné mezi sledovanými skupinami

I v tomto měření se téměř objevil statisticky významný rozdíl ($p = 0,053072$) mezi sledovanými skupinami. Což souvisí s úzkou spojitostí mezi obsahem kyseliny mléčné a titrační kyselostí. Statistické vyhodnocení obsahu kyseliny mléčné je uvedeno v tabulce č. 29.

Tabulka 29: Statistické vyhodnocení obsahu kyseliny mléčné (v g/l) ve sledovaných skupinách

t	Skupina 1 – průměry	Skupina 2 – průměry	p-hodnota
4 h	16,85	10,49	0,067474
6 h	41,05	17,55	0,053072

5.3.5.4 Výsledky stanovení rozdílů v počtu MO mezi sledovanými skupinami

Z níže uvedené tabulky č. 30 není patrný žádný statisticky významný rozdíl na hladině pravděpodobnosti 0,05 v rámci průměrného počtu MO mezi sledovanými skupinami 1 a 2.

Tabulka 30: Statistické vyhodnocení průměrného počtu MO mezi sledovanými skupinami

t	Skupina 1 – průměry*	Skupina 2 – průměry*	p-hodnota
4 h	7,62	7,60	0,965131
6 h	8,29	7,99	0,269315

*Poznámka: Všechny uvedené hodnoty jsou v log KTJ/ml.

6 Diskuze

6.1 Aktivní a titrační kyselost

Kyselost mléka není způsobena pouze kyselinou mléčnou, nýbrž i přítomností kaseinů, albuminů, CO₂, citrátu a fosfátů. Proto je hodnota získaná stanovením titrační kyselosti podle Soxhlet-Henkela upřednostněna před hodnotou určující množství kyseliny mléčné v rámci určení kyselosti mléka/mléčných výrobků (Milagres et al. 2012).

Cais-Sokolińska et al. (2004) hodnotili průběh kysání mléka, tj. stanovení titrační kyselosti a koncentrace kyseliny mléčné při výrobě mléčného produktu za použití jogurtových bakterií (*S. salivarius* subsp. *thermophilus* a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*). Zjistili, že titrační kyselost získaného mléčného výrobku stoupá spolu se zvýšením počtu MO v aplikovaném inokulu. Svým experimentem prokázali, že i poměr bakteriálních kultur aplikovaných během inokulace mléka, měl významný dopad na titrační kyselost mléčného výrobku. Kvalita mléčného výrobku záleží na kvalitě a složení aplikovaných bakteriálních kultur. Jogurtové bakterie využívají laktózu v průběhu kvašení různou rychlostí, což vede ke značným rozdílům v měření kyselosti mléčného produktu v čase. K experimentu použili pasterizované mléko vytemperované na 43 °C v objemu 250 ml a k zaočkování bylo použito 5 ml inokula (2% inokulum). Inkubace probíhala ve 43 °C a byla ukončena po 6 hodinách s okamžitou redukcí teploty na 6 °C. Při této teplotě byly vzorky ponechány ještě dalších 18 hodin. Titrační kyselost byla zjištěna ve stupních Soxhlet-Henkela, aktivní kyselost za použití pH metru s elektrodou. Cais-Sokolińska et al. (2004) také uvedli, že titrační kyselost v 0 hodin odpovídala 6,58 °SH a konstantně se zvyšovala. Po 6 hodinách inkubační doby byla jimi naměřená titrační kyselost jogurtu, obsahujícího kulturu v poměru aplikovaných bakteriálních kmenů 1:1, významně nižší (36,5 °SH), než titrační kyselost jogurtů vyrobených s použitím poměru 3:2 s převahou laktobacilů (39,5 °SH). Ačkoliv ani v jednom případě titrační kyselost nepřesáhla hodnotu 40 °SH. A stejně tak tomu odpovídalo i pH, které bylo u jogurtů vyrobených za použití bakteriálních kultur v poměru 1:1 o trochu vyšší. Celkově se však průměrné hodnoty pH pohybovaly kolem 6,7 (v 0 hodin) a 4,3 (po 6 hodinách).

Gezginç & Kilinç (2019) provedli experiment za použití stejných druhů bakterií. K jejich experimentu použili vytemperované (45 °C) plnotučné UHT mléko (200 ml) zaočkované 1% inokulem. Po inkubační době (6 hodin) byly konečné hodnoty pH všech vzorků v rozmezí 3,82 – 4,46 (za použití mikroprocesorového pH metru).

Stejný experiment provedli ve své studii i vědci Vasilean et al. (2011). Nicméně, jako fermentační médium použili UHT mléko s různým obsahem tuku (3,5 %, 1,5 % a 0,5 % tuku). Před zaočkováním se mléko vytemperovalo na 45 °C. Vzorky byly inkubovány při teplotě 43 °C po dobu 6 hodin a 30 minut. Fermentace byla zastavena, když pH dosáhlo hodnoty 4,6. Poté byly vzorky jogurtu okamžitě ochlazeny a uloženy při teplotě 4 °C. Z výsledků této vědecké studie nebyl v rámci aktivní a titrační kyselosti nalezen žádný statisticky významný rozdíl ve vzorcích mléka s různým obsahem tuku. Titrační kyselost se u vzorků pohybovala kolem 85 °SH. Výsledná hodnota pH se u vzorků pohybovala kolem 4,57 (měřeno digitálním pH metrem Hanna).

