

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4131 Zemědělství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie - Živočišné

Katedra: Katedra kvality zemědělských produktů

Vedoucí katedry: Ing. Pavel Smetana, Ph.D.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Využití bakterií mléčného kysání při produkci vybraných
potravinářských výrobků**

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

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

Autor bakalářské práce: Simona Hybšová

České Budějovice, 2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Simona HYBŠOVÁ**
Osobní číslo: **Z17541**
Studijní program: **B4131 Zemědělství**
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie - Živočišné**
Název tématu: **Využití bakterií mléčného kysání při produkci vybraných potravinářských výrobků**
Zadávací katedra: **Katedra kvality zemědělských produktů**

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

Bakterie mléčného kvašení mají příznivý vliv na gastrointestinální trakt člověka, uplatňují se při v procesu fermentace a mají využití v řadě odvětví, např. v potravinářském průmyslu při výrobě mléčných produktů.

Cílem bakalářské práce bude zpracovat literární přehled, týkající se bakterií mléčného kvašení, zejména rodu *Lactobacillus* ssp. z pohledu obecné charakteristiky, průmyslového uplatnění a zdravotního stavu jedince.

Bakalářská práce bude vypracována na základě pokynů (http://www.zf.jcu.cz/copy_of_students/informace-pro-studujici/dokumenty-studijnihoo-oddeleni/informace-pro-studujici/Jak_vypracovat_DP.pdf) podle následující osnovy:

1. Úvod - charakteristika a význam řešené problematiky
2. Cíl práce
3. Současný stav poznání dané problematiky s ohledem na cíle práce, zpracovaný formou literárního přehledu na základě studia soudobé vědecké a odborné literatury
4. Závěr - shrnutí získaných informací, návrhy a doporučení vyplývající z problematiky
5. Summary - přehled a nejdůležitější výsledky včetně klíčových slov (v anglickém jazyce)
6. Seznam literatury - jednotný, podle platných citačních zásad

Rozsah grafických prací: 5-10 stran (tabulky, grafy)

Rozsah pracovní zprávy: 30-35 stran textu

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

- Leroy F., De Vuyst L.: Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends in Food Sci. & Techn. 2004, 67-78.
- Smid E.J., Kleerebezem M.: Production of aroma compounds in lactic fermentations. Annu. Rev. Food Sci. Technol. 2014, 313-326
- Siro I. et al.: Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - A review. Appetite, 2008, 456-467.
- Databáze WOS, CASLIN, Česká zemědělská bibliografie, CAB Abstracts, PROQUEST, dostupné na www: <http://www.lib.jcu.cz/cs/databaze>
- Dokumenty, publikace a informace Společnosti pro výživu (<http://www.vyzivaspol.cz/>), Potravinářské komory ČR (<http://www.foodnet.cz/>), popř. internetových portálů www.agronavigator.cz, www.mze.cz a www.czso.cz; dále odborné publikace v časopisech Výživa a potraviny, Mlékařské listy aj.
- Vyhláška MZe č.397/2016, kterou se stanoví požadavky pro mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. Částka: 32/2003 Sb.

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

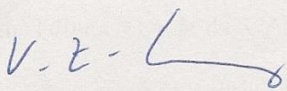
Katedra kvality zemědělských produktů

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


Katedra kvality zemědělských produktů

Datum zadání bakalářské práce: 11. května 2017

Termín odevzdání bakalářské práce: 21. dubna 2018


prof. Ing. Milošlav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení I, S
Studentská 1888, 370 05 České Budějovice


Ing. Pavel Smetana, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 11. května 2017

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě 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 dne 19. 4. 2018

.....
Simona Hybšová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto poděkovala vedoucí bakalářské práce, paní doc. Ing. Evě Samkové, Ph.D. za komplexní rady při konzultacích, za odbornou pomoc a za veškerý čas, který mi věnovala při zpracovávání bakalářské práce. Také bych ráda poděkovala MVDr. Lucii Hasoňové, Ph.D. za podnětné připomínky v průběhu sepisování práce.

ABSTRAKT

Bakterie mléčného kysání hrají v potravinářské biotechnologii nepostradatelnou roli. Uplatňují se z hlediska fermentačních vlastností, ale i z hlediska antimikrobiální aktivity. Mezi nejvýznamnější řadíme rod *Lactobacillus*. Tento bakteriální rod se uplatňuje při fermentačních procesech potravinářských výrobků a zahrnuje i kmeny řazené mezi probiotické organismy. Tyto mikroorganismy prospívají lidskému zdraví, zejména svým působením v gastrointestinálním traktu.

Práce se zabývá všeobecnou charakteristikou mléčných bakterií s následným popisem vybraných potravinářských výrobků. Fermentované výrobky byly zhodnoceny zejména s ohledem na uplatnění jednotlivých druhů mléčných bakterií, pocházejících z rodu *Lactobacillus*. Rovněž byla popsána významnost těchto druhů bakterií s ohledem na zdravotní stav konzumentů.

Klíčová slova: mléko; fermentace; bakterie mléčného kysání (BMK); *Lactobacillus* ssp.; probiotika; zdravotní stav

SUMMARY

Lactic acid bacteria has an indispensable role in food biotechnology. They are applied in terms of fermentation properties, but also in terms of antimicrobial activity. The most prominent genus is *Lactobacillus*. This bacterial genus is used in the fermentation processes of food products and includes also strains classified as probiotic organisms. These microorganisms are beneficial to human health, particularly by its action in the gastrointestinal tract.

The thesis deals with general characterization of milk bacteria with subsequent description of selected food products. The fermented products have been evaluated especially with regard to the use of individual types of lactic bacteria from the genus *Lactobacillus*. Also, the significance of these types of bacteria has been described with regard to the health of the consumers.

Keywords: milk; fermentation; lactic acid bacteria (LAB); *Lactobacillus* spp.; probiotic; health

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. CÍL PRÁCE.....	10
3. CHARAKTERISTIKA BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KYSÁNÍ.....	11
3.1. Taxonomie a klasifikace	11
3.1.1 Metabolické produkty BMK.....	15
3.2 Zdravotní význam rodu <i>Lactobacillus</i>	19
3.2.1 Bakteriociny.....	19
3.3 Uplatnění rodu <i>Lactobacillus</i> v potravinářském průmyslu	21
3.3.1 Fermentované mléčné výrobky.....	21
3.3.2 Fermentované masné výrobky	28
3.3.3 Fermentované pekařské výrobky	29
3.3.4 Fermentovaná zelenina	30
4. ZÁVĚR.....	34
5. SEZNAM LITERATURY	35
6. PŘÍLOHY	39
6.1. Seznam obrázků:.....	39
6.2. Seznam tabulek:.....	40

1. ÚVOD

Bakterie mléčného kysání jsou heterogenní skupinou mikroorganismů. Uplatňují se při fermentačních procesech, které patří k nejstarším způsobům konzervace potravin na světě. V průběhu procesu fermentují mléčné bakterie sacharidy za vzniku metabolických produktů, zejména kyseliny mléčné. V důsledku produkce kyseliny mléčné pak mimo jiné inhibují růst patogenních mikroorganismů. Vlivem dalších metabolických produktů přispívají s kyselinou mléčnou také k příznivé chuti a struktuře celé řady mléčných, pekárenských, masných i zeleninových výrobků.

Některé bakterie mléčného kysání jsou také nezbytnou součástí gastrointestinálního traktu, kde jsou schopny udržovat kyselé prostředí a působit tak proti škodlivým mikroorganismům. Mezi zdravotně prospěšné bakterie, které se ve střevě přirozeně nachází, patří zejména mléčné bakterie z rodu *Lactobacillus*. Jedná se o probiotické bakterie, které jsou součástí komerčně i ekonomicky dostupných výrobků a slouží tak jako prevence celé řady onemocnění.

V posledních letech jsou bakterie mléčného kysání studovány v nejrůznějších oblastech, zejména pro své schopnosti produkovat vedle kyseliny mléčné i celou řadu dalších látek, které jsou schopny regulovat celá mikrobiální společenstva. Tato schopnost souvisí zejména s produkcí bakteriocinů jako produktu některých kmenů mléčných bakterií.

2. CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce bude zpracovat literární přehled, týkající se bakterií mléčného kvašení, zejména rodu *Lactobacillus* ssp. z pohledu obecné charakteristiky, průmyslového uplatnění a zdravotního stavu jedince.

3. CHARAKTERISTIKA BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KYSÁNÍ

Bakterie mléčného kysání (BMK) jsou definovány jako skupina grampozitivních, nesporulujících, aerotolerantních a organotrofních koků nebo tyčinek, produkujících kyselinu mléčnou jako hlavní koncový produkt v průběhu fermentace sacharidů (Lásztity, 2009).

Mnoho těchto bakterií nacházíme v řadě potravin, jako znehodnocující nebo jako hojně se vyskytující mikroorganismy, přirozeně fermentující potravinářské výrobky (Smid, Kleerebezem, 2014). Způsobují rychlé okyselení suroviny produkcí organických kyselin, zejména kyseliny mléčné. Tímto způsobem zvyšují trvanlivost a mikrobiální bezpečnost, zlepšují texturu a přispívají k příznivým sensorickým vlastnostem konečného produktu (Leroy, De Vuyst, 2004).

Kyselina mléčná zastavuje rozmnožování hnilobných bakterií a stafylokoků, tudíž činnost mléčných bakterií využívá lidstvo již odedávna pro konzervaci zeleniny i některých krmiv (kysané zelí a okurky, silážované jeteloviny a vyslazené řepkové řízky apod.) (Šilhánková, 2008).

Dnes BMK představují rozsáhlou a různorodou mikrobiologickou skupinu, která hraje důležitou roli v potravinářském průmyslu, zejména v mlékárenství, pekárenské technologii či při zpracování ryb a masa. Tyto bakterie jsou také součástí normální lidské mikroflóry a mohou být použity jako probiotika pro zajištění zdravotních přínosů (Novik et al., 2017).

