

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Živočišné biotechnologie

Katedra: Katedra veterinárních disciplín a kvality produktů

Vedoucí katedry: prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.

## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

### **Stanovení probiotických mikroorganismů ve vybraných kysaných mléčných produktech**

(Determination of probiotic bacteria in selected fermented milk products)

Vedoucí diplomové práce:	doc. Ing. Eva SAMKOVÁ, Ph.D.
Konzultant diplomové práce:	MVDr. Lucie HASOŇOVÁ, Ph.D.
Autor diplomové práce:	Bc. Květa KORANDOVÁ

**České Budějovice, 2014**

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Květa KORANDOVÁ**  
Osobní číslo: **Z12725**  
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**  
Studijní obor: **Živočišné biotechnologie**  
Název tématu: **Stanovení probiotických mikroorganismů ve vybraných kysaných mléčných produktech**  
Zadávací katedra: **Katedra veterinárních disciplin a kvality produktů**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Kysané mléčné produkty patří mezi oblíbené mléčné výrobky. Podle současné platné legislativy musí obsahovat živé mikroorganismy v přesně definovaném množství, a to po celou dobu deklarované spotřeby.

Cílem práce bude sledovat zastoupení probiotických mikroorganismů ve vybraných kysaných mléčných produktech a posoudit zjištěné hodnoty s požadavky legislativy.

Diplomová práce bude zpracována na základě zásad zpracování závěrečných prací uvedených na [http://www.zf.jcu.cz/copy\\_of\\_studenti/informace-pro-studujici/dokumenty-studijniho-oddeleni/informace-pro-studujici/Jak\\_vypracovat\\_DP.pdf](http://www.zf.jcu.cz/copy_of_studenti/informace-pro-studujici/dokumenty-studijniho-oddeleni/informace-pro-studujici/Jak_vypracovat_DP.pdf) podle následující rámcové osnovy:

1. **Úvod** - charakteristika a význam řešené problematiky včetně uvedení cílů práce
2. **Literární přehled** - současný stav poznání dané problematiky získaný studiem soudobé vědecké a odborné literatury
3. **Materiál a metodika** - popis použitých analytických metod včetně metod statistických
4. **Výsledky a diskuse** - tabulkové a grafické zpracování získaných dat navazující na cíl práce, jejich statistické vyhodnocení a porovnání s dostupnými literárními údaji
5. **Závěr** - stručné shrnutí výsledků vlastní práce, návrhy a doporučení vyplývající z řešené problematiky
6. **Summary** - přehled a nejdůležitější výsledky včetně klíčových slov (v anglickém jazyce)
7. **Seznam literatury** - jednotný, podle platných citačních zásad.

Rozsah grafických prací: tabulky a grafy dle potřeby

Rozsah pracovní zprávy: 35-50 stran textu

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

- SACCARO D.M. et al.: The viability of three probiotic organisms grown with yoghurt starter cultures during storage for 21 days at 4 degrees C. Int. J. Dairy Techn., 2009, 62 (3): 397-404.
- SHAH N.P.: Probiotic Bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. J. Dairy Sci., 2000, 83 (4): 894-907.
- SCHARL M. et al.: Dying in yoghurt: the number of living bacteria in probiotic yoghurt decreases under exposure to room temperature. Digestion, 2011, 83 (1-2): 13-17.
- ŠILHÁNKOVÁ L.: Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. 3. vyd. Praha: Academia, 2002. 363 s. ISBN: 80-200-1024-6.
- Databáze WOS, Česká zemědělská bibliografie, CAB Abstracts, PROQUEST, dostupné na: <http://www.lib.jcu.cz/cs/databaze>
- Vědecké a odborné články v časopisech a sbornících: př. Výživa a potraviny, Mlékařské listy aj.
- Vyhláška MZe č.77/2003, kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. Částka: 32/2003 Sb.

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Eva Samková, Ph.D.


Katedra veterinárních disciplin a kvality produktů

Konzultant diplomové práce: MVDr. Lucie Hasoňová, Ph.D.

Katedra veterinárních disciplin a kvality produktů

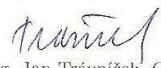
Datum zadání diplomové práce: 26. března 2013

Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2014

  
prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.

děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA  
studijní oddělení  
Studentůvská 13 ④  
370 05 České Budějovice

  
prof. Ing. Jan Trávníček, CSc.

vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 26. března 2013

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 25. 4. 2014

.....

Bc. Květa Korandová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Touto cestou bych chtěla především poděkovat paní Ing. Haně Leherové za umožnění provedení experimentální části práce ve společnosti “AGRO-LA“ spol. s.r.o. v Jindřichově Hradci a také za ochotu, čas a pomoc při provedení této praktické části.

Dále bych ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce paní doc. Ing. Evě Samkové, Ph.D. za cenné připomínky, rady a odbornou pomoc při zpracování a řešení mé diplomové práce.

A samozřejmě děkuji mé rodině za podporu.

## **ABSTRAKT**

Cílem práce bylo sledovat zastoupení probiotických mikroorganismů ve vybraných kysaných mléčných produktech. Pro stanovení kmenů *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* a rod *Bifidobacterium* byly vybrány z tržní sítě 3 vzorky bílých jogurtů, u kterých výrobce deklaroval přítomnost bifidobakterií.

Literární rešerše vysvětluje problematiku probiotických mikroorganismů a pojednává o procesu fermentace, fermentovaných mléčných výrobcích, a především o fermentovaném mléčném výrobku jogurtu.

V experimentální části je tato práce zaměřena na vyhodnocení mikrobiologických analýz a kyselosti vybraných jogurtů v závislosti na vzorcích a doby skladování. Zjištěné výsledky ukázaly, že počet živých bakterií kmenů *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* splňovaly legislativní požadavky, zatímco počet bakterií rodu *Bifidobacterium* mohl být ovlivněn různými faktory, které zapříčinily, že dle výsledků v této práci, u některých vzorků nebyl dostatečný počet těchto bakterií.

**Klíčová slova:** probiotické mikroorganismy, fermentované mléčné výrobky, jogurt, životaschopnost bakterií, kyselost, skladování.

## **ABSTRACT**

The aim of the thesis was to monitor presence of probiotic microorganisms in representative fermented dairy products. Three samples of white yoghurt available in the market, in which the manufacturer declared presence of bifidobacteria, were chosen for determination of strains of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* and the genus of *Bifidobacterium*.

Bibliographic research deals with explanation of the wider context of probiotic microorganisms and the process of fermentation, fermented dairy products and in particular of yoghurt as one type of fermented dairy products.

In the experimental part, the thesis focusses on evaluation of microbiological analyses and pH of selected yoghurts in relation to the samples and storage time. The results show that the number of live bacteria of *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* and *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* strains complied with the statutory requirements, while the number of bacteria of *Bifidobacterium* genus could have been affected by various factors which caused that according to the results of the work, certain samples lacked the sufficient numbers of these bacteria.

**Key words:** probiotic microorganisms, fermented dairy products, yoghurt, bacteria viability, acidity, storage.

## Obsah

1. ÚVOD .....	10
2. LITERÁLNÍ PŘEHLED .....	11
2.1 Probiotické mikroorganismy a jejich význam.....	11
2.2 Fermentace mléka .....	14
2.2.1 Produkce vitamínů skupiny B .....	15
2.2.2 Produkce bioaktivních peptidů.....	16
2.3 Fermentované mléčné výrobky .....	17
2.4 Jogurt.....	19
2.4.1 Výroba jogurtu .....	19
2.4.2 Rozdělení jogurtů .....	23
2.4.3 Jogurty s obsahem probiotických mikroorganismů .....	23
2.4.4 Životaschopnost probiotických mikroorganismů v jogurtech .....	24
3. MATERIÁL A METODIKA .....	27
3.1 Cíl práce .....	27
3.2 Materiál a metodika pokusu .....	27
3.3 Analýza vzorků .....	28
3.3.1 Stanovení kyselosti .....	28
3.3.2 Mikrobiologická stanovení .....	29
3.4 Statistické vyhodnocení dat.....	35
4. VÝSLEDKY A DISKUSE .....	36
4.1 Kyselost u sledovaných jogurtů .....	36
4.1.1 Aktivní a titrační kyselost jogurtu v závislosti na sledovaném vzorku.....	37
4.1.2 Souhrnné vyhodnocení vlivu sledovaných vzorků a doby skladování .....	39
4.2 Mikrobiologické ukazatele u sledovaných jogurtů .....	42



4.2.1 Růst bakterií kmenů <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> a <i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i> v závislosti na sledovaném vzorku	42
4.2.2 Růst bakterií rodu <i>Bifidobacterium</i> v závislosti na sledovaném vzorku	50
4.2.3 Celkový počet mikroorganismů v závislosti na sledovaném vzorku	53
4.2.4 Souhrnné vyhodnocení vlivu sledovaných vzorků a doby skladování	56
5. ZÁVĚR	63
6. SUMMARY	65
7. SEZNAM LITERATURY	67
8. SEZNAM ZKRATEK	73
9. SEZNAM TABULEK A GRAFŮ	74
9.1 Tabulky	74
9.2 Grafy	75

## 1. ÚVOD

Probiotické mikroorganismy jsou důležité ve výživě člověka, pozitivně působí na jeho zdravotní stav, především na složení střevní mikroflóry, která má klíčovou úlohu při vytváření funkčního imunitního systému. Proto je jejich využití v potravinách velice opodstatněné.

Tato práce je zaměřena na probiotické bakterie obsažené ve fermentovaných mléčných výrobcích, které vznikají fermentací mléka, což je proces kysání, ve kterém je mléčný cukr laktóza hydrolyzován na monosacharidy glukózu a galaktózu. Významným fermentovaným mléčným produktem je jogurt - vyvážená, lehce stravitelná, zdraví prospěšná potravina, která je zdrojem plnohodnotných bílkovin, vápníku, fosforu a různých vitamínů především ze skupiny B.

Cílem této práce bylo sledovat zastoupení probiotických mikroorganismů (*Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* a *Bifidobacterium*) ve vybraných kysaných mléčných produktech (bílé jogurty) po ukončení zracího procesu.

## 2. LITERÁLNÍ PŘEHLED

### 2.1 Probiotické mikroorganismy a jejich význam

Pojem „probiotic“ se začal užívat od roku 1965, pochází z řeckého slova „*pro bios*“, které znamená „pro život“ (SUCHÁNEK, 2006).

V současnosti nejčastěji používanou definicí je definice z roku 1989, jejímž autorem je Roy Fuller. Charakterizoval probiotikum jako živý, mikrobiální, potravinový doplněk, který pozitivně ovlivňuje hostitele zlepšením složení jeho střevní mikroflóry (KOHOUT, 2010).

Pro zařazení mezi probiotika musí jednotlivé bakteriální kmeny splňovat několik základních požadavků. Bakteriální kmeny musí mít prokazatelně pozitivní vliv na zdraví hostitele a musí být zdravotně nezávadné, izolované ze stejného živočišného druhu, jako je předpokládán příjemce, nesmí být toxické ani patogenní. Forma, ve které je probiotikum do trávicího ústrojí aplikováno, musí mít schopnost přežít v trávicím ústrojí a být metabolicky aktivní. Bakterie musí být životaschopné během skladování, důležité jsou i senzorické vlastnosti potravin nebo potravinového doplňku, ve kterých jsou obsaženy (NEVORAL, 2005).

Sdružená expertní skupina FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization) doporučuje pro výrobky, kde výrobce deklaruje přítomnost probiotik, uvedení některých důležitých údajů, které by vždy měly být k dispozici na obalu produktu. Musí být označen rod, druh a kmen probiotických mikroorganismů, minimální množství mikroorganismů na konci deklarované doby spotřeby, doporučená dávka, která obsahuje množství probiotik zajišťující účinek, podmínky uchování a kontaktní údaje, kde jsou k dispozici detailní informace o výrobci (KOKESHOVÁ, 2009).

Způsob prokazování prospěšných účinků na zdraví podle směrnice: Pokyny pro hodnocení probiotik, vytvořenou sdruženou expertní pracovní skupinou FAO/WHO doporučuje mimo jiné i Mezinárodní vědecká asociace pro probiotika a prebiotika (ISAPP) a Evropská asociace pro kultury do potravin a krmiv (EFFCA). Principiálním výsledkem studií účinnosti probiotik mají být prokázané prospěšné účinky, jakou jsou statisticky a biologicky významné zlepšení stavu, symptomů, příznaků, pohody a kvality života, snížení rizika onemocnění, rychlejší uzdravení,

a to v prokázané korelaci s testovaným probiotikem (ŠPELINA, WINKLEROVÁ 2009).

Probiotické bakterie mohou příznivě působit na trávicí trakt svou vlastní přítomností tím, že vytěsňují patogenní nebo potenciálně patogenní mikroorganismy díky růstu a produkci kyselých látek, tvorbě antimikrobiálních látek, konkurencí o potravu nebo úpravou prostředí, kdy je zvýhodněn růst takových skupin již přítomných bakterií, které pozitivně ovlivňují zdravotní stav hostitele. Další prospěšné působení spočívá v tvorbě vitamínů a mastných kyselin s krátkým řetězcem (tzn. těkavých mastných kyselin, zejména máselné kyseliny), které slouží jako substrát pro buňky tlustého střeva (kolonocyty) (KOHOUT, 2010). Mezi nejužnavanější příznivé účinky na lidské zdraví patří imunomodulační schopnosti probiotik, neboť mají mimo jiné prospěšný vliv na slizniční systémovou imunitu. Střevní mikroflóra má klíčovou úlohu při vytváření funkčního imunitního systému (ŠPELINA, WINKLEROVÁ, 2009).

Probiotika dokážou obnovit fyziologickou rovnováhu střevní mikroflóry porušenou používáním některých léků nebo konzervantů, barviv a pesticidů, které mohou být obsažené v potravě. K narušení fyziologické rovnováhy může dojít také při nesprávném životním stylu a výživových návycích (KOHOUT, 2010).

Mezi další příznivé účinky patří antimikrobiální aktivita v souvislosti s nejrůznějšími druhy gastrointestinálních infekcí (akutní průjemové onemocnění, průjemové onemocnění spojené s užíváním antibiotik, ozařováním, prevence tzv. cestovních průjmů), dále prevence atopického ekzému, zlepšení trávení laktózy, redukce hladiny sérového cholesterolu, antikarcinogenní účinky, léčení urovaginálních infekcí apod. (HORÁČKOVÁ, ŠVIRÁKOVÁ, 2009).

Probiotické bakterie nekolonizují střevo natrvalo, ale jen dočasně, většinou jsou detekovatelné jen po dobu přijímání potravin s probiotiky (ŠPELINA, WINKLEROVÁ 2009).

### **Nejčastěji používané rody probiotických bakterií**

I když existuje velké množství probiotických mikroorganismů (tabulka č. 1), nejčastěji jsou využívány rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, méně pak druhy *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* a *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (HORÁČKOVÁ, 2010).

**Tabulka č. 1)** Přehled nejčastěji využívaných probiotických bakterií (HORÁČKOVÁ, ŠVIRÁKOVÁ, 2009)

<b>Mikrobiální druh</b>	<b>kmen</b>
<b><i>Bifidobacterium</i></b>	
<i>longum</i>	B536, SBT-2928
<i>breve</i>	Yakult
<i>bifidus</i>	Bb-11
<i>lactis (animalis)</i>	Bb-01
<i>infantis</i>	Shirota
<b><i>Lactobacillus</i></b>	
<i>acidophilus</i>	LA1/LA5, NCFM
<i>delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	Lb 12
<i>paracasei</i>	CRL 431, F19
<i>casei</i>	Shirota, Immunitass
<i>rhamnosus</i>	GG1, GR-1
<i>plantarum</i>	299v
<i>salivarius</i>	UCC118
<i>lactis</i>	La1
<i>reuteri</i>	SD2112
<i>fermentum</i>	RC-14
<i>johnsonii</i>	La1
<i>helveticus</i>	B02
<b><i>Lactococcus lactis</i></b>	L1a

Probiotika se na trhu objevují jako léčiva, jako součást doplňků stravy nebo jako součást funkčních potravin (HEUBNER et al., 2007). Jako funkční potraviny jsou označovány potraviny, u kterých je mimo jejich nutriční hodnotu dostatečně prokázán příznivý účinek na jednu či více cílových funkcí v organismu, jež zlepšují fyzický i duševní zdravotní stav anebo přispívají ke snížení rizika vzniku určitých onemocnění (CONTOR, 2001). Mezi tyto funkční potraviny patří mimo jiné fermentované mléčné výrobky, vznikající fermentací mléka.

## 2.2 Fermentace mléka

Mléčné kysání je proces, při němž je laktóza rozštěpena bakteriálními laktázami na monosacharidy glukózu a galaktózu. Základním anaerobním katabolickým procesem sacharolytických bakterií je tzv. glykolýza neboli Embden – Meyerhofova metabolická cesta, kdy dochází k přeměně hexóz na pyruvát. Ten je pak dále metabolizován u různých kmenů mikroorganismů odlišným způsobem. Cílem jeho přeměny je vždy současná přeměna redukováného kofaktoru (NADH) ve formu schopnou dehydrogenovat další molekulu substrátu při glykolýze v  $\text{NAD}^+$  (MARTH, STEELE, 2001).

U homofermentativních mléčných bakterií je pyruvát redukován za součinnosti NADH na laktát tj. anion mléčné kyseliny. Při tomto kvašení získávají mléčné bakterie volnou energii nezbytnou k růstu v anaerobním prostředí. Množství vzniklé kyseliny mléčné je pak u různých druhů variabilní (MAXA, RADA, 2002).

Heterofermentativní mléčné bakterie na rozdíl od homofermentativních mléčných bakterií neobsahují enzym aldolázu, který štěpí hexóza-1,6-bisfosfát ve dva triosafosfáty. Proto převádějí hexózy oxidačním mechanismem hexózafosfátového zkratu v pentóza-5-fosfát a oxid uhličitý. Tato pentóza-5-fosfát se pak enzymaticky štěpí na acetylfosfát a glycerinaldehyd-3-fosfát. Z acetylfosfátu vzniká za součinnosti NADH etanol. Glycerinaldehyd 3-fosfát je glykolýzou přeměněn v pyruvát a pak na laktát (ŠILHÁNKOVÁ, 2002).

Doprovodnou reakcí enzymové hydrolýzy laktózy je transgalaktosylace.  $\beta$ -galaktosidáza katalyzuje přenos galaktosylu, uvolněného po rozštěpení vazby mezi glukózou a galaktózou, na jiný sacharid přítomný v prostředí. V nejjednodušším případě jde o hydrolýzu za vzniku volné galaktózy, v ostatních případech vznikají galaktooligosacharidy, které se v malé míře mohou uplatňovat jako prebiotikum (SAKO et al., 1999).

V trávicím ústrojí se laktóza během fermentačních pochodů hydrolyzuje působením bakteriální  $\beta$ -galaktosidázy na D-galaktózu a D-glukózu, která se dále jejich enzymatickou činností mění na kyselinu mléčnou. Kyselina mléčná se ve fermentovaných mléčných výrobcích vyskytuje ve dvou optických izomerech. Pravotočivá L(+) kyselina mléčná je kompletně v lidském organismu metabolizována, levotočivá D(-) kyselina mléčná se přeměňuje jen omezeně

a pozvolna. *Lactobacillus acidophilus* a bifidobakterie produkují převážně L(+) kyselinu mléčnou, kterou člověk snáze metabolizuje (CUPÁKOVÁ et al., 2002).

Jedním z nejvýznamnějších rodů zkvašující laktózu na kyselinu mléčnou je rod *Lactobacillus*. Podle produktů katabolického metabolismu se rozděluje tento rod na homofermentativní mléčné bakterie, které při zkvašování sacharidů produkují pouze kyselinu mléčnou a heterofermentativní mléčné bakterie, které mimo kyseliny mléčné produkují ještě například kyselinu octovou, etanol, glycerol a CO<sub>2</sub>. Mezi homofermentativní druhy rodu *Lactobacillus* patří *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, a *Lactobacillus casei*. Dále sem patří rody *Streptococcus*, *Lactococcus* a rod *Pediococcus*. Mezi heterofermentativní druhy rodu *Lactobacillus* patří *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis* a *Lactobacillus buchneri* a rod *Leuconostoc* (ŠILHÁNKOVÁ, 2002).

Během kvašení produkují mikroorganismy řadu sekundárních metabolitů, z nichž některé jsou zdraví prospěšné a to zejména vitamíny skupiny B a bioaktivní peptidy. Nadprodukce vitamínů bakteriemi mléčného kvašení v mléce je velmi atraktivní pro průmyslovou výrobu mléčných fermentovaných výrobků (PETŘÍKOVÁ, 2012).

### 2.2.1 Produkce vitamínů skupiny B

Většina fermentovaných výrobků obsahuje v porovnání se syrovým mlékem vyšší množství kyseliny listové. Tuto skutečnost lze vysvětlit tak, že některé startovací kultury bakterií, které se používají při mlékárenském kvašení syntetizují foláty *de novo* a vylučují přebytek těchto látek do růstového média. Příkladem jsou startovací jogurtové kultury druhu *Streptococcus thermophilus* a startovací kultura sýrů a kysaných nápojů *Lactococcus lactis*. Například syrové mléko obsahuje 30 – 50 µg/l kyseliny listové a fermentovaný mléčný výrobek jogurt 60 – 100 µg/l kyseliny listové (LE BLANC et al., 2007).

Dále jsou některé bakterie mléčného kvašení schopny produkovat malé množství riboflavinu (vitamín B<sub>2</sub>) do prostředí růstového média (HUGENHOLTZ et al., 2002). Mezi další vitamíny, které jsou schopny produkovat jen některé mikroorganismy, patří kobalamin (vitamín B<sub>12</sub>). Příkladem bakteriálního druhu schopného produkovat tento vitamín je *Lactobacillus reuteri* (TARANTO et al., 2003).

