

Využití metody TGGE pro studium vybraných bakterií mléčného kvašení

Bc. Richard Sobel

Diplomová práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie a mikrobiologie potravin
akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Richard SOBEL**
Osobní číslo: **T10423**
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Využití metody TGGE pro studium vybraných bakterií mléčného kvašení.**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Bakterie mléčného kvašení a jejich úloha při výrobě fermentovaných mléčných výrobků
2. Využití metod molekulární biologie pro studium bakterií mléčného kvašení
3. Metoda TGGE a její využití v mikrobiologii

II. Praktická část

1. Optimalizace metody TGGE pro studium bakterií mléčného kvašení v podmínkách in vitro
2. Izolace DNA z matrice přírodních sýrů
3. Sledování dynamiky populace bakterií mléčného kvašení metodou TGGE v přírodních sýrech
4. Formulace závěrů

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

1. ADAMS, R. Martin a Maurice O. MOSS. Food Microbiology. 3rd ed. Cambridge: RSC Publishing, 2008. ISBN 978-0-85404-284-5
2. WARTELL, M.R.; HOSSEINI, S.; POWELL, S., et al. Detecting single base substitutions, mismatches and bulges in DNA by temperature gradient gel electrophoresis and related methods. *Journal of Chromatography A*. 1998, vol. 806, s. 169-185
3. MUYZER, G; SMALLA, K. Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) in Microbial Ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Mikrobiology*. 1998, vol. 73, no. 1 s. 127-141. ISSN:0003-6072
4. MUYZER, G. DGGE/TGGE a Metod for identifying genes from natural ecosystems. *Current opinion in mikrobiology*. 1999, vol. 2, no. 3, s. 317-322

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky

Datum zadání diplomové práce: **1. února 2012**

Termín odevzdání diplomové práce: **2. května 2012**

Ve Zlíně dne 10. února 2012


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: RICHARD SOBEL

Obor: THEVP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 30.4.2012


.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) *Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.*

(3) *Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.*

²⁾ *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:*

(3) *Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).*

³⁾ *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:*

(1) *Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.*

(2) *Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.*

(3) *Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.*

ABSTRAKT

Práce byla zaměřena na sledování změn zastoupení mikroorganismů během zrání u přírodního sýru typu Eidam. Pro stanovení přítomnosti bakterií se v současnosti, kromě tradičních izolačních technik např. plotnová metoda, používají moderní izolační metody molekulární biologie. Pro výzkum byla použita metoda molekulární biologie TGGE (gelová elektroforéza v teplotním gradientu)

V jednotlivých vzorcích sýra byly nalezeny startérové kultury a non-starterové bakterie mléčného kvašení a také kontaminující bakterie. Na začátku zrání převládaly především startérové kultury, jejichž množství postupně klesalo, naopak v pozdějších stádiích zrání převládaly non-starterové kultury. Ve vzorcích sýra byly identifikovány, především na počátku zrání, i kontaminující bakterie *Escherichia coli*.

Klíčová slova: bakterie mléčného kvašení, sýr Eidam, zrání sýrů, gelová elektroforéza v teplotním gradientu, deoxyribonukleová kyselina, polymerázová řetězová reakce

ABSTRACT

The work was focused on monitoring changes in the representation of microorganisms during ripening of Dutch type cheese Edam. In the present, to determine the presence of bacteria is using modern isolation methods of molecular biology. For the research was used method of molecular biology TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis).

Starter cultures, non-starter bacteria and contaminating bacteria have been found in individual samples of cheese. At the beginning of cheese ripening, dominated primarily starter cultures, their number gradually declined, while in the later stages of cheese ripening dominated a non-starter cultures. In individual cheese samples were identified, especially at the beginning of cheese ripening, a contaminating bacteria *Escherichia coli*.

Keywords: Lactic Acid Bacteria, Cheese Edam, cheese ripening, Temperature Gradient Gel Electrophoresis, Deoxyribonucleic acid, Polymerase chain reaction

Touto cestou bych rád poděkoval vedoucí mé diplomové práce doc. RNDr. Leoně Buňkové PhD. za odborné vedení, rady, připomínky a trpělivost.