3.1. Taxonomie a klasifikace

Roku 1983 byly do skupiny BMK zahrnuty bakteriální rody *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*. Následně se od roku 1984 mezi BMK zařadil i rod *Enterococcus*, který vznikl vyjmutím většiny streptokoků sérologické skupiny D do samostatného rodu, a *Lactococcus*, do kterého byly převedeny streptokoky sérologické skupiny N. Z rodu *Lactobacillus* byly vyjmuty atypické laktobacily (*Lb. carnis*, *Lb. divergens* a *Lb. piscicola*) a byly zařazeny do nového rodu *Carnobacterium*. Kromě již zmíněných bakterií byl mezi BMK řazen některými autory i rod *Bifidobacterium*, který se na rozdíl od ostatních rodů liší fylogenetickou příbuzností, což bylo dokázáno sérologicky i homologicky studiiemi s 16S rRNA (Kameník, 1994). V současné době jsou mezi BMK zahrnuty rody *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*,

Oenococcus, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella* (Stiles, Holzapfel, 1997).

BMK řadíme do kmene *Firmicutes*, řádu *Lactobacillales* a níže zmíněných čeledí, ke kterým jsou přiřazeny jednotlivé rody:

Čeď: *Lactobacillaceae* Rod: *Lactobacillus*

Rod: *Pediococcus*

Rod: *Vagococcus*

Čeď: *Carnobacteriaceae* Rod: *Carnobacterium*

Čeď: *Enterococcaceae* Rod: *Enterococcus*

Rod: *Tetragenococcus*

Čeď: *Leuconostocaceae* Rod: *Leuconostoc*

Rod: *Oenococcus*

Rod: *Weissella*

Čeď: *Streptococcaceae* Rod: *Streptococcus*

Rod: *Lactococcus* (Sedláček, 2007)

Odlišnosti mezi jednotlivými rody byly pozorovány v míře růstu, odlišných teplotách, pH media a toleranci k NaCl. Teplota růstu se může pohybovat v rozmezí 18 – 45 °C, koncentrace NaCl 6,5 – 18 % a pH 4,4 - 9,3 (Lásztity, 2009). Jednotlivé rody a podmínky jejich růstu jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Podmínky růstu bakterií mléčného kysání

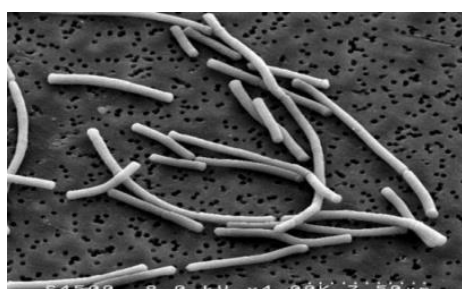
Rod	Optimální teplota (°C)	Růst v 6,5% NaCl	Růst v 18% NaCl	Růst v pH 4,4	Růst v pH 9,6
<i>Carnobacterium</i>	30		-		-
<i>Enterococcus</i>	37	+	-	+	+
<i>Tetragenococcus</i>		+	+	(-) variabilní	+
<i>Lactobacillus</i>	30 - 40	variabilní	-	variabilní	-
<i>Pediococcus</i>	25	variabilní	-	+	-
<i>Leuconostoc</i>	20 - 30	variabilní	-	variabilní	-
<i>Oenococcus</i>	22	variabilní	-	variabilní	-
<i>Weissella</i>		variabilní	-	variabilní	-
<i>Lactococcus</i>	37	-	-	variabilní	-

<i>Streptococcus</i>	37	-	-	-	-
<i>Vagococcus</i>	25 - 30	-	-		-

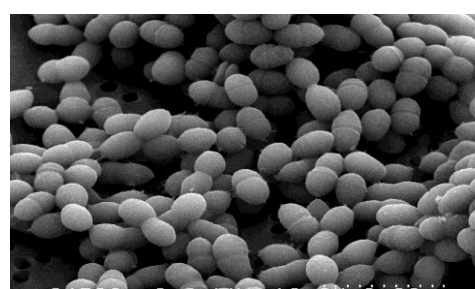
Zdroj: Upraveno na základě více zdrojů uvedených v seznamu literatury

Základní klasifikační systém BMK na úrovni genů podle Orla-Jensena rozděluje BMK dle morfologického hlediska na tyčinky (*Lactobacillus* a *Carnobacterium*) a koky (všechny ostatní rody) (Lásztity, 2009).

Obrázek 1: *Lactobacillus bulgaricus*



Obrázek 2: *Streptococcus thermophilus*



Zdroj: Görner a Valík (2004)

Velmi důležitou charakteristikou BMK je dělení dle způsobu fermentace glukózy za standardních podmínek spojených s neomezeným zásobováním tohoto monosacharidu a růstových faktorů (aminoskupiny, aminokyseliny, vitamíny a prekurzory nukleových kyselin). Podle těchto podmínek můžeme BMK rozdělit do dvou skupin: na homofermentativní a heterofermentativní (Lásztity, 2009). Rozdělení BMK dle typu fermentace a následný vznik hlavních produktů jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2: Přehled rodů bakterií mléčného kysání z hlediska typu fermentace a metabolických produktů

Rod (skupina)	Typ fermentace	Hlavní produkty	Konfigurace kyseliny mléčné
<i>Lactococcus</i>	HMF	kyselina mléčná	L(+)
<i>Streptococcus</i>	HMF	kyselina mléčná	L(+)
<i>Pediococcus</i>	HMF	kyselina mléčná	DL, L(+)
<i>Lactobacillus</i>	HMF	kyselina mléčná	

Thermobacterium	HMF	kyselina mléčná	D(-), L(+), DL
Streptobacterium	HMF	kyselina mléčná	D(-), L(+), DL
	HTF*	kys. mléčná : kys. octová (1:1)	
Betabacterium	HTF	kys. mléčná : kys. octová : oxid uhličitý (1:1:1)	DL
<i>Leuconostoc</i>	HTF	kys. mléčná : kys. octová : oxid uhličitý (1:1:1)	D(-)
<i>Bifidobacterium</i>	HTF	kys. mléčná : kys. octová (2:3)	L(+)

* při fermentaci pentóz * HMF – homofermentativní, HTF - heterofermentativní

Zdroj: Görner a Valík (2004) – upraveno

Podrobnější klasifikace jednotlivých druhů je velmi komplikovaná a dokonce knihy zabývající se mikrobiologií neposkytují vždy všeobecný přehled. Pro příklad lze uvést, že jen rod *Lactobacillus* obsahuje kolem 50 uznaných druhů (Lásztity, 2009), které na základě konečných produktů fermentace sacharidů můžeme dělit do tří skupin:

I. skupina

Obligátně homofermentativní: monosacharidy (hexózy) fermentují výhradně na kyselinu mléčnou, monosacharidy pentózy ani glukonát nefermentují.

Lb. delbrueckii ssp. *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*,
Lb. acidophilus, *Lb. helveticus*

II. skupina

Fakultativně heterofermentativní: monosacharidy (hexózy) fermentují na kyselinu mléčnou či na směs kyseliny mléčné, octové, mravenčí a etanolu, monosacharidy pentózy fermentují na kyselinu mléčnou a octovou.

Lb. casei, *Lb. plantarum*, *Lb. sake*

III. skupina

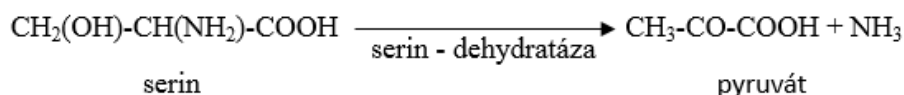
Obligátně heterofermentativní: monosacharidy (hexózy) fermentují na kyselinu mléčnou, octovou a oxid uhličitý, monosacharidy pentózy fermentují na kyselinu mléčnou a octovou.

Lb. buchneri, *Lb. fermentum*, *Lb. kefir* (Sedláček, 2007)

3.1.1 Metabolické produkty BMK

Monosacharidy (hexózy) jsou obecně primární substráty, ze kterých pomocí BMK vzniká anion kyseliny pyrohroznové (pyruvát) a následně dochází k tvorbě konformace kyseliny mléčné, též ve formě anionu (laktátu). Dalšími takovými substráty, ze kterých aniony kyseliny pyrohroznové a mléčné mohou vznikat, jsou organické kyseliny a aminokyseliny (Azam et al., 2017). Např. při deaminaci aminokyseliny serinu pomocí enzymu serin-dehydratázy na anion organické kyseliny pyrohroznové (pyruvát), uvedené na následujícím obrázku 3.

Obrázek 3: Deaminace aminokyseliny serinu na anion kyseliny pyrohroznové



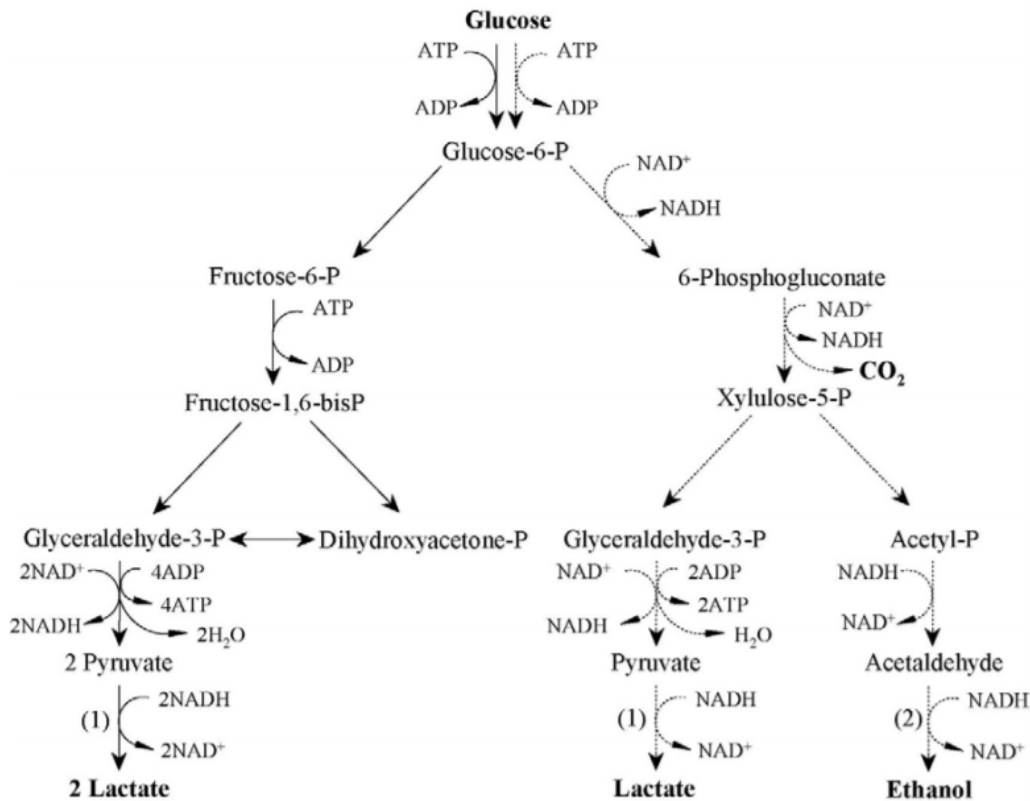
Zdroj: Görner a Valík (2004) – upraveno

Jak již bylo v předchozí kapitole uvedeno, podle cesty, kterými jsou sacharidy metabolizovány, dělíme BMK na homofermentativní a heterofermentativní (Azam et al., 2017). Jejich metabolické dráhy jsou zaznamenány na obrázku 4.