## 2.2.2 Produkce bioaktivních peptidů

Bílkoviny kysaných mléčných výrobků jsou lépe stravitelnější. Kasein je v nich koagulován, většinou dochází ke kaseinolýze. Část mléčných bílkovin se štěpí bakteriálními protézami (polypeptidázy, peptidázy) již při fermentaci na peptidy a volné aminokyseliny. Další část proteinů je koagulována kyselinou mléčnou (produkovanou bakteriemi mléčného kvašení). Trávicí enzymy je mohou takto rychleji štěpit díky zvětšenému povrchu proteinů (GRIEGER, HOLEC, 1990).

V kysaných mléčných výrobcích je činností mikroflóry zvýšen obsah některých volných aminokyselin (tryptofan, metionin, lysin) (CUPÁKOVÁ et al., 2002).

Enzymovou hydrolyzou kaseinu vznikají fosforylované peptidy, ty vytvářejí v zakysaném mléce rozpustné komplexy s vápníkem a významně zvyšují jeho biologickou dostupnost (LUKÁŠOVÁ, SMRČKOVÁ, 2003).

Ze zakysaného mléka byly také izolovány hydrolyzáty kaseinu, které působí jako ACE-inhibitory (angiotensin-converting-enzyme inhibitor) s významným antihypertenzním účinkem a mohou se uplatnit i jako růstové faktory bifidobakterií (STEER et al., 2000).

Bioaktivní peptidy jsou peptidy obsažené ve funkčních potravinách, které kromě jejich výživové hodnoty mají také pozitivní fyziologický účinek v těle (VERMEIRSEN et al., 2004). Bioaktivní peptidy mohou být skryté ve struktuře bílkovin a k jejich uvolnění a aktivaci je nutná proteolýza (MINERVINY et al., 2003). Některé bioaktivní peptidy slouží jako přenašeče vápníku a jiných minerálů a tím zajišťují jejich rychlejší dostupnost (SILVA, MALCATA, 2005).

Průmyslově využívané kmeny bakterií mléčného kysání vytvářejí pomocí přirozené proteolýzy během fermentace bioaktivní peptidy. Využití mléčných bílkovin (především kaseinu) bakteriemi mléčného kvašení obvykle začíná štěpením. Počátek štěpení je uskutečňován pomocí extracelulárních proteináz na peptidy, které se následně štěpí na aminokyseliny pomocí intracelulárních peptidáz (CHRISTENSEN, 1999).

Při mléčném kvašení vzniká velké množství antimikrobiálních bioaktivních peptidů. Je zde možnost, že by se tyto antimikrobiální peptidy mohly užívat



v budoucnu při léčbě bakteriálních infekcí místo použití antibiotik. Tuto možnost nabízí též fagy a bakteriociny mléčných bakterií (JOEGER, 2003).

### **2.3 Fermentované mléčné výrobky**

Podle Vyhlášky Ministerstva zemědělství ČR č. 77/2003 Sb. je jako fermentovaný mléčný výrobek označován výrobek získaný kysáním mléka, smetany, podmáslí nebo jejich směsi za použití mikroorganismů tepelně neošetřený po kysacím procesu. Vyhláška též specifikuje použité mikroorganismy a stanovuje pro jednotlivé skupiny kysaných mléčných výrobků množství bakterií použité mikrobiální kultury (tabulka č. 2).

Mezi potraviny obsahující probiotické bakterie patří zelenina konzervována mléčným kysáním – v našich podmínkách velmi známé kysané zelí a kvašené okurky, nikoliv zelenina pasterovaná v kyselém prostředí. Méně známé, ale velmi perspektivní by mohly být kysané houby, protože kromě probiotických bakterií jsou zásobárnou specifické vlákniny, která je také nutná pro správnou funkci střev. Mezi další potraviny s probiotiky můžeme řadit fermentované masné výrobky např.: poličan, herkules, křemešník, čabajské a uherské klobásy. Nejvíce zastoupenými potravinami s obsahem probiotik jsou však kysané mléčné výrobky, kam patří např.: jogurty, jogurtová mléka, acidofilní mléka, kefíry, kefirová mléka, kysané mléko nebo smetanový zákys, kysaná nebo zakysaná smetana a kysané podmáslí (KOVÁŘÍKOVÁ, ERBAN, 2007).

V ČR je používání probiotik vymezeno Vyhláškou Ministerstva zdravotnictví č. 352/2009 Sb., kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin.

**Tabulka č. 2)** Druhy živých mikroorganismů v kysaných mléčných výrobcích (Vyhláška Ministerstva zemědělství ČR č. 77/2003 Sb.).

Druh výrobku	Použité mikroorganismy	Mléčná mikroflóra výrobku v 1 g
Acidofilní mléko	<i>Lactobacillus acidophilus</i> a další mezofilní, příp. termofilní kultury bakterií mléčného kvašení	$10^6$ <i>Lactobacillus acidophilus</i>
Jogurty *)	protosymbiotická směs <i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i> a <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	$10^7$
Kysané mléko, vč. smetanového zákysu, podmáslí a kysané smetany	monokultury nebo směsné kultury bakterií mléčného kvašení	$10^6$
Kefír	zákys připravený z kefírových zrn, jehož mikroflóra se skládá z kvasinek zkvašující laktózu <i>Kluyveromyces marxianus</i> i nezkvašujících laktózu <i>Saccharomyces unisporus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces exiguus</i> a dále <i>Leuconostoc</i> , <i>Lactococcus</i> a <i>Aerobacter</i> , rostoucí ve vzájemném společenství	bakterie mléčného kvašení $10^6$ a kvasinky $10^4$
Kefírové mléko	zákys skládající se z kvasinkových kultur rodu <i>Kluyveromyces</i> , <i>Torulopsis</i> nebo <i>Candida valida</i> a mezofilních a termofilních kultur bakterií mléčného kvašení v symbióze	bakterie mléčného kvašení $10^6$ a kvasinky $10^2$
Kysaný mléčný výrobek s bifidokulturou	<i>Bifidobacterium ssp.</i> v kombinaci s mezofilními a termofilními bakteriemi mléčného kvašení	$10^6$ bifidobakterie

\*) U jogurtových výrobků mohou být kromě základní jogurtové kultury přidávány kmeny produkující kyselinu mléčnou a pomáhající dotvářet specifickou chuťovou nebo texturovou charakteristiku výrobku. Musí však být zachován optimální poměr obou základních kmenů jogurtové kultury (Vyhláška Ministerstva zemědělství ČR č. 77/2003 Sb.).

## 2.4 Jogurt

Jogurt patří mezi nejrozšířenější a nejoblíbenější kysané mléčné výrobky. Výroba jogurtu byla známa již 5000 let před naším letopočtem v zemích středního Východu. Prvotní záměr výroby spočíval ve snadnějším uchování mléka v horkém podnebí a zároveň i pro jeho lahodnou chuť (VALENTOVÁ, 2001).

Jogurty patří mezi kysané mléčné výrobky s termofilními bakteriemi. Jak je uvedeno v tabulce č. 2, jogurtová kultura obsahuje bakterie *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. Jogurt je vyvážená a zdraví prospěšná potravina, která má relativně nízkou energetickou hodnotu, ale je bohatým zdrojem plnohodnotných bílkovin, vápníku, fosforu a různých vitamínů skupiny B (ŠTAFEN, 2011). Definice jogurtu byla stanovena dle FAO/WHO následně: „Jogurt je sražený mléčný produkt získaný mléčným kysáním pomocí bakterií *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*. Mikroorganismy ve finálním výrobku musí být životaschopné a v hojném množství“ (HORIUCHI et al., 2009).

Oba mikroorganismy jogurtové kultury mají symbiotický vztah a spolu se vyznačují rychlou tvorbou kyseliny mléčné, při optimální teplotě 40 – 43 °C koagulují kasein za 2 – 3 hodiny. Koagulace začíná při hodnotě pH 5,3 a ukončená je při 4,5. Druhou významnou vlastností jogurtového zákysu je tvorba aromatické látky acetaldehydu v množství 20 – 30 mg/l (GÖRNER, VALÍK, 2004).

### 2.4.1 Výroba jogurtu

Mléko určené pro výrobu kysaných mléčných výrobků musí svými vlastnostmi a složením tvořit vhodné podmínky pro rozvoj přidaných čistých mlékařských kultur. Mléko nesmí obsahovat žádné inhibiční látky, musí být získáváno hygienickým způsobem od zdravých a dobře krmených dojníc a musí mít normální složení a vlastnosti. Na výrobu kysaných mléčných výrobků se používá mléko o různé tučnosti, popřípadě i obnovené sušené mléko. Pro vlastní výrobu se mléko standardizuje na obsah tuku a sušiny (ŠUSTOVÁ, LUŽOVÁ, 2008). Pro vylepšení konzistence se zvyšuje obsah sušiny zahuštěním nebo přidávkem sušeného odstředěného mléka (asi 15 %). Homogenizací se stává produkt chuťově plnější a viskóznější. Mléko na výrobu jogurtů se při pasteraci zahřívá na vysoké teploty, aby syrovátkové bílkoviny denaturovaly a navázaly se na kaseinové micely.

Bílkoviny takto silněji vážou vodu, dochází k odbourání cysteinu a sacharidů (DRDÁK et al., 1996).

Po ochlazení mléka na teplotu fermentace (kolem 30 až 40 °C) se do mléka přidávají mlékařské kultury (ŠUSTOVÁ, LUŽOVÁ, 2008). Mléka určená na výrobu jogurtu se obvykle očkují 1 - 2 % aktivní kultury (JAY et al., 2005). *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* se obvykle přidávají do jogurtové směsi v poměru 1:1. Kultury mohou být připravovány odděleně z čistých kmenů nebo se mohou lyofilizované přidávat přímo do směsi (MARTH, STEELE, 2001).

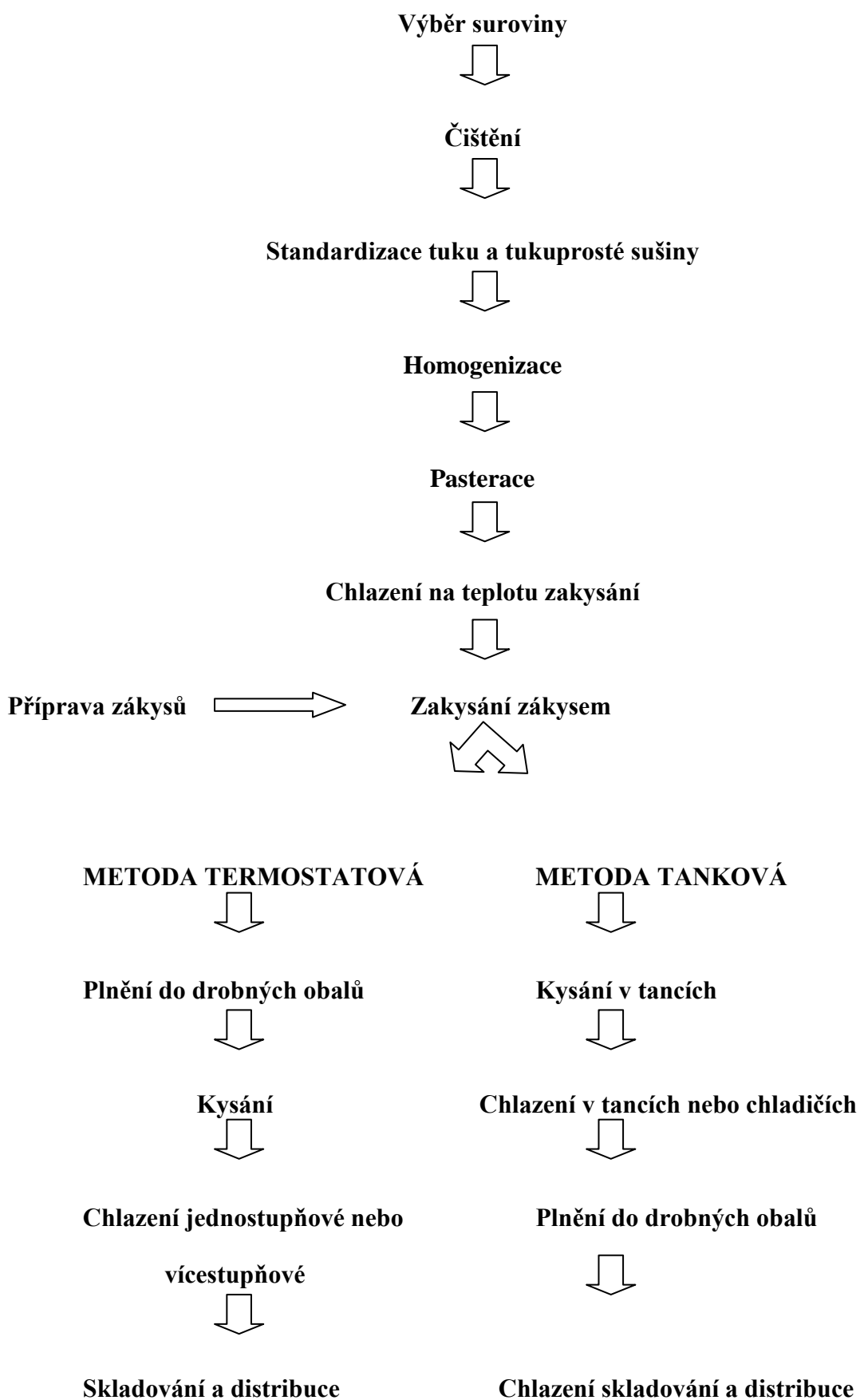
Při fermentaci standardizované, homogenizované a vysokopasterované směsi pro výrobu jogurtů je důležité udržet správný poměr laktobacilů a streptokoků a vytvořit podmínky pro vznik požadovaného množství metabolitů (kyselina mléčná 0,85 – 1,20 %, acetaldehyd 10 – 15 mg/kg, biacetyl 1 – 2 mg/kg). Poměr obou druhů je nejvíce ovlivněn dobou kultivace, teplotou inkubace a objemem inokula. Zvýšení inokula, doby i teploty kultivace se posouvá poměr bakterií ve prospěch laktobacilů, což se projeví vyšší kyselostí a vyšším podílem fyziologicky méně výhodného D(-) izomeru kyseliny mléčné. V současné době se fermentace obvykle vede tak, aby výrobek obsahoval v převaze streptokoky, byl méně kyselý a obsahoval vyšší podíl L(+) izomeru kyseliny mléčné. Sensorické hodnocení jogurtové kultury se provádí po jejím vychlazení na 10 °C. Dobrá kultura vykazuje hustou konzistenci, povrch je suchý, bez syrovátky. Film neulpívá na stěně, ale rozděluje se v praménky. Chuť je čistě kyselá, specificky jogurtová (KADLEC et al., 2009).

V ČR se využívají dva typy fermentace jogurtů. Prvním typem je fermentace ve spotřebitelských obalech tedy tzv. **klasická termostatová metoda**, obvykle se uskutečňuje po dobu 3 – 4 hodin při teplotě 42 – 45 °C, s inokulem 1 – 2 % (obj.). Spotřebitelské balení je naplněno jogurtovou směsí ještě před fermentací. Minimální titrační kyselost se po 4 hodinách kultivace při 42 °C pohybuje v rozmezí 40 až 50 SH (2,5 mmol H<sup>+</sup>/l) a aktivní kyselost v rozmezí 4,0 až 4,5. Při výrobě se ovšem fermentace ukončuje dříve při vyšším pH (např. 4,7 – 5,0), protože vychlazení v obalu je relativně pomalé a fermentace částečně probíhá i během chlazení (KADLEC et al., 2009). Jogurt se sušinou 21% má mít po ukončení fermentace 60 – 65 SH a v době expedice ne víc jak 75 SH. Při tomto způsobu výroby má jogurt bílou barvu, hladký povrch a jemnou konzistenci. Chuť a vůně je čistá, výrazně

aromatická, jogurtová, správně kyselá. Při nedostatečném vychlazení po ukončení fermentace může docházet k dalšímu prokysávání, a tím ke vzniku kovové příchuti (GÖRNER, VALÍK, 2004).

Druhým typem fermentace je **fermentace tanková**. Tento typ jogurtu se vyrábí fermentací jogurtové směsi v tanku, která je až po fermentaci a promíchání balena do spotřebních obalů (HORIUCHI et al., 2009). Fermentace může probíhat i po dobu až 16 – 18 hod., při teplotě 30 °C, s inokulem 0,05 – 0,10 % (obj.). Obvyklé jsou i postupy za podmínek ležících mezi klasickou termostátovou a tankovou fermentací (např. s dobou 7 – 8 hodin, při teplotě 30 – 36 °C). Při dlouhodobé kultivaci při nižší teplotě méně rostou laktobacily, což má za následek nižší kyselost a méně typickou jogurtovou chuť a vůni. Chlazení u tankové metody probíhá obvykle dvojstupňově: (1. stupeň kontinuálně na teplotu 20 °C, 2. stupeň po plnění v obalu na teplotu 4 – 8 °C), protože během chlazení se částečně obnoví struktura koagulátu a zvýší viskozita výrobku. Je možné i jednostupňové chlazení, které ovšem vede k méně viskózní konzistenci. Na konci fermentace má mít jogurt kyselost 70 – 75 SH (ŠUSTOVÁ, LUŽOVÁ, 2008).

## SCHÉMA VÝROBY JOGURTU (ZADRAŽIL, 2002)



Při výrobě jogurtů, kde se požaduje trvanlivost po výrobě, po dobu přepravy a uchování v potravinářských prodejnách 15 – 30 dní, nesmí jejich teplota překročit 8 °C. Snahou závodu je, aby teplota produktu nepřekročila 6 °C. Při manipulaci s mléčnou směsí po předepsané pasteraci se ve fermentačních tancích pracuje zásadně se vzduchem pročištěným mikrobiologickými filtry (GÖRNER, VALÍK, 2004).

#### **2.4.2 Rozdělení jogurtů**

Jogurtové výrobky se mohou dělit na přírodní jogurty a ochucené, které obsahují navíc další různé složky, např. ovoce, cereálie, aromata, barviva a přísady zlepšující konzistenci (HRABĚ et al., 2006).

Podle obsahu tuku lze dělit jogurty na smetanové (obsahují více než 10 % tuku), bílé (více než 3 %), jogurty se sníženým obsahem tuku (0,5 – 3 %) a nízkotučné (0 – 0,5 % tuku) (Vyhláška Ministerstva zemědělství ČR č. 77/2003 Sb.).

Dále se jogurty rozdělují podle použitého způsobu fermentace a zpracování koagulátu na jogurty s nerozmíchaným koagulátem (fermentace probíhá přímo ve spotřebitelském obalu), jogurty s rozmíchaným koagulátem (fermentace probíhá v tanku, po promíchání a vychlazení se plní do obalů), jogurty pitné (fermentace probíhá v tanku, následuje ochlazení na 18 – 20 °C, přidají se přísady a probíhá ošetření pro prodloužení doby použitelnosti) (KADLEC, 2008).

#### **2.4.3 Jogurty s obsahem probiotických mikroorganismů**

V posledních letech byla snaha o zlepšování životaschopnosti probiotik ve fermentovaných mléčných výrobcích, neboť jejich zastoupení v potravinách hraje pro spotřebitele důležitou roli. Laktobacily a bifidobakterie jsou přidávány do směsných kultur pro vytvoření funkčních potravin (SALAZAR et al., 2009).

Především jsou preferovány bifidobakterie lidského původu: *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *B. infantis* a *B. bifidum*. Musí být použito o 10 % více inokula, protože bifidobakterie produkují kyselinu mléčnou pomalu. Inkubace probíhá při teplotě 42 °C 6 – 8 hodin, vytvoří se sraženina a počet živých mikroorganismů ve finálním výrobku musí být podle Vyhlášky Ministerstva zemědělství ČR č. 77/2003 Sb. 10<sup>6</sup> KTJ/g (kolonii tvořící jednotky). Výhodou při používání bifidobakterií je, že nedochází k vysokému okyselení během výroby a skladování

a výsledný jogurt má tedy jemnější chuť. K zajištění životaschopnosti kultury během skladování výsledného jogurtu musí být vybrány vhodné kmeny bifidobakterií (MARTH, STEELE, 2001).

#### **2.4.4 Životaschopnost probiotických mikroorganismů v jogurtech**

Životaschopnost probiotických bakterií v jogurtu závisí na použité kultuře, interakcích mezi přítomnými druhy, produkci peroxidu vodíku během bakteriálního metabolismu a také na aciditě výrobku. Dále je životaschopnost závislá na přístupnosti živin, přítomnosti růstových promotorů a inhibitorů, koncentraci sacharidů, množství rozpuštěného kyslíku a jeho průchodnosti přes obal (zvláště platí pro *Bifidobacterium sp.*), velikosti inokula a době fermentace. Bifidobakterie jsou přirozeně anaerobní a proto jejich růst a přežívání negativně ovlivňuje vysoký obsah kyslíku. *Lactobacillus acidophilus* má vysokou pufrační kapacitu cytoplazmy (pH 3,72 – 7,74), což mu umožňuje přežít změny cytoplazmatického pH a udržet si stabilitu i v kyselých podmínkách. V porovnání s bifidobakteriemi je *Lactobacillus acidophilus* také mnohem tolerantnější ke kyselým podmínkám a roste i při nižším pH než 5 (GÖRNER, VALÍK, 2004).

Tolerance mikroorganismů rodu *Bifidobacterium ssp.* ke kyselým podmínkám je druhově specifická. *B. longum* snáší kyselé prostředí lépe než *B. infantis*, *B. adolescentis* a *B. bifidum*. *B. longum* také lépe roste v čerstvém mléce, zatímco *B. animalis ssp. animalis* potřebuje ke svému růstu mléko fermentované. I když studie prokázaly, že tolerance *Bifidobacterium ssp.* ke kyselým podmínkám a žlučovým kyselinám je druhově specifická, DAVE, SHAH(1997<sup>A</sup>) prokázali, že *B. animalis ssp. animalis* přežívá lépe než ostatní druhy.

*Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* ovlivňuje růst *Lactobacillus acidophilus* a bifidobakterií díky tomu, že produkuje během fermentace kyseliny a peroxid vodíku. Díky proteolytické schopnosti roste *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* rychleji a produkuje více kyselin. Kromě toho se také uvolňují esenciální aminokyseliny valin, glycin a histidin, které růst bifidobakterií podporují. *Streptococcus thermophilus* růst probiotických organismů neinhibuje a pravděpodobně ho stimuluje díky jeho spotřebě kyslíku (DAVE, SHAH, 1997<sup>A</sup>).



## Fermentační média

Použití probiotických mikroorganismů k fermentaci mléka je značně omezeno jejich pomalým růstem v mléce. I přestože *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium ssp.* vykazují galaktosidázovou aktivitu, je důvodem jejich pomalého růstu nízká koncentrace volných aminokyselin a peptidů v mléce, které tyto mikroorganismy potřebují ke svému růstu. Růst *L. acidophilus* a *Bifidobacterium ssp.* v mléce lze zvýšit přidáním kaseinového nebo proteinového hydrolyzátu, extraktu z kvasinek, glukózy a vitamínů. Přídavek mléčného proteinu zvyšuje pufrční kapacitu fermentovaného mléka a zvyšuje životaschopnost probiotických mikroorganismů (LEDVINA et al., 2004).

Na syntetických médiích rostou probiotické organismy obvykle lépe než v mléce. Tato média jsou však pro rozsáhlejší kultivace probiotických bakterií nákladná a drahá a také mohou způsobovat nepříjemnou pachů. K výrobě kvalitního produktu je tedy nutné použít jako médium mléko kvůli přítomnosti kaseinu. Pomalý růst probiotických mikroorganismů v mléce může způsobit přerůstání nežádoucími mikroorganismy, které následně mohou zapříčinit nepříjemnou chuť výrobku. Fermentační proces s *Lactobacillus delbrueckii* a *Streptococcus thermophilus* trvá 4 hodiny, pokud je však přítomna pouze probiotická kultura, trvá fermentace 20 – 24 hodin. Z tohoto důvodu jsou obě kultury přidávány buď společně, nebo je fermentace rozdělena, kdy probiotika rostou v jedné části mléka (aby se docílilo vysokého počtu jejich buněk) a mikroorganismy startovací kultury rostou v jiné části mléka. Po ukončení tohoto způsobu fermentace se obě části smíchají dohromady (LEDVINA et al., 2004, DRAKARLARAKOU et al., 2003).

## Vliv kyslíku na životaschopnost

Pro zajištění probiotických vlastností výrobku je důležité, aby bakterie přežily i v trvanlivých výrobcích. Bifidobakterie jsou anaerobní a přítomnost kyslíku je kritickým problémem. Kyslík může snadno pronikat do mléka během výroby jogurtu. Odstranění kyslíku během výroby probiotických mléčných produktů vyžaduje speciální vybavení, které zajistí anaerobní podmínky (DAVE, SHAH, 1997<sup>B</sup>).

Kyslík ničí probiotické kultury dvěma způsoby. První je přímá toxicita, kdy určité probiotické kultury jsou na kyslík citlivé a zabijí je již jeho samotná

přítomnost. Druhým způsobem je vznik metabolického peroxidu vodíku u některých kultur. Například u *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, byla zaznamenána i synergistická inhibice probiotických kultur v důsledku tvorby kyselin a peroxidu vodíku (TALWALKAR, KAILASAPATHY, 2004).

KAILASAPATHY et al. (2008) zjistili, že přídavek ovocné složky (mango, rybíz, jahoda, malina, borůvka a mučenka) neměl významný vliv na životaschopnost probiotických bakterií *L. acidophilus* a *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* v jogurtech s rozmíchaným koagulátem. Nepatrný vliv mělo na přežití probiotických bakterií pH, nicméně množství probiotik po 35 – dnech splňovalo požadovanou úroveň  $10^6 - 10^7$  KTJ/g.

### 3. MATERIÁL A METODIKA

#### 3.1 Cíl práce

Cílem práce bylo sledovat zastoupení probiotických mikroorganismů ve vybraných kysaných mléčných produktech a posoudit zjištěné hodnoty s požadavky legislativy.

#### 3.2 Materiál a metodika pokusu

V tržní síti byly zakoupeny vzorky tří druhů jogurtů s deklarovaným zastoupením bifidobakterií (tabulka č. 3)

**Tabulka č. 3)** Charakteristika sledovaných vzorků jogurtů – základní chemické složení (g/100g)

Vzorek	Tuky *	Sacharidy *	Bílkoviny*	Sušina 0. den skladování **	Sušina 56. den skladování **
1	3,4	5,1	4,5	13,2	13,4
2	3,8	3,8	3,5	11,9	12,1
3	3,7	3,9	3,6	12,5	12,6

\*obsah vybraných ukazatelů chemického složení uvedených na obalech vzorků

\*\*obsah sušiny stanovený v akreditované laboratoři “AGRO-LA“, spol. s.r.o., Jindřichův Hradec

Experimentální část práce byla uskutečněna v laboratoři společnosti “AGRO-LA“, spol. s. r. o., Jindřichův Hradec. Zde byly jogurty uchovány při skladovací teplotě 4 °C po dobu osmi týdnů a pravidelně analyzovány na vybrané mikrobiologické a fyzikálně-chemické ukazatele.

Pro vyhodnocení vlivu změn v kyselosti a ve vybraných mikrobiologických ukazatelích byly jako nezávislé proměnné zvoleny následující faktory:

- **vzorek** (1, 2 a 3)
- **doba skladování** (0., 21., 28., 42. a 56. den)

Vzhledem k nenormálnímu rozdělení dat u proměnných vyjadřujících počet mikroorganismů byly tyto proměnné přepočítány na logaritmické jednotky a statistické analýzy byly tedy vypracovány pouze pro tyto proměnné.

Sledované ukazatele (závislé proměnné) včetně celkového počtu analyzovaných vzorků během pokusu jsou uvedeny v tabulce č. 4.

**Tabulka č. 4)** Počet analyzovaných vzorků v rámci jednotlivých sledovaných ukazatelů

Počty vzorků (včetně kontroly)	Celkem
<b>Kyselost</b>	
titrační	30
aktivní	30
<b>Mikrobiologické ukazatele</b>	
počet mikroorganismů <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	120
počet mikroorganismů <i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i>	120
počet mikroorganismů <i>Bifidobacterium</i>	120
celkový počet mikroorganismů	120
koliformní bakterie	30
kvasinky a plísně	30
<b>Chemické ukazatele</b>	
sušina	6
<b>Celkem</b>	<b>606</b>

### 3.3 Analýza vzorků

#### 3.3.1 Stanovení kyselosti

##### Titrační kyselost

Stanovení titrační kyselosti bylo provedeno metodou podle Soxhlet-Henkela.

Kyselost podle Soxhlet-Henkela je dána počtem mililitrů odměrného roztoku  $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol.l}^{-1}$  spotřebovaného při titraci zkušební vzorku na fenolftalein jako indikátor. Vyjadřuje se v ml roztoku  $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol.l}^{-1}$  spotřebovaných na 100 g u smetany nebo zakysaných tekutých mléčných výrobků včetně jogurtů.

##### Příprava vzorku:

Tekutý vzorek byl homogenizován pomocí minitřepačky Vortex.

### Vlastní stanovení:

Do Erlenmayerovy baňky bylo odměřeno 10 g vzorku a přidány 2 ml 2 % roztoku fenolftaleinu. Za stálého míchání byl roztok titrován NaOH ( $c_{\text{NaOH}} = 0,25 \text{ mol.l}^{-1}$ ) do slabě růžového zbarvení.

### Výpočet:

$$SH = a \cdot 100/mo$$

a... spotřeba roztoku  $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol.l}^{-1}$  při titraci naváženého zkušebního vzorku, v ml.

mo... navážené množství vzorku, v ml nebo g.

### **Aktivní kyselost**

Aktivní kyselost bílých jogurtů byla měřena pH metrem typu PH WTW 330/set 2 od firmy WTW s rokem výroby 1999.

### **3.3.2 Mikrobiologická stanovení**

Ke sledování mikrobiologických ukazatelů byly využity mikrobiologické kultivační metody.

Po otevření víčka jogurtu a promíchání bylo sterilně odebráno a naváženo 10g vzorku z každého vzorku. V případě nutnosti byla provedena homogenizace vzorku pomocí homogenizátoru Stomacher. Po přidavku 90 ml sterilní destilované vody byla směs homogenizována pomocí minitřepačky Vortex. Vzniklá suspenze představovala 1. ředění. Následná ředění byla prováděna přidáním 1 ml vzniklé suspenze s 9 ml ředícího roztoku.

Pro očkování vzorků byla použita metoda přelivem – zalití živným médiem. Tato metoda spočívá v tom, že na dno sterilní misky bylo napipetováno 1 ml příslušného ředění. Po napipetování vzorku byla miska zalita příslušným živným médiem, řádně promíchána a následně se nechaly Petriho misky ztuhnout. Petriho misky byly vkládány do termostatu dnem vzhůru a kultivovány za podmínek daného mikrobiologického stanovení. Každé stanovení bylo prováděno souběžně ve dvou Petriho miskách.

### **Stanovení *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus***

Pro stanovení *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* mikrobiologickou metodou byl použit komerční výrobek firmy Merck, s.r.o., MRS agar (Lactobacillus agar podle DE MAN, ROGOSA a SHARPE) o následujícím složení: Pepton z kaseinu 10,0 g; masový extrakt 10,0 g; kvasničný extrakt 4,0 g, D(+) glukóza 20,0 g; hydrogenfosforečnan didraselný 2,0 g; Tween® 80 1,0 g; kyselý citran amonný 2,0 g; octan sodný 5,0 g; síran hořečnatý 0,2 g; síran manganatý 0,04 g; agar-agar 14,0 g, destilovaná voda 1 litr.

Agar byl připraven navážením cca 68,2 g MRS agaru, který se za občasného míchání nechal rozpustit v 1 litru destilované vody, rozpuštění agaru lze uspišit jeho ohřátím na 45 °C. Po dokonalém rozpuštění bylo upraveno pH tak, aby po sterilaci měl vzniklý agar pH  $5,7 \pm 0,2$  při 25 °C.

Sterilace probíhala 15 minut při 121 °C. Po ukončené sterilaci se agar zchladil na 45 °C a rozléval do inokulovaných Petriho misek. Agar v Petriho miskách má být hnědý a čirý.

#### Příprava vzorku:

Odváží se 10 g vzorku a přidá se 9 - ti násobek ředícího roztoku a provede se homogenizace na stupeň 3 po dobu 2 x 10 sekund. Takto vzniklá suspenze je považována za 1. ředění. Následná ředění se provádějí ve zkumavkách. Do zkumavky s 9 ml ředícího roztoku bylo přidáno 1 ml vzniklé suspenze z předchozího kroku a vzorek se homogenizuje na minitřepačce Vortex.

#### Inokulace a kultivace:

Za aseptických podmínek byl očkovan 1 ml vzorku nebo příslušného ředění do sterilních Petriho misek. Takto připravené misky byly zality MRS agarem. Ředění vzorku se volilo tak, aby Petriho misky po inkubaci obsahovaly 15 až 150 charakteristických kolonií. Inokulované Petriho misky se nechaly ztuhnout na vodorovné ploše za laboratorní teploty. Po ztuhnutí se inokulovaná živná půda převrstvila asi 5 až 7 ml MRS agarem, pro zajištění anaerobního prostředí. Ztuhlé misky byly kultivovány při 30 °C po dobu 72 hodin. Aby se zabránilo vysychání živné půdy, byla vložena do termostatu kádinka s vodou.

### Vyhodnocování výsledků:

*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* tvoří na MRS agaru drobné bílé nepravidelné kolonie.

### **Stanovení *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus***

Pro kultivaci a stanovení počtu mléčných streptokoků se v porovnání s jinými srovnatelnými médii nejvíce osvědčil agar M17 (podle TERZAGHI). Ve sledovaném pokusu byl použit komerční výrobek firmy Merck, s.r.o., o následujícím složení: Pepton ze sójové moučky 5,0 g; pepton z masa 2,5 g; pepton z kaseinu 2,5 g; kvasničný extrakt 2,5 g; masový extrakt 5,0 g; laktóza monohydrát 5,0 g; kyselina askorbová 0,5 g; b-glycerofosfát sodný 19,0 g; síran hořečnatý 0,25 g; agar-agar 12,75 g, destilovaná voda 1 litr.

Agar byl připraven navážením 55 g média M17, který se nechal za občasného míchání rozpustit v 1 litru destilované vody, pro urychlení rozpouštění se suspenze zahřála na 45 °C, po dokonalém rozpuštění se upravilo pH tak, aby po sterilaci měl agar pH  $7,2 \pm 0,2$  při 25 °C.

Sterilace probíhala 15 minut při 121 °C. Po sterilaci se agar zchladil na 45 °C a rozléval do inokulovaných Petriho misek. Médium v Petriho miskách má být hnědé a čiré.

### Příprava vzorku:

Příprava vzorku probíhala stejným způsobem jako příprava vzorku v případě stanovení *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.

### Inokulace a kultivace:

Za aseptických podmínek byl očkovan 1 ml vzorku nebo příslušného ředění do sterilních Petriho misek. Takto připravené misky byly zality M17 agarem. Ředění vzorku se volilo tak, aby Petriho misky po inkubaci obsahovaly 15 až 150 charakteristických kolonií. Inokulované Petriho misky se nechaly ztuhnout na vodorovné ploše za laboratorní teploty. Ztuhlé misky byly kultivovány při teplotě 28 °C po dobu 24 až 48 hodin za aerobních podmínek.

### Vyhodnocování výsledků:

Již po 15 hodinách jsou viditelné kolonie laktózo-pozitivních streptokoků.

## **Stanovení *Bifidobacterium***

Pro stanovení *Bifidobacterium* mikrobiologickou metodou byl použit komerční výrobek firmy Merck, s.r.o., MRS agar (Lactobacillus agar podle DE MAN, ROGOSA a SHARPE) se suplementem o následujícím složení: Pepton z kaseinu 10,0 g; masový extrakt 10,0 g; kvasničný extrakt 4,0 g, D(+) glukóza 20,0 g; hydrogenfosforečnan didraselný 2,0 g; Tween® 80 1,0 g; kyselý citran amonný 2,0 g; octan sodný 5,0 g; síran hořečnatý 0,2 g; síran manganatý 0,04 g; agar-agar 14,0 g, destilovaná voda 1 litr.

Agar byl připraven navážením cca 68,2 g MRS agaru, který se za občasného míchání nechal rozpustit v 1 litru destilované vody, rozpuštění agaru lze uspišit jeho ohřátím na 45 °C. Po dokonalém rozpuštění bylo upraveno pH tak, aby po sterilaci měl vzniklý agar pH  $5,7 \pm 0,2$  při 25 °C. Sterilace probíhala 15 minut při 121 °C.

Po ukončené sterilaci byl agar zchlazen na 45 °C a před rozléváním do inokulovaných Petriho misek bylo napipetováno 5 ml suplementu, který se skládá z: 150 ml vody, 0,009g dicloxacicinu a 2,24g L-cysteinu. Agar v Petriho miskách má být hnědý a čirý.

### Příprava vzorku:

Příprava vzorku probíhala stejným způsobem jako příprava vzorku v případě stanovení *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*.

### Inokulace a kultivace:

Za aseptických podmínek byl očkovan 1 ml vzorku nebo příslušného ředění do sterilních Petriho misek. Takto připravené misky byly zality MRS agarem. Ředění vzorku se volilo tak, aby Petriho misky po inkubaci obsahovaly 15 až 150 charakteristických kolonií. Inokulované Petriho misky se nechaly ztuhnout na vodorovné ploše za laboratorní teploty. Po ztuhnutí se inokulovaná živná půda převrstvila asi 5 až 7 ml MRS agarem pro zajištění anaerobního prostředí. Ztuhlé misky byly kultivovány při 35 °C po dobu 72 hodin. Aby se zabránilo vysychání živné půdy, byla vložena do termostatu kádinka s vodou.

### Vyhodnocování výsledků:

*Bifidobacterium* tvoří na MRS agaru se suplementem drobné bílé nepravidelné kolonie.



## **Stanovení celkového počtu mikroorganismů**

Pro stanovení celkového počtu mikroorganismů mikrobiologickou metodou byl použit komerční výrobek firmy Merck, s.r.o., GTK agar (agar s peptonem z kaseinu, glukózou a kvasničným extraktem) o následujícím složení: Pepton z kaseinu 5,0 g; kvasničný extrakt 2,5 g; D(+)glukóza 1,0 g; agar - agar 14,0 g, destilovaná voda 1 litr.

Agar byl připraven navážením cca 22,5 g GTK agaru, který se za občasného míchání nechal rozpustit v 1 litru destilované vody, rozpuštění agaru bylo možné uspíšit jeho ohřátím na 45 °C. Po dokonalém rozpuštění se upravilo pH tak, aby po sterilaci měl vzniklý agar pH  $7,0 \pm 0,2$  při 25 °C.

Sterilace probíhala 15 minut při 121 °C. Po ukončené sterilaci se agar zchladil na 45 °C a rozléval do inokulovaných Petriho misek. Agar v Petriho miskách má být čirý a nažloutlý.

### Příprava vzorku:

Příprava vzorku probíhala stejným způsobem jako příprava vzorků výše zmíněných.

### Inokulace a kultivace:

Za aseptických podmínek byl očkovan 1 ml vzorku prvního ředění do sterilních Petriho misek. Takto připravené misky byly zality GTK agarem. Ředění vzorku se volilo tak, aby Petriho misky po inkubaci obsahovaly 15 až 150 charakteristických kolonií. Inokulované Petriho misky se nechaly ztuhnout na vodorovné ploše za laboratorní teploty. Ztuhlé misky byly kultivovány při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin za aerobních podmínek.

### Vyhodnocování výsledků:

Po kultivaci jsou kolonie na GTK agaru velmi drobné, ale dobře viditelné bílé kolonie.

## **Stanovení koliformních bakterií**

Pro stanovení koliformních bakterií mikrobiologickou metodou byl použit komerční výrobek firmy Merck, s.r.o., VČŽL agar - VRB agar (agar s krystalovou violetí, neutrální červení a žlučovými solemi) o následujícím složení: Pepton z masa

7,0 g; kvasničný extrakt 3,0 g; chlorid sodný 5,0 g; laktóza 10,0 g; neutrální červen 0,03 g; směs žlučových solí 1,5 g; krystalová violet' 0,002 g; agar-agar 13,0 g, 1 litr destilované vody.

Agar byl připraven navážením cca 39,5 g VČŽL agaru, který se za občasného míchání nechal rozpustit v 1 litru destilované vody, rozpuštění agaru bylo možné uspišit jeho ohřátím na 45 °C. Po dokonalém rozpuštění se upravilo pH tak, aby měl vzniklý agar pH  $7,4 \pm 0,2$ . Sterilizace agaru neprobíhala a tento byl ihned rozléván do inokulovaných Petriho misek. Agar v Petriho miskách má být čirý a tmavě červený.

#### Příprava vzorku:

Příprava vzorku probíhala stejným způsobem jako příprava vzorků výše zmíněných.

#### Inokulace a kultivace:

Za aseptických podmínek se očkovalo 1 ml vzorku prvního ředění do sterilních Petriho misek. Takto připravené misky byly zality VČŽL agarem. Ředění vzorku se volilo tak, aby Petriho misky po inkubaci obsahovaly 15 až 150 charakteristických kolonií. Inokulované Petriho misky se nechaly ztuhnout na vodorovné ploše za laboratorní teploty. Ztuhlé misky byly kultivovány při teplotě 37 °C po dobu 24 až 48 hodin za aerobních podmínek.

#### Vyhodnocování výsledků:

Po kultivaci jsou kolonie na VČŽL agaru dobře viditelné s jemně růžovým nádechem.

#### **Stanovení kvasinek a plísní**

Pro stanovení kvasinek a plísní mikrobiologickou metodou byl použit komerční výrobek firmy Merck, s.r.o., GKCH agar -YGC agar (agar s kvasničným extraktem, glukózou a chloramfenikolem FIL-IDF) o následujícím složení: Kvasničný extrakt 5,0 g; D(+)-glukóza 20,0 g; chloramfenikol 0,1 g; agar - agar 14,9 g, 1 litr destilované vody.

Agar byl připraven navážením cca 40 g GKCH agaru, který se za občasného míchání nechal rozpustit v 1 litru destilované vody, rozpuštění agaru se uspišilo jeho

ohřátím na 45 °C. Po dokonalém rozpuštění se upravilo pH tak, aby měl vzniklý agar pH  $6,6 \pm 0,2$ .

Sterilace probíhala 15 minut při 121 °C. Po sterilaci se agar zchladil na 45 °C a rozléval do inokulovaných Petriho misek. Médium v Petriho miskách má být žlutavé a čiré.

#### Inokulace a kultivace:

Za aseptických podmínek se očkovalo 1 ml vzorku prvního ředění do sterilních Petriho misek. Takto připravené misky byly zality GKCH agarem. Ředění vzorku se volilo tak, aby Petriho misky po inkubaci obsahovaly 15 až 150 charakteristických kolonií. Inokulované Petriho misky se nechaly ztuhnout na vodorovné ploše za laboratorní teploty. Ztuhlé misky byly kultivovány při teplotě 25 °C po dobu 5 dnů za aerobních podmínek.

#### Vyhodnocování výsledků:

Po kultivaci se počítaly všechny kolonie kvasinek a plísni.

### **3.4 Statistické vyhodnocení dat**

Pro statistickou analýzu byly využity programy Microsoft Excel a Statistica Cz 12.0 (Statsoft s.r.o.). Zjištěné hodnoty mikrobiologických ukazatelů byly vyjádřeny také v logaritmických jednotkách.