Dále bych chtěl poděkovat Ing. Lucii Husárové za konzultaci a především za pomoc při praktické části této diplomové práci.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	12
1.1 TECHNOLOGICKY VÝZNAMNÉ BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ	12
1.1.1 Rod <i>Lactobacillus</i>	13
1.1.2 Rod <i>Pediococcus</i>	14
1.1.3 Rod <i>Enterococcus</i>	14
1.1.4 Rod <i>Leuconostoc</i>	15
1.1.5 Rod <i>Streptococcus</i>	15
1.1.6 Rod <i>Lactococcus</i>	16
2 VÝROBA SÝRU TYPU EIDAM	17
2.1 CHARAKTERISTIKA EIDAMSKÝCH SÝRŮ	17
2.2 PŮVOD EIDAMSKÝCH SÝRŮ.....	17
2.3 MIKROBIOLOGICKÉ KULTURY VYSKYTUJÍCÍ SE V SÝRECH EIDAMSKÉHO TYPU	17
2.4 ÚPRAVA MLÉKA	18
2.5 STANDARDIZACE MLÉKA A PŘÍDAVEK KOMPONENT.....	18
2.6 SÝŘENÍ MLÉKA	19
2.7 TVAROVÁNÍ SÝŘENINY	21
2.8 LISOVÁNÍ.....	22
2.9 SOLENÍ	23
2.10 ZRÁNÍ SÝRŮ.....	24
3 METODA TGGE A JEJÍ VYUŽITÍ V MIKROBIOLOGII	26
3.1 HISTORIE TGGE.....	26
3.2 PRINCIP TGGE	26
3.3 PARALELNÍ TGGE.....	30
3.4 BARVENÍ GELŮ	32
3.5 VÝHODY A NEVÝHODY TGGE	32
3.6 POUŽITÍ TGGE V PRAXI	33
4 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE	35
4.1 MODIFIKACE PCR	37
4.2 PRAKTICKÉ POUŽITÍ PCR	37
II PRAKTICKÁ ČÁST	38
5 CÍLE PRÁCE	39
6 MATERIÁL A METODY	40

6.1	CHARAKTERISTIKA VZORKŮ	40
6.2	POUŽITÉ KULTURY BAKTERIÍ	42
6.2.1	Kultury bakterií	42
6.2.2	Kultivační média	44
6.2.3	Kultivace bakterií	46
6.3	IZOLACE BAKTERIÁLNÍ DNA ZE VZORKU SÝRA	46
6.4	IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN Z BAKTERIÍ POMOCÍ IZOLAČNÍHO KITU.....	47
6.5	IZOLACE NUKLEOVÝCH KYSELIN Z BAKTERIÍ POMOCÍ FENOL – CHLOROFORMOVÉ EXTRAKCE	48
6.6	PCR REAKCE.....	49
6.6.1	Příprava směsi pro PCR	49
6.6.2	Elektroforéza v agarózovém gelu a detekce PCR produktu.....	51
6.7	TGGE	51
6.7.1	Příprava chemikálií	51
6.7.2	Příprava gelu pro TGGE	52
6.7.3	Elektroforéza v teplotním gradientu.....	54
6.7.4	Barvení gelu	55
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	56
7.1	OPTIMALIZACE METOD IZOLACE DNA Z BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	56
7.1.1	Izolace DNA pomocí kitu	56
7.1.2	Izolace DNA pomocí desintegrace buněk	57
7.1.3	Izolace nukleových kyselin pomocí fenol – chloroformové extrakce.....	58
7.1.4	PCR s použitím FastStart PCR Master	59
7.1.5	PCR s izolovanou DNA	59
7.2	DETEKCE MIKROORGANISMŮ POMOCÍ TGGE	60
7.2.1	Detekce bakterií mléčného kvašení.....	60
7.2.2	Detekce mikroorganismů v sýrech ve stadiu zrání 1 – 14 dnů.....	61
7.2.3	Detekce mikroorganismů v sýrech ve stadiu zrání 28 – 77 dnů.....	63
7.3	SOUHRNNÁ DISKUSE.....	66
	ZÁVĚR	71
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	72
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	80
	SEZNAM OBRÁZKŮ	81
	SEZNAM TABULEK.....	82

ÚVOD

Bakterie mléčného kvašení jsou charakterizovány jako grampozitivní, nepohyblivé, nesporulující mikroorganismy, které produkují kyselinu mléčnou jako hlavní nebo jediný produkt svého metabolismu. Jsou katalasa negativní a obvykle postrádají cytochromy. Skupina bakterií mléčného kvašení zahrnuje několik čeledí: *Lactobacillaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Leuconostocaceae* a *Streptococcaceae* [1, 2, 3].

Bakterie mléčného kvašení jsou velmi náročné na přítomnost nutričních látek, jako jsou sacharidy, aminokyseliny, peptidy, nukleové kyseliny, kyselina hyaluronová a vitaminy [2].

Různé druhy bakterií mléčného kvašení se dokázaly přizpůsobit různorodým podmínkám prostředí, proto jsou v přírodě velmi rozšířené. Běžně se vyskytují v trávicích traktách zvířat a člověka, dále v mléce a mléčných výrobcích, masných výrobcích, výrobcích z mořských živočichů a na rostlinách a výrobcích z nich. V praxi se používají hlavně ve výrobě a konzervaci mléčných výrobků (sýry, mléčné nápoje, jogurty aj.), masných výrobků, kysaného zelí, okurek a siláže [2, 4].