Při homofermentativní fermentaci je konečným produktem vznikajícím z anionu kyseliny pyrohroznové (pyruvátu) primárně anion kyseliny mléčné (laktát) (Plocková, Březina, 1988), kdy z metabolitů tvoří BMK až 90 % této kyseliny (Görner, Valík, 2004). Kromě kyseliny mléčné může docházet ke vzniku i dalších metabolitů, nacházejících se však v nepatrném množství. Homofermentativní BMK obvykle metabolizují monosacharid glukózu prostřednictvím Ebden-Mayerhof-Parnasovy dráhy (tj. glykolýza) (Wee et al., 2006), kdy produkují kyselinu mléčnou fermentací 1 molu monosacharidu glukózy na 2 moly kyseliny mléčné a vytvářejí tak výtěžek 2 moly ATP na molekulu glukózy (Azam et al., 2017).

Naopak heterofermentativní fermentace je charakterizována tím, že vedle kyseliny mléčné vznikají ještě další konečné produkty. Nejčastěji jsou jimi kyselina octová, etanol a oxid uhličitý (Plocková, Březina, 1988), kdy z metabolitů tvoří okolo 50 % kyseliny mléčné (Görner, Valík, 2004) fermentací 1 molu glukózy na 1 mol kyseliny mléčné, 1 mol etanolu a 1 mol oxidu uhličitého (Azam et al., 2017).

Obrázek 4: Metabolické dráhy homofermentativních a heterofermentativních bakterií mléčného kysání

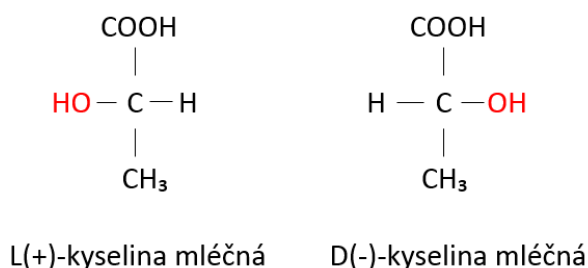


*(1)laktátdehydrogenáza, (2)alkoholdehydrogenáza *ATP (adenosintrifosfát)

Zdroj: Wee et al. (2006)

Kyselina mléčná je klasifikována jako GRAS (všeobecně považována za bezpečnou) pro své použití jako potravinářské přísady Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv v USA. Ve fermentovaných výrobcích má jako hlavní produkt metabolismu dvojí uspořádání. Vyskytuje se ve formě L(+) pravotočivé kyseliny mléčné (Görner, Valík, 2004), která je v případě fermentovaných mléčných výrobků kompletně metabolizována v lidském organismu (Necidová et al., 2002), či D(-) levotočivé kyseliny mléčné, která je v některých případech lidskému organismu naopak škodlivá (Wee et al., 2006). Např. u dětí do 1 roku věku (Necidová et al., 2002) může vést k acidóze či odvápnění (Wee et al., 2006). Tyto kyseliny se liší jednak pozicí -OH skupiny, a dále stáčitostí polarizovaného světla charakterizovanou znaky (+) a (-). Příslušné vzorce mléčných kyselin jsou uvedeny na následujícím obrázku 5. Kyselina mléčná se vyskytuje i jako opticky inaktivní racemická DL - kyselina, jejíž konfigurace však není známa (Görner, Valík, 2004).

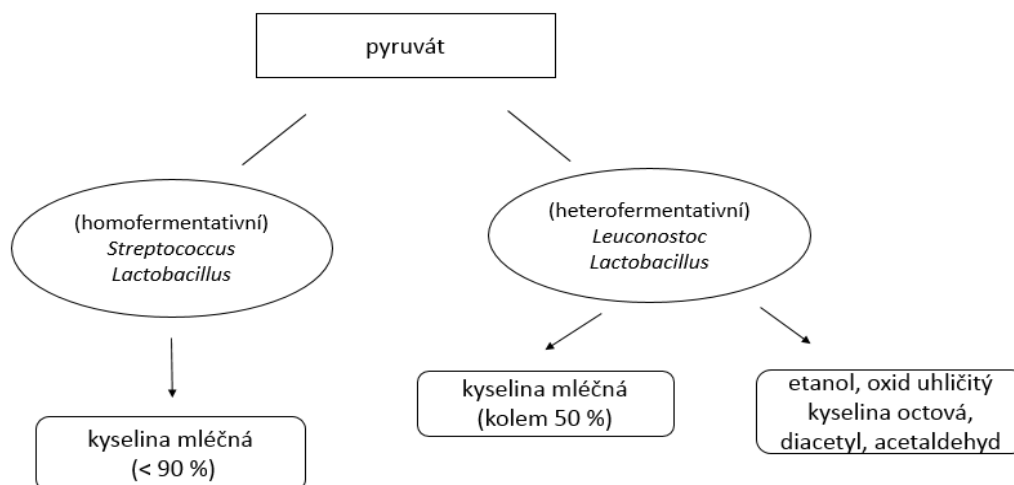
Obrázek 5: Konfigurace L(+) a D(-) kyseliny mléčné



Zdroj: Görner a Valík (2004) – upraveno

Kyselina mléčná může být jako hlavní koncový produkt fermentace BMK za určitých okolností dále metabolizována. Krom toho mohou BMK převést prekurzor kyseliny mléčné na anion kyseliny pyrohroznové (pyruvát) a ta na další důležité sloučeniny, významné pro fermentaci potravin a nápojů (Azam et al., 2017). Proces rozkladu pyruvátu je uveden na obrázku 6. Tímto způsobem některé BMK produkují těkavé látky, přispívající k typické chuti fermentovaných výrobků (Leroy, De Vuyst, 2004).

Obrázek 6: Schéma rozkladu anionu kyseliny pyrohroznové u homofermentativních a heterofermentativních bakterií mléčného kysání



Zdroj: Šilhánková (2007) – upraveno

Anion kyseliny pyrohroznové (pyruvát) může vést k tvorbě sloučenin, jako je kyselina octová, etanol, diacetyl a acetaldehyd, z nichž všechny mohou mít významný vliv na aroma fermentovaných potravinářských výrobků. Tímto způsobem BMK produkují těkavé látky, které jsou typické pro daný produkt, jako je kefir a kumys (etanol), máslo a

podmáslí (diacetyl) či jogurt (acetaldehyd). Optimální kontrola nad fermentací vede ke zlepšení produkce některých z těchto sloučenin (Leroy, De Vuyst, 2004).

V současnosti lze získávat pomocí BMK větší kontrolu nad procesy při tvorbě aromatických sloučenin, např. zvýšení produkce diacetylu pomocí *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* v podmáslí přesměrováním pyruvátového katabolismu (Leroy, De Vuyst, 2004). Změnou fyzikálně-chemických vlastností můžeme teoreticky řídit aktivitu metabolických cest vedoucí k tvorbě aroma (Smid, Kleerebezem, 2014).

Tabulka 3: Přehled vybraných druhů rodu *Lactobacillus* z hlediska optimálních teplot, konfigurací, vzniklých produktů a výskytu

Vybrané rody BMK	Optimální teplota	Konfigurace	Produkty	Převážný výskyt
<i>Lb. acidophilus</i>	37 °C	DL	acetaldehyd /etanol/	probiotické acidofilní mléko
<i>Lb. brevis</i>	30 °C	DL		mléko, sýry, zelenina, kvas
<i>Lb. casei</i>	30 °C	L(+)	kyselina octová /etanol/	probiotické mléko, sýry, mléčné produkty, pekárenský kvas
<i>Lb. bulgaricus</i>	40 °C	D(-)	acetaldehyd, diacetyl /etanol/	jogurt, sýry
<i>Lb. fermentum</i>	41 – 42 °C	DL		mléčné produkty, pekárenský kvas, rostlinný materiál
<i>Lb. helveticus</i>	40 °C	DL	acetaldehyd, kyselina octová, diacetyl /etanol/	kyselé mléko, tvrdé sýry (ementálského typu)
<i>Lb. lactis</i>	30 °C	D(-)	acetaldehyd, aceton, diacetyl /etanol/	kyselé mléko, sýry, lisované kvasnice
<i>Lb. plantarum</i>	30 – 35 °C	L(+)		mléčné produkty, zelenina, pekárenský kvas
<i>Lb. kefir</i>	25 – 30 °C	DL	acetaldehyd, kyselina octová, etanol, oxid uhličitý	kefírová zrna a kefir

Zdroj: Plocková a Březina (1988), Gajdůšek (1998), Görner a Valík (2004), Leroy a De Vuyst, (2004), Klaban (2005)

3.2 Zdravotní význam rodu *Lactobacillus*

V souvislosti s civilizačními chorobami se do popředí zájmu a výživových doporučení dostávají tzv. funkční potraviny (Vlková et al., 2006). Jedná se o potraviny pozitivně podporující zdravotní stav v podobě komerčních výrobků (Siró, 2008).

Důležitou složkou funkčních potravin jsou probiotika. Termín probiotický v překladu znamená „pro život“ a je opakem antibiotického působení, tedy takového, které život (zde myšleno bakterie) potlačuje či zcela ničí. Probiotika zvyšují imunitní schopnost organismu, člověk lépe odolává běžným infekcím, včetně lepší možnosti obrany vůči působení potenciálně karcinogenních látek (Společnost pro výživu, 2015). Probiotika mají také povzbuzující účinek na trávení, podporují resorpci vápníku, mají schopnost syntetizovat některé vitamíny skupiny B a některé volné aminokyseliny (tryptofan, methion, lysin) (Necidová et al., 2002). Velký význam probiotik spočívá v protinádorových účincích, souvisejících s inhibicí mutagenní aktivity, snížením počtu enzymů podílejících se na tvorbě karcinogenů, mutagenních agens, které vznik nádoru podporují (Naidu et al., 2010).