Tomovska et al. (2016) použili jako fermentační médium také UHT mléko, ale délka fermentace odpovídala pouze 4 hodinám. Po uplynutí této doby byly všechny vzorky okamžitě přendány do chladničky s teplotou 4 °C. Před zaočkováním inokulační dávkou bylo mléko vytemperováno na 35 °C. Očkování bylo provedeno 1% inokulem. Inkubace vzorků probíhala při teplotě 40 °C. Digitálním pH metrem bylo stanoveno snížení hodnoty pH z 6,67 (v 0 hodin) na 4,47 (po 4. hodině). Uvedli, že většina výrobců má nastavenou hodnotu pH mezi 4,00 – 4,60. U titrační kyselosti došlo ke zvýšení z 8,00 °SH (v 0 hodin) na 27,87 °SH (po 4. hodině), tudíž ani v této studii nepřesáhla titrační kyselost 40 °SH. Alm (1982) ve své studii uvedl, že hodnota pH se v 0 hodin pohybovala kolem 6,7 – 6,8 (měřeno radiometrem). Po uplynutí inkubační doby (3 – 4 h) při teplotě 43 – 44 °C se hodnoty pH pohybovaly v rozmezí 3,8 – 4,2. Bouteille et al. (2013) použili k vlastnímu experimentu také UHT mléko, které ale bylo vytemperované na 45 °C před zaočkováním inokulační dávkou. Uvedli, že pro výrobní proces jogurtu se obecně používá 1,5 – 3% inokulum. Inkubace proběhla při teplotě 45 °C po dobu 4 h. Získaný mléčný výrobek měl pH kolem 4,2 – 4,7 (měřeno pH metrem s elektrodou).

V první části experimentu této diplomové práce byl použit k měření hodnoty pH reflektometr RQFlex[®] 10 (již zmíněný v metodice), a proto jsou získané hodnoty z tohoto přístroje o trochu nižší hned při měření v 0 hodin, než jsou hodnoty pH v dalších částech experimentu, kde byl použit pH metr Hanna Instruments. Tento fakt byl ověřen i později, kdy u stejných vzorků byly hodnoty pH měřeny pomocí obou přístrojů, a to i přesto, že kalibrace byla provedena v obou případech. Jelikož byly v první části experimentu porovnávány pouze vzorky obsahující streptokoky, tak se naměřené hodnoty trochu liší oproti studiím, kde byl hodnocen symbiotický vztah jogurtových bakterií. To je jeden z hlavních důvodů, proč hodnota pH neklesala v čase tak rychle. Až po 24 hodinách se u všech pozorovaných vzorků pohybovala hodnota pH v rozmezí 4,00 – 4,50, což již bylo v souladu s uvedenými hodnotami pH ve všech výše zmiňovaných vědeckých studiích. Co se týče titrační kyselosti, tak ta odpovídala normálu již v 0 hodin. Po 4 hodinách inkubace se všechny gruzínské vzorky blížily k hodnotě, kterou uvádí ve svém experimentu Tomovska et al. (2016) – 27,87 °SH. I přesto, že je hodnota titrační kyselosti nízká, je důležité podotknout, že se jedná pouze o kmeny streptokoků. U vzorků obsahujících izoláty streptokoků, z jogurtů běžně prodávaných na českém trhu, byla až na výjimku (CZ1) titrační kyselosti ještě nižší. I v následujících hodinách byla titrační kyselost stále nižší než je obvyklé u jogurtových výrobků, ačkoliv i Cais-Sokolińska et al. (2004) nedosáhli ve svém experimentu hodnoty titrační kyselosti přesahující 40 °SH. Z gruzínských vzorků se osvědčily zvláště vzorky G3 (35,89 °SH), G6 (36,89 °SH), které dosáhly vyšší titrační kyselosti a nižší aktivní kyselosti než vzorky z komerčně dostupných mléčných výrobků (opět až na výjimku – CZ1).

Ve druhé části experimentu této diplomové práce byl zkoumán symbiotický vztah již zmiňovaných dvou druhů bakterií a jeho vliv na průběh fermentace. Ke všem vzorkům měřených v první části experimentu byl přidán tentýž kmen laktobacilů izolovaných z komerčně dostupných mléčných výrobků na území ČR. Je důležité zmínit, že ve většině studiích je uváděno množství inokulační dávky 1 – 3% (Cais-Sokolińska et al. 2004; Bouteille et al. 2013; Tomovska et al. 2016; Gezginç & Kiliç 2019). V této části experimentu však nešlo primárně o výrobu jogurtu, ale o porovnání kysacích schopností vybraných mléčných bakterií na základě možného objevení nového kmenu streptokoků, který by se mohl vyznačovat odlišnými vlastnostmi v průběhu kysání. Tudíž nemá tak velký význam, jaká je inokulační

