



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MIKROBIOLOGICKÝ PROFIL ROSTLINNÝCH ANALOGŮ MLÉKA

MICROBIOLOGICAL PROFILE OF PLANT MILK ANALOGUES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Eliška Mastilová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.

BRNO 2025

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK2134/2024 Akademický rok: 2024/25
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Eliška Mastilová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a technologie
Vedoucí práce: **Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Mikrobiologický profil rostlinných analogů mléka

Zadání bakalářské práce:

- Vypracujte literární rešerši na téma
 - rostlinné nápoje jako alternativy mléka, jejich charakteristika, technologie výroby, složení a výživové vlastnosti,
 - mikrobiologický profil od vstupních surovin až po finální výrobek s ohledem na možný výskyt nežádoucích mikroorganismů,
 - možnost obohacení těchto nápojů benefičními mikroorganismy, např. probiotiky,
 - metody stanovení mikrobiálního profilu, včetně legislativních požadavků.
- Pomocí vybraných mikrobiologických a molekulárně diagnostických metod charakterizujte mikrobiologický profil modelových vzorků rostlinných analogů mléka bez a s přidavkem probiotické kultury.
- Proveďte senzorické zhodnocení vybraných rostlinných analogů mléka.

Termín odevzdání bakalářské práce: 26.5.2025:

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

Eliška Mastilová
studentka

Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 3.2.2025

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Tato práce je zaměřena na zkoumání rostlinných alternativ mléka a dalším rostlinným výrobkům. Teoretická část práce je věnována základním definicím a popisu výrobku jako fyzikálně-chemickým a senzorickým vlastnostem výrobku. Dále se věnuje technologické výrobě, složení a výživové hodnotě výrobku či mikrobiologickému profilu a přidávání benefičních mikroorganismů do produktu.

Experimentální část je zaměřena na zkoumání mikrobiologického profilu výroku příslušnými metodami. Do výrobku jsou přidávány probiotika a kultivačními metodami je pozorována jejich životnost a za různých skladovacích podmínek. Další části jsou výrobky podrobeny analýze mikrobiomu za pomoci molekulárně diagnostické metody. Nejprve je izolována DNA ze vzorků komerčním kitem. Izolovaná DNA je metodou PCR v reálném čase zkoumána na přítomnost domény *Bacteria*, rodu *Lactobacillus* a kvasinek.

Kultivačními metodami byly ve vzorcích stanoven celkový počet mikroorganismů. Možnost přidavku probiotik do výrobku byl potvrzen jako možný za podmínek skladování v chladu. Molekulárně diagnostickými metodami byla potvrzena přítomnost domény *Bacteria* a kvasinek.

ABSTRACT

The thesis focuses on research into plant-based alternatives to milk and other plant products. The theoretical part of the thesis is devoted to basic definitions, physico-chemical and sensory properties. It also deals with technological production process, composition, and nutritional value of the product, as well as its microbiological profile and the addition of beneficial microorganisms to the product.

The experimental part focuses on examining the microbiological profile of the product using appropriate methods. Probiotics microorganisms are added to the product, and their viability is monitored through cultivation methods under various storage conditions. In the next part, the products are subjected to microbiome analysis using molecular diagnostic methods. DNA is first isolated from samples using a commercial kit. The isolated DNA is examined for the presence of the *Bacteria* domain, the *Lactobacillus* genus, and yeast using real-time PCR.

The total number of microorganisms was determined in the samples using cultivation methods. The possibility of adding probiotics to the product was confirmed under cold storage conditions. Molecular diagnostic methods confirmed the presence of the *Bacteria* domain and yeast.

KLÍČOVÁ SLOVA

rostlinné alternativy mléka, mikrobiom, probiotika, polymerová řetězová reakce

KEYWORDS

plant-based milk alternatives, microbiome, probiotics, polymerase chain reaction

MASTILOVÁ, Eliška. *Mikrobiologický profil rostlinných analogů mléka*. Online, bakalářská práce. Štěpánka TRACHTOVÁ (vedoucí práce). Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2025. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/161999>. [cit. 2025-05-17].

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem svojí bakalářskou práci vypracovala samostatně a veškeré použité literární zdroje jsem úplně a správně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a její možné využití ke komerčním účelům je možné pouze se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Touto formou bych chtěla poděkovat svojí vedoucí Ing. Štěpánce Trachtové, Ph.D. za odborné vedení a pomoc při zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat doc. Evě Vítové Ph.D. za konzultaci a poskytnutí prostoru k senzorické analýze.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	Teoretická část.....	9
2.1	Rostlinné alternativní nápoje.....	9
2.1.1	Fyzikálně-chemické vlastnosti rostlinných alternativ	9
2.1.2	Senzorické vlastnosti rostlinných alternativ mléka	9
2.2	Typy rostlinného alternativního mléka.....	10
2.2.1	Kokosové mléko.....	11
2.2.2	Mandlové mléko.....	11
2.3	Výroba rostlinných nápojů	11
2.3.1	Předúprava surovin.....	12
2.3.2	Extrakce.....	12
2.3.3	Enzymatické zpracování	12
2.3.4	Kvašení.....	13
2.3.5	Klíčení	13
2.3.6	Oddělení	13
2.3.7	Složení výrobku.....	13
2.3.8	Homogenizace	14
2.3.9	Tepelné zpracování.....	14
2.3.10	Obohacování živinami.....	14
2.3.11	Balení	15
2.4	Složení a výživové vlastnosti	15
2.4.1	Proteiny	15
2.4.2	Tuk a mastné kyseliny	15
2.4.3	Sacharidy	16
2.4.4	Vitamíny a minerály	16
2.4.5	Bioaktivní látky	16
2.5	Mikroflóra rostlinných alternativ mléka.....	17
2.5.1	Bakterie mléčného kvašení.....	17
2.5.2	Kvasinky.....	17
2.5.3	Rod <i>Bacillus</i>	18
2.5.4	Rod <i>Clostridium</i>	18

2.6	Přídavek probiotik do rostlinných alternativ mléka	18
2.6.1	Rod <i>Laktobacillus</i>	19
2.6.2	Vliv na senzorické vlastnosti rostlinných alternativ mléka po přidání probiotik.	19
2.7	Legislativní požadavky na výrobek.....	20
2.8	Metody pro stanovení mikrobiomu	21
2.8.1	Mikrobiologické kultivační metody	21
2.8.2	Molekulárně diagnostické metody	21
2.8.3	Senzorická analýzy.....	23
3	CÍLE PRÁCE.....	25
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
4.1	Materiál	26
4.1.1	Vzorky.....	26
4.1.2	Chemikálie	26
4.1.3	Přístroje a pomůcky.....	27
4.1.4	Kultivační media	27
4.1.5	Pozitivní kontroly	28
4.1.6	Použité primery	28
4.2	Metody	29
4.2.1	Kultivační vyšetření	29
4.2.2	Izolace DNA.....	30
4.2.3	Stanovení koncentrace a čistoty DNA.....	30
4.2.4	Polymerová řetězová reakce v reálném čase.....	31
4.2.5	Senzorická analýza	32
5	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	33
5.1	Kultivační vyšetření	33
5.1.1	Metoda nejvyššího pravděpodobného počtu	33
5.1.2	Přídavek probiotik do výrobků.....	34
5.2	Molekulárně diagnostické metody	35
5.2.1	Izolace DNA a měření její koncentrace a čistoty	35
5.2.2	Řetězová polymerová reakce v čase.....	36
5.3	Senzorická analýza	38
5.4	Shrnutí výsledků.....	39
6	ZÁVĚR	41
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	42

8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	56
9	PŘÍLOHY	57

1 ÚVOD

Živočišné mléko je ceněnou a důležitou potravinou v lidské stravě, která může poskytnout živiny schopné předávat energii již od narození jako bioaktivní složky a imunitní buňky zodpovědné za protizánětlivé, protiinfekční a probiotické účinky [1]. Jedná se o potravinu, která obsahuje téměř všechny živiny nezbytné pro chod lidského těla, je stále hojně konzumováno i v dospělosti [2].

V posledních letech byly na trh vyvinuty a uvedeny nové rostlinné potraviny a nápoje, aby reagovaly na rostoucí poptávku po alternativách k živočišným produktům. Lidé s intolerancí laktózy, malabsorpcí nebo alergií na mléčné bílkoviny by měli upřednostňovat alternativní výrobky [3]. Kromě faktu, že rostlinná mléka nahrazují laktózu, mohou být tyto mléka prospěšná i pro zdraví populace, díky surovinám používaným při výrobě. Rostlinné alternativy mléka obsahují živiny a mikroživiny přítomné ve složení potravin, které přinášející zdravotní výhody a pozitivně působí na lidský organismus [4].

V Evropě spotřeba bílkovin rostlinného mléka neustále roste a ročně se zvyšuje o 11 % rostlinných potravin a nápojů, které jsou náhradou k mléčným výrobkům [3]. Spotřebitelé začínají více vyhledávat zdravé potraviny, jako jsou fermentované potraviny obsahující probiotika [5]. Bylo zjištěno v souladu s literaturou, že většina alternativních bílkovinných potravin je spotřebiteli přijímána hůře. Pro zlepšení sensorického profilu a přijatelnost výrobku, byli vyzkoušeny směsi alternativních bílkovinných mlék nebo přidání složek, jako je vanilkový extrakt [6].

Cílem této práce bylo sledovat pomocí kultivačních a molekulárně diagnostických metod mikrobiom rostlinných alternativ mléka a jejich výrobku s a bez přídavku probiotik. Probiotika byla přidána do některých z těchto výrobků a následně byla pomocí kultivačních metod pozorovaná životnost, vybraného probiotika v prostředí rostlinného nápoje. Vybraným probiotikem byl *Lactobacillus casei* jehož přítomnost byla zkoumána v mandlovém nápoji. Kromě mikrobiologického profilu výrobku byl v práci také analyzován spotřebitelský zájem. Za pomoci sensorické analýzy byla prozkoumána obliba rostlinných náhražek mléka u spotřebitelů.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Rostlinné alternativní nápoje

Kravske mléko je považováno za jednu z potravin s nejkompexnějším a plnohodnotným složením, které v současné době konzumuje převážná většina populace [7; 8]. Poskytuje základní živiny potřebné k životu, jako jsou tuky, bílkoviny a sacharidy [8]. Kromě primárních metabolitů je také zdrojem řady dalších mikroživin jako je vápník, selen, riboflavin, vitamin B12 a kyselina pantotenová neboli vitamin B5, která k celkovému růstu a udržení tělesného chodu významně přispívá [9]. Ačkoliv je mléko dobrým zdrojem základních živin důležitých v lidské stravě, existují záporů spojené s konzumací této potraviny [10]. Kravske mléko je nejčastější alergenem v raném dětství, ale většina dětí z této alergie vyroste [11]. Jedním z hlavních negativ spojených s konzumací této potraviny je alergie na bílkovinu kravskeho mléka. Tato alergie je způsobena nepříznivou imunitní reakcí na dietní antigen obsažený v kravske mléce [10]. Další nepříznivým zdrojem ovlivňující lidské zdraví ve spojení s konzumací kravskeho mléka je intolerance na laktózu [12]. Člověk s intolerancí na laktózu není schopen trávit a vstřebávat laktózu ze stravy, kvůli absenci nebo nedostatku enzymu laktázy [13; 12]

V současné době probíhá několik výzkumů zabývajících se nahrazením živočišného mléka za rostlinná mléka [4]. V kategorii mléka je rostlinné mléko nyní vedoucí inovátor, díky pokrokům v oblasti vývoje výrobku a s tím související rozmanitost složek, které se snaží napodobit smyslové vlastnosti i výživovou hodnotu kravskeho mléka [14]. Rostlinné nápoje jsou extrakty na bázi zeleniny, luštěnin, obilovin, pseudocereálií a ořechů rozpustných ve vodě [15]

2.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti rostlinných alternativ

Fyzikálně chemické vlastnosti výrobku se liší v závislosti na použité primární složce, složení a způsobu ošetření při výrobě nápoje. Převážně se jedná o výrobky vykazující chování tekutin řidnoucích smykem s různými indexy lomu [16]. Při navrhování složení a metody extrakce je důležité zohlednit i jiné fyzikálně-chemické vlastnosti jako distribuci velikosti částic, typ emulgátoru nebo složení vodné fáze. Tyto faktory je důležité zohlednit kvůli úpravě koloidních interakcí v rostlinných nápojích [17]. V případě rostlinných nárazek na bázi sóji, ovesa anebo arašídů se průměrná velikost kapiček pohybuje v rozmezí od 0,29 μm do 1,55 μm [18]. Rostlinné alternativy mléka mají pH hodnotu v rozmezí od 6,60 do 6,83, což je hodnota odpovídající mléku hovězímu [16]. Dalším sledovaným parametrem je viskozita. U výrobku na bázi arašídů byla pozorována nižší viskozita než u výrobku ze sóji. Tento rozdíl je důsledkem vyššího obsahu tuku v arašídovém mléce, který napomáhá lepší emulgaci bílkovin a tím snižuje viskozitu nápoje [18].

2.1.2 Senzorické vlastnosti rostlinných alternativ mléka

V současné době se na spotřebitelském trhu objevil široký výběr alternativ rostlinných nápojů vyrobených z různých surovin, jako jsou luštěniny (cizrna, sója), obiloviny (oves, rýže), pseudoobiloviny (quinoa, teff, pohanka), ořechy (mandle, kešu, kokos) nebo semena (sezam,

konopí) [19]. Navzájem se od sebe liší sensorickými a nutričními vlastnostmi v závislosti na surovině, zpracování, obohacení a přítomnosti dalších složek, jako jsou sladidla a aromatické přísady [20]. Přestože je publikováno stále více studií zabývajících se sensorickými vlastnostmi potravin rostlinného původu, málo z nich se věnuje konkrétně kategorii rostlinným alternativám mlék [6]. Současně musí čelit výzvám, mezi které patří hlavně horší sensorické vlastnosti a snížená přijatelnost pro spotřebitele oproti živočišnému mléku [21].

Bylo zjištěno, že hlavní chuťový znak rostlinných alternativních mlék je na úrovni složek spojen s rostlinným zdrojem [6]. Výrobky na bázi obilovin jako je oves, rýže nebo pohanka mají obilnou příchuť a výrobky na bázi ořechů jako jsou mandle, kokos, lískové ořechy a para ořechy se budou vyznačovat ořechovou příchuť a mají často křídovou vůni [22; 23]. Některé rostlinné složky jako rozpustná vláknina zlepšují texturu a příjemný pocit v ústech [24]. V rámci konkrétních kategorií byly také nalezeny určité výrobky s rozdílnými specifickými chutěmi, vůněmi a konzistencí oproti jejich sesterským výrobkům [23]. Starší studie ukázala, že mléka na bázi rýže s nižším obsahem cukru vykazovala škrobovou, fermentovanou vůni s lepenkovou a syrovou chutí [25]. Výrobek byl méně preferován, což je důkazem, že i v rámci stejné rostlinné kategorie výrobku může přidavek složek ovlivnit sensorické faktory [25; 21].

Rostlinné alternativní nápoje jsou stále negativně spojovány s výrobky s nepříjemnou chutí, protože čím méně je chuť alternativního mléka podobná živočišnému mléku, tím nižší zájem je u klasických spotřebitelů [6; 26].

V roce 2019 vyšla studie zkoumající alternativy mléka na bázi rýže zaměřené na hodnocení sensorických vlastností těchto výrobků vyškolenými účastníky a hodnocení spotřebitele jejich přijatelnosti. Stupeň sladkosti výrobků značně ovlivnila oblíbenost u spotřebitelů, kteří některé výrobky označily za příliš sladké a některé naopak za nedostatečně sladké. Chuť výrobků v ústech se významně lišila a ovlivňovala jejich oblíbenost. U všech testovaných výrobků ze studie vyplynula určitá zjištění, jako příliš malá hustota. Bylo doporučeno vývojářům a zpracovatelům, aby zvýšili hustotu těchto výrobků, pro lepší přijatelnost spotřebitele [27].

2.2 Typy rostlinného alternativního mléka

Podle primární složky neboli příslušného rostlinného zdroje byly rostlinné alternativy mléčných výrobků rozděleny do 5 různých kategorií, a to na pseudoobiloviny, obiloviny, luštěniny, ořechy, semena a případné směsi primárních složek. Kromě těchto hlavních kategorií se na trhu objevují i podkategorie, které zahrnují nápoje na bázi mandlí, kokosu, slunečnicových semen, cizrny, konopí, hrachu a rýže [11; 24]. Například skupina nápojů vyrobená z ořechů a semen zahrnuje mandle, lískové ořechy, kešu, kokos, tygří ořechy a vlašské ořechy [11]. Obecně mají mléčné výrobky na bázi ořechů hustší texturu a zároveň výrobky z mandlí, kešu a para ořechů mají sladkou chuť [23]. Zvláštní kategorií je skupina smíšených mlék, která zahrnuje alternativy obsahující primární složku z více rostlinných zdrojů [11]. Nápoje vykazují odlišné složení a chuť v závislosti na rostlinné surovině [24].

2.2.1 Kokosové mléko

Kokosový ořech lze pokládat za ovoce s výživovou hodnotou, protože každou jeho část jde využít k různým účelům [8]. Je považováno za nejvhodnější náhradu kravského mléka, jelikož jej lze použít jako náhradu kravského mléka ve výrobcích jako sýr, jogurt nebo mražené dezerty [28]. Mléko získané z tohoto plodu se celosvětově používá k výrobě cukrovinek, pečiva, sušenek a zmrzliny. Kokosové mléko je dobře stravitelná náhražka mléka, díky přítomnosti triglyceridů se středně dlouhým řetězcem. Kokosový ořech na rozdíl od jiných analogů mléka obsahuje mastné kyseliny se středně dlouhým řetězcem. Ty se snadno vstřebávají a metabolizují v játrech, kde se přeměňují na ketolátky užitečné pro fungování mozku [29].

Mladé kokosové mléko obsahuje sacharidy, tedy hlavně sacharózu a škrob. Dále lipidy a bílkoviny, které jsou bohaté na lysin, methionin a tryptofan [30]. Mléko obsahuje poměrné množství minerálních látek a vitaminů, naproti tomu je obsah vápníku velmi nízký, a to z tohoto výrobku činí nemléčný nápoj s nedostatkem vápníku [31].

2.2.2 Mandlové mléko

Mandle je potravina podporující funkce jako mentální bdělost, soustředění, paměť a pomáhají k dobrému spánku, při správném užití [32]. Jsou používány jako složka pečených potravin, cukrovinek, müsli tyčinek, snídaňových cereálií a mnoha dalších výrobků [33].

Hlavní složky mandlí jsou bílkoviny, lipidy, rozpustné cukry, minerální látky a vláknina [4]. Většina mandlí obsahuje 16-23 g/100 g bílkovin, přičemž jsou tvořeny převážně esenciálními aminokyselinami. Lipidy, tvořeny především nenasyčenými mastnými kyselinami, konkrétně mononenasyčenými tuky jsou zastoupeny v množství 31-35 g/100 g s převahou kyseliny olejové [34; 35]. Vysoký obsah mastných kyselin má význam při růstu patogenních mikroorganismů jako jsou *Escherichiae coli* a *Listeria monocytogenes* [36]. Snížení výskytu patogenů je možné tepelným zpracováním, ale současně při použití těchto metod dochází ke snížení nutričních hodnot [37]. Kromě hlavních složek je tato surovina dobrým zdrojem vitamínu E a komplexu vitamínu B. Obsah vitamínu E ve formě α -tokoferolu činí 25,87 mg/100 g mandlí, naproti tomu komplex vitamínu B zahrnující vitamín B1 až B6, je řádově nižší a činí 0,24 mg/100 g B1, 0,8 mg/100 g B2, 4 mg/100 g B3, 0,3 mg/100 g B5 a 0,13 mg/100 g B6 [38].