Mezi probiotické kultury řadíme zejména mléčné bakterie *Lb. casei* a *Lb. acidophilus* (Společnost pro výživu, 2015).

Zvláště bohatým zdrojem probiotických bakterií jsou fermentované potraviny, mezi které řadíme zejména mléčné výrobky, (Legarová, Kouřimská, 2012), zeleninu či výrobky asijského původu (Organic facts, 2018).

Nároky na probiotický výrobek zahrnují minimální deklarované množství mléčných bakterií na hranici $10^6 - 10^9$ KTJ.g⁻¹ (Horáčková, Šviráková, 2009). Doba působení probiotik je v lidském organismu závislá na pravidelnosti konzumace probiotických výrobků, která by podle dosavadních výzkumů měla být v řádu několika dnů (Kalač, 2003).

Studie vyhodnocující spotřebu funkčních potravin v 90. letech v Severní Americe a v Evropě prokázala, že konzumace funkčních potravin byla u Američanů velmi nízká, na rozdíl od konzumace zjištěné v evropských zemích. Tento rostoucí trend v Evropě je přičítán především zdravotním benefitům funkčních potravin (Siró, 2008).

3.2.1 Bakteriociny

Bakteriociny jsou definované jako ribozomálně syntetizované peptidy, které se tradičně využívají jako konzervační látka pro potraviny. Přidávají se či je dokonce produkují startérové kultury v průběhu fermentace (Chikindas et al., 2018). Produkovány jsou také

např. divokými kmeny BMK, v případě, kdy musí odolávat konkurenci jiných mikroorganismů (Leroy, De Vuyst, 2004).

V současnosti existují studie, které vybrané bakteriociny zkoumají do hloubky. S tím úzce souvisí otevření nové výzkumné oblasti, pracující na rozšíření aplikace těchto mikrobiálních peptidů. Možné využití bakteriocinů doprovází rychlý vývoj v genetice a nanotechnologiích, připravující cestu k jejich aplikaci v léčbě rakoviny (Chikindas et al., 2018).

Zcela nové zaměření bakteriocinů je spjato s významností právě k funkčním potravinám. Jedná se o studie, zabývající se mléčnými bakteriemi, které produkují bakteriociny s cílem osídlit gastrointestinální trakt formou potravy, případně s funkcí zdravotně podpůrnou. U prvních hlášených experimentů se jednalo o bakteriocin produkovaný *Lb. salivarium*, který byl schopen osídlit gastrointestinální trakt hlodavce (myši) a snížit následně její hmotnost. Naopak derivát *Lb. salivarium* bez bakteriocinu popsané změny nezpůsobil (Chikindas et al., 2018).

V tabulce č. 4 je uveden seznam bakteriocinů produkovaných BMK s již prozkoumanými antimikrobiálními účinky, zejména u bakteriocinu nisin. Produkce antimikrobiálních látek BMK je velmi důležité pro výběr kmene k výrobě účinných probiotik a mléčně kvašených dietetických výrobků (Maxa, Rada, 1996).

Tabulka 4: Seznam bakteriocinů produkovaných bakteriemi mléčného kysání

Druh mléčné bakterie	Bakteriocin
<i>Lb. acidophilus</i>	acidolin, acidophilin, laktocidin
<i>Lb. bulgaricus</i>	bulgaricin
<i>Lb. plantarum</i>	laktolin
<i>Lb. brevis</i>	laktobacilin, laktobrevin
<i>Lb. reuteri</i>	reuterin, reutericin
<i>Lb. helveticus</i>	laktocin
<i>Lb. casei</i>	látka podobná laktocinu
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	nisin
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	diplokocin

Zdroj: Maxa a Rada (1996)

Nejstarším, nejdéle studovaným a komerčně vyráběným bakteriocinem je nisin (Chikindas et al., 2018) syntetizovaný mléčnými bakteriemi *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Tuto antibiotickou látku se podařilo roku 1944 izolovat A. T. Mattickovi a A. Hirschovi (Klaban, 2005). V ČR se používá v souvislosti s využitím jako konzervačního prostředku. Přirozeně vzniká v mléčných produktech (Vlková et al., 2006), kde slouží zejména k potlačení klostridií při výrobě sýrů (Klaban, 2005).

V humánních probiotikách dominuje zejména *Lb. acidophilus* a *Lb. bulgaricus*. *Lb. acidophilus* má opravdu široké antimikrobiální spektrum činnosti. Působí jak proti grampozitivním, tak gramnegativním bakteriím, na rozdíl od *Lb. bulgaricus*, jehož účinnost je o něco slabší (Maxa, Rada, 1996).

3.3 Uplatnění rodu *Lactobacillus* v potravinářském průmyslu

BMK mají v potravinářském průmyslu velmi široké uplatnění. Působení mléčných bakterií je ale odlišné. U fermentovaných rostlinných produktů se nachází jako přirozeně přítomné na fermentovaném substrátu a kysání je tedy spíše spontánním procesem (Görner, Valík, 2004). Při výrobě fermentovaných produktů živočišného původu se v současnosti využívají vybrané laktobacily spolu s ostatními BMK ve formě tzv. startérových kultur (Görner, Valík, 2004). BMK mají své využití v celé řadě mléčných, masných ale i pekárenských výrobků, či dokonce ve fermentované zelenině (Florou-Paneri et al., 2013).

3.3.1 Fermentované mléčné výrobky

Mlékárenství je bezesporu nejvýznamnějším odvětvím potravinářského průmyslu, kde se využívají BMK (Klaban, 2005). V mléčné potravíně se mohou vyskytovat jako kontaminanty, tzv. „divoké kmeny“ přítomné v syrovém mléce (Havlová et al., 1993). V tomto případě se do mléka dostávají primárně prostřednictvím trav na pastvinách či sekundárně z prostředí, kde je s mlékem manipulováno (Görner, Valík, 2004). Šlechtěné variety BMK jsou naopak prospěšné ve formě čistých mlékárenských kultur v mlékárenské technologii (Havlová et al., 1993).

Mlékařské kultury se vyrábějí buď jako monokultury, nebo jako směsné kultury složené z různých kmenů stejného druhu nebo různých druhů mikroorganismů. Pro vybrané kysané mléčné výrobky typu acidofilní mléko, kefír, jogurt a jogurtové mléko, nachází

využití smetanové, kefirové a acidofilní mléčárenské kultury s obsahem probiotických mikroorganismů (MILCOM, 2010). Mlékárny obvykle nakupují komerční kultury, které jsou již připravené v laboratořích, a zajišťují požadované vlastnosti příslušných mléčných výrobků. Komerční kultury se vyskytují v různých formách od hluboce zmražených, přes lyofilizované v práškové podobě až po tekuté, které se v dnešní době využívají jen vzácně. Tyto kultury jsou přidávány do mléka, kde v průběhu fermentace produkují látky, které dávají vzniklému produktu charakteristické vlastnosti jako je kyselost, chuť, aroma a konzistence. Pokles pH má při již zmíněné fermentaci na výsledný mléčný produkt vliv jak z hlediska konzervace, tak i z hlediska zlepšení jeho nutriční hodnoty a stravitelnosti (Bylund, 2015).

Tabulka 5: Vybrané lyofilizované komerční kultury kmene *Lactobacillus*

Druh mikroorganismu	Číslo kmene	Podmínky růstu	Izolováno z:
<i>Lb. acidophilus</i>	CCDM 152	37°C, 16-18 hod., anaerobně	acidofilního mléka
<i>Lb. brevis</i>	CCDM 202	30 °C, 72 hod., anaerobně	lidské stolice
<i>Lb. delbrueckii</i>	CCDM 364	37°C, 16 - 18 hod., anaerobně	jogurtu
<i>Lb. fermentum</i>	CCDM 399	37°C, 16 - 18 hod., anaerobně	originální kultury
<i>Lb. helveticus</i>	CCDM 102	37°C, 16-18 hod., anaerobně	kravského mléka
<i>Lb. kefir</i>	CCDM 853	30°C, 48 - 72 hod., anaerobně	kefirových zrn
<i>Lb. kimchii</i>	CCDM 647	30°C, 20 - 24 hod., anaerobně	kimchii
<i>Lb. plantarum</i>	CCDM 183	37°C, 16-18 hod., anaerobně	kysaného mléčného výrobku
<i>Lb. sake</i>	CCDM 339	30°C, 20 - 24 hod., anaerobně	kultury na sake

Zdroj: MILCOM (2010)

Acidofilní mléko

Jedná se o mléko fermentované pomocí smetanové kultury s přidavkem probiotické bakterie *Lb. acidophilus* (Vlková et al., 2006).

Obrázek 7: Acidofilní mléko



Obrázek 8: *Lactobacillus acidophilus*



Zdroj: TESCO (2018)

Zdroj: MYSTICAL BIOTECH (2016)

Smetanová kultura je nejdéle používanou kulturou v mlékárenské výrobě, nezbytnou pro výrobu kysaných mlék (Plocková, Březina, 1988). Obvyklá smetanová kultura obsahuje kyselinotvorné bakterie (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*) a bakterie aromatvorné (*Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*) v poměru 9:1. (Klaban, 2005). Kultura se vypěstuje ve vybraném plnotučném nebo odstředěném mléce (Plocková, Březina 1988), kdy zralá kultura dosahuje silně pozitivní reakci na aromatické látky po vytvoření diacetylu (Plocková, Březina 1988). Tato aromatická látka je také hlavní složkou a příčinou specifické vůně smetanové kultury (Klaban, 2005).

Acidofilní kultura obsahuje *Lb. acidophilus*, který se vyznačuje určitými dieteticko-léčebnými účinky na lidský organismus a schopností implantace v zažívacím traktu savců, včetně člověka. Kultura *Lb. acidophilus* se obvykle nepoužívá samostatně, ale např. v kombinaci *Lb. acidophilus* se základní (smetanovou), případně jogurtovou kulturou (Plocková, Březina 1988). Finální kultura je specifická, zvláště u nově izolovaných kmenů je ovlivněna přítomností kyseliny octové (Plocková, Březina, 1988).