dávka, ale jaký je průběh mléčného kvašení jako takový. V této části experimentu bylo u všech vzorků použito přibližně 0,7% inokulum, což může – a nemusí – vysvětlit jiný průběh mléčného kvašení u sledovaných vzorků. Co se týče výsledků aktivní kyselosti, tak v 0 hodin se pohybovala v rozmezí 6,42 – 6,66 u všech vzorků, což souhlasilo s uvedenými hodnotami v ostatních studiích (Alm 1982; Cais-Sokolińska et al. 2004; Tomovska et al. 2016). Stejně tak odpovídala i hodnota titrační kyselosti v 0 hodin, která se pohybovala v rozmezí 7,14 – 7,77 ° SH (Tomovska et al. 2016). V následujících hodinách hodnota pH klesala velmi pomalu. Po 6 hodinách inkubační doby se pohybovala v rozmezí 4,61 – 5,98. Z gruzínských vzorků opět nejlépe dopadly vzorky G3 (pH = 4,65) a G6 (pH = 4,61). Po 24 hodinách byly hodnoty pH u gruzínských vzorků v rozmezí 3,89 – 4,34. Takové pH se většinou naměřilo v ostatních studiích již po 6 hodinách inkubační doby (Cais-Sokolińska et al. 2004; Gezginç & Kiliç 2019). S tím souvisela i pomalu rostoucí titrační kyselost, kterou lze vidět tabulce č. 14. Z výsledných hodnot je patrné, že až po 24 hodinách se hodnota titrační kyselosti dostala na optimální hodnotu odpovídající kysaným mléčným výrobkům, nicméně ne u všech vzorků. Z gruzínských vzorků dosáhly optimální hodnoty TK pro FMV vzorky G3 (53,76 ° SH), G6 (54,60 ° SH) a G12 (53,76 ° SH). U druhé skupiny dopadly nejlépe vzorky CZ1 (57,12 ° SH) a CZ2 (53,13 ° SH).

Existuje několik faktorů, které mohly zapříčinit takto pomalý průběh fermentace. Jedním z nich může být použití velmi malého množství inokulační dávky (0,7% inokulum). Druhou příčinou může být relativně malé množství fermentačního média (50 ml). V ostatních vědeckých studiích proběhla inokulace většinou do vytemperovaného mléka (35 – 45 ° C). To je další faktor, který urychluje zahájení fermentace bakteriemi mléčného kvašení. Viz Vasilean et al. (2011), kteří provedli před inkubací UHT mléka vytemperování na teplotu 45 ° C a po následné inkubaci (6 hodin a 30 minut) byla titrační kyselost vzniklého jogurtu 85 ° SH.

Vasilean et al. (2011) provedli ve své studii ještě další pokus, který se týkal vzorků s nízkotučným mlékem. U těchto vzorků byl zvýšen procentuální obsah bílkovin přidáním sušeného odstředěného mléka. Čím vyšší byl obsah bílkovin, tím vyšší byla i výsledná hodnota pH (4,68) a to i přesto, že se hodnota titrační kyselosti u vzorků zvyšovala. Tento fakt je způsobený díky pufrací schopnosti proteinů. Následoval další pokus, ve kterém obohatili nízkotučné mléko o laktózu. Výsledkem byl značný nárůst počtu MO (v řádě 10⁸ KTJ/ml), avšak žádná významná změna v aktivní či titrační kyselosti nebyla naměřena.

Ve třetí části experimentu se pracovalo se zahuštěným mlékem (přidáním polotučného sušeného mléka do polotučného UHT mléka), tím se velmi významně zvedl obsah sušiny a nutričně významných látek pro BMK. Tímto experimentem se potvrdil názor, který uvádí Vasilean et al. (2011), tj. čím vyšší obsah proteinů, tím vyšší titrační kyselost. Jelikož u stejných vzorků najednou výrazně vzrostla titrační kyselost a už po 4 hodinách se pohybovala u gruzínských vzorků v rozmezí 32,76 – 50,40 ° SH. Po 6 hodinách inkubace byla titrační kyselost gruzínských vzorků v rozmezí 53,34 – 60,90 ° SH, což byly nejvyšší získané hodnoty titrační kyselosti ze všech částech experimentu. Hodnoty titrační kyselosti u druhé skupiny vzorků byly v rozmezí 18,06 – 56,70 ° SH, přičemž nejlépe dopadl opět vzorek CZ1 (56,70 ° SH). Hodnoty pH se u gruzínských vzorků po 6 hodinách inkubace pohybovaly v rozmezí 4,27 – 4,64, což bylo ve shodě s ostatními vědeckými studiemi (Vasilean et al. 2011; Tomovska et al. 2016). Z gruzínských vzorků dopadly nejlépe vzorky G3 (57,12 ° SH), G6 (56,28 ° SH) a G8 (60,90 ° SH). Vzorky měly zároveň i daleko hustší konzistenci.