Mandle jsou bohaté na nutriční složky, a to především na vápník, hořčík, selen, draslík, zinek, fosfor a měď, a protože v mandlích je přítomna i arabinóza mají prebiotické vlastnosti [34].

Alergie na mandle je běžnou alergií způsobená látkami jako amandin, což je hlavní protein mandlí. Dále může být způsobena proteiny legumin a prunin, které jsou hlavní zásobní proteiny semen vyskytující se v mandlích přibližně 65 % [39]. Tyto proteiny lze snadno odstranit pomocí mechanických a fermentačních úprav [40].

2.3 Výroba rostlinných nápojů

Rostlinné alternativy mléka jsou z chemicko-fyzikálního hlediska koloidní suspenze nebo emulze skládající se z rozpuštěného a dezintegrovaného rostlinného materiálu [41]. Nápoje

tohoto druhu jsou zpracovávány několika typů procesů v závislosti na surovině, z které se nápoj získává, existují však společné procesy zpracování pro všechny rostlinné nápoje. Mezi tyto univerzální kroky zpracování patří předúprava suroviny, extrakce mléka, zapracování přídatných látek, suspenze, stabilizace a vhodné skladování pro zlepšení trvanlivosti výrobku [42].

2.3.1 Předúprava surovin

Před samotnou výrobou je nutná předúprava surovin [43]. Suroviny bývají upravovány před samotným zpracováním převážně kvůli zlepšení nebo umožnění samotné extrakce, zvýšení nutriční kvality, zlepšení sensorických vlastností nebo odstranění nepříjemné chuti. Samotný krok předúpravy surovin zahrnuje loupání a namáčení [44]. Namáčení podporuje změkčení a roztažnost surovin, usnadňuje rozmělnění suroviny při procesu mletí [45]. Surovina je namáčena podle druhu ve vodě podobu 3 až 18 hodin nebo v alkalickém roztoku s 0,2 až 2 % hydrogenuhličitanu sodného. První případ namáčení ve vodě se používá na suroviny jako hrách, kešu ořechy, sójové boby, oves nebo sezam, v druhém případě se jedná o suroviny jako arašidy a tygří ořechy, u kterých dochází při procesu k odstranění fazolové a ořechové chuti [44]. Kromě pozitivní podpory při dalším zpracování snižuje namáčení počáteční mikrobiální zátěž [46].

Dalšími často používanými procesy jsou blanšírování, odtučňování či fermentace. Blanšírování je využíváno při předúpravě mandlí pro odstranění slupky nebo pro odstranění nepříjemné chuti u arašidů. Je nutnou součástí inaktivace inhibitorů trypsinu a lipoxygenáz, které produkují bílkoviny. V případě fermentace se jedná převážně o proces pro zlepšení nutričních vlastností [44]. Mezi procesy předúpravy patří i pražení surovin, které zvyšuje aroma a chuť konečného produktu. Požití zahřívání může mít za následek snížení rozpustnosti bílkovin a rychlost extrakce [47].

2.3.2 Extrakce

Proces extrakce má zásadní vliv na výsledný složení výrobku [44]. Lze zlepšit účinnost extrakce zvýšením teploty, přidáním enzymů, fermentací, klíčením nebo zvýšením pH pomocí NaOH nebo hydrogenuhličitanu [43]. Vyšší teplota při extrakci zvyšuje extrahovatelnost tuků, naopak dochází při zvýšení teploty k denaturaci bílkovin, čím se snižuje rozpustnost tuku a výtěžnost. Možnou alternativou je použití extrakce pomocí mikrovln, používaná převážně pro výrobu sójového alternativního mléka. Ve srovnání s metodou extrakce parní infuzí zvyšuje extrakce mikrovln výtěžnost, obsah bílkovin a celkovou rozpustnost sušiny. Mikrovlnný ohřev zvyšuje solubilizaci polysacharidů a dalších složek [48]. Tento typ extrakce také může pomoci s odstraněním rizikových faktorů, jako jsou kyanogenní glykosidy nebo inaktivovat endogenní oxidázy v rostlinných surovinách, a tím zlepšit oxidační stabilitu konečného výrobku [49].

2.3.3 Enzymatické zpracování

Enzymolýza je účinná za mírných reakčních podmínek, vykazuje nízkou energetickou náročnost, vysokou účinnost. Při tomto procesu je spotřeba rozpouštědla velmi nízká, díky které je podpořeno uvolnění vnitrobuněčných buněk, zvyšuje obsah bílkovin a rozpustných cukrů, zlepšuje stabilitu a sensorické vlastnosti výrobu [50]. Je uváděno že částečná enzymová hydrolýza bílkovin a polysacharidů má pozitivní vliv na výtěžnost extrakce [51], zároveň je

klíčovým krokem při podpoře rozpouštění živin [52]. Dochází k želatinizaci škrobu, přičemž následným vodním mletím se vytváří vysoce viskózní gel. Proces je velmi účinný při přípravě ovesného nápoje [44].

2.3.4 Kvašení

Rostlinné nápoje vyráběné mikrobiální fermentací se obvykle fermentují ve smíšených kulturách za použití dvou či více mikrobiálních kmenů, čímž se zlepši kvalita konečného produktu [53]. Nejčastěji se k těmto účelům používají bakterie mléčného kvašení, bacily a kvasinky. Fermentace může zlepšit chuť výsledného výrobku či odstranit nežádoucí pachy a zároveň vytvořit příjemnou vůni [43]. Kromě sensorických vlastností může mít pozitivní následky na nutriční hodnotu, jako zvýšení obsahu živin a zlepšením jejich biologické využitelnosti [54]. U mandlového nápoje fermentace pomocí bakterií mléčného kvašení zvyšuje obsah fenolických sloučenin, čím získají vyšší antioxidační kapacitu [43].

2.3.5 Klíčení

Klíčení se používá k uvolnění živin, protože syrová zrna nejsou tak výživná jako naklíčená [43]. Proces klíčení podporuje enzymatický rozklad sacharidů na jednoduché cukry, ale účinek je závislý na aktivaci hydrolytických a amylolytických enzymů, což vede k snížení obsahu škrobu a zvýšení obsahu jednoduchých cukrů [55]. Při kombinaci klíčení s další technologií je potenciálně možné získání výživných rostlinných nápojů [43].

2.3.6 Oddělení

Filtrací, dekantací nebo odstředěním jsou hrubé částice odděleny ze suspenze [47], podle požadavků na velikost částic [43]. Při separaci se odstraňuje převážně nerozpustná vláknina, pro dosažení určité jemnosti částic, čímž je podpořena stabilita výrobku [43]. V případě surovin s vysokým obsahem tuků je nutné přebytečný tuk odstranit separátorem. Oddělený produkt lze tepelně zpracovat za cíle získat olej nebo sekundární suroviny, např. složka zmrzliny nebo pekárenských výrobků [47].

2.3.7 Složení výrobku

V této fázi vyrobí dochází k přidávání složek do základu výrobku, převážně se jedná o vitaminy, minerální látky, sladidla, ochucovadla, barviva, sůl, oleje a stabilizátory [44]. Během procesu míchání se do nápojů přidávají cukr, sůl, úprava kyselosti, aroma a vonné látky z exogenních zdrojů pro zlepšení chuti a vůně [43]. Mezi nejběžnější stabilizátory používané u tohoto typu výrobku patří karagenen, rýžový škrob, guma gellan, kukuřičný dextrin, xanthanová guma, guma guar a tapiokový škrob [44]. Stabilizační emulze jsou přidávány do nápojů po sterilaci za vysoké teploty [43].

Dalším velmi používanou přísadou u alternativních mlék je metabisulfit sodný určený pro konzervaci nebo také kyselina citronová používaná jako antioxidant [44]. Rostlinné nápoje se značně odlišují od živočišných mlék nutriční kvalitou a biologickou dostupností, proto je obohacení těchto výrobků nezbytné [47].

2.3.8 Homogenizace

Produkt je před homogenizací sám o sobě nestabilní, protože obsahuje nerozpustné částice, které mají vyšší hustoty, než voda, a tak se usazují na dně. Jedná se o bílkoviny, škrob, vlákninu a další buněčný materiál. Homogenizace zlepšuje stabilitu rostlinné alternativy mléka nerušením agregátu a kapiček lipidů, velikost částic se sníží a jejich distribuce se naopak zvýší [56]. Procesu homogenizace lze dosáhnout mechanickým zařízením, mezi které patří míchačky s vysokým smykem, koloidní mlýny, vysokotlaké ventilové homogenyzátory a mikrofluidizátory [44].

Často používanou metodou pro homogenizaci při zpracování rostlinných nápojů je ultravysokotlaká homogenizace [43]. U alternativních výrobků mléka na bázi mandlí a sóji může metoda zlepšit stabilitu a prodloužit trvanlivost [57]. Kapalný vzorek je vystaven smykové a kavitační síle v homogenizátoru. Dochází k vysokorychlostnímu nárazu kapaliny a vířivému působení, čímž se vzorku ztrácí strukturu a částice v emulzi se zmenší. Celková stabilita na konci procesu je vyšší. Při procesu se pracuje s vysokými tlaky, což může způsobit pokles mikroorganismů a tím zajistit nezávadnost konečného výrobku. Takto ošetřené výrobky lze skladovat při pokojové teplotě po dobu až 6 měsíců [43].

2.3.9 Tepelné zpracování

Tepelné ošetření pozitivně ovlivňuje konzervaci, konkrétně snižuje počet mikrobů a inaktivuje enzymy přítomné v suspenzi [58]. Je nutné zvolit vhodnou kombinaci teploty a času, abychom zajistili zničení všech nežádoucích látek, tím že je zabráněno shlukování kapiček pokrytých olejem [47]. U komerčních výrobků dochází k ošetření pasterizací, okamžitou sterilací, ultravysokou teplotou nebo vysokoteplotní vysokotlaké sterilací, aby se prodloužila jejich trvanlivost [43]. Pasterizace je obvykle proces ošetření při teplotě nižší 100 °C, který inhibuje patogenní mikroorganismy [47]. Naneštěstí, vysoké teploty při úpravě mohou způsobit změny struktury, fyzikálních a chemických vlastností, což může mít negativní vliv na výrobek a pro to se začínají více používat šetrnější alternativy [43].

Pro komerční výrobky byla navržena metoda pulzního elektrického pole, která prodlužuje trvanlivost výrobku [47]. Jedná se o sterilizační techniku bez použití zvýšené teploty. Vzorky jsou vystaveny pulzům vysokého tlaku při teplotách 30 až 40 °C [59]. Při intenzivních pulzech dochází k elektroporaci, která způsobuje vyšší propustnost mikrobiálních membrán buněk, což vede k jejich poškození až smrti. Metoda je vhodná především pro tekuté potraviny s nízkou vodivostí a viskozitou [43].

2.3.10 Obohacování živinami

Při zpracování rostlinných alternativ mléka dochází ke změnám koncentrací mikroživin. Příkladem je namáčení nebo bělení surovin v počátečních úpravách, kdy může dojít ke ztrátě vitaminů rozpustných ve vodě nebo dekantace, kdy dochází ke ztrátě minerálních látek. Dalším faktorem ovlivňující koncentraci mikroživin ve výrobku je teplota. Teplené zpracování může zničit, v závislosti na čase a teplotě, některé vitaminy nebo denaturovat bílkoviny [60]. Proto je obohacení doporučeno provést po teplených úpravách [44].

2.3.11 Balení

Zpravované nápoje jsou baleny podle potřeby do obalů pro distribuci a skladování. Výrobek je balen do kartonových obalů, tedy vícevrstvých krabic nebo do plastových lahví. Rostlinné alternativy mléka se také suší rozprášením nebo v bubnu. Vzniká stabilní prášek, který lze podle potřeby obnovit na požadovaný produkt [44]. Před sušením by měl kapalný produkt stabilizovaný, abychom následně získali stabilní produkt [61].

2.4 Složení a výživové vlastnosti

Výživový profil rostlinného mléka je závislý na použité surovině, složení a procesu výroby [17]. Jejich složení se liší převážně obsahem cukru, tuku a bílkovin. Ve srovnání s kravským mlékem, které má vysokou nutriční hodnotu jsou rostlinné alternativy o něco nutričně nevyrovnané. Zatím co kravské mléko je dobrým zdrojem bílkovin, vápníku, fosforu, draslíku a vitamínu D, rostlinné nápoje mají většinou nižší výživové hodnoty a je nutné obohacení o různé živiny [44].

2.4.1 Proteiny

Podobně jako kravské mléko má i rostlinná alternativa této potraviny na bázi sóji vysoký obsah bílkoviny. Sójový nápoj obsahuje nejvyšší obsah bílkovin ze všech alternativ a je považován za kompletní zdroj bílkovin pro dospělého člověka, protože obsahuje všechny esenciální aminokyseliny. Naopak nejnižší obsah bílkovin mají výrobky na bázi rýži [43]. Obsah hrubých bílkovin v nápojích se pohybuje od 0,6 g/kg v rýžovém nápoji po 43,0 g/kg v sójovém.

Rostlinné nápoje mají mezi jednotlivými druhy velmi odlišný obsah aminokyselin [62]. Oproti mléčným bílkovinám mají mírný nedostatek některých esenciálních aminokyselin, jako metionin a lysin [63]. Obecně se má zato, že kvůli nepřítomnosti těchto aminokyselin mají rostlinné bílkoviny nižší výživovou hodnotu, než mléčné bílkoviny [43].

2.4.2 Tuk a mastné kyseliny

Rostlinné alternativy jsou bohaté na nenasycené mastné kyseliny, obsahují jen malé množství nasycených mastných kyselin a neobsahují cholesterol [64], což přináší benefity pro zdraví člověka [65]. Polynenasycené mastné kyseliny je podskupina zahrnující omega 3 a omega 6 mastné kyseliny, které přinášejí při konzumaci mnoho zdravotních výhod. Při přijímání omega 3 a omega 6 potravou je důležité udržovat vhodnou rovnováhu, protože nadměrná konzumace omega 6 a nedostatek omega 3 může způsobit nechtěné zdravotní potíže [43]. Například konopné mléko je bohatým zdrojem α -linolové kyseliny, což je důležitá omega 3 mastná kyselina [65]. Mastné kyseliny obsažené v těchto výrobcích jsou převážně mastné kyseliny s dlouhým řetězcem, kromě tuku obsaženém v kokosových výrobcích. Ty naopak obsahují mastné kyseliny s krátkým a středně dlouhým řetězcem. Byl zjištěno že nápoje s dlouhými řetězci mají vysoký obsah omega 6 mastných kyselin ve srovnání s kokosovým nábojem a mlékem [62]. Triglyceridy se středně dlouhými řetězci v kokosovém mléce, mají pozitivní vliv na tělesnou hmotnost, hladinu inzulínu a rychlost metabolismu. I přes to že kokosové mléko obsahuje vysoký podíl nasycených tuků jedná se o výrobek, který má přínos pro zdraví člověka [16]. Průměrný obsah celkových transmastných kyselin se pohybuje od 0,0015 g/100 g do 0,0022 g/100 g výrobku [62].

2.4.3 Sacharidy

Sacharóza, fruktóza, glukóza, laktóza, škrob a vláknina jsou sacharidy obsaženy ve všech rostlinných nápojích a mléce. Celkový obsah sacharidů v rostlinných nápojích se pohybuje od 1,9 g/kg v mandlovém nápoji po 73,2 g/kg v rýžovém nápoji. V nápojích na bázi špaldy, rýže a ovsu je celkový obsah sacharidů nejvyšší, v kokosovém a kešu nápojích je obsah střední a mandlové, sójové a konopné nápoje mají celkový obsah sacharidů v porovnání s ostatními nejnižší. Rostlinné alternativy mléka obsahují sacharózu a glukózu na rozdíl od mléka, jehož jediným zdrojem sacharidů je laktóza [62].

2.4.4 Vitamíny a minerály

Kravské mléko je obecně považováno za velmi dobrý zdroj všech vitamínů, kromě vitamínu D. Ten je v mléce obsažen v nízkých koncentracích a obvykle je nutné externí suplementaci pro obohacení [43]. Stejně jako mléko i rostlinné náhražky mají nízký obsah vitamínu D, a proto jsou komerční náhražky často obohaceny tímto vitamínem. Na druhou stranu sójové a mandlové nápoje mají relativně vysoký obsah vitamínu E pohybující se okolo 3,84 až 4,00 mg/100 ml [66]. Dále pak nápoje na bázi kokosu, mandlí a kešu obsahují 60 µg/100 ml, což je dvakrát více než je obsaženo v mléce kravském. Do některých rostlinných nápojů je přidáván slunečnicový olej, který pravděpodobně přispívá ke zvýšení obsahu vitamínu E [62]. Obecně lze říct, že rostlinné nápoje mají oproti kravskému mléku vyšší obsah vitamínů rozpustných v tucích [43].

Rostlinné nápoje v porovnání s mlékem obsahují nižší množství fosforu, draslíku, vápníku, zinku, síry, jódu a chloridů [62]. Avšak sami o sobě jsou i tak bohaté na minerální látky jako vápník, hořčík, selen, draslík, zinek, fosfor, měď a mangan [43]. Některé nápoje bývají obohaceny fosforečnanem vápenatým nebo vápníkem v řas [62]. Pokud je výrobek obohacen vnějšími zdroji vápníku, je obsah v rostlinném nápoji vyšší než v kravském mléce [67]. Obohacení výrobku mořskými řasami zlepšuje koncentraci vápníku na úroveň mléka, ale v porovnání s fosforečnanem vápenatým je koncentrace významně nižší. Nicméně, přídavek mořských řas má i za následek zvýšení obsahu jódu [62].

2.4.5 Bioaktivní látky

Rostlinné nápoje obsahují mnoho různých bioaktivních látek, které mají různé další zdravotní účinky [16]. Jedná se převážně o flavonoidy, fenolové kyseliny, lignany a fytosteroly [68]. Bylo prokázáno že izoflavony obsažené v sójovém mléce snižují poruchy paměti u lidí trpících na Alzheimerovu chorobu, snižují krevní tlak, zvyšují hustotu kostních minerálů [16]. Některé nápoje mohou obsahovat inherentní flavonoidy, které pocházejí z jejich základních složek, a tím propůjčit nápojům antioxidační vlastnosti. Avšak obohacení flavonoidy není u komerčně vyráběných nápojů standartní [43]. V arašídových nápojích je obsažen resveratrol, který má údajně antioxidační, antibakteriální, hepatoprotektivní a kardiovaskulární účinky [69]. Lignany jsou ve velkém obsaženy v nápojích ze sezamových semínek. Jedná se o přírodní rostlinné estrogény, které mohou regulovat produkci tří typů estrogenu nebo snižovat riziko rakoviny prsu. Kromě protinádorových účinku mohou lignany regulovat detoxikační enzymy a tím podporovat detoxikační procesy [43].