U souboru byly vyhodnoceny předpoklady pro užití parametrických metod a k analýze vlivů výrobce a skladování byla použita jednofaktorová analýza rozptylu. Pro porovnání (post-hoc testy) ve skupinách byl použit Fisherův LSD test na obvyklých hladinách významnosti ( $p < 0,05$ ).

## 4. VÝSLEDKY A DISKUSE

Jedním z hlavních kritérií pro hodnocení jakosti kysaných mléčných výrobků s probiotickými bakteriemi je zastoupení a množství živých mikroorganismů, které ovlivňují i kyselost produktu.

U jogurtů je Vyhláškou Ministerstva zemědělství č. 77/2003 Sb. stanoveno, že množství mikroorganismů *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* (dále jen *Streptococcus*) a *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (dále jen *Lactobacillus*) musí být  $10^7$  KTJ/g pro výrobky s bifidokulturou *Bifidobacterium ssp.* použité v kombinaci s mezofilními a termofilními bakteriemi mléčného kvašení  $10^6$  KTJ/g.

Pro posouzení životaschopnosti mikroorganismů byly prováděny mikrobiologické analýzy, a to na začátku a na konci deklarované doby spotřeby (do 21. dne), dále pak 3x v průběhu následujících 5 týdnů. Pro stanovení kmenů *Lactobacillus*, *Streptococcus* a bakterií rodu *Bifidobacterium* byly vybrány z tržní sítě 3 vzorky bílých jogurtů, u kterých výrobce deklaroval přítomnost bifidobakterií.

Mimo sledování počtu kulturních mikroorganismů byly sledovány i nežádoucí mikroorganismy (koliformní bakterie, plísně a kvasinky) a kyselost daných vzorků.

### 4.1 Kyselost u sledovaných jogurtů

Kyselost potravinářského výrobku je dána obsahem organických kyselin, především kyseliny mléčné a dále obsahem a složením minerálních látek a bílkovin (ČERNÁ, MERGL, 1971). Stanovení kyselosti umožňuje kontrolovat technologii výroby potravinářských výrobků a lze jej využít i ke kontrole správného skladování hotových výrobků nebo surovin pro potravinářskou výrobu. Zvýšená kyselost může poukazovat na zhoršené podmínky skladování, a tím i možný rozvoj kontaminujících mikroorganismů, což vede k rozkladu sacharidů a vzniku různých organických kyselin. Naopak při výrobě kysaných mléčných výrobků je rozklad laktózy hlavním procesem technologie výroby a kyselost tedy slouží i ke kontrole průběhu fermentace (DVOŘÁK, 2003; KADLEC, 2008).

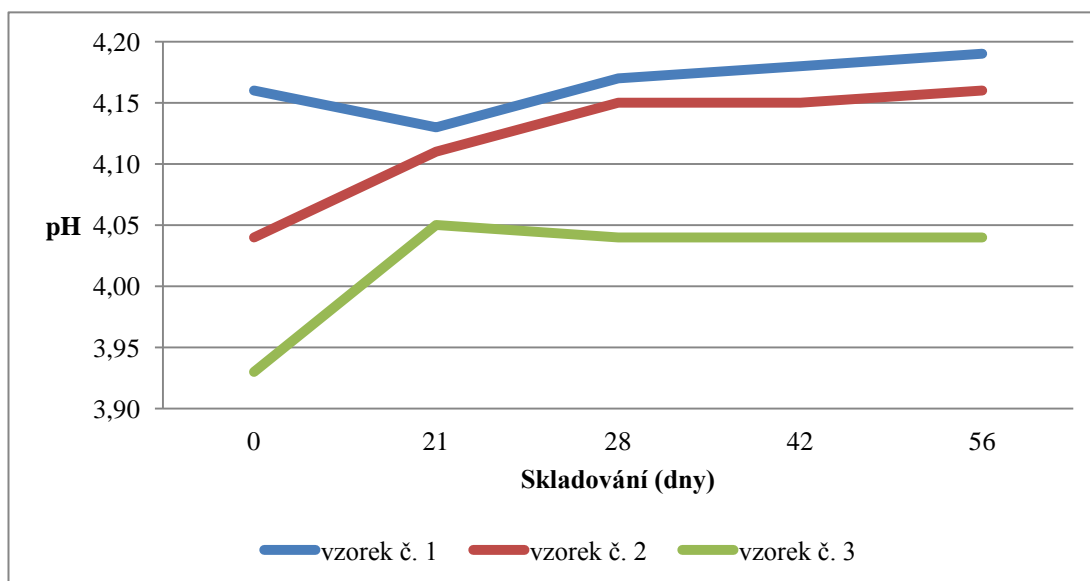
#### 4.1.1 Aktivní a titrační kyselost jogurtu v závislosti na sledovaném vzorku

Aktivní kyselost se mezi jednotlivými vzorky jogurtů lišila (tabulka č. 5; graf č. 1), a to po celou dobu skladování, přičemž u vzorku č. 1 nejprve hodnota pH mírně poklesla a následně se postupně zvyšovala. U vzorků č. 2 a 3 se hodnota pH mírně zvyšovala po celou dobu skladování. Na začátku sledování (0. den) byly také zjištěné rozdíly v pH mezi jednotlivými vzorky vyšší než na konci sledování (56. den). Nejnižší aktivní kyselost pak byla zjištěna u vzorku č. 3 (3,93 – 4,05), nejvyšší u vzorku č. 1 (4,16 – 4,19), hodnota pH vzorku č. 2 pak byla mezi 4,04 – 4,16 pH. Lze konstatovat, že v podstatě u všech vzorků se od 28. dne hodnota pH měnila jen minimálně, nejvyšší rozdíly během skladování byly zjištěny v aktivní kyselosti mezi nultým a 21. – 28. dnem.

**Tabulka č. 5)** Aktivní a titrační kyselost bílých jogurtů v jednotlivých dnech skladování

Vzorek	Skladování (dny)				
	0	21	28	42	56
<b>Aktivní kyselost (pH)</b>					
1	4,16	4,13	4,17	4,18	4,19
2	4,04	4,11	4,15	4,15	4,16
3	3,93	4,05	4,04	4,04	4,04
<b>Titrační kyselost (SH)</b>					
1	50,1	54,0	54,2	54,5	55,0
2	40,4	42,1	42,8	44,0	44,0
3	44,0	46,7	47,0	49,0	50,0

**Graf č. 1)** Aktivní kyselost bílých jogurtů v jednotlivých dnech skladování



Z tabulky č. 5 i grafu č. 1 si lze povšimnout poměrně velkých rozdílů v počátečních hodnotách pH u jednotlivých vzorků. Tyto rozdílné počáteční hodnoty (0. den sledování) vlastně dosahovaly výrobky při distribuci do obchodní sítě a jejich příčinou mohly být odlišné podmínky a způsob výroby, které daní výrobcí používají. Mezi tyto odlišné podmínky může patřit doba a teplota při fermentaci, použitá kultura, ale i poměr mezi kmeny *Lactobacillus* a *Streptococcus*. Podle ONGOLA et al. (2007) tyto faktory ovlivňují fermentační proces a zároveň tedy i kyselost jogurtů. Za zajímavé lze pokládat, že vzorek č. 1 a 2 má podobné hodnoty pH, zatímco pH vzorku č. 3 se lišilo v celém průběhu sledování a jeho hodnota nepřesáhla hodnotu 4,05. Vzorek č. 1 se pohyboval v hodnotách 4,16 (na začátku měření) až 4,19 pH. (na konci měření), vzorek č. 2 v hodnotách pH 4,04 až 4,16 pH.

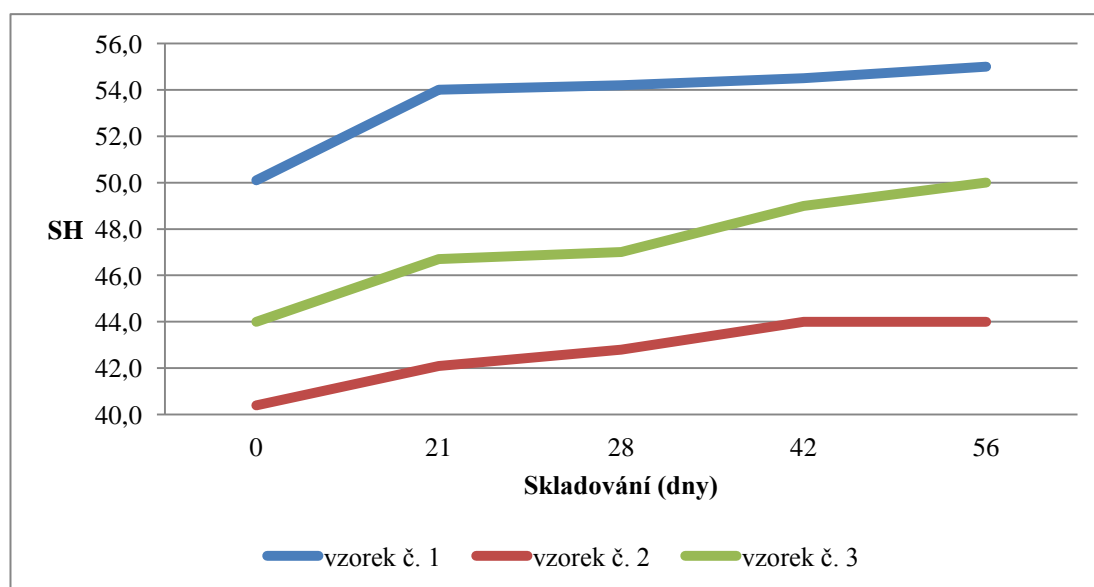
TYKVARTOVÁ et al. (2009) uvádí, že příčinou rozdílných hodnot pH u jednotlivých vzorků může být také přidavek hydrokoloidů, které se přidávají do jogurtů za účelem hladkého homogenního vzhledu, krémové a stejnorodé konzistence a které mohou ovlivňovat pH. Ve sledovaných vzorcích však přidavek hydrokoloidů na obalech vyznačen nebyl.

Graf č. 2 znázorňuje naměřené hodnoty titrační kyselosti vzorků bílých jogurtů v průběhu jejich skladování. Rovněž u titrační kyselosti lze sledovat počáteční rozdíly u jednotlivých vzorků, přičemž během skladování se hodnoty SH

u každého vzorku postupně zvyšovaly. U vzorku č. 1 se hodnota SH zvýšila během skladování z 50,1 na konečných 55,0 SH, u vzorku č. 2 z počátečních 40,4 na 44,0 SH a u vzorku č. 3 ze 44,0 na konečných 50,0 SH.

Z těchto hodnot je patrné, že ani jeden vzorek neměl optimální hodnotu titrační kyselosti, která má být po ukončení fermentace, jak uvádí GÖRNER a VALÍK (2004), tedy 60 – 65 SH a v době expedice ne víc jak 75 SH. Titrační kyselost naměřená u sledovaných vzorků jogurtů odpovídá spíše hodnotám uváděným KADLECEM et al. (2009). Autor uvádí, že po 4 hodinách kultivace za teploty 42°C by měly hodnoty titrační kyselosti činit 40 – 50 SH.

**Graf č. 2)** Titrační kyselost bílých jogurtů v jednotlivých dnech skladování



#### 4.1.2 Souhrnné vyhodnocení vlivu sledovaných vzorků a doby skladování

V předchozím hodnocení byly zjištěny určité rozdíly v hodnotách kyselosti naměřené v průběhu skladování. Při statistickém hodnocení bylo zjištěno, že průměrné hodnoty aktivní a titrační kyselosti se ve sledovaném pokusu statisticky významně nelišily (tabulka č. 6). Výraznější rozdíly aktivní a titrační kyselosti byly zjištěny hlavně mezi nultým a 21. dnem skladování, v ostatních měřeních byl rozdíl málo výrazný. Pravděpodobným důvodem nepotvrzené statistické významnosti u zjištěných rozdílů byl nízký počet vzorků.

**Tabulka č. 6)** Vliv doby skladování na aktivní a titrační kyselost jogurtu

Skladování (dny)	aktivní kyselost (n=3)		titrační kyselost (n=3)	
	$\bar{x}$	$s_x$	$\bar{x}$	$s_x$
<b>0</b>	4,04	0,12	44,83	4,90
<b>21</b>	4,10	0,04	47,60	6,00
<b>28</b>	4,12	0,07	48,00	5,77
<b>42</b>	4,12	0,07	49,17	5,25
<b>56</b>	4,13	0,08	49,67	5,50
<b>p</b>	0,6731		0,8365	

\*  $\bar{x}$  = průměrné hodnoty;  $s_x$  = směrodatná odchylka; p = statistická významnost

Tabulka č. 7 a znázorňuje statistické vyhodnocení vlivu sledovaného vzorku na aktivní (graf č. 3) a titrační (graf č. 4) kyselost jogurtu. Z tabulky je zřejmé, že vliv sledovaného vzorku byl potvrzen jak v případě aktivní, tak v případě titrační kyselosti. U aktivní kyselosti se průměrné hodnoty pH vzorků č. 1 a č. 2 statisticky významně nelišily (4,17 a 4,12), zatímco vzorek č. 3 měl statisticky významně nižší hodnotu pH (4,02).

U hodnocení titrační kyselosti dle tabulky č. 7 lze konstatovat, že u všech vzorků byly zjištěny výrazné rozdíly v kyselosti, kdy nejnižší kyselost vykazoval vzorek č. 2 (aktivní 4,12; titrační 42,66 SH) a nejvyšší vzorek č. 1 (aktivní 4,17; titrační 53,56 SH). Tyto rozdílné výsledky byly pravděpodobně způsobeny rozdílnými hodnotami při prvním měření, kdy nejvyšší hodnotu kyselosti vykazoval vzorek č. 1 (viz kapitola 4.1.1).



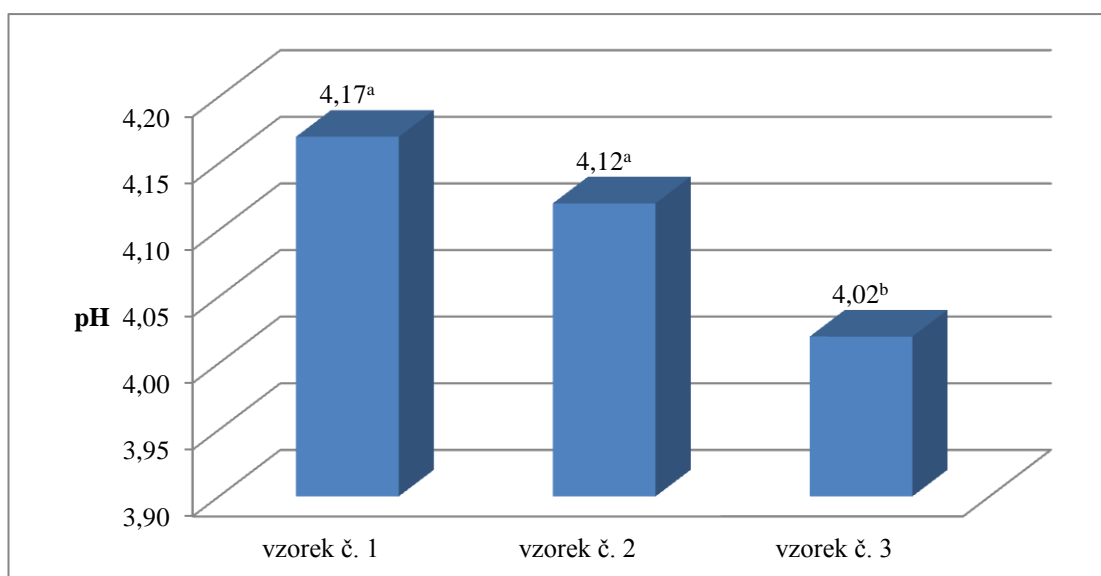
**Tabulka č. 7)** Vliv sledovaných vzorků na aktivní a titrační kyselost jogurtu

Vzorek	aktivní kyselost (n=5)		titrační kyselost (n=5)	
	x	s <sub>x</sub>	x	s <sub>x</sub>
<b>1</b>	4,17 <sup>a</sup>	0,02	53,56 <sup>c</sup>	1,97
<b>2</b>	4,12 <sup>a</sup>	0,05	42,66 <sup>a</sup>	1,50
<b>3</b>	4,02 <sup>b</sup>	0,05	47,34 <sup>b</sup>	2,32
<b>p</b>	0,0005		0,0000	

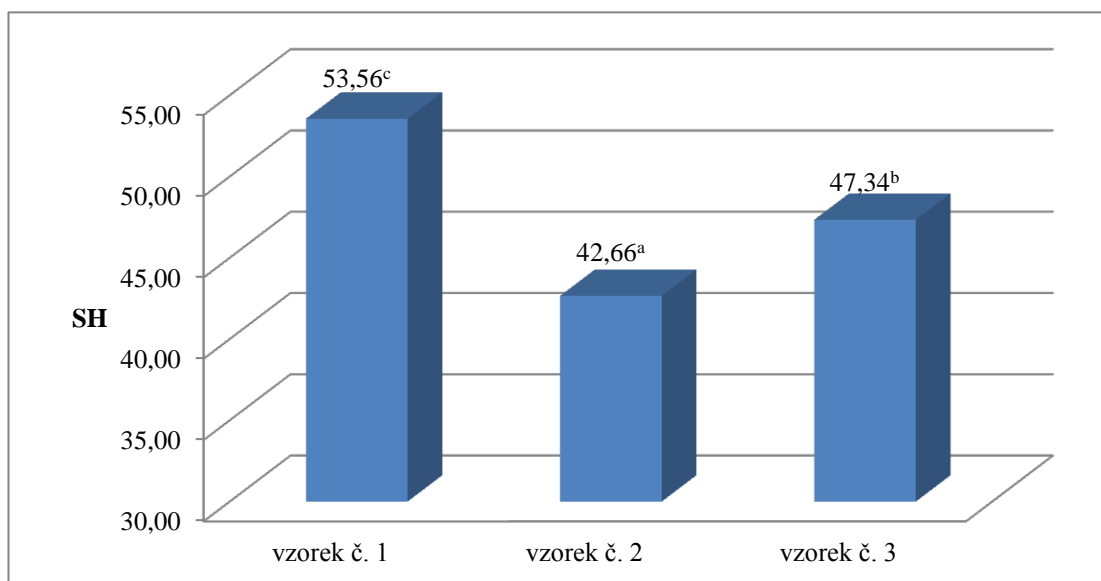
\* x = průměrné hodnoty; s<sub>x</sub> = směrodatná odchylka; p = statistická významnost

<sup>a, b</sup> = průměry s odlišnými horními indexy se liší na hladině významnosti p<0,05

**Graf č. 3)** Vliv sledovaných vzorků na aktivní kyselost jogurtu



**Graf č. 4)** Vliv sledovaných vzorků na titrační kyselost jogurtu



## 4.2 Mikrobiologické ukazatele u sledovaných jogurtů

### 4.2.1 Růst bakterií kmenů *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* v závislosti na sledovaném vzorku

Při výrobě jogurtů se využívá jogurtová kultura, kterou tvoří termofilní tyčinky *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* a koky *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* (GAJDŮŠEK, 2000). Vzájemný poměr tyčinek a koků, které se přidávají do jogurtové směsi, je obvykle 1:1 (MARTH, STEELE, 2001), ale někteří autoři jako např. GÖRNER, VALÍK (2004) uvádějí i poměr v rozmezí 1:2 až 2:1. Mikroorganismy jogurtové kultury jsou v symbiotickém vztahu a společně se vyznačují rychlou tvorbou kyseliny mléčné, aromatických látek a případně látek slizových zlepšujících konzistenci jogurtů. Další významnou vlastností je tvorba aromatické látky acetaldehydu v množství 20 - 30 mg/l (GÖRNER, VALÍK, 2004).

Počty mikroorganismů kmenů *Lactobacillus* a *Streptococcus* zjištěné u vzorku č. 1 během celé doby sledování znázorňuje tabulka č. 8 a graf č. 5. Na začátku experimentu (0. den) byl počet bakterií kmene *Lactobacillus*  $5,26 \times 10^7$  KTJ/g (7,72 log KTJ/g) a kmene *Streptococcus*  $2,99 \times 10^8$  KTJ/g (8,48 log KTJ/g). Jejich celkový počet byl  $3,51 \times 10^9$  KTJ/g (8,55 log KTJ/g). V den deklarovaného ukončení spotřeby/použitelnosti (tj. 21. den) se počet bakterií kmene

*Streptococcus* jen nepatrně snížil na  $2,12 \times 10^8$  KTJ/g (8,33 log KTJ/g), zatímco u kmene *Lactobacillus* došlo k výraznému poklesu na hodnotu  $1,51 \times 10^5$  (5,18 log KTJ/g). Důležitou hodnotou z hlediska legislativních předpisů je celkový počet kmenů *Lactobacillus* a *Streptococcus*, který byl 21. den  $2,12 \times 10^8$  KTJ/g (8,33 log KTJ/g), což odpovídá požadavkům Vyhlášky č. 77/2003 Sb., která stanovuje, že jogurty mají mít i v den ukončené doby spotřeby hodnotu pro kmene *Lactobacillus* a *Streptococcus*  $10^7$  KTJ/g.