Ze všech tří částí experimentu mezi sledovanými skupinami 1 a 2 nebyl nalezen statisticky významný rozdíl, kterému by se měla věnovat větší pozornost. Pokud se našel statisticky významný rozdíl, bylo to pouze v případech, kde bylo zmiňované vhodné opakování měření u vybraných vzorků.

6.2 Obsah kyseliny mléčné

Cais-Sokolińska et al. (2004) uvedli, že na obsah kyseliny mléčné má významný vliv typ použitých bakteriálních kultur a jejich poměr. Z jejich výsledků je patrné, že mléčný výrobek získaný za použití jogurtových bakterií v poměru 1:1 má nižší obsah kyseliny mléčné než při použití bakteriální kultury v poměru 3:2 (s převahou laktobacilů). Kyselina mléčná (měřená pomocí spektrofotometru) byla v 0 hodin zastoupena 0,16 %, ve 4 hodiny 0,53 – 0,66 % a po 6 hodinách 0,82 – 0,89 %. K podobnému závěru došli i Gezginç & Kilinç (2019) a Vasilean et al. (2011), kteří uvedli obsah kyseliny mléčné ve vzorcích jogurtů v rozmezí 0,63 – 1,055 % po přibližně 6 hodinách inkubační doby. Obsah kyseliny mléčné byl zjištěn pomocí HPLC. Alm (1982) naměřil stejné hodnoty obsahu kyseliny mléčné jako tomu je v ostatních vědeckých studiích (0,6 – 1,2 %). Pro experiment použil kravské mléko (ošetřené teplotou 95 ° C po dobu 3 minut) s obsahem tuku 3,0 %. Vasilean et al. (2011) ve svém experimentu prokázali, že vyšší obsah bílkovin ve vzorcích se odrážel i ve vyšším obsahu kyseliny mléčné.

Bouteille et al. (2013) hodnotili obsah kyseliny mléčné skrz metodu využívající kvantitativní protonovou nukleární magnetickou rezonanční spektroskopii. Výsledný obsah kyseliny mléčné se pohyboval kolem 0,7 – 1,1 % v souladu s ostatními vědeckými studiemi. Počáteční obsah kyseliny mléčné (tedy v 0 hodin) se pohyboval kolem $2,06 \pm 0,02$ g/l. Tato hodnota byla o 13 % vyšší, než je průměrná hodnota (1,8 g/l) uvedená v literatuře. Po 3 hodinách fermentačního procesu se obsah kyseliny mléčné pohyboval okolo $5,23 \pm 1,11$ g/l. Konečná koncentrace kyseliny mléčné se po 4. hodině měření pohybovala kolem $8,16 \pm 0,74$ g/l. Sledování obsahu kyseliny mléčné je jeden ze způsobů, jak sledovat účinnost daného kmene.

Ve všech částech experimentu byl použit k měření obsahu kyseliny mléčné reflektometr RQFlex[®] 10 za použití testovacích proužků Reflectoquant[®] Lactic Acid Test (již zmíněno v metodice). V první i ve druhé části experimentu, kde se měřil obsah kyseliny mléčné v 0 hodin, hodnoty nepřesahovaly naměřený obsah kyseliny mléčné, který uváděli Cais-Sokolińska et al. (2004) a též Bouteille et al. (2013). Maximální obsah kyseliny mléčné u gruzínských vzorků v 0 hodin byl naměřen u vzorků v první části experimentu – G3 (1,25 g/l) a G8 (1,36 g/l). Ve 3. hodině měření vzorky stále odpovídaly uváděným obsahům kyseliny mléčné ve FMV. Cais-Sokolińska et al. (2004), Vasilean et al. (2011), Bouteille et al. (2013) uvedli téměř shodný procentuální obsah kyseliny mléčné ve FMV. Od 6. hodiny měření však hodnoty obsahu kyseliny mléčné u některých vzorků velmi výrazně přesahují maximální uváděné hodnoty ve vědeckých studiích. Ačkoliv byla provedena kalibrace přístroje, experiment rozdělen na více částí a bylo provedeno i opakované měření, hodnoty stále vycházely ve všech částech experimentu nepřiměřeně vysoké. V zahuštěném mléce byly hodnoty obsahu kyseliny mléčné nejvyšší. Čímž se na jednu stranu mohl potvrdit již zmiňovaný názor, že ve vzorcích s vyšším obsahem bílkovin se zvyšuje i obsah kyseliny mléčné (Vasilean

et al. 2011). Po 6 hodinách inkubace byly hodnoty obsahu kyseliny mléčné u gruzínských vzorků v rozmezí 29,20 – 46,80 g/l.