2.5 Mikrofóra rostlinných alternativ mléka

Potravina přinášející hostiteli léčebné účinky, by měla v době konzumace obsahovat minimálně 10⁶ životaschopných kolonií bakterií [70]. Obecně je známo že rostlinné materiály podporují růstu mikroorganismů [24]. Proto je nutné při výrobě těchto výrobků brát ohled na mikrobiologickou bezpečnost a stabilitu vyvinutých receptur pro tradiční výrobu. Výroba rostlinných mléčných alternativ často zahrnuje vysokoteplotní ošetření, jehož účelem je odstranit potravinové patogeny a mikroorganismy způsobující kažení [71].

2.5.1 Bakterie mléčného kvašení

Je nežádoucí, aby výrobek obsahoval mikroorganismy tvořící spory, protože by mohla být ohrožena bezpečnost i kvalita konečného výrobku. Výrobky jsou proto tepelně ošetřeny nebo fermentovány, čímž dochází k potlačení růstu spor [71].

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou skupinou mikroorganismů zodpovědných za kvašení mléčných potravin zároveň jsou nejpoužívanějšími mikroby pro fermentaci rostlinného původu [72; 24].

Bakterie mléčného kvašení okyselují médium, které se stává pro jiné mikrobiální organismy méně příznivým prostředím, zároveň se tak prodlouží trvanlivost výrobku [73]. Výrobek se okyselen produkcí kyseliny mléčné a dalšími důležitými sloučeninami, jako bakteriociny, aromatickými sloučeninami, vitaminy, minerálními látkami enzym okyselí [74].

Fermentace zvyšuje koncentraci nebo biologickou dostupnost bioaktivních látek [75]. Bakterie tohoto druhu jako jsou *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei* jsou jedny z nejpoužívanějších probiotik v komerčních startovacích kulturách [74].

Výběr kmenů bakterií mléčného kvašení pro matrice na rostlinné bázi je klíčový pro dosažení žádaných vlastností při výrobě produktů. Jeden z hlavních problémů je že prozatím máme omezené znalosti o rostlinných kmenech bakterií mléčného kvašení na rozdíl od mléčných kmenů [76].

2.5.2 Kvasinky

Kvasinky spolu s BMK jsou jedny z nejpoužívanějšími mikroorganismů pro fermentaci rostlinného materiálu. Jedná se např. o kvasinky rodu *Saccharomyces*. Bylo prokázáno že tyto mikroorganismy mají vlastnosti, které napomáhají zlepšení nutričních a senzorických vlastností [53]. Specifické mikrobiální kmeny kvasinek syntetizují vitaminy během fermentace, včetně vitamínu K a vitamínů skupiny B [24]. Stejně jako BMK, může přítomnost kvasinek zlepšuje senzorické vlastnosti výrobku, jako odstranit pachut' z výrobku na bázi sóji. Kmen kvasinek se podílí na se podílí na produkci těkavých látek prostřednictvím procesu fermentace. Do této skupiny spadá např. kvasinka *Saccharomices cerevisiae*, která může odstranit pachut' ze sójového prášku nebo *Lycoperdon pyriform*, používaná na snížení pachuti v sójových nápojích.

Dalšími zástupci této skupiny jsou *Kluyveromyces marxianus*, *Candida ethanolica* a *Pichia amenthionina*. *K. marxianus* a *C. ethanolica* jsou kvasinky, která může vytvořit vonné aroma a chuťové látky a tím zlepšit přijatelnost výrobku. Celkově rod *Kluyveromyces*, *Candida*,

Saccharomyces a *Pichia* jsou používány k výrobě fermentovaných mléčných i nemléčných nápojů po celém světě [77].

2.5.3 Rod *Bacillus*

Bakterie z rodu *Bacillus* jsou všudypřítomné v půdě a mohou tak podporovat růst rostlin, zároveň přispívají k funkčnosti a úrodnosti půdy. V důsledku jejich časté přítomnosti v půdě jsou častou součástí mnoha druhů rostlinných potravin. Patří jsme zástupci jako *Bacillus subtilis* a *Bacillus cereus*. Některé z těchto mikroorganismů produkují toxiny, které jsou škodlivé pro zdraví člověka.

Zástupci ze skupiny *Bacillus subtilis* jsou převážně nepatogenní, a pro člověka nepředstavují život neohrožující hrozbu. Jedná se o zástupce z druhů *B. licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. majavensis*, *B. atrophaeus* a mnoho dalších [71]. Optimální teplota růstu pro tento druh je mezi 30 °C a 50 °C, kromě *B. licheniformis*, který roste při teplotě až 58 °C [78]. Bakterie rodu *Bacillus* (např. *B. subtilis*, *B. licheniformis*) jsou častou součástí potravin, včetně mléka a sušeného mléka. Bakterie této skupiny jsou často spojovány se kažením potravin, avšak výskyt *B. licheniformis* produkujícího toxin lichenysin v cytotoxických koncentracích byl popsán několika autory [71].

Dalším zástupcem tohoto rodu je *Bacillus cereus*, který zahrnuje mnoho příbuzných druhů jako *B. weihenstephanensis*, *B. cytotoxicus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* a další [79]. Druhy v této skupině jsou patogenní a odlišují se schopností způsobovat onemocnění u lidí a zvířat. Každý rok je zaznamenáno několik desítek potravinových epidemií způsobených *B. cereus* a jeho toxiny. Kmen *B. cereus* nese toxinový gen, který může způsobit emetické a průjemové onemocnění. Kmeny se shlukem genů ces mohou v potravinách produkovat tepelně stabilní toxin cereulid, který způsobuje emetický syndrom. V závislosti na kmenu mohou být přítomny různé kombinace genů pro toxiny [71].

2.5.4 Rod *Clostridium*

Bakterie jako rod *Clostridium*, které tvoří spory je ze složek a konečných potravin těžké odstranit. Tvorba robustní endospory tomuto rodu umožňuje přežít v různých nepříznivých podmínkách. Většina druhů je spojená s kažením potravin a nezpůsobují onemocnění, avšak *Clostridium perfringens* a *Clostridium botulium* jsou tvůrci závažných onemocnění z potravin [71].

2.6 Přídavek probiotik do rostlinných alternativ mléka

Spotřebitelé v současné době čím dál více vyhledávají zdravé potraviny, jako jsou fermentované potraviny obsahující probiotika [80]. Jedná se o živé mikroorganismy obývající střeva přinášející hostiteli účinky prospěšné zdraví, pokud jsou v dostatečném množství přijímány [80; 81]. Aktivní probiotika, zlepšují nutriční hodnoty, chuť, texturu a stabilitu a zajišťuje mikrobiologickou bezpečnost. Jedny z nejdůležitějších probiotických kmenů využívaných jako přídavek do rostlinný mlék jsou kmeny z rodu *Laktobacillus* a rod *Bifidobacterium* [16]. Jako medium pro podávání probiotik se používají fermentované matrice na bázi mléka, jako jsou jogurty a sýry [82]. V posledních letech se začaly zkoumat i nosiče

rostlinného původu získané z obilovin, ovoce, zeleniny a luštěnin, které by mohly sloužit jako nosiče probiotik [83].

Výsledky výzkumu ukazují, že přidávání sójového mléka při výrobě probiotického jogurtu ani délka fermentace neměly negativní vliv na růst, životaschopnost či přežívání probiotických bakterií [83]. Pro vývoj rostlinných alternativ je klíčové zjištění průběhu fermentace v rostlinných mléčných náhražkách a informace, jak fermentace ovlivňuje chuť a texturu [84].

Důležitou součástí je použití smíšených kultur ke kvašení rostlinných materiálů. Obecně platí že interakce mezi mikroby ve smíšených kulturách jsou četné a komplexní. Spolupráce mezi *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* je příkladem mutualismu při výrobě jogurtu. Oba kmeny se navzájem stimulují v růstu, produkci kyselin a těkavých látek [85]. Dalším příkladem může být i fakt že některé kvasinky prospívají růstu bakterií mléčného kvašení vylučováním specifických živin [24]. Všechny kombinace nejsou však pro přežití startovacích kultur žádoucí [86].

2.6.1 Rod *Lactobacillus*

Jedním ze zástupců této kategorie mikroorganismů je fakultativní anaerob *Lactobacillus rhamnosus* s probiotickým potenciálem, který byl využit při výrobě prvního probiotického fermentovaného mléka v Africe [87]. Používá se v mnoha humanitních projektech určených pro osoby žijící v chudobě, podvýživě a s infekčními chorobami. Jeho schopnosti přežít tranzit a kolonizovat gastrointestinální a urogenitální trakt je důvodem využití pro zdraví lidstva. Má široké využití a přínosy pro lidské zdraví, které mají význam sahající od zmírnění narušené funkce střevní mikroflóry, snížení kožních vyrážek a zlepšení gastrointestinálních potíží až po posílení imunity a boj proti onemocněním dýchacích cest. *L. rhamnosus* ve spolupráci s *L. reuteri* snižuje podle zjištění také výskyt plísňových a bakteriálních infekcí urogenitálního traktu, o více než 50 % během jednoho roku [83].

Dalším mikroorganismem s probiotickými účinky může být *Lactiplantibacillus plantarum* izolovaný z kukuřičné siláže [88]. Například fermentace sójového šrotu pomocí *Lactobacillus plantarum* vedla k významnému zvýšení obsahu esenciálních aminokyselin, včetně L-lysinu, a tím ke zlepšení jeho nutriční hodnoty [89]. Pro studii byl využit pro jeho dobrou schopnost snášet gastrointestinální podmínky, adhezivní vlastnosti a zlepšení střevních epitelálních buněk. Během doby skladování v mrkvovo-pomerančových nápojích byla stanovena schopnost přežití bakterií *Lactiplantibacillus plantarum*. Po sedmidenním skladování při 4 °C se životaschopnost *Lactiplantibacillus plantarum* zvýšila ve všech fermentovaných veganských nápojích ve srovnání s koncentrací na konci doby fermentace [88].

2.6.2 Vliv na senzorycké vlastnosti rostlinných alternativ mléka po přidání probiotik

Fermentace ve smíšené kultuře je účinná pro vytváření zvýrazňovačů preferované chuti. Například acetaldehyd, tedy důležitá sloučenina požadované jogurtové příchuti, se tvoří směsí dvou nebo více kultur [24]. Fermentace, převážně smíšenými kulturami, může zlepšit obsah bílkovin, rozpustnost a dostupnost volných aminokyselin, současně také může zlepšit chuť a

texturu výrobků [83; 90]. Směsná kultura *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* a *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus* snížily fazolovou příchuť arašídového mléka a výrazně zvýšily bělost, viskozitu, gumovitost a hladkost [91]. Směsná kultura při fermentaci *Lactobacillus reuteri* a *Streptococcus thermophilus* zase zvyšuje hodnotu indexu světlosti a bělosti [92].

Předchozí studie zkoumaly řadu výhod, které fermentace přináší potravinám na bázi sóji [83]. Ve srovnání s nefermentovanou sójou fermentovaný sójový nápoj vykazoval lepší antioxidační potenciál, nutriční hodnotu a zdraví podporující účinky [93]. Kromě toho že fermentace sójových potravin podporuje funkční vlastnosti zlepšuje i chuťový profil, texturu, antinutriční složky, biologickou dostupnost minerálních látek a stravitelnost [83].

2.7 Legislativní požadavky na výrobek

Rostlinné alternativy mléka, spolu se všemi potravinami podléhají zákonu č. 110/1997 Sb. o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. Zákon je povinností provozovatele potravinářského podniku, výrobce a dovozce [94].

Rostlinné alternativy mléka spadají s ohledem na mikrobiologické kritéria pro potraviny a způsob jejich kontroly do nařízení komise (ES) č. 2073/2005. Toto nařízení stanovuje mikrobiologické požadavky a prováděcí pravidla pro potravinářské podniky s ohledem na dodržování při obecných a zvláštních hygienických opatřeních. Provozovatelé potravinářských podniků musejí ve všech fázích výroby zavést systém HACCP spolu s uplatňováním správné hygienické praxe. Potraviny uváděné do oběhu musí vyhovovat mikrobiologickým požadavkům stanovených v nařízení. Rostlinné alternativy mléka spadají v tomto nařízení do kategorie potravin určené k přímé spotřebě, ačkoliv pro potraviny tohoto druhu nejsou v nařízení stanoveny konkrétní limity [95].

Dle vyhlášky č. 132/2004 Sb., která byla zrušena v roce 2006 a nahrazena nařízením komise (ES) č. 2073/2005, jsou sledovány v rostlinných alternativách mléka tyto mikroorganismy: *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* a koagulázopozitivní stafylokoky do nejvyšší mezní hodnoty 10^4 KTJ na 1 ml vzorku, termotolerantní *Campylobacter*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* a *Yersinia enterocolitica* musí být negativní při použití 25 ml vzorku. Potraviny jsou z mikrobiologického hlediska označeny jako závadné, pokud byla překročena nejvyšší mezní hodnota [96].

Dle vyhlášky č. 248/2018 Sb. upravující požadavky na nápoje, kvasný ocet a droždí jsou stanoveny nároky na jakost a technologické zpracování nealkoholických nápojů, přičemž do této kategorie spadají i rostlinné alternativy mléka [97].

Podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1308/2013 v příloze VII definice, označení a obchodní názvy produktů podle článku 78 v části III se jako „mléko“ mohou označit pouze běžné tekutiny vyloučené mléčnou žlázou z jednoho nebo více dojení, bez jakýchkoliv přísad či odebrání [98].

2.8 Metody pro stanovení mikrobiomu

2.8.1 Mikrobiologické kultivační metody

Cílem kultivačních metod je přenesení mikroorganismu přítomných v testovaném vzorku do živné půdy. Mikroorganismy zaočkované v živném médiu jsou následně inkubovány za podmínek vhodných pro růst daného mikroorganismu. Základem všech kvantitativních metod kultivace je stanovení počtu životaschopných buněk daného mikroorganismů ve vzorku [99].

Jedním z nejpoužívanějších metod je stanovení celkového počtu mikroorganismů. Celkový počet mikroorganismů (CPM) je pojem zahrnující celkový počet mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů, které rostou v neselektivních půdách nebo tvoří kolonie v agarových půdách za aerobních podmínek. Stanovení je vyjádřeno v jednotce KTJ (kolonie tvořící jednotky) v 1 g nebo 1 ml testovaném vzorku. Po určité době kultivace jsou vybrány misky s obsahem kolonií menší než 300. Hodnota CPM je obecnou informací o mikrobiální kontaminaci vzorku. Stanovení celkového počtu mikroorganismů je prováděno podle ČSN EN ISO 4833 Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metodou pro stanovení celkového počtu mikroorganismů – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. Druhá část normy: Technika rozřem a počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C je používána na výrobky určené pro lidskou spotřebu a krmení zvířat [100].

Další metodou využívanou pro stanovení CPM je technika nejvýše pravděpodobného počtu. Jedná se o metodu určenou pro analýzu vzorků s obsahem bakterií menší než 300 v 1 g nebo 30 bakterií v 1 ml vzorku [101]. Tekutý vzorek o určeném objemu a ředění je očkovan do tekuté živné půdy ve zkumavkách. Po inkubaci jsou spočítány pozitivní zkumavky v každém ředění a podle jejich počtu je sestaven trojčíselný kód, podle kterého je z tabulky hodnot odečtena MPN.

S ohledem na malou přesnost metody pravděpodobného počtu je vhodné využít tuto metodu v kombinaci s jinou [100]. Metodou používanou v kombinaci s MPN může být McFarlandův standard. McFarlandovy standardy jsou chemické roztoky používané k standardizaci přibližného počtu bakterií v kapalně suspenzi. Jedná se o roztok chloridu barnatého a kyseliny sírové, při reakci mezi nimi se vytváří sraženina síranu barnatého, která při protřepání má vizuálně srovnatelný zákal s bakteriální suspenzí o známé koncentraci [102].

2.8.2 Molekulárně diagnostické metody

2.8.2.1 Purifikace DNA

Úvodní fáze každé molekulárně diagnostické metody spočívá v extrakci DNA z buněk a jejich oddělení od ostatních buněčných složek. Tato fáze metody rozhoduje o kvalitě izolovaného materiálu, a tedy i o úspěšnosti navazujících postupů. Tento proces je označen jako purifikace a jeho cílem je získání nukleové kyseliny v nativním stavu o přijatelném množství a čistotě. Metody purifikace DNA jsou založeny na využití rozdělenosti biologických makromolekul, absorpce na pevný povrch nebo ultracentrifugace v gradientních roztocích. Přestože existuje několik metod izolace nukleových kyselin, které jsou vybírány v závislosti na jejich následné analýze, mají společné základní rysy [103].

Jedním z prvních společných purifikačních kroků je lyze buněk a tkání. Základním požadavkem procesu je dostupnost vstupního biologického materiálu, jedná se o buď o kultury bakteriálních či eukaryotických buněk, které je nezbytné separovat od růstového média, obvykle centrifugací, nebo o komplexní vzorky tkání a pletiv, jež vyžadují homogenizaci před následnou lyzi buněk. Vyvoláním lyze buněčné stěny dojde k uvolnění vnitřního obsahu buněk, přičemž způsob uvedení lyze závisí na typu buněk. Bakteriální stěna buněk je rozrušena enzymem zvaným lysozymem. Spolu s lysozymem jsou používány také detergenty pro rozpouštění cytoplazmatické membrány a chelatační činidla, které destabilizují vnější bakteriální membránu a inhibují deoxyribonukleázy. Po rozrušení buněčné stěny a cytoplazmatické membrány vzniká komplexní směs DNA, RNA, proteinů, lipidů, sacharidů, nízkomolekulárních látek a uhlovodíků [103].

Další důležitou součástí izolace DNA je přidání předčišťovacích enzymů. Z purifikovaného DNA lze snadno odstínit RNA působením enzymu ribonukleázy. V opačném případě je proces obtížnější. Tento krok je možné vynechat, pokud kontaminace nukleové kyseliny není závadou při analýze nebo k jejich odstranění postačí následné purifikační kroky. Důležitým krokem při purifikaci DNA je odstranění proteinů z buněčných lyzátů, např. proteinázou K. Proteiny se odstraňují jednak kvůli možné degradaci nukleových kyselin, ale také protože některé proteiny se vážou na DNA a tím by mohly omezit účinnost celého experimentu [103].

2.8.2.2 Izolace DNA

Jedním z nejpoužívanějších metod odstranění proteinů z buněčných lyzátů je extrakce fenolem. Fenol je nemísitelný s vodou, z tohoto důvodu se vytváří dvě vrstvy po přidání do vodného prostředí buněčných lyzátů. Po promíchání směsi a následné centrifugaci se na mezifázovém rozhraní koncentrují vysrážené denaturované proteiny. Při použití fenolu, který je stabilizovaný neutrálním či alkalickým pufrům, DNA zůstává ve vodné fázi. Pokud je na extrakci využit kyselý fenol, DNA přechází do organické fáze a ve vodné fázi zůstává RNA, čehož se využívá při izolaci RNA [103].

Po extrakci je vodný roztok nukleových kyselin zbaven proteinů, avšak příliš naředěn a pravděpodobně obsahuje část fenolu, kvůli jeho určitému stupni rozpustnosti ve vodě. Proto je nutné převést nukleové kyseliny do menšího objemu a přečistit je srážením DNA alkoholem, např. ethanolem. Při srážení DNA v nízkých koncentracích je často snížena teplota a přidána sůl (např. 3M octan sodný) pro zvýšení účinnosti. Nukleové kyseliny se srážejí spolu s přídáním soli a ze sráženiny se odstraňují přidáním 70% ethanolu, který je následně odpařen. DNA je rozpuštěno obvykle ve vodném pufru Tris-HCl, inhibitoru nukleáz a EDTA, skladován při 4 °C [103].