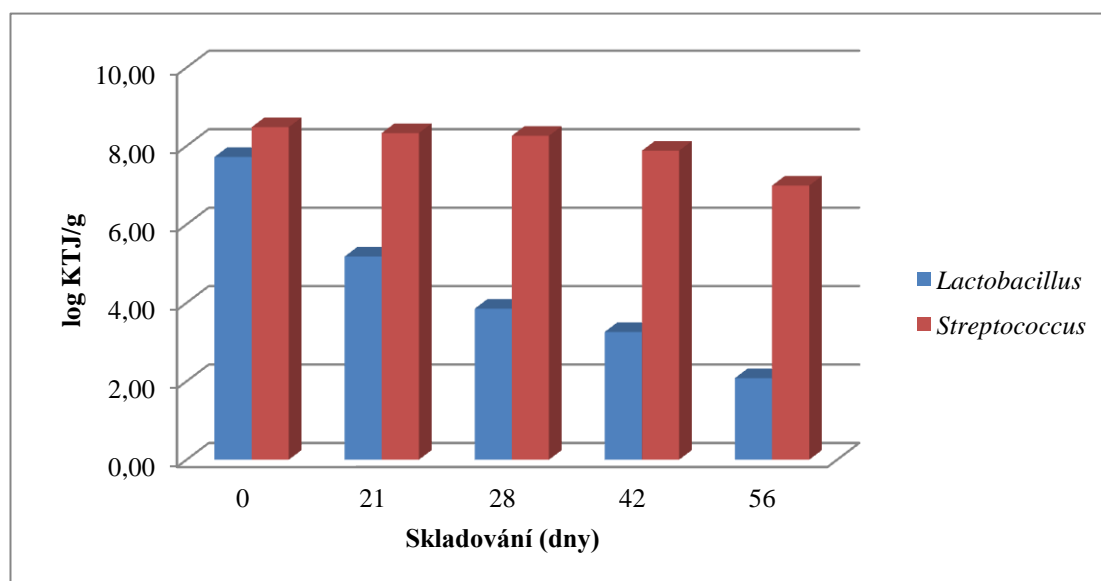
Nízký počet bakterií kmene *Lactobacillus* ( $1,51 \times 10^5$  KTJ/g tj. 5,18 log KTJ/g) způsobil, že v celkovém součtu ( $2,12 \times 10^8$  tj. 8,33) se projevil zejména vliv počtu bakterií kmene *Streptococcus* ( $2,12 \times 10^8$  tj. 8,33).

V průběhu sledování počtu těchto kulturních kmenů docházelo k postupnému snižování až do 56. dne. Z grafu č. 5 je zřejmé, že počet bakterií kmene *Streptococcus* klesá pomaleji a 56. den dosahuje hodnoty  $9,80 \times 10^6$  KTJ/g (6,99 log KTJ/g). U kmene *Lactobacillus* byl pozorován výrazný pokles počtu bakterií během doby sledování, a to až na  $1,20 \times 10^2$  KTJ/g (2,08 log KTJ/g) v 56. dni. Z výše uvedeného vyplývá, že daný výrobek sice splňuje legislativní požadavky Vyhlášky č. 77/2003 Sb., a to až do 42. dne sledování, kdy celková hodnota bakterií kulturních kmenů je  $7,60 \times 10^7$  KTJ/g (7,88 log KTJ/g), ale jak je zřejmé z grafu č. 5, tato hodnota byla zajištěna dostatečným počtem bakterií kmene *Streptococcus*. Počet bakterií kmene *Lactobacillus* byl ve 42. dni pouze  $1,80 \times 10^3$  KTJ/g (3,26 log KTJ/g).

**Tabulka č. 8)** Zastoupení kmenů *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* (KTJ/g) u vzorku č. 1

Kmeny		Skladování (dny)				
		0	21	28	42	56
<i>Lactobacillus</i>	log	7,72	5,18	3,85	3,26	2,08
	počet	$5,26 \times 10^7$	$1,51 \times 10^5$	$7,00 \times 10^3$	$1,80 \times 10^3$	$1,20 \times 10^2$
<i>Streptococcus</i>	log	8,48	8,33	8,26	7,88	6,99
	počet	$2,99 \times 10^8$	$2,12 \times 10^8$	$1,80 \times 10^8$	$7,60 \times 10^7$	$9,80 \times 10^6$
CELKEM	log	8,55	8,33	8,26	7,88	6,99
	počet	$3,52 \times 10^8$	$2,12 \times 10^8$	$1,80 \times 10^8$	$7,60 \times 10^7$	$9,80 \times 10^6$

**Graf č. 5)** Zastoupení kmenů *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* (log KTJ/g) u vzorku č. 1

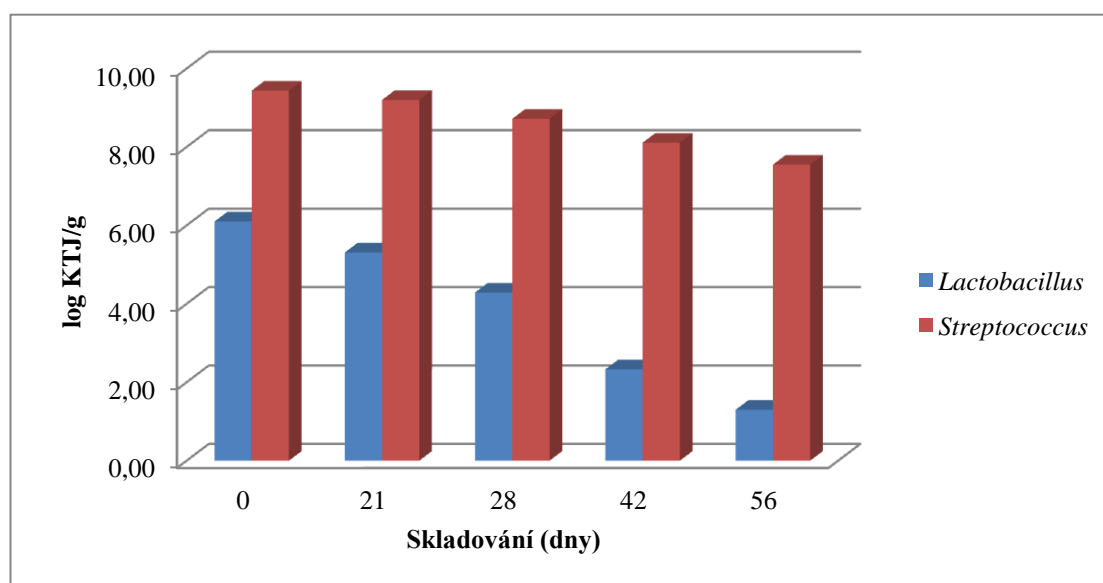


V tabulce č. 9 a v grafu č. 6 je znázorněn průběh výsledků zjištěných během sledování vzorku č. 2. Na počátku analýzy byl počet kulturního bakteriálního kmene *Lactobacillus*  $1,25 \times 10^6$  KTJ/g (6,10 log KTJ/g), počet bakterií kmene *Streptococcus* byl v porovnání s laktobacily podstatně vyšší, a to  $2,77 \times 10^9$  KTJ/g (9,44 log KTJ/g), celkový počet obou kmenů bakterií byl pak  $2,77 \times 10^9$  KTJ/g (9,44 log KTJ/g). V den končící deklarované doby spotřeby (tj. 21. den) byl zjištěn počet bakterií kmene *Lactobacillus*  $2,03 \times 10^5$  KTJ/g (5,31 log KTJ/g), pro kmen *Streptococcus*  $1,59 \times 10^9$  KTJ/g (9,20 log KTJ/g) a pro celkový počet bakterií obou kmenů  $1,59 \times 10^9$  KTJ/g (9,20 log KTJ/g). Z uvedených výsledků vyplývá, že stejně jako u vzorku č. 1, také u vzorku č. 2 odpovídal v den deklarovaného ukončení spotřeby celkový počet laktobacilů a streptokoků Vyhláše č. 77/2003 Sb. Při hodnocení celého průběhu sledování (graf č. 6) je patrné, že docházelo k postupnému snižování počtu sledovaných mikroorganismů. Avšak zatímco bakterie kmene *Streptococcus* byly přítomny ve vysokém množství ( $3,53 \times 10^7$  KTJ/g, tj. 7,55 log KTJ/g) i na konci experimentu (56. den) počet bakterií kmene *Lactobacillus* klesl v 56. dni až na  $2,00 \times 10^1$  KTJ/g (1,30 log KTJ/g). Celkový počet kmenů *Lactobacillus* a *Streptococcus* (56. den) byl  $3,53 \times 10^7$  KTJ/g (7,55 log KTJ/g), což je jako u předchozího vzorku ovlivněno vyhovujícím počtem bakterií kmene *Streptococcus*.

**Tabulka č. 9)** Zastoupení kmenů *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* (KTJ/g) u vzorku č. 2

Kmeny		Skladování (dny)				
		0	21	28	42	56
<i>Lactobacillus</i>	log	6,10	5,31	4,29	2,33	1,30
	počet	$1,25 \times 10^6$	$2,03 \times 10^5$	$1,90 \times 10^4$	$2,10 \times 10^2$	$2,00 \times 10^1$
<i>Streptococcus</i>	log	9,44	9,20	8,72	8,11	7,55
	počet	$2,77 \times 10^9$	$1,59 \times 10^9$	$5,30 \times 10^8$	$1,30 \times 10^8$	$3,53 \times 10^7$
CELKEM	log	9,44	9,20	8,72	8,11	7,55
	počet	$2,78 \times 10^9$	$1,59 \times 10^9$	$5,30 \times 10^8$	$1,30 \times 10^8$	$3,53 \times 10^7$

**Graf č. 6)** Zastoupení kmenů *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* (log KTJ/g) u vzorku č. 2



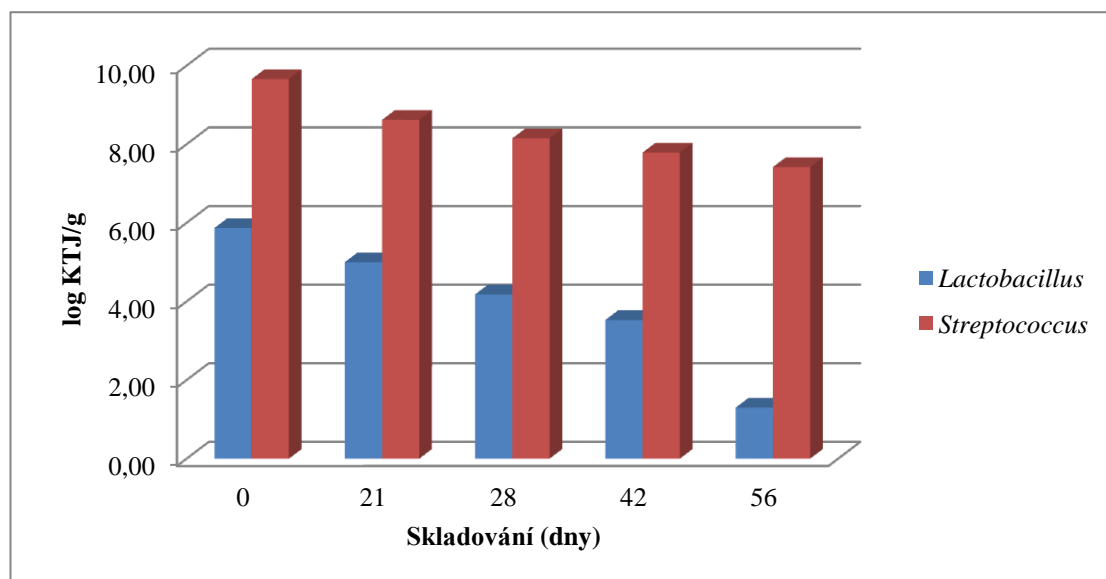
V případě vzorku č. 3 byla počáteční hodnota bakterií kmene *Lactobacillus*  $7,34 \times 10^5$  KTJ/g (5,87 log KTJ/g), u kmene *Streptococcus*  $4,58 \times 10^9$  KTJ/g (9,66 log KTJ/g) a celkové množství obou kmenů  $4,58 \times 10^9$  KTJ/g (9,66 log KTJ/g) – tabulka č. 10 a graf č. 7. V době deklarovaného ukončení spotřeby obsahoval vzorek č. 3 celkový počet bakterií mléčného kvašení  $4,20 \times 10^8$  KTJ/g (8,62 log KTJ/g), z čeho vyplývá, že i tento bílý jogurt splňuje požadavky Vyhlášky č. 77/2003 Sb. na množství kulturních mikroorganismů. V průběhu skladování tohoto vzorku

docházelo k postupnému poklesu počtu mikroorganismů (graf č. 7) a v poslední den sledování byl počet bakterií kmene *Lactobacillus*  $2,00 \times 10^1$  KTJ/g (1,30 log KTJ/g), počet bakterií kmene *Streptococcus*  $2,64 \times 10^7$  KTJ/g (7,42 log KTJ/g) a celkový počet obou kmenů  $2,64 \times 10^7$  KTJ/g (7,42 log KTJ/g). Podobně jako u předchozích dvou vzorků byl celkový počet mikroorganismů v poslední den sledování dostatečně vysoký díky počtu bakterií kmene *Streptococcus*, zatímco obsah bakterií kmene *Lactobacillus* byl velice nízký.

**Tabulka č. 10)** Zastoupení kmenů *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* (KTJ/g) u vzorku č. 3

Kmeny		Skladování (dny)				
		0	21	28	42	56
<i>Lactobacillus</i>	log	5,87	5,00	4,18	3,53	1,30
	počet	$7,34 \times 10^5$	$1,00 \times 10^5$	$1,50 \times 10^4$	$3,40 \times 10^3$	$2,00 \times 10^1$
<i>Streptococcus</i>	log	9,66	8,62	8,15	7,79	7,42
	počet	$4,58 \times 10^9$	$4,20 \times 10^8$	$1,40 \times 10^8$	$6,10 \times 10^7$	$2,64 \times 10^7$
CELKEM	log	9,66	8,62	8,15	7,79	7,42
	počet	$4,58 \times 10^9$	$4,20 \times 10^8$	$1,40 \times 10^8$	$6,10 \times 10^7$	$2,64 \times 10^7$

**Graf č. 7)** Zastoupení kmenů *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* (log KTJ/g) u vzorku č. 3



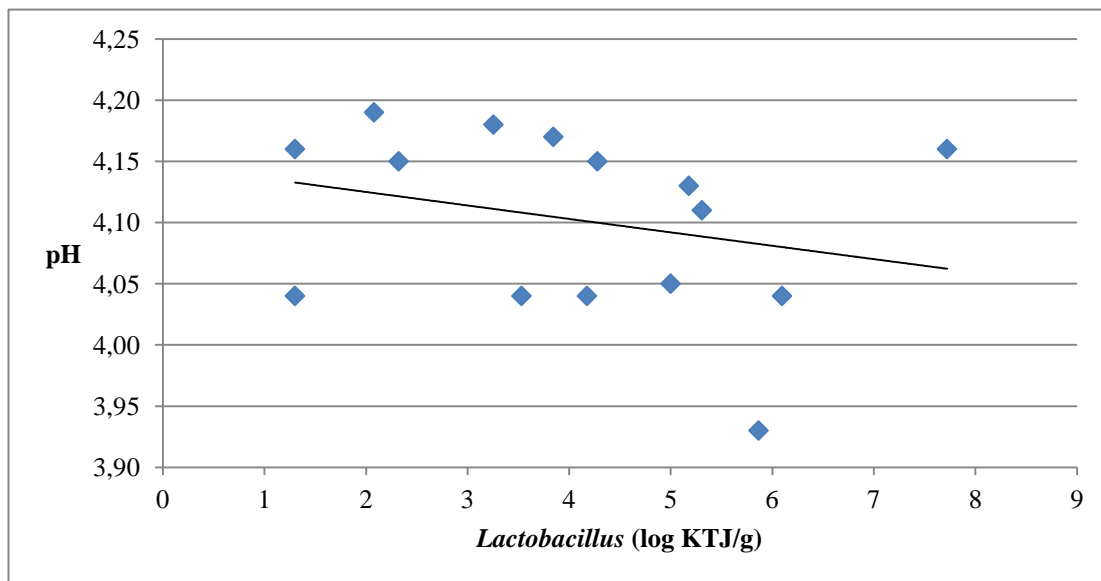
Při celkovém hodnocení vyrovnanosti poměru kmene *Lactobacillus* a *Streptococcus* je patrné, že tento poměr byl vyrovnaný pouze u vzorku č. 1, a to v nultý den, poté došlo k výraznému poklesu kmene *Lactobacillus* oproti kmenu *Streptococcus*. Z grafů č. 5, 6 a 7 a tabulky č. 11 lze pozorovat, že poměry mezi těmito dvěma kmeny nebyly nijak vyrovnané ani u jednoho vzorku a mohly ovlivnit i kyselost těchto produktů.

**Tabulka č. 11)** Poměry mezi sledovanými kmeny *Lactobacillus* a *Streptococcus* v průběhu skladování

	Skladování (dny)				
	0	21	28	42	56
<b>vzorek č. 1</b>	1 : 1,10	1 : 1,61	1 : 2,15	1 : 2,42	1 : 3,36
<b>vzorek č. 2</b>	1 : 1,55	1 : 1,73	1 : 2,04	1 : 3,49	1 : 5,80
<b>vzorek č. 3</b>	1 : 1,65	1 : 1,72	1 : 1,95	1 : 2,20	1 : 5,70

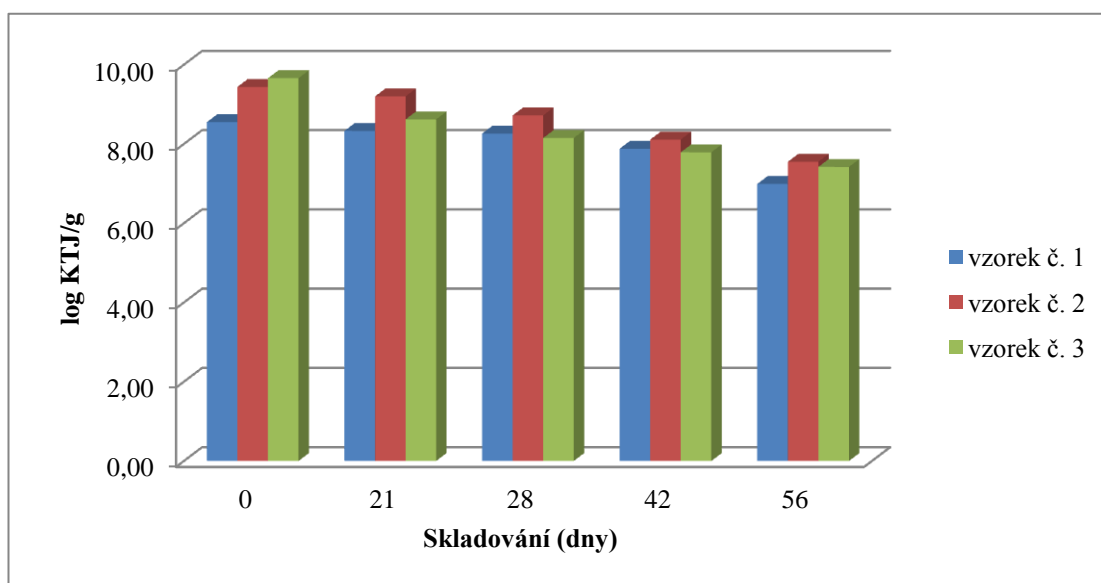
U vzorku č. 1 byly zjištěny vyšší hodnoty kyselosti, než tomu bylo u vzorku č. 2 a 3 (kapitola 4.1.1). Jak uvádějí McSWEENEY et al. (2009), vyšší množství mikroorganismů kmene *Lactobacillus* výrazně ovlivňuje kyselost, tedy nižší zastoupení tohoto kmene u sledovaných vzorků pravděpodobně způsobilo i nižší kyselost, tedy vyšší pH (graf č. 8). ŠUSTOVÁ, LUŽOVÁ (2008) uvádějí, že příčinou nižšího počtu kmene *Lactobacillus* může být delší kultivace při nižší teplotě, kdy laktobacily rostou méně.

**Graf č. 8)** Vztah mezi počtem bakterií kmene *Lactobacillus* (log KTJ/g) a aktivní kyselostí výrobků



Pro celkové porovnání jednotlivých vzorků je zde uveden souhrnný graf č. 9, ve kterém jsou dobře viditelné rozdíly mezi vzorky 1, 2 a 3 v celkovém počtu bakterií kmenů *Lactobacillus* a *Streptococcus* během doby skladování.

**Graf č. 9)** Zastoupení celkového počtu bakterií kmenů *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* (log KTJ/g) u všech tří sledovaných vzorků





LEHEROVÁ (2013) v obdobném pokusu sledovala počty bakterií kmenů *Lactobacillus* a *Streptococcus* u třech vzorků bílých jogurtů v průběhu skladování 8 týdnů. U těchto vzorků nebyla výrobcem deklarována přítomnost bakterií rodu *Bifidobacterium*.

Průměrné počty bakterií kmene *Streptococcus* zjištěné autorkou byly přibližně o řád vyšší než počty streptokoků ve vzorcích sledovaných v této diplomové práci, a to po celou dobu skladování (tabulka č. 12). Průměrné počty bakterií kmene *Lactobacillus* byly u autorky podstatně vyšší oproti průměrným počtům laktobacilů zjištěných v této diplomové práci. Např. 0. den skladování zjistila autorka průměrný počet  $4,62 \times 10^9$  KTJ/g, v den končící deklarované doby spotřeby  $1,63 \times 10^8$  KTJ/g, zatímco v této diplomové práci byly zjištěny hodnoty  $1,82 \times 10^7$  KTJ/g, resp.  $1,51 \times 10^5$  KTJ/g. Poměry mezi uvedenými kmeny byly poměrně vyrovnané po celou dobu sledování a celkový počet laktobacilů a streptokoků splňoval požadavky Vyhlášky č. 77/2003 Sb. i poslední den skladování (56. den).