Ve všech výše zmíněných publikacích byly použity jiné metody na měření obsahu kyseliny mléčné. Cais-Sokolińska et al. (2004) měřili kyselinu mléčnou pomocí spektrofotometru. Vasilean et al. (2011) využili k měření nejčastěji používanou separační metodu – HPLC. Bouteille et al. (2013) použili na stanovení obsahu kyseliny mléčné nukleární magnetickou rezonanční spektroskopii. Je možné, že se jedná o metody přesnější v porovnání s reflektometrickou metodou použitou v této práci. Jejich využití v této diplomové práci nebylo možné, a to především z toho důvodu, že nebyla k dispozici vhodná metoda a finanční zajištění tohoto měření. Více opakování by pravděpodobně pomohlo zajistit přesnější výsledky, ale opět jak z hlediska finančního, tak i materiálového a časového, toto nebylo možno provést.

Alonso et al. (2014) uvedli, že mikrobiální fermentace je silně závislá na buněčné funkčnosti a životaschopnosti. Byli toho názoru, že fermentační výkonnost a robustnost fermentací může být negativně ovlivněna přítomností buněk neprodukcujících kyselinu mléčnou, tj. poškozených či neživotaschopných MO. Pochopení fyziologické heterogenity mléčných bakterií může vést ke zlepšení kysacích schopností a tím pádem i k větší produkci kyseliny mléčné skrz kultivaci bakterií. Ačkoliv byl tento článek zaměřen na jiný druh mléčných bakterií (konkrétně na druh *Lactobacillus casei*), bylo zde naměřeno až 41,5 g/l vytvořeného laktátu po uplynutí 48 hodin pomocí HPLC.

6.3 Počet mikroorganismů při stanovení kysacích schopností BMK

Gezginç & Kiliñç (2019) ve svém experimentu přendali všechny vzorky (po uplynutí inkubační doby 6 hodin) do chladničky s teplotou 4 – 5 °C a nechali přes noc. Druhý den byly stanoveny počty MO v řádu 10^8 KTJ/ml u všech měřených vzorků. Vasilean et al. (2011) ve své studii uvedli, že výsledný počet MO byl po inkubaci vzorků (6 h a 30 min při teplotě 43 °C) pro plnotučné i polotučné mléko v řádu 10^7 KTJ/ml a pro nízkotučné mléko v řádu 10^6 KTJ/ml. Vasilean et al. (2011) svým dalším experimentem prokázali, že vyšší obsah bílkovin (způsobený přidáním sušeného odstředěného mléka) neměl v nízkotučném mléce žádný vliv na výsledný počet MO (stále v řádu 10^6 KTJ/ml). Následně také potvrdili, že přidáním laktózy do fermentačního média se podpořil růst BMK. Ve všech vzorcích s přidavkem laktózy byl počet MO v řádě 10^8 KTJ/ml. Tímto se potvrdilo, že *S. salivarius* subsp. *thermophilus* dává přednost laktóze, jakožto primárnímu zdroji uhlíku a energie před glukózou.

I přesto, že v první části experimentu této diplomové práce byla u dvou gruzínských vzorků (G8 a G12) inokulační dávka v nižším řádu (10^4 – 10^5 KTJ/ml), naměřená aktivní a titrační kyselost byla jen o trochu nižší než u zbylých dvou vzorků (G3, G6), kde inokulační dávka byla v řádě 10^8 KTJ/ml. U vzorků (G3, G6), které měly již od začátku vysoký počet MO (skrz inokulační dávku), nebyl růst sledovaných bakterií v rámci času nijak významný (hodnoty byly stále v řádu 10^7 KTJ/ml). Je tedy možné říct, že pokud je inokulační dávka zastoupena nižším počtem MO, tak v následujícím hodinách je možné sledovat rychlý růst MO na rozdíl od vzorků, kde inokulační dávka byla již na počátku zastoupena vysokým množstvím MO a dále si zachovával téměř konstantní počet MO. Hodnoty počtu MO se shodují s údaji, které naměřili Vasilean et al. (2011).

Ve druhé části experimentu byla u všech gruzínských vzorků inokulační dávka v řádě 10^6 KTJ na inokulační dávku. Již ve třetí hodině měly všechny gruzínské vzorky počet MO v řádu 10^7 KTJ/ml, což souhlasí s výsledky Vasilean et al. (2011). Hodnoty v řádě 10^8 KTJ/ml, které naměřili Gezginç & Kilinç (2019) se příliš nevyskytovaly. U vzorků G3 a G6 došlo k poklesu počtu streptokoků při velmi nízkém pH (přibližně 3,90) ve 24. hodině (o celé dva řády KTJ/ml). Zajímavým výsledkem je ale vzorek G12, kde i přesto, že výsledné pH bylo také 3,90, tak se nijak nesnížil počet streptokoků ve vzorku. V 6. hodině při pH = 5,94 byl počet streptokoků v řádu 10^7 KTJ/ml. Ve 24. hodině při pH = 3,90 byl počet streptokoků stále v řádu 10^7 KTJ/ml. Nelze vyloučit, že se jedná o odlišný kmen, který je tolerantnější k nízkým hodnotám pH.

Počet streptokoků i laktobacilů byl v zahuštěném mléce mnohem vyšší než v mléce nezahuštěném. Tím se potvrzuje názor, který uvedli Vasilean et al. (2011), že vyšší obsah energeticky významných látek (např. lakóza), vede k podpoře růstu MO. Což mělo pravděpodobně i vliv na vyšší získané hodnoty titrační kyselosti.