2.8.2.3 Detekce a kvantifikace DNA

Spektrofotometrickým měřením absorbance při vlnové délce 270 nm lze odhadnout koncentraci DNA, pouze v případě že purifikovaná DNA je čistě bez látek, které absorbují ultrafialové záření. Stanovení je jednoduché, ale bohužel není příliš selektivní. Roztok DNA o koncentraci

50 µg/ml má absorpenci 1, hodnota se liší, pokud jsou v roztoku přítomny proteiny či fenol, který ruší měření [103].

2.8.2.4 Polymerová řetězová reakce

Polymerová řetězová reakce (zkráceně PCR) je enzymatická amplifikace specifických nebo genomických sekvencí DNA za pomoci primerů [104]. Technika PCR v molekulární biologii slouží k namnožení jedné nebo několika kopií části DNA v rozsahu několika řádů, tímto procesem vznikají tisíce až milióny kopií určité sekvence DNA [105]. Důležitou rysem PCR je experimentální charakter amplifikace. Základní princip PCR metody se opírá o vlastnosti semikonzervativní replikace DNA, která je provedena DNA polymerázou v prokaryotických a eukaryotických buňkách. Pro úspěšnou amplifikaci DNA touto technikou je nezbytné znát sekvenci koncových oblastí cílové DNA, ne které se mohou navázat dva krátké oligonukleotidy sloužící jako primery. K dosažení požadované amplifikace je nutné opakovat sérii cyklů, která zahrnuje tři kroky, a to denaturaci, annealing a elongaci primerů [104].

Denaturace je proces, při kterém jsou od sebe odděleny dvě vlákna DNA za pomoci zvyšování teploty. První krok procesu probíhá při tzv. denaturační teplotě, což odpovídá 94 °C. Při teplotě vyšší 80 °C vodíkové vazby mezi nukleovými kyselinami zanikají a veškeré enzymové procesy se zastavují, což má za následek denaturaci dvouvláknové matrice na jednovláknovou DNA [106].

V druhé fázi jsou primery ve formě krátkých jednovláknových sekvencí nukleových kyselin, obvykle se jedná o sekvence 20 až 30 nukleotidů. Tyto sekvence se používají ke charakteristickému spojení s výslednou nukleovou kyselinou. Proces probíhá při tzv. teplotě hybridizace primerů, která se pohybuje v rozmezí 40 °C a 70 °C po dobu 30–35 sekund.

Poslední třetí fáze elongace probíhá při teplotě 72 °C po dobu 30–35 s, a nazývá se elongační teplota. V této fázi jsou syntetizovány nová vlákna DNA, díky Taq polymeráze, která prodlužuje primery přidáním dNTP [107]. Tento cyklus se běžně opakuje 25–35krát, což většinou trvá 2–4 h podle délky kopírované DNA [104].

Aby bylo možné přesně kvantifikovat množství výchozí DNA, byla později vyvinuta metoda real-time PCR. Při real-time PCR se množství DNA monitoruje po každém amplifikačním cyklu pomocí fluorescenčních barviv, jejichž signál roste úměrně s množstvím vznikajícího PCR produktu, tzv. ampliconu. Data získaná v exponenciální fázi reakce poskytují kvantitativní informace o počátečním množství cílové DNA. Při real-time PCR se používají fluorescenční nosiče, jako barviva, která se vážou na dvoušroubovicovou DNA nebo molekuly barviv navázané na primery či sondy. V průběhu reakce se sleduje změna fluorescence pomocí přístroje, který kombinuje termální cyklování s detekcí fluorescenčního signálu. Výsledkem měření je vykreslení tzv. amplifikační křivky, tedy závislost fluorescence na počtu cyklů a znázorňuje akumulaci produktu v průběhu celé reakce [108].

2.8.3 Senzorická analýzy

Senzorická analýza představuje obor, který se systematicky věnuje vyvolávání a hodnocení smyslových vjemů potravin, jako jsou chuť, vůně, vzhled či textura, a jejich následné vědecké

interpretaci. Už řadu desetiletí je součástí procesu kontroly jakosti a bezpečnosti potravin. Analýza probíhá za podmínek, které jsou vhodné pro objektivní, přesné a reprodukovatelné měření. Její výzkum je prováděn zejména pro zrychlení získávání relativních informací za využití nízkých nákladů. Díky sensorické analýze lze přímo korigovat technologické fáze výroby potravin [109].

Pro provedení sensorické analýzy potravin je využíváno několik metod. Všechny metody jsou založeny na získání objektivních výsledků o zkoušených vzorcích ze subjektivních názorů hodnotitelů. Metody jsou vždy prováděny skupinou hodnotitelů a výsledky jsou statisticky zpracovány. Jedná se o normalizované metody, tedy jejich průběh a požadavky jsou určeny českými technickými normami ČSN. Metody sensorické analýzy lze rozdělit do tří základních skupin, a to rozlišování zkoušky, zkoušky používající stupnice a kategorie a popisné zkoušky [109].

3 CÍLE PRÁCE

V rámci bakalářské práce budou řešeny tyto dílčí úkoly:

- Vypracujte literární rešerši na téma rostlinné nápoje jako alternativy mléka, jejich charakteristika, technologie výroby, složení a výživové vlastnosti, mikrobiologický profil od vstupních surovin až po finální výrobek s ohledem na možný výskyt nežádoucích mikroorganismů, možnost obohacení těchto nápojů benefitními mikroorganismy, např. probiotiky, metody stanovení mikrobiálního profilu, včetně legislativních požadavků.
- Pomocí vybraných mikrobiologických a molekulárně diagnostických metod charakterizujte mikrobiologický profil modelových vzorků rostlinných analogů mléka bez a s přídavkem probiotické kultury.
- Proveďte senzorické zhodnocení vybraných rostlinných analogů mléka

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Vzorky

Vzorky použité pro experimentální účely jsou komerční výrobky volně prodávané v obchodních řetězcích. Pro účely analýzy byly zakoupeny vždy maximálně 24 hodin před provedením experimentu. Následně byly pro potřeby práce podle požadavků na metodu následně ředěny sterilní vodou nebo 0,85 % roztokem chloridu sodného na požadovanou koncentraci.

Jedná se o výrobky na bázi mandlí a kokosu. V případě výrobku na bázi mandlí byl využit mandlový nápoj (Nature's Promise Bio Mandlový nápoj) prodávaný v obchodním řetězci Albert. Dále byly pro analýzu využity konkrétně tři výrobky vyrobeny z kokosu, a to kokosový nápoj (Bio kokosový nápoj natur, 1 l) dostupný v prodejnách Dm drogerie, kondenzované kokosové mléko (Nature's Charm Kokosové mléko kondenzované slazené 200 g) a sušený kokosový nápoj (Topnatur kokosový nápoj 350 g) byly zakoupeny v prodejně Zdraví s chutí Brno.

Nature's Promise Bio Mandlový nápoj

Složení: pitná voda, mandle (2,3 %), stabilizátory: karubin, guma gellan; přírodní mandlové aroma, jedlá mořská sůl, emulgátor: lecitiny (slunečnicové). Může obsahovat stopy jiných skořápkových plodů [110].

Bio kokosový nápoj natur, 1 l

Složení: voda, 7,5% kokosová mouka částečně odtučněná, 6% kokosové mléko, mořská sůl, zahušťovadlo: guarová guma [111]

Nature's Charm Kokosové mléko kondenzované slazené 200 g

Složení: kokosové mléko (kokosový krém, filtrovaná voda) (59,0 %), třtinový cukr (40 %), stabilizátory: uhličitan vápenatý (0,8 %), guma guar, jedlá mořská sůl [112]

Topnatur kokosový nápoj 350 g

Složení: 85dextróza, kokosový tuk (29 %), sušený glukózový sirup, emulgátor: E472e (rostlinný původ), stabilizátor: fosforečnan draselný, aroma [113]

Mlékárna Kunín polotučné mléko 1,5 % 1 l

Složení: polotučné mléko

4.1.2 Chemikálie

- 96% ethanol pro UV (Penta, Chrudim, ČR)
- Destilovaná voda (FCH VUT Brno, ČR)
- Dodecylsulfát sodný – SDS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Fenol (Sigma, St. Louis, USA)
- Hydroxid sodný (Penta, Chrudim, ČR)

- Chlorid sodný (Penta, Chrudim, ČR)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová – EDTA (Sigma, St. Louis, USA)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
- Lysozym (Serva, Heidelberg, Německo)
- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- Proteináza K (100 µg/ml) (Sigma, St. Louis, USA)
- qPCR 2x SYTO 9 Master Mix (Top-Bio, Praha, ČR)
- složení: 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 (25°C), 40 mM (NH₄)₂SO₄, 5 mM MgCl₂, 400 µM dATP, 400 µM dCTP, 400 µM dGTP, 400 µM dTTP, Taq DNA polymeráza (50 U/ml), monoklonální protilátka anti-Taq, SYTO-9, stabilizátory a aditiva
- Směs chloroform-isoamylalkohol (24:1) - CIZ (Lachema, Brno, ČR)
- Trihydrát octanu sodného (Lachema, Brno, ČR)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan – Tris-báze (Serva, Heidelberg, Německo)

4.1.3 Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy Ohaus Pioneer (Ohaus, USA)
- Autokláv Vaposteri (BMT, Brno, ČR)
- BagMixer 400 W – homogenizátor typu stomacher (Interscience, Francie)
- Centrifuga MINI Spin 14 500 (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Densitometer DEN-1B (Biosan, Lotyšsko)
- DNA/RNA UV-dekontaminační box UVC/T-AR (Biosan, Lotyšsko)
- Eppendorfovy zkumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Fixed Speed Vortex Mixer (Ohaus, Nänikon, Švýcarsko)
- Komerční kit pro izolaci DNA NucleoSpin® Food (Macherey-Nagel)
- KS 3000 i control, inkubátor s orbitální třepačkou (IKA, Německo)
- Laboratorní sklo a další standardní laboratorní vybavení (kahan, baňky, rukavice atd.)
- Laboratorní váha Ohaus Scout (Ohaus, USA)
- Magnetická míchačka M2-A analogová (Argolab, Itálie)
- Membránová vývěva N 86 KN.18 (KNF, Německo)
- Mikropipety a plastové špičky
- Mini Microbiology and Hematology Incubator (Labnet International)
- Minicentrifuga Combi-Spin FVL-2400 N (Biosan, Lotyšsko)
- NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer (ThermoFischer Scientific)
- Očkovací hokejky
- Petriho misky
- Stripy (Novas Bio, USA)
- Thermocycler Rotor-Gene 6000 (Corbett Research UK Ltd, Cambridge, United Kingdom)

4.1.4 Kultivační media

Nutrient Agar w/ 1% Peptone – MPA (HiMedia Laboratories, Německo)

Složení: masový pepton (10 g/l), hovězí extrakt (5 g/l), chlorid sodný (5 g/l), agar (15 g/l)

Malt Extrakt Broth Base – SA (HiMedia Laboratories, Německo)

Složení: sladový extrakt (17 g/l), mykologický pepton (3 g/l) + agar (15 g/l)

Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar – DRBC (HiMedia Laboratories, Německo)

Složení: pepton (5 g/l), dextróza (10 g/l), dihydrogenfosforečnan draselný (1 g/l), síran hořečnatý (0,5 g/l), barvivo rose bengal (0,025 g/l), chloramfenikol (0,1 g/l), dichloran (0,002 g/l), agar (15 g/l)

Potato Dextrose Agar w/Chloramphenicol – PDA (HiMedia Laboratories, Německo)

Složení: brambory (200 g/l), dextrosa (20 g/l), agar (15 g/l), chloramfenikol (0,05 g/l)

Endo Agar (HiMedia Laboratories, Německo)

Složení: masový pepton (10 g/l), laktosa (10 g/l), siřičitan sodný (2,5 g/l), hydrogenfosforečnan didraselný (3,5 g/l), basický fuchsin (0,5 g/l), agar (15 g/l)

Lactobacillus MRS Broth, Granulated – MRS (MRS Broth, Granulated)

Složení: masový pepton (10 g/l), hovězí extrakt (10 g/l), kvasný extrakt (5 g/l), glukosa (20 g/l), polysorbát 80 (1 g/l), citran amonný (2 g/l), octan sodný (5 g/l), heptahydrát síranu hořečnatého (0,1 g/l), tetrahydrát síranu manganatého (0,05 g/l), hydrogenfosforečnan didraselný (2 g/l) + agar (15 g/l)

Nutrient Broth w/ 1% Peptone – MPB (HiMedia Laboratories, Německo)

Složení: masový pepton (10 g/l), hovězí extrakt (10 g/l), chlorid sodný (5 g/l)

4.1.5 Pozitivní kontroly

Sbírkové kmeny byly poskytnuty následujícími institucemi: Zbiirkou kultur kvasiniek při Chemickém ústavu Slovenské akademie věd v Bratislavě (CCY), Sbírkou mlékařských mikroorganismů Laktoflora (CCDM) a Sbírkou kultur hub Univerzity Karlovy v Praze (CCF).

- *Bifidobacterium animalis* CCM 4988
- *Lactobacillus delbueckii* CCDM 125
- *Saccharomyces cerevisiae* CCY 101

4.1.6 Použité primery

Primery použité pro PCR amplifikace jsou uvedeny v Tab. 1. Všechny byly syntetizovány společností Generi Biotech, Hradec Králové.

Tab. 1: Použité primery

	primery	sekvence 5' – 3'	velikost produktu PCR [bp]	zdroj
doména <i>Bacteria</i>	F_eub R_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	466	[114]
rod <i>Lactobacillus</i>	LbLMa 1rev R16-1	CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA	250	[115]
celkové kvasinky	Oli_F Oli_R	CGT CAT AGA GGG TGA GAA TCC ACT TGT TCG CTA TCG GTC TC	152	[116]

4.2 Metody

Všechny postupy byly převzaty s dílčími úpravami z literatury „Metody molekulární biotechnologie pro řešitele BP a DP“ od Ing. Štěpánky Trachtové, Ph.D.

4.2.1 Kultivační vyšetření

4.2.1.1 Stanovení CPM technikou roztěru

Podle pokynů výrobce byly připraveno šest různých pevných živných medií: masopeptonový agar (MPA), sladivový agar (SA), de Mann, Rogosa a Sharp (MRS), bramboro-dextrosový agar (PDA), chloramfenikolový agar s dichloranem a bengálskou červení (DRBC) a Endův agar.

MPA je živná půda určena ke kultivaci široké škály mikroorganismů. SA je určen na stanovení plísní a kvasinek, převážně pro testování sterility výrobku. Stejně jako u sladivového agaru i PDA půda je určená pro kultivaci kvasinek a plísní v potravinářských výrobku, ale PDA půda je určena pro kultivaci těchto mikroorganismů z nápojů. DRBC medium díky svému složení zpomaluje růst rychle rostoucích plísní, což umožňuje detekci pomalu rostoucích plísní. Na MRS mediu lze kultivací detekovat přítomnost rod *Lactobacillus*. Endo agar je určen pro izolaci a kultivaci koliformních mikroorganismů [117]. Pevné živné půdy byly připraveny podle pokynů výrobce a sterilovány v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Poté byl asepticky rozlity do Petriho misek.

Vyšetření rostlinných alternativ mléka bylo provedeno podle normy ČSN EN ISO 4833-2 [118]. Vzorky mandlového nápoje, kokosového nápoje, kondenzovaného kokosového mléka a sušeného kokosového nápoje byly naředěny metodou desítkového ředění na ředění 10^{-1} , 10^{-2} a 10^{-3} . Sušené kokosové mléko bylo před použitím připraveno podle pokynů výrobce. Zředěné vzorky byly naočkovány na Petriho misky a rozetřeny. Kultivace mikroorganismů na MPA, MRS a Endo agaru probíhala při 37 °C po dobu 24 hodin, na SA, PDA a DRBC při 25 °C po dobu 5 dnů. Po kultivaci byly Petriho misky vyfoceny a spočítány kolonie.

4.2.1.2 Technika nejvyššího pravděpodobného počtu

Podle pokynů výrobce na obalu byla připravena tekutá živná půda Nutrient Broth w/ 1% Peptone do zkumavek. Zkumavky s bujonem byl sterilovány při 121 °C po dobu 15 minut.

Stanovení bylo provedeno podle normy ČSN ISO 7251 [101]. Vzorky rostlinných alternativ mléka byly zředěny na 10^{-1} a 10^{-2} . Zkumavky s bujonem byly zaočkovány 1 ml čistého nebo zředěného vzorku a následně kultivován při 37 °C po dobu 48 hodin.

4.2.1.3 Přídavek probiotik do výrobku

Podle pokynů výrobce bylo připraveno tekuté médium de Man – Rogosa – Sharpe (MRS), které je určené pro kultivaci laktobacilů [117]. Medium bylo sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Do dvou různých nádob se sterilním tekutým živným médiem byli zaočkováni dva různé mikroorganismy, a to *Lactobacillus acidophilus* (CCDM 476) a *Lactobacillus casei* (CCM 4711). Buňky byly kultivovány při 37 °C po dobu 48 hodin. Narostlé kultury byly skladovány v chladícím boxu při 4 °C.

Růstové křivky *Lactobacillus casei* (CCM 4711) byla měřena v prostředí mandlového nápoje a bujónu jako prostředí pro optimální růst. Vzorek mandlového mléka byl metodou desítkového ředění naředěn 0,85 % roztokem chloridu sodného na zředění 10^{-2} . Před očkovaním byla změřena koncentrace použité inokula. Do 9 ml bujónu a mandlového nápoje zředěného 10^{-2} byl napipetován 1 ml kultury *Lactobacillus casei* (CCM 4711) starou maximálně 24 hodin. Zaočkované zkumavky byly kultivovány při 37 °C po dobu 27 hodin. Růstová křivka byla měřena po dobu 8,5 hodin, v prvních 5 hodinách každých 30 minut poté každou hodinu. Po uplynulé době měření byla 11,5hodinová mezera, následně bylo opět měřeno další 7 hodin, každých 30 minut. Měření bylo provedeno pro dvě paralelní zkumavky zaočkované kulturou *Lactobacillus casei* (CCM 4711) o stejné koncentraci.

Dále byla zkoumána živostnost *Lactobacillus casei* (CCM 4711) po dobu 7 dnů ve vzorku mandlového nápoje. Podle pokynů výrobce byla připravena živné půdě MRS, která byla sterilizována po dobu 15 minut při 121 °C. Do 9 ml čistého mandlového mléka, byl napipetován 1 ml kultury o koncentraci $2,28 \cdot 10^9$ KTJ/ml a vzorky byly kultivovány v chodícím bodu při 4 °C nebo při laboratorní teplotě. Po 24 hodinách, 5 dnech a 7 dnech kultivace byl vzorek zředěn na ředění 10^{-2} . Zředěný vzorek byl naočkován na Petriho misky a rozetřen. Kultura *Lactobacillus casei* (CCM 4711) byly kultivována na MRS mediu po dobu 24 hodin při 37 °C. Narostlé kolonie byl spočítány a přepočítány na KTJ/ml.