Změny bakterií mléčného kvašení probíhají především během zrání mléčných výrobků, především u sýrů. Zrání je složitý proces, během kterého dochází k nejrozličnější mikrobiologickým, biochemickým a senzorickým změnám ve výrobku. Během zrání jsou důležité podmínky, ve kterých probíhá, jedná se především o délku zrání, teplotu a vlhkost. Důležitým z těchto parametrů je teplota, která významně ovlivňuje biochemické děje, při vyšších hodnotách je urychluje, při nižších zpomaluje. Nezastupitelnou roli během zrání hraje ve velké míře úprava mléka. Především se jedná o mikrobiologické složení, obsahu tuku, bílkovin, z nichž jsou důležité kaseiny a obsahu katalyzátorů [5, 6].

Elektroforéza prokázala, že může být důležitým nástrojem při analýze biomolekul z důvodů přesných výsledků a širokého rozsahu použití. Toto platí i pro elektroforézu TGGE (gelová elektroforéza v teplotním gradientu), která dokáže přesně detekovat změny v pořadí bází v nukleotidové sekvenci, jak ve dvouřetězcové, tak v jednořetězcové DNA. Metoda TGGE má potenciál zachytit i ty nejmenší změny ve fragmentech DNA [7, 8, 9].

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Bakterie mléčného kvašení patří mezi heterogenní skupinu mikroorganismů, které fermentují různé živiny za vzniku kyseliny mléčné. Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní, mikroaerofilní a aerotolerantní mikroorganismy, některé jsou striktně anaerobní, dále jsou to acidotolerantní a nesporulující bakterie. Do skupiny bakterií mléčného kvašení jsou v dnešní době řazeny rody *Abiotrophia*, *Aerococcus*, *Agitococcus*, *Alkalibacterium*, *Allofustis*, *Alloicoccus*, *Atopobacter*, *Atopococcus*, *Atopostipes*, *Carnobacterium*, *Desemzia*, *Dolosicoccus*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Eremococcus*, *Globicatella*, *Granulicatella*, *Ignavigranum*, *Isobaculum*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Lactovum*, *Leuconostoc*, *Marinilactibacillus*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Paralactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Trichococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*. Mezi tyto bakterie je díky některým společným vlastnostem a využití v technologii výroby potravin rovněž řazen rod *Bifidobacterium*, který patří do skupiny aktinomycet [1, 2, 3].

Bakterie mléčného kvašení se podle způsobu zkvašování sacharidů rozdělují na homofermentativní a heterofermentativní. Mezi homofermentativní BMK se řadí např. *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, které produkují hlavně kyselinu mléčnou. Heterofermentativní bakterie produkují 50 % kyseliny mléčné a zbytek tvoří kyselina octová, ethanol, oxid uhličitý a vodík. Mezi tyto bakterie patří např. *Leuconostoc*, někteří zástupci rodu *Lactobacillus*, *Weissella* a *Bifidobacterium*. Tyto bakterie patří mezi mezofilní mikroorganismy, tzn., že optimální teplotu růstu mají okolo 37 °C, mohou však růst i při teplotách pod 5 °C a nad 45 °C. Optimální pH pro růst se pohybuje v rozmezí pH 4,0 – 4,5, některé však rostou při pH 9,6 (*Enterococcus*) a jiné rostou při pH 3,2 (*Leuconostoc*) [1, 2, 4].

1.1 Technologicky významné bakterie mléčného kvašení

Téměř všechny technologicky významné BMK taxonomicky náleží do řádu *Lactobacillales* z kmene *Firmicutes*. V tomto řádu, který je rozdělen do sedmi čeledí, jsou zahrnuty grampozitivní bakterie tvaru tyčinek nebo koků, ojediněle vláken. Z hlediska využití v potravinářství jsou významné především čeledi zahrnující BMK využívané v technologii potravin nebo kontaminující potraviny: *Lactobacillaceae*, *Aerococcaceae*,

Carnobacteriaceae, *Enterococcaceae*, *Streptococcaceae*. Jejich charakteristickým znakem je produkce kyseliny mléčné jako hlavního metabolitu při fermentaci cukrů. Mnoho rodů se používá pro výrobu různých fermentovaných potravin (kumys, jogurt, máslo, sýry, kefir, acidofilní mléka aj.). Řada z nich se také používá při fermentaci zelí, výrobě fermentovaných masných výrobků a vína, ve kterém přeměňují kyselinu jablečnou na kyselinu mléčnou. Některé druhy z těchto čeledí však mohou být podmíněně patogenní [3, 10].

1.1.1 Rod *Lactobacillus*

Tento rod patří do čeledi *Lactobacillaceae*, buňky bakterií jsou ve tvaru tyčinek nebo kokotyčinek, které tvoří pravidelné řetízky. Jsou grampozitivní, nesporulující, fakultativně anaerobní, někdy mikroaerofilní a někteří zástupci dokonce anaerobní. Optimální teