



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

KLASICKÝ VS. BULHARSKÝ JOGURT – SENZORICKÁ KVALITA VS. CHEMICKÉ A MIKROBIOLOGICKÉ SLOŽENÍ

CLASSIC VS. BULGARIAN YOGURT – SENSORY QUALITY VS. CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL
COMPOSITION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Michaela Podloučková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2024

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1964/2023 Akademický rok: 2023/24
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Michaela Podloučková**
Studijní program: Chemie přírodních látek
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Klasický vs. bulharský jogurt – senzorická kvalita vs. chemické a mikrobiologické složení

Zadání diplomové práce:

- Zpracujte literární přehled dané problematiky:
 - jogurt – charakteristika, technologie výroby, senzorická kvalita, těkavé (aromatické) látky, mikrobiální profil
 - možnosti stanovení těkavých látek v jogurtu – princip, provedení, přehled aplikací
 - možnosti senzorického hodnocení jogurtu – přehled aplikací
 - možnosti identifikace mikrobiálních kultur (molekulárně biologické a mikrobiologické metody)
 - princip, provedení, přehled aplikací na jogurty
- Pomocí vybraných metod posuďte profil těkavých látek, mikrobiální profil a celkovou senzorickou kvalitu modelových vzorků jogurtu
- Porovnejte kvalitu klasického vs. bulharského jogurtu, diskutujte rozdíly mezi vzorky

Termín odevzdání diplomové práce: 29.4.2024:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Michaela Podloučková
studentka

doc. Ing. Eva Vítová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2024

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá porovnáním klasického a bulharského jogurtu z hlediska obsahu těkavých látek, senzorické kvality a mikrobiálního profilu.

Těkavé látky byly identifikovány a semikvantifikovány pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí ve spojení s mikroextrakcí pevnou fází, pro stanovení mikrobiálního profilu byla použita klasická kultivace a následně polymerázová řetězová reakce (PCR) v reálném čase. Senzorická analýza se skládala z hodnocení pomocí grafických stupnic, profilového a pořadového testu.

V experimentální části byly vyrobeny 3 vzorky, „klasický“ bílý a bulharský jogurt vyrobené z komerčních jogurtových kultur, a tradiční bulharský jogurt dovezený přímo z Bulharska.

Na základě provedené PCR analýzy byla u všech jogurtů potvrzena bakteriální DNA, pouze u jogurtu bulharského tradičního se vyskytovala také DNA kvasinek. Bulharský tradiční jogurt se tak odlišoval detekovatelnou kvasinkovou chutí, ale především kvalitativním i kvantitativním složením těkavých látek. Z celkem identifikovaných 29 sloučenin se jich v tomto jogurtu nacházelo 20; hlavní skupinu tvořily estery, zatímco u ostatních jogurtů převažovaly ketony.

Ze senzorického hlediska byl nejlépe hodnocen jogurt bulharský vyrobený z komerční kultury, který měl příjemný vzhled, vůni a příjemně kyselou chuť a celkově výbornou senzorickou kvalitu.

KLÍČOVÁ SLOVA

jogurt, aromatické látky, senzorická analýza, mikrobiální profil, SPME, GC-MS, PCR

ABSTRACT

This thesis compares classic and Bulgarian yoghurt in terms of volatile content, sensory quality, and microbial profile.

The volatiles were identified and semi-quantified by gas chromatography with mass detection in conjunction with solid phase microextraction, whereas classical culture followed by real-time polymerase chain reaction (PCR) was used to determine the microbial profile. Sensory analysis consisted of evaluation by graphic scales, profile and ordinal tests.

In the experimental part, 3 samples were produced, a "classic" white and Bulgarian yoghurt made from commercial yoghurt cultures, and a traditional Bulgarian yoghurt imported directly from Bulgaria.

Based on the PCR analysis performed, bacterial DNA was confirmed in all yogurts, only the traditional Bulgarian yogurt also contained yeast DNA. The Bulgarian traditional yoghurt thus differed in its detectable yeast taste, but above all in the qualitative and quantitative composition of the volatile substances. Of the 29 compounds identified, 20 were present in this yoghurt; esters were the main group, while ketones predominated in the other yoghurts.

From a sensory point of view, the Bulgarian yoghurt made from commercial culture was the best evaluated, with a pleasant appearance, a pleasant smell and a pleasantly sour taste and an overall excellent sensory quality.

KEY WORDS

yogurt, aroma compounds, sensory analysis, microbial profile, SPME, GC-MS, PCR

PODLOUČKOVÁ, Michaela. Klasický vs. bulharský jogurt – sensorická kvalita vs. chemické a mikrobiologické složení. Brno, 2024. Dostupné také z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/156545>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Eva Vítová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala doc. Ing. Evě Vítové, Ph.D. a Ing. Štěpánce Trachtové, Ph.D. za cenné rady, ochotu a odborné vedení při zpracování této diplomové práce.

OBSAH

1	Úvod	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Jogurt.....	9
2.1.1	Složení jogurtu	9
2.2	Typy jogurtů.....	10
2.2.1	Bulharský jogurt.....	11
2.3	Technologie výroby jogurtu	11
2.4	Zdravotní benefity jogurtů	13
2.5	Těkavé látky v jogurtu.....	13
2.5.1	Možnosti stanovení těkavých látek	16
2.6	Mikrobiální profil jogurtu	17
2.6.2	Možnosti identifikace mikrobiálních kultur	20
2.7	Senzorická kvalita jogurtů.....	22
2.7.1	Možnosti sensorického hodnocení	23
3	Experimentální část	24
3.1	Použité chemikálie a vybavení	24
3.1.1	Přístroje a pomůcky.....	24
3.1.2	Suroviny pro výrobu jogurtů	24
3.1.3	Živná média pro kultivaci	24
3.1.4	Chemikálie	24
3.2	Analyzované vzorky.....	25
3.2.1	Použité kultury	25
3.3	Použité metody a pracovní postupy	26
3.3.1	Postup výroby jogurtové kultury	26
3.3.2	Postup výroby jogurtů	27
3.3.3	Senzorická analýza.....	27
3.3.4	Stanovení těkavých látek.....	28
3.3.5	Stanovení mikrobiálního profilu	29
3.4	Statistické zpracování výsledků	31
4	Výsledky a diskuze.....	32
4.1	Výsledky stanovení těkavých látek	32
4.1.1	Porovnání počtu identifikovaných látek v jogurtech.....	35

4.1.2	Porovnání obsahu identifikovaných látek v jogurtech	38
4.2	Výsledky senzoričkého hodnocení	40
4.2.1	Hodnocení vzhledu a barvy	40
4.2.2	Hodnocení konzistence	41
4.2.3	Hodnocení vůně.....	43
4.2.4	Hodnocení chuti	44
4.2.5	Profilový test vybraných chutí	45
4.2.6	Pořadový test.....	46
4.2.7	Analýza hlavních komponent.....	47
4.2.8	Korelační analýza	49
4.3	Výsledky stanovení mikrobiálního profilu.....	49
4.3.1	Kultivace na tuhých médiích.....	49
4.3.2	Izolace DNA.....	51
4.3.3	Průkaz přítomnosti DNA domény <i>Bacteria</i> metodou PCR v reálném čase.....	52
4.3.4	Průkaz přítomnosti DNA kvasinek metodou PCR v reálném čase	56
5	Závěr.....	60
6	Použité zdroje	61
7	Seznam použitých zkratk.....	69
8	Seznam příloh.....	70
9	Přílohy	71

1 ÚVOD

Jogurt je jedním z nejoblíbenějších mléčných výrobků po celém světě a má dlouhou historii v různých kulturách. Jeho konzumace je spojována s mnoha zdravotními výhodami díky obsahu probiotik, bílkovin, vitaminů a minerálů. Tato kombinace přispívá ke zdraví trávicího systému, podporuje imunitní systém a poskytuje tělu potřebné živiny pro správné fungování. Jogurt je vyráběn fermentací za pomoci bakterií mléčného kvašení, které přeměňují mléko na jogurt s charakteristickou konzistencí, chutí a vůní. Dnes je jogurt dostupný v různých variantách, které se liší nejen příchutěmi, ale také složením a výživovými hodnotami. Klasický jogurt je často označován jako "přírodní" a obsahuje minimální množství přidaných látek, zatímco ovocné varianty jsou obohaceny o příchutě a kousky ovoce, které dodávají jogurtu sladkou chuť a vůni. Jogurt je také velmi všestranný v kuchyni, může být konzumován samostatně jako chutná a zdravá svačina nebo přidán do různých receptů.

Bulharský jogurt je jedním z nejznámějších typů jogurtu a je známý svou bohatou a krémovou konzistencí a příjemně kyselou chutí. Jeho výroba je spojována s Bulharskem, zemí s dlouhou tradicí výroby kvalitních mléčných výrobků.

V posledních letech se však jogurt stal více než jen potravinou – stal se symbolem zdravého životního stylu a cílem rozsáhlého výzkumu v oblasti výživy a potravinářství. Jeho výhody jsou zkoumány vědci i spotřebiteli, kteří hledají způsoby, jak začlenit tento výživný výrobek do svého stravovacího režimu. Cílem této práce bylo porovnat kvalitu klasického a bulharského jogurtu z hlediska obsahu aromatických látek, mikrobiologického složení a senzorické kvality, aby bylo možné lépe porozumět jejich rozdílům.

2 TEORETICKÁ ČÁST

Tato práce se zabývá porovnáním tří druhů jogurtů vyrobených s použitím různých druhů jogurtových kultur. Toto porovnání se týká obsahu těkavých aromatických látek a s tím související senzoričnou kvalitou společně s mikrobiálním profilem.

2.1 Jogurt

Celosvětově je jogurt považován za fermentovaný mléčný výrobek, který obsahuje specifické bakteriální kmeny, obvykle *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus bulgaricus*.

Dle české legislativy (vyhláška č. 397/2016 Sb.) je jogurt definován jako „*kysaný mléčný výrobek získaný kysáním mléka, smetany, podmásli nebo jejich směsi pomocí mikroorganismů (viz Tabulka 1) u kterého lze zvýšit obsah sušiny pouze přidáním mléčné bílkoviny, sušeného nebo zahuštěného mléka, nebo odebráním syrovátky, tepelně neošetřený po kysacím procesu*” [1].

Tabulka 1 Požadavky na mikroorganismy dle české legislativy [1]

Výrobek	Použité mikroorganismy	Mléčná mikroflóra v 1 g
Jogurty včetně jogurtového mléka	Symbiotická směs <i>Streptococcus thermophilus</i> a <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	10 ⁷

Jogurt jako takový je prastará potravina, která v dřívější době našla své uplatnění zejména jako způsob konzervace mléka. V dnešní době existuje nespočet různých druhů jogurtů, lišících se jak použitým mlékem, tak obsahem mikroorganismů. Druhy jogurtů, které jsou v dnešní době konzumovány jsou ovlivněny místními tradicemi, často je také společně s jogurtem vyráběn kefir [2].

Jogurt získává své fyzikální vlastnosti díky bakteriím mléčného kvašení, kdy vylučovaná kyselina mléčná způsobuje želatinaci mléčných bílkovin a výsledkem je síť těchto bílkovin, spojených vodíkovými vazbami a disulfidickými můstky. Tyto vazby jsou křehké a mechanickým pohybem se rozrušují [3].

2.1.1 Složení jogurtu

Výživová hodnota jogurtů se liší v závislosti zejména na použitých složkách. Z mléka většiny domácích savců lze vyrobit jogurt. Nejběžněji se jedná o mléko kravské, ovšem v dnešní době nabývají na popularitě i jogurty z jiných druhů mléka. Často se tak můžeme setkat například s jogurtem z kozího, ovčího, buvolího, nebo dokonce velbloudího mléka. Přestože se mléka zpracovávají podobným způsobem, liší se obsahem tuků, proteinů, kaseinů a dalších nutričně významných složek (viz Tabulka 2). [4].

Podobně jako mléko je jogurt dobrým zdrojem bílkovin a vápníku a může být také dobrým zdrojem jódu, draslíku a vitaminů skupiny B. Některé jogurty mohou být obohaceny vitamínem D [5].

Tabulka 2 Obsah hlavních složek jogurtu na 100 g produktu [4]

	Klasický jogurt	Nízkotučný jogurt	Jogurt s ovocem	Řecký jogurt
Voda (g)	81,9	84,9	77,0	77,0
Energetická hodnota (kJ)	330,5	234,4	376,6	481,2
Proteiny (g)	5,7	5,1	4,1	6,4
Tuky (g)	3,0	0,8	0,7	9,1
Cukry (g)	7,8	7,5	17,9	N
Vápník (mg)	200	190	150	150
Fosfor (mg)	170	160	120	130
Sodík (mg)	80	83	64	N
Draslík (mg)	280	250	210	N
Zinek (mg)	0,7	0,6	0,5	0,5

N – Neuvedeno

Wang a kol. [6] zkoumali nutriční a fyzikální vlastnosti jogurtů z kravského, koziho a velbloudího sušeného mléka. Dle jejich výzkumu byl jogurt z koziho mléka nejbohatší v obsahu tuku a těkavých aromatických látek, ale měl nejvyšší obsah kyselin. Jogurt z velbloudího mléka měl nejvyšší obsah bílkovin a nejnižší obsah laktosy a jogurt z kravského mléka měl nejlepší strukturální stabilitu.

Tabulka 3 Analýza nutričních komponentů jogurtů z různých mlék na 100 g [6]

	Proteiny (g)	Tuky (g)	Laktosa (g)
Kravský	3,34	3,83	4,63
Kozí	3,51	4,15	4,57
Velbloudí	3,57	4,11	4,37

Terzioglu a kol. [7] porovnávali jogurty z kravského, koziho, ovčího a buvolího mléka z hlediska textury, biochemických a fyzikálně-chemických vlastností. Z výzkumu vyplývá, že jogurt z ovčího mléka obsahoval nejvíce celkové sušiny, tuku a bílkovin a také obsahoval mnoho polynenasycených mastných kyselin a cholesterolu. Ve všech vzorcích jogurtů byla nejvíce dominantní esenciální aminokyselina leucin a neesenciální kyselina glutamová. Jogurt z kravského mléka obsahoval nejméně proteinů a tuků.

2.2 Typy jogurtů

Jogurty můžeme klasifikovat z několika pohledů. Podle složení dělíme jogurty na plnotučné (obsah tuku nad 3,5 %), se sníženým obsahem tuků (obsah tuku 0,5 až 2 %) a nízkotučné (do 0,5 % obsahu tuků). Z hlediska výrobního postupu můžeme jogurt dělit na jogurt s rozmíchaným koagulátem (Stired type) a s nerozmíchaným koagulátem (Set type). U jogurtu s rozmíchaným koagulátem dochází k fermentaci v tanku a struktura gelu je před balením narušena, tím vzniká krémovější konzistence. Jogurt s nerozmíchaným koagulátem fermentuje až v maloobchodním balení [8]. Jogurty můžeme dělit také podle příchutě, kde mezi základní

typy patří jogurty bílé a ovocné. Avšak příchutí, které se mohou do jogurtů přidávat je velké množství [9].

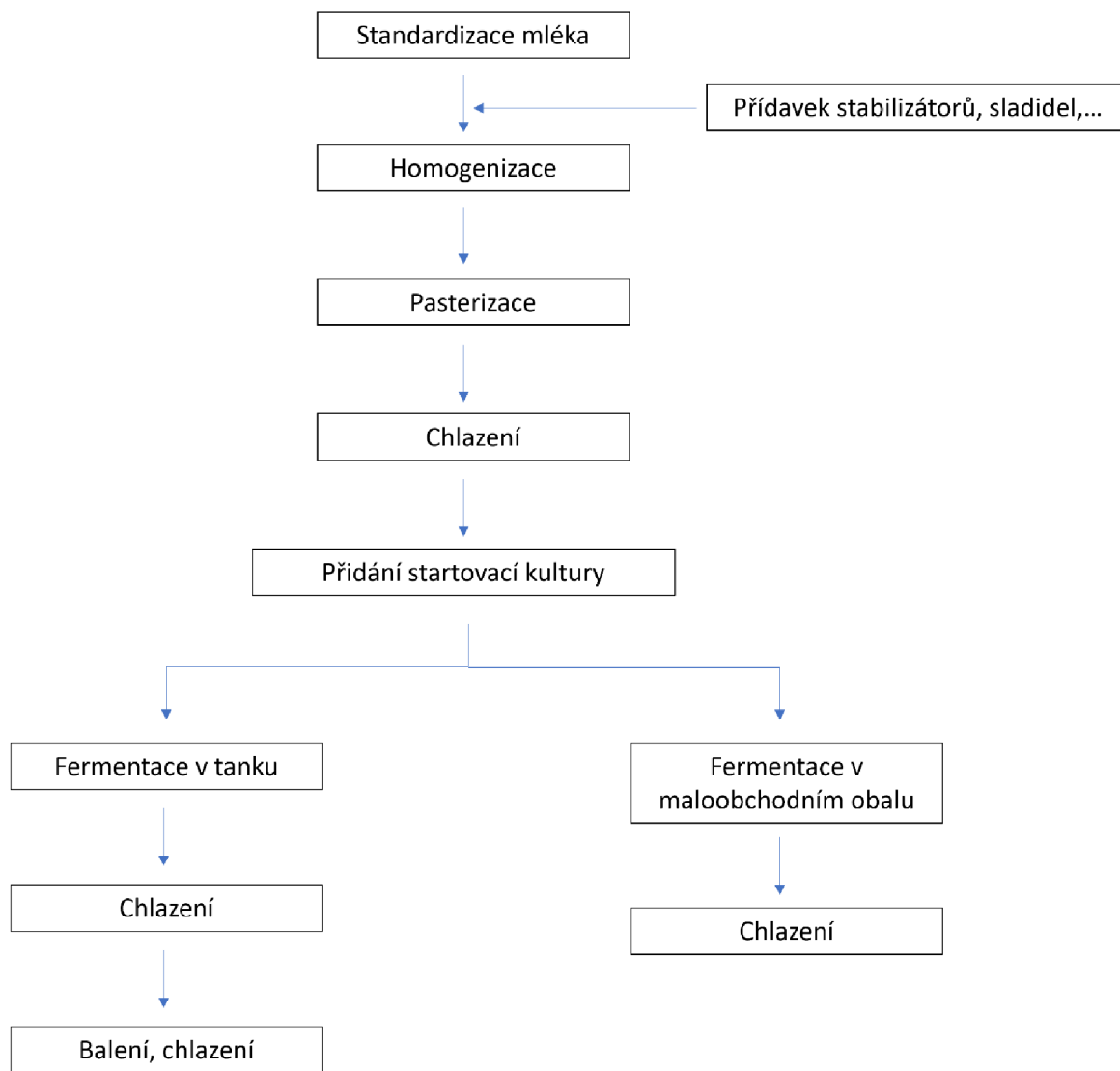
2.2.1 Bulharský jogurt

Hlavním záměrem této práce bylo porovnání klasického „českého“ jogurtu vs. jogurtu bulharského. Balkánský region je historií a tradicí významný pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků. Bulharský jogurt v Bulharsku známý jako „kiselo mlyako“, je charakteristický znak země a je to tradiční mléčný výrobek. Mikroflóru bulharského jogurtu poprvé studoval Stamen Grigoroff a dokázal výskyt tyčinkovité bakterie, která byla později pojmenována jako *Lactobacillus bulgaricus*. Bulharský jogurt by měl být bílý, nebo mírně nažloutlý s hustou, ale hladkou konzistencí a výraznou kyselou chutí a vůní. Tento jogurt může být vyroben z kravského, ovčího, kozího a buvolího mléka, ovšem nejčastěji jejich kombinací v poměru 1:1. Je také známo, že v některých oblastech Bulharska se vyskytuje endemická jogurtová mikroflóra [10; 11; 12]. Právě mikrobiální rozmanitost těchto oblastí zkoumali Velikova a kol. [13]. Celkem 77 vzorků jogurtů z různých druhů mléka shromáždili po návštěvě vesnic, farem i klášterů. Pomocí sekvenování 16S rDNA izolovali celkem 76 kmenů, z toho 53 % patřilo k *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, 14 % k jiným laktobacilům a 32 % ke kokům mléčného kvašení jako například *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus acidilactici* atd. Mimo to také u vybraných kmenů zjišťovali, zda produkují extracelulární exopolysacharidy a galaktooligosacharidy. 18 kmenů bylo označeno jako producenti exopolysacharidů, a to zejména *Lb. bulgaricus*, *Lb. fermentum* a *Lb. mesenteroides*. Jako producenti probiotických galaktooligosacharidů bylo označeno 10 kmenů, které produkovaly zejména tri- a tetrasacharidy. Celkově se ukázalo, že domácí bulharské jogurty jsou bohatým zdrojem bakterií mléčného kvašení se zdravím prospěšnými účinky.

2.3 Technologie výroby jogurtu

Nejdůležitějším parametrem celé výroby je teplota, a to vzhledem k jejímu vlivu na kvalitu mléka, obsah a růst mikroorganismů. Prvním krokem výroby jogurtů je výběr mléka a jeho úprava. Z chuťových, konzistenčních i legislativních důvodů se upravuje obsah sušiny v mléce například přidáním sušeného mléka a případně se může upravit obsah tuků. K mléku se mohou přidávat stabilizátory, sladidla nebo další látky k dosažení požadovaných charakteristik. Po přidání všech potřebných látek je směs důkladně homogenizována. Homogenizace napomáhá zmenšovat kuličky mléčného tuku a rovnoměrnému rozptýlení všech přidaných složek. Tento proces obvykle probíhá při tlaku 15 až 20 MPa a při teplotě 60 až 70 °C. Abychom zabránili kontaminaci, je nutné mléko tepelně ošetřit. V průmyslu se teplotní rozsah i doba trvání procesu liší, nejčastěji se používá termizace, nízká a vysoká pasterace, sterilace a ultra tepelné ošetření. Po tepelném ošetření je mléko zchlazeno na teplotu 40 až 45 °C, což je optimální teplota pro fermentaci. Pro fermentaci je využita definovaná směs mléčných bakterií. Důvodem použití kombinace bakterií je obvykle dosažení požadovaných chuťových vlastností výrobku, zejména laktátu a aromatických látek. Rozlišujeme dva výše zmíněné způsoby fermentace. Pokud je směs ponechána ve fermentačních tancích, získáme jogurt s rozmíchaným koagulátem (Stirred type), pokud je směs ponechána fermentovat v maloobchodních baleních získáváme jogurt s nerozmíchaným koagulátem (Set type). Fermentace probíhá při konstantní teplotě (obvykle 45 °C) několik hodin, dokud není dosaženo požadovaného pH (cca 4,4 – 4,6) a chuti. Jakmile

je fermentace dokončena, je potřeba jogurt co nejrychleji zchladit, aby se předešlo dalšímu růstu jogurtové kultury. Rychlost chlazení by měla být rovnoměrná, jinak by mohlo dojít k oddělování syrovátky v hotovém jogurtu. K hotovému jogurtu může být následně přidáno ovoce, ochucovací nebo barvicí látky. Nakonec je jogurt zabalen a skladován při nízkých teplotách do 6 °C, konzumován by měl být co nejčerstvěji. Trvanlivost jogurtu bývá v chlazených podmínkách obvykle 3 až 4 týdny, v závislosti na hygienických podmínkách při výrobě a kvalitě obalového materiálu [4; 8; 14; 15; 16].



Obrázek 1 Technologie výroby jogurtů [14]

Nové postupy při výrobě jogurtu zkoušeli De Prisco a kol. [17]. Studovali účinky chitosan-alginátových tobolek na metabolické aktivity *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii*. Sledovali životaschopnost bakterií a produkci těkavých metabolitů během skladování při 4 °C po dobu 28 dní. I když několik těkavých látek mělo oproti obyčejnému jogurtu odlišné koncentrace, tak koncentrace hlavních aromatických látek jako je acetaldehyd nebyla ovlivněna. Během fermentace došlo také ke koexistenci volných a zapouzdřených bakterií, a tedy celková životaschopnost bakterií během skladování byla zvýšena.

2.4 Zdravotní benefity jogurtů

Nejen, že konzumace mléčných výrobků zvyšuje příjem vápníku a zlepšuje funkci kostí a svalů, ale alespoň 3 porce denně nízkotučných nebo netučných mléčných výrobků, jako je mléko, jogurt nebo sýr, pomáhají zlepšit celkový příjem živin, což může přispět ke snížení rizika vzniku různých onemocnění.

Jogurt je lépe stravitelnou alternativou mléka, protože v průměru obsahuje méně laktózy kvůli přítomnosti bakterií produkujících laktázu. Proto se doporučuje konzumovat osobám s laktózovou intolerancí, jako náhrada za mléko. Studie také ukazují, že při zvýšení denní konzumace mléčných výrobků se snižuje riziko vzniku diabetu II. typu. Například Choi a kol. [18] tuto skutečnost studovali 12 let u mužů středního a staršího věku. Další studie Liu a kol. [19] ukázala, že u žen starších 45 let je riziko vzniku diabetu 2. typu sníženo o 18 % při konzumaci více než dvou porcí jogurtu týdně ve srovnání s méně než jednou porcí za měsíc.

Pro lidské zdraví je důležitá střevní mikroflóra, která hraje důležitou roli vůči nemocem a podporuje střevní funkci. Při nedostatku prospěšných střevních bakterií může docházet k zánětlivým onemocněním střev, nebo i ke vzniku rakoviny střev. Proto je důležité podporovat střevní mikroflóru, například konzumací probiotik, které obsahuje i jogurt [20]. Meyer a kol. [21] hodnotili účinek jogurtu obohaceného o probiotickou kulturu a jogurtu neobohaceného na tvorbu protizánětlivých cytokinů. Po dobu dvou týdnů konzumovaly ženy 100 g a poté 200 g jogurtu. Bylo zjištěno, že oba typy zkoumaných jogurtů zvýšily produkci cytokinů. Beniwal a kol. [22] testovali účinek konzumace jogurtu při prevenci průjmu souvisejícího s antibiotiky. Pacientům, kteří užívali perorálně nebo intravenózně antibiotika bylo podáváno 230 g jogurtu. Dospěli k závěru, že u těchto pacientů se celkově méně vyskytovaly průjmy. Také nedávná studie Le Roy a kol. [23] hlásí, že konzumace jogurtu je spojena se snížením hmotnosti viscerálního tuku a změnami ve střevním mikrobiomu.

Několik studií se také věnovalo účinku jogurtu a mléčných výrobků na kontrolu tělesné váhy. Studie na zvířatech ukázaly, že intracelulární hladiny vápníku hrají klíčovou roli v metabolismu tuků. Tématem obesity a zvýšeným příjmem vápníku se zabývali Parikh a kol. [24]. Dle jejich výzkumu může vazba mastných kyselin ve střevě pomocí vápníku z potravy dostatečně snížit absorpci tuku. Ovšem pokud byl vápník získáván z mléčných výrobků, úbytek hmotnosti byl v mnohem větším rozsahu, a tak přesný mechanismus nebyl zjištěn. Další studie Wang a kol. [25] shrnuje dvacetiletý výzkum, zda je konzumace jogurtu spojena s lepší kvalitou stravy a metabolickým profilem u dospělých amerických občanů. Prokázali, že častá konzumace jogurtů jako součást zdravého způsobu stravování byla spojena s menším přírůstkem hmotnosti v průběhu času.