4.2.2 Izolace DNA

4.2.2.1 Izolace komerčním kitem NucleoSpin® Food

Izolace DNA byla provedena komerčním kitem NucleoSpin® Food dle pokynů výrobce přímo z potravin.

4.2.3 Stanovení koncentrace a čistoty DNA

U DNA vyizolovaného kometčním kitem NucleoSpin® Food byla měřena koncentrace a čistota pomocí přístroje NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer.

Nejprve byl přístroj kalibrován na elučním pufrem CE pro vzorky izolované komerčním kitem. Byla proměřena absorbance při 230 nm, 260 nm a 280 nm, hodnoty byly zaznamenány. Na měření byl použit objem roztoku DNA 2 μ l. Přístroj byl po každém měření promyt nanesením sterilní destilované vody na podstavec a ořen buničinou.

4.2.4 Polymerová řetězová reakce v reálném čase

Polymerovou řetězovou reakcí v reálném čase byla zjišťována přítomnost domény *Bacteria*, rodu *Lactobacillus* a celkových kvasinek.

Stanovení bylo provedeno na přístroji RotorGene™ 6000. Komponenty pro PCR reakci byli před použitím promíchány a krátce zcentrifugovány. PCR směs byla připravena (dle Tab. 2) do 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky, následně byla rozpipetována po 24 ml do 200 μ l sterilních Eppendorfovy zkumavek v chlazeném bloku. Poté byl do každé ze zkumavek přidán 1 ml izolovaného DNA nebo pozitivní kontrola. Negativní kontrola byla připravena z PCR směsi bez DNA matrice.

Tab. 2: Složení PCR směsi pro stanovení bakterii, laktobacilů i kvasinek

PCR komponenta	Objem v PCR směsi [μ l]
PCR voda	9,5
qPCR 2x SYTO 9 Master Mix	12,5
foward primer (10 pmol/ μ l)	1
reverse primer (10 pmol/ μ l)	1
DNA matrice	1

Vzorky byly umístěny do přístroje Rotor-Gene™ 6000, který pracuje podle nastaveného programu odpovídajícího použitým primerům. Výsledky PCR v reálném čase byly zpracovány pomocí programu (viz Tab. 3) pro Rotor-Gene™ 6000 na základě kalibrační křivky z purifikované DNA.

Tab. 3: Teplotní programy pro PCR v reálném čase

krok qPCR	doména <i>Bacteria</i>	celkové kvasinky (a)	celkové kvasinky (b)	celkové plísň	<i>Geotrichum candidum</i>	rod <i>Candida</i>	rod <i>Brevi- bacterium</i>
1 denaturace před prvním cyklem	95 °C/5'	94 °C/5'	94 °C/5'	95 °C/5'	95 °C/5'	95 °C/10'	95 °C/5'
2 denaturace	95 °C/30"	94 °C/30"	94 °C/20"	95 °C/30"	95 °C/30"	95 °C/30"	92 °C/30"
3 připojení primerů	55 °C/30"	51 °C/30"	55 °C/20"	60 °C/30"	60 °C/30"	58 °C/30"	57 °C/60"
4 syntéza DNA	72 °C/60"	72 °C/60"	72 °C/20"	72 °C/30"	72 °C/30"	72 °C/30"	72 °C/60"
5 prodloužení syntézy	72 °C/ 5'	72 °C/5'	72 °C/3'	72 °C/8'	72 °C/8'	72 °C/7'	72 °C/10'
6 melt analýza	nárůst teploty z 50 °C na 99 °C (zvyšování teploty po 1 °C)						
počet cyklů (krok 2–4)	30	30	40	35	35	30	35

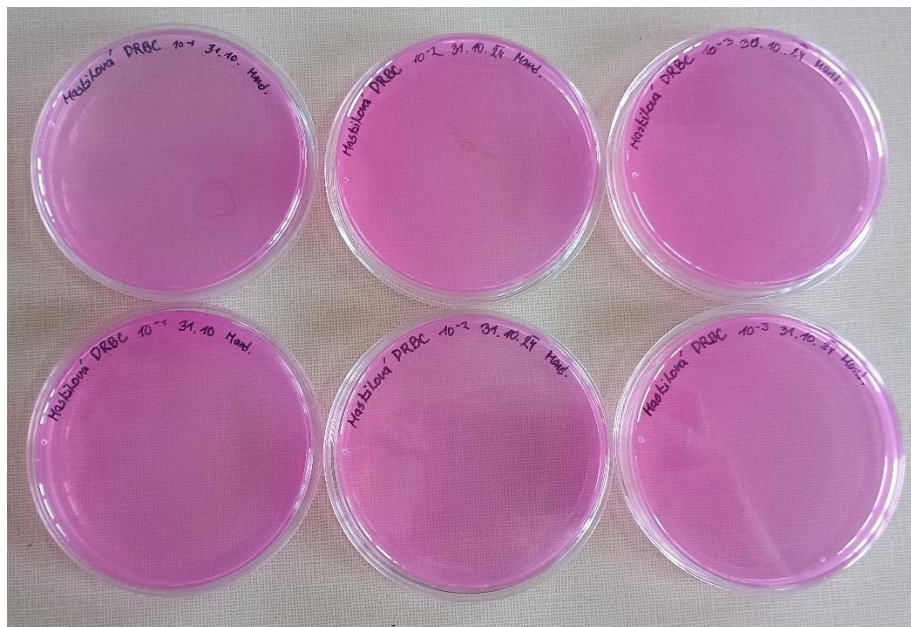
4.2.5 Senzorická analýza

Byl vytvořen dotazník sensorické analýzy obsahující kategorie hodnocení vzhledu, vůně, konzistence a chuti. Vzorky pro sensorické hodnocení byly připraveny dle postupu od výrobce a servírovány v plastových kelímcích označených kódem výrobku. Hodnotitelé byli usazeni do boxu a spolu s vzorky a dotazníkem jim byla podána voda. Výsledky ze sensorické analýzy byla statisticky vyhodnoceny v programu Excel.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Kultivační vyšetření

Stanovení dle normy ČSN EN ISO 4833-2 není vhodné pro tento druh výrobků, kvůli jejich nízké mikrobiologické aktivitě. Výrobky jsou často tepelně ošetřeny a tím dochází k inhibici mikroorganismů ve výrobcích. Při stanovení nedošlo po kultivaci k nárustu kolonií pro žádné zvolené ředění u zvolených výrobků (viz Obr. 1).



Obr. 1: Kultivační vyšetření vzorku mandlového nápoje dle normy ČSN EN ISO 4833-2

Kultivační vyšetření potvrdilo, že testované produkty splňují mikrobiologickou kvalitu.

5.1.1 Metoda nejvyššího pravděpodobného počtu

Dle normy ČSN ISO 4831 byla potvrzena přítomnost mikroorganismů ve výrobcích a ze statistických tabulek byla podle pozitivních zkumavek zjištěna nejvyšší pravděpodobnost počtu mikroorganismů v 100 ml vzorku (viz Tab. 4).

Tabulka 4: MPN index s 95 % konfidenčním intervalem pro vzorky dle normy ČSN ISO 4831

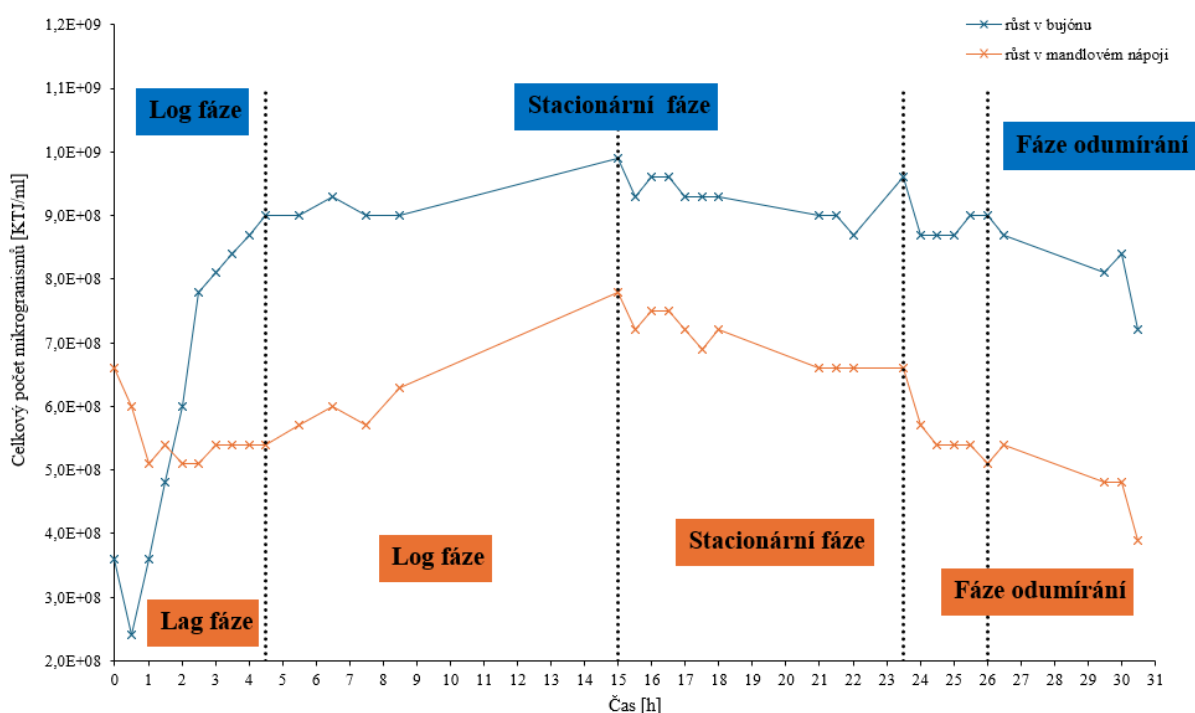
Vzorek	Počet zkumavek s pozitivní reakcí			MPN index pro 100 ml
	3 nezředěné vzorky	3 vzorky 10 x zředěné	3 vzorky 100x zředěné	
mandlový nápoj	3	2	1	150
kokosový nápoj	3	2	2	210
kondenzované kokosové mléko	2	2	1	28
sušený kokosový nápoj	2	2	0	21

Ve všech analyzovaných vzorcích byla stanovena celková mikrobiální aktivita, bez určení přítomnosti konkrétních mikrobiálních rodů. Po kultivaci byl v MPB bujónu přítomný viditelný zákal. Charakteristika zákalu byla závislá na použitém zředění výrobku. Při použití nezředěného výrobku byl zákal přítomný téměř v celém objemu bujónu, sediment buněk byl nahromaděn převážně u hladiny, což potvrzuje přítomnost aerobních mikroorganismů ve výrobku. U nižších zředění byl zákal slabší až téměř nepřítomný. Buňky mikroorganismů tvořily u zředění 10^{-1} stejně jako u nezředěného výrobku vrstvu na hladině bujónu naopak u nejnižšího zředění, tedy 10^{-2} byl sediment buněk přítomný spíše ve střední části nebo na dně zkumavky.

5.1.2 Přídavek probiotik do výrobků

Po kultivaci mikroorganismů v MRS mediu byl pozorován ztuhlý zákal média u kultury *Lactobacillus casei* (CCM 4711), která byla dále využita jako probiotikum přidané do vzorku mandlového mléka. Růstové křivky byly měřeny v závislosti času na celkovém počtu mikroorganismů v ml vzorku (viz Obr. 2). Naměřené hodnoty zákalu byly pomocí standardů McFarlanda přepočítány na celkový počet mikroorganismů v jednotkách KTJ/ml.

Z optimální růstové křivky *Lactobacillus casei* (CCM 4711) v MPB bujónu lze identifikovat základní fáze růstu mikroorganismu. V tomto případě je lag fáze neboli klidová fáze růstu nepřítomna a hned po naočkování nastává log fáze, tedy exponenciální část nárůstu počtu buněk. Log fáze přetrvává od 5,5 hodiny do 26 hodiny měření, poté nastává fáze odumírání buněk. Naměřená růstová křivka *Lactobacillus casei* (CCM 4711) v zředěném mandlovém mléce má všechny fáze růstu oproti optimálnímu rostu. V 4,5 hodině měření nastává konec klidové fáze a počet buněk exponenciálně roste po dobu 9,5 hodin. Následuje stacionární fáze, při které dochází k menším poklesům počtu buněk až do 23,5 hodiny měření, kdy značně počet buněk významně klesat.



Obr 2: Růstová křivka *Lactobacillus casei* (CCM 4711) v prostředí mandlovém nápoji a MPB bujónu

Inokulum použité na zaočkování měl koncentraci $2,28 \cdot 10^9$ KTJ/ml. Naměřená křivka *L. casei* v případě použití bujónu jako prostředí, vykazuje vyšší koncentraci mikroorganismů po celou dobu měření. Ačkoliv růstová křivka v mandlovém nápoji vykazovala všechny fáze růstu jako modelové prostředí, je zřejmé, že podmínky v mandlovém nápoji nejsou pro růst ideální. Po naočkování dochází k poklesu počtu buněk a následný nárůst je jen mírný. Přídavek probiotik je možný, při použití neředěného mandlového nápoje, který je obohacen o esenciální živiny podporující růst.

Dále byla kontrolována životaschopnost *Lactobacillus casei* v mandlovém nápoji po dobu 7 dnů. Dle výsledku (viz Tab. 5) je znatelné že rod *Lactobacillus* je přirozenou součástí mikrobiomu výrobku i bez umělého přídavku. S postupem času je pokles buněk ve výrobku znatelný a dá se tedy předpokládat pokles mikroorganismů až na úplné minimum, při delším skladování. Při porovnání způsobu skladování je znatelné že k většímu poklesu množství buněk dochází při skladování za laboratorní teploty. Při skladování v chladu je podle výsledků růst probiotik zpomalen a pokles koncentrace buněk je nižší. Díky nižšímu poklesu je možné dodat výrobku benefity, které tyto mikroorganismy přinášejí. Dle výsledků lze říct že nižší teplota má vliv na růst mikroorganismů a je tedy důležité dbát na pokyny výrobce.

Tab. 5: Výsledky stanovené životnosti *Lactobacillus casei* (CCM 4711) při různých skladovacích podmínkách

skladování	přídavek probiotik	chladicí box	laboratorní teplota
		CPM [KTJ/ml]	CPM [KTJ/ml]
24 hodin	ne	$1,20 \cdot 10^4$	$4,05 \cdot 10^3$
	ano	$1,82 \cdot 10^5$ $1,94 \cdot 10^5$	$1,82 \cdot 10^5$ $1,69 \cdot 10^5$
5 dnů	ne	$1,15 \cdot 10^2$	$2,41 \cdot 10^3$
	ano	$1,41 \cdot 10^5$ $1,58 \cdot 10^5$	$1,05 \cdot 10^5$ $9,18 \cdot 10^4$
7 dnů	ne	$6,91 \cdot 10^1$	$4,34 \cdot 10^2$
	ano	$1,08 \cdot 10^5$ $8,70 \cdot 10^4$	$6,96 \cdot 10^4$ $6,06 \cdot 10^4$

5.2 Molekulárně diagnostické metody

Pro doplnění mikrobiologického profilu ke kultivačnímu stanovení byly použity metody molekulárně diagnostické, konkrétně polymerová řetězová reakce v reálném čase. Ze všech vzorků byla izolována DNA a následně spektrofotometricky ověřena čistota a koncentrace této DNA. Řetězovou polymerovou reakcí v reálném čase byla sledována přítomnost domény *Bacteria*, celkových kvasinek a rodu *Lactobacillus*.

5.2.1 Izolace DNA a měření její koncentrace a čistoty

V první fázi molekulárně diagnostické metody byla DNA izolována komerčním kitem přímo z testovaných nápojů rostlinného charakteru. Získaný roztok obsahující DNA byl proměřen

spektrofotometricky na přístroji Nanodrop. V Tab. 6 lze vidět naměřené průměrné koncentrace a průměrné absorbance při vlnové délce 260 nm a 280 nm pro jednotlivé vzorky.

Tab. 6: Naměřené koncentrace a poměry absorbancí izolované DNA ve vzorcích

použité vzorek	izolace komerčním kitem		
	kód	<i>c</i> DNA [ng/μl]	<i>A</i> 260/280 [-]
kokosový nápoj	1.1	13,8	1,42
	1.2	13,1	1,46
mandlový nápoj	2.1	37,8	1,99
	2.2	13,8	1,97
kondenzovaný kokosový nápoj	3.1	174,6	1,44
	3.2	91,8	1,40
sušená kokosový nápoj	4.1	13,2	1,76
	4.2	10,2	1,40
mandlový nápoj s probiotiky	5.1	108,4	2,00
	5.2	60,9	2,02

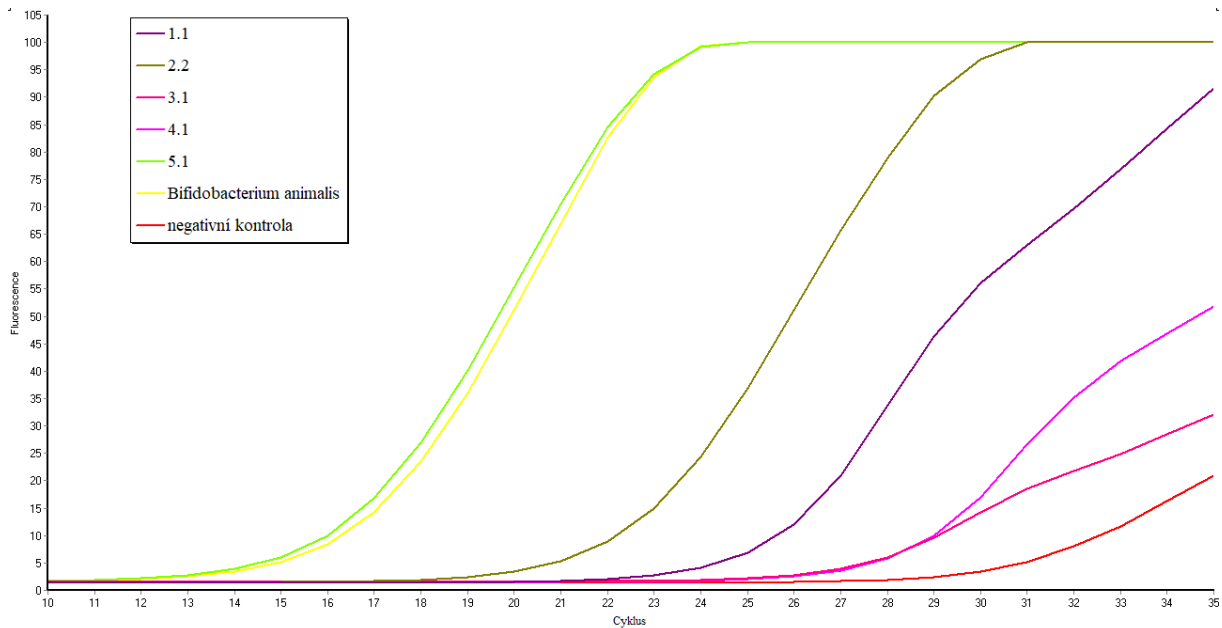
Z výsledku poměru absorbancí 260 nm a 280 nm lze zjistit že vzorky izolované komerčním kitem obsahují nečistoty. Kontaminace může být způsobena přítomností proteinů ve vzorcích.