Bylo provedeno statistické vyhodnocení všech vzorků ze tří částí experimentu v čase 6 hodin. Nulová hypotéza zněla tak, že mezi vzorky není žádný statisticky významný rozdíl z hlediska počtu streptokoků. Tukey-HSD test nevyhodnotil žádný statisticky významný rozdíl a nulová hypotéza byla přijata. Zatímco LSD test potvrdil statisticky významný rozdíl a nulovou hypotézu zamítl. Jelikož je známo, že skrz tento test je velmi snadné získat statisticky významný rozdíl u testovaných dvojic a jejich středních hodnot, nebyly tyto získané výsledky publikovány.

7 Závěr

- Kysací schopnosti se mezi jednotlivými vzorky, obsahujícími vybrané izoláty streptokoků, lišily. Nicméně v rámci statistického vyhodnocení dvou sledovaných skupin (izoláty čistých kultur streptokoků z tradičního gruzínského kysaného mléčného výrobku jogurtového typu versus izoláty streptokoků z komerčně dostupných mléčných výrobků na území ČR), ke kterému byl použit dvouvýběrový t-test, nebyly tyto rozdíly v kysacích schopnostech streptokoků statisticky významné. Z tohoto hlediska byla nulová hypotéza přijata.
- Hypotéza stanovená na začátku této diplomové práce (kapitola 2) nebyla na základě získaných výsledků vyvrácena ani přijata. Je tu možný závěr, že vzorky G3 a G6 měly odlišné kysací schopnosti od zbylých kmenů streptokoků, nicméně bylo by nutné provést opakovaná měření k potvrzení hypotézy.
- Ze sledovaných gruzínských vzorků vycházely nejlépe vzorky G3 a G6 ve všech částech experimentu. Tudíž byly vyhodnoceny jako vzorky s nejvýznamnějšími kysacími schopnostmi. I v porovnání se vzorky obsahující izoláty streptokoků z komerčně dostupných mléčných výrobků prokysávaly mléka více.
- Potvrdilo se, že hodnoty titrační kyselosti týchž vzorků, byly daleko vyšší v zahuštěném mléce. Pravděpodobně díky vyššímu obsahu energeticky významných látek, který vede k podpoře růstu MO.
- Naměřený obsah kyseliny mléčné nelze posoudit, jelikož hodnoty značně převyšují obsah uváděný ve FMV. Pravděpodobně by bylo vhodné zvolit přesnější metodu měření (HPLC, NMR apod.), jako bylo uvedeno v ostatních vědeckých studiích. Použití těchto metod v této diplomové práci nebylo možné, a to především z toho důvodu, že nebyla k dispozici vhodná metoda a finanční zajištění tohoto měření. Více opakování by pravděpodobně také pomohlo zajistit přesnější výsledky, ale opět jak z hlediska finančního, tak i materiálového a časového, toto nebylo možno provést.
- U vzorků G3 a G6 došlo k poklesu počtu streptokoků při velmi nízkém pH (přibližně 3,90) ve 24. hodině měření (z 10^8 na 10^6 KTJ/ml). Nicméně je možné, že to bylo pouze kvůli dřívějšímu nástupu odumírání kultury, tj. životní cyklus proběhl rychleji. Ačkoliv zajímavým zjištěním bylo, že u vzorku G12, kde i přesto, že výsledné pH bylo stejně nízké (3,90), počet streptokoků zůstal stejný – v řádě 10^7 KTJ/ml. Je možné, že se jedná o odlišný kmen, který je tolerantnější k nízkým hodnotám pH. K potvrzení této teorie by tento kmen musel být identifikován molekulárně-genetickými metodami.

8 Literatura

- Ainsworth S., Stockdale S., Bottacini F., Mahony J., van Sinderen D. 2014. The *Lactococcus lactis* plasmidome: Much learnt, yet still lots to discover. *FEMS Microbiology Reviews*, **38(5)**:1066–1088.
- Alm L. 1982. Effect of Fermentation on L(+) and D(-) Lactic Acid in Milk. *Journal of Dairy Science*, **65(4)**:515–520.
- Alonso S., Herrero, M., Rendueles, M., Díaz M. 2014. Physiological heterogeneity in *Lactobacillus casei* fermentations on residual yoghurt whey. *Process Biochemistry*, **49(5)**:732–739.
- Babička L. 2012. *Přídavné látky v potravinách (1.vyd.)*. Potravinářská komora České republiky, Česká technologická platforma pro potraviny, Praha.
- Beltrán F. R., Climent-Pascual E., Orden M. U. de la, Urreaga J. M. 2020. Effect of solid-state polymerization on the structure and properties of mechanically recycled polylactic acid. *Polymer Degradation and Stability*, **171**:1–5.
- Bouteille R., Gaudet M., Lecanu B., This, H. 2013. Monitoring lactic acid production during milk fermentation by in situ quantitative proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Dairy Science*, **96(4)**:2071–2080.
- Brožek J., Benešová V., Malinová L., Kalousková R., Šanda K., Ledrová Z. 2015. Kyselina polymléčná-materiál pro biodegradovatelné odvětví a technické textilie. *Chemické Listy*, **109**:291–297.
- Caballero B., Finglas P., Toldra F. 2003. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (2nd edition)*. Academic Press, San Diego.
- Cais-Sokolińska D., Michalski M. M., Pikul J. 2004. Role of the proportion of yoghurt bacterial strains in milk souring and the formation of curd qualitative characteristics. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, **48(4)**:437–441.
- Cani P. D., Vos W. M. de. 2017. Next-Generation Beneficial Microbes: The Case of *Akkermansia muciniphila*. *Frontiers in Microbiology*, **8**:1765.
- Cotter P. D., Ross R. P., Hill C. 2013. Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, **11(2)**:95–105.
- Dey T. B., Kumar A., Banerjee R., Chandna P., Kuhad R. C. 2016. Improvement of microbial α -amylase stability: Strategic approaches. *Process Biochemistry*, **51(10)**:1380–1390.
- Early R. 1998. *Technology of dairy products (2nd ed.)*. Blackie Academic Professional, London.
- Esteban-Torres M., Reverón I., Santamaría L., Mancheno J. M., Rivas, B. de las, Munoz, R. 2016. The Lp_3561 and Lp_3562 Enzymes Support a Functional Divergence Process in the Lipase/Esterase Toolkit from *Lactobacillus plantarum*. *Frontiers in Microbiology*, **7**:1118.
- Fernandes C. S., Dias R., Nóbrega J. M., Afonso I. M., Melo L. F., Maia J. M. 2005. Simulation of stirred yoghurt processing in plate heat exchangers. *Journal of Food Engineering*, **69(3)**:281–290.
- Fernández M., Hudson J. A., Korpel, R., Reyes-Gavilán C. G. de los. 2015. Impact on

Human Health of Microorganisms Present in Fermented Dairy Products: An Overview. *BioMed Research International* 1–8.

Gabrovská D., Plocková M., Horáčková Š., Tlaskalová-Hogenová H., Nevoral J., Dostálová J., Kopáček J. 2019. Bakterie mléčného kvašení, probiotika a fermentované mléčné výrobky (2. vyd.). Potravinářská komora České republiky, Praha.

García-Cano I., Rocha-Mendoza D., Kosmerl E., Zhang L., Jiménez-Flores R. 2020. Technically relevant enzymes and proteins produced by LAB suitable for industrial and biological activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **104**:1401–1422.

Gezginç Y., Kiliç A. E. 2019. Determination of The Potential Use of Exopolysaccharide-Producing *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* in Yogurt. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, **2(2)**:401–408.

Görner F., Valík L. 2004. Aplikovaná mikrobiologie požívatin (1. vyd.). Malé Centrum, Brno.

Guglielmetti S., Noni I. De, Caracciolo F., Molinari F., Parini C., Mora D. 2008. Bacterial Cinnamoyl Esterase Activity Screening for the Production of a Novel Functional Food Product. *Applied and Environmental Microbiology*, **74(4)**:1284–1288.

Han K., Cao J., Wang J., Chen J., Yuan K., Pang F., Gu S., Hun N. 2018. Effects of *Lactobacillus helveticus* fermentation on the Ca²⁺ release and antioxidative properties of sheep bone hydrolysate. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, **38(6)**: 1144–1154.

Hong Q., Liu X. M., Hang F., Zhao J. X., Zhang H., Chen W. 2017. Screening of adjunct cultures and their application in ester formation in Camembert-type cheese. *Food Microbiology*, **70**:33–41.

Horáčková Š., Bialasová K., Plocková M. 2018. Metabolismus a význam bakterií mléčného kvašení ve fermentovaných mléčných výrobcích. *Mlékařské Listy* **29(5)**:22–24.

Horáčková Š., Ůhlhansová A., Plocková M. 2017. Interakce žlučových kyselin a probiotických mikroorganismů. *Chemické Listy* **111(4)**:246–250.

Johansen E. 2017. Future access and improvement of industrial lactic acid bacteria cultures. *Microbial Cell Factories* **16(1)**:1–5.

Kadlec P., Melzoch K., Voldřich M. 2009. Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin (1.vyd.). Key Publishing, Ostrava.

Kadlec P., Melzoch K., Voldřich M., Kol A. 2012. Technologie potravin - přehled tradičních potravinářských výrob (1.vyd.). Key Publishing s.r.o, Ostrava.

Klaban V. 2005. Ilustrovaný mikrobiologický slovník (1. české v). Galén, Praha.

Kopáček J. 2014. Mléko a mléčné výrobky: jak poznáme kvalitu? Sdružení českých spotřebitelů, Praha.

Lacroix C. 2010. Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation (1st ed.). Woodhead Publishing, UK.

Lahtinen S., Ouwehand A., Salminen S., Wright A. von. 2012. Lactic acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects (4th ed.). CRC Press, London.