Vzhledem k neustálému růstu v odvětví jogurtů roste také poptávka spotřebitelů, kteří dbají na své zdraví. Je proto důležité zdravotní výroky důkladně podložit vědeckým výzkumem.

2.5 Těkavé látky v jogurtu

Tradiční jogurtové aroma je kombinací vonných a chuťových látek, které jsou typicky produkovány během mléčné fermentace jogurtovými kulturami. Během fermentace tyto kultury

přeměňují laktózu a další živiny v mléce na jiné látky, které vedou k produkci různých chuťových a aromatických sloučenin. Bylo popsáno více než 100 různých těkavých sloučenin, které byly produkovány různými jogurtovými kulturami. Kromě kyseliny mléčné se na typické vůni a chuti jogurtu nejvíce podílejí acetaldehyd, diacetyl, acetoin, aceton a 2-butanon. Při delším skladování jogurtu mohou vznikat nepříjemné chuti a vůně, což se připisuje zejména vzniku nežádoucích aldehydů a mastných kyselin při oxidaci lipidů [26].

Acetaldehyd je nepostradatelnou aromatickou sloučeninou jogurtu. Dobrá chuť jogurtu vzniká, pokud je vyprodukováno správné množství ($23\text{--}40\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ a nejméně $8\text{--}10\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) acetaldehydu. Diacetyl údajně přispívá k jemné, plné chuti a vůni jogurtu a je důležitý zejména pro výrobky, které obsahují nízké koncentrace acetaldehydu. Produkce kyselin by měla být během fermentace kontrolována, neboť delší okyselení má za následek vznik nežádoucích chutí. Na výskyt aromatických látek v jogurtu má vliv několik faktorů. Jedním z nich může být vliv mikrobiálních kultur, nebo také druh použitého mléka a v neposlední řadě způsob zpracování [27].

Tabulka 4 Vybrané aromatické látky jogurtu [26]

Sloučenina	Aroma	Sloučenina	Aroma
Kyselina octová	Octové	Pentan-2-on-4-ol	Okurka, salát
Kyselina propanová	Sýrové	Ethanol	Alkoholové
Methional	Vařená zelenina	2,3-butandiol	Krémové
Methylester kyseliny benzoové	Vanilkové	Oct-1-en-3-on	Houbové
Benzaldehyd	Mandlové	Pentan-2-on	Víno
Kyselina pelargonová	Zemité	Aceton	Ovocné
Ethyl-nitrát	Sladké	Kyselina pentanová	Nechutné
Kyselina hexanová	Pot	Hexanal	Tráva
Acetaldehyd	Čerstvé, zelené jablko	Ethyl-acetát	Mírné
Butanal	Kakaové	Dekanal	Květinové
Kyselina oktanová	Sýrové	Kyselina isobutyrová	Máslové
Hexanol	Mastné	Non-1-en-3-ol	Houbové
Kyselina dekanová	Hnilobné	Diethyl disulfid	Jako vařená cibule
2-furanmethanol	Jako toustový chléb	Acetofenon	Sladké mandlové
Kyselina heptanová	Kyselé	Ethyl 2-methylbutyrát	Hruškové
2,3-pentandion	Sladké	Kyselina myristová	Kokosové
2-fenylacetaldehyd	Květinové	Pentanal	Kvasinkové
3-methylbuten-2-al	Třešňové	Isopropyl alkohol	Zatuchlé
Dimethylsulfid	Sladké	Nonanal	Růžové
2,3-butandion	Máslové, vanilkové	2-methyl-1-propanol	Víno
Butyl-akrylát	Tropické ovoce		

Až 117 aromatických látek našli v jogurtu Liu a kol. [28] za použití čtyř extrakčních metod a plynové chromatografie. Největší zastoupení měly alkoholy a estery a jako nejúčinnější se jevila extrakční metoda dynamického headspace vzorkování, při které bylo nalezeno 88 sloučenin. Karami [29] porovnával jogurt z ovčího a kravského mléka. Z hlediska těkavých látek zkoumal acetaldehyd, diacetyl, aceton a ethanol v průběhu skladování. V žádném vzorku se nevyskytovalo detekovatelné množství acetonu, množství acetaldehydu dle předpokladů s přibývajícím časem klesalo, ovšem bez velkého spádu. Stejně tak se množství diacetylu postupně snižovalo. Oproti jogurtu z kravského mléka, jogurt z ovčího mléka obsahoval až dvakrát tolik acetaldehydu i diacetylu, což může být způsobeno degradací aminokyselin. Obsah ethanolu se v obou typech jogurtu s časem zvyšoval, zřejmě díky rozkladu acetaldehydu. Podobně zkoumali jogurty ze čtyř druhů mléka Erakaya a kol. [30] metodou plynové chromatografie s mikroextrakcí na pevné fázi (SPME-GC-MS). Celkem identifikovali 34 aromatických látek, ve všech vzorcích jogurtů zaznamenali výskyt acetaldehydu, diacetylu, acetoinu a hexanalu. Mezi další identifikované látky patřily 2,3-pentandion, 2-heptanon, 2-nonanon, 2-undekanon, ethyl acetát, ethyl oktanoát, diethyl ftalát, heptan, kyselina octová, kyselina máselná, kyselina kapronová a další. Největší obsah těkavých látek vykazoval jogurt z kozího mléka.

Papaioannou a kol. [31] stanovovali profil těkavých látek a chuť u jogurtů připravených z kravského a kozího mléka za použití tří různých, komerčně dostupných startovacích kultur (klasická, kyselá, jemná), v přítomnosti nebo nepřítomnosti probiotických bakterií. Pro analýzu těkavých látek použili plynovou chromatografii s hmotnostní detekcí. U vzorku kravského jogurtu bez přídavku probiotik byl ze skupiny aldehydů detekován pouze acetaldehyd, oproti jogurtu s přídavkem bifidobakterií, který dále obsahoval pentanal, hexanal a nonanal. U skupiny ketonů bylo pozorován až třikrát menší obsah u jogurtu z jemné kultury bez obsahu probiotik a mezi vzorky byl také rozdíl v obsahu těkavých kyselin, zejména kyseliny octové a hexanové. Velký rozdíl mezi jogurty z kravského mléka a jogurty z kozího mléka byl v obsahu terpenů, kdy v kravském jogurtu byly terpeny stanoveny jen v malých množstvích ($<10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$).

Tabulka 5 Obsah těkavých látek v kravském jogurtu bez přidání probiotik [31]

Sloučenina	Jemná kultura	Klasická kultura	Kyselá kultura
Acetaldehyd	-	✓	-
Acetone	-	✓	-
Diacetyl	✓	✓	✓
2 - pentanon	-	✓	-
2,3-pentandion	-	-	✓
Acetoin	✓	✓	✓
2 – heptanon	✓	✓	✓
Dihydro-2-methyl-3(2H)-thiofenon	-	-	✓
2 - nonanon	✓	-	✓
Hexanová kyselina	✓	✓	-

Tabulka 6 Obsah těkavých látek v kravském jogurtu bez přidání probiotik [31] - pokračování

Sloučenina	Jemná kultura	Klasická kultura	Kyselá kultura
Toluen	-	-	✓
2,4 - dimethyl-1-heptan	✓	-	-
1 - decen	-	-	✓
Dekan	✓	✓	✓
Dodekan	-	-	✓
Limonen	-	✓	✓
Karyofyllen	-	✓	-

Startovací kultury pro výrobu bulharského jogurtu charakterizovali Krastanov a kol. [32]. Nejdříve zkoumali symbiózu mezi kmeny *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* a *Streptococcus salivarius* ssp. *Thermophilus* vyizolovaných z bulharských mléčných výrobků. Symbióza byla potvrzena pouze, když byl poměr laktobacilů a streptokoků přibližně 1:3, 1:9 nebo 1:5. Aromatické látky těchto symbiotických kultur měřili pomocí SPME-GC-MS, kdy tyto kultury byly kultivovány v rekonstituovaném sušeném mléce. Celkem identifikovali 47 aromatických látek. Acetaldehyd, furaldehyd, 3-hydroxybutanal, benzaldehyd, benzacetaldehyd, ethylbenzaldehyd a 2-oktanal byly detekovány ve všech startovacích kulturách. Z těchto aldehydů byl nejvíce zastoupen benzaldehyd a acetaldehyd. Ze skupiny ketonů měly největší koncentraci acetoin, 2-pentanon, 2,3-butandion a 2-nonanon. 2-acylfuran, 2-heptanon, 2-undekanon a 3-methyl-2-butanon byly ve výrazně nižších koncentracích. Mezi kyselinami byly v největší míře zastoupeny kyseliny hexanová a octová a mezi alkoholy byl dominantní 2-furanmethanol. Mezi další látky patřil ethenyl propanoát, tetradekan, 2,4,4-trimethylpent-2-en a 2-methylundekan. Tyto aromatické profily by bylo možné použít k prokázání a posouzení pravosti tradičních bulharských mléčných výrobků.

2.5.1 Možnosti stanovení těkavých látek

K extrakci těkavých látek z mléčných výrobků může být použita široká škála extrakčních technik, jako je dynamická headspace extrakce, odpařování aroma za pomoci rozpouštědla, tepelná desorpce, simultánní destilace – extrakce a zcela nejčastěji mikroextrakce v pevné fázi (SPME). Většina těchto technik se používá v tandemu s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí (GC-MS), ale mohou být využívány i možnosti jako plynová chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem (GC-FID), hmotnostní spektrometrie se zvoleným průtokem iontů (SIFT-MS) nebo hmotnostní spektrometrie s přenosem protonů (PTR-MS) [33].

2.5.1.1 Mikroextrakce pevnou fází

Zařízení SPME se skládá ze stojanu s integrovaným extrakčním vláknem uvnitř jehly a montážního držáku. Vlákno je křemenné potažené na povrchu tenkým filmem extrakční fáze. Při měření je vlákno buď ponořeno do kapalného vzorku nebo je ponecháno v prostředí nasyceném těkavými analyty. Po sorpci analytů na vlákno je provedena desorpce, nejčastěji v injektoru plynového chromatografu. Díky nízkým detekčním limitům, nízkým nákladům

a jednoduchosti manipulace je to oblíbená metoda při analýze těkavých látek v potravinách [34].

2.5.1.2 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Plynová chromatografie (GC) je separační metoda, založená na pohybu vzorku ve dvou různých fázích. Mobilní fázi je vzorek unášen nad nebo přes stacionární fázi, kde se složky dělí podle schopnosti poutat se na tuto fázi. Základem plynové chromatografie je plynná mobilní fáze, nejčastěji dusík, helium nebo také vodík. GC se zaměřuje na látky plynné, případně kapalné, které se dají odpařit. Mezi hlavní výhody této metody patří jednoduchá a spolehlivá analýza s použitím pouze malého množství vzorku, účinná separace, vysoká citlivost a široké použití s využitím různých detekčních metod [35].

Sdružená technika GC-MS je dnes nepoužívanější tandemovou technikou v instrumentální analytické chemii a je vhodná jak pro kvantitativní, tak i pro kvalitativní analýzu. Kombinuje separaci složek s vysokým rozlišením se selektivní a citlivou hmotnostní detekcí, čehož se využívá zejména u komplexních vzorků. Hlavní schopností tohoto tandemu je schopnost identifikace neznámých sloučenin pomocí zavedených a rozsáhlých chemických, elektron ionizačních knihoven. Toto spojení je také výhodné, protože sloučeniny, které lze analyzovat pomocí GC, jsou také kompatibilní s požadavky MS. Jediným rozdílem jsou různé pracovní tlaky. Podstata MS spočívá na procesu ionizace, kde nepoužívanější technikou je elektronová ionizace. Chemická ionizace se často používá ke stanovení molekulových hmotností sloučenin, které vykazují malý nebo dokonce žádný molekulární ion v důsledku intenzivní fragmentace. Vzniklé ionty jsou poté hmotnostně rozlišeny pomocí hmotnostního analyzátoru. Mezi základní typy patří magnetický sektorový analyzátor, analyzátor doby letu, iontová past a kvadrupólové analyzátory, které jsou u tandemu GC-MS nejčastěji používány. Skládají se z 4 pevných, v průřezu kruhových nebo hyperbolických tyčí zarovnaných ve stejné vzdálenosti a rovnoběžné s iontovou dráhou. Kvadrupól používá elektrická pole k oddělení iontů podle jejich podílu hmotnosti a náboje (m/z). Tyto oddělené ionty jsou nakonec detekovány například pomocí elektronásobiče [36; 37]. Vzhledem k uvedeným výhodám byly tyto techniky použity v experimentální části práce.

2.6 Mikrobiální profil jogurtu

Jogurt je vyráběn procesem kysání mléka a tento proces je závislý na růstu a aktivitě bakterií mléčného kvašení (BMK), které fermentují laktózu na kyselinu mléčnou. BMK jsou různorodou skupinou mikroorganismů, jedná se o grampozitivní koky a paličky s fakultativně anaerobním metabolismem. Svým metabolismem vytvářejí metabolity, které jsou pro nežádoucí bakterie toxické stejně jako nízké pH, čehož se využívá při konzervaci potravin živočišného i rostlinného původu. Dle koncových produktů metabolismu dělíme BMK na homofermentativní, které přeměňují sacharid výlučně na kyselinu mléčnou, a na heterofermentativní, u kterých vzniká kyselina mléčná z více jak 50 % sacharidu a dále vzniká kyselina octová, CO_2 a případně ethanol. Kromě kyseliny mléčné mohou BMK také produkovat další látky, jako jsou aromatické sloučeniny, které přispívají k charakteristické chuti a vůni mléčných výrobků. Mezi nejznámější bakterie mléčného kvašení patří *Lactobacillus*,

Streptococcus, *Lactococcus* a *Bifidobacterium*. Základními bakteriemi pro přípravu jogurtů a od nich odvozených výrobků jsou kmeny druhů *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Tyto mikroorganismy mají symbiotický vztah, kde *Streptococcus* produkuje kyselinu mléčnou, která snižuje pH mléka a vytváří kyselé prostředí, které je vhodné pro růst *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Naopak, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* produkuje enzymy, které pomáhají rozkládat cukry v mléce na jednodušší sloučeniny [38; 39]. Mimo BMK se v mléčných výrobcích mohou vyskytovat i kvasinky fermentující laktózu *Candida kefyr* a *Kluyveromyces marxianus* var. *Marxianus* nebo nefermentující laktózu *Saccharomyces cerevisiae* a *Debaryomyces hansenii*.

Velikova a kol. [13] studovali bulharský jogurt z hlediska mikrobiálního složení. Z celkem 77 jogurtů získaných z různých částí Bulharska vyzolovali 76 kmenů BMK pomocí selektivních médií. Celkem vyzolovali 52 kmenů s tyčinkovými buňkami a 24 kmenů koků. Tyto kmeny byly podrobeny izolaci DNA, následovala PCR analýza a analýza pomocí sekvenování, která byla založena na sekvenování genu 16S ribozomální RNA. Bylo identifikováno 6 druhů laktobacilů, kromě *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (40 kmenů), zkoumané bulharské jogurty obsahovaly *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lb. helveticus*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus* a *Lb. fermentum*. 13 kmenů patřilo mezi koky rodu *Pediococcus acidilactici*, 5 kmenů *Str. thermophilus*, 4 z *Enterococcus faecium* a 2 z rodu *Leuconostoc*. Jogurty s největší biodiverzitou BMK pocházely z pohoří Rodopy, kde většina vzorků obsahovala dva nebo tři kmeny BMK různé morfologie. Podobně charakterizovali BMK u bulharských mléčných výrobků Koleva a kol. [40], z bílých sýrů, jogurtů a tradičního výrobku katak bylo vyzolováno 25 kultur BMK. Osm kmenů z jogurtu bylo fenotypově podobných *Lactobacillus delbrueckii*. Tumbarski a kol. [41] se ve své studii zabývali izolací a srovnáním kmenů *Lactobacillus* ze čtrnácti domácích bulharských a italských jogurtů. Kmeny *Lactobacillus* byly pomocí sekvenování genu 16S rRNA identifikovány jako *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. Výsledky antimikrobiálního testu ukázaly, že bulharské kmeny *Lb. bulgaricus* měly vyšší antimikrobiální aktivitu ve srovnání s italskými kmeny. Stejný výsledek měl test citlivosti na antibiotika, kdy bulharské kmeny byly rezistentní až středně citlivé, oproti italským kmenům, které byly citlivé. Výsledky testu rezistence na nisin ukázaly, že pouze jeden z izolátů byl odolný vůči nisinu.

Mléčné výrobky a jejich obsah BMK zkoumali v severozápadní Etiopii Taye a kol. [42] z 16 zkoumaných mléčných výrobků tvořilo 5 výrobků jogurty. Kultivace probíhaly na selektivních médiích při 30°C a 37°C za aerobních a anaerobních podmínek po dobu 48–72 h, celkem vyzolovali 41 bakteriálních kmenů, které identifikovali a seskupili do 6 rodů viz Tabulka 7.

Tabulka 7 Podíl bakterií mléčného kvašení izolovaných z mléka a mléčných výrobků [42]

Vzorek	Mléko	Sýr	Jogurt
<i>Lactobacillus</i> spp.	5	2	3
<i>Lactococcus</i> spp.	4	3	2
<i>Streptococcus</i> spp.	4	2	2
<i>Leuconostoc</i> spp.	2	2	2
<i>Pediococcus</i> spp.	3	0	0
<i>Bifidobacteria</i> spp.	3	1	1

Farimany a kol. [43] podrobili pět jogurtů z Íránu mikrobiologické charakterizaci. Z kultivovaných kmenů byla vyizolovaná DNA podrobena PCR amplifikaci a následnému sekvenování 16S rRNA. Ze 102 izolátů byly majoritně zastoupeny termofilní BMK *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* (s podobným počtem ssp. *bulgaricus* a *lactis*). Sladký a probiotický jogurt porovnávali Paul a kol. [44] s rostlinnými fermentovanými potravinami. Z 13 izolovaných bakterií bylo 6 rychle rostoucích kmenů podrobeno testu s 50 biochemickými reakcemi. Tímto testem byly jako hlavní rod identifikovány laktobacily, následované leuconotostoky. Konkrétně byly identifikovány druhy *Lactobacillus curvatus* ze slazeného jogurtu; *Leuconostoc mesenteroides* ze slazeného i probiotického jogurtu; *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* z probiotického jogurtu; *Lactobacillus plantarum* z nápoje kanji a *Lactobacillus delbrueckii* z rýže kanji.

2.6.1.1 Rod *Streptococcus*

Tento rod zahrnuje lidské a zvířecí patogeny, orální komenzály, střevní komenzály a jediný druh, *Streptococcus thermophilus*, který se používá při výrobě fermentovaných potravin. *S. thermophilus* se příliš neliší od mezofilních mléčných laktokoků, ovšem cesta, kterou je laktóza metabolizována, je zcela odlišná. Jedná se o mezofilní mikroorganismus a jejich optimální teplota je kolem 40 až 42 °C, ovšem dobře rostoucí kultury snášejí i teplotu přes 60 °C. Mléko začíná srážet při 30 až 45 °C. Tvoří kulovité až vejcovité buňky v párech až řetězcích s průměrem 0,7 až 0,9 μm [45; 46]

2.6.1.2 Rod *Lactococcus*

Rod *Lactococcus* se skládá z pěti odlišných druhů: *Lactococcus lactis*, *Lactococcus garviae*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum* a *Lactococcus raffinolactis*. Jejich optimální teplota je 30 °C, jsou nepohyblivé, obvykle v párech koků nebo řetězcích. *L. lactis* je nejdůležitějším zástupcem, protože se používá jako startovací kultura pro většinu tvrdých sýrů a jiných mléčných výrobků. V mléce tvoří 0,8 až 0,9 % kyseliny mléčné. Existují tři poddruhy: *L. lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* ssp. *horinae* (ten nemá žádný význam ve fermentovaných potravinách). Zařazujeme sem také *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis*, který je velmi podobný *L. lactis* ssp. *lactis*, ovšem dokáže štěpit kyselinu citronovou za tvorby acetionu [47].

2.6.1.3 Rod *Lactobacillus*

Kromě velmi extrémních prostředí existuje jen málo lokalit, kde se laktobacily nenacházejí, a často jsou popisovány jako všudypřítomné v přírodě. Schopnost laktobacilů růst a přetrvávat v tolika různých prostředích a podmínkách odráží jejich rozmanité fyziologické vlastnosti. Jedná se o grampozitivní paličky, jejich teplotní optima se velmi liší, od 30 °C do 45 °C. Tolerance vůči kyselinám je společným znakem laktobacilů (mnoho kmenů ve skutečnosti preferuje kyselé prostředí).

Z hlediska fermentace je lze rozdělit do tří skupin. I. skupina jsou obligátně homofermentativní druhy, které fermentují pouze hexózy, například *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus* a další. Druhy II. skupiny jsou fakultativně heterofermentativní, které při nedostatku glukózy produkují kyselinu octovou, ethanol a kyselinu mravenčí a jsou schopny fermentovat pentózy. Do této skupiny patří např. *Lactobacillus casei*. III. skupina jsou obligátně heterofermentativní laktobacily. Tato skupina obsahuje také plynotvorné betabakterie mezi které jsou řazeny mimo jiné *Lactobacillus brevis* nebo *fermentum*.

Jako startovací kultury pro mléčné výrobky se používají dva hlavní druhy (hlavně pro sýry a jogurty), *Lactobacillus helveticus* a *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* je vybaven rozsáhlým proteolytickým a aminokyselinovým transportním systémem, který zvyšuje jeho metabolickou funkci, zejména v prostředí mléka bohatého na bílkoviny. Úzká spolupráce mezi *L. bulgaricus* a *S. thermophilus* umožňuje zvýšenou acidifikaci při fermentaci mléka [48; 49; 39].

2.6.2 Možnosti identifikace mikrobiálních kultur

Mikrobiologické metody identifikace mikroorganismů se vyvíjely od 18. století až do současnosti, kdy se stále více upřednostňují molekulárně genetické techniky. Tradiční metody, jako je mikroskopie a kultivace, postupně ustupují a nahrazují je moderní přístupy, které využívají znalost genetických sekvencí. V 80. a 90. letech 20. století nastal zásadní pokrok v oblasti molekulárně genetických metod, především díky vynálezu PCR (polymerázová řetězová reakce). Tato metoda umožňuje rychlé a citlivé zvýšení počtu kopií specifických úseků DNA, což je klíčové pro identifikaci mikroorganismů na základě jejich genetického kódu. PCR se stala základní technikou pro mnoho dalších molekulárně genetických metod. Díky těmto pokrokům v molekulární genetice je nyní možné identifikovat mikroorganismy rychleji, citlivěji a přesněji než kdykoli předtím. Tato technologická revoluce má široké uplatnění v oblasti biomedicíny, průmyslu, zemědělství a ochrany životního prostředí [50].

2.6.2.1 Mikrobiologické metody

Mikrobiologické metody identifikace mikroorganismů jsou základní techniky, které umožňují určit identitu mikroorganismů. Nejstarší metodou identifikace mikroorganismů je mikroskopie. Mikroskopem zkoumáme morfologické rysy, jako tvar a velikost buněk mikroorganismů. V mikroskopii je možné využití barvení, nejvíce využívané je Gramovo barvení. To umožňuje rozlišení G+ a G- bakterií, na základě stavby buněčné stěny. Dalším často používaným

barvením je za použití fluorescenčních barviv. Mikroorganismy je možné identifikovat za pomoci zkoumání růstových podmínek, barvy a tvaru kolonií. Toho se využívá při kultivaci na živných mediích, což je také nejjednodušší způsob, jak kvantifikovat živé mikroorganismy [51; 52].

2.6.2.2 Molekulárně biologické metody

Molekulárně biologické metody se při identifikaci mikroorganismů zaměřují na analýzu jejich genetického materiálu. Základní principy těchto metod jsou založeny na detekci a analýze určitých DNA nebo RNA sekvencí, které jsou charakteristické pro daný druh nebo skupinu.

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR je výkonná metoda, která se rychle stala jednou z nejpoužívanějších technik molekulární biologie. Základní princip této metody je velmi jednoduchý. Malé množství DNA je v každém cyklu PCR reakce zdvojnásobováno díky enzymu DNA polymeráza, která katalyzuje syntézu nových řetězců DNA ze stavebních bloků DNA – nukleotidů. Je nutné, aby polymeráza byla termostabilní a vydržela vysoké teploty, nejčastěji je izolována z *Thermus aquaticus*, bakterie jejímž původní rezervoárem jsou horké prameny. Další předpokladem úspěšné syntézy je přítomnost tzv. primerů. Jedná se o krátký řetězec DNA, který slouží jako počáteční místo replikace. Specifické primery jsou navrženy tak, aby selektivně amplifikovaly pouze určitý úsek DNA, který je charakteristický pro detekovaný mikroorganismus. Tato technika se skládá se tří opakujících se kroků:

- Denaturace – Zahřátí na 90–97°C, které způsobí denaturaci DNA, tedy rozdělení dvoušroubovice DNA na jednovláknové řetězce.
- Annealing – Ochlazení na 50–60 °C, při kterém dochází k hybridizaci primerů se sekvencemi DNA.
- Elongace – Probíhá při teplotě kolem 72 °C a DNA polymeráza váže příslušné nukleotidy na primery, vznikají dvě vlákna DNA.

Tyto kroky se opakují asi v 30 cyklech, kdy množství DNA roste exponenciálně a je možné jej detekovat a analyzovat. Detekce produktů PCR může být provedena pomocí gelové elektroforézy na agarózovém gelu, kdy se DNA vizualizuje barvením např. ethidium bromidem a je okamžitě viditelné pod UV zářením [53; 54].

V případě použití polymerázové řetězové reakce v reálném čase (real-time PCR, RT-PCR) je možné provádět kvalitativní analýzu a současně kvantifikaci produktů PCR v průběhu reakce. Toho je dosaženo použitím fluorescenčních barviv, která reagují s amplifikovaným produktem a mohou být měřena přístrojem. Po každém cyklu je zaznamenána síla fluorescenčního signálu, která roste s koncentrací DNA. Kromě toho lze produkt charakterizovat pomocí teplot tání, kdy je produkt vystaven zvyšující se teplotě. Tento bod tání je jedinečnou vlastností závislou na délce produktu a složení nukleotidů [55].

Sekvenování 16S rRNA

Tato metoda využívá specifické sekvence 16S rRNA genu, která je součástí ribozomální RNA bakterií. Celý tento gen má délku 1500 bp. 16S rRNA má několik konzervovaných úseků, které jsou společné pro všechny bakterie, a variabilní úseky, které jsou specifické pro různé druhy

nebo skupiny bakterií. Princip sekvenování 16S rRNA spočívá v izolaci DNA bakterií, amplifikaci specifického úseku 16S rRNA pomocí PCR a následné sekvenování této DNA sekvence. Amplifikovaná DNA sekvence se sekvenuje pomocí Sangerova sekvenování nebo metody sekvenování nové generace (NGS).

Princip Sangerova sekvenování spočívá v tom, že se DNA polymerázou syntetizuje nový řetězec DNA, který je označený zvláštními nukleotidy, tzv. dideoxyribonukleotidy (ddNTP). Tyto speciální nukleotidy mají odlišnou strukturu od běžných nukleotidů, které se používají při syntéze DNA. Když se ddNTP připojí k nově syntetizovanému řetězci, způsobí zastavení syntézy, protože nemají 3' hydroxyl, který je potřebný pro další připojení dalšího nukleotidu. Díky tomu se vytvoří řetězec DNA různých délek, který obsahuje všechny možné kombinace ddNTP a běžných nukleotidů. Po syntéze těchto řetězců se provede elektroforéza, která oddělí nukleotidy podle jejich velikosti.

Oproti tomu NGS umožňuje sekvenování velkých množství DNA nebo RNA současně, což umožňuje analýzu celých genomů rychle a efektivně. Jeho princip NGS spočívá v tom, že se DNA nebo RNA vzorek rozdělí na malé fragmenty, které se poté amplifikují a sekvenují současně. Získaná sekvence se porovná s databázemi známých sekvencí 16S rRNA, což umožňuje identifikaci a klasifikaci bakterií na základě jejich fylogenetických vztahů [56; 57; 58].

2.7 Senzorická kvalita jogurtů

Senzorické posuzování má v dnešní době velký význam, neboť kvalita vnímaná pomocí smyslů představuje nedílnou součást celkové kvality potravin. Tato senzorická kvalita je zároveň jediným aspektem kvality, který spotřebitel může samostatně hodnotit při výběru potravin. Pod pojmem senzorická analýza rozumíme posuzování potravin přímo pomocí lidských smyslů a následné zpracování výsledků centrálním nervovým systémem. Tato analýza se provádí za podmínek, které zajistí objektivní, přesné a opakovatelné měření [59].

Přijatelnost jogurtu, jako u jiných potravinářských výrobků, závisí na mnoha faktorech, ale nejdůležitější je senzorická kvalita. Posuzování vzhledu zahrnuje posouzení povrchu výrobku, jeho barvy, zřetelné čistoty, přítomnosti cizích látek, prosakování syrovátky a oddělování fází. Hodnocení probíhá zkouškou v otevřeném obalu, případně vylitím obsahu z obalu, pokud je to nutné. Hodnocení konzistence zahrnuje parametry jako hustota, lepivost a hrubost. Provádí se mícháním vzorku v nádobě (černou) lžičkou před posouzením v ústech. Posouzení chuti se realizuje prostřednictvím vnímání pachů a chutí obsahu výrobku [59].

Zda má na senzorickou kvalitu jogurtů vliv doba minimální trvanlivosti zkoumali Kalhotka a kol. [60]. Vybrané bílé jogurty čerstvé a po uplynutí doby expirace hodnotilo 10 školených hodnotitelů z hlediska textury, vůně, chuti, kyselosti a celkového pocitu výrobku. Velmi překvapivé byly výsledky u hodnocení celkového dojmu a vůně, protože u všech jogurtů na počátku i po uplynutí doby min. trvanlivosti bylo hodnocení velmi podobné. Největší rozdíl byl zaznamenán u deskriptoru chuť. U některých jogurtů došlo ke zlepšení hodnocení, naopak u většiny došlo ke zhoršení, ovšem nebyly zaznamenány žádné závažné senzorické změny. Šulcerová a kol. [61] se zabývali stejnou problematikou. Došli k závěru, že k největšímu

zhoršení došlo u jogurtů, které byly vyrobeny s přidavkem sušené syrovátky, zřejmě díky uvolňování syrovátky s dobou skladování.

Jaworska a kol. [62] prováděli průzkum vlivu texturních vlastností jogurtů na jejich celkovou kvalitu a přijatelnost. Výsledky sensorického hodnocení byly zpracovány pomocí analýzy hlavních komponent (PCA). Zjistili, že hladkost a hustota s přijatelností jogurtů pro spotřebitele nijak výrazně nesouvisela.

Do jogurtů mohou být přidávány stabilizátory, a právě vliv přídavku pektinu a želatiny na sensorické vlastnosti jogurtů zkoumali Soomro a kol. [63]. Přídavek stabilizátorů činil 0,2 % a byly použity 2 typy mléka pro přípravu jogurtů: buvolí a kravské. Byly hodnoceny 4 znaky: vzhled, chuť, textura a celková přijatelnost. Dle výsledků měl přídavek stabilizátorů pozitivní vliv na texturu i chuť jogurtů. Nejlépe hodnocený byl jogurt z buvolího mléka s přidavkem želatiny jako stabilizátoru, ale statisticky byly všechny vzorky hodně podobné.

2.7.1 Možnosti sensorického hodnocení

Výběr metody sensorického hodnocení je závislý na typu vzorku, na jejich množství, a také na zaškolenosti hodnotitelů. Mezi obvykle používané metody patří rozlišovací zkoušky, preferenční zkoušky, srovnání se standardem, profilový test a posuzování pomocí stupnic.

Nejčastěji se v praxi můžeme setkat s posuzováním potravin pomocí stupnic. Tato metoda nám může pomoci lépe kvantitativně rozlišit rozdíly mezi vzorky. Rozeznáváme stupnice intenzitní, kterými posuzujeme intenzitu vlastnosti a stupnice hedonické, kterými posuzujeme příjemnost (případně přijatelnost). Podoba stupnic se může v různých hodnoceních lišit, můžeme se setkat se stupnicemi kategorovými (nominálními), slovními, bodovými, ovšem značně se rozšířilo používání grafických stupnic. Grafické stupnice poskytují citlivější dělení mezi vzorky, ovšem k přesnému vyjádření je potřeba zkušenosti [64].

Pokud je potřeba určit, zda je mezi vzorky rozdíl, používají se rozlišovací zkoušky. Pokud je třeba zjistit rozdílnost u více vzorků, používá se pořadová zkouška, při které hodnotitel seřadí vzorky podle intenzity určitého znaku [65].

Preferenční zkoušky se používají, když chceme zjistit, kterému vzorku by dal hodnotitel přednost z hlediska kvality, příjemnosti nebo přijatelnosti. Velmi citlivou metodou je pak profilový test, kdy je zapotřebí hodnotitel se speciálním zaškolením. V tomto případě je hodnoceno několik hlavních znaků s použitím grafických stupnic [64].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V experimentální části byly vyrobeny vzorky tří typů jogurtů a následně charakterizovány z hlediska těkavých (aromatických) látek, mikrobiálního složení a sensorické kvality.

3.1 Použité chemikálie a vybavení

Chemikálie, pomůcky, přístroje a ingredience spolu s jejich charakteristikami, které byly použity při výrobě jogurtů a při analýze v experimentální části studie.

3.1.1 Přístroje a pomůcky

Plynový chromatograf Trace™ 1310 se split/splitless injektorem (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), Hmotnostní detektor ISQ™ LT Single Quadrupole (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), SPME vlákno DVB/CAR/PDMS 50/30 μm, Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, USA), Knihovna spekter NIST/EPA/NIH, Verze 2.0 (Gaithersburg, Maryland, USA), Počítač (Intel Pentium Procesor), Předvážky EK-600i (A&D Instruments LTD., Japonsko), pH metr (Hanna Instruments, ČR), skříňová sušárna ULM 400 (Mettler GmbH & Co. KG, Německo), centrifuga MINI Spin Plus 14 500 min⁻¹, 14 000× g (Eppendorf, Německo), NanoDrop 2 000, UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, USA), termostat – Mini incubator (Labnet, USA), Eco™ Real-Time PCR System (Illumina, California, USA), vakuový exikátor, mikropipety BIOHIT (1000, 200, 100, 20, 10 μl), vialky s kaučuk-teflonovými septy a šroubovacími uzávěry, běžné laboratorní sklo, chladnička s mrazničkou, kuchyňské pomůcky a nádoby.

3.1.2 Suroviny pro výrobu jogurtů

Mléko (1,5 % tuku, pasterováno), sušené mléko odtučněné (Nutrihouse).

3.1.3 Živná média pro kultivaci

Masopeptonový agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Maharashtra, Indie), Sladinový agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Maharashtra, Indie), de Mann, Rogosa, Sharpe (OXOID CZ s.r.o.).

3.1.4 Chemikálie

- Pro přípravu hrubého lyzátu a extrakci DNA

Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma, St. Louis, USA), fenol (Sigma, St. Louis, USA), izoamylalkohol (Lachema, Brno, ČR) chloroform (Lachema, Brno, ČR), kyselina etyléndiamíntetraoctová (EDTA) (Sigma, St. Louis, USA), tris-HCl (Penta, Chrudim, ČR), lysozym (Reanal, Budapešť, Maďarsko), proteináza K (Sigma, St. Louis, USA), octan sodný (Lachema, Brno, ČR), ethanol, 96 % (Penta, Chrudim, ČR).

- Komponenty PCR

PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR), SYTO PCR SYBR Master mix (Top Bio, Praha, ČR), Primer F_eub (10 pmol/μl), Primer R_eub (10 pmol/μl), Primer Oli-F (10 pmol/μl), Primer Oli-R (10 pmol/μl).

Tabulka 8 Použité PCR primery

Primery	Sekvence primeru (5' - 3')	Velikost produktů PCR	Zdroj
Doména Bacteria			
F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466 bp	[66]
R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT		
Celkové kvasinky			
Oli-F	CGT CAT AG A GGG TGA GA A TCC	152 bp	[67]
Oli-R	A CT TGT TCG CTA TCG GTC TC		

3.2 Analyzované vzorky

V experimentální části práce byly analyzovány vzorky jogurtů vyrobených v laboratorních podmínkách na FCH VUT v Brně. Výroba jogurtů vycházela ze standardního technologického postupu viz kapitola 3.3.2. Celkem byly analyzovány 3 vzorky jogurtů, a to „klasický“ bílý jogurt a dva jogurty bulharské. Klasický jogurt byl vyroben z jogurtové kultury výrobce Milcom, jogurt bulharský kupovaný byl vyroben z koupené bulharské kultury a jogurt bulharský tradiční byl vyroben z jogurtu dovezeného z Bulharska přeočkováním. Vyrobene jogurty byly uchovávány ve výrobních lahvích v lednici při teplotě 4 °C. Před senzoricou analýzou nebyly jogurty nijak upravovány, před analýzou těkavých látek byly pouze vytemperovány na laboratorní teplotu.

Tabulka 9 Označení vzorků

	Označení
Klasický jogurt	KL
Bulharský jogurt – kupovaný	BK
Bulharský jogurt – tradiční	BT

3.2.1 Použité kultury

- jogurtová kultura sušená; složení *Lactobacillus delbrueckii* ssp, *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, MILCOM a.s., ČR
- lyofilizovaná kultura pro přípravu bulharského jogurtu: složení – *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, LB Bulgaricum, BG
- tradiční bulharský jogurt (nedefinovaného složení)



Obrázek 2 Analyzované jogurty

3.3 Použité metody a pracovní postupy

3.3.1 Postup výroby jogurtové kultury

Polotučné mléko (1 litr) bylo v hrnci zahřáto na 90 až 95 °C, při této teplotě bylo ponecháno 2 až 3 minuty. Následně bylo zchlazeno na 40 až 45 °C a do mléka byla přidána příslušná sušená/lyofilizovaná jogurtová kultura. Po dobrém promíchání byla připravená směs rozlita do lahví, které byly ponechány při 45 °C fermentovat 3 až 6 hodin, dokud nebylo dosaženo požadovaného pH 4,5 až 4,7. Po fermentaci byly lahve s připravenou kulturou ponechány v lednici (4 °C) max. po dobu 14 dní, poté byly přeočkovány do čerstvého mléka.



Obrázek 3 Jogurtová kultura pro výrobu klasického jogurtu



Obrázek 4 Jogurtová kultura pro výrobu bulharského koupeného jogurtu

3.3.2 Postup výroby jogurtů

Do polotučného mléka (1 litr) bylo přidáno 5 až 6 % sušeného odtučněného mléka, pro zvýšení sušiny a zlepšení konzistence jogurtu. Směs byla poté zahřata na 90 až 95 °C, při této teplotě byla ponechána 2 až 3 minuty. Následně byla směs zchlazena na 40 až 45 °C a bylo přidáno 20 až 30 gramů připravené jogurtové kultury nebo hotového jogurtu (viz Tabulka 10). Po dobrém promíchání byla připravená směs rozlita do lahví, fermentace probíhala stejně jako u přípravy jogurtové kultury (viz kapitola 3.3.1).

Tabulka 10 Receptura pro výrobu jogurtů

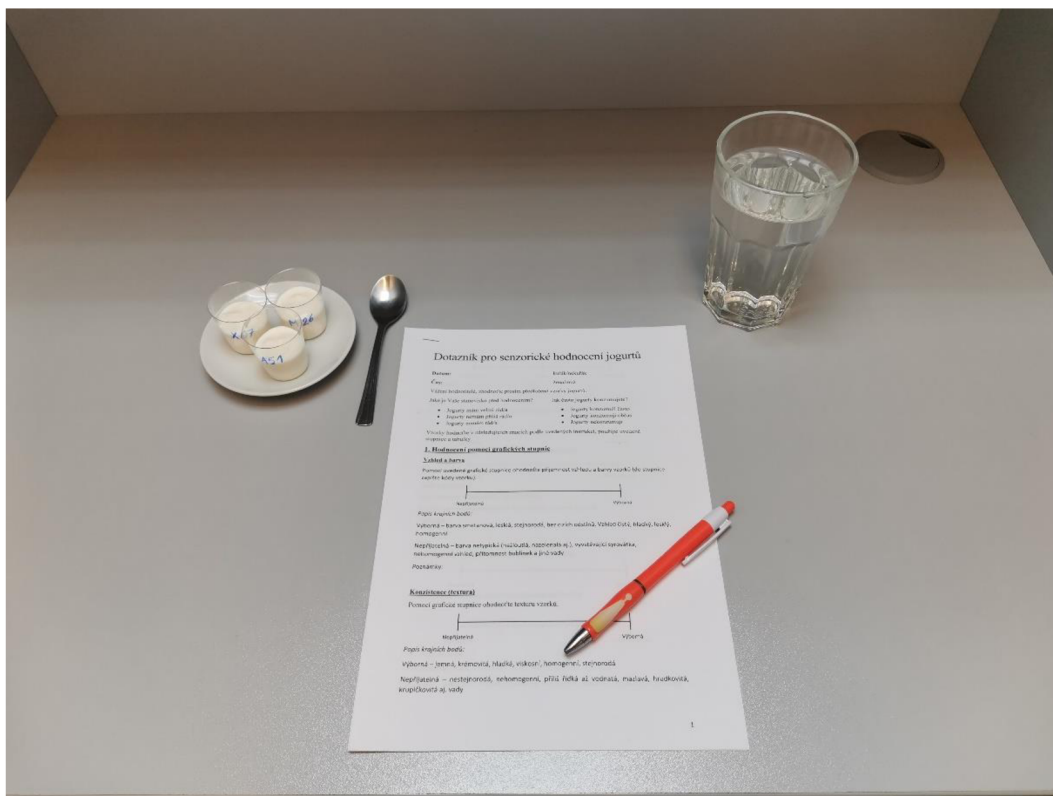
	Přídavek sušeného mléka na 1 litr mléka (g)	Přídavek jogurtové kultury na 1 litr mléka (g)
Klasický jogurt	60	30
Bulharský jogurt – kupovaný	50	20
Bulharský jogurt – tradiční	50	20

3.3.3 Senzorická analýza

Senzorické hodnocení probíhalo v laboratoři senzorické analýzy po dobu dvou dnů. Celkem se zúčastnilo 25 (n = 25) hodnotitelů. Hodnotitelé obdrželi cca 20 g od každého jogurtu, označených třímístným kódem. Pro neutralizaci chuti měli hodnotitelé k dispozici vodu. Senzorická analýza se skládala z hodnocení pomocí grafických stupnic, profilového testu chuti a pořadového testu. Použitý dotazník je přiložen v příloze 1.

Při hodnocení byly použity grafické stupnice o délce 10 cm, vůně a chuť byly hodnoceny z hlediska intenzity a příjemnosti, barva a vzhled pouze z hlediska příjemnosti a konzistence byla hodnocena z hlediska příjemnosti a z hlediska hustoty. V profilovém testu byla hodnocena intenzita kyselé, sladké, hořké, jogurtové a kvasinkové chuti. Hodnotitelé měli možnost přidat

vlastní charakteristiku chuti, pokud nějakou pocítili. Nakonec hodnotitelé seřadili vzorky podle přijatelnosti od nejvíce po nejméně přijatelný.



Obrázek 5 Ukázka vzorků připravených k senzorní analýze

3.3.4 Stanovení těkavých látek

Těkavé látky byly stanoveny pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí ve spojení s mikroextrakcí tuhou fází (HS-SPME-GC-MS). Před analýzou byly vzorky temperovány a naváženy do vialek po 3 gramech. Každý jogurt byl změřen třikrát ($n = 3$)

3.3.4.1 Podmínky SPME extrakce

Doba inkubace (temperování) 10 min, doba extrakce 20 min, teplota agitátoru (teplota extrakce a inkubace) 40 °C, agitátor zapnutý 5 s, agitátor vypnutý 60 s, množství vzorku 3 g, hloubka ponoření vlákna do vialky 20 mm.

3.3.4.2 Podmínky GC-MS analýzy

Kapilární kolona ZB–Wax (parametry kolony: 30 m × 0,25 mm × 0,5 μl), teplota injektoru (teplota desorpce) 240 °C, doba desorpce 20 min, dávkování: splitless (ventil uzavřen 10 min), hloubka ponoření vlákna do injektoru 40 mm, nosný plyn helium, průtok nosného plynu 1 ml · min⁻¹, teplotní program: 40 °C s výdrží 2 min (vzestupný gradient 3 °C/min do 110 °C s výdrží 10 min, vzestupný gradient 3 °C/min do 200 °C s výdrží 0 min, celková doba analýzy 65 min), hmotnostní detektor v módu EI (energie ionizačních elektronů 70 eV, teplota iontového zdroje 200 °C, skenovací rozsah m/z 30–370 amu, rychlost skenování 0,2 s)

3.3.4.3 *Vyhodnocení výsledků*

Pro analýzu výsledků byl využit software Xcalibur a referenční knihovny spekter. K identifikaci sloučenin byla porovnána naměřená hmotnostní spektra se spektry v knihovně a retenční indexy (Van den Dool a Kratz) byly porovnány s publikovanými hodnotami. Obsah sloučenin byl následně vyhodnocen pomocí ploch píků na chromatogramu, což poskytlo semikvantitativní údaje (výsledky jsou vyjádřeny jako relativní %).

3.3.5 **Stanovení mikrobiálního profilu**

3.3.5.1 *Příprava kultivačních médií a kultivace*

Pro kultivaci byly použity 3 druhy pevných médií: masopeptonový agar (MPA), sladidinový agar (SA) a agar de Man, Rogosa, Sharpe (MRS).

Kultivační média byla připravena podle uvedeného návodu na obalu. Po smíchání v Erlenmeyerových baňkách uvedeného množství práškového média a destilované vody byla média vysterylizována v autoklávu a poté byla rozlita do Petriho misek (cca 20 ml).

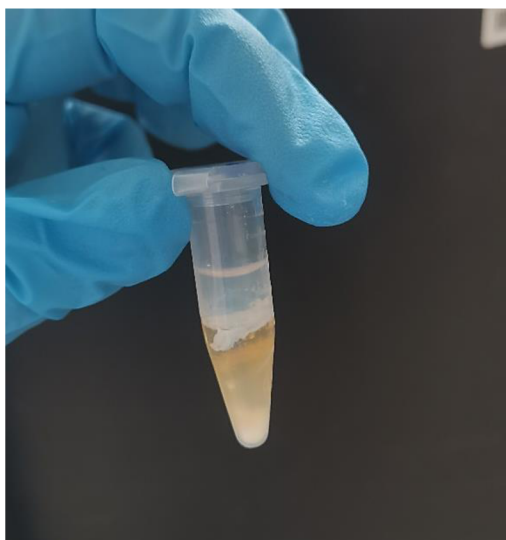
Z každého vzorku jogurtu byly ředěním sterilní vodou připraveny vzorky o ředění 10^{-3} a 10^{-5} . Na agarové plotny s médii bylo hokejkou rozetřeno 100 μ l zředěného vzorku.

3.3.5.2 *Příprava hrubého lyzátu*

Pro izolaci DNA bylo nejprve potřeba připravit hrubý lyzát jogurtů. Do sterilní eppendorfky (1,5 ml) byl odebrán 1 ml vzorku jogurtu, pro každý typ jogurtu byly připraveny 3 opakování. Vzorek byl centrifugován po dobu 5 minut při $14\,000\text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$. Supernatant byl slit a získaný sediment byl promyt v 1 ml roztoku A ((10nM Tris-HCl (pH 7,8); 5 nM EDTA). Poté byla opět provedena centrifugace za stejných podmínek, supernatant byl slit a sediment byl resuspendován v 1 ml lyzačního roztoku B (10nM Tris-HCl (pH 7,8); 5 nM EDTA; lyzozym 3mg/ml). Následovala půlhodinová inkubace při laboratorní teplotě a následně bylo přidáno 50 μ l 20 % SDS a 5 μ l proteinázy K. Takto byly vzorky inkubovány při 55°C do druhého dne.

3.3.5.3 *Izolace DNA fenolovou extrakcí*

K 500 μ l připraveného hrubého lyzátu byl přidán stejný objem fenolu (destilovaný fenol nasycený v TE pufru, pH 7,8) a tato směs byla kývavým pohybem promíchávána po dobu 4 minut. Následovala centrifugace po dobu 3 minut při $15\,000\text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$. Po oddělení fází byla vodní fáze odebrána do čisté eppendorfky a k ní bylo přidáno 700 μ l CIZ směsi (směs chloroformu a izoamylalkoholu v poměru 24:1). Směs byla opět po dobu 4 minut kývavým pohybem promíchávána a poté zcentrifugována po dobu 3 minut při $10\,000\text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$. Vodní fáze s DNA byla odebrána do čisté eppendorfky. Takto byla DNA připravena k přesrážení ethanolem, kdy k vodní fázi byla přidána 1/20 objemu octanu sodného a 800 μ l ethanolu. Obsah byl důkladně promíchán a ponechán po dobu 15 minut při -20°C . Poté byla provedena centrifugace při $10\,000\text{ ot} \cdot \text{min}^{-1}$ po dobu 15 minut. Supernatant byl slit a sediment DNA byl usušen ve vakuovém exikátoru. Nakonec k usušené DNA bylo přidáno 50 μ l TE purfu (pH 7,8; připraven sterilním smícháním 1 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,8), 200 μ l 0,5 M EDTA (pH 8,0) a 98 ml sterilní destilované vody) a DNA byla ponechána rozpouštět přes noc v lednici.



Obrázek 6 Oddělené fáze po centrifugaci s fenolem při izolaci DNA

3.3.5.4 Izolace DNA komerčním kitem

Pro izolaci DNA z jogurtu byl také použit kit pro extrakci DNA z potravin od značky NucleoSPin od firmy MACHEREY-NAGEL(Německo). Pro lepší výsledky byl použit hrubý lyzát buněk jogurtu vyroben dle kap. 3.3.5.2. Následně bylo postupováno dle dodaného návodu.

3.3.5.5 Příprava jedné kolonie pro PCR

Vybraná bakteriální a kvasinková kolonie získaná po kultivaci na agarových plotnách byla rozsuspendována v 50 μ l PCR vody. Suspenze byla poté povařena při 99 $^{\circ}$ C 10 minut.

3.3.5.6 Stanovení čistoty a koncentrace DNA

Koncentrace a čistota vyizolované DNA byla měřena spektrofotometricky na spektrofotometru NanoDrop 2000.

3.3.5.7 PCR v reálném čase

Pro měření RT-PCR byla vyizolovaná DNA nejdříve naředěna na koncentraci 10 ng/ μ l. Komponenty pro PCR byly nejdříve promíchány a krátce zcentrifugovány. Pro každý vzorek bylo připraveno 25 μ l PCR směsi dle Tabulky 11. Navíc byly připraveny negativní kontroly, které neobsahovaly DNA, ale pouze vodu a pozitivní kontroly, které obsahovaly DNA z vybraných typových kmenů.

Tabulka 11 Složení PCR směsi

Komponent	Objem (μl)
Voda pro PCR	9,5
SYTO PCR SYBR Master mix	12,5
Primer F	1,0
Primer R	1,0
DNA matrice	1,0

Připravené vzorky pro PCR analýzu byly promíchány, krátce zcentrifugovány a vloženy do PCR cycleru. Program cycleru byl nastaven dle Tabulky 12 a 13.

Tabulka 12 Nastavení programu pro PCR doménu *Bacteria*

	Teplota (°C)	Délka (s)	
Denaturace iniciační	95	300	
Denaturace	95	30	30 cyklů
Připojení primerů	55	30	
Syntéza DNA	72	30	
Poslední syntéza DNA	72	300	
Melt analýza	50 až 90		

Tabulka 13 Nastavení programu pro PCR kvasinek

	Teplota (°C)	Délka (s)	
Denaturace iniciační	94	300	
Denaturace	94	60	30 cyklů
Připojení primerů	51	30	
Syntéza DNA	72	60	
Poslední syntéza DNA	72	300	
Melt analýza	50 až 90		

3.4 Statistické zpracování výsledků

Získaná data byla vyhodnocena v aplikaci Microsoft Excel Office 19 a Statistica 14.1. Pro lepší přehled jsou výsledky znázorněny graficky ve formě sloupcových a boxových grafů. Ze statistických metod byla použita korelační analýza, k určení vztahu mezi proměnnými sensorické analýzy. Také analýza rozptylu jejímž cílem je zjistit, zda existuje statisticky významný rozdíl mezi vzorky, a analýza hlavních komponent pro vizualizaci dat do faktorové roviny hlavních komponent 1 a 2.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Jak již bylo zmíněno, hlavním záměrem této práce bylo porovnat „klasický“ český vs. bulharský jogurt. Celkem byly vyrobeny a analyzovány 3 vzorky, „klasický“ bílý a bulharský jogurt vyrobené z čistých (standardních komerčně připravených) jogurtových kultur, a tradiční bulharský jogurt dovezený přímo z Bulharska.

Vzhledem k tomu, že složení tradičního bulharského jogurtu není přesně známo, jeho chuť a vůně bývá popisována jako výraznější, kyselejší než jogurtu klasického, naším cílem bylo pokusit se stanovit mikrobiální profil vzorků a diskutovat souvislosti s jejich senzoryckou kvalitou a obsahem těkavých (aromatických) látek.

4.1 Výsledky stanovení těkavých látek

Jedním z cílů této práce byla identifikace a porovnání těkavých látek vyrobených jogurtů. Pro charakterizaci byla použita metoda HS-SPME-GC-MS (kap. 2.5).

Těkavé látky ve vzorcích jogurtů byly identifikovány na základě hmotnostních spekter, které byly porovnány s existujícími knihovny. Současně byly vypočteny retenční indexy (RI) a porovnány s publikovanými hodnotami (RI_{ref}), pokud byly k dispozici. Přehled všech identifikovaných látek je uveden v Tabulce 14. Uvedené sloučeniny se vyskytovali alespoň ve 2 ze 3 paralelních vzorků a hodnota T_R je průměrem jejich retenčních časů. Pro jednotlivé vzorky je uveden relativní obsah jednotlivých sloučenin v procentech. Tyto sloučeniny byly zařazeny do chemických skupin a dle literatury bylo dohledáno jejich aroma. Ukázka chromatogramu je v Příloze 2.

Celkem bylo ve všech vzorcích identifikováno 29 aromatických látek, z toho 8 alkoholů, 7 ketonů, 6 esterů, 5 kyselin, 2 terpeny a 1 aldehyd.

Tabulka 14 Těkavé aromatické látky identifikované ve vzorcích jogurtů

Sloučenina	Skupina	Popis aroma [68]	T _R (min)	Bulharský kupovaný (rel. %)	Bulharský tradiční (rel. %)	Klasický (rel. %)	RI	RI _{ref} [69; 70]
Ethylacetát	Ester	Ananas	3,88	-	60,4	-	954	893
Ethanol	Alkohol	Sladké	5,2	-	3,2	-	984	932
Propylacetát	Ester	Ovocné	5,79	-	0,9	-	997	976
Diacetyl	Keton	Máslové	5,83	14,7	-	9,9	998	986
Isobutylacetát	Ester	Ovocné	6,8	-	0,6	-	1027	1018
Pentan-2,3-dion	Keton	Máslové	8,3	4,6	-	5,2	1074	1071
Isoamylacetát	Ester	Banán	10,44	-	10,2	-	1133	1168
Heptan-2-on	Keton	Mýdlové	12,96	10,3	1,5	13,1	1198	1185
3-methyl-3-buten-1-ol acetát	Ester	Ovocné	13,55	-	0,3	-	1211	-
3-methyl-2-butenal	Aldehyd	Ovocné	13,74	-	-	1,1	1216	1236
3-methylbutanol	Alkohol	Alkoholové	14,5	-	12,5	-	1234	1215
Acetoin	Keton	Máslové	17,61	38,2	1,3	24,2	1303	1289
Pentan-3-ol	Alkohol	-	20,02	-	-	4,2	1363	1112
2-hydroxy-3-pentanon	Keton	Zemitá	20,75	2,2	-	-	1380	1396
Isopropanol	Alkohol	Květinové	20,74	-	0,2	-	1380	-
Nonan-2-on	Keton	Vařené mléko	21,85	3,5	0,9	5,5	1406	1394
2-ethylhexanol	Alkohol	Růže	26,43	1,0	-	-	1512	1518
Octová kyselina	Kyselina	Kyselé	26,52	2,2	1,0	-	1514	1446
Nonan-2-ol	Alkohol	Okurkové	27,87	-	0,2	-	1540	1528
Linalool	Terpen	Květinové	29,27	-	0,5	-	1566	1543
Máselná kyselina	Kyselina	Žluklé	37,65	3,2	0,6	3,3	1687	1623
Isovalerová kyselina	Kyselina	Sladké	39,74	9,2	1,1	19,6	1719	1666

Tabulka 15 Těkavé aromatické látky identifikované ve vzorcích jogurtů – pokračování

Sloučenina	Skupina	Popis aroma [68]	T_R (min)	Bulharský kupovaný (rel. %)	Bulharský tradiční (rel. %)	Klasický (rel. %)	RI	RI_{ref} [69; 70]
2-tridekanon	Keton	Sýrové	43,68	-	-	1,0	1786	1808
2-fenylethylester kyseliny octové	Ester	-	43,94	-	1,9	-	1790	1812
Geraniol	Terpen	Růže	45,28	0,6	-	1,6	1816	1839
Hexanová kyselina	Kyselina	Tučné	46,37	6,7	1,5	6,9	1840	1843
2-fenylethanol	Alkohol	Růže	47,03	-	0,5	-	1853	1856
2-methoxy-4-methylfenol	Alkohol	-	48,12	-	-	0,8	1877	1933
Oktanová kyselina	Kyselina	Sýr, pot	51,79	3,8	0,7	3,7	1964	2057

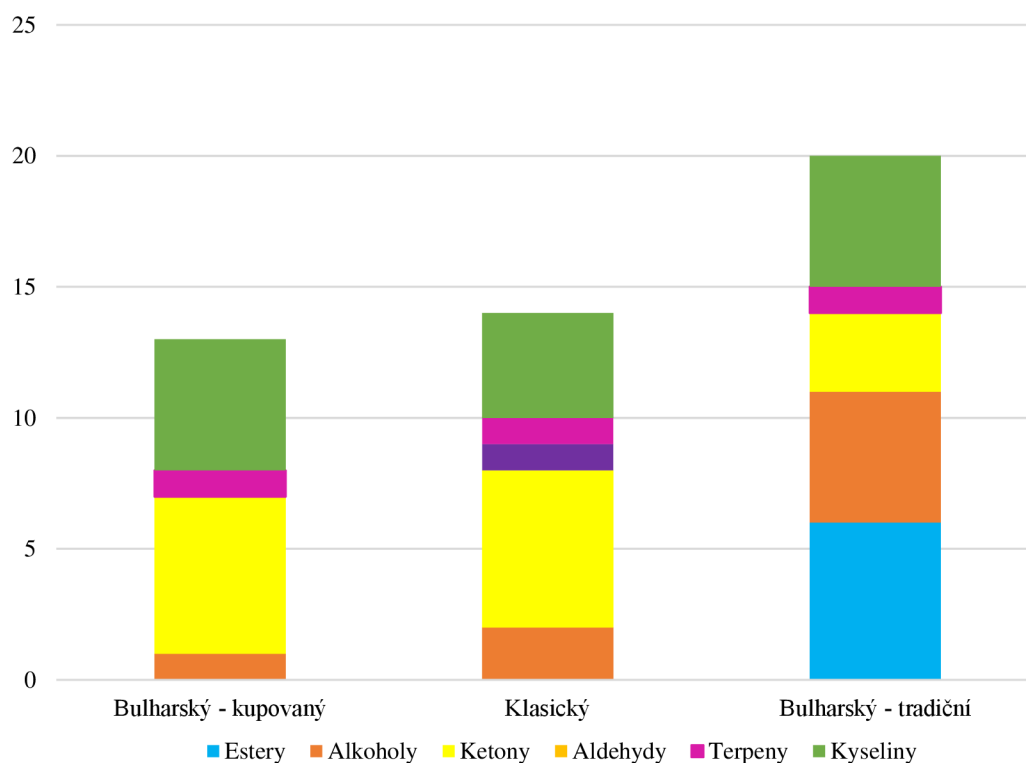
T_R – retenční čas, RI – retenční index, RI_{ref} – retenční index podle literatury

4.1.1 Porovnání počtu identifikovaných látek v jogurtech

Počet identifikovaných látek dle chemických skupin je porovnán v Grafu 1 a v Grafu 2 je porovnáno jejich procentuální zastoupení.

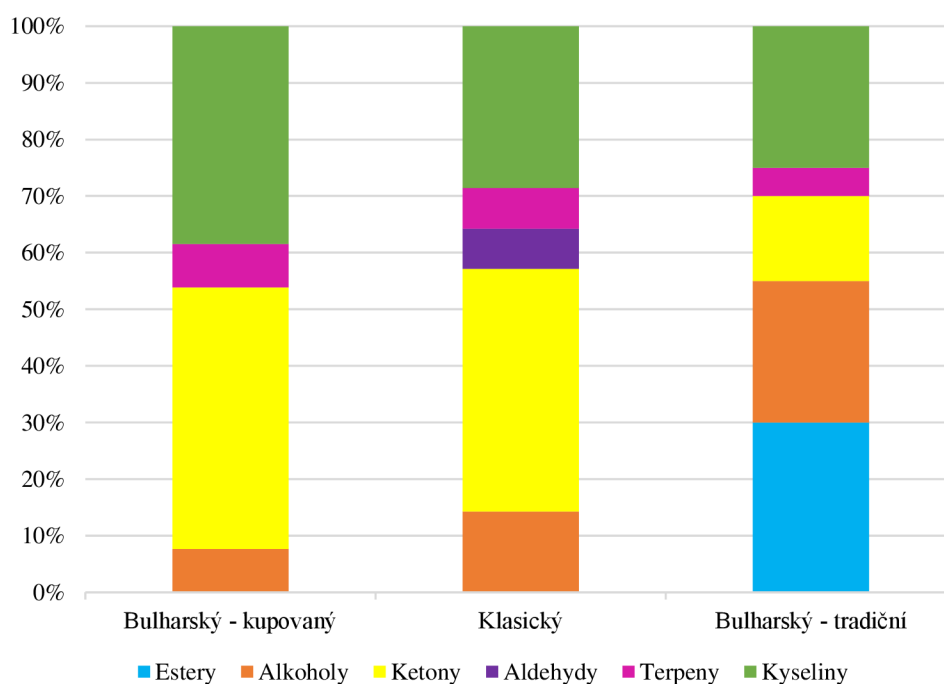
Jak je patrné, v bulharském tradičním (BT) jogurtu bylo identifikováno nejvíce aromatických sloučenin a to 20, v klasickém jogurtu (KL) bylo identifikováno pouze 14 látek a v jogurtu bulharském z koupené kultury (BK) pouze 13. Ve všech vzorcích se vyskytovalo 7 ze všech identifikovaných sloučenin, heptan-2-on, acetoin, nonan-2-on, kyselina máselná, isovalerová, hexanová a oktanová. Obecně můžeme říci, že jogurt BK a TR jsou si počtem a složením aromatických látek podobné, zatímco jogurt BT se výrazně liší. To je hlavně způsobeno obsahem esterů, které byly identifikované pouze v jogurtu BT. Ovšem kyselinové složení bylo velmi podobné mezi všemi jogurty, u jogurtu TR a BK se navíc oproti jogurtu BT vyskytovala pouze kyselina octová. Stejně tak se vzorky podobaly obsahem terpenů, kdy každý vzorek obsahoval 1 terpen (konkrétně linalool). Jediným detekovaným aldehydem byl 3-methyl-2-butenal, a to pouze u jogurtu TR. Pro jogurtovou chuť typický acetaldehyd (viz kap. 2.5) nebyl detekován v žádném vzorku. Vybrané parametry použité metody byly sice optimalizovány, nicméně další experimenty budou zaměřeny na úpravu a příp. zlepšení citlivosti použité metody, tak aby bylo možné detekovat i další látky, přítomné v nižších koncentracích.

V porovnání se studií Papaioannou a kol. [31], kteří také identifikovali v jogurtech pouze jeden aldehyd, kterým ovšem byl pro jogurty typický acetaldehyd. Naopak identifikovali pouze 3 kyseliny, a to hexanovou, octovou a máselnou. Ve studii Liu a kol. [28] navíc identifikovali 5 sloučenin síry, které se u námi analyzovaných vzorků jogurtů nevyskytovaly. Těkavé sloučeniny síry mají obecně nízký práh detekce a mohou hrát důležitou roli v aroma mléčných výrobků, kde vznikají ze sirných aminokyselin; např. dimethylsulfid byl popsán jako klíčová sloučenina aroma jogurtu.



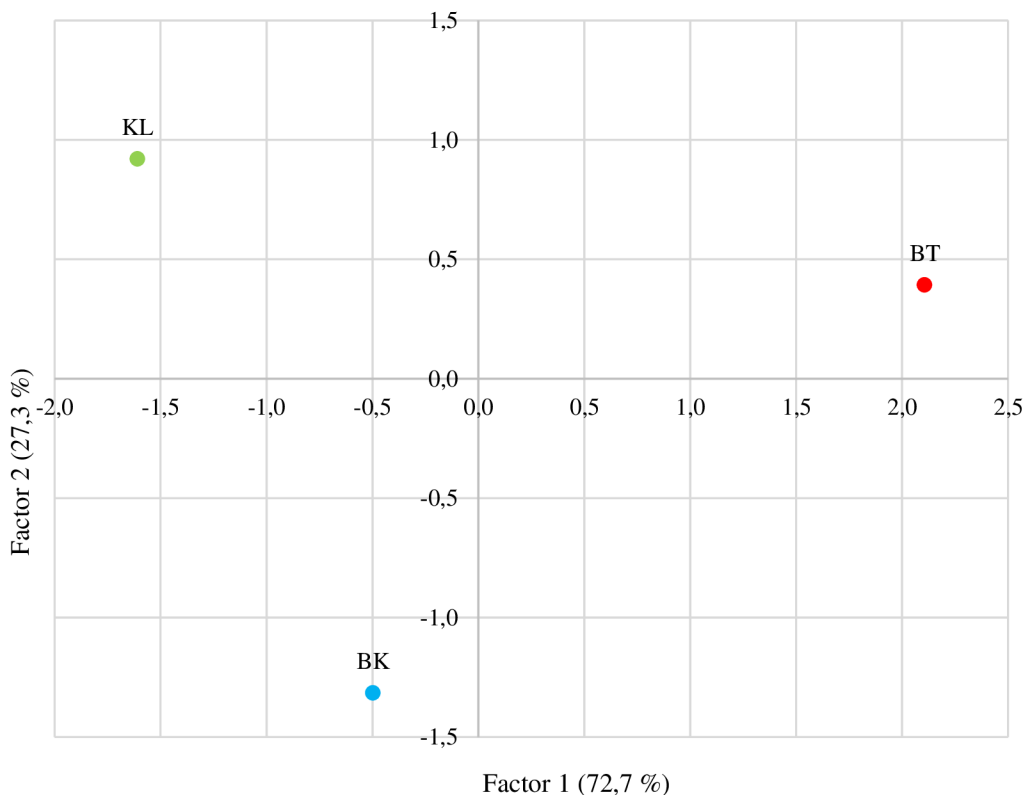
Graf 1 Porovnání počtu těkavých látek v jogurtech

V Grafu 2 pozorujeme, že jogurt BT se zastoupením esterů velmi liší od ostatních jogurtů. Estery tvořily 30 % identifikovaných látek, a alkoholy až 25 %. Naopak jogurty BK a TR obsahovaly mnohem více ketonů než BT, u BK tvořily přes 40 % identifikovaných látek a u jogurtu TR přes 30 %.

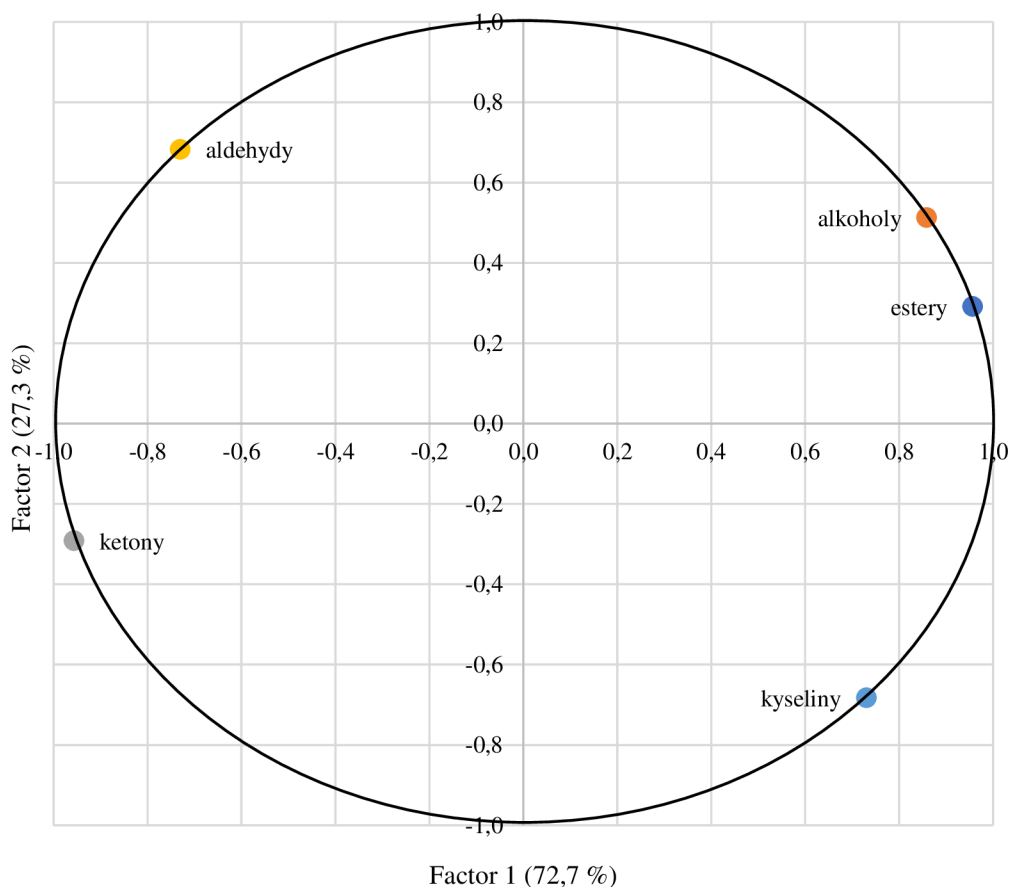


Graf 2 Procentuální zastoupení počtu těkavých látek v jogurtech

Výsledky stanovení počtu identifikovaných těkavých látek byly zpracovány pomocí analýzy hlavních komponent, mimo skupinu terpenů, která byla pro všechny vzorky stejná. V Grafu 3 můžeme pozorovat, že vzorky jogurtů se od sebe z hlediska složení těkavých látek výrazně liší, každý je umístěn v odlišné části grafu. Jogurt KL a BK koreluje negativně s komponentou 1, kdežto jogurt BT s ní koreluje pozitivně. Podobně je jogurt KL a BT vykreslen v oblasti pozitivní komponenty 2 a jogurt BK v negativní oblasti komponenty 2. Pokud porovnáme Grafy 3 a 4, jogurt BT obsahuje nejvíce alkoholů a esterů a není příliš bohatý na ketony. Opakem toho je jogurt BK. Jogurt KL je bohatý na aldehydy a neobsahuje příliš mnoho kyselin.



Graf 3 Projekce případů (vzorky jogurtů) do faktorové roviny 1 a 2



Graf 4 Projekce proměnných (skupiny těkavých látek) do faktorové roviny 1 a 2

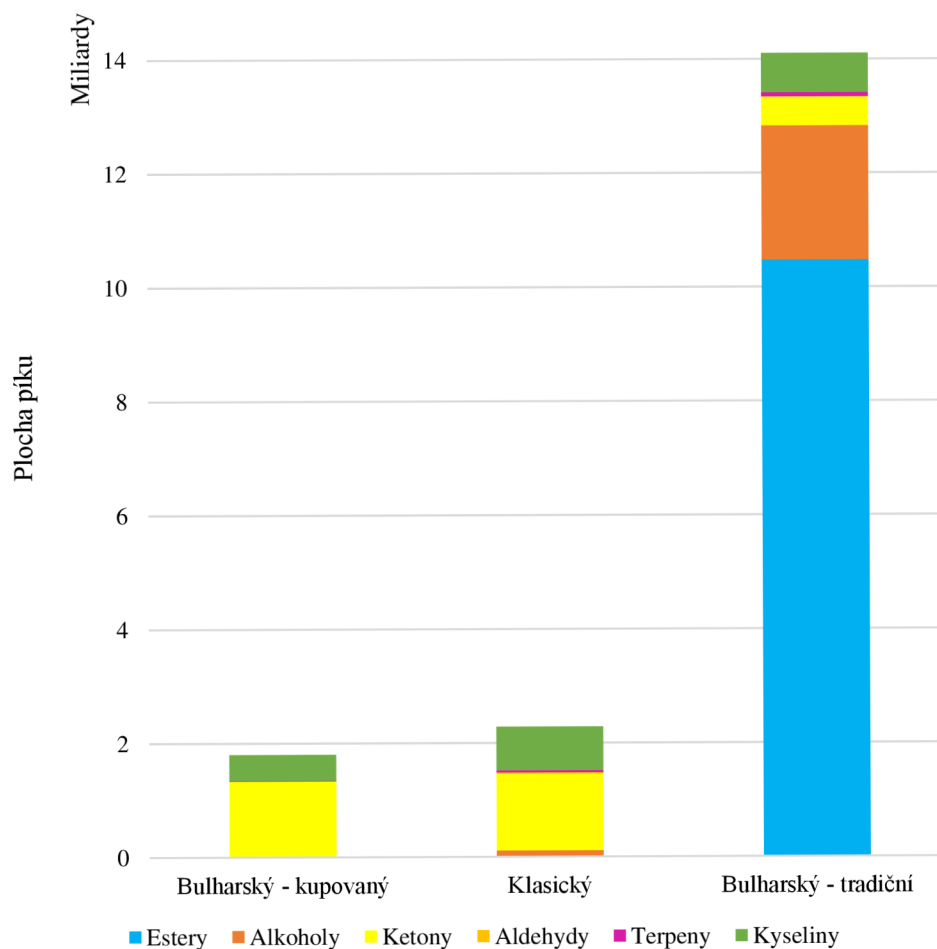
4.1.2 Porovnání obsahu identifikovaných látek v jogurtech

Obsah těkavých látek je vyjádřen porovnáním ploch píků jednotlivých látek. Graf 5 zobrazuje porovnání obsahu těkavých látek v jednotlivých vzorcích jogurtů a Graf 6 vyjadřuje „relativní obsah“, tj. % z celkové plochy všech píků na chromatogramu.

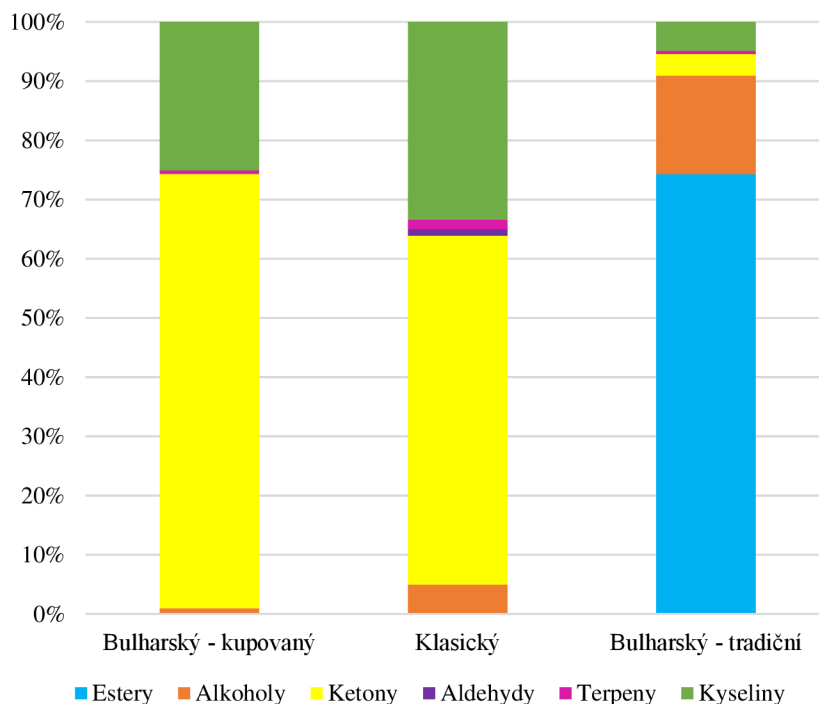
Z Grafu 5 je patrné, že jogurt BT obsahoval několikanásobně větší množství těkavých látek. Z celkového obsahu tvořily více než 70 % estery, a to zejména ethylacetát, který sám o sobě tvořil přes 60 %. Zajímavé je, že v ostatních jogurtech tato sloučenina vůbec nebyla detekována.

Z ostatních sloučenin pouze isoamylacetát a 3-methylbutanol měly relativní obsah větší než 10 %, zbytek látek se pohyboval pod 4 %. Jak již bylo zmíněno, jogurty BK a KL byly svým složením podobné, nejvíce obsahovaly ketony (více než 50 %) a kyseliny, kdy u obou jogurtů měl největší obsah acetoin. U jogurtu BK měl poté největší obsah diacetyl a heptan-2-on, u jogurtu TR to byly kyselina isovalerová, heptan-2-on a diacetyl. Papaioannou a kol. [31] zaznamenali ve své studii také zvýšený obsah acetoinu. Acetoin, diacetyl a heptan-2-on identifikovali ve své studii také Liu a kol. [28] stejně jako pentan-2,3-dion a nonan-2-on. Mimo tyto ketony identifikovali navíc aceton a pentan-2-on. Erkaya a kol. [30] identifikovali ve své studii diacetyl i acetoin, mimo to ve všech vzorcích také identifikovali hexanal. Ethylacetát, který se ve velkém množství vyskytoval ve vzorku jogurtu BT, identifikovali ve všech vzorcích, ovšem v maximálním množství 3 %. Jako klíčové aromatické látky pro jogurt jsou nejčastěji popisovány acetaldehyd a diacetyl, ovšem k chuti jogurtu dále přispívá také 2,3-butandion,

2, 3-pentandion, dimethylsulfid a benzaldehyd. Základními aromatickými látkami, které se podílí na typické chuti bulharského jogurtu jsou acetaldehyd, aceton, 2-butanon, diacetyl, etylacetát a etanol [27; 71]. Z uvedených významných sloučenin byly v této práci identifikovány diacetyl, ethylacetát a ethanol.



Graf 5 Porovnání obsahu těkavých látek v jogurtech



Graf 6 Procentuální obsah identifikovaných těkavých látek v jogurtech

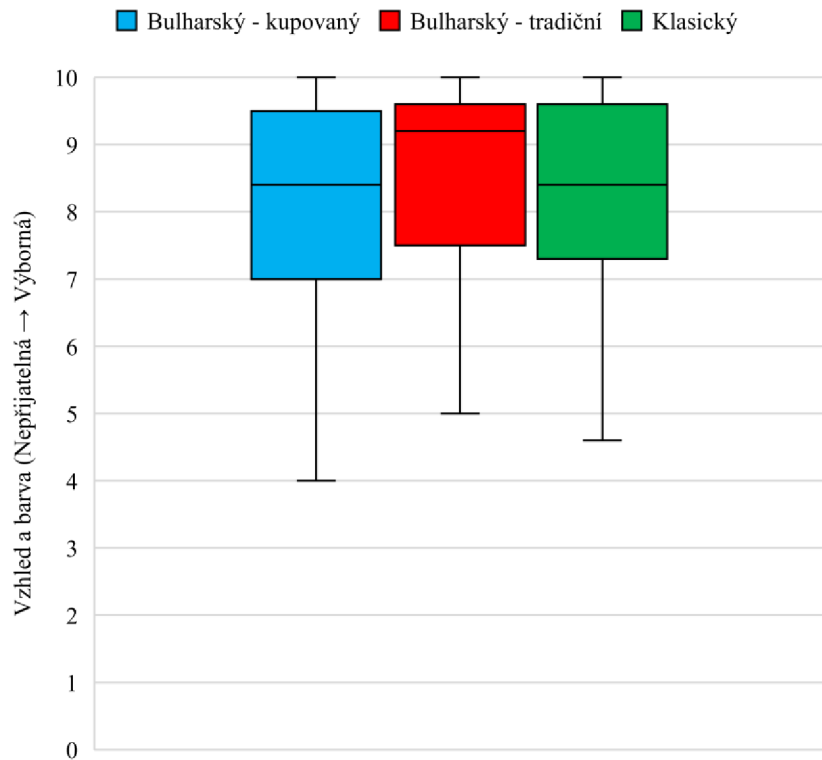
4.2 Výsledky senzoričkého hodnocení

Vyrobené jogurty byly zároveň podrobeny senzoričké analýze. Hlavním cílem bylo porovnat chuťový profil jogurtů a jejich celkovou přijatelnost. Hodnocení se zúčastnilo 25 hodnotitelů, kteří byli v dotazníku nejprve dotazováni na pohlaví, zda kouří cigarety, jaký mají vztah k jogurtům a jak často je konzumují. Celkem se hodnocení zúčastnilo 52 % mužů a 48 % žen, z toho pouze 3 hodnotitelé byli kuřáci. Co se týče vztahu k jogurtům, pouze 2 hodnotitelé uvedli, že jogurty nemají příliš rádi, ostatní hodnotitelé jogurty konzumují velmi rádi. Mezi hodnotiteli 56 % konzumuje jogurty často a 44 % je konzumuje občas.