5.2.2 Řetězová polymerová reakce v čase

Řetězová polymerová reakce v reálném čase byla provedena za účelem stanovit přítomnost domény *Bacteria*, celkových kvasinek a rodu *Lactobacillus* ve vzorcích.

Doména Bacteria

Pro stanovení domény *Bacteria* ve vzorcích byla použita dvojice primerů – primery F_eub a R_eub [114]. Jako pozitivní kontrola byl použit mikroorganismus *Bifidobacterium animalis* (CCM 4988). Amplifikace byla provedena pro všechny vzorky o koncentraci DNA 10 ng/μl. Doména *Bacteria* byla potvrzena ve vzorcích mandlového nápoje s a bez probiotika, izolovaných komerčním kitem (viz Obr. 3).



Obr. 3: Amplifikační křivky vybraných vzorků izolovaných komerčním kitem, qPCR na doménu Bacteria

V případě vzorků izolovaných komerčním kitem nebyla potvrzena přítomnost domény *Bacteria* u kondenzovaného kokosového mléka, kokosového a sušeného kokosového nápoje. Největší koncentrace bakterií byla identifikována v mandlové mléce obohaceném probiotiky. Amplifikační křivka byla srovnatelná s pozitivní kontrolou a lze tedy s jistotou potvrdit přítomnost bakterií ve vzorku. Mandlový nápoj vykázala nejvyšší koncentraci, hned po probiotickém mandlovém nápoji, oproti ostatním výrobkům, což nesouhlasí s kultivačním vyšetřením, které stanovilo největší přítomnost mikroorganismů u kokosového nápoje.

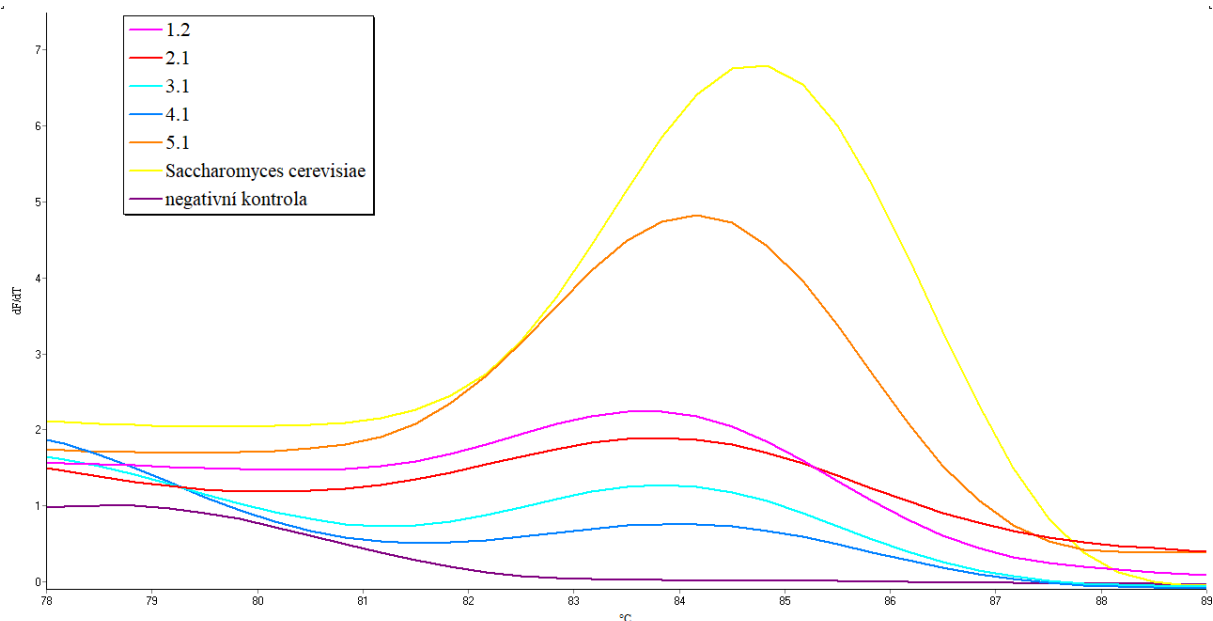
Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* byl stanoven za pomoci primeru LbLMA 1rev a R16-1 [115]. Tyto primery jsou určeny pro obecné stanovení laktobacilů. Jako pozitivní kontrola byl použit mikroorganismus *Lactobacillus delbrueckii* (CCDM 125). Opět byla provedena amplifikace pro všechny vzorky izolované komerčním kitem.

V obou případech izolace byly amplifikační křivky všech vzorků negativní a nebyla potvrzena přítomnost rodu *Lactobacillus*. K nárustu křivky nedošlo ani v případě vzorku obohacených o probiotika izolovaných komerčním kitem. Důvod neidentifikování rodu *Lactobacillus* v tomto vzorku může být způsoben nízkým množstvím probiotik ve výroku či nekompatibilitou primeru s *Lactobacillus casei*. U ostatních vzorků je kultivační metodou potvrzena přítomnost rodu *Lactobacillus*, avšak v nízkých koncentracích, které nemuseli být detekovány při měření.

Celkové kvasinky

Celkové kvasinky byly stanoveny za použití primeru – Oli_F a Oli_R [116]. Pro porovnání výsledků byl použit mikroorganismus *Saccharomyces cerevisiae* (CCY 101) jako pozitivní kontrola. U všech vzorků izolačních komerčním kitem nebyly amplifikační křivky pozitivní, a tedy přítomnost kvasinek byla potvrzena pouze v některých výrobcích.



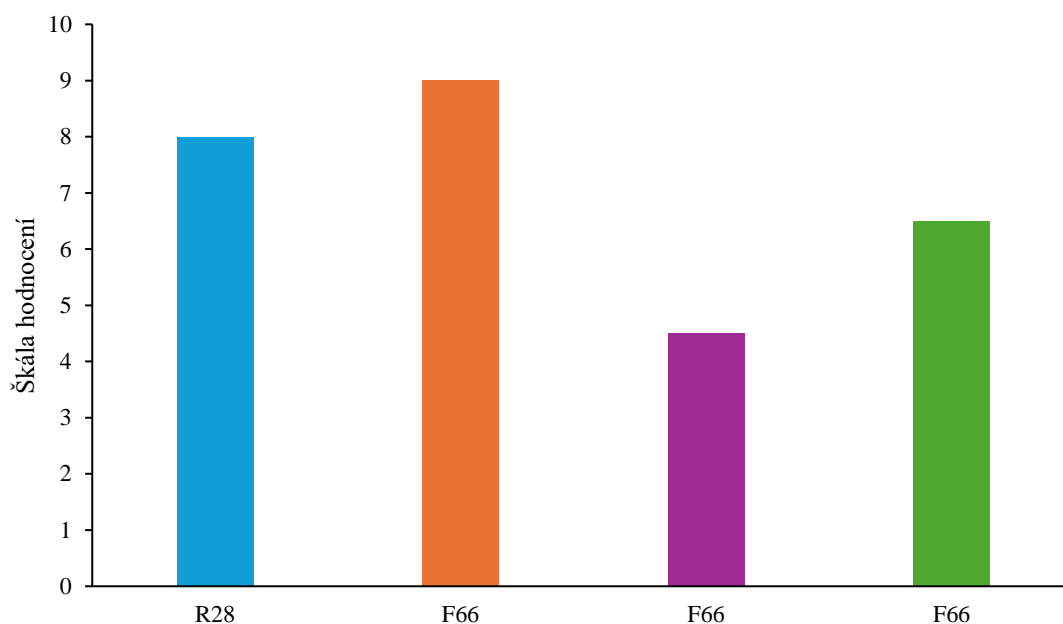
Obr. 4: Křivky tání produktů qPCR vybraných vzorků izolovaných komerčním kitem

Všechny vzorky izolované komerčním kitem byl pozitivní na přítomnost kvasinek. Největší nárůst byl pozorován u vzorku mandlového mléka obohaceného o probiotika. Menší nárůst byl pozorován i u vzorků mandlového a kokosového nápoje, u vzorku kondenzovaného a sušeného kokosového nápoje byla přítomnost kvasinek minimální.

5.3 Senzorická analýza

Senzorická analýza byla provedena za pomoci dotazníku. Dotazník obsahoval pět hlavních kategorií hodnocení, a to vzhled, textura, vůně, chuť a celkový dojem výrobku. Hodnotitelé hodnotily čtyři výrobky na základě preferencí na škále od 1 (nevyhovující) do 10 (ideální). Hodnoceny byly tyto výrobky: kokosový nápoj (R28), kravské mléko (F66), mandlový nápoj (G73) a sušený kokosový nápoj (K41). Analýzy se zúčastnilo celkem 20 hodnotitelů, z nichž 15 byly ženy a 5 byly muži, všichni kromě dvou starších 51 let, ve věku 21 až 30 let. Pravidelní konzumenti rostlinných alternativ mléka byly pouze 2 hodnotitelé a 3 aktivní kuřáci. Ze zúčastněných hodnotitelů bylo pouze 8 osob, kteří neměli nikdy zkušenost se sensorickou analýzou.

Výsledky z dotazníku byly statisticky zhodnoceny. Z výsledků vyplývá že základě vzhledu a celkové chuti je nejlépe přijímán vzorek F66, tedy kravské mléko. Vzorek G73 je naopak v kategorii celkové chuti přijímán nejhůře, avšak v kategorii vzhledu je druhý nejoblíbenější po vzorku F66. Obecně nejhůře je přijímán vzorek G73, který v kategorii chuti má nejnižší hodnoty ze všech vzorků, jak u sladkosti, tak kyselosti. Několik hodnotitelů přirovnávalo v poznámkách chuť vzorku k vodě. Vzorek R28 byl ve všech hodnocených kategoriích považovaný za nadprůměrný, kromě barvy a kyselosti výrobku, kde obdržel nejnižší hodnoty ze všech testovaných vzorků. Druhým nejhůře přijatým vzorkem byl K41. Vzorek byl neoblíbený hlavně kvůli přítomnosti usazeniny. Na druhou stranu vzorek K41 obdržel nejvyšší hodnoty v kategorii vůně.



Obr. 5: Výsledek senzoričského hodnocení pro kategorii celkového dojmu

Dle výsledků (viz Obr. 5) lze říct že kravské mléko bylo ve většině kategorií přijímáno hodnotiteli nejlépe než jeho rostlinné alternativy. Z rostlinných náhrad mléka byl nejlépe přijímán kokosový nápoj.

5.4 Shrnutí výsledků

Vzorky použité pro výzkum v této práci byly volně dostupné výrobky zakoupené v obchodních řetězcích. Jednalo se o mandlový nápoj, kokosový nápoj, kondenzované kokosové mléko a sušený kokosový nápoj. Cílem práce bylo stanovit mikroflóru výrobku za pomoci úročených metod a výsledky mezi sebou porovnat. Dále bylo součástí práce přidat do jednoho z výrobků vybrané probiotikum a pozorovat jeho životaschopnost. Nakonec byly všechny testované výrobky podrobeny senzoričské analýze pro zjištění přijatelnosti mezi spotřebiteli.

V první části byl mikroflóra vybraných výrobků testována kultivačními metodami. Nejdříve byla použita horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů, konkrétně na stanovení celkového počtu mikroorganismů, koliformních bakterií, laktobacilů, kvasinek a plísní na specifických živných půdách. Výsledky kultivačního vyšetření ukazují, že žádný z testovaných nápojů není kontaminován mikroorganismy. Výrobky tedy splňují podmínky pro konzumaci, a tedy prodej v obchodní síti. Metodou nejvyššího pravděpodobného počtu byla potvrzena předpokládaná přítomnost mikroorganismů ve výrobcích za pomoci statistických tabulek. Nejvyšší index MPN byl pozorován u vzorku kokosového a mandlového nápoje.

V další fázi experimentální části byl do výrobku, konkrétně mandlového nápoje, přidán benefitující mikroorganismus a pozorována jeho životaschopnost. Měřením růstové křivky v zředěném mandlovém mléce byly pozorovány jednotlivé fáze životního cyklu přidaného kmene *Lactobacillus casei* (CCM 4711). Růst v mandlovém mléce byl srovnán s ideální růstovou křivkou naměřenou v prostředí bujónu. Z výsledků lze pozorovat že koncentrace *Lactobacillus casei* je v prostředí zředěného mandlového nápoje zřetelně nižší po celou dobu cyklu. Ačkoliv při růstu dosáhla křivka měřená v prostředí mandlového nápoje všech fází za

stejnou dobu jako v modelovém případě je znatelné, že prostředí není ideální pro růst. Při naočkování pochází k poklesu počtu buněk a nárůst není příliš znatelný. Přídavek mikroorganismů probiotického charakteru je možný v případě nezředěného mandlového nápoje obohaceného o důležité živiny pro růst.

U přídavku probiotik bylo dále sledován jejich úbytek po dobu 7 dnů při rozdílných skladovacích podmínkách. Podle očekávání nižší teplota zpomalila pokles buněk mikroorganismů, které má význam při delší skladovací době.

Ve třetí části byla za pomoci molekulárně diagnostických metod sledována mikroflóra výrobků a porovnána s výsledky z kultivačního stanovení. Nejdříve bylo izolováno DNA ze vzorků komerčním kitem a následně byla měřena jeho koncentrace a čistota ve vzniklém roztoku. Přístrojem Nanodrop bylo zjištěno že vzorky izolované komerčním kitem, protože je výrobce doporučován pro izolaci genomové DNA z potravin vykazovali vyšší míru znečištění proteiny.

Metodou qPCR byla analyzován přítomnost domény *Bacteria*, rodu *Lactobacillus* a celkových kvasinek ve výrobcích. Domény *Bacteria* byla prokázána ve všech vzorcích kromě sušeného kokosového nápoje. Největší nárůst amplifikační křivky byl zaznamenán u mandlového nápoje s a bez probiotika. Přítomnost rodu *Lactobacillus* byl negativní ve všech analyzovaných výrobcích. Z kapitoly přídavek probiotik, víme že jsou laktobacily součástí mikroflóry výrobku, což znamená že výsledek může být ovlivněn nízkým množstvím probiotik ve výroku či nekompatibilitou primeru s *Lactobacillus casei* v nápoji s probiotikem. Poslední stanovení bylo provedeno na přítomnost celkových kvasinek ve výrobcích. Všechny vzorky izolované komerčním kitem byly pozitivní na celkové kvasinky. Nejvyšší amplifikaci vykazoval opět vzorek mandlového nápoje s probiotiky.

Nakonec byla za pomoci senzorické analýzy prozkoumána oblíbenost rostlinných alternativ mléka mezi spotřebitelé. Dle výsledků byl určena jako nejlépe přijímaný výrobek kravské mléko téměř ve všech kategoriích. Z rostlinných náhražek vyšel nejlépe kokosový nápoj, který byl kladně hodnocen převážně v kategoriích vůně a textury.

6 ZÁVĚR

V teoretické části této práce byly práce byly popsány rostlinné alternativy jako alternativy mléka, jejich charakteristika a základní vlastnosti, jako složení a výživová hodnota. Dále byl popsán celý proces technologické výroby a možná přítomnost žádoucích i nežádoucích mikroorganismů. Součástí kapitoly věnované mikrobiomu výrobku byla také úvaha o možnosti obohacení nápojů prospěšnými mikroorganismy a o tom, jaký vliv by takové obohacení mohlo mít na vlastnosti a kvalitu finálního produktu. Konec teoretické části pojednává o legislativních požadavcích na mikrobiální nezávadnost těchto výrobků.

V experimentální části byl zkoumán mikrobiom rostlinných alternativních nápojů různými metodami. Komerční výrobky zakoupené v obchodních řetězcích byly nedřívě kultivačně vyšetřeny.

Do mandlového nápoje byl přidán *Lactobacillus casei* jako obohacující mikroorganismus. Podle předpokladů byla růstová křivka *Lactobacillus casei* v mandlovém nápoji oproti ideálnímu prostředí v bujónu nevyhovující. Pro stálé udržení standardní koncentrace probiotika v nápoji je nutné omezit ředění a případně obohatit výrobek o živiny. Stejně tak je důležité skladovat výrobky v chladu a tím prodloužit živostnost probiotik.

Analýzou pomocí qPCR byla potvrzena přítomnost bakterií a kvasinek téměř ve všech výrobcích. Přítomnost bakterií byla prokázána ve všech výrobcích kromě sušeného kokosového mléka. Rod *Lactobacillus* byl negativní ve všech vzorcích. Z kultivačního vyšetření je známo že laktobacily se ve vzorcích nachází proto předpokládáme, že množstvím probiotik byl ve výroku nízký nebo primery nebyly kompatibilní. Kvasinky byly přítomny ve všechny analyzovaných vzorcích.

Senzorickou analýzou byl potvrzen předpoklad, že u běžných spotřebitelů je stále nejvíce atraktivní produkt živočišného původu. V rostlinných nápojů byl nejlépe hodnocen kokosový nápoj.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] ZIMMERMANN, Petra a CURTIS, Nigel. Breast milk microbiota: A review of the factors that influence composition. *Journal of Infection*. 2020, roč. 81, č. 1, s. 17-47.
- [2] BELITZ, Hans D.; GROSCH, Werner a SCHIEBERLE, Petr. Milk and Dairy Products. In: *Food Chemistry*. 4. 2008, s. 498-521. ISBN 978-3-540-69934-7.
- [3] MONTEMURRO, Marco; PONTONIO, Erica; CODA, Rossana a RIZZELLO, Carlo Giuseppe. Plant-Based Alternatives to Yogurt: State-of-the-Art and Perspectives of New Biotechnological Challenges. Online. *Foods*. 2021, roč. 10, č. 2. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods10020316>. [cit. 2024-11-25].
- [4] ZANDONA, Laís; LIMA, Caroline a LANNES, Suzana. Plant-Based Milk Substitutes: Factors to Lead to Its Use and Benefits to Human Health. Online. In: ZIARNO, Małgorzata (ed.). *Milk Substitutes - Selected Aspects*. IntechOpen, 2021. ISBN 978-1-78985-637-8. Dostupné z: <https://doi.org/10.5772/intechopen.94496>. [cit. 2025-02-15].
- [5] HILL, Colin; GUARNER, Francisco; REID, Gregor; GIBSON, Glenn R.; MERENSTEIN, Daniel J. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Online. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2014, roč. 11, č. 8, s. 506-514. ISSN 1759-5045. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>. [cit. 2025-03-31].
- [6] CARDELLO, Armand V.; LLOBELL, Fabien; GIACALONE, Davide; ROIGARD, Christina M. a JAEGER, Sara R. Plant-based alternatives vs dairy milk: Consumer segments and their sensory, emotional, cognitive and situational use responses to tasted products. Online. *Food Quality and Preference*. 2022, roč. 100. ISSN 09503293. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2022.104599>. [cit. 2024-11-25].
- [7] HAUG, Anna; HØSTMARK, Arne T a HARSTAD, Odd M. Bovine milk in human nutrition – a review. Online. *Lipids in Health and Disease*. Roč. 6, č. 1. ISSN 1476511X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1476-511X-6-25>. [cit. 2024-12-16].
- [8] PAUL, Anna Aleena; KUMAR, Satish; KUMAR, Vikas a SHARMA, Rakesh. Milk Analog: Plant based alternatives to conventional milk, production, potential and health concerns. Online. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2020, roč. 60, č. 18, s. 3005-3023. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1674243>. [cit. 2024-11-25].
- [9] MÄKINEN, Outi Elina; WANHALINNA, Viivi; ZANNINI, Emanuele a ARENDT, Elke Karin. Foods for Special Dietary Needs: Non-dairy Plant-based Milk Substitutes

and Fermented Dairy-type Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2016, roč. 56, č. 3, s. 339-349.