Rozdíl je zde patrný i v teplotách, kdy acidofilní kultura vyžaduje teplotu během fermentace 37 °C, zatímco mezofilní kultura 21-23 °C. Pokud by bylo mléko kysané pouze touto bakterií, byly by organoleptické vlastnosti takto vzniklých výrobků nepřijatelné pro konzumenta. Acidofilní mléko se proto vyrábí odděleným zráním mléka zaočkovaného *Lb. acidophilus* a mléka se smetanovou kulturou, následně dochází k jejich smíchání v poměru

1:9 (Vlková et al., 2006). Velmi jemné sraženiny finálního výrobku se dosahuje homogenizací. Následně se mléko zchladí na 10°C a plní do spotřebitelských obalů (Plocková, Březina, 1988).

Podle studie Šalakové et al. (2016) byl realizován výzkum vybraných druhů laktobacilů a bifidobakterií z hlediska zdravotních benefitů. Následující studie byla zaměřena na praktickou aplikaci kmene *Lb. acidophilus* CCDM pro poloprovozní výrobu acidofilního mléka. Tento kmen pochází ze Sbírký mlékárenských kultur *Lactoflora* s již ověřenou probiotickou vlastností. U výsledného výrobku acidofilního mléka byla vyhodnocena kyselost, mikrobiální skladba a senzorycké vlastnosti. V průběhu výroby bylo vysoce pasterované mléko zaočkované pomocí 1% smetanového zákysu CCDM 1 spolu s 0,1% acidofilním zákysem (*Lb. acidophilus* CCDM 151). Po zaočkování se plnilo do lahví a umístilo do zrací komory po dobu 18 hodin. Po kultivaci byly stanoveny parametry kysaného mléčného výrobku po výrobě. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Aktivní a titrační kyselosti a mikroskopický obraz výrobku acidofilního mléka, včetně počtu KTJ/ml a senzoryckých vlastností

*pH – aktivní kyselost; SH – titrační kyselost; MO – mikroorganismy

Mlékařské kultury	pH	SH	MO
Směs: CCDM 1 a CCDM 151	4,36	48	diplokoky, streptokoky, ojediněle tyčinky
Počet KTJ/ml laktokoky	Počet KTJ/ml <i>Lb.acidophilus</i>		
7,2.10 ⁷	6,8.10 ⁶		
M17 agar 30°C/72 h	ČSN ISO 20128		
Mlékařské kultury	chut'	vůně	konzistence
Směs: CCDM 1 a CCDM 151	++	++	++

Hodnocení: +++ vynikající, ++ velmi dobré, + dobré, - nevyhovující

Zdroj: Šalaková et al. (2016) – upraveno

Na základě výše uvedených výsledků lze konstatovat, že i po 3 týdnech skladování v chladu při 4 - 8 °C má kysaný výrobek - acidofilní mléko velmi dobré senzorycké vlastnosti. Počet KTJ/ml *Lb. acidophilus* byl stanoven dle ČSN ISO 20128 po jednom týdnu 4,2.10⁶ KTJ/ml, po třech týdnech 1,5.10⁷ KTJ/ml. Z výsledků vyplývá, že počet KTJ/ml *Lb. acidophilus* i po třech týdnech skladování splňoval požadavky vyhlášky č. 397/2016 Sb.

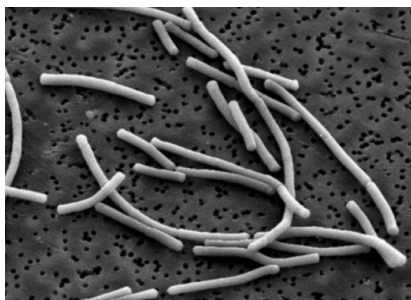
Konzumaci kysaných mléčných výrobků obsahujících *Lb. acidophilus* lze označit jako velmi prospěšnou pro zdravotní stav jedince. Zdravotní výhody zahrnují širokou škálu pozitivních účinků včetně prevence a léčby střevních infekcí, zlepšení trávení laktózy u lidí s laktózovou intolerancí, napomáhání redukcí cholesterolu v krvi a vykazují též jisté antikarcinogenní účinky (Anserson, Gilliland, 1999). Významnou vlastností tohoto kmene je schopnost produkovat tzv. exopolysacharidy, které mají antioxidační účinky a inhibují expresi genů, které se podílejí na nádorové abiogenezi (Deepak et al., 2016).

Jogurty a jogurtová mléka

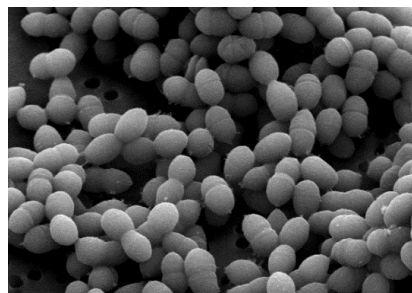
Při výrobě jogurtu se zahuštěné mléko, v případě jogurtových mlék mléko nezahuštěné pasteruje, zchladí a následně očkuje 1 - 2 % jogurtové kultury.

Jogurtová kultura se používá především k výrobě řady jogurtových výrobků (Plocková, Březina, 1988). Klasická jogurtová kultura je kultura směsná, tvořená dvěma mikrobiálními druhy: *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* a *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*. Oba tyto mikroby žijí v symbiotickém vztahu, kdy po zaočkování pasterovaného kravského mléka jogurtovou kulturou produkuje *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* látky stimulující množení *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, které nastává později (Klaban, 2005) ve vzájemném poměru těchto bakterií 2:1 až 1:2 (laktobacily: streptokoky) (Plocková, Březina, 1988). Jejich význam spočívá v tvorbě aromatické látky acetaldehydu a schopnosti tvorby slizu, který zvyšuje kompaktnost koagulátu vlivem nižší kultivační teploty a současně vyšší hodnotě pH (Görner, Valík, 2004).

Obrázek 9: *Lactobacillus bulgaricus*



Obrázek 10: *Streptococcus thermophilus*



Zdroj: MYSTICAL BIOTECH (2016)

Mléko zaočkované jogurtovou kulturou se buď plní do spotřebitelských obalů, ve kterých dochází k fermentaci při 42-45 °C po dobu 2,5- 3 hodiny nebo je ponecháno v tancích, kde probíhá kysání při 30-37 °C až 16 hodin v závislosti na teplotě. K zastavení kysání se jogurt zchladí na 5-8 °C a následuje plnění již hotového jogurtu do obalu (Vlková et al., 2006).

Kefír

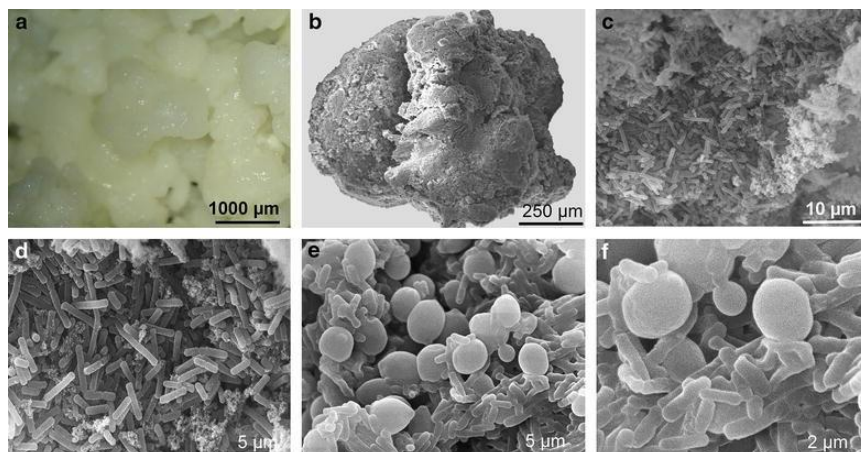
Kefír je fermentovaný mléčný výrobek původem ze střední Asie, oblasti Kavkazu (Görner, Valík, 2004), který vzniká procesem mléčně-alkoholického kvašení (Lacmanová et al., 2010).

Ve výrobcích se smíšenou bakteriální a kvasinkovou mikroflórou probíhá rozklad laktózy za vzniku kyseliny mléčné (BMK) a alkoholového kvašení laktózy (kvasinky) za vzniku etanolu a oxidu uhličitého, který dává výrobkům osvěžující, mírně štiplavou chuť. Ze směsných bakteriálních a kvasinkových kultur patří mezi nejznámější a nejpoužívanější kefírová kultura, která se připravuje z kefírových zrn nebo kefírová kultura sestavená z mikroorganismů: *Streptococcus lactis*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus*, *Kluyveromyces fragilis* a *Candida kefir* v poměru 100:10:1 (streptokoky: laktobacily: kvasinky) (Plocková, Březina, 1988).

Při výrobě kefiru je pasterované mléko očkováno kefírovými zrny, která jsou složena z příslušných mikroorganismů - laktobacily, laktokoky a kvasinky (Vlková et al., 2006). Rod *Lactobacillus* představuje v kefírových zrnech rozmanitou škálu druhů, mezi ty známější můžeme zařadit: *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*, *Lb. casei*, *Lb. kefir*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. lactis* ssp. *lactis*, *Lb. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* a *Lb. gasseri* (Yildiz, 2009).

Studium kefírových zrn je velmi důležité. V případě, kdy jsou mikroorganismy oddělené jako čisté kultury, nemohou v mléce růst nebo mají sníženou biochemickou aktivitu. Kefír je příkladem symbiózy (obrázek 11), kdy růst a přežití jednotlivých kmenů závisí na přítomnosti ostatních. Jako příklad je možné uvést zlepšení růstu *Lb. kefir* po přidání kvasinky *Candida kefir* buď před nebo zároveň do fermentovaného mléka (Farnworth, 2008).

Obrázek 11: Kefírová zrna pod elektronovým mikroskopem, včetně symbiózy tyčinkovitých laktobacilů spolu s kvasinkami

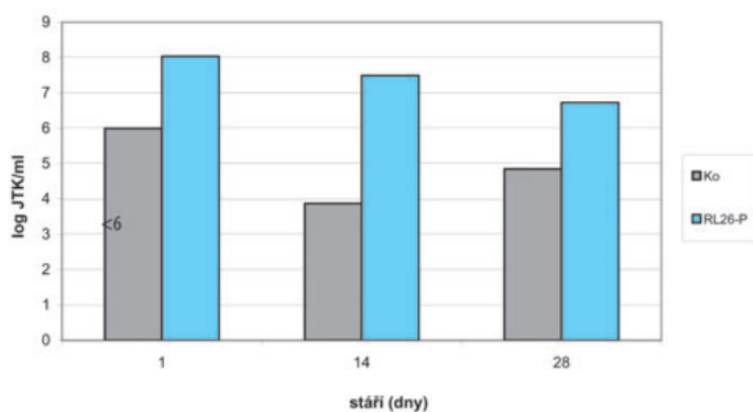


Zdroj: Friques et al. (2015)

Zrání kefiru probíhá v tancích při teplotě 20 °C po dobu 16 hodin (Vlková et al., 2006). Při fermentaci se v typickém kefirovém produktu vyskytuje etanol, oxid uhličitý a další aromatické sloučeniny, jako je acetaldehyd, diacetyl a acetoin. Kefírový nápoj obsahuje přibližně 0,2 - 0,7 % kefiranu. Tento polysacharid produkuje rod *Lactobacillus* v kefirových zrnech a poskytuje tak následně finálnímu produktu mírně olejovou strukturu (Azam et al., 2017).