Výsledky senzoričké analýzy jsou uvedeny ve formě boxových grafů, kde osa y vyjadřuje grafickou stupnici (10 cm).

4.2.1 Hodnocení vzhledu a barvy

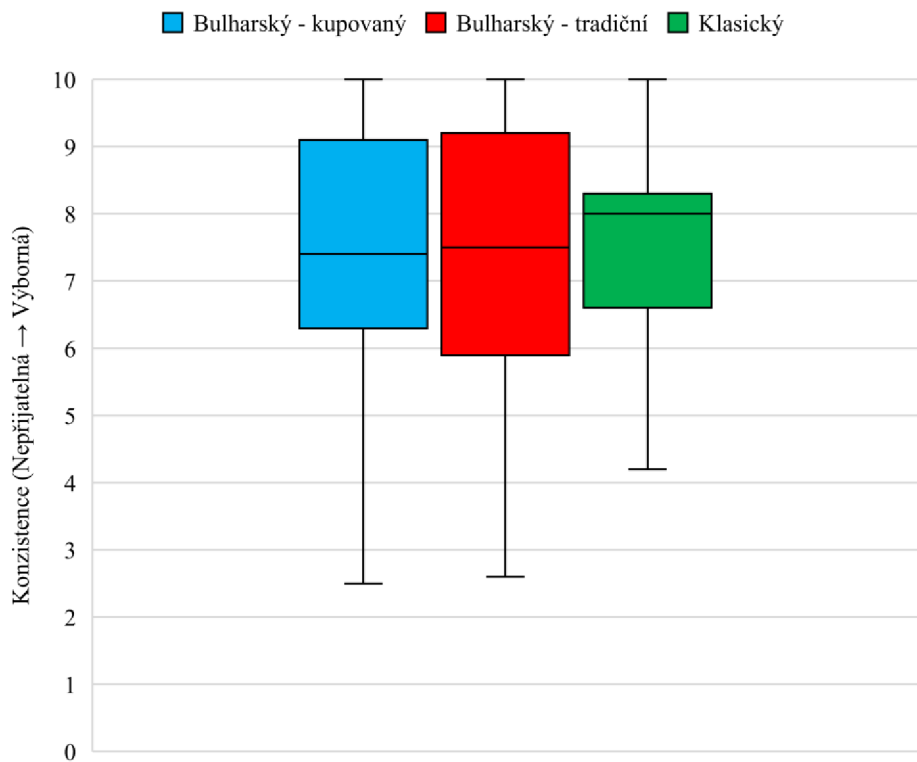
Vzhled a barva byly hodnoceny pouze z hlediska přijatelnosti od nepříjemné po výbornou. Kvalitní jogurt by měl mít příjemně smetanovou barvu a hladký, lesklý, homogenní vzhled bez bublinek, krupiček apod. Dle výsledků uvedených v Grafu 7 byly všechny jogurty hodnoceny podobně jako velmi dobré. Několik hodnotitelů v poznámkách uvedlo, že nenalezli mezi vzorky ve vzhledu a barvě žádný rozdíl. Dle mediánu měl nejlepší vzhled a barvu jogurt bulharský tradiční. Protože data neměla normální rozložení, byla ke statistickému zpracování použita neparametrická verze metody ANOVA (Kruskal-Wallis ANOVA). Na základě těchto výsledků není mezi jogurty statistický rozdíl, co se týče vzhledu a barvy.



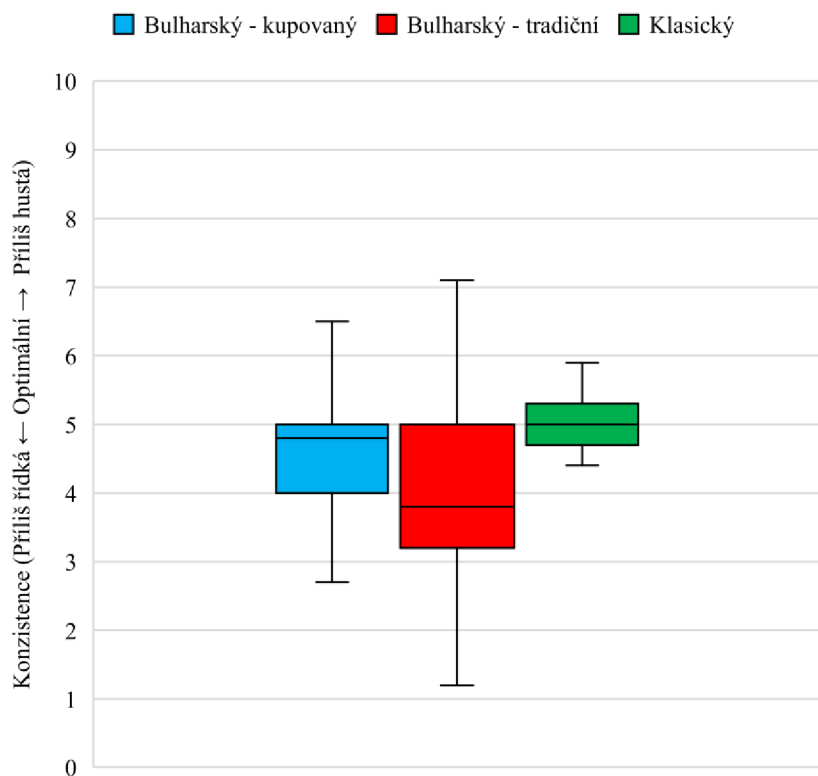
Graf 7 Výsledky hodnocení vzhledu a barvy jogurtů

4.2.2 Hodnocení konzistence

Konzistence byla opět hodnocena z hlediska přijatelnosti, a protože u jogurtů je výrazným parametrem kvality hustá konzistence, byla navíc samostatně hodnocena hustota vzorků; zvláště bulharský jogurt by se měl vyznačovat hustou, viskózní konzistencí. Z Grafu 8 je patrné, že bulharské jogurty byly hodnoceny velmi podobně a jako nejlepší se jevil jogurt klasický. Výsledky hodnocení hustoty jogurtu jsou uvedeny v Grafu 9. Cca optimální hustotu měl jogurt klasický, bulharské jogurty byly řidší, oproti očekávání bulharský tradiční jogurt měl nejřidší konzistenci. Z poměrně velkého rozptylu hodnot lze usuzovat, že preference hodnotitelů jsou velmi individuální. Data nebyla ani v jednom případě homogenní, a proto byla použita Kruskal-Wallis ANOVA. Přijatelnost se mezi vzorky statisticky nelišila, kdežto u hodnocení hustoty byly statisticky významné rozdíly mezi klasickým jogurtem a jogurtem bulharským tradičním.



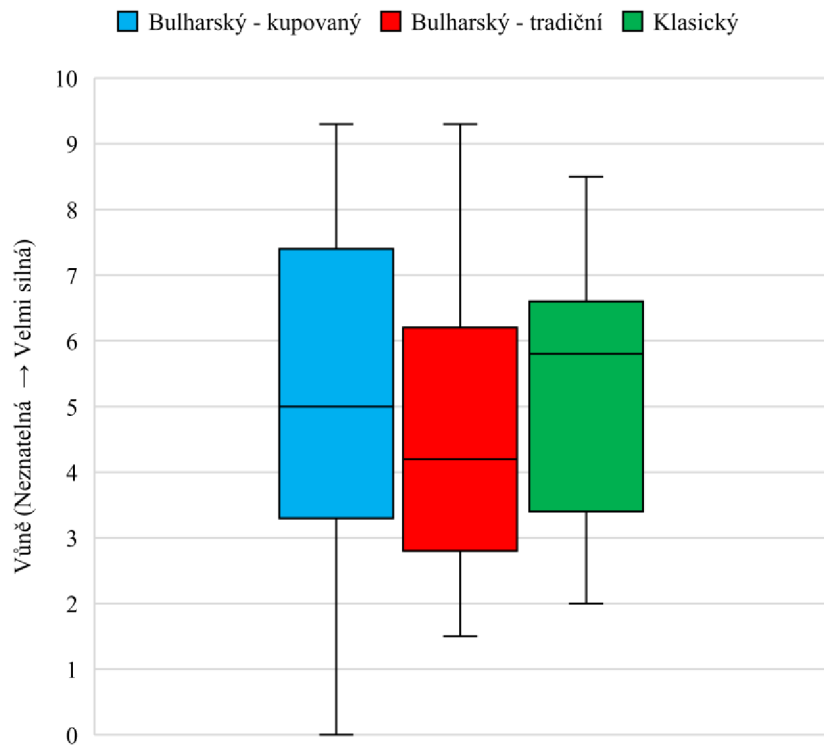
Graf 8 Výsledky hodnocení konzistence jogurtů



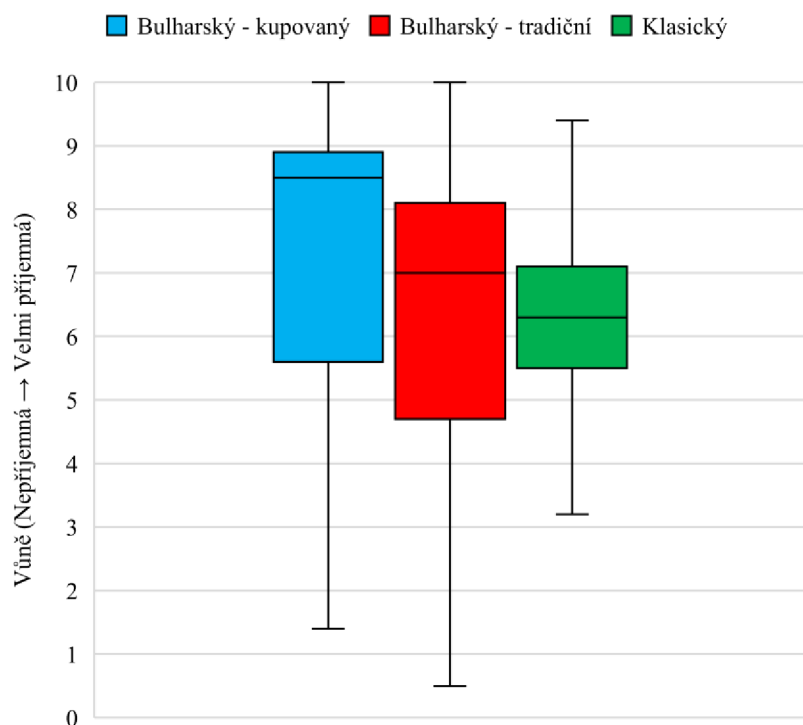
Graf 9 Výsledky hodnocení hustoty jogurtů

4.2.3 Hodnocení vůně

Vůně jogurtů byla hodnocena opět z hlediska příjemnost, ale také intenzity (neznatelná → velmi silná). Jogurt klasický měl dle hodnocení nejintenzivnější vůni, jogurt bulharský tradiční měl vůni překvapivě nejméně intenzivní. Nepříjemnější vůni měl pak jogurt bulharský kupovaný, a nejméně příjemnou jogurt klasický. Z těchto výsledků můžeme usoudit, že čím výraznější byla vůně, tím byla méně příjemná. Ze statistického hlediska ovšem nejsou mezi vzorky významné rozdíly.



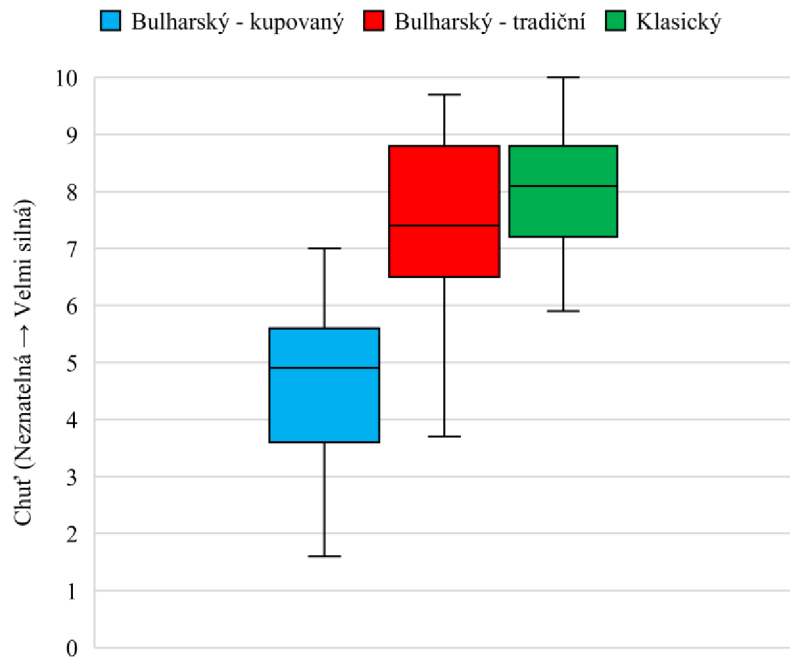
Graf 10 Výsledky hodnocení intenzity vůně jogurtů



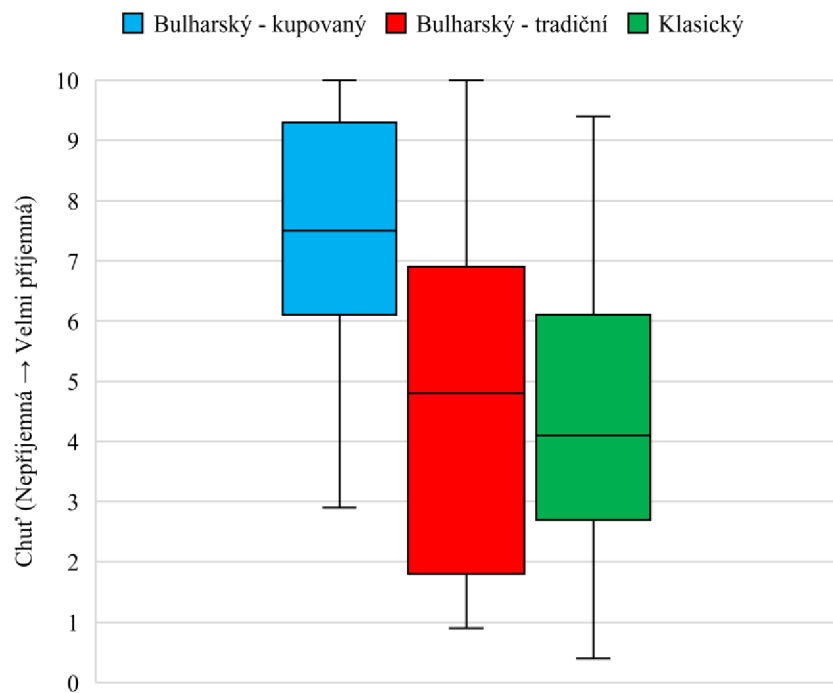
Graf 11 Výsledky hodnocení příjemnosti vůně jogurtů

4.2.4 Hodnocení chuti

Chuť byla hodnocena stejně jako vůně z hlediska intenzity a příjemnosti. Klasický jogurt měl dle hodnotitelů nejvýraznější chuť, a naopak nejméně příjemnou. Stejného jevu si můžeme všimnout u jogurtu bulharského koupového, kde intenzita chuti byla mezi vzorky nejnižší a příjemnost nejvyšší. Odlišnost chuti jogurtu bulharského kupovaného potvrzuje i analýza rozptylu, kde byly nalezeny statisticky významné rozdíly v chuti mezi vzorkem BK a mezi ostatními vzorky.



Graf 12 Výsledky hodnocení intenzity chuti jogurtů

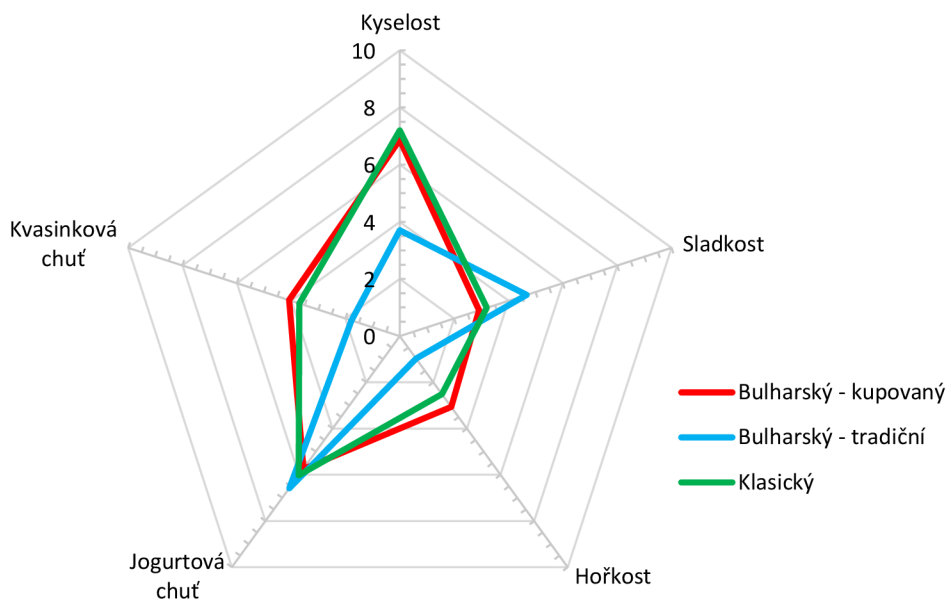


Graf 13 Výsledky hodnocení příjemnosti chuti jogurtů

4.2.5 Profilový test vybraných chutí

Pro komplexní vyhodnocení chuti jogurtů byl použit profilový test, kde byly hodnoceny vybrané deskriptory (sladkost, hořkost, kyselost, jogurtová a kvasinková chuť). Jedná se o chutě, které ovlivňují sensorickou kvalitu jogurtu (sladkost, hořkost, kyselost) a o chutě předpokládané. Pro všechny deskriptory byla použita nestrukturovaná grafická stupnice od neznatelné po velmi silnou intenzitu dané chuti. Výsledky jsou uvedeny v Grafu 14.

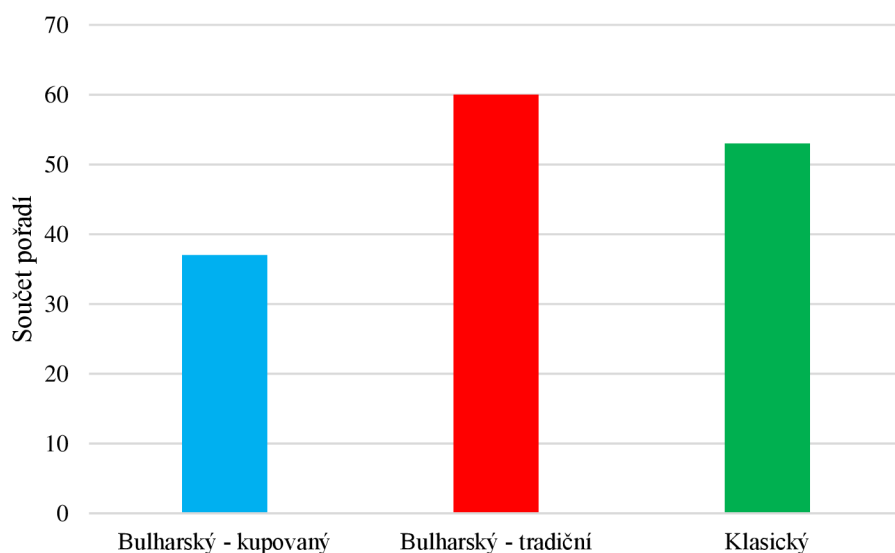
Z celkového pohledu byly vzorky KL a BT hodnoceny velmi podobně ve všech parametrech. Jogurt BK se výrazně odlišoval, byl mnohem sladší a méně kyselý a vykazoval nejvýraznější jogurtovou chuť. Díky tomu byl tento jogurt hodnocen jako celkově nejlepší z hlediska chuti (viz předchozí kapitola). Kvasinkovou chuť střední intenzity hodnotitelé identifikovali v jogurtu BT a KL, stejně tomu tak bylo u hořkosti, která mohla s kvasinkovou chutí souviset. Jak ve své studii udává Nikolova a kol. [72] bulharský jogurt má hladký a lesklý povrch, husté koagulum, homogenní konzistenci a příjemně mléčně nakyslou chuť, která se během skladování zvyšuje. O kvasinkové chuti se studie zabývající se bulharským jogurtem nezmiňují.



Graf 14 Výsledky profilového testu

4.2.6 Pořadový test

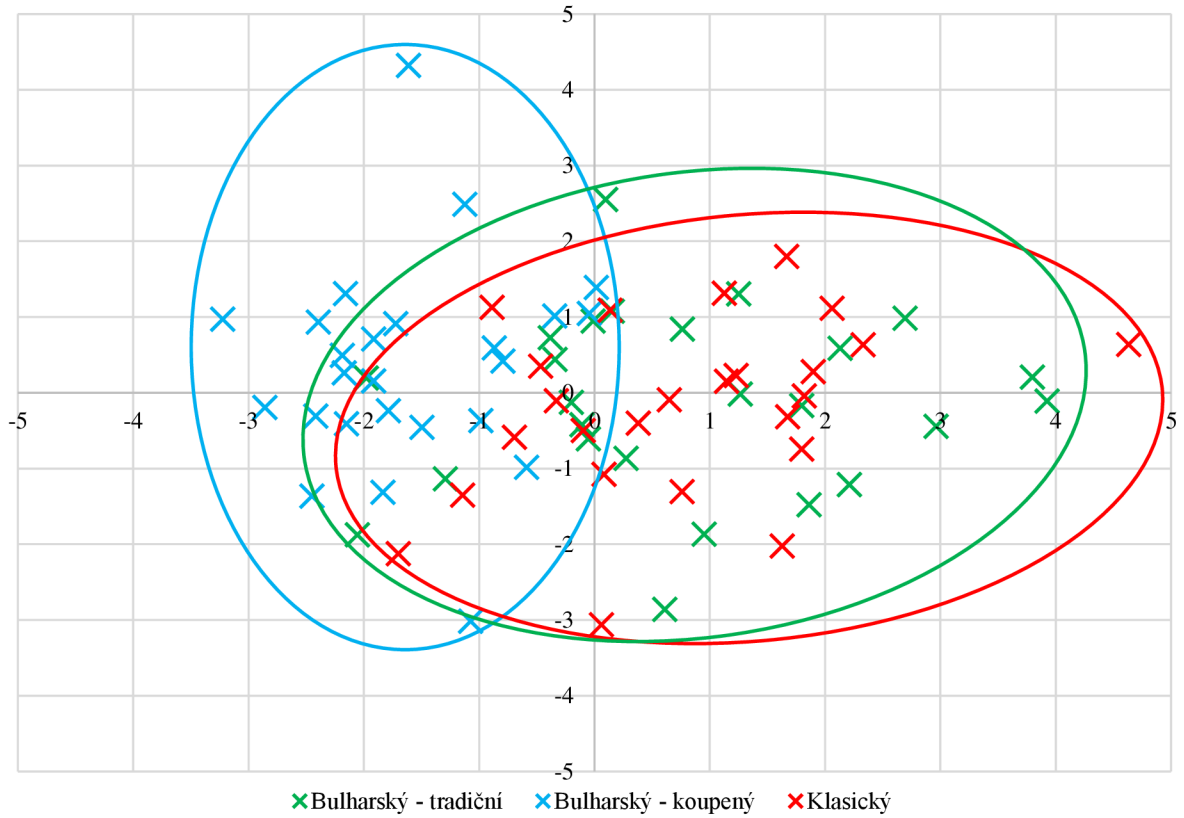
Celkovou přijatelnost vzorků jogurtů měli hodnotitelé možnost porovnat v rámci pořadového testu. Nejlépe byl mezi vzorky hodnocen jogurt bulharský kupovaný, poté následoval jogurt tradiční a jogurt bulharský tradiční byl hodnocen nejhůře. Tyto výsledky odpovídají předpokladům, které vyplývají z hodnocení chuti a z profilového testu. Obecně hodnotitelé upřednostňovali jogurty sladší, ne tak kyselé.



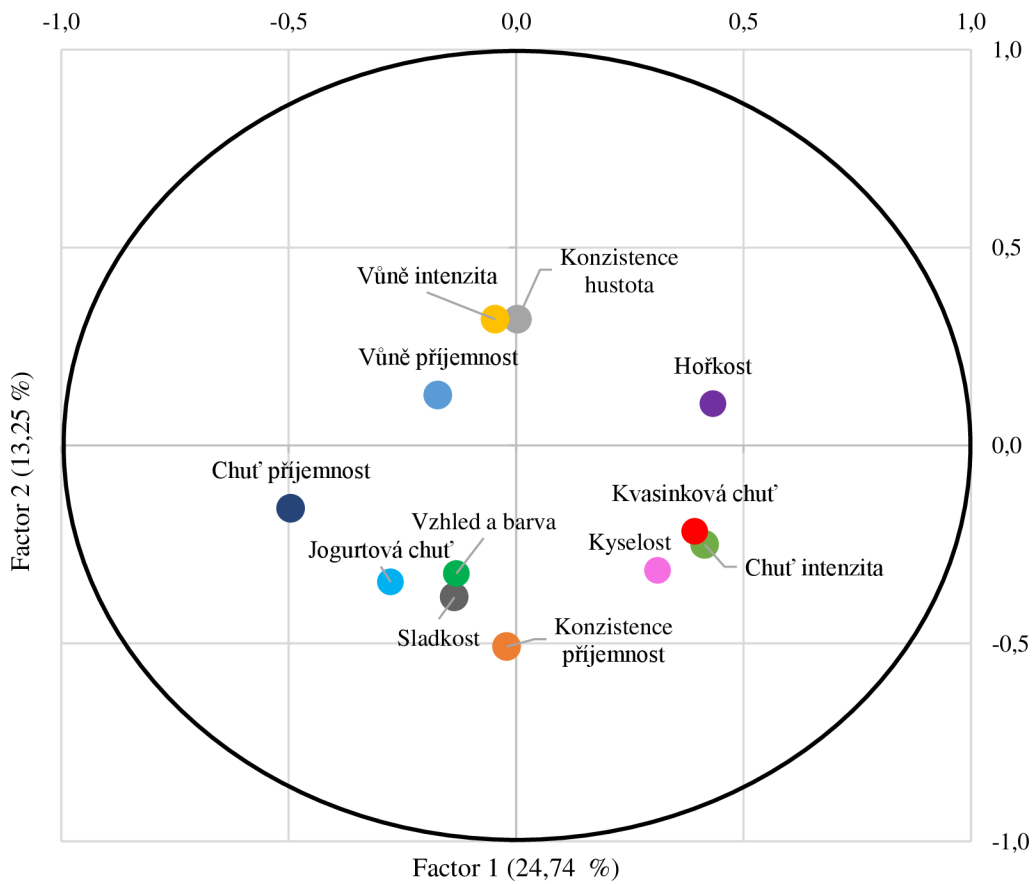
Graf 15 Výsledky pořadového testu

4.2.7 Analýza hlavních komponent

Také výsledky sensorického hodnocení byly na závěr zpracovány pomocí metody PCA. Z grafů je patrné, že vzorek jogurtu BK tvoří shluk v negativní oblasti komponenty 1. Z porovnání obou grafů vyplývá, že tento jogurt měl příjemnou chuť i vůni a byl mnohem sladší než ostatní jogurty. Zároveň tento shluk leží jak v pozitivní, tak v negativní oblasti komponenty 2. Vzorky BT a KL byly oba podobně projektovány z velké části do pozitivní oblasti komponenty 1, s tím souvisí i detekovaná kvasinková chuť a s ní hořkost. Tyto jogurty měly také intenzivnější celkový dojem chuti a kyselost.