- [10] RANGEL, Adriano Henrique do Nascimento; SALES, Danielle Cavalcanti; URBANO, Stela Antas; GALVÃO JÚNIOR, José Geraldo Bezerra; ANDRADE NETO, Júlio César de et al. Lactose intolerance and cow's milk protein allergy. Online. *Food Science and Technology*. 2016, roč. 36, č. 2, s. 179-187. ISSN 1678-457X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1590/1678-457X.0019>. [cit. 2024-12-16].
- [11] CLEGG, Miriam E.; TARRADO RIBES, Ariana; REYNOLDS, Reece; KLIEM, Kirsty a STERGIADIS, Sokratis. A comparative assessment of the nutritional composition of dairy and plant-based dairy alternatives available for sale in the UK and the implications for consumers' dietary intakes. Online. *Food Research International*. 2021, roč. 148. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110586>. [cit. 2024-11-25].
- [12] HEINE, Ralf G.; ALREFAEE, Fawaz; BACHINA, Prashant; DE LEON, Julie C.; GENG, Lanlan et al. Lactose intolerance and gastrointestinal cow's milk allergy in infants and children – common misconceptions revisited. Online. *World Allergy Organization Journal*. 2017, roč. 10. ISSN 19394551. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s40413-017-0173-0>. [cit. 2024-12-16].
- [13] LOMER, M. C. E.; PARKES, G. C. a SANDERSON, J. D. Review article: lactose intolerance in clinical practice – myths and realities. Online. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2008, roč. 27, č. 2, s. 93-103. ISSN 0269-2813. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03557.x>. [cit. 2025-02-15].
- [14] IGNASZEWSKI, Emma. *Plant-based foods*. The Good Food Institute. 2021.
- [15] ASTOLFI, Maria L.; MARCONI, Elisabetta; PROTANO, Carmela a CANEPARI, Silvia. Comparative elemental analysis of dairy milk and plant-based milk alternatives. *FOOD CONTROL*. 2020, vol. 2020, no. 116, s. 11. ISSN 0956-7135.
- [16] DARYANI, Drushti; PEGUA, Kakoli a ARYAA, Shalini S. Review of plant-based milk analogue: its preparation, nutritional, physicochemical, and organoleptic properties. Online. *Food Science and Biotechnology*. 2024, roč. 33, č. 5, s. 1059-1073. ISSN 1226-7708. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10068-023-01482-z>. [cit. 2025-03-31].
- [17] MCCLEMENTS, David Julian; NEWMAN, Emily a MCCLEMENTS, Isobelle Farrell. Plant-based Milks: A Review of the Science Underpinning Their Design, Fabrication, and Performance. Online. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2019, roč. 18, č. 6, s. 2047-2067. ISSN 1541-4337. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12505>. [cit. 2025-04-01].
- [18] YAO, Yueying; HE, Wenmeng; CAI, Xifan; BEKHIT, Alaa El-Din Ahmed a XU, Baojun. Sensory, physicochemical and rheological properties of plant-based milk

- alternatives made from soybean, peanut, adlay, adzuki bean, oat and buckwheat. Online. *International Journal of Food Science & Technology*. 2022, roč. 57, č. 8, s. 4868-4878. ISSN 0950-5423. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ijfs.15814>. [cit. 2025-04-01].
- [19] SILVA, Aline R.A.; SILVA, Marselle M.N. a RIBEIRO, Bernardo D. Chapter 12 - Plant-based milk products. In: *Future Foods*. Academic Press, 2022, s. 233-249. ISBN 9780323910019.
- [20] MÄKINEN, Outi Elina; WANHALINNA, Viivi; ZANNINI, Emanuele a ARENDT, Elke Karin. Foods for Special Dietary Needs: Non-dairy Plant-based Milk Substitutes and Fermented Dairy-type Products. Online. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015, roč. 56, č. 3, s. 339-349. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.761950>. [cit. 2025-02-15].
- [21] JAEGER, Sara R.; DUPAS DE MATOS, Amanda; FREMPOMAA ODURO, Ama a HORT, Joanne. Sensory characteristics of plant-based milk alternatives: Product characterisation by consumers and drivers of liking. Online. *Food Research International*. 2024, roč. 180. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114093>. [cit. 2024-11-25].
- [22] DIARRA, Kouane; NONG, Zhang Guo a JIE, Chen. Peanut Milk and Peanut Milk Based Products Production: A Review. Online. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2005, roč. 45, č. 5, s. 405-423. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10408390590967685>. [cit. 2025-02-15].
- [23] VAIKMA, Helen; KALEDA, Aleksei; ROSEND, Julia a ROSENVALD, Sirli. Erratum to “Market mapping of plant-based milk alternatives by using sensory (RATA) and GC analysis” [Future Foods, 4 (2021) 100049]. Online. *Future Foods*. 2022, roč. 6. ISSN 26668335. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2022.100166>. [cit. 2025-02-15].
- [24] TANGYU, Muzi; MULLER, Jeroen; BOLTEN, Christoph J. a WITTMANN, Christoph. Fermentation of plant-based milk alternatives for improved flavour and nutritional value. Online. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019, roč. 103, č. 23-24, s. 9263-9275. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10175-9>. [cit. 2024-11-25].
- [25] PRAMUDYA, Ragita C.; LEE, Jihyun; CHAPKO, Matthew J.; LEE, KwangRag; LEE, Sunghee et al. Variations in U.S. consumers' acceptability of commercially-available rice-based milk alternatives with respect to sensory attributes and food neophobia traits. Online. *Journal of Sensory Studies*. 2019, roč. 34, č. 3. ISSN 0887-8250. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/joss.12496>. [cit. 2025-02-16].
- [26] WANSINK, Brian; SONKA, Steven; GOLDSMITH, Peter; CHIRIBOGA, Jorge a EREN, Nilgün. Increasing the Acceptance of Soy-Based Foods. Online. *Journal of*

- International Food & Agribusiness Marketing*. 2005, roč. 17, č. 1, s. 35-55. ISSN 0897-4438. Dostupné z: https://doi.org/10.1300/J047v17n01_03. [cit. 2025-02-16].
- [27] PRAMUDYA, Ragita C.; LEE, Jihyun; CHAPKO, Matthew J.; LEE, KwangRag; LEE, Sunghye et al. Variations in U.S. consumers' acceptability of commercially-available rice-based milk alternatives with respect to sensory attributes and food neophobia traits. Online. *Journal of Sensory Studies*. 2019, roč. 34, č. 3. ISSN 0887-8250. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/joss.12496>. [cit. 2025-02-16].
- [28] M. MARINA, A. a NURULAZIZAH, S. Use of Coconut Versus Dairy Milk Products in Malaysian Dishes: Comparison of Nutritional Composition and Sensory Evaluation. Online. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2014, roč. 2, č. 4, s. 204-208. ISSN 2333-1119. Dostupné z: <https://doi.org/10.12691/jfnr-2-4-12>. [cit. 2025-02-16].
- [29] FERNANDO, W. M. A. D. B.; MARTINS, Ian J.; GOOZEE, K. G.; BRENNAN, Charles S.; JAYASENA, V. et al. The role of dietary coconut for the prevention and treatment of Alzheimer's disease: potential mechanisms of action. Online. *British Journal of Nutrition*. 2015, roč. 114, č. 1, s. 1-14. ISSN 0007-1145. Dostupné z: <https://doi.org/10.1017/S0007114515001452>. [cit. 2025-02-16].
- [30] YULIANA, Neti; RANGGA, Azhari a RAKHMIATI. Manufacture of fermented coco milk-drink containing lactic acid bacteria cultures. *African Journal of Food Science*. 2010, roč. 2010, č. 4, s. 5. ISSN 1996-0794.
- [31] KATZ, Alyssa C. *Milk Nutrition and Perceptions*. Honors Thesis. Providence Campus: Johnson & Wales University, 2018.
- [32] GORJI, Narjes; MOEINI, Reihaneh a MEMARIANI, Zahra. Almond, hazelnut and walnut, three nuts for neuroprotection in Alzheimer's disease: A neuropharmacological review of their bioactive constituents. Online. *Pharmacological Research*. 2018, roč. 129, s. 115-127. ISSN 10436618. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.12.003>. [cit. 2025-02-16].
- [33] BARREIRA, João C.M.; FERREIRA, Isabel C.F.R.; OLIVEIRA, M. Beatriz P.P. a PEREIRA, José Alberto. Antioxidant activity and bioactive compounds of ten Portuguese regional and commercial almond cultivars. Online. *Food and Chemical Toxicology*. 2008, roč. 46, č. 6, s. 2230-2235. ISSN 02786915. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.02.024>. [cit. 2025-02-16].
- [34] SILVA, Aline R.A.; SILVA, Marselle M.N. a RIBEIRO, Bernardo D. Health issues and technological aspects of plant-based alternative milk. Online. *Food Research International*. 2020, roč. 131. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108972>. [cit. 2025-02-16].
- [35] GRUNDY, Myriam Marie-Louise; LAPSLEY, Karen a ELLIS, Peter Rory. A review of the impact of processing on nutrient bioaccessibility and digestion of almonds. Online.

International Journal of Food Science & Technology. 2016, roč. 51, č. 9, s. 1937-1946. ISSN 0950-5423. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ijfs.13192>. [cit. 2025-02-16].

- [36] IORIO, Maria Clara; BEVILACQUA, Antonio; CORBO, Maria Rosaria; CAMPANIELLO, Daniela; SINIGAGLIA, Milena et al. A case study on the use of ultrasound for the inhibition of *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in almond milk. Online. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2019, roč. 52, s. 477-483. ISSN 13504177. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.12.026>. [cit. 2025-02-16].
- [37] VAN IMPE, J.; SMET, C.; TIWARI, B.; GREINER, R.; OJHA, S. et al. State of the art of nonthermal and thermal processing for inactivation of micro-organisms. Online. *Journal of Applied Microbiology*. 2018, roč. 125, č. 1, s. 16-35. ISSN 13645072. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jam.13751>. [cit. 2025-02-16].
- [38] ÖZDEMİR, Basak; YÜCEL, Saadet S. a OKAY, Yesim. Health properties of almond. *Journal of Hygienic Engineering and Design*. 2016, roč. 2016, č. 17, s. 6.
- [39] CHHABRA, Guneet S.; LIU, Changqi; SU, Mengna; VENKATACHALAM, Mahesh; ROUX, Kenneth H. et al. Effects of the Maillard Reaction on the Immunoreactivity of Amandin in Food Matrices. Online. *Journal of Food Science*. 2017, roč. 82, č. 10, s. 2495-2503. ISSN 0022-1147. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13839>. [cit. 2025-02-16].
- [40] LEE, Janelle; TOWNSEND, Janice A.; THOMPSON, Tatyana; GARITTY, Thomas; DE, Arpan et al. Analysis of the Cariogenic Potential of Various Almond Milk Beverages using a *Streptococcus mutans* Biofilm Model in vitro. Online. *Caries Research*. 2018, roč. 52, č. 1-2, s. 51-57. ISSN 0008-6568. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000479936>. [cit. 2025-02-16].
- [41] SETHI, Swati; TYAGI, S. K. a ANURAG, Rahul K. Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. Online. *Journal of Food Science and Technology*. 2016, roč. 53, č. 9, s. 3408-3423. ISSN 0022-1155. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2328-3>. [cit. 2025-03-31].
- [42] KEHINDE, Bababode A.; PANGHAL, Anil; GARG, M.K.; SHARMA, Poorva a CHHIKARA, Navnidhi. Chapter Four - Vegetable milk as probiotic and prebiotic foods. In: *Advances in Food and Nutrition Research*. 94. Academic Press, 2020, s. 115-160. ISBN 9780128202180.
- [43] XIE, Aijun; DONG, Yushi; LIU, Zifei; LI, Zhiwei; SHAO, Junhua et al. A Review of Plant-Based Drinks Addressing Nutrients, Flavor, and Processing Technologies. Online. *Foods*. 2023, roč. 12, č. 21. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods12213952>. [cit. 2025-03-31].

- [44] REYES-JURADO, F.; SOTO-REYES, N.; DÁVILA-RODRÍGUEZ, M.; LORENZO-LEAL, A.C.; JIMÉNEZ-MUNGUÍA, M.T. et al. Plant-Based Milk Alternatives: Types, Processes, Benefits, and Characteristics. Online. *Food Reviews International*. 2023, roč. 39, č. 4, s. 2320-2351. ISSN 8755-9129. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1952421>. [cit. 2025-03-31].
- [45] PADMA, M.; JAGANNADARAO, P.V.K.; EDUKONDALU, L.; RAVIBABU, G. a APARNA, K. Physico-Chemical Analysis of Milk Prepared from Broken Rice. Online. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2018, roč. 7, č. 2, s. 426-428. ISSN 23197692. Dostupné z: <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.702.054>. [cit. 2025-03-31].
- [46] AYDAR, Elif Feyza; TUTUNCU, Sena a OZCELIK, Beraat. Plant-based milk substitutes: Bioactive compounds, conventional and novel processes, bioavailability studies, and health effects. Online. *Journal of Functional Foods*. 2020, roč. 70. ISSN 17564646. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103975>. [cit. 2025-03-31].
- [47] N YADAV, Deep. Plant Based Dairy Analogues: An Emerging Food. Online. *Agricultural Research & Technology: Open Access Journal*. 2017, roč. 10, č. 2. ISSN 24716774. Dostupné z: <https://doi.org/10.19080/ARTOAJ.2017.10.555781>. [cit. 2025-03-31].
- [48] VARGHESE, Taruna a PARE, Akash. Effect of microwave assisted extraction on yield and protein characteristics of soymilk. Online. *Journal of Food Engineering*. 2019, roč. 262, s. 92-99. ISSN 02608774. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.05.020>. [cit. 2025-03-31].
- [49] WONG, Wai a GUPTA, Manoj. Using Microwave Energy to Synthesize Light Weight/Energy Saving Magnesium Based Materials: A Review. Online. *Technologies*. 2015, roč. 3, č. 1, s. 1-18. ISSN 2227-7080. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/technologies3010001>. [cit. 2025-03-31].
- [50] JACOB, MANDY; JAROS, DORIS a ROHM, HARALD. Recent advances in milk clotting enzymes. Online. *International Journal of Dairy Technology*. 2011, roč. 64, č. 1, s. 14-33. ISSN 1364-727X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2010.00633.x>. [cit. 2025-03-31].
- [51] ERIKSEN, SVEND. Application of Enzymes in Soy Milk Production to Improve Yield. Online. *Journal of Food Science*. 1983, roč. 48, č. 2, s. 445-447. ISSN 0022-1147. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1983.tb10762.x>. [cit. 2025-03-31].
- [52] PENHA, Camila Benedetti; SANTOS, Vinícius De Paola; SPERANZA, Paula a KUROZAWA, Louise Emy. Plant-based beverages: Ecofriendly technologies in the production process. Online. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2021,

- roč. 72. ISSN 14668564. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2021.102760>. [cit. 2025-03-31].
- [53] TANGYU, Muzi; MULLER, Jeroen; BOLTEN, Christoph J. a WITTMANN, Christoph. Fermentation of plant-based milk alternatives for improved flavour and nutritional value. Online. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019, roč. 103, č. 23-24, s. 9263-9275. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10175-9>. [cit. 2025-03-31].
- [54] RASIKA, D. M. D.; VIDANARACHCHI, Janak K.; LUIZ, Selma F.; AZEREDO, Denise Rosane Perdomo; CRUZ, Adriano G. et al. Probiotic Delivery through Non-Dairy Plant-Based Food Matrices. Online. *Agriculture*. 2021, roč. 11, č. 7. ISSN 2077-0472. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/agriculture11070599>. [cit. 2025-03-31].
- [55] OGHBAEI, Morteza; PRAKASH, Jamuna a YILDIZ, Fatih. Effect of primary processing of cereals and legumes on its nutritional quality: A comprehensive review. Online. *Cogent Food & Agriculture*. 2016, roč. 2, č. 1. ISSN 2331-1932. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/23311932.2015.1136015>. [cit. 2025-03-31].
- [56] MÄKINEN, Outi Elina; WANHALINNA, Viivi; ZANNINI, Emanuele a ARENDT, Elke Karin. Foods for Special Dietary Needs: Non-dairy Plant-based Milk Substitutes and Fermented Dairy-type Products. Online. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015, roč. 56, č. 3, s. 339-349. ISSN 1040-8398. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.761950>. [cit. 2025-03-31].
- [57] POLISELI-SCOPEL, Fábio H.; HERNÁNDEZ-HERRERO, Manuela; GUAMIS, Buenaventura a FERRAGUT, Victoria. Comparison of ultra high pressure homogenization and conventional thermal treatments on the microbiological, physical and chemical quality of soymilk. Online. *LWT - Food Science and Technology*. 2012, roč. 46, č. 1, s. 42-48. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.11.004>. [cit. 2025-03-31].
- [58] CRUZ, N.; CAPELLAS, M.; HERNÁNDEZ, M.; TRUJILLO, A.J.; GUAMIS, B. et al. Ultra high pressure homogenization of soymilk: Microbiological, physicochemical and microstructural characteristics. Online. *Food Research International*. 2007, roč. 40, č. 6, s. 725-732. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.01.003>. [cit. 2025-03-31].
- [59] GENTÈS, Marie-Claude; CARON, Annie a CHAMPAGNE, Claude P. Potential applications of pulsed electric field in cheesemaking. Online. *International Journal of Dairy Technology*. 2022, roč. 75, č. 2, s. 270-288. ISSN 1364-727X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1471-0307.12854>. [cit. 2025-03-31].
- [60] SILVA, Aline R.A.; SILVA, Marselle M.N. a RIBEIRO, Bernardo D. Health issues and technological aspects of plant-based alternative milk. Online. *Food Research*

International. 2020, roč. 131. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108972>. [cit. 2025-03-31].