Na následujícím obrázku 12 jsou uvedeny změny v množství kmene *Lb. plantarum* RL26-P během skladování kefiru v průběhu 28 dnů při teplotě 4 – 6 °C. Do kefiru byly přidány bakterie propionového kvašení za účelem zvýšení obsahu vitamínu B₁₂ po 1., 14., a 28. dnu skladování.

Obrázek 12: Změny v množství kmene *Lactobacillus plantarum* RL-26-P stanovených na FHN agaru během skladování kefiru po dobu 28 dní při 4 - 6 °C



Zdroj: Lacmanová et al. (2010)

Testovaný kmen *Lactobacillus plantarum* byl i po 28 dnech skladování přítomen v dostatečném množství (v log KTJ/ml) a i při posouzení sensorických vlastností byl kefír shledán jako vyhovující.

Mezi již potvrzené zdravotní přínosy kefíru patří snížení symptomů laktóзовé intolerance, stimulace imunitního systému, snižování cholesterolu či antimutagenní a antikarcinogenní vlastnosti (Guzel-Seydim et al., 2011).

3.3.2 Fermentované masné výrobky

Jedná se o tepelně neopracované masné produkty vyrobené ze syrového masa fermentativním zráním a sušením. Jsou to krájitelné nebo roztíratelné klobásy a salámy, které se konzumují většinou v syrovém stavu, a jsou skladované při teplotách 10 - 15 °C (Vlková et al., 2006). V současné době je fermentace považována za proces, který zvyšuje funkční hodnotu masných výrobků a také bezpečnost potravin (Prash et al., 2016). Význam BMK při fermentaci tepelně neopracovaných masných produktů spočívá v tvorbě kyseliny mléčné přidané do díla, látek s antimikrobiální aktivitou, látek aromatických a chuťově aktivních (Kameník, 1994).

Obrázek 13: Dunajská klobása



Obrázek 14: Salám Poličan



Zdroj: KMOTR - Masna Kroměříž a.s

Tabulka 7: Úlohy startérových kultur při zrání

Mikroorganismus	Úloha	Účinek na produkt
<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus pentosaceus</i>	tvorba kyselin	konzervace, zpevnění, urychlení tvorby barvy, tvorba aroma
<i>Pediococcus acidilactici</i>	tvorba kyselin a bakteriocinu pediocinu	tvorba aroma

Zdroj: Görner a Valík (2004) - upraveno

Fermentované klobásy

Zahájení používání startovacích kultur vedlo jednak k zajištění stálé kvality klobás, tak i k bezpečnosti při inhibici růstu stafylokoků, včetně ostatních patogenů (Lásztity, 2009).

Samotná příprava klobás zahrnuje rozemletí masa s tukem a následné smíchání s přísadami soli, cukru a koření, dále plnění a vystavení fermentaci se zvolenou počáteční startovací kulturou, mezi které řadíme zejména *Lb. plantarum*, *Lb. culvatus* a mléčné bakterie rodu *Pediococcus*. Po fermentaci, trvající 1 - 3 dny v závislosti na teplotě a relativní vlhkosti vzduchu dochází k procesu dozrávání a sušení (Toldrá, 2014).

Fermentované salámy

Při výrobě fermentovaných salámů se syrové maso spolu s tukovou tkání, kořením, solícími přísadami a startérovými mikrobiálními kulturami kutrují na požadovanou zrnitost, kdy se nakonec plní do technologických obalů (Görner, Valík, 2004). Pro fermentované salámy hrají startérové kultury důležitou roli, kdy rozhodující význam mají bakterie rodu *Lactobacillus* (*Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. sake* a *Lb. culvatus*) a *Pediococcus*. Vzhledem k tomu, že se ve středoevropských podmínkách používají teploty fermentace maximálně do 25 °C, získávají dominanci v díle zástupci rodu *Lactobacillus*. Druhy rodu *Pediococcus* s teplotními optimy kolem 40°C (*P. acidilactici*) nebo 30 - 35°C (*P. pentosaceus*) získávají uplatnění především v masném průmyslu v USA (Kameník, 1994). Mezi české fermentované salámy řadíme např. Herkules, Paprikáš a Poličan (KMOTR - Masna Kroměříž a.s).

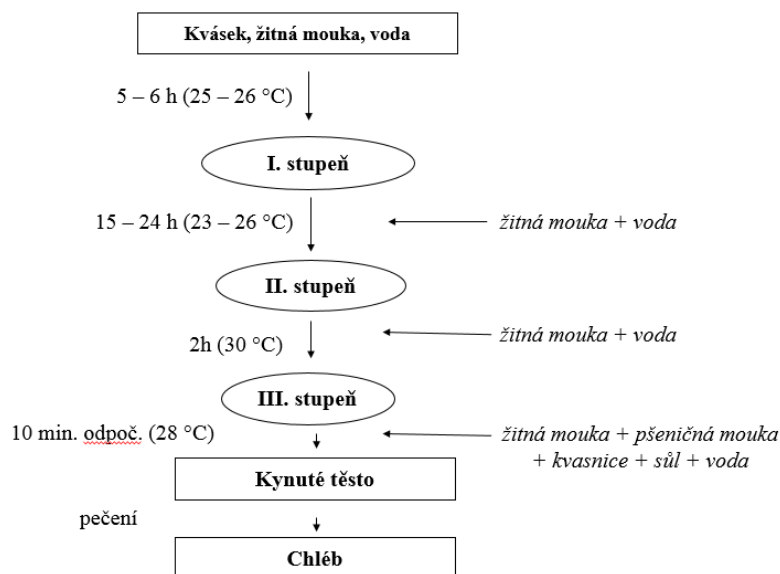
3.3.3 Fermentované pekařské výrobky

Fermentovaný chléb

Fermentovaný chléb se vyrábí z žitného či pšenično-žitného těsta s podílem žita větším jak 20 %. Těsto vyžaduje kysání, které je zabezpečeno buď chemicky, přísadami organických potravinářských kyselin či biologicky použitím kvásku. Pekařenské startérové kultury jsou složeny z BMK, zahrnující *Lb. plantarum*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. brevis* a *Lb. sanfrancisco*. Tyto mléčné bakterie mají podíl na tvorbě aroma a chuti těsta. Kysání chlebového těsta poskytuje upečenému chlebu vítané vlastnosti, jako dostatečnou ochranu proti rozvoji nežádoucí mikroflóry mouky (např. *Bacillus mesentericus* vyvolávající

nitkovitost chleba), prodloužení trvanlivosti a zlepšení vlastností střídy (Görner, Valík, 2004). Na obrázku 12 je uveden proces výroby pšenično-žitného chleba s použitím kvásku.

Obrázek 15: Třístupňové vedení těsta na výrobu pšenično-žitného chleba



Zdroj: Görner a Valík (2004) – upraveno

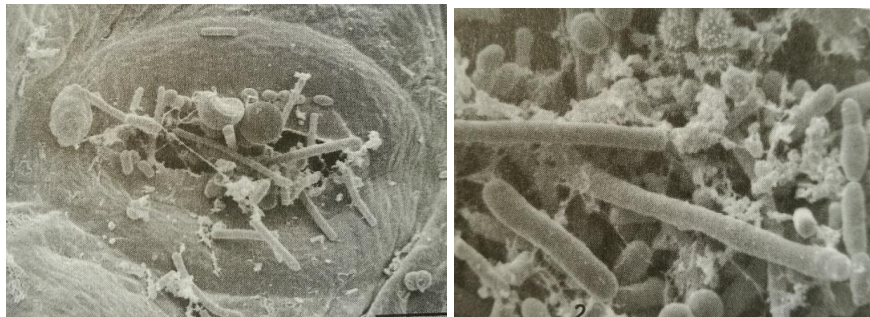
3.3.4 Fermentovaná zelenina

Při anaerobní fermentaci rostlinných produktů se rychle rozmnožují BMK, které potlačují růst nežádoucí mikroflóry. Fermentovaná zelenina se vyrábí spontánní fermentací, které podléhají lehkou využitelné sacharidy. Kyselomléčná fermentace prodlužuje trvanlivost produktu ($\text{pH} < 4$) a příznivě mění jeho sensorické vlastnosti, texturu a stravitelnost. Na zelenině jsou vždy, i když v malém množství BMK s dominancí zástupců *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* oproti méně zastoupeným BMK jako je *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum* a *Lb. brevis*, jejichž růst je stimulovaný přiměřeným solením (Görner, Valík, 2004).

Kysané zelí

Kysané zelí se vyrábí z čerstvě nakrájeného zelí s přidávkou 1,5-2,5% soli. Následně se zelí natlačí do kvasných kádí, přičemž se musí vytlačit co nejvíce vzduchu. Hmotu se přiměřeně zatíží tak, aby byla celá ponořená do vtlačeného nálevu. Kysání probíhá 4 až 6 týdnů při teplotě 18-20 °C působením přirozené mikroflóry zelí (obrázek 15 a 16) (Vlková et al., 2006).