**Tabulka č. 12)** Porovnání průměrných počtů bakterií kmene *Lactobacillus* a *Streptococcus* (KTJ/g) v průběhu skladování

		Skladování (dny)				
		0	21	28	42	56
<i>Lactobacillus</i>	1	$4,62 \times 10^9$	$1,63 \times 10^8$	$2,87 \times 10^7$	$7,38 \times 10^6$	$1,25 \times 10^6$
	2	$1,82 \times 10^7$	$1,51 \times 10^5$	$1,37 \times 10^4$	$1,80 \times 10^3$	$5,3 \times 10^1$
<i>Streptococcus</i>	1	$2,23 \times 10^{10}$	$3,32 \times 10^9$	$1,75 \times 10^9$	$1,92 \times 10^8$	$9,58 \times 10^7$
	2	$2,55 \times 10^9$	$7,41 \times 10^8$	$2,83 \times 10^8$	$8,90 \times 10^7$	$2,38 \times 10^7$
<i>Lactobacillus</i> + <i>Streptococcus</i>	1	$2,69 \times 10^{10}$	$3,48 \times 10^9$	$1,78 \times 10^9$	$1,98 \times 10^8$	$9,63 \times 10^8$
	2	$2,57 \times 10^9$	$7,41 \times 10^8$	$2,83 \times 10^8$	$8,90 \times 10^7$	$2,38 \times 10^7$

\* 1 = mikrobiologické ukazatele zjištěné Leherovou (2013); 2 = mikrobiologické ukazatele zjištěné v této diplomové práci

#### 4.2.2 Růst bakterií rodu *Bifidobacterium* v závislosti na sledovaném vzorku

Bakterie rodu *Bifidobacterium* jsou přidávány do jogurtů jako probiotická kultura. Výrobek obsahující tuto kulturu je pak označen jako výrobek s probiotickou kulturou. Součástí diplomové práce bylo i sledování počtu bakterií rodu *Bifidobacterium* po celou dobu prováděného experimentu. Tabulka č. 13 a graf č. 10 znázorňují výsledky získané během sledovaného období u všech tří vzorků.

U vzorku č. 1 byl zjištěn během skladování výrazný pokles bifidobakterií. Počáteční hodnota počtu bakterií rodu *Bifidobacterium* byla  $1,80 \times 10^8$  KTJ/g ( $8,26 \log$  KTJ/g), hodnota v 21. dni se příliš nelišila ( $3,40 \times 10^7$  KTJ/g tj.  $7,53 \log$  KTJ/g), avšak v následujících dnech sledování už docházelo k výraznému poklesu na  $3,60 \times 10^4$  KTJ/g ( $4,56 \log$  KTJ/g) – 42. den a poslední den sledování (56. den) už ve vzorku nebyly přítomné žádné živé bakterie rodu *Bifidobacterium*.

Vzhledem k tomu, že Vyhláška č. 77/2003 Sb. stanovuje počet bifidobakterií při deklarovaném ukončení spotřeby (21. den) na  $10^6$  KTJ/g, lze konstatovat, že vzorek č. 1 v tomto ohledu splnil požadavky vyhlášky.

U vzorku č. 2 lze konstatovat, že i zde dochází k postupnému snižování počtu bifidobakterií v průběhu skladování, ale oproti vzorku č. 1 nebylo snižování počtu bakterií tak výrazné. Počáteční hodnota byla oproti vzorku č. 1 nižší, a to  $2,34 \times 10^6$  KTJ/g ( $6,37 \log$  KTJ/g), následně byl zaznamenán další pokles, neboť v den končící deklarované doby spotřeby (21. den) byl počet bakterií rodu *Bifidobacterium*  $7,20 \times 10^5$  KTJ/g ( $5,86 \log$  KTJ/g). Z uvedeného výsledku vyplývá, že vzorek č. 2 nesplnil požadavky Vyhlášky č. 77/2003 Sb., neboť neobsahoval dostatečné množství živých bifidobakterií. Pokles počtu bakterií rodu *Bifidobacterium* v porovnání se vzorkem č. 1 byl pozvolný a poslední den sledování (56. den) byl počet  $1,18 \times 10^4$  KTJ/g ( $4,07 \log$  KTJ/g).

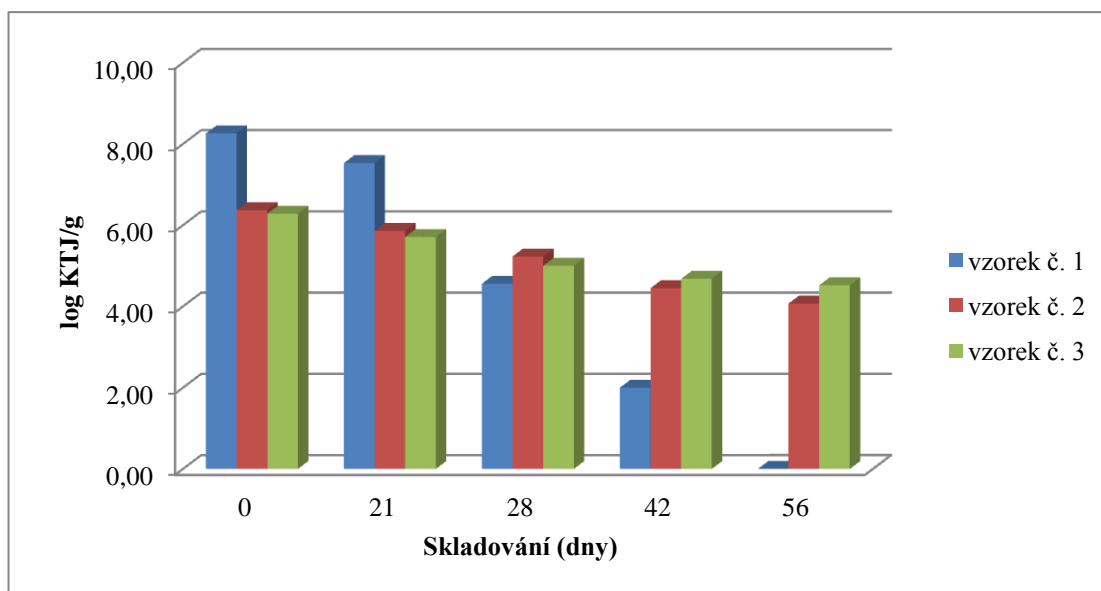
Počty bifidobakterií zjištěné u vzorku č. 3 v průběhu skladování vykazují velmi podobné hodnoty jako u vzorku č. 2, a to počáteční počet  $1,90 \times 10^6$  KTJ/g ( $6,28 \log$  KTJ/g), v 21. dni byl počet nepatrně nižší  $5,13 \times 10^5$  KTJ/g ( $5,71 \log$  KTJ/g) a v posledním dni sledování (56. den) nepatrně vyšší než počty bifidobakterií zjištěné u vzorku č. 2, a to  $3,30 \times 10^4$  KTJ/g ( $4,52 \log$  KTJ/g). Také u vzorku č. 3 nesplnil

daný výrobek dostatečný počet živých bifidobakterií v den končící deklarované doby spotřeby podle Vyhlášky č. 77/2003 Sb.

**Tabulka č. 13)** Zastoupení rodu *Bifidobacterium* (KTJ/g) u sledovaných třech vzorků

Vzorek		Skladování (dny)				
		0	21	28	42	56
1	log	8,26	7,53	4,56	2,00	0,00
	počet	$1,80 \times 10^8$	$3,40 \times 10^7$	$3,60 \times 10^4$	$1,00 \times 10^2$	0,00
2	log	6,37	5,86	5,23	4,45	4,07
	počet	$2,34 \times 10^6$	$7,20 \times 10^5$	$1,70 \times 10^5$	$2,80 \times 10^4$	$1,18 \times 10^4$
3	log	6,28	5,71	5,00	4,68	4,52
	počet	$1,90 \times 10^6$	$5,13 \times 10^5$	$1,00 \times 10^5$	$4,80 \times 10^4$	$3,30 \times 10^4$

**Graf č. 10)** Zastoupení rodu *Bifidobacterium* (log KTJ/g) u sledovaných třech vzorků



Bifidobakterie vykazují v mléce jen slabý růst. Potřebují přísadek růstových faktorů, aby dosáhli požadovaného počtu. Růst bifidobakterií podporuje například:  $\kappa$ -kasein,  $\alpha$ -laktalbumin,  $\beta$ -laktoglobulin, kvasniční extrakt, treonin nebo cystein. Často

kvůli nákladnosti obohacování výrobků aminokyselinami se některé výrobky obohacují prebiotickými oligosacharidy. Patří mezi ně galaktooligosacharidy, fruktooligosacharidy, isomaltooligosacharidy, inulin, rafinóza nebo laktulóza (RUDOLFOVÁ, ČURDA, 2005). Je možné, že ve sledovaných vzorcích neměly bifidobakterie dostatek živin pro svůj růst a jejich počty byly nízké.

Rovněž výsledné pH na konci fermentace je kritickým faktorem pro přežití těchto bakterií. Pokud klesne pod hodnotu 4,4 pH, způsobí tak snížení počtu bifidobakterií (SHAH, 2000). Hodnoty pH, které byly naměřeny u sledovaných jogurtů, především u vzorku č. 2 a č. 3, kde na konci deklarované doby spotřeby výrobek neobsahoval dostatečný počet těchto bakterií, nepřesáhly hodnotu pH 4,16. Toto mohl být jeden z faktorů, proč daný výrobek nesplňoval požadavky Vyhlášky č. 77/2003 Sb.

Dalším faktorem přežívání bifidobakterií mohou být vzájemné interakce mezi přítomnými druhy ve výrobku. Výzkumy provedené firmou Chr. Hansen ukázaly, že některé kmeny *Streptococcus thermophilus* růst bifidobakterií inhibují (TAMINE, 2005).

Mezi další kritické faktory patří i množství kyslíku, který je pro bifidobakterie toxický. SHAH (2000) provedl studii, ve které zkoumal množství kyslíku v plastových a skleněných obalech a zjistil, že podíl rozpuštěného kyslíku byl vyšší u jogurtů v plastových kelímcích. Vysoký počet bakterií zůstal v produktu uloženém ve skleněném obalu, kde se počet bifidobakterií dokonce zdvojnásobil. Sledované vzorky č. 1, 2 a 3 byly všechny v plastových obalech, tudíž přichází v úvahu i tento vliv na počet bakterií rodu *Bifidobacterium*.

Velice významný vliv mohlo mít i kultivační médium, na kterém bylo provedeno stanovení počtu bifidobakterií. V této práci byl využit MRS agar se suplementem (dicloxacilin a L-cystein). KRAHULCOVÁ (2011) v obdobném pokusu, kde byly použity vzorky bílých jogurtů, kultivovala bakterie rodu *Bifidobacterium* na MRS agaru obohaceném o cystein pro podporu růstu bifidobakterií a dále na MSMA agaru (Modified Skim Milk Agar). Autorka uvádí následující údaje - bakterie rodu *Bifidobacterium* byly na MRS agaru s cysteinem v počtu  $3,15 \times 10^7$  KTJ/g (7,50 log KTJ/g), tato hodnota je podobná hodnotám, kterých bylo dosaženo v této diplomové práci na MRS agaru se suplementem.

Na MSMA agaru byl počet bakterií  $1,35 \times 10^{10}$  KTJ/g (10,13 log KTJ/g). Vzhledem k tomu, že autorka zjišťovala počty bakterií pouze nultý den, je pravděpodobné, že i při stanovení za 21 dní (tzn. v den končící deklarované doby spotřeby) by tato hodnota byla nad  $10^6$  KTJ/g, kterou ukládá Vyhláška č. 77/2003 Sb. pro počet bakterií rodu *Bifidobacterium*. Důvodem může být preference výrobce klasického MRS agaru bez suplementů pro zástupce rodu *Lactobacillus*. Půda MSMA je doporučena výrobcem pro kultivace všech typů mléčných bakterií. Z toho vyplývá, že nelze přesně říci, že by výrobce produktů sledovaných v této práci nedodržel podmínky Vyhlášky č. 77/2003 Sb., ale je možné, že nebyla zvolena nejvhodnější půda pro kultivaci bifidobakterií.

#### **4.2.3 Celkový počet mikroorganismů v závislosti na sledovaném vzorku**

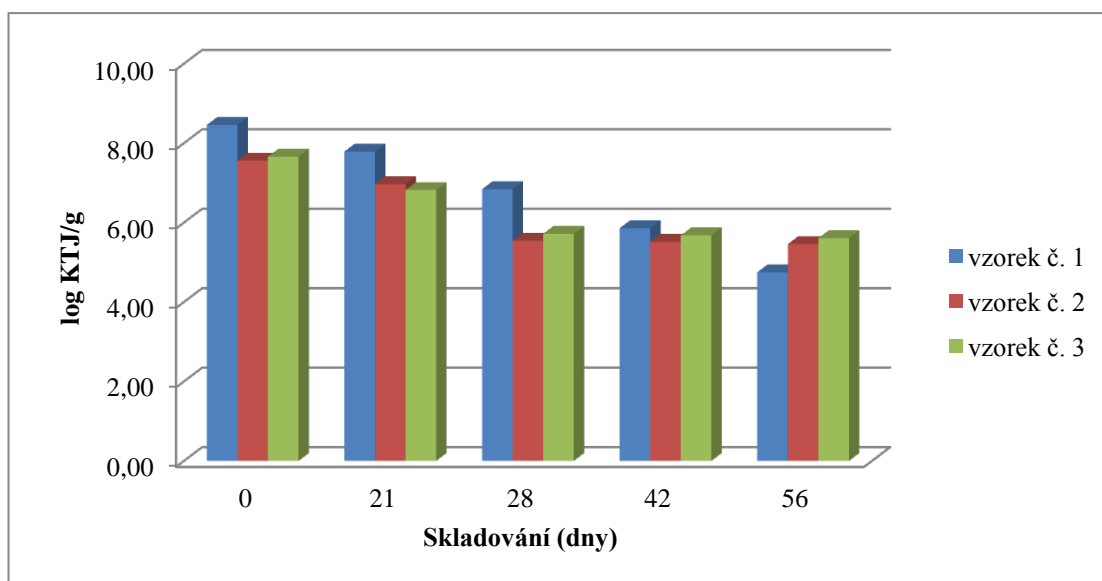
Tabulka č. 14 a graf č. 11 znázorňují celkový počet mikroorganismů (CPM) zjištěný u všech vzorků v průběhu skladování. CPM není ukazatelem nežádoucí kontaminace, ale promítají se v něm i počty bakterií kmene *Lactobacillus*, *Streptococcus* nebo i bakterií rodu *Bifidobacterium*.

Případné rozdíly mezi CPM a součtem bakterií kmene *Lactobacillus*, *Streptococcus* a bakterií rodu *Bifidobacterium* by mohly být způsobené druhem použité kultivační půdy. Pro stanovení CPM byl využit kultivační agar firmy Merck, s.r.o., GTK agar, který je doporučený Mezinárodní mlékárenskou federací (IDF) jako standardní agar pro zjištění fakultativně anaerobních mezofilních bakterií (CPM) v mléce. Kmeny *Lactobacillus*, *Streptococcus* a rod *Bifidobacterium* byly jednotlivě kultivovány na půdách se specifickým složením, které umožňuje jejich dobrý růst. Lze říci, že agar GTK není plně vhodný pro stanovení celkového počtu mikroorganismů ve fermentovaných mléčných výrobcích. Z tohoto důvodu mohou vzniknout rozdíly v počtu mezi CPM a součtem bakterií kmene *Lactobacillus*, *Streptococcus* a bakterií rodu *Bifidobacterium*. Zjištěné hodnoty CPM nemají zásadní vliv na posouzení celkové kvality vyráběných jogurtů.

**Tabulka č. 14)** Celkový počet mikroorganismů (KTJ/g) u všech třech vzorků průběhu skladování

Vzorek		Skladování (dny)				
		0	21	28	42	56
1	log	8,46	7,79	6,84	5,86	4,75
	počet	$2,86 \times 10^8$	$6,10 \times 10^7$	$6,90 \times 10^6$	$7,30 \times 10^5$	$5,60 \times 10^4$
2	log	7,56	6,97	5,54	5,52	5,46
	počet	$3,60 \times 10^7$	$9,30 \times 10^6$	$3,50 \times 10^5$	$3,30 \times 10^5$	$2,90 \times 10^5$
3	log	7,66	6,82	5,72	5,68	5,61
	počet	$4,52 \times 10^7$	$6,50 \times 10^6$	$5,20 \times 10^6$	$4,80 \times 10^6$	$4,10 \times 10^6$

**Graf č. 11)** Celkový počet mikroorganismů (log KTJ/g) u všech třech vzorků v průběhu skladování

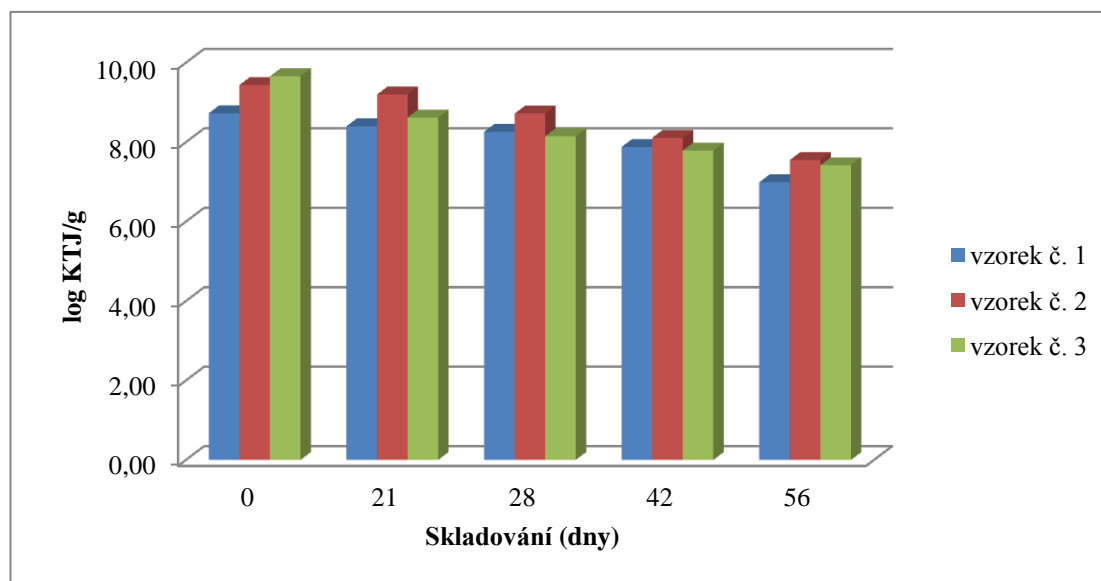


Pro přehlednost je zde uvedena tabulka č. 15 a graf č. 12 zobrazující součet počtu kmenů *Lactobacillus*, *Streptococcus* a rodu *Bifidobacterium*.

**Tabulka č. 15)** Součet počtu bakterií kmene *Lactobacillus*, *Streptococcus* a bakterií rodu *Bifidobacterium* (KTJ/g) u všech třech vzorků v průběhu skladování

Vzorek		Skladování (dny)				
		0	21	28	42	56
1	log	8,73	8,4	8,26	7,88	6,99
	počet	$5,31 \times 10^8$	$2,46 \times 10^8$	$1,80 \times 10^8$	$7,60 \times 10^7$	$9,80 \times 10^6$
2	log	9,44	9,2	8,72	8,11	7,55
	počet	$2,77 \times 10^9$	$1,59 \times 10^9$	$5,30 \times 10^8$	$1,30 \times 10^8$	$3,53 \times 10^7$
3	log	9,66	8,62	8,15	7,79	7,42
	počet	$4,58 \times 10^9$	$4,21 \times 10^8$	$1,40 \times 10^8$	$6,11 \times 10^7$	$2,64 \times 10^7$

**Graf č. 12)** Celkový součet počtu bakterií kmene *Lactobacillus*, *Streptococcus* a bakterií rodu *Bifidobacterium* (log KTJ/g) u všech třech vzorků v průběhu skladování



U všech tří vzorků bylo také provedeno stanovení na přítomnost koliformních bakterií, plísní a kvasinek. V žádném z analyzovaných vzorků nebyla potvrzena přítomnost těchto nežádoucích mikroorganismů, které by jinak mohly mít vliv na kažení jogurtů nebo způsobovat nežádoucí biochemické změny a tím mít negativní vliv na lidské zdraví.

#### 4.2.4 Souhrnné vyhodnocení vlivu sledovaných vzorků a doby skladování

Tabulka č. 16 zobrazuje statistické vyhodnocení vlivu sledovaných vzorků na průměrný počet bakterií kmenů *Lactobacillus*, *Streptococcus* a bakterií rodu *Bifidobacterium*. Ze statistického hodnocení vyplývá, že se průměrné logaritmické hodnoty sledovaných bakterií významně nelišily. Pro přehlednější porovnání jsou zde uvedeny také grafy č. 13 až 16 s počty bakterií kmene *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* + *Streptococcus* a rodu *Bifidobacterium*. Na těchto grafech je zřetelné, že během sledovaného období nedošlo k výraznějším rozdílům v počtu těchto bakterií v závislosti na druhu sledovaného vzorku.