Graf 16 Projekce případů (vzorky jogurtů) do faktorové roviny 1 a 2



Graf 17 Projekce proměnných (senzorní vlastnosti) do faktorové roviny 1 a 2

4.2.8 Korelační analýza

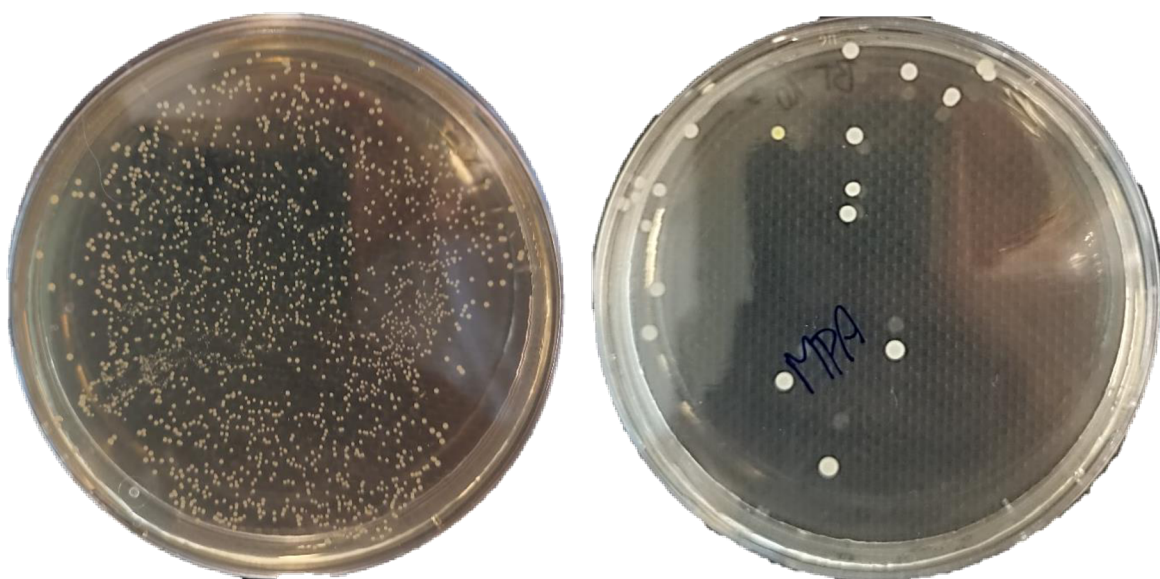
Byla provedena korelační analýza sensoricky hodnocených vlastností jogurtů. Hořkost a kvasinková chuť mají korelační koeficient 0,68, což značí silnou korelaci – čím větší je kvasinková chuť, tím více je jogurt hořký. Hořkost dále negativně korelovala s příjemností chutě jogurtu (korelační koeficient je -0,51). Se zvyšováním hořké chuti bude tedy jogurt méně chuťově příjemný. S tím souvisí také korelace intenzita vs. příjemnost chutě, zvyšování intenzity negativně ovlivňuje příjemnost chutě jogurtu (korelační koeficient -0,54). Kyselost pak silně pozitivně ovlivňovala intenzitu chuti a negativně slabě ovlivňovala její příjemnost, s korelačním koeficientem -0,37.

4.3 Výsledky stanovení mikrobiálního profilu

Hlavním cílem práce bylo pokusit se stanovit základní mikrobiální profil vzorků, tj. prokázat přítomnost bakterií a kvasinek. Zatímco jogurty vyrobené z čistých mlékařských kultur (KL a BK) by měly obsahovat pouze bakterie *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus bulgaricus*, u tradičního bulharského jogurtu (BT) lze předpokládat mnohem pestřejší zastoupení mikroorganismů, možná i přítomnost kvasinek. Od toho se potom mohou odvíjet výše zjištěné odlišnosti v sensorické kvalitě a profilu těkavých látek jednotlivých vzorků.

4.3.1 Kultivace na tuhých médiích

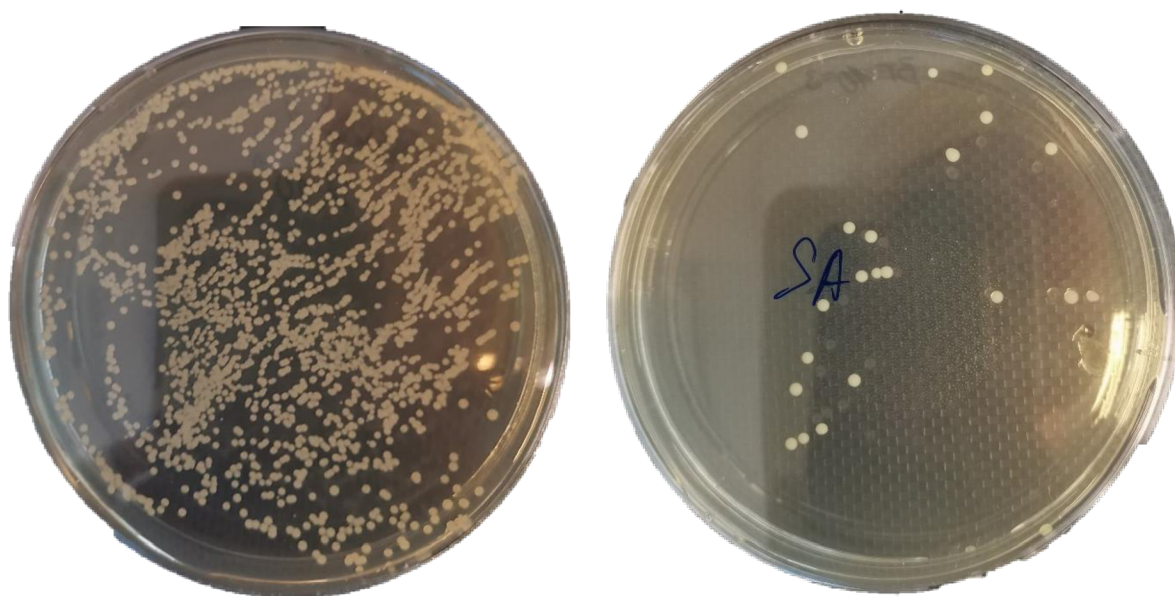
Bakterie a kvasinky byly kultivovány na agarových médiích MPA, MRS a SA. Petriho misky s MPA a MRS médiem byly kultivovány při 37 °C a s SA médiem při 25 °C po dobu dvou dnů. U jogurtu BT došlo k nárůstu buněk při ředění 10^{-1} a 10^{-3} na všech typech médií; médium SA je specifické pro kvasinky, potvrzení kvasinkové DNA bylo provedeno pomocí PCR v reálném čase. U jogurtu BK došlo k nárůstu menšího množství buněk při ředění 10^{-1} a 10^{-3} na médiu MPA. Stejně tak u jogurtu KL došlo k malému nárůstu buněk na médiu MPA, ovšem pouze při ředění 10^{-1} , u ředění 10^{-5} došlo na jedné plotně k náhodnému nárůstu velké kolonie, a tak byla považována za kontaminaci, ovšem i tak byla použita pro PCR analýzu.



Obrázek 7 Růst kolonií buněk jogurtu BT při ředění 10^{-1} (vlevo) a 10^{-3} (vpravo) na MPA médiu



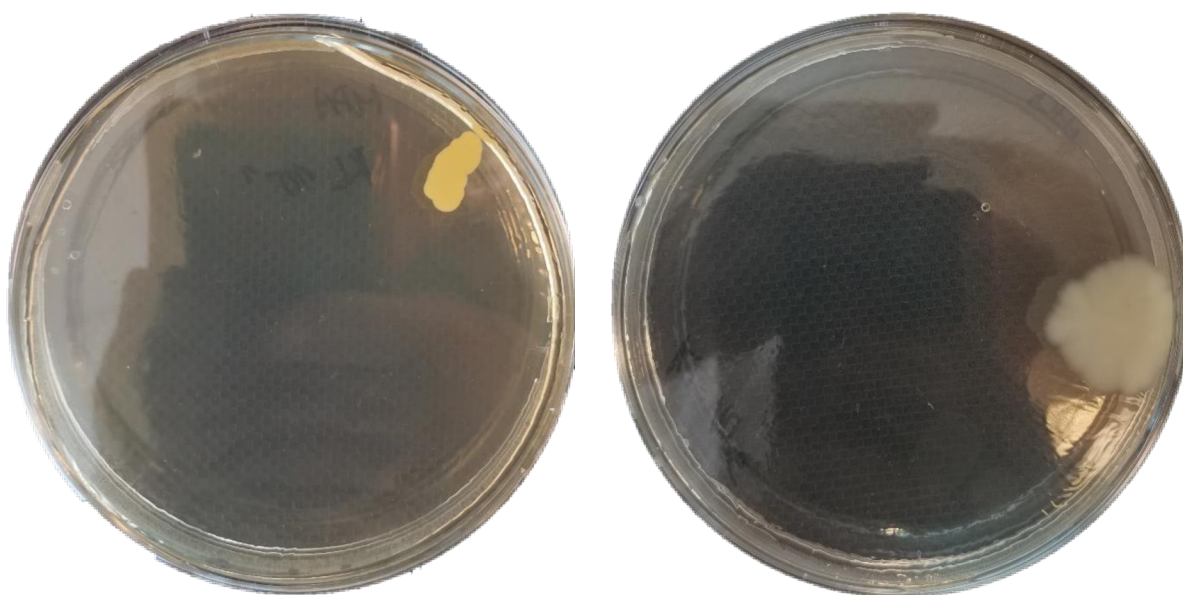
Obrázek 8 Růst kolonií buněk jogurtu BT při ředění 10^{-3} na MRS mediu



Obrázek 9 Růst kolonií buněk jogurtu BT při ředění 10^{-1} (vlevo) a 10^{-3} (vpravo) na mediu SA



Obrázek 10 Růst kolonií buněk jogurtu BK při ředění 10^{-1} (vlevo) a 10^{-3} (vpravo) na MPA mediu



Obrázek 11 Růst kolonií buněk jogurtu KL při ředění 10^{-1} (vlevo) a 10^{-5} (vpravo) na mediu MPA

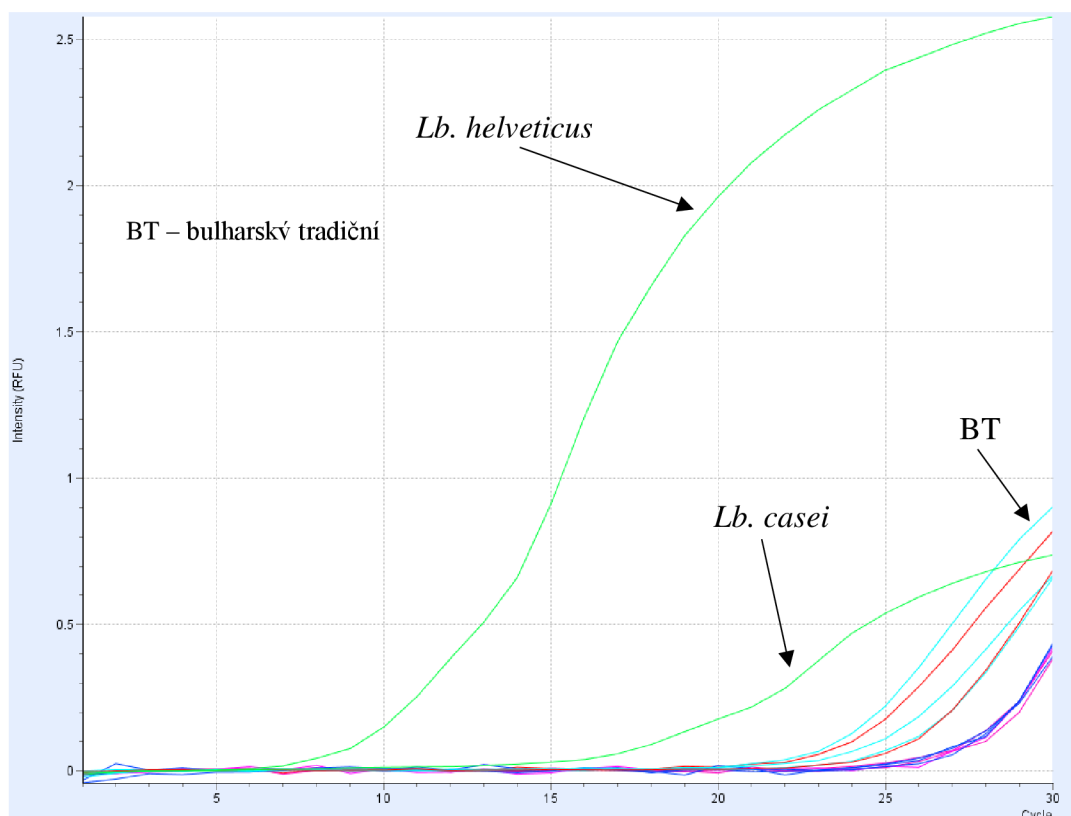
4.3.2 Izolace DNA

Z jogurtů byly nejprve připraveny lyzáty dle kap. 3.3.5.2. ve dvou opakováních. Následně byla DNA izolována fenolovou extrakcí dle kap. 3.3.5.3 a přesrážena ethanolom. Koncentrace DNA byla změřena spektrofotometricky na přístroji NanoDrop 2000. Takto izolovaná DNA měla koncentraci 1000 až 5000 ng/ μ l a poměr $A_{260/280}$ indikoval mírné znečištění proteiny nebo jinými látkami. Oproti tomu DNA izolovaná pomocí komerčního kitu měla koncentraci v rozsahu 2 až 10 ng/ μ l. Je možné, že pro získání větší koncentrace by bylo zapotřebí použít větší množství jogurtu. Také, je možné, že tento kit i přesto že je výrobcem doporučován k izolaci DNA

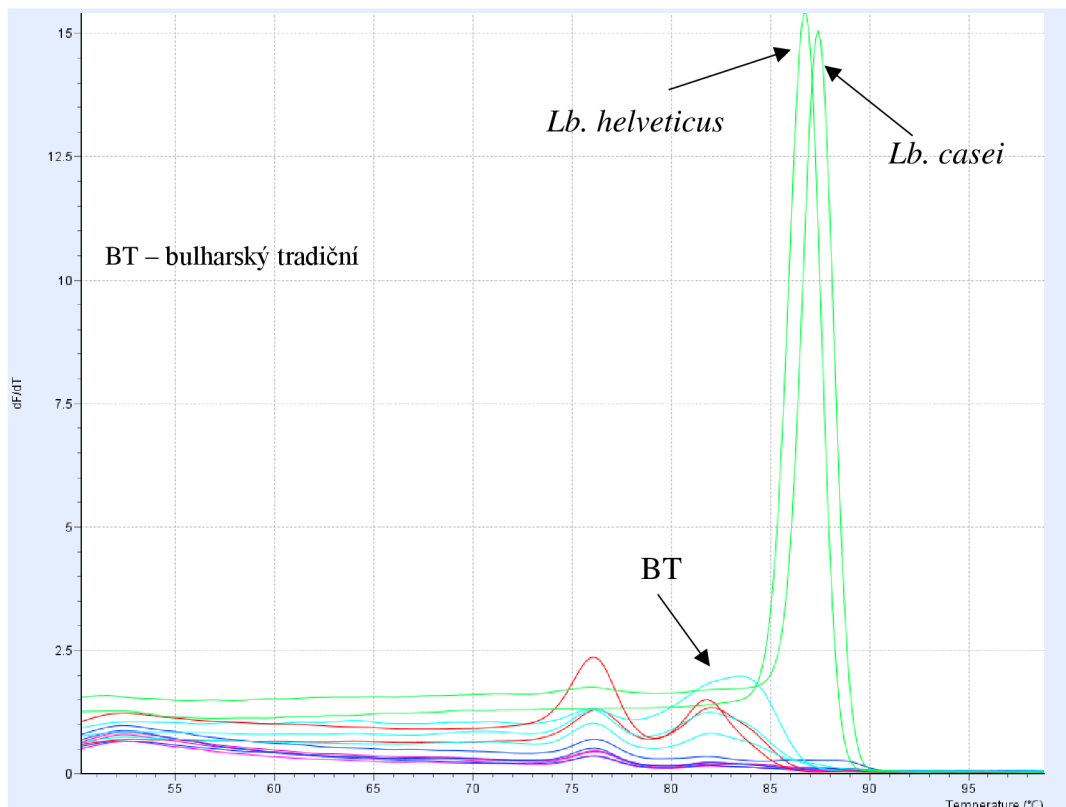
z potravin, není pro jogurty vhodný, protože v pozitivně testovaných vzorcích tohoto kitu se nevyskytuje žádný mléčný výrobek.

4.3.3 Průkaz přítomnosti DNA domény *Bacteria* metodou PCR v reálném čase

Pro prokázání přítomnosti bakteriální DNA byla nejprve použita DNA vyizolovaná přímo z jogurtů pomocí fenolové extrakce dle kap. 3.3.5.3, která byla naředěna na 10 ng/μl. Byly připraveny směsi pro PCR a byla provedena RT-PCR dle postupu 3.3.5.7. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA kmene *Lactobacillus casei* CCM 4798 a *Lactobacillus helveticus* CCDM 456/02. Výsledky jsou vyjádřeny ve formě amplifikační křivky a křivky tání. Jak je na Obrázek 12 patrné, DNA *Lb. helveticus* CCDM 456/02 se začala amplifikovat po 7 cyklu a *Lb. casei* CCM 4798 po 15 cyklu. Vzorek jogurtu BT (světle modrá barva) se začal amplifikovat po 22 cyklu. Z analýzy křivek tání (Obrázek 13) je patrné, že výsledky pro vzorky jogurtu KL a BK jsou negativní, tedy že neobsahují bakteriální DNA, u jogurtu BT můžeme pozorovat křivku s bodem tání kolem 83 °C, takže tyto vzorky patrně obsahovaly bakteriální DNA. Celkově tyto výsledky nebyly průkazné pro potvrzení výskytu bakteriální DNA ve vzorcích jogurtu, je možné že reakce byla inhibována některými sloučeninami použitými při izolaci DNA, jako je ethanol nebo fenol.

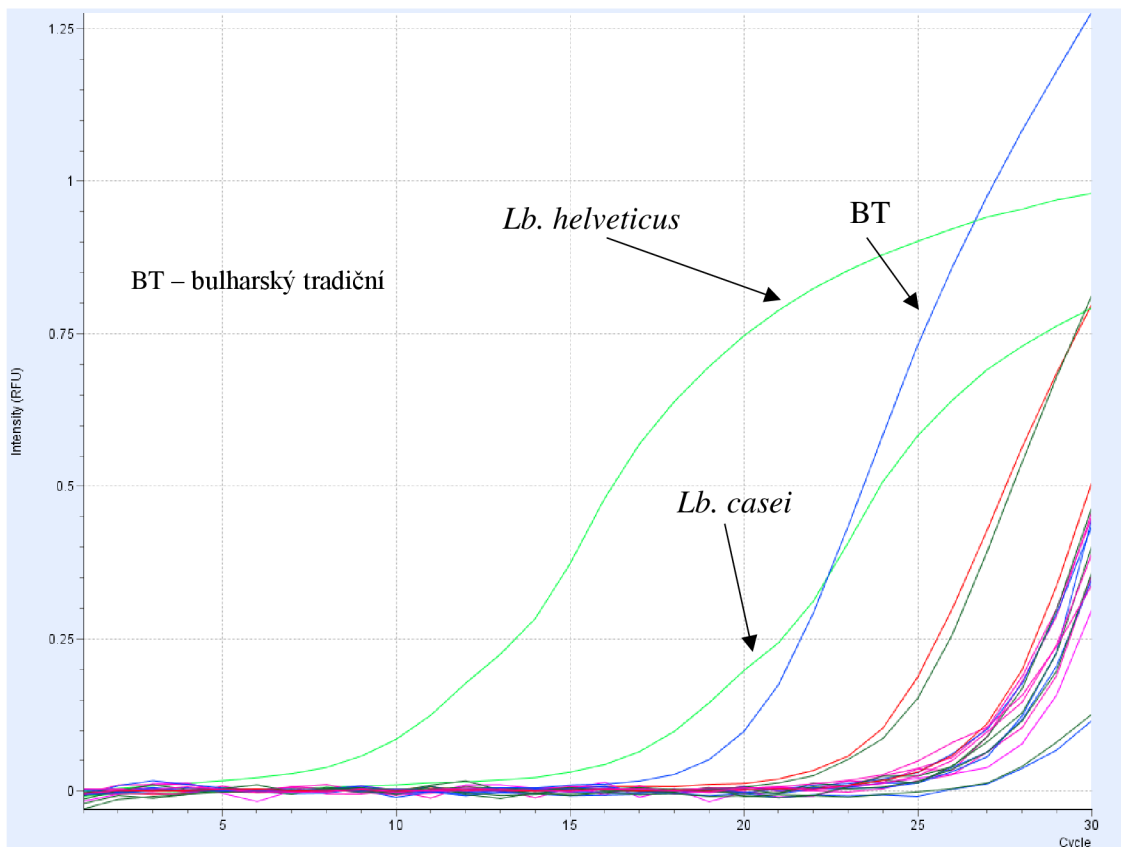


Obrázek 12 Amplifikační křivky pro doménu *Bacteria* s použitím DNA izolované fenolovou extrakcí

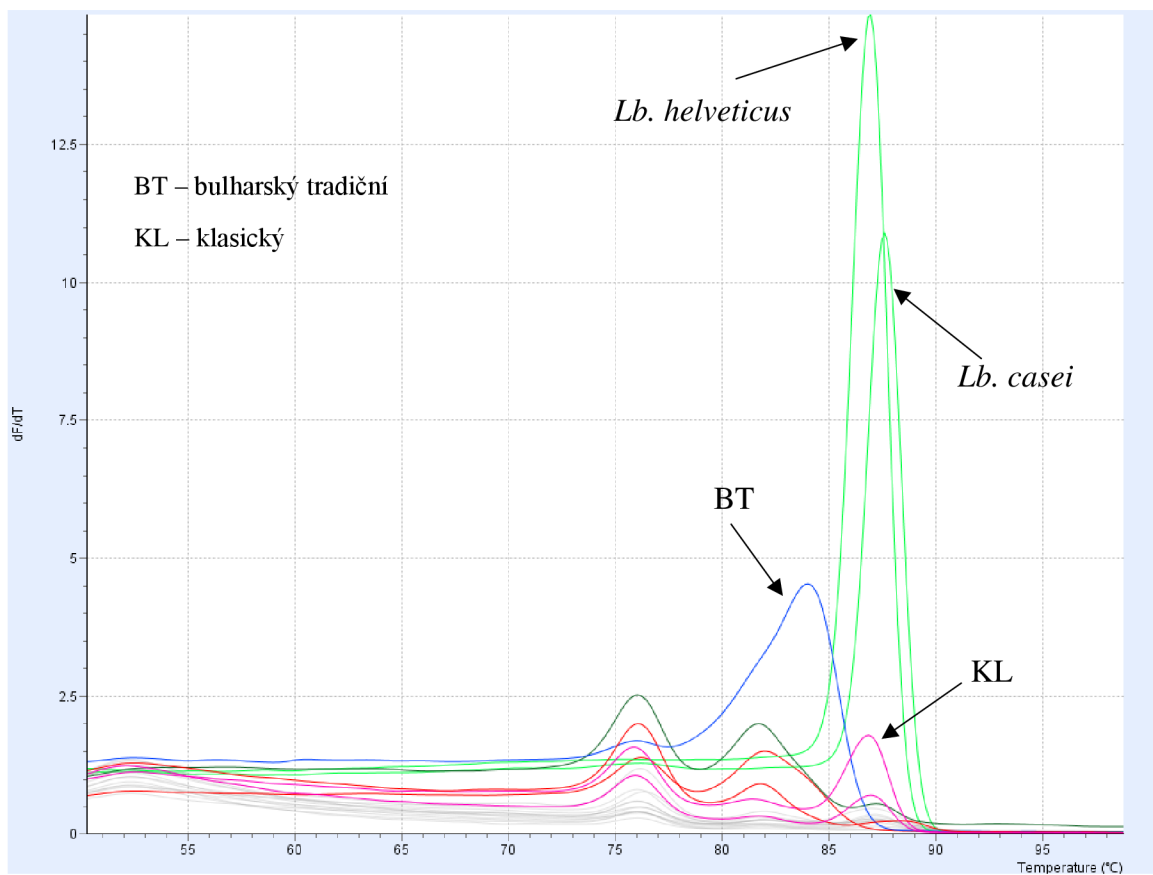


Obrázek 13 Křivky tání pro doménu *Bacteria* s použitím DNA izolované fenolovou extrakcí

Po izolaci DNA pomocí kitu byly vybrány některé izoláty DNA, které měly dostatečně vysokou koncentraci pro použití PCR metody. Na Obrázku 14 můžeme pozorovat, že vzorek jogurtu BT se začal amplifikovat po 16 cyklu. Z analýzy křivek tání (Obrázek 15) je patrné, že vzorek BT tvoří pík s bodem tání kolem 84 °C, podobně jako u PCR s použitím DNA izolované pomocí fenolové extrakce. Můžeme si také povšimnout malého píku (ružová barva) v oblasti pozitivních kontrol s bodem tání kolem 87 °C, který patří vzorku jogurtu KL. To nám naznačuje pozitivní výsledek z hlediska obsahu bakteriální DNA, ovšem jedná se o dvojpík, což značí tvorbu nespecifického produktu.



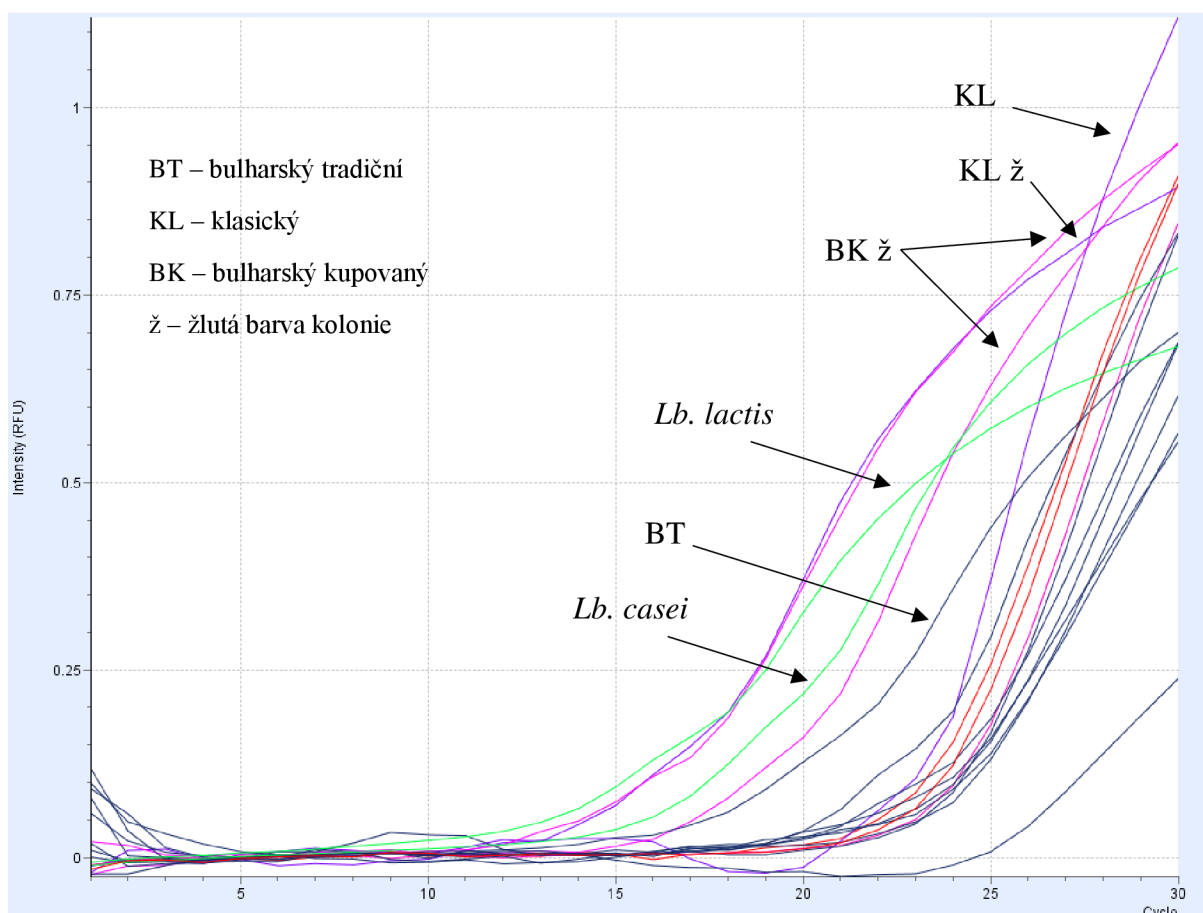
Obrázek 14 Amplifikační křivky pro doménu *Bacteria* s použitím DNA izolované kitem



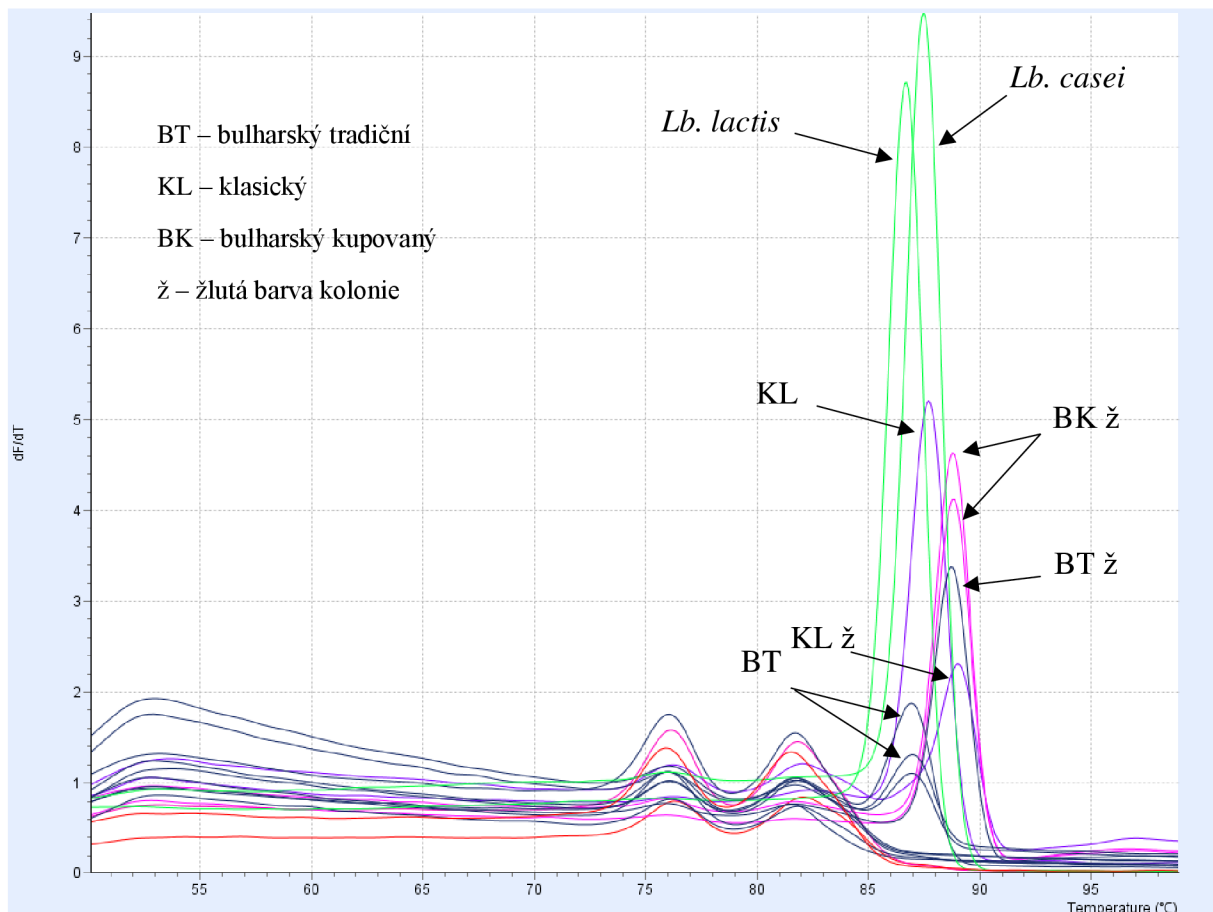
Obrázek 15 Křivky tání pro doménu *Bacteria* s použitím DNA izolované kitem

Protože ani jeden z výsledků za použití DNA izolované výše uvedenými způsoby nebyl průkazný, byly pro PCR použity přímo kolonie buněk získané kultivací (kap. 4.3.1), které byly lyzovány zvýšenou teplotou (99 °C/10 minut). Na některých médiích se vyskytovaly kolonie bílé a žluté barvy, vzorky se žlutou kolonií jsou označeny písmenem ž. Na Obrázku 16 můžeme pozorovat že žluté kolonie získané z jogurtu KL a BK se začaly amplifikovat po 11 cyklu, bílá kolonie jogurtu BT a KL se začala amplifikovat po 15 cyklu. Obrázek 17 zobrazuje křivky tání, kde můžeme pozorovat, že všechny vzorky žlutých kolonií tvoří pik s bodem tání kolem 89 °C. Vzorky s bílou kolonií tvoří pik s bodem tání kolem 87 °C.

Za použití lyzátu buněk získaného přímo z vypíchnuté kolonie narostlé na vhodné kultivačním médiu byla potvrzena přítomnost bakterií ve všech vzorcích jogurtů.



Obrázek 16 Amplifikační křivky pro doménu *Bacteria* při použití kolonií buněk



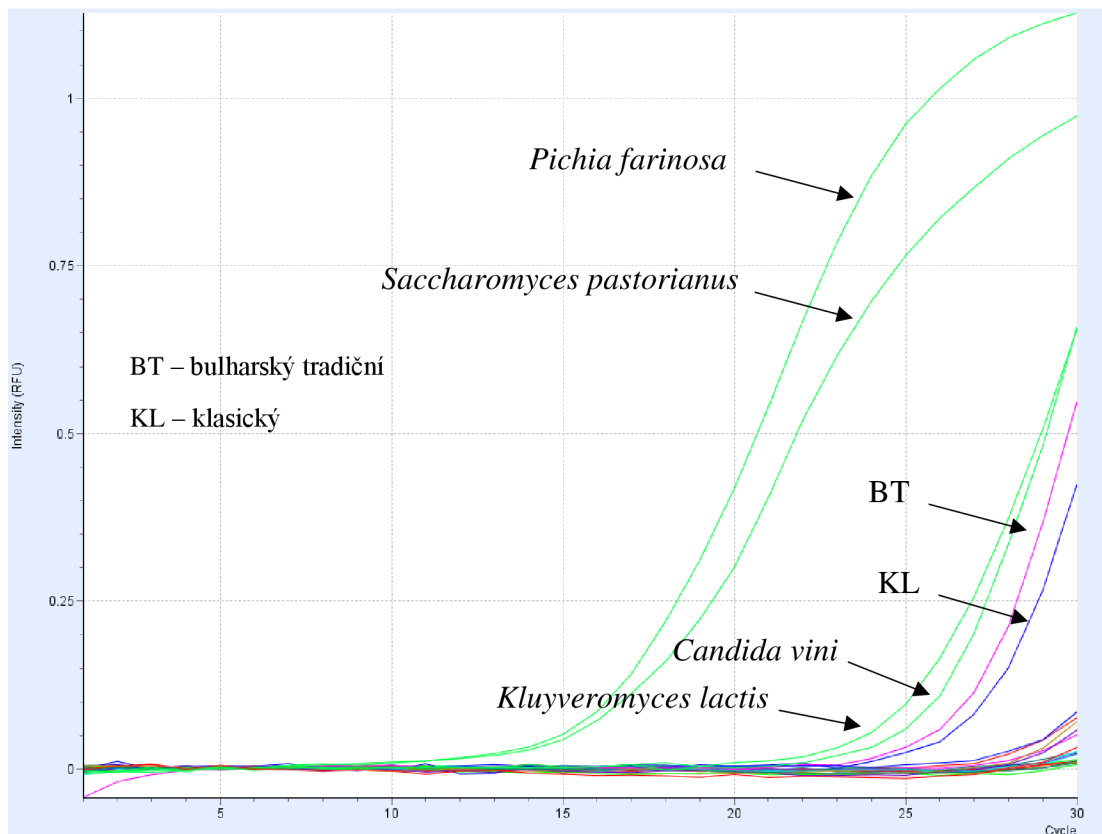
Obrázek 17 Křivky tání pro doměnu *Bacteria* při použití kolonií buněk

Z výše uvedeného vyplývá, že pro další práci, tedy bližší určení jednotlivých bakteriálních rodů, respektive druhů je zapotřebí najít vhodnější způsob izolace DNA přímo z jogurtů, nebo již ze začátku vycházet z kultivací.

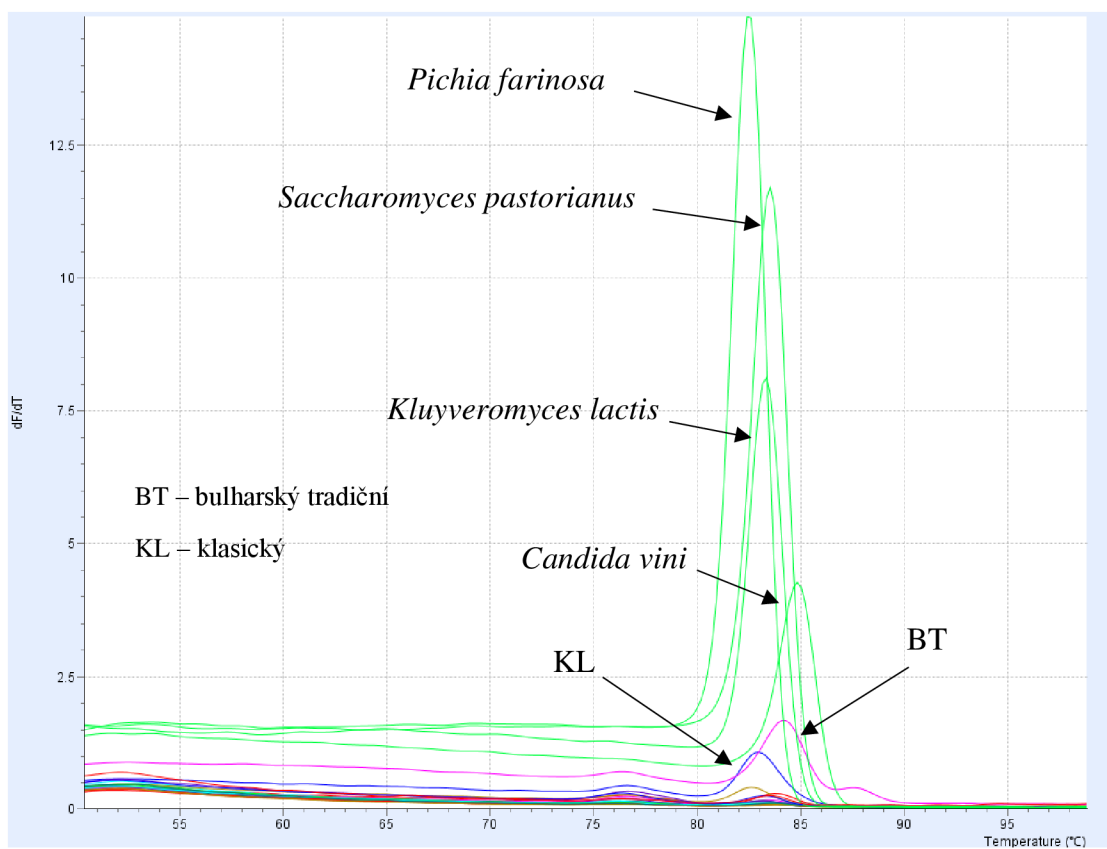
4.3.4 Průkaz přítomnosti DNA kvasinek metodou PCR v reálném čase

Pro prokázání přítomnosti kvasinkové DNA byla použita stejná DNA jako v kap. 4.3.3. Byly připraveny směsi pro PCR a byla provedena qPCR dle postupu 3.3.5.7. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA kmene *Saccharomyces pastorianus* CCY 21-6-3, *Kluyveromyces lactis* CCDM 260, *Candida vini* CCY 29-39-3 a *Pichia farinosa* CCY 39-4-3. Výsledky jsou vyjádřeny ve formě amplifikační křivky a křivky tání na Obrázku 18, respektive 19.

Stejně jako v případě detekce přítomnosti bakteriální DNA, DNA izolovaná pomocí fenolové extrakce přímo z jogurtu nebyla amplifikována (Obrázek 18). U DNA izolované kitem byly amplifikovány stejné 2 vzorky jako v případě bakteriální DNA, a tedy vzorek DNA jogurtu BT a KL. K amplifikaci došlo po 23 cyklu. Bod tání pro pík jogurtu BT je kolem 84 °C a jogurtu KL kolem 83 °C.

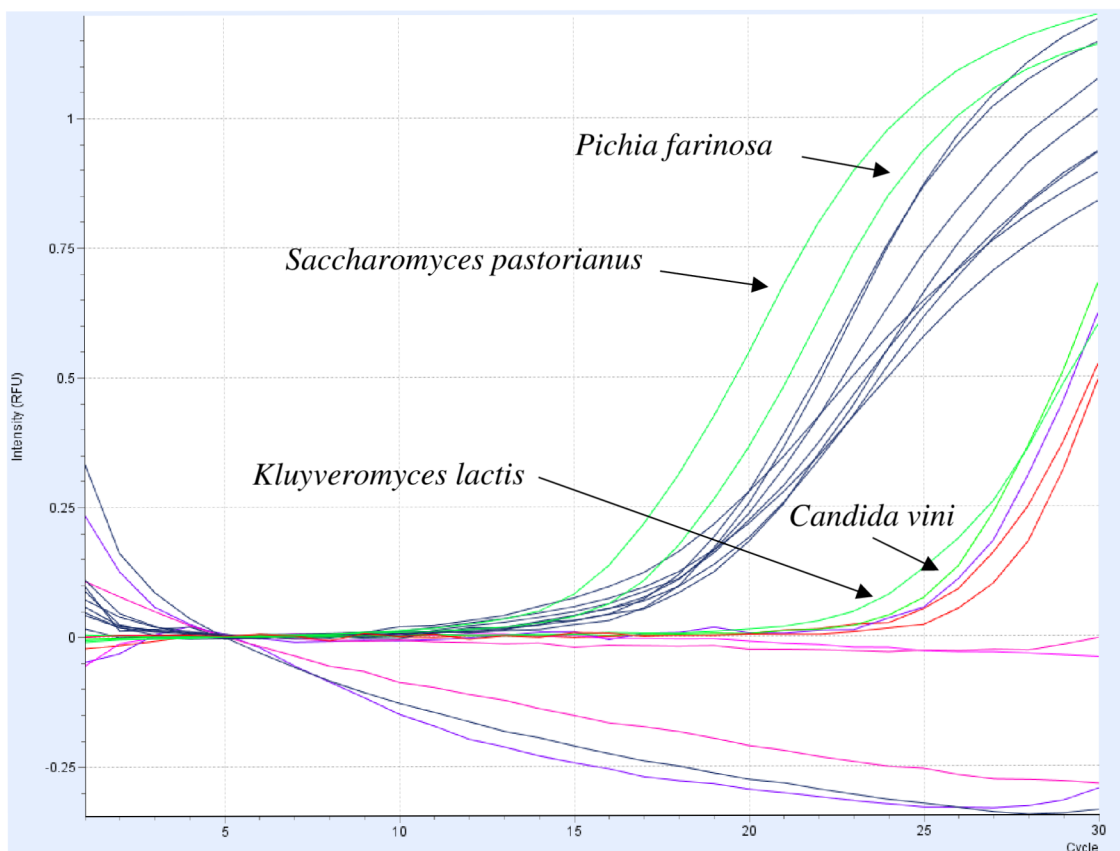


Obrázek 18 Amplifikační křivka pro kvasinky při použití DNA izolované fenolovou extrakcí a pomocí kitu

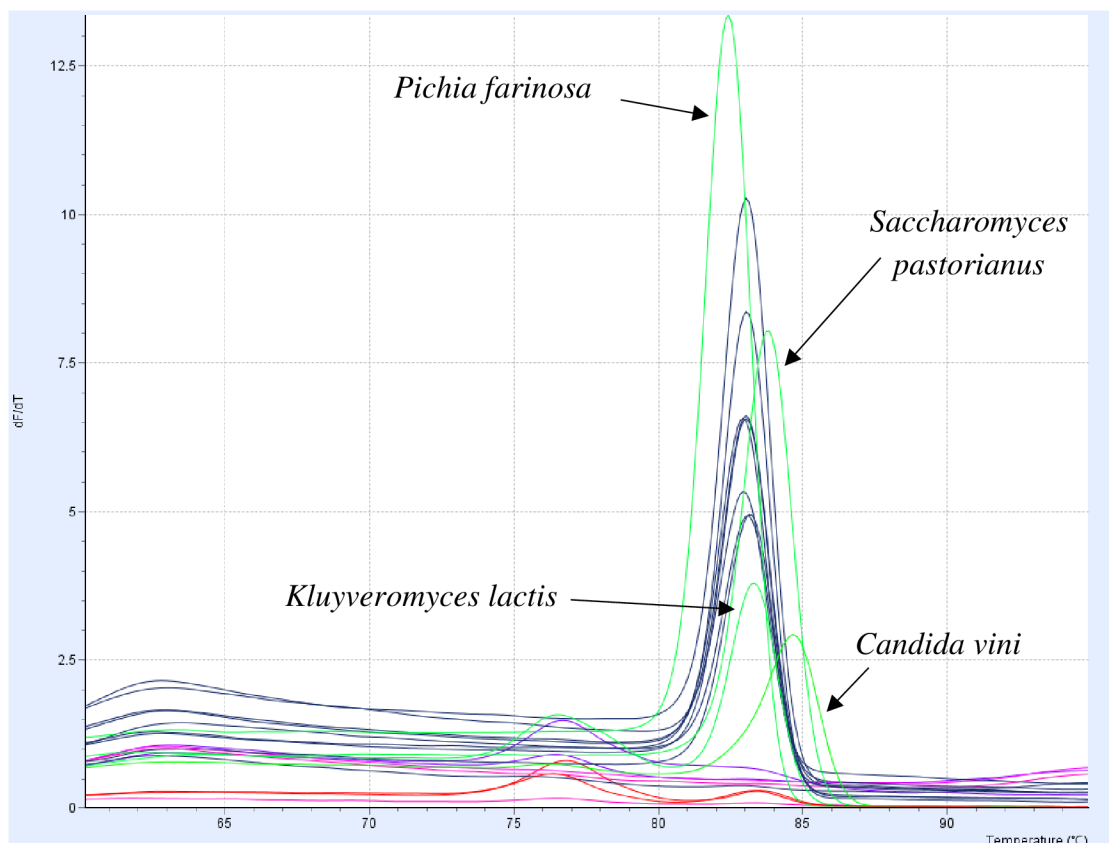


Obrázek 19 Křivky tání pro kvasinky při použití DNA izolované fenolovou extrakcí a pomocí kitu

Při použití hrubého lyzátu buněk získaného přímo z kolonií narostlých na kultivačním médiu pro důkaz kvasinek byly všechny vzorky jogurtu BT (tmavě modré) amplifikovány po 11 cyklu. Stejně tak všechny píky mají bod tání kolem 83 °C.



Obrázek 20 Amplifikační křivky pro kvasinky při použití kolonií buněk



Obrázek 21 Křivky tání pro kvasinky při použití kolonií buněk

Provedené stanovení potvrdilo původní předpoklad, že na rozdíl od klasického jogurtu (KL) a bulharského jogurtu – kupovaného (BK) byla v bulharském jogurtu – tradiční (BT) prokázána přítomnost kvasinek. Jogurt BK a KL tedy kvasinky neobsahoval, potvrzen zde byla pouze přítomnost bakteriální DNA, což odpovídá přítomnost jogurtových kultur používaných k jeho výrobě. Shrnutí výsledků je uvedeno v Tabulce 16.

Tabulka 16 Výsledky stanovení mikrobiálního profilu jogurtů

Typ jogurtu	Označení	Bakteriální DNA	DNA kvasinek
Klasický jogurt	KL	+	-
Bulharský jogurt – kupovaný	BK	+	-
Bulharský jogurt – tradiční	BT	+	+

+ ... Pomocí RT-PCR prokázána přítomnost bakteriální/kvasinkové DNA

- ... Pomocí RT-PCR nebyla prokázána přítomnost bakteriální/kvasinkové DNA

5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo porovnat bulharský a klasický jogurt z hlediska mikrobiálního profilu, sensorické kvality a obsahu těkavých látek. K analýze byly vyrobeny 3 druhy jogurtů, dva ze sušené kultury a jeden pomocí jogurtu dovezeného přímo z Bulharska.

Pro stanovení mikrobiálního profilu jogurtů byla využita kvantitativní polymerázová řetězová reakce. Vzhledem k tomu, že po jednoduché izolaci přímo z jogurtu pomocí fenolové extrakce a komerčního kitu se nepodařilo prokázat bakteriální ani kvasinkovou DNA, byly jogurty kultivovány na pevných médiích a narostlé kolonie byly použity jako DNA matrice pro PCR reakci. Takto se podařilo prokázat ve všech jogurtech bakteriální DNA, kvasinkovou DNA, podle očekávání, pouze v jogurtu bulharském tradičním.

S tím souvisí i výsledky sensorického hodnocení, kdy u tradičního bulharského jogurtu hodnotitelé detekovali kvasinkovou chuť. Jinak ale překvapivě byl tento jogurt hodnocen velmi podobně, jako jogurt klasický, který měl výrazně kyselou chuť. Ze sensorického hlediska byl nejlépe hodnocen jogurt bulharský vyrobený ze sušené kultury, který měl příjemný vzhled, vůni a příjemně kyselou chuť a celkově výbornou sensorickou kvalitu.

Odlišnost bulharského tradičního jogurtu se dobře ukázala na profilu těkavých látek, který byl nejbohatší, co se týče obsahu i počtu sloučenin. Měl tedy výraznější aroma než ostatní jogurty, což bylo potvrzeno sensorickým hodnocením.

Obsah těkavých látek v jogurtech byl stanoven pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí ve spojení s mikroextrakcí s pevnou fází. Celkem bylo ve všech vzorcích identifikováno 29 aromatických látek, z toho 8 alkoholů, 7 ketonů, 6 esterů, 5 kyselin, 2 terpeny a 1 aldehyd. Aromatický charakter těchto látek byl ověřen v literatuře. U všech vzorků byl identifikován heptan-2-on, acetoin, nonan-2-on, kyselina máselná, isovalerová, hexanová a oktanová.

Jogurt bulharský tradiční se tedy celkově lišil složením aromatických látek od ostatních dvou vzorků. Jeho aromatický profil byl až ze 70 % tvořen estery, kdežto v ostatních jogurtech převládaly zejména ketony. Dle literatury pro jogurty typický acetaldehyd nebyl nalezen v žádném jogurtu. Z významných sloučenin typických pro aroma jogurtu byly nalezeny diacetyl, ethylacetát a ethanol.

Na základě zjištěných poznatků lze říct, že jogurty vyrobené v Bulharsku se liší od klasických jogurtů jak v sensorické kvalitě, obsahu těkavých látek tak i v mikrobiálním profilu. To může být způsobeno zejména endemickou jogurtovou mikroflórou, která se vyskytuje v některých oblastech Bulharska.

V navazující práci bude vhodné optimalizovat (zlepšit citlivost) metody stanovení těkavých látek v jogurtu, z hlediska molekulárně – diagnostického pak optimalizovat metodu izolace mikrobiální DNA z jogurtu a zaměřit se na stanovení konkrétních rodů, případně druhů mikroorganismů vyskytujících se v jogurtech.

6 POUŽITÉ ZDROJE

- [1] Vyhláška č. 397/2016 Sb. o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. In: *Sborník zákonů*. 2016.
- [2] FISBERG, Mauro a Rachel MACHADO. History of yogurt and current patterns of consumption. *Nutrition Reviews* [online]. 2015, **73**(1), 4-7 [cit. 2023-10-18]. ISSN 0029-6643. Dostupné z: doi:10.1093/nutrit/nuv020
- [3] ROBINSON, R. K. a P. ITSARANUWAT. Properties of Yoghurt and their Appraisal. *Fermented milks* [online]. Blackwell Publishing Ltd, 2007 [cit. 2023-10-18]. ISBN 9780470995501. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9780470995501.ch4>
- [4] TAMIME, A.Y. a R.K. ROBINSON. *Yoghurt Science and Technology* [online]. 2nd. Woodhead Publishing, 1999 [cit. 2023-10-22]. ISBN 978-1-85573-399-2.
- [5] SAJDAKOWSKA, Marta, Jerzy GEBSKI, Dominika GUZEK, Krystyna GUTKOWSKA a Sylwia ZAKOWSKA-BIEMANS. Dairy Products Quality from a Consumer Point of View: Study among Polish Adults. *Nutrients* [online]. 2020, **12**(5) [cit. 2023-10-30]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:doi:10.3390/nu12051503
- [6] WANG, Liang, Tao WU, Yi ZHANG, Kangye YANG, Yuting HE, Kaiwen DENG, Caiyin LIANG a Yachun GU. Comparative studies on the nutritional and physicochemical properties of yoghurts from cows', goats', and camels' milk powder. *International Dairy Journal* [online]. 2023, **138** [cit. 2023-10-30]. ISSN 09586946. Dostupné z: doi:10.1016/j.idairyj.2022.105542
- [7] TERZIOĞLU, Murat Emre, İhsan BAKİRCİ, Emel OZ et al. Comparison of camel, buffalo, cow, goat, and sheep yoghurts in terms of various physicochemical, biochemical, textural and rheological properties. *International Dairy Journal* [online]. 2023, **146** [cit. 2023-10-30]. ISSN 09586946. Dostupné z: doi:10.1016/j.idairyj.2023.105749
- [8] SFAKIANAKIS, Panagiotis Sfakianakis a Constantina TZIA. Dairy technologies in yogurt production. POLTRONIERI, Palmiro. *Microbiology in Dairy Processing: Challenges and Opportunities* [online]. John Wiley & Sons Ltd and the Institute of Food Technologists, 2017, s. 279-298 [cit. 2023-10-22]. ISBN 9781119114802.
- [9] BANERJEE, Ujjwainee, Halder TANIMA, Rakibul MALIDA, Roshni PANDA a Gourisankar ROYMAHAPATRA. VARIETY OF YOGURT AND ITS HEALTH ASPECTS - A BRIEF REVIEW. *International Journal of Innovative Practice and Applied Research* [online]. 2017, (7), 56-66 [cit. 2023-10-22]. ISSN 2349-8978.
- [10] IVANOV, Ivan, Kaloyan PETROV, Valentin LOZANOV, Iassen HRISTOV, Zhengjun WU, Zhenmin LIU a Penka PETROVA. Bioactive Compounds Produced by the

- Accompanying Microflora in Bulgarian Yoghurt. *Processes* [online]. 2021, **9**(1) [cit. 2023-11-27]. ISSN 2227-9717. Dostupné z: doi:10.3390/pr9010114
- [11] TENEVA-ANGELOVA, Tsvetanka, Tatyana BALABANOVA a Dora BESHKOVA. Traditional Balkan fermented milk products. *Engineering in Life Sciences* [online]. 2018, **18**(11), 807-819 [cit. 2023-11-27]. ISSN 1618-0240. Dostupné z: doi:10.1002/elsc.201800050
- [12] PETROVA, Penka, IVANOV, Lidia TSIGORIYNA, Nadezhda VALCHEVA, Evgenia VASILEVA, Tsvetomila PARVANOVA-MANCHEVA, ARSOV a Kaloyan PETROV. Traditional Bulgarian Dairy Products: Ethnic Foods with Health Benefits. *Microorganisms* [online]. 2021, (3) [cit. 2023-11-27]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9030480
- [13] VELIKOVA, Petya, Kaloyan PETROV, Valentin LOZANOV, Flora TSVETANOVA, Anton STOYANOV, Zhengjun WU, Zhenmin LIU a Penka PETROVA. *Microbial diversity and health-promoting properties of the traditional Bulgarian yogurt* [online]. 2018, **32**(5), 1205-1217 [cit. 2023-11-27]. ISSN 1310-2818. Dostupné z: doi:10.1080/13102818.2018.1475255
- [14] ROBINSON, R. K., J. A. LUCEY a A. Y. TAMIME. Manufacture of Yoghurt. *Fermented milks* [online]. Blackwell Publishing Ltd, 2007, s. 53-75 [cit. 2023-10-18]. ISBN 9780470995501.
- [15] Manufacture of various types of yogurt. CHANDAN, Ramesh C. a Arun KILARA. *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks* [online]. John Wiley & Sons, Inc., 2013, s. 263-295 [cit. 2023-10-22]. ISBN 9781118481301.
- [16] PAVELKA, Antonín. *Mléčné výrobky pro vaše zdraví*. Brno: Litera, 1996. ISBN 80-857-6309-5.
- [17] DE PRISCO, Annachiara, Hein J. F. VAN VALENBERG, Vincenzo FOGLIANO a Gianluigi MAURIELLO. Microencapsulated Starter Culture During Yoghurt Manufacturing, Effect on Technological Features. *Food and Bioprocess Technology* [online]. 2017, **10**(10), 1767-1777 [cit. 2023-11-13]. ISSN 1935-5130. Dostupné z: doi:10.1007/s11947-017-1946-8
- [18] CHOI, Hyon K. Dairy Consumption and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus in Men. *Archives of Internal Medicine* [online]. 2005, **165**(9) [cit. 2024-01-22]. ISSN 0003-9926. Dostupné z: doi:10.1001/archinte.165.9.997
- [19] LIU, Simin, Hyon K. CHOI, Earl FORD, Yiqing SONG, Anna KLEVAK, Julie E. BURING a JoAnn E. MANSON. A Prospective Study of Dairy Intake and the Risk of Type 2 Diabetes in Women. *Diabetes Care* [online]. 2006, **29**(7), 1579-1584 [cit. 2024-01-22]. ISSN 0149-5992. Dostupné z: doi:10.2337/dc06-0256

- [20] MCKINLEY, MICHELLE C. The nutrition and health benefits of yoghurt. *International Journal of Dairy Technology* [online]. 2005, **58**(1), 1-12 [cit. 2024-01-28]. ISSN 1364-727X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-0307.2005.00180.x
- [21] MEYER, A. L., I. ELMADFA, I. HERBACEK a M. MICKSCHE. Probiotic, as well as conventional yogurt, can enhance the stimulated production of proinflammatory cytokines. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* [online]. 2007, **20**(6), 590-598 [cit. 2024-01-28]. ISSN 0952-3871. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-277X.2007.00807.x
- [22] BENIWAL, Ripudaman S., Vincent C. ARENA, Leno THOMAS, Sudhir NARLA, Thomas F. IMPERIALE, Rauf A. CHAUDHRY a Usman A. AHMAD. A Randomized Trial of Yogurt for Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhea. *Digestive Diseases and Sciences* [online]. **48**(10), 2077-2082 [cit. 2024-01-28]. ISSN 01632116. Dostupné z: doi:10.1023/A:1026155328638
- [23] LE ROY, Caroline Ivanne, Alexander KURILSHIKOV, Emily R. LEEMING et al. Yoghurt consumption is associated with changes in the composition of the human gut microbiome and metabolome. *BMC Microbiology* [online]. 2022, **22**(1) [cit. 2024-01-31]. ISSN 1471-2180. Dostupné z: doi:10.1186/s12866-021-02364-2
- [24] PARIKH, Shamik J a Jack A YANOVSKI. Calcium intake and adiposity. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2003, **77**(2), 281-287 [cit. 2024-01-23]. ISSN 00029165. Dostupné z: doi:10.1093/ajcn/77.2.281
- [25] WANG, Huifen, Kara A. LIVINGSTON, Caroline S. FOX, James B. MEIGS a Paul F. JACQUES. Yogurt consumption is associated with better diet quality and metabolic profile in American men and women. *Nutrition Research* [online]. 2013, **33**(1), 18-26 [cit. 2024-01-23]. ISSN 02715317. Dostupné z: doi:10.1016/j.nutres.2012.11.009
- [26] KRASTANOV, Albert, Philip J. YEBOAH, Namesha DULARI WIJEMANNA, Abdulhakim S. EDDIN, Raphael D. AYIVI a Salam A. IBRAHIM. Volatile Aromatic Flavor Compounds in Yogurt: A Review. *Current Issues and Advances in the Dairy Industry* [online]. IntechOpen, 2023 [cit. 2024-01-31]. Food Science and Nutrition. ISBN 978-1-83768-092-4. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.109034
- [27] ROUTRAY, Winny a Hari N. MISHRA. Scientific and Technical Aspects of Yogurt Aroma and Taste: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2011, **10**(4), 208-220 [cit. 2024-01-31]. ISSN 15414337. Dostupné z: doi:10.1111/j.1541-4337.2011.00151.x
- [28] LIU, Chen, Ping YANG, Haili WANG a Huanlu SONG. Identification of odor compounds and odor-active compounds of yogurt using DHS, SPME, SAFE, and SBSE/GC-O-MS. *LWT* [online]. 2022, **154** [cit. 2024-02-12]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2021.112689

- [29] KARAMI, M. Investigation of Physicochemical, Microbiological, and Rheological Properties and Volatile Compounds of Ewe and Cow Milk Yoghurt. *Journal of Agricultural Science and Technology* [online]. 2018, 1149-1160 [cit. 2024-02-14]. Dostupné z: <http://jast.modares.ac.ir/article-23-20120-en.html>
- [30] ERKAYA, TUBA a MUSTAFA ŞENGÜL. Comparison of volatile compounds in yoghurts made from cows', buffaloes', ewes' and goats' milks. *International Journal of Dairy Technology* [online]. 2011, **64**(2), 240-246 [cit. 2024-02-14]. ISSN 1364-727X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-0307.2010.00655.x
- [31] PAPAIOANNOU, Georgia, Ioanna KOSMA, Anastasia V. BADEKA a Michael G. KONTOMINAS. Profile of Volatile Compounds in Dessert Yogurts Prepared from Cow and Goat Milk, Using Different Starter Cultures and Probiotics. *Foods* [online]. 2021, **10**(12) [cit. 2024-02-14]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods10123153
- [32] KRASTANOV, Albert, Marin GEORGIEV, Aleksandar SLAVCHEV, Denica BLAZHEVA, Bogdan GORANOV a Salam A. IBRAHIM. Design and Volatile Compound Profiling of Starter Cultures for Yogurt Preparation. *Foods* [online]. 2023, **12**(2) [cit. 2024-02-15]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods12020379
- [33] CHENG, Zeng, Maurice G O'SULLIVAN, Song MIAO, Joseph P KERRY a Kieran N KILCAWLEY. Sensorial, cultural and volatile properties of milk, dairy powders, yoghurt and butter: A review. *International Journal of Dairy Technology* [online]. 2022, **75**(4), 761-790 [cit. 2024-02-15]. ISSN 1364-727X. Dostupné z: doi:10.1111/1471-0307.12898
- [34] BALASUBRAMANIAN, Sundar a Suranjan PANIGRAHI. Solid-Phase Microextraction (SPME) Techniques for Quality Characterization of Food Products: A Review. *Food and Bioprocess Technology* [online]. 2011, **4**(1), 1-26 [cit. 2024-02-15]. ISSN 1935-5130. Dostupné z: doi:10.1007/s11947-009-0299-3
- [35] PEDERSEN-BJERGAARD, Stig. Gas Chromatography (GC). *Bioanalysis of Pharmaceuticals* [online]. Chichester, UK, 2015, 173-206 [cit. 2024-02-20]. Dostupné z: doi:10.1002/9781118716830.ch8
- [36] STASHENKO, Elena a Jairo REN. Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Advances in Gas Chromatography* [online]. InTech, 2014 [cit. 2024-02-25]. ISBN 978-953-51-1227-3. Dostupné z: doi:10.5772/57492
- [37] MASUCCI, John a Gary CALDWELL. Techniques for Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Modern Practice of Gas Chromatography* [online]. 4th. Wiley-Interscience, 2004, s. 339-401 [cit. 2024-02-25]. ISBN 0471229830.
- [38] GÖRNER, Fridrich a L. VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. Bratislava: Malé Centrum, 2004. ISBN 80-967-0649-7.

- [39] AYIVI, Raphael D. a Salam A. IBRAHIM. *Lactic acid bacteria: an essential probiotic and starter culture for the production of yoghurt* [online]. 2022, **57**(11), 7008-7025 [cit. 2024-02-26]. ISSN 0950-5423. Dostupné z: doi:10.1111/ijfs.16076
- [40] KOLEVA, P., R. GEORGIEVA, D. NIKOLOVA a S. DANOVA. *Lactic Acid Microflora of Bulgarian Milk Products From Mountain Regions* [online]. 2014, **23**(1), 856-860 [cit. 2024-03-03]. ISSN 1310-2818. Dostupné z: doi:10.1080/13102818.2009.10818557
- [41] TUMBARSKI, Yulian, Velichka YANAKIEVA a Rositsa DENKOVA. ISOLATION, IDENTIFICATION AND COMPARISON OF SOME PROPERTIES OF LACTOBACILLUS DELBRUECKII SUBSP. BULGARICUS STRAINS FROM TRADITIONAL BULGARIAN AND ITALIAN YOGURTS. *Carpathian Journal of Food Science and Technology* [online]. 38-54 [cit. 2024-03-03]. ISSN 2066-6845. Dostupné z: doi:10.34302/crpjfst/2021.13.1.4
- [42] TAYE, Yeshambel, Tadesse DEGU, Haben FESSEHA, Mesfin MATHEWOS a Argyro BEKATOROU. Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Cow Milk and Milk Products. *The Scientific World Journal* [online]. 2021, **2021**, 1-6 [cit. 2024-03-03]. ISSN 1537-744X. Dostupné z: doi:10.1155/2021/4697445
- [43] HAJIMOHAMMADI FARIMANI, Reza, Mohammad Bagher HABIBI NAJAFI, Bibi Sedigheh FAZLY BAZZAZ, Mohammad Reza EDALATIAN, Ahmad Reza BAHRAMI, Ana Belén FLÓREZ a Baltasar MAYO. Identification, typing and functional characterization of dominant lactic acid bacteria strains from Iranian traditional yoghurt. *European Food Research and Technology* [online]. 2016, **242**(4), 517-526 [cit. 2024-03-03]. ISSN 1438-2377. Dostupné z: doi:10.1007/s00217-015-2562-3
- [44] PAUL, Charushila, Israt Dilruba MISHU, Md Ibrahim MIAH, Md Latiful BARI, Sabita Rezwana RAHMAN a Md Abdul MALEK. Isolation, identification and probiotic potential of lactic acid bacteria and yeasts from commercial yogurt and homemade non-dairy fermented food “KANJF”. *International Journal of Gastronomy and Food Science* [online]. 2023, **34** [cit. 2024-03-03]. ISSN 1878450X. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijgfs.2023.100787
- [45] HUTKINS, R. a Y.J. GOH. STREPTOCOCCUS | *Streptococcus thermophilus*. *Encyclopedia of Food Microbiology* [online]. Elsevier, 2014, 554-559 [cit. 2024-02-26]. ISBN 9780123847331. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00325-6
- [46] DAN, Tong, Rulin JIN, Weiyi REN, Ting LI, Haiyan CHEN a Tiansong SUN. Characteristics of Milk Fermented by *Streptococcus thermophilus* MGA45-4 and the Profiles of Associated Volatile Compounds during Fermentation and Storage. *Molecules* [online]. 2018, **23**(4) [cit. 2024-02-26]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23040878

- [47] HUTKINS, Robert W. *Microbiology and Technology of Fermented Foods* [online]. Blackwell Publishing, 2006 [cit. 2024-02-26]. Dostupné z: doi:10.1002/9780470277515
- [48] CARR, Frank J., Don CHILL a Nino MAIDA. The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. 2008, **28**(4), 281-370 [cit. 2024-02-28]. ISSN 1040-841X. Dostupné z: doi:10.1080/1040-840291046759
- [49] POT, Bruno, Giovanna E. FELIS, Katrien De BRUYNE, Effie TSAKALIDOU, Konstantinos PAPADIMITRIOU, Jørgen LEISNER a Peter VANDAMME. The genus *Lactobacillus*. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy* [online]. First edition. John Wiley & Sons, 2014 [cit. 2024-02-28]. ISBN 9781118655252.
- [50] WHEELIS, Mark. *Principles of Modern Microbiology*. 1st. Jones & Bartlett Learning, 2007. ISBN 978-0763710750.
- [51] DAVEY, Hazel M. Life, Death, and In-Between: Meanings and Methods in Microbiology: Meanings and Methods in Microbiology. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2011, **77**(16), 5571-5576 [cit. 2024-03-03]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.00744-11
- [52] AUSTIN, Brian. The value of cultures to modern microbiology. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. 2017, **110**(10), 1247-1256 [cit. 2024-03-03]. ISSN 0003-6072. Dostupné z: doi:10.1007/s10482-017-0840-8
- [53] KADRI, Karim. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science* [online]. IntechOpen, 2020 [cit. 2024-03-03]. ISBN 978-1-78984-089-6. Dostupné z: doi:10.5772/intechopen.86491
- [54] JOSHI, Mohini a J. D. DESHPANDE. POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS, PRINCIPLES AND APPLICATION. *International Journal of Biomedical Research* [online]. 2011, **2**(1), 81-97 [cit. 2024-03-03]. ISSN 0976-9633. Dostupné z: doi:10.7439/ijbr.v2i1.83
- [55] VALASEK, Mark A. a Joyce J. REPA. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education* [online]. 2005, **29**(3), 151-159 [cit. 2024-03-03]. ISSN 1043-4046. Dostupné z: doi:10.1152/advan.00019.2005
- [56] ABELLAN-SCHNEYDER, Isabel, Monica S. MATCHADO, Sandra REITMEIER et al. Primer, Pipelines, Parameters: Issues in 16S rRNA Gene Sequencing. *MSphere* [online]. 2021, **6**(1), 01202-20 [cit. 2024-03-03]. ISSN 2379-5042. Dostupné z: doi:10.1128/mSphere.01202-20
- [57] ZHANG, Hongfa a Chunping YOU. 16S ribosomal RNA-depletion PCR and its application in cause analysis of yogurt package shrinkage. *Journal of Dairy Science* [online]. 2022, **105**(9), 7288-7297 [cit. 2024-03-03]. ISSN 00220302. Dostupné z: doi:10.3168/jds.2021-21575

- [58] VALENCIA, C. Alexander, M. Ali PERVAIZ, Ammar HUSAMI, Yaping QIAN a Kejian ZHANG. *Next Generation Sequencing Technologies in Medical Genetics* [online]. [cit. 2024-03-03]. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4614-9032-6
- [59] KARAGÜL-YÜCEER, Yonca a MaryAnne DRAKE. Sensory analysis of yogurt. *Manufacturing Yogurt and Fermented Milks* [online]. John Wiley & Sons, Inc., 2013 [cit. 2023-12-11]. ISSN 9781118481301. Dostupné z: doi:10.1002/9781118481301.ch16
- [60] KALHOTKA, Libor, Květoslava ŠUSTOVÁ, Tomasz GÖBEL a Blanka KVASNIČKOVÁ. The microbiological and sensory qualities of yoghurts and their changes after of "best before" date. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* [online]. 2014, **57**(5), 167-176 [cit. 2023-12-11]. ISSN 12118516. Dostupné z: doi:10.11118/actaun200957050167
- [61] ŠULCEROVÁ, Hana a Květoslava ŠUSTOVÁ. Changes monitoring of white yoghurts sensorial characteristic during their minimal endurance time. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* [online]. 2014, **55**(5), 187-196 [cit. 2023-12-11]. ISSN 12118516. Dostupné z: doi:10.11118/actaun200755050187
- [62] JAWORSKA, DANUTA, BOZENA WASZKIEWICZ-ROBAK, WOJCIECH KOLANOWSKI a FRANCISZEK SWIDERSKI. Relative importance of texture properties in the sensory quality and acceptance of natural yoghurts. *International Journal of Dairy Technology* [online]. 2005, **58**(1), 39-46 [cit. 2023-12-11]. ISSN 1364-727X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1471-0307.2005.00178.x
- [63] SOOMRO, Aijaz Hussain. Effect of milk source and stabilizers on the compositional and sensorial quality of yogurt. *Pure and Applied Biology* [online]. 2016, **5**(4) [cit. 2024-01-22]. ISSN 23042478. Dostupné z: doi:10.19045/bspab.2016.50158
- [64] JAROŠOVÁ, Alžběta, Helena VALENTOVÁ a František PUDIL. *Senzorické hodnocení potravin: laboratorní cvičení*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2001. ISBN 80-715-7539-9.
- [65] BUŇKA, František, Jan HRABĚ a Bohumír VOSPĚL. *Senzorická analýza potravin I*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2008. ISBN 978-80-7318-628-9.
- [66] ORTH, D. S. *Handbook of cosmetic microbiology*. 1. New York: Marcel Dekker, Inc., 1993. ISBN 08-247-9012-X.
- [67] TOFALO, R., M. SCHIRONE, G. PERPETUINI, G. SUZZI a A. CORSETTI. Development and application of a real-time PCR-based assay to enumerate total yeasts and *Pichia anomala*, *Pichia guillermondii* and *Pichia kluyveri* in fermented table olives. *Food Control* [online]. 2012, 356-362 [cit. 2024-04-21]. ISSN 0956-7135.
- [68] *Flavornet and human odor space* [online]. In: . [cit. 2024-03-12]. Dostupné z: <https://www.flavornet.org/flavornet.html>

- [69] BABUSHOK, V. I., P. J. LINSTROM a I. G. ZENKEVICH. Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* [online]. 2011, **40**(4) [cit. 2024-03-12]. ISSN 0047-2689. Dostupné z: doi:10.1063/1.3653552
- [70] BIANCHI, Federica, Maria CARERI, Alessandro MANGIA a Marilena MUSCI. Retention indices in the analysis of food aroma volatile compounds in temperature-programmed gas chromatography: Database creation and evaluation of precision and robustness. *Journal of Separation Science* [online]. 2007, **30**(4), 563-572 [cit. 2024-03-05]. ISSN 1615-9306. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.200600393
- [71] CHENG, Hefa. Volatile Flavor Compounds in Yogurt: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2010, **50**(10), 938-950 [cit. 2024-04-07]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408390903044081
- [72] NIKOLOVA, I., S. DAMIYANOVA, I. KOSTOVA, V. PRODANOVA-STEFANOVA, Y. KOLEVA a A. STOYANOVA. COMPARATIVE ANALYSIS AND QUALITATIVE EVALUATION OF BULGARIAN YOGHURTS. *Oxidation Communications* [online]. 2023, **46** [cit. 2024-03-26]. ISSN 0209-4541.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

GC	Plynová chromatografie
SPME	Mikroextrakce pevnou fází
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
GC-FID	Plynová chromatografie s plamenově-ionizační detekcí
SIFT-MS	Hmotnostní spektrometrie se zvoleným průtokem iontů
PTR-MS	Hmotnostní spektrometrie s přenosem protonů
BMK	Bakterie mléčného kvašení
PCR	Polymerázová řetězová reakce
RT-PCR	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase
PCA	Analýza hlavních komponent
MPA	Masopeptonový agar
SA	Sladinový agar
MRS	Agar de Man, Rogosa, Sharpe

8 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1 Dotazník pro sensorickou analýzu jogurtů

Příloha 2 Ukázka chromatogramu těkavých látek v bulharském tradičním jogurt; identifikace sloučenin viz Tabulka 14

9 PŘÍLOHY

Příloha 1 Dotazník pro senzoryckou analýzu jogurtů

Dotazník pro senzorycké hodnocení jogurtů

Datum: kuřák/nekuřák

Čas: žena/muž

Vážení hodnotitelé, zhodnoťte prosím předložené vzorky jogurtů.

Jaké je Vaše stanovisko před hodnocením?

Jak často jogurty konzumujete?

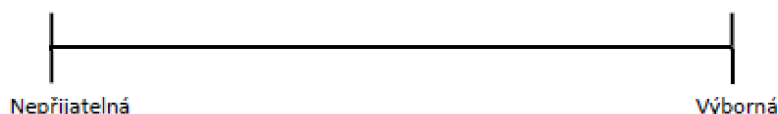
- Jogurty mám velmi rád/a
- Jogurty nemám příliš rád/a
- Jogurty nemám rád/a
- Jogurty konzumuji často
- Jogurty konzumuji občas
- Jogurty nekonzumuji

Vzorky hodnoťte v následujících znacích podle uvedených instrukcí, použijte uvedené stupnice a tabulky.

1. Hodnocení pomocí grafických stupnic

Vzhled a barva

Pomocí uvedené grafické stupnice ohodnoťte příjemnost vzhledu a barvy vzorků (do stupnice запиšte kódy vzorku).



Popis krajních bodů:

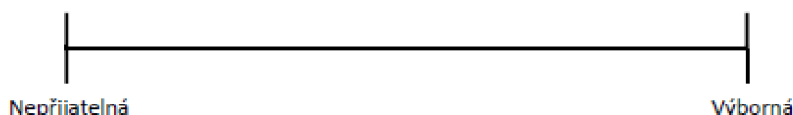
Výborná – barva smetanová, lesklá, stejnorodá, bez cizích odstínů. Vzhled čistý, hladký, lesklý, homogenní

Nepřijatelná – barva netypická (nažloutlá, nazelenalá aj.), vyvstávající syrovátka, nehomogenní vzhled, přítomnost bublinek a jiné vady

Poznámky:

Konzistence (textura)

Pomocí grafické stupnice ohodnoťte texturu vzorků.



Popis krajních bodů:

Výborná – jemná, krémovitá, hladká, viskosní, homogenní, stejnorodá

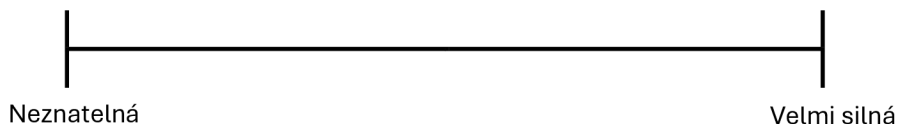
Nepřijatelná – nestejnorodá, nehomogenní, příliš řídká až vodnatá, mazlavá, hrudkovitá, krupičkovitá aj. vady

Poznámky:

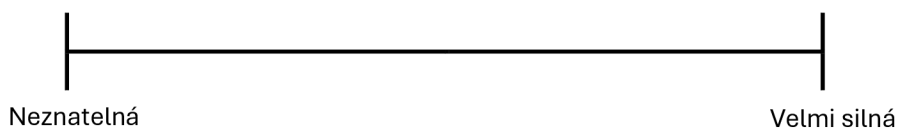
2. Profilový test vybraných chutí

Posuďte dílčí chutě u každého vzorku. Použijte grafické stupnice.

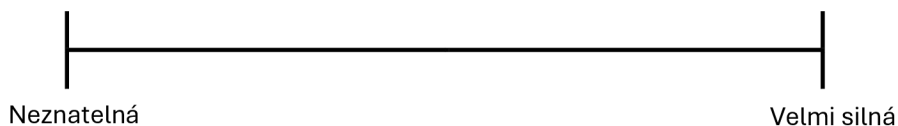
Kyselost



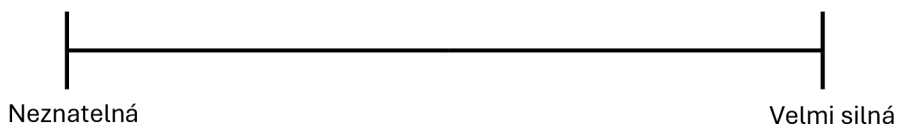
Sladkost



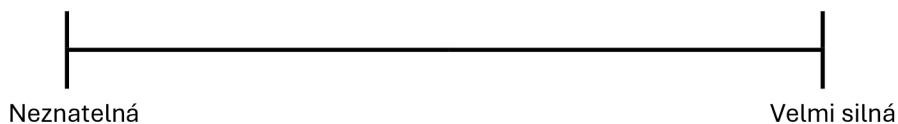
Hořkost



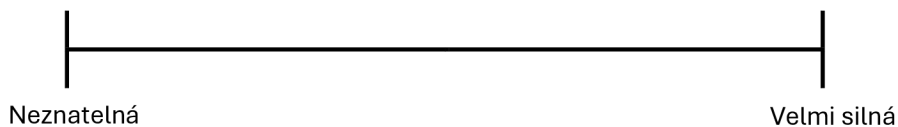
Jogurtová chuť



Kvasinková chuť



Jiná (případně jaká)



3. Pořadová zkouška - celková přijatelnost

Seřaďte vzorky dle celkové přijatelnosti

	Nejvíce přijatelný		Nejméně přijatelný
Kód vzorku			

Děkuji za účast a za vyplnění dotazníku. Případné připomínky ke vzorkům nebo k hodnocení pište prosím zde:

Příloha 2 Ukázka chromatogramu těkavých látek v bulharském tradičním jogurtu; identifikace sloučenin viz Tabulka 14