- [61] ABDULLAH, Zalizawati; TAIP, Farah Saleena; MUSTAPA KAMAL, Siti Mazlina a ABDUL RAHMAN, Ribhan Zafira. Effect of sodium caseinate concentration and sonication amplitude on the stability and physical characteristics of homogenized coconut milk. Online. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2018, roč. 42, č. 11. ISSN 01458892. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jfpp.13773>. [cit. 2025-03-31].
- [62] WALTHER, Barbara; GUGGISBERG, Dominik; BADERTSCHER, René; EGGER, Lotti; PORTMANN, Reto et al. Comparison of nutritional composition between plant-based drinks and cow's milk. Online. *Frontiers in Nutrition*. 2022, roč. 9. ISSN 2296-861X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.988707>. [cit. 2025-04-01].
- [63] SCHAAFSMA, Gertjan. The Protein Digestibility–Corrected Amino Acid Score. Online. *The Journal of Nutrition*. 2000, roč. 130, č. 7, s. 1865S-1867S. ISSN 00223166. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jn/130.7.1865S>. [cit. 2025-04-01].
- [64] YANAI, Hidekatsu; KATSUYAMA, Hisayuki; HAMASAKI, Hidetaka; ABE, Shinichi; TADA, Norio et al. Effects of Dietary Fat Intake on HDL Metabolism. Online. *Journal of Clinical Medicine Research*. 2015, roč. 7, č. 3, s. 145-149. ISSN 1918-3003. Dostupné z: <https://doi.org/10.14740/jocmr2030w>. [cit. 2025-04-01].
- [65] CHALUPA-KREBZDAK, Sebastian; LONG, Chloe J. a BOHRER, Benjamin M. Nutrient density and nutritional value of milk and plant-based milk alternatives. Online. *International Dairy Journal*. 2018, roč. 87, s. 84-92. ISSN 09586946. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.07.018>. [cit. 2025-04-01].
- [66] ROMULO, Andreas. Nutritional Contents and Processing of Plant-Based Milk: A Review. Online. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2022, roč. 998, č. 1. ISSN 1755-1307. Dostupné z: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/998/1/012054>. [cit. 2025-04-01].
- [67] VANGA, Sai Kranthi a RAGHAVAN, Vijaya. How well do plant based alternatives fare nutritionally compared to cow's milk? Online. *Journal of Food Science and Technology*. 2018, roč. 55, č. 1, s. 10-20. ISSN 0022-1155. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s13197-017-2915-y>. [cit. 2025-04-01].
- [68] FERRAGUT, Victoria; VALENCIA-FLORES, Dora; PÉREZ-GONZÁLEZ, Marianita; GALLARDO, Joan a HERNÁNDEZ-HERRERO, Manuela. Quality Characteristics and Shelf-Life of Ultra-High Pressure Homogenized (UHPH) Almond Beverage. Online. *Foods*. 2015, roč. 4, č. 2, s. 159-172. ISSN 2304-8158. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/foods4020159>. [cit. 2025-04-01].
- [69] PATEL, Bhavisha Y. a VOLCHECK, Gerald W. Food Allergy: Common Causes, Diagnosis, and Treatment. Online. *Mayo Clinic Proceedings*. 2015, roč. 90, č. 10, s.

1411-1419. ISSN 00256196. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.07.012>. [cit. 2025-04-01].

- [70] TRIPATHI, M.K. a GIRI, S.K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. Online. *Journal of Functional Foods*. 2014, roč. 9, s. 225-241. ISSN 17564646. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.04.030>. [cit. 2025-02-17].
- [71] KYRYLENKO, Alina; EIJLANDER, Robyn T.; ALLINEY, Giovanni; DE BOS, Elly Lucas-van a WELLS-BENNIK, Marjon H.J. Levels and types of microbial contaminants in different plant-based ingredients used in dairy alternatives. Online. *International Journal of Food Microbiology*. 2023, roč. 407. ISSN 01681605. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110392>. [cit. 2025-05-04].
- [72] BERNARDEAU, Marion; GUGUEN, Micheline a VERNOUX, Jean Paul. Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. Online. *FEMS Microbiology Reviews*. 2006, roč. 30, č. 4, s. 487-513. ISSN 1574-6976. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00020.x>. [cit. 2025-02-17].
- [73] SARANRAJ, P.; NAIDU, M.A. a SIVASAKTHIVELAN, P. Lactic Acid Bacteria and its Antimicrobial Properties: A Review. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*. 2013, roč. 4, č. 6, s. 1124-1133.
- [74] AL ZAHRANI, Ashwag Jaman a SHORI, Amal Bakr. Viability of probiotics and antioxidant activity of soy and almond milk fermented with selected strains of probiotic *Lactobacillus* spp. Online. *LWT*. 2023, roč. 176. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114531>. [cit. 2025-05-04].
- [75] PYO, Young-Hee; LEE, Tung-Ching a LEE, Young-Chul. Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with β -glucosidase-producing lactic acid bacteria. Online. *Food Research International*. 2005, roč. 38, č. 5, s. 551-559. ISSN 09639969. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2004.11.008>. [cit. 2025-02-17].
- [76] XIAO, Hang; SEDÓ MOLINA, Guillermo Eduardo; TOVAR, Miguel; MINH QUOC, Ha; HANSEN, Egon Bech et al. Isolation and characterization of plant-based lactic acid bacteria from spontaneously fermented foods using a new modified medium. Online. *LWT*. 2024, roč. 192. ISSN 00236438. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115695>. [cit. 2025-05-04].
- [77] KORMA, Sameh A.; LI, Li; GHAMRY, Mohamed; ZHOU, Qiyang; AN, Peipei et al. Effect of co-fermentation system with isolated new yeasts on soymilk: microbiological, physicochemical, rheological, aromatic, and sensory characterizations. Online. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2022, roč. 53, č. 3, s. 1549-1564. ISSN 1517-8382. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00773-7>. [cit. 2025-05-04].

- [78] WARTH, A D. Relationship between the heat resistance of spores and the optimum and maximum growth temperatures of Bacillus species. Online. *Journal of Bacteriology*. 1978, roč. 134, č. 3, s. 699-705. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/jb.134.3.699-705.1978>. [cit. 2025-05-04].
- [79] LIU, Yang; DU, Juan; LAI, Qiliang; ZENG, Runying; YE, Dezan et al. Proposal of nine novel species of the Bacillus cereus group. Online. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2017, roč. 67, č. 8, s. 2499-2508. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001821>. [cit. 2025-05-04].
- [80] HILL, Colin; GUARNER, Francisco; REID, Gregor; GIBSON, Glenn R.; MERENSTEIN, Daniel J. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. Online. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2014, roč. 11, č. 8, s. 506-514. ISSN 1759-5045. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>. [cit. 2025-03-02].
- [81] FAO/WHO. *Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. London Ontario, Canada. 2002.
- [82] GOMAND, F.; BORGES, F.; BURGAIN, J.; GUERIN, J.; REVOL-JUNELLES, A.-M. et al. Food Matrix Design for Effective Lactic Acid Bacteria Delivery. Online. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2019, roč. 10, č. 1, s. 285-310. ISSN 1941-1413. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121140>. [cit. 2025-03-02].
- [83] FATIMA, Syeda M a HEKMAT, Sharareh. Microbial and Sensory Analysis of Soy and Cow Milk-Based Yogurt as a Probiotic Matrix for Lactobacillus rhamnosus GR-1. *Fermentation*. 2020, roč. 6, č. 74, s. 14.
- [84] ISLAM, Naorin; SHAFIEE, Mojtaba a VATANPARAST, Hassan. Trends in the consumption of conventional dairy milk and plant-based beverages and their contribution to nutrient intake among Canadians. Online. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*. 2021, roč. 34, č. 6, s. 1022-1034. ISSN 0952-3871. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/jhn.12910>. [cit. 2025-02-17].
- [85] SIEUWERTS, Sander; DE BOK, Frank A. M.; HUGENHOLTZ, Jeroen a VAN HYLCKAMA VLIET, Johan E. T. Unraveling Microbial Interactions in Food Fermentations: from Classical to Genomics Approaches. Online. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008, roč. 74, č. 16, s. 4997-5007. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AEM.00113-08>. [cit. 2025-03-02].
- [86] ANGELOV, Angel; GOTCHEVA, Velitchka; HRISTOZOVA, Tsonka a GARGOVA, Stoyanka. Application of pure and mixed probiotic lactic acid bacteria and yeast cultures for oat fermentation. Online. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2005, roč.

- 85, č. 12, s. 2134-2141. ISSN 0022-5142. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jsfa.2223>. [cit. 2025-03-02].
- [87] WESTERIK, Nieke; KORT, Remco; SYBESMA, Wilbert a REID, Gregor. Lactobacillus rhamnosus Probiotic Food as a Tool for Empowerment Across the Value Chain in Africa. Online. *Frontiers in Microbiology*. 2018, roč. 9. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01501>. [cit. 2025-03-02].
- [88] VALERO-CASES, Estefanía; FRUTOS, María José a PÉREZ-LLAMAS, Francisca. Development of synbiotic vegan beverages: probiotic viability, sensory profile, consumers' acceptance and functional stability. Online. *International Journal of Food Science & Technology*. 2023, roč. 58, č. 5, s. 2325-2335. ISSN 0950-5423. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ijfs.16361>. [cit. 2024-11-25].
- [89] SONG, Y.-S.; FRIAS, J.; MARTINEZ-VILLALUENGA, C.; VIDAL-VALDEVERDE, C. a DE MEJIA, E. Gonzalez. Immunoreactivity reduction of soybean meal by fermentation, effect on amino acid composition and antigenicity of commercial soy products. Online. *Food Chemistry*. 2008, roč. 108, č. 2, s. 571-581. ISSN 03088146. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.013>. [cit. 2025-03-02].
- [90] HARPER, Aimee R.; DOBSON, Renwick C.J.; MORRIS, Vanessa K. a MOGGRE, Gert-Jan. Fermentation of plant-based dairy alternatives by lactic acid bacteria. Online. *Microbial Biotechnology*. 2022, roč. 15, č. 5, s. 1404-1421. ISSN 1751-7915. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14008>. [cit. 2024-11-25].
- [91] LEE, Chan. Changes in n-Hexanal Content of Peanut Milk Fermented with Lactic Acid Bacteria. *Food Science Biotechnology*. 2001, roč. 10, č. 4, s. 387-390.
- [92] BERNAT, Neus; CHÁFER, Maite; CHIRALT, Amparo a GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, Chelo. Development of a non-dairy probiotic fermented product based on almond milk and inulin. Online. *Food Science and Technology International*. 2015, roč. 21, č. 6, s. 440-453. ISSN 1082-0132. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/1082013214543705>. [cit. 2025-03-02].
- [93] MARAZZA, José A.; NAZARENO, Mónica A.; DE GIORI, Graciela Savoy a GARRO, Marisa S. Enhancement of the antioxidant capacity of soymilk by fermentation with Lactobacillus rhamnosus. Online. *Journal of Functional Foods*. 2012, roč. 4, č. 3, s. 594-601. ISSN 17564646. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.03.005>. [cit. 2025-03-02].
- [94] Zákon č. 110/1997 Sb.: Zákon o potravinách a tabákových výrobcích a o změně a doplnění některých souvisejících zákonů. In: . 1997, 38/1997.
- [95] Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny (Text s významem pro EHP). In: . 2006.

- [96] Vyhláška č. 132/2004 Sb.: Vyhláška o mikrobiologických požadavcích na potraviny, způsobu jejich kontroly a hodnocení. In: . 2004, 42/2004.
- [97] Vyhláška č. 248/2018 Sb.: Vyhláška o požadavcích na nápoje, kvasný ocet a droždí. In: . 2018, 125/2018.
- [98] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1308/2013 ze dne 17. prosince 2013 , kterým se stanoví společná organizace trhů se zemědělskými produkty a zrušují nařízení Rady (EHS) č. 922/72, (EHS) č. 234/79, (ES) č. 1037/2001 a (ES) č. 1234/2007. In: . 2017.
- [99] BURSOVÁ, Šárka; NECIDOVÁ, Lenka a DUŠKOVÁ, Marta. *MIKROBIOLOGIE POTRAVIN A MIKROBIOLOGICKÉ LABORATORNÍ METODY. OBECNÁ MIKROBIOLOGIE*. FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE Ústav hygieny a technologie mléka, 2014.
- [100] BASTLOVÁ, Zita. *Laboratorní cvičení z mikrobiologie potravin II-b*. Online. Inovace VOV portál inovace vyššího odborného vzdělávání. 2018. Dostupné z: <https://www.vovcr.cz/odz/tech/304/page00.html>. [cit. 2025-04-15].
- [101] PRAHA: ÚŘAD PRO TECHNICKOU NORMALIZACI, METROLOGII A STÁTNÍ ZKUŠEBNICTVÍ. ČSN ISO 7251, *Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu presumptivních Escherichia coli: Technika nejvýše pravděpodobného počtu*. 2006.
- [102] McFARLAND STANDARD - Pouze pro použití in vitro. TM50-TM60. Dalynn Biologicals, 2002.
- [103] ŠMARDA, Jan; DOŠKAŘ, Jiří; PANTŮČEK, Roman; RŮŽIČKOVÁ, Vladislava a KOPTÍKOVÁ, Jana. *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, 2005.
- [104] GILL, Komaljeet; NEGI, Shivanti; RANA, Neerja a KUMAR, Pankaj. RDT and genetic engineering: Basic of RDT method, PCR, and application. Online. In: *Basic Biotechniques for Bioprocess and Bioentrepreneurship*. Elsevier, 2023, s. 207-216. ISBN 9780128161098. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816109-8.00013-1>. [cit. 2025-05-04].
- [105] MANJUNATH, B.C.; CHANDRASHEKAR, B.R.; MAHESH, Melkundi a VATCHALA RANI, R.M. DNA Profiling and forensic dentistry – A review of the recent concepts and trends. Online. *Journal of Forensic and Legal Medicine*. 2011, roč. 18, č. 5, s. 191-197. ISSN 1752928X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2011.02.005>. [cit. 2025-05-04].
- [106] CZAJKA, J; BSAT, N; PIANI, M; RUSS, W; SULTANA, K et al. Differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by 16S rRNA genes and intraspecies discrimination of *Listeria monocytogenes* strains by random amplified polymorphic

- DNA polymorphisms. Online. *Applied and Environmental Microbiology*. 1993, roč. 59, č. 1, s. 304-308. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/aem.59.1.304-308.1993>. [cit. 2025-05-04].
- [107] GARIBYAN, Lilit a AVASHIA, Nidhi. Polymerase Chain Reaction. Online. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013, roč. 133, č. 3, s. 1-4. ISSN 0022202X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>. [cit. 2025-05-04].
- [108] *Real-time PCR Handbook 3.0*. Online. 2025. Dostupné z: https://rise.articulate.com/share/CzJ69zEmF4MgocDs26iDJscAyM-xxAt-#/lessons/etcfjHVmsOoRuAYZ8Tm9ygluZ_q8L44W. [cit. 2025-05-04].
- [109] ZEMANOVÁ, Vladimíra. *Senzorická analýzy*. Online. Inovace VOV portál inovace vyššího odborného vzdělávání. 2019. Dostupné z: <https://www.vovcr.cz/odv/tech/296/page00.html>. [cit. 2025-05-04].
- [110] *Albert.cz*. Online. C2025. Dostupné z: <https://www.albert.cz/shop/Mlecne-a-chlazené/Rostlinne-a-veganske-vyrobky/Rostlinne-napoj/Nature-s-Promise-Bio-Mandlovy-napoj/p/27622797>. [cit. 2025-05-06].
- [111] *Dm drogerie markt*. Online. C2025. Dostupné z: <https://www.dm.cz/dmbio-bio-kokosovy-napoj-natur-p4066447380583.html>. [cit. 2025-05-06].
- [112] *Grizly*. Online. C2014-2024. Dostupné z: <https://www.grizly.cz/natures-charm-slazene-kokosove-kondenzovane-mleko-200-g>. [cit. 2025-05-06].
- [113] *Topnatur.cz*. Online. C2025. Dostupné z: <https://www.topnatur.cz/cs/produkt/kokosovy-napoj-topnatur>. [cit. 2025-05-06].
- [114] HAARMAN, Monique a KNOL, Jan. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. Online. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, roč. 72, č. 4, s. 2359-2365. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2359-2365.2006>. [cit. 2025-05-18].
- [115] DUBERNET, SÃ©golÃ¨ne; DESMASURES, Nathalie a GUÃ©GUEN, Micheline. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. Online. *FEMS Microbiology Letters*. 2002, roč. 214, č. 2, s. 271-275. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11358.x>. [cit. 2025-05-24].
- [116] TOFALO, Rosanna; SCHIRONE, Maria; PERPETUINI, Giorgia; SUZZI, Giovanna a CORSETTI, Aldo. Development and application of a real-time PCR-based assay to enumerate total yeasts and *Pichia anomala*, *Pichia guillermondii* and *Pichia kluyveri* in fermented table olives. Online. *Food Control*. 2012, roč. 23, č. 2, s. 356-362. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.07.032>. [cit. 2025-05-18].

- [117] ATLAS, Ronald M. *Handbook of microbiological media*. 4th ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, c2010. ISBN 978-1-4398-0406-3.
- [118] PRAHA: ÚŘAD PRO TECHNICKOU NORMALIZACI, METROLOGII A STÁTNÍ ZKUŠEBNICTVÍ. ČSN EN ISO 4833-2, *Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů: Část 2: Technika roztěrem a počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C*. 2014.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BMK – bakterie mléčného kvašení

ČSN – české státní normy

c DNA – koncentrace DNA

CCDM – Sběrka mlékařských mikroorganismů Laktoflora

CCF – Sběrka kultur hub na Univerzitě Karlově v Praze

CCY – Zbierka kultúr kvasiniek na chemickém ústavě SAV Bratislava

CPM – celkový počet mikroorganismů

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DRBC – chloramfenikolový agar s dichloranem a bengálskou červení

HACCP – systém analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů

HCl – kyseliny chlorovodíková

KTJ – kolonii tvořící jednotka

MPA – masopeptonový agar

MPB – masopeptonový bujón

MPN – metoda nejvyššího pravděpodobného počtu

MRS – de Mann, Rogosa a Sharp

PCR – polymerázová řetězová reakce

PDA – bramboro-dextrosový agar

qPCR – polymerázová řetězová reakce v reálném čase

RNA – ribonukleová kyselina

SA – sladinový agar

UHT – vysokoteplotní úprava

9 PŘÍLOHY

Dotazník pro sensorické hodnocení rostlinných alternativ mléka

Vážení hodnotitelé,

vítejte na sensorickém hodnocení rostlinných alternativ mléka. Prosím o objektivní vyplnění dle vašeho vlastního vnímání. V první části prosím napište či zakroužkujte správnou odpověď.

Datum hodnocení:

Věková kategorie: <20 21–30 31-40 41-50 51+

Pohlaví: žena muž

Kouříte? ano ne

Pijete pravidelně rostlinná alternativní mléka? ano ne

Máte nějakou zkušenost se sensorickým hodnocením? ano ne

Před sebou máte čtyři různé vzorky s mlékem nebo rostlinnou alternativou mléka. Vzorky můžete ovonět či ochutnat a do vyhrazených tabulek ohodnoťte odpovídajícím číslem od 1 (nevyhovující) do 10 (ideální). Na konci je místo pro vysvětlující poznámky k vašemu hodnocení (pouze dobrovolné).

1. Vzhled výrobku

Ohodnoťte vzhled vzorků číslem od 1 (velmi špatný) do 10 (výborný) podle vašich preferencí.

	R28	F66	G73	K41
barva				
přítomnost usazeniny				
celkový vzhled				

2. Vůně

Ohodnoťte vůni vzorků číslem od 1 (nepříjemná) do 10 (velmi příjemná) podle vašich preferencí.

R28	F66	G73	K41

3. Textura/konzistence

Ohodnoťte texturu vzorků číslem od 1 (špatná) do 10 (výborná) podle vašich preferencí.

	R28	F66	G73	K41
hustota				
pocit v ústech				

4. Chuť

Ohodnoťte chuť vzorků číslem od 1 (nepříjemná) do 10 (velmi příjemná) podle vašich preferencí.

	R28	F66	G73	K41
sladkost				
kyselost				
celková chuť				

5. Celkový dojem výrobku

Ohodnoťte výrobky číslem od 1 (velmi špatný) do 10 (výborný) podle vašich preferencí.

R28	F66	G73	K41

Poznámky:

V této části dotazníku je prostor na vaše doplňující poznámky a postřehy k vašemu hodnocení. Děkuji za spolupráci.