Langella P., Guarner F., Martin R. 2019. Editorial: Next-Generation Probiotics: From

- Commensal Bacteria to Novel Drugs and Food Supplements. *Frontiers in Microbiology*, **10**:1973.
- Lim Y. H., Foo H. L., Loh T. C., Mohamad R., Abdullah N. 2019. Comparative studies of versatile extracellular proteolytic activities of lactic acid bacteria and their potential for extracellular amino acid productions as feed supplements. *Journal of Animal Science and Biotechnology* **10**(1):1–13.
- Lukic J., Vukotic G., Stanisavljevic N., Kosanovic D., Molnar Z., Begovic J., Terzic-Vidojevic A., Jeney G., Ljubobratovic U. 2019. Solid state treatment with *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGHN14 and *Lactobacillus rhamnosus* BGT10 improves nutrient bioavailability in granular fish feed. *PLoS ONE*, **14**
- Macchione I. G., Lopetuso L. R., Ianiro G., Napol M., Gibiino G., Rizzatt G., Petito V., Gasbarrini A., Scaldaferri F. 2019. *Akkermansia muciniphila*: Key player in metabolic and gastrointestinal disorders. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, **23**(18):8075–8083.
- Mahesh M., Tushar J., Pushkar C., Sarita M. 2019. Assessment of Lactic Acid Bacteria Isolated from Chakka : An Indian Fermented Dairy Product *Food & Industrial Microbiology* **5**(1):1–8.
- Maria-Neto S., De Almeida K. C., Macedo M. L. R., Franco O. L. 2015. Understanding bacterial resistance to antimicrobial peptides: From the surface to deep inside. *Biochimica et Biophysica Acta* **1848**(11):3078–3088.
- Martin A. R., Maurice M. O. 2008. *Food Microbiology* (3rd editio). The Royal Society of Chemistry, UK.
- Meyers S. A., Cuppett S. L., Hutkins R. W. 1996. Lipase production by lactic acid bacteria and activity on butter oil. *Food Microbiology* **13**(5):383–389.
- Milagres M. P., Brandão S. C. C., Magalhães M. A., Minim V. P. R., Minim L. A. 2012. Development and validation of the high performance liquid chromatography-ion exclusion method for detection of lactic acid in milk. *Food Chemistry* **135**(3):1078–
- Naito Y., Uchiyama K., Takagi T. 2018. A next-generation beneficial microbe: *Akkermansia muciniphila*. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* **63**(1):33–35.
- Papagianni M. 2012. Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **3**(4):1–5.
- Rakická M., Marko A., Šturdík E., Danihelová M., Mošovská S., Juríková L. 2015. Vplyv fermentácie baktériami mliečneho kysnutia na chemickú kompozíciu potravín. *Chemické Listy* **109**:371–376.
- Ray R. C., Montet D. 2017. *Fermented Foods, Part II: Technological Interventions* (1st editio). CRC Press, Boca Raton.
- Robinson R. K. 2002. *Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Productes* (3rd ed.). John Wiley & Sons, New York.
- Rudolfová J., Čurda L. 2005. Prebiotický účinek galaktooligosacharidů a využití laktosy pro jejich produkci. *Chemické Listy* **99**(3):168–174.
- Savijoki K., Ingmer H., Varmanen P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* **71**(4):394–406.

- Sedláček I. 2007. Taxonomie prokaryot. Masarykova univerzita, Brno.
- Šilhánková L. 2008. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology (3.vyd.). Academia, Praha.
- Smit G., Smit B. A., Engels W. J. M. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews* **29(3)**:591–610.
- Sorfová D., Tichá M., Bartlová M. 2005. Biochemie: základní kurz (3.vydání). Karolinum, Praha.
- Tomovska J., Gjorgievski N., Makarijoski B. 2016. Examination of pH, Titratable Acidity and Antioxidant Activity in Fermented Milk. *Journal of Materials Science and Engineering* **6**:326–333.
- van Hylekama Vlieg J. E. T., Hugenholtz J. 2007. Mining natural diversity of lactic acid bacteria for flavour and health benefits. *International Dairy Journal* **17(11)**:1290–1297.
- Vasilean I., Segal R., Vasile A. 2011. Obtaining fermented dairy products with the yogurt culture YF-L 812. *Annals of the University “Dunarea de Jos” of Galati - Fascicle VI: Food Technology* **35(1)**:92–99.
- Vinderola G., Ouwehand A., Seppo S., Wright A. von. 2019. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. In *Biotechnology: Second Edition (5th editio, Vol. 1)*. CRC Press, Boca Raton.
- Vodrážka Z. 1996. Biochemie (2. vydání). Academia, Praha.
- Vos P., Garrity G., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K.-H., Whitman W. B. 2009. *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes (2nd editio)*. Springer, Athens.
- Whitman W. B. 2015. *Bergey’s manual of systematics of archaea and bacteria*. John Wiley & Sons Inc. in association with Bergey’s Manual Trust, New Jersey.