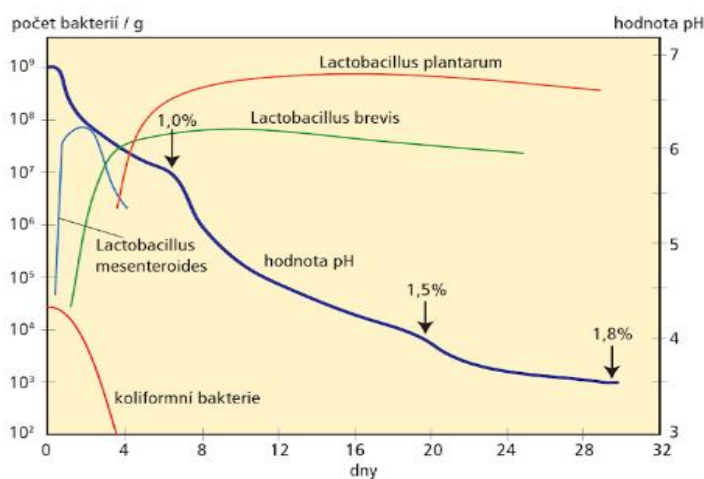
Obrázek 16: Mikroorganismy se nachází v dýchacích otvorech listu



Zdroj: Görner a Valík (2004)

Při výrobě kysaného zelí dochází v první fázi k rozmnožení bakterií *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, které produkují za krátkou dobu velké množství kyseliny mléčné a malé množství oxidu uhličitého. Vytvoří anaerobní prostředí a zamezí tím růst nežádoucích mikroorganismů. V další fázi se rozmnoží laktobacily, zvláště *Lb. plantarum* a *Lb. brevis*, které dále zvyšují koncentraci kyseliny mléčné (Cempírková et al., 1997) (obrázek 17). Při obsahu kyseliny mléčné 1,5-2,5 % a hodnotě pH 3,8-3,6 se kysané zelí chladí při 3 °C. Do obchodu se distribuuje při dostatečném chlazení čerstvé či tepelné upravené (Görner, Valík, 2004). Organoleptické vlastnosti závisí na fermentační činnosti bakterií, což je mimo jiné podmíněno mikroorganismy před nakládáním zeleniny, koncentrací solí, teplotou a délkou fermentačního procesu (Cempírková et al., 1997).

Obrázek 17: Ideální model pro růst bakterií mléčného kysání během fermentace kysaného zelí a vývoj hodnoty pH



Zdroj: Lorenz-Ladener (2016) - upraveno

Kysané okurky

Kysané okurky se připravují kysáním čerstvých okurek působením přirozené mikroflóry, kde převládají zejména druhy bakterií *Lb. brevis* a *Lb. plantarum*. Okurky se fermentují ponořené v 3 - 5% solném nálevu s přidavkem bylin, při teplotě 18 až 20 °C po dobu asi 3 až 6 týdnů (Vlková et al., 2006).

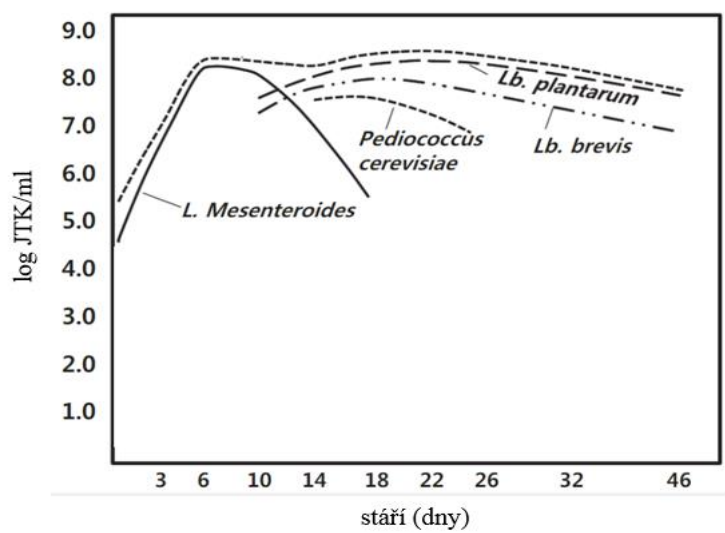
Fermentované rostlinné potraviny pocházejí z asijských zemí, kde zajišťovaly pro vysoký podíl obyvatelstva bílkovinnou stravu z rostlinných zdrojů. Kromě mléčných bakterií se však při samotné fermentaci uplatňují i plísně. Jsou to vesměs fermentované výrobky na bázi sójových bobů a dalších rostlinných produktů, převážně obilovin (pšenice, ječmen nebo rýže). Mezi tyto výrobky patří sójové omáčky, miso pasty či tempeh, připomínající maso (Špalek et al., 2008). Mezi jeden z nejvýznamnějších asijských výrobků, kde je rod *Lactobacillus* nepostradatelnou součástí v průběhu fermentace, řadíme i korejské národní jídlo kimchi (Rhee et al., 2011).

Kimchi

Kimchi je korejský výrobek z čínské zelné s přidavkem koření, včetně česneku, zázvoru a červené papriky. Blahodárné účinky na zdraví, velmi sladká chuť a křupavá textura z kimchi činí nejpříznivější a nepostradatelné jídlo pro Korejce. Jde o výrobek, jehož spotřeba je podle průzkumu 50 – 100 g/den v létě a v zimě až 100 – 200 g/den (Rhee et al., 2011).

Významnou úlohu při samotné fermentaci hrají BMK. Optimální chuť je dosažena při pH 4,0 – 4,5 a okyselení 0,5 – 0,6 % kyseliny mléčné. Při vyšší teplotě fermentace se doba zrání kimchi snižuje: kimchi zraje 1 týden při 15 °C, nebo také může zrát pouze 3 dny při 25 °C. Před samotnou fermentací je dominantní mléčnou bakterií v kimchi *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, zatímco kmeny *Lactobacillus* jsou hlavními mléčnými bakteriemi v průběhu fermentace. Dominance jednotlivých kmenů se liší právě v průběhu fermentace v závislosti na teplotě. Příkladem je *Lb. plantarum* a *Lb. brevis* dominující při teplotě fermentace 20 – 30 °C (obrázek 19), zatímco *Lb. maltaromicus* a *Lb. bavaricum* dominují při teplotě fermentace 5 – 7 °C. Pro optimální chuť výsledného výrobku je vhodná teplota nižší, neboť *Lb. plantarum* produkuje jako homofermentativní mléčná bakterie značné množství kyseliny mléčné a dochází tím k překyselení (Rhee et al., 2011).

Obrázek 18: Změny mikroflóry při fermentaci kimchi při 14 °C a 3,5% NaCl



Zdroj: Rhee et al. (2011) – upraveno

4. ZÁVĚR

Mezi nejvýznamnější rod bakterií mléčného kysání řadíme *Lactobacillus ssp.*, který je obsažen v celé řadě fermentovaných potravinářských výrobků, zejména v mlékárenském průmyslu. Uplatňuje se jako startérová kultura při výrobě kysaných mléčných výrobků. Mezi nejvýznamnější, zdravotně prospěšné výrobky řadíme acidofilní mléko, kefir či jogurt. Konzumací těchto výrobků s obsahem probiotických mikroorganismů, které jsou součástí trendu dnešní doby jako složka funkčních potravin, lze zamezit působení nepříznivých mikroorganismů a udržet tak zdravou rovnováhu střevní mikroflóry v organismu člověka. Startérová kultura mléčných laktobacilů získala v průběhu let krom mlékárenství své uplatnění i v masném či pekařském průmyslu, kde jsou přidávány zejména z důvodu bezpečnosti výrobku, ale i z důvodu pozitivních sensorických vlastností. Dodnes se také u některých druhů zeleniny využívá spontánní fermentace, která mění textury a zvyšuje obsah vitaminů a minerálních látek.

V průběhu fermentace mohou být jednotlivé druhy rodu *Lactobacillus* ovlivňovány, neboť mají odlišné nároky na růst. V případě změny teploty, koncentrace soli a pH prostředí je tedy možné příslušné druhy regulovat. Správnými fermentačními procesy tak můžeme zamezit např. překyselení výsledného výrobku a zachovávat tak jeho optimální sensorické vlastnosti.

5. SEZNAM LITERATURY

Literární zdroje:

- (1) ANDERSON J., GILLILAND S.: Effect of Fermented Milk (Yogurt) Containing Lactobacillus Acidophilus L1 on Serum Cholesterol in Hypercholesterolemic Humans. *Journal of the American College of Nutrition*. 1999, 18(1):43-50.
- (2) AZAM, M., MOHSIN, M., IJAZ, H., TULAIN, U.R., ASHRAF, M.A., FAYYAZ A., ABADDEEN, Z., KAMRAN, Q.: Lactic acid bacteria in traditional fermented Asian foods. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017, 30(5):1803-1814.
- (3) CEMPÍRKOVÁ, R., HEJLOVÁ, Š., LUKÁŠOVÁ, J.: *Mikrobiologie potravin*. České Budějovice: Jihočeská univerzita, 1997. 165s. ISBN 80-7040-254-7.
- (4) CHIKINDAS, M.L., WEEKS, R., DRIDER, D., CHISTYAKOV, V., DICKS, L.: Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology*. 2018, 49:23-28.
- (5) DEEPAK V., RAMACHANDRAN S., BALAHMAR RM., PANDIAN SR., SIVASUBRAMANIAM SD., NELLAIAH H., SUNDAR K.: In vitro evaluation of anticancer properties of exopolysaccharides from Lactobacillus acidophilus in colon cancer cell lines. *In Vitro Cellular&Developmental Biology*. 2016, 52(2):163-173.
- (6) ELLI ,M., CALLEGARI ,M., FERRARI, S., BESSI, E., CATTIVELLI, D., SOLDI, S., MORELLI, L., FEUILLERAT, N.G., ANTOINE, J.M.: Survival of Yogurt Bacteria in the Human Gut. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, 72(7):5113–5117.
- (7) FARNWORTH, E.R.: *Handbook of Fermented Functional Foods* - 2. vyd. USA: CRC Press, 2008, 600s. ISBN 9781420053265
- (8) FRIQUES, A., ARPINI, C., KALIL, L., GAVA, A., LEAL, M., PORTO, M., NOGUEIRA, B., DIAS, A., ANDRADE, T., PEREIRA, T., MEYRELLES, S., CAMPAGNARO, B., VASQUEZ, E.: Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Translational Medicine*. 2015, 13:390.
- (9) GAJDŮŠEK, S.: *Mlékařství II.* - 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2000, 142s. ISBN 80-7157-342-6.
- (10) GÖRNER, F., VALÍK, L.: *Aplikovaná mikrobiológia potravín: princípy mikrobiológie potravín, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho pôvodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami*. Bratislava: Malé centrum, 2004. 528s. ISBN 80-967064-9-7.
- (11) GUZEL-SEYDIM, Z., KOK-TAS, T., GREEN, A., SEYDIM, A.: Review: Functional Properties of Kefir. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2011, 51:3, 261-268.