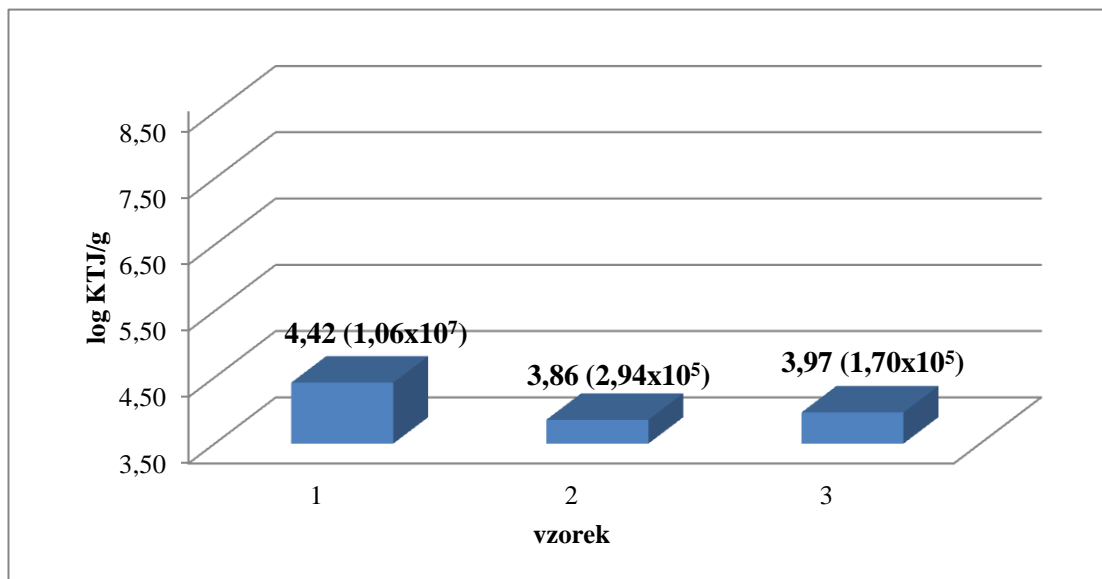
**Tabulka č. 16)** Vliv sledovaného vzorku na vybrané mikrobiologické ukazatele

			1	2	3	p
<i>Lactobacillus</i> (v 1 g) (n=5)	log	x	4,42	3,86	3,97	0,8968
		s <sub>x</sub>	2,16	2,01	1,73	
<i>Streptococcus</i> (v 1 g) (n=5)	log	x	7,99	8,61	8,33	0,4547
		s <sub>x</sub>	0,60	0,78	0,87	
<i>Bifidobacterium</i> (v 1 g) (n=5)	log	x	4,47	5,20	5,24	0,8201
		s <sub>x</sub>	3,53	0,95	0,74	
<i>Lactobacillus</i> + <i>Streptococcus</i> (v 1 g) (n=5)	log	x	8,00	8,61	8,33	0,4740
		s <sub>x</sub>	0,61	0,78	0,87	
	průměrný poměr	x	1 : 2,13	1 : 2,92	1 : 2,65	0,7075
		s <sub>x</sub>	0,86	1,78	1,72	

\* x = průměrné hodnoty; s<sub>x</sub> = směrodatná odchylka; p = statistická významnost;

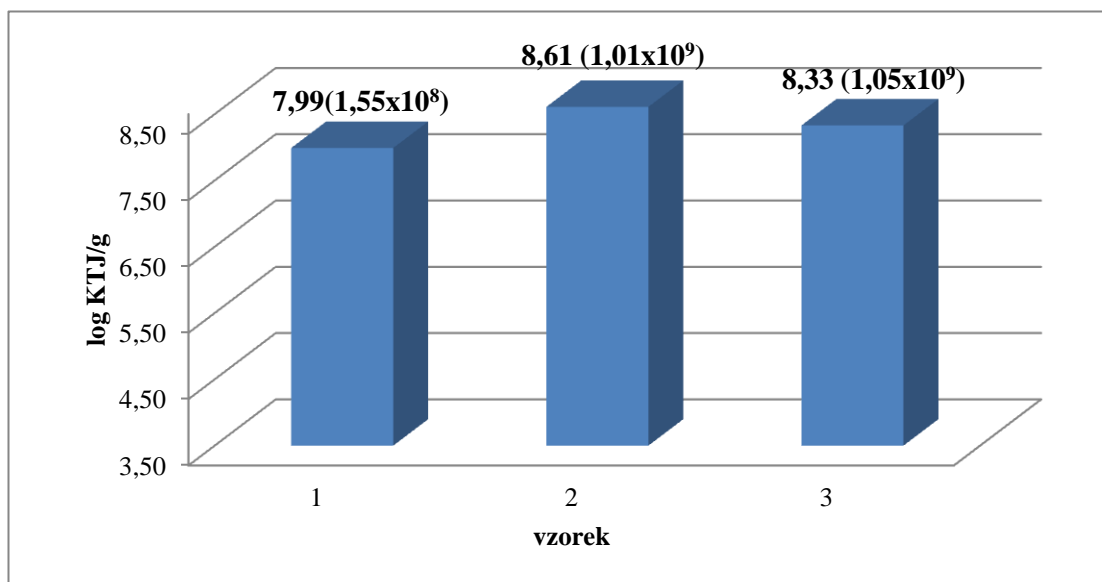


**Graf č. 13)** Vliv sledovaného vzorku na počet bakterií kmene *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (log KTJ/g)



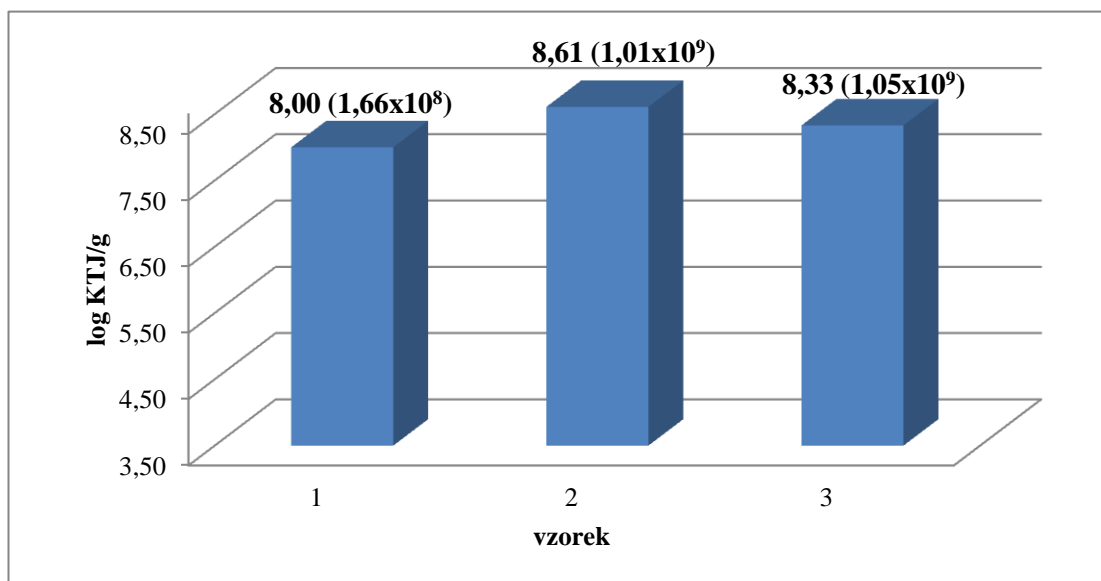
\* v závorkách jsou uvedeny počty sledovaných mikroorganismů (KTJ/g)

**Graf č. 14)** Vliv sledovaného vzorku na počet bakterií kmene *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* (log KTJ/g)



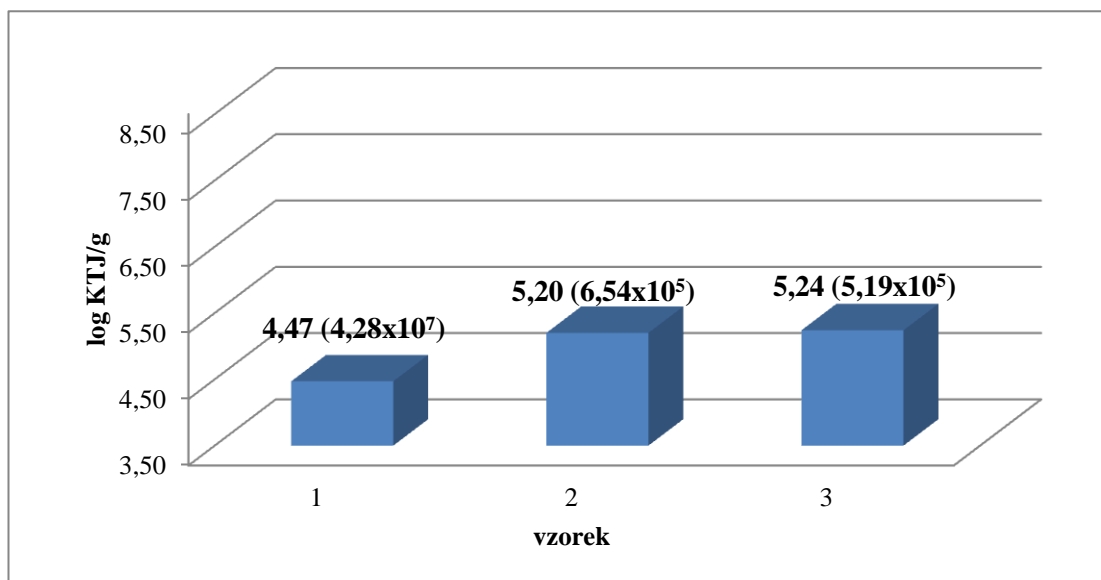
\* v závorkách jsou uvedeny počty sledovaných mikroorganismů (KTJ/g)

**Graf č. 15)** Vliv sledovaného vzorku na součet bakterií kmenů *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* (log KTJ/g)



\* v závorkách jsou uvedeny počty sledovaných mikroorganismů (KTJ/g)

**Graf č. 16)** Vliv sledovaného vzorku na počet bakterií rodu *Bifidobacterium* (log KTJ/g)



\* v závorkách jsou uvedeny počty sledovaných mikroorganismů (KTJ/g)

Případné rozdíly mezi jednotlivými sledovanými vzorky v počtu bakterií kmenů *Lactobacillus*, *Streptococcus* a bakterií rodu *Bifidobacterium* by mohly být

způsobené použitím různých komerčně dostupných forem čistých mlékařských kultur. Čisté mlékařské kultury mohou být v tekutém stavu, lyofilizované nebo hluboko zamražené (HRABĚ et al., 2006). Dalším možným důvodem rozdílných počtů sledovaných bakterií mezi jednotlivými vzorky, který přichází v úvahu u výrobků s probiotickou kulturou, jsou různé způsoby fermentace mléka, kdy se probiotické mikroorganismy přidávají do mléka společně se startovací kulturou. V tomto případě probiotika rostou ve směsi se startovací kulturou jen velmi pomalu. Druhým způsobem je, že probiotika rostou v jedné části mléka (aby se docílilo vysokého počtu jejich buněk) a mikroorganismy startovací kultury rostou v jiné části mléka. Po ukončení tohoto způsobu fermentace se obě části smíchají dohromady. Třetím způsobem je, že probiotická kultura je využita jako startovací kultura, poté se ale doba fermentace zvýší až na několik dní (DRAKARLARAKOU et al., 2003).

Mezi další vlivy působící na počet bakterií ve výrobku může být technologie výroby jogurtů. V ČR se využívá metoda klasická termostatová, kdy fermentace probíhá ve spotřebitelském obalu, fermentace se ukončuje dříve při vyšším pH (4,7 – 5,0), protože vychlazení v obalu je relativně pomalé a fermentace částečně probíhá i během chlazení (KADLEC et al., 2008). Druhým způsobem fermentace je fermentace tanková, která probíhá v tancích a po ukončení fermentace a promíchání je jogurt plněn do spotřebitelských obalů. Zde je možné, jak již bylo uvedeno v kapitole 4.2.1, že při dlouhodobé kultivaci a nižší teplotě méně rostou laktobacily, což má za následek nižší kyselost a méně typickou jogurtovou chuť a vůni (ŠUSTOVÁ, LUŽOVÁ, 2008). Výrazný vliv na počet bakterií v jogurtu má výsledné pH na konci fermentace, které je kritickým faktorem pro přežití probiotického mikroorganismu. Pokud klesne pod 4,4 pH, způsobí tak snížení počtu probiotik (NĚMEČKOVÁ et al., 2011).

Tabulka č. 15 a grafy č. 17 a 18 znázorňují vliv skladování na mikrobiologické ukazatele. Z výsledků uvedených v tabulce č. 15 je patrné, že sledovaný vliv byl statisticky významný. Z hodnot stanoveného počtu mikroorganismů je zřejmé, že u všech sledovaných mikrobiologických ukazatelů byl zjištěn pokles. Zatímco však průměrné hodnoty počtu streptokoků klesaly v průběhu skladování pozvolně (z 9,19 na 7,32 log KTJ/g), u druhých dvou mikroorganismů byly poklesy prudké. V případě laktobacilů z hodnoty 6,56 na hodnotu

1,56 log KTJ/g a u bifidobakterií z hodnoty 6,97 na hodnotu 2,86 log KTJ/g (graf č. 17).

K postupnému poklesu počtu bakterií mléčného kvašení během doby skladování dochází především z důvodu vyčerpání živin, které jsou důležité pro růst těchto mikroorganismů. Mezi takové živiny patří zejména vitamíny a aminokyseliny. Díky růstu bakterií se postupně zvyšuje množství kyseliny mléčné ve výrobku a ta snižuje celkové pH, z čehož vyplývá, že s delším skladováním dochází ke změně prostředí, které již není vhodné pro růst bakterií mléčného kvašení a zcela nevhodné pro růst bifidobakterií (KADLEC, 2008).

Vzhledem k posouzení počtu živých bakterií v den deklarovaného ukončení spotřeby lze uvést, že všechny tři výrobky splňovaly požadavky Vyhlášky č. 77/2003 Sb. pro stanovení počtu bakterií rodu *Lactobacillus* a *Streptococcus* (viz kapitola č. 4.2.1). Při stanovení počtu bakterií rodu *Bifidobacterium* požadavky Vyhlášky č. 77/2003 Sb. na počet bakterií nebyly v den končící deklarované doby spotřeby splněny u vzorku č. 2 a 3. Možné důvody jsou uvedeny v kapitole č. 4.2.2. Vzorek č. 1 požadavky Vyhlášky č. 77/2003 Sb. splňoval.

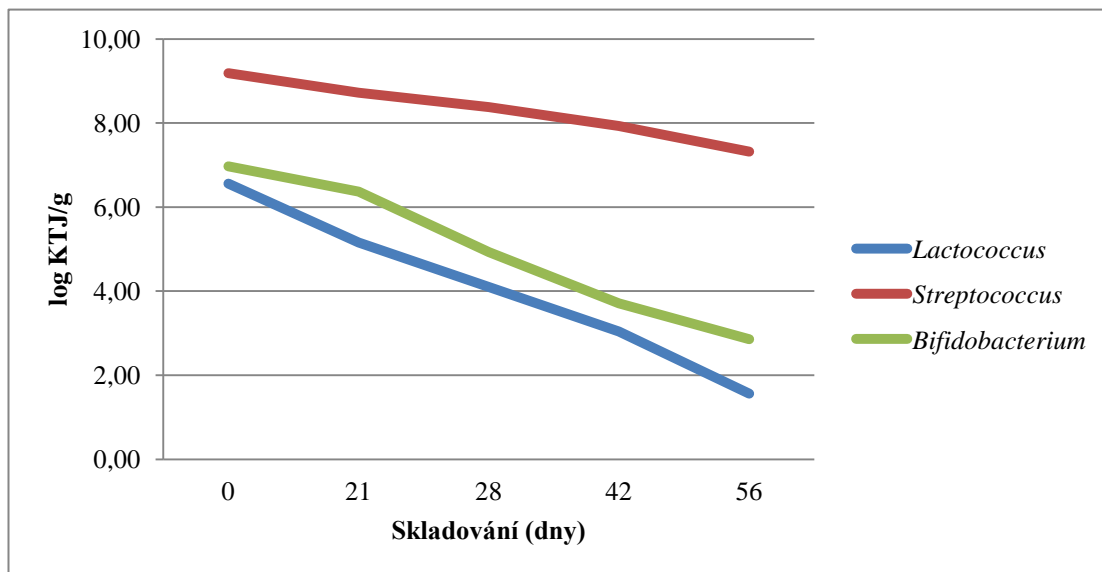
Tabulka č. 15) Vliv skladování na vybrané mikrobiologické ukazatele

			0	21	28	42	56	p
<i>Lactobacillus</i> (v 1 g) (n=5)	log	x	6,56 <sup>c</sup>	5,16 <sup>d</sup>	4,10 <sup>c</sup>	3,04 <sup>b</sup>	1,56 <sup>a</sup>	0,0000
		s <sub>x</sub>	1,01	0,15	0,23	0,63	0,45	
<i>Streptococcus</i> (v 1 g) (n=5)	log	x	9,19 <sup>d</sup>	8,72 <sup>cd</sup>	8,38 <sup>bc</sup>	7,93 <sup>ab</sup>	7,32 <sup>a</sup>	0,0018
		s <sub>x</sub>	0,63	0,44	0,31	0,17	0,29	
<i>Bifidobacterium</i> (v 1 g) (n=5)	log	x	6,97 <sup>c</sup>	6,37 <sup>bc</sup>	4,93 <sup>abc</sup>	3,71 <sup>ab</sup>	2,86 <sup>a</sup>	0,0307
		s <sub>x</sub>	1,12	1,01	0,34	1,49	2,49	
<i>Lactobacillus + Streptococcus</i> (v 1 g) (n=5)	log	x	9,22 <sup>d</sup>	8,72 <sup>cd</sup>	8,38 <sup>bc</sup>	7,93 <sup>ab</sup>	7,32 <sup>a</sup>	0,0013
		s <sub>x</sub>	0,59	0,44	0,31	0,17	0,29	
<i>Lactobacillus + Streptococcus</i> (v 1 g) (n=5)	průměrný poměr	x	1 : 1,43	1 : 1,69	1 : 2,05	1 : 2,71	1 : 4,96	0,0007
		s <sub>x</sub>	0,29	0,07	0,10	0,69	1,38	
CPM (v 1 g) (n=5)	log	x	7,89 <sup>b</sup>	7,19 <sup>b</sup>	6,03 <sup>a</sup>	5,69 <sup>a</sup>	5,27 <sup>a</sup>	0,0004
		s <sub>x</sub>	0,49	0,52	0,70	0,17	0,46	

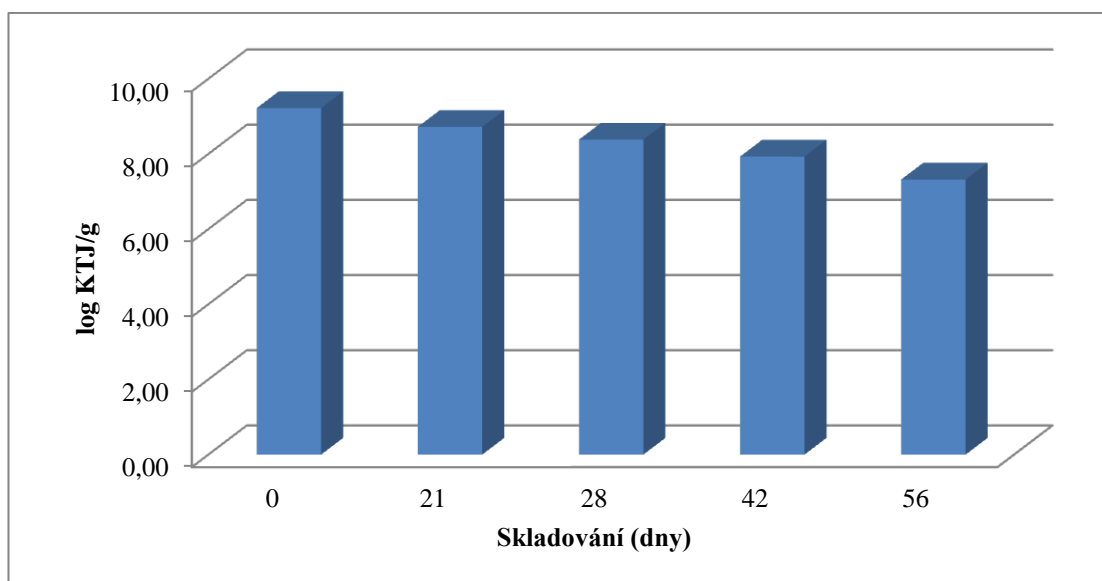
\* x = průměrné hodnoty; s<sub>x</sub> = směrodatná odchylka; p = statistická významnost

a, b, c, d = průměry s odlišnými horními indexy se liší na hladině významnosti p<0,05

**Graf č. 17)** Průměrné hodnoty počtů bakterií kmenů *Lactobacillus*, *Streptococcus* a rodu *Bifidobacterium* v průběhu skladování (log KTJ/g)



**Graf č. 18)** Vliv skladování na součet počtu bakterií kmene *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus* (log KTJ/g)



## 5. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo sledovat zastoupení probiotických mikroorganismů ve vybraných bílých jogurtech v průběhu skladování a porovnat jejich množství s požadavky dané legislativou. Práce byla také zaměřena na stanovení kyselosti jogurtů, která má významný vliv na životaschopnost probiotik.

Aktivní a titrační kyselost je jedním z nejdůležitějších jakostních ukazatelů. Naměřené hodnoty aktivní kyselosti se měnily především mezi nultým dnem sledování a 21. dnem (tzn. v den končící deklarované doby spotřeby). U titrační kyselosti byly naměřeny poměrně nízké počáteční hodnoty, které v průběhu skladování mírně stoupaly. Důvodem, proč sledované jogurty neměly optimální kyselost, může být doba a teplota fermentace, případně složení obou specifických kmenů jogurtové kultury. Při statistickém vyhodnocení bylo zjištěno, že průměrné hodnoty aktivní a titrační kyselosti se statisticky významně nelišily v závislosti na době skladování, ale statisticky významně se lišily v závislosti na výrobci.

Při stanovení *Lactobacillus* a *Streptococcus* byl počet těchto bakterií vyrovnaný pouze v nultý den u vzorku č. 1. Kmen *Lactobacillus* vykazoval poměrně nízké zastoupení u všech vzorků a v průběhu skladování docházelo k dalšímu zřetelnému snižování počtu těchto bakterií. Tento jev mohl být zapříčiněn dlouhou kultivací při nižší teplotě, kdy laktobacily rostou méně. Dalším faktorem mohlo být nízké pH výrobku. Kmen *Streptococcus* vykazoval u všech vzorků vysoký počet živých bakterií po celou dobu sledování. Počáteční hodnoty se pohybovaly v řádech  $10^9 - 10^8$  KTJ/g. Na konci skladování, tzn. 56. den, bylo zastoupení počtu bakterií *Streptococcus* mezi hodnotami  $10^6 - 10^7$  KTJ/g, a to u všech sledovaných vzorků. Celkový počet kmenů *Lactobacillus* a *Streptococcus* v den končící deklarované doby spotřeby splňoval požadavky Vyhlášky č. 77/2003 Sb., která stanovuje celkové množství těchto kulturních mikroorganismů na  $10^7$  KTJ/g.