- (12) HALL, G.: *Fish processing: Sustainability and New Opportunities*. Wiley-Blackwell Publishing, 2010. 312s. ISBN: 978-1-405-19047-3.
- (13) HAVLOVÁ, J., JIČÍNSKÁ, E., HRABOVÁ, H.: *Mikrobiologické metody v kontrole jakosti mléka a mlékárenských výrobků*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1993. 243 s. ISBN 80-85120-37-2.
- (14) HORÁČKOVÁ, Š., ŠVIRÁKOVÁ, E.: Probiotické mikroorganismy v mlékárenském průmyslu. *Mlékařské listy*. 2009, č. 113, 12-14.
- (15) KALÁČ, P.: *Funkční potraviny: kroky ke zdraví*. České Budějovice: Dona, 2003. 130s. ISBN 80-7322-029-6.
- (16) KAMENÍK, J. *Startovací kultury v masném průmyslu*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1994. 51s. ISBN 80-85120-46-1.
- (17) KLABAN, V.: *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. Praha 5: Galén, 2005. 654s. ISBN: 80-7262-341-9.
- (18) LÁSZTITY, R.: *Food quality and standards – Volume III*. Oxford, U.K.: Eolss Publisher, 2009. 358 s. ISBN 978-1-905839-43-8.
- (19) LACMANOVÁ, I., DRÁBAL, V., VOLNÁ, L.: Aplikace probiotických kultur laktobacilů v mléčných výrobcích typu kefíru. *Mlékařské listy*, 2010, č. 123.
- (20) LEROY F., DE VUYST L.: Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* 2004, 67-78.
- (21) LORENZ-LADENER, C. *Nakládáme zeleninu: zdravě, rychle, chutně - pomocí mléčného kvašení*. Praha: Grada Publishing, 2016. 120s. ISBN 978-80-247-5785-8.
- (22) MAXA, V., RADA, V.: *Význam bifidobakterií a bakterií mléčného kvašení pro výživu a zdraví*. - 1. vyd. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1996. 42 s. ISBN: 80-85120-57-7.
- (23) NAIDU, A.S., BIDLACK, W.R., CLEMENTS, R.A.: Probiotic Spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2010, 39:1, 13-126.
- (24) NECIDOVÁ, L., CUPÁKOVÁ, Š., JANŠTOVÁ, B., NAVRÁTILOVÁ, P.: Úloha probiotik v kysaných mléčných výrobcích. *Veterinářství*. 2002, roč. 52, č. 2, 66-88 s.
- (25) PAK, N.: *Sul: Korean alcoholic beverages*. Daejeon: National Research Institute of Cultural Heritage, 2013. 148s. ISBN 892990176X.
- (26) PLOCKOVÁ, M., BŘEZINA P.: *Mikrobiologie mléka a tuků*. - 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1988, 228 s.
- (27) PRASH, V., BELLOSO, O., KEENER, L., ASTLEY, S.B., BRAUN, S., MCMAHON H. LELIEVELD, H.: *Safety of Fermented Meat*. Amsterdam: Elsevier/Academic Press,

2016. 514s. ISBN: 978-0-12-800605-4.

(28) RHEE, S.J., LEE, J.- E., LEE-C.H.: Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods. *Microbial Cell Factories*. 2011, 10(Suppl1):S5 1-13.

(29) SEDLÁČEK, I.: *Taxonomie prokaryot*.-1.vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007, 270 s. ISBN 80-210-4207-9.

(30) SIRÓ I. et al.: Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance – A review. *Appetite*. 2008, 456-467.

(31) SMID E.J., KIEEREBEZEM M.: Production of aroma compounds in lactic fermentations. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2014, 313-326.

(32) STILES, M.E., HOLZAPFEL, W.H.: Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. 1997, 29;36(1):1-29.

(33) ŠALAKOVÁ, A., DRAGONOVÁ, H., DRBOHLAV, J., ROUBAL, P.: Laktobacily a jejich uplatnění v kysaných mléčných výrobcích. *Mlékařské listy*, 2016, č. 157, 18-22.

(34) ŠILHÁNKOVÁ, L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. - 3.vyd. Praha: Academica, 2002. 363 s. ISBN 80-200-1024-6.

(35) ŠPALEK, J., CVIKOVÁ, O., DOHNAL, V.: Fermentované rostlinné potraviny asijského původu na českém trh. *Výživa a potraviny*, 2008, č. 2, 52-54.

(36) TAMANG, J.P.: *Ethnic fermented foods and alcoholic beverages of Asia*. New York, NY: Springer - Berlin Heidelberg, 2016. ISBN 9788132227984.

(37) TOLDRÁ, F.: *Handbook of fermented meat and poultry*. - 2.vyd. Wiley-Blackwell Publishing, 2014. 528s. ISBN 978-1-118-52269-1.

(38) VLKOVÁ, E., RADA, V., KILLER J.: *Potravinářská mikrobiologie*. - 1.vyd. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2006. 168 s. ISBN 80-213-1583-0 (brož.).

(39) WEE, Y. J., KIM, J. N., RYU, H. W.: Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technology and Biotechnology*. 2006, 44(2):163–172.

(40) YILDIZ, F.: *Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy*. USA : CRC Press, 2009. 451s. ISBN 9781420082074.

Internetové zdroje:

BYLUND, G.: *Cultures and starter manufacture*. Dairy Processing Handbook. [online].[cit. 2018-04-20].

Dostupné na: <http://dairyprocessinghandbook.com/chapter/cultures-and-starter-manufacture>

FLOROU-PANERI, P., CHRISTAKI, E., BONOS, E (2013).: *Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients*. InTechOpen. [online].[cit. 2018-01-30].

Dostupné na: <https://www.intechopen.com/books/lactic-acid-bacteria-r-d-for-food-health-and-livestock-purposes/lactic-acid-bacteria-as-source-of-functional-ingredients>

KMOTR – Masna Kroměříž a.s. *Fermentované klobásy*. Agrofert [online].[cit. 2018-02-3].

Dostupné na: <http://www.kmotr.cz>

LEGAROVÁ, V., KOUŘIMSKÁ, L. (2012) : *Laktosa v syrovátce*. Společnost pro výživu. Praha. [online].[cit. 2018-03-8].

Dostupné na: <http://www.vyzivapol.cz/>

MILCOM (2010): *Sbírka čistých mlékařských kultur LAKTOFLORA®* [online].[cit. 2018-04-20].

Dostupné na: <https://www.vurv.cz/collections/vurv.exe/search>

MYSTICAL BIOTECH. *Probiotics*. [online]. [cit. 2018-03-1].

Dostupné na: <http://www.mysticalbiotech.com/>

NOVIK, G., MEEROROVSKAYA, O., SAVICH. V. (2017): *Waste Degradation and Utilization by Lactic Acid Bacteria: Use of Lactic Acid Bacteria in Production of Food Additives, Bioenergy and Biogas*. InTechOpen. [online].[cit. 2018-02-17].

Dostupné na: <https://www.intechopen.com/books/food-additives/waste-degradation-and-utilization-by-lactic-acid-bacteria-use-of-lactic-acid-bacteria-in-production-#title1>

ORGANIC FACTS. *12 Incredible Probiotic-Rich Foods* (2018): [online].[cit. 2018-03-12].

Dostupné na: <https://www.organicfacts.net/probiotic-rich-foods.html>

ORGANIC FACTS. *10 Surprising Benefits Of Kimchi* (2018): [online].[cit. 2018-03-14].

Dostupné na: <https://www.organicfacts.net/health-benefits/other/health-benefits-of-kimchi.html>

SPOLEČNOST PRO VÝŽIVU. *Probiotika* (2015): [online].[cit. 2018-02-3].

Dostupné na: <http://www.vyzivapol.cz/probiotika/>

TESCO. *Acidofilní mléko plnotučné 500g*. [online].[cit. 2018-02-3].

Dostupné na: <https://nakup.itesco.cz/groceries/cs-CZ/products/2001006916928>

6. PŘÍLOHY

6.1. Seznam obrázků:

Obrázek 1: <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	13
Obrázek 2: <i>Streptococcus thermophilus</i>	13
Obrázek 3: Deaminace aminokyseliny serinu na anion kyseliny pyrohroznové.....	15
Obrázek 4: Metabolické dráhy homofermentativních a heterofermentativních bakterií mléčného kysání	16
Obrázek 5: Konfigurace L(+) a D(-) kyseliny mléčné	17
Obrázek 6: Schéma rozkladu anionu kyseliny pyrohroznové u homofermentativních a heterofermentativních bakterií mléčného kysání.....	17
Obrázek 7: Acidofilní mléko	23
Obrázek 8: <i>Lactobacillus acidophilus</i>	23
Obrázek 9: <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	25
Obrázek 10: <i>Streptococcus thermophilus</i>	25
Obrázek 11: Kefírová zrna pod elektronovým mikroskopem, včetně symbiózy tyčinkovitých laktobacilů spolu s kvasinkami.....	27
Obrázek 12: Změny v množství kmene <i>Lactobacillus plantarum</i> RL-26-P stanovených na FHN agaru během skladování kefiru po dobu 28 dní při 4 - 6 °C.....	27
Obrázek 13: Dunajská klobása	28
Obrázek 14: Salám Poličan.....	28
Obrázek 15: Třístupňové vedení těsta na výrobu pšenično-žitného chleba	30
Obrázek 16: Mikroorganismy se nachází v dýchacích otvorech listu	31
Obrázek 17: Ideální model pro růst bakterií mléčného kysání během fermentace kysaného zelí a vývoj hodnoty pH	31
Obrázek 18: Změny mikroflóry při fermentaci kimchi při 14 °C a 3,5% NaCl.....	33

6.2. Seznam tabulek:

Tabulka 1: Podmínky růstu bakterií mléčného kysání.....	12
Tabulka 2: Přehled rodů bakterií mléčného kysání z hlediska typu fermentace a metabolických produktů	13
Tabulka 3: Přehled vybraných druhů rodu Lactobacillus z hlediska optimálních teplot, konfigurací, vzniklých produktů a výskytu	18
Tabulka 4: Seznam bakteriocinů produkovaných bakteriemi mléčného kysání.....	20
Tabulka 5: Vybrané lyofilizované komerční kultury kmene Lactobacillus	22
Tabulka 6: Aktivní a titrační kyselosti a mikroskopický obraz výrobku acidofilního mléka, včetně počtu KTJ/ml a senzorických vlastností	24
Tabulka 7: Úlohy startérových kultur při zrání	28