Mikroorganismy rodu *Bifidobacterium* byly u vzorku č. 1 v dostatečném množství až do dne končící deklarované doby spotřeby, poté jejich počet klesal a poslední den skladování (56. den), již nebyly přítomné žádné živé bakterie rodu *Bifidobacterium*. U vzorků č. 2 a 3 byly zjištěny nízké počty už při prvním stanovení a v 21. dni byl počet pouze v řádu  $10^5$  KTJ/g. Tuto skutečnost lze vysvětlit několika možnými působícími faktory: nízké množství růstových faktorů, nízké pH výrobku,

vzájemné interakce mezi přítomnými druhy (některé kmeny například bakterie *Streptococcus thermophilus* mohou inhibovat růst bifidobakterií), množství rozpuštěného kyslíku v produktu (kyslík je pro bifidobakterie toxický), a v úvahu přichází i to, že nebyla zvolena vhodná půda pro kultivaci rodu *Bifidobacterium*.

V žádném z analyzovaných vzorků nebyla potvrzena přítomnost nežádoucích mikroorganismů, a to koliformních bakterií, kvasinek a plísní.



## 6. SUMMARY

The aim of the diploma thesis was to monitor occurrence of probiotic microorganisms in representative white yoghurts during storage and to compare their amounts with requirements of legal regulations. The work also focused on the determination of pH in yoghurts which is essential for the probiotic viability.

Active and titratable acidity is one of the most important quality indicators. The ascertained values of active acidity mostly changed between the zero and the 21<sup>st</sup> (i.e. date of expiry). In titratable acidity, initial values were relatively low and they slightly increased in the process of determination of titratable acidity. The reason why the monitored yoghurt lacked the optimal acidity may be the fermentation time and temperature, or composition of both specific yoghurt culture strains. During statistical evaluation it was ascertained that average values of active and titratable acidity did not significantly differ in relation to the storage time, but the statistical differences were significant in relation to the manufacturer.

In the case of *Lactobacillus* and *Streptococcus*, even numbers were measured only on day zero in sample No. 1. The representation of *Lactobacillus* strain was relatively low in all the samples and its amount markedly decreased during the storage period. This phenomenon could have been caused by long cultivation at low temperature, which hinders the growth of lactobacilli. Another factor may have been the low pH of the product. *Streptococcus* strain was represented by a large number of live bacteria for the entire storage period. The initial values were approximately  $10^9 - 10^8$  CFU/g. At the end of storage, i.e. on the 56<sup>th</sup> day, the numbers of *Streptococcus* bacteria were  $10^6 - 10^7$  CFU/g in all the samples. The total number of *Lactobacillus* and *Streptococcus* strains on the date of expiry complied with Decree No. 77/2003 Coll., which sets the total number of these cultures of microorganisms to  $10^7$  CFU/g.

*Bifidobacterium* genus was represented in the sufficient amount in sample No. 1 until the date of expiry and in comparison with day zero, the numbers gradually decreased for the monitored period. No live bacteria of the *Bifidobacterium* genus were present on the last day, i.e. day 56. In samples 2 and 3, low numbers were ascertained during the initial measurement and on the 21<sup>st</sup> day, their number amounted to  $10^5$  CFU/g. This can be explained by several possible factors affecting the number of live bacteria: low amount of growth factors, low pH of the product,

interaction between the present kinds of bacteria (certain strains, e.g. *Streptococcus thermophilus* are likely to inhibit the growth of bifidobacteria), the volume of oxygen dissolved in the product (oxygen is toxic for bifidobacteria) and we may also consider the suitability of the ground for cultivation of *Bifidobacterium* genus.

It was also ascertained whether the samples contained undesirable microorganisms, namely coliform bacteria, yeast and mold. Their presence was not confirmed in any of the analyzed samples.

## 7. SEZNAM LITERATURY

1. CONTOR, L. Nutr. Metab. Cardiovasc. *Functional food science in Europe*. 2001, č. 11, s. 20 – 23.
2. CUPÁKOVÁ, Š., JANŠTOVÁ, B., NAVRÁTILOVA, P., NECIDOVA, L. Úloha probiotik v kysaných mléčných výrobcích. *Veterinářství*, 2002, 52, s. 66-68.
3. ČERNÁ, E., MERGL, M. Laboratorní kontrolní metody v mlékařství. 1. vyd. Praha: Nakladatelství technické literatury, 1971, s. 264.
4. <sup>A</sup>DAVE, R. I., SHAH N. P. Viability of Yoghurt and Probiotic Bacteria in Yoghurts Made from Commercial Starter Cultures. *Elsevier Science Limited*. Great Britain, 1997, č. 7, 31 – 41 s.
5. <sup>B</sup>DAVE, R. I., SHAH, N. P. Effect of cysteine on the viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. *International dairy journal*. AUG-SEP, 1997, č. 7, 537-545 s.
6. DRAKOULARAKOU A. P., KEHAGIAS C., KARAKANAS P. N., KOULOURIS S., TIMBIS D. A study of the growth of *Lactobacillus acidophilus* in bovine, ovine and caprine milk. *Int. J. Dairy Technol.* 56: s. 59-61
7. DRDÁK, M., et al. *Základy potravinářských technologií: Spracovanie rastlinných a živočíšnych surovín, cereálne a fermentačné technológie, uchovanie, hygiena a ekológia potravín*. 1. vyd. Brno: Malé Centrum, 1996. 511 s. ISBN 80-967064-1-1.
8. DVOŘÁK, V. *Analytická chemie I*. 1.vyd. Kroměříž: VOŠP, 2003.
9. GAJDŮŠEK, S. *Mlékařství*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2000. ISBN 80-7157-342-6.
10. GÖRNER, F., L. VALÍK. *Aplikovaná mikrobiologie poživatin*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
11. GRIEGER, C., HOLEC, J., a kol.: *Hygiena mléka a mléčných výrobků*. Bratislava: Příroda, 1990. 520 s. ISBN 80-07-00253-7
12. HEUBNER, J., WEHLIG R. L., HUTKINS R. V. Functional activity of commercial prebiotics. *Int. Dairy J.* 2007, č. 17, 770 – 775.
13. HORÁČKOVÁ, Š. a E. ŠVIRÁKOVÁ. Probiotické mikroorganismy v mlékárenském průmyslu. *Mlékařské listy*. 2009, 113/114, s. 13.

14. HORÁČKOVÁ, Š. Nové trendy v probiotikách. *Mlékařské listy*. 2010, č. 120, s. 19.
15. HORIUCHI, H., et al. A method for manufacturing superior set yogurt under reduced oxygen conditions. *Journal of Dairy Science: Official Publication of the American Dairy Science Association*. 2009, vol. 92, no. 9, 4112 – 4121 s.
16. HRABĚ, J., BŘEZINA, P., VALÁŠEK, P. *Technologie výroby potravin živočišného původu*. 1. vydání. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2006. 180 s. ISBN 80-7318 405-2.
17. HUGENHOLTZ, J., SYBESMA, W., GROOT, M. N., WISSELINK, W., LADERO, V., BURGESS, K., SINDEREN, D., PIARD, J.-Ch., EGGINK, G., SMID, E.J., SAVOY, G., SESMA, F., JANSEN, T., HOLS, P., KLEEREBEZEM, M. Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Anton. Leeuw.*, 2002, 82(1-4):217-35.
18. CHRISTENSEN, J. E., DUDLEY, E. G., PEDERSON, J. A., STEELE, J. L. Peptidases and aminoacid catabolism in lactic acid bacteria. *A. Van. Leeuw.*, 1999, 76(1-4):217-246.
19. JAY, J. M., LOESSNER, M. J., GOLDEN, D. A. *Modern Food Microbiology*. 7th edition. New York: Springer, 2005, 790s. ISBN 0-38723180-3.
20. JOERGER, R. D. Antimicrobial peptides and bacteriophages. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2003, 77(2):326-330.
21. KADLEC, P. *Technologie potravin II*. 1. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. Technologie mléka a mlékárenských výrobků, 236 s. ISBN 978-80-7080-510-7.
22. KADLEC, P., a kol. *Co byste měli vědět o výrobě potravin?: technologie potravin*. Vyd. 1. Ostrava: Key publishing, 2009. 536 s. Monografie. ISBN 978-80-7418-060-6.
23. KAILASAPATHY, K., I. HARMSTORF a M. PHILLIPS. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in stirred fruit yogurts. *Science Direct*. 2008, č. 4, 1317 – 1322 s.
24. KNĚZ, V., et al. *Čisté mlékařské kultury a jejich použití v mlékárenském průmyslu*. 2. přeprac. vyd. Praha: SNTL/Slovenské vydavatelstvo technickej literatury, 1960. 300s.

25. KOVAŘÍKOVÁ, E., ERBAN, V. Výživa a potraviny. *Probiotika-přátelé nejbližší*, 2007, roč.62, č. 6, s. 153-155.
26. KRAHULCOVÁ, A. *Vývoj probiotického doplňku stravy*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2011. 114 s. Diplomová práce. Vedoucí práce Dana Vránová.
27. LeBLANC J.G., de GIORI G.S., SMID E.J., HUGENHOLTZ J., SESMA F. (2007) *Folate production by lactic acid bacteria and other food-grade microorganisms*. In: Mendez-Vilas A. (eds.) *Communicating Current research and Educationař Topics and Trends in Applied Microbiology*. 329-339, Formatex.
28. LEDVINA, M., STOKLASOVÁ, A., CERMAN, J. *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2004. 2 sv. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0851-0.
29. LEHEROVÁ, H. *Sledování růstu kulturní mikroflóry v jogurtu v průběhu minimální doby trvanlivosti*. České Budějovice, 2013. Diplomová práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Vedoucí práce Eva Samková.
30. LUKÁŠOVÁ, J., SMRČKOVÁ, A. Obsah vápníku v mléce a jeho význam. *Veterinářství*, 2003, 53, s. 192-193 .
31. MARTH, E. T., J. L. STEELE. *Applied Dairy Microbiology*. 2nd editin. New York: Marcel Dekker, 2001. 13 s. ISBN 0-8247-0536-X.
32. MAXA, V., RADA, V. Význam bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení pro výživu a zdraví. 2. vydání. Praha: ÚZPI 2002. 40 s. ISBN 80-85120-57-7.
33. McSWEENEY, P. L. H., FOX, P. F. *Advanced Dairy Chemistry, Volume 3 – Lactose, Water, Salt and Minor Constituents*. 3rd Edition, Springer-Verlag. s. 825.
34. MINERVINY, F., ALGARON, F., FOX, P. F., MONNET, V., GOBETTI, M., RIZZELO, C. G. Angiotensin I converting enzyme inhibitory and antimicrobial bioactive peptides. *Int. J. Dairy Technol.*, 2003,69(9):5297-5305.
35. NĚMEČKOVÁ, I., MARTÍNKOVÁ S., ROUBAL P. Vliv pH a teploty skladování na mikrobiologickou kvalitu acidofilních mlék. *Mlékařské listy*. 2011, č. 128, s. 15-18.

36. ONGOL, M. P., SAWATARI, Y., EBINA, Y., SONE, T., TANAKA, M., TOMITA, F., YOKOTA, A., ASANO, K. *Yoghurt fermented by Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus H<sup>+</sup> - ATPase-defective mutants exhibits enhanced viability of Bifidobacterium breve during storage.* International Journal and Food Microbiology. 2007, 116, 358-366 s.
37. PETŘÍKOVÁ, A. *Mikrobiální společenstva mléka.* Brno, 2012. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav experimentální biologie. Vedoucí práce Kateřina Kšicová.
38. RUDOLFOVÁ, J., ČURDA L. Prebiotický účinek galaktooligosacharidů a využití laktosy pro jejich produkci. *Chemické listy*, 2005, 99, s. 168-174.
39. SAKO, T., MATSUMOTO, K., TANAKA, R. Recent progress on research and applications nondigestible galactooligosaccharides. *International Dairy Journal*, 1999, 9, s. 69–80.
40. SALAZAR, N., et al. Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains of human origin, and metabolit activity of the producing bacteria in milk. *Journal of Dairy Science: Official Publication of the American Dairy Science Association*. 2009, vol. 92, no. 9, 4158 – 4168 s.
41. SILVA, V. S., MALCATA, F. X.: Casein as source of bioactive peptides. *Int. Dairy. J.*, 2005, 15(1):1-5.
42. SHAH, N. P. Probiotic bakterie: Selective enumeration and survival in dairy foods. *J. Dairy Sci.*, 2000, 83: 894-907.
43. STEER, T., CARPENTER, H., TUOHY, K., GIBSON, R. Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro and prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 2000, 13, s. 229-254.
44. SUCHÁNEK, P. Probiotika - další nové poznatky. *Moje zdraví*. 2006, roč. 4, č. 2, 50 – 52 s.
45. ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology.* Praha: Akademia. 2002. 363 s. ISBN 8-85605-71-6
46. ŠTAFEN, M. *Potravinářská revue. Zakysané mléčné výrobky a jogurt - nezpochybnitelná součást zdravé výživy.* 2011, 12 - 13.
47. ŠUSTOVÁ, K., LUŽOVÁ T. Výroba jogurtů. *Farmářská výroba sýrů a kysaných mléčných výrobků. V. Sborník referátů ze semináře s mezinárodní účastí.* Brno, 2008. ISBN 978-80-7375-178-4.

48. TALWALKAR, A., KAILASAPATHY, K. A review of oxygen toxicity in probiotic yogurts: Influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2004, č. 3, 117-124 s.
49. TAMINE A. Y. *Probiotic Dairy Products*. Oxford: Blackwell Publishing, 2005, 215 s.
50. TARANTO, M.P., VERA, J.L., HUGENHOLTZ, J., DE VALDEZ, G.F., SESMA, F. Lactobacillus reuteri CRL1098 Produces Cobalamin. *J. Bacteriol.*, 2003, 185(18):5643-5647.
51. TEPLÝ, M., et al. *Kefír, jogurt, acidofilní a jiné kyselky*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1968. 185 s.
52. TYKVARTOVÁ, D., J. HRABĚ, D. HORNÍČKOVÁ, J. ŠVARC, J. MRÁZEK, M. POSPÍŠIL a J. PATROVSKÝ. Výběr vhodných hydrokoloidů pro stabilizaci jakosti termizovaných jogurtových nápojů. *Mlékařské listy*. 2009, č. 118, s. 8-12.
53. VERMEIRSEN, V., VAN CAMP, J., VERSTRAETE, W. Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Br. J. Nutr.*, 2004, 92(3):357-366.
54. Vyhláška Ministerstva zemědělství ČR č. 77/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje.
55. Vyhláška Ministerstva zdravotnictví ČR č. 352/2009 Sb., kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin
56. ZADRAŽIL, K. *Mlékařství (přednášky)*. 1. vyd. Praha: Česká zemědělská Univerzita a ISV, 2002, s. 127.

### **Elektronické zdroje**

1. KOHOUT, P. Probiotika, historie a současnost. *Medicína pro praxi*. 2010, č. 2. Dostupné z: [www.tribune.cz](http://www.tribune.cz)
2. KOKEŠOVÁ, A. Imunomodulační účinky probiotik v klinické praxi. *Pediatric pro praxi*. 2009, č. 10, s. 170. Dostupné z: [www.pediatricpropraxi.cz](http://www.pediatricpropraxi.cz)
3. NEVORAL, J. Prebiotika, probiotika a synbiotika. *Pediatric pro praxi*. 2005, č. 2, s. 60. Dostupné z: [www.pediatricpropraxi.cz](http://www.pediatricpropraxi.cz)

4. ŠPELINA, V., WINKLEROVÁ D. Principy hodnocení účinnosti a bezpečnosti probiotik a charakteristika registrovaných doplňků stravy s obsahem probiotik a prebiotik. *Pediatric pro praxi*. 2009, č. 10, 247 - 250. Dostupné z: [www.pediatricpropraxi.cz](http://www.pediatricpropraxi.cz)
5. VALENTOVÁ, H. Obliba jogurtů a prevence chutí u dětí a mládeže. In: [online]. [cit. 2013-08-01]. Dostupné z: <http://institut-danone.cz/data/studie/pridelene-granty/2001-04pdf>.



## 8. SEZNAM ZKRATEK

**SH** - titrační kyselost podle Soxhlet-Henkela (je dána počtem mililitrů odměrného roztoku  $c(\text{NaOH}) = 0,25 \text{ mol.l}^{-1}$  spotřebovaného při titraci zkušebního vzorku na fenolftalein jako indikátor).

**KTJ** - kolonie tvořící jednotky

**CFU** – colony-forming unit

**CPM** - celkový počet mikroorganismů

*Lactobacillus* - *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*

*Streptococcus* - *Streptococcus salivarius ssp. thermophilus*

## 9. SEZNAM TABULEK A GRAFŮ

### 9.1 Tabulky

Tabulka č. 1) Přehled nejčastěji využívaných probiotických bakterií (HORÁČKOVÁ, ŠVIRÁKOVÁ, 2009).....	13
Tabulka č. 2) Druhy živých mikroorganismů v kysaných mléčných výrobcích (Vyhláška Ministerstva zemědělství ČR č. 77/2003 Sb.).....	18
Tabulka č. 3) Charakteristika sledovaných vzorků jogurtů – základní chemické složení (g/100g).....	27
Tabulka č. 4) Počet analyzovaných vzorků v rámci jednotlivých sledovaných ukazatelů .....	28
Tabulka č. 5) Aktivní a titrační kyselost bílých jogurtů v jednotlivých dnech skladování .....	37
Tabulka č. 6) Vliv doby skladování na aktivní a titrační kyselost jogurtu .....	40
Tabulka č. 7) Vliv sledovaných vzorků na aktivní a titrační kyselost jogurtu.....	41
Tabulka č. 8) Zastoupení kmenů <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> a <i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i> (KTJ/g) u vzorku č. 1 .....	43
Tabulka č. 9) Zastoupení kmenů <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> a <i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i> (KTJ/g) u vzorku č. 2.....	45
Tabulka č. 10) Zastoupení kmenů <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> a <i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i> (KTJ/g) u vzorku č. 3 .....	46
Tabulka č. 11) Poměry mezi sledovanými kmeny <i>Lactobacillus</i> a <i>Streptococcus</i> v průběhu skladování .....	47
Tabulka č. 12) Porovnání průměrných počtů bakterií kmene <i>Lactobacillus</i> a <i>Streptococcus</i> (KTJ/g) v průběhu skladování .....	49
Tabulka č. 13) Zastoupení rodu <i>Bifidobacterium</i> (KTJ/g) u sledovaných třech vzorků .....	51
Tabulka č. 14) Celkový počet mikroorganismů (KTJ/g) u všech třech vzorků průběhu skladování .....	54

Tabulka č. 15) Součet počtu bakterií kmene <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> a bakterií rodu <i>Bifidobacterium</i> (KTJ/g) u všech třech vzorků v průběhu skladování .....	55
Tabulka č. 16) Vliv sledovaného vzorku na vybrané mikrobiologické ukazatele .....	56
Tabulka č. 15) Vliv skladování na vybrané mikrobiologické ukazatele .....	61

## 9.2 Grafy

Graf č. 1) Aktivní kyselost bílých jogurtů v jednotlivých dnech skladování .....	38
Graf č. 2) Titrační kyselost bílých jogurtů v jednotlivých dnech skladování .....	39
Graf č. 3) Vliv sledovaných vzorků na aktivní kyselost jogurtu.....	41
Graf č. 4) Vliv sledovaných vzorků na titrační kyselost jogurtu .....	42
Graf č. 5) Zastoupení kmenů <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> a <i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i> (log KTJ/g) u vzorku č. 1 .....	44
Graf č. 6) Zastoupení kmenů <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> a <i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i> (log KTJ/g) u vzorku č. 2.....	45
Graf č. 7) Zastoupení kmenů <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> a <i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i> (log KTJ/g) u vzorku č. 3.....	46
Graf č. 8) Vztah mezi počtem bakterií kmene <i>Lactobacillus</i> (log KTJ/g) a aktivní kyselostí výrobků .....	48
Graf č. 9) Zastoupení celkového počtu bakterií kmenů <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> a <i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i> (log KTJ/g) u všech tří sledovaných vzorků .....	48
Graf č. 10) Zastoupení rodu <i>Bifidobacterium</i> (log KTJ/g) u sledovaných třech vzorků.....	51
Graf č. 11) Celkový počet mikroorganismů (log KTJ/g) u všech třech vzorků v průběhu skladování .....	54
Graf č. 12) Celkový součet počtu bakterií kmene <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> a bakterií rodu <i>Bifidobacterium</i> (log KTJ/g) u všech třech vzorků v průběhu skladování .....	55

Graf č. 13) Vliv sledovaného vzorku na počet bakterií kmene <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> (log KTJ/g).....	57
Graf č. 14) Vliv sledovaného vzorku na počet bakterií kmene <i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i> (log KTJ/g).....	57
Graf č. 15) Vliv sledovaného vzorku na součet bakterií kmenů <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> a <i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i> (log KTJ/g) .....	58
Graf č. 16) Vliv sledovaného vzorku na počet bakterií rodu <i>Bifidobacterium</i> (log KTJ/g) .....	58
Graf č. 17) Průměrné hodnoty počtů bakterií kmenů <i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> a rodu <i>Bifidobacterium</i> v průběhu skladování (log KTJ/g) .....	62
Graf č. 18) Vliv skladování na součet počtu bakterií kmene <i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i> a <i>Streptococcus salivarius ssp. thermophilus</i> (log KTJ/g) .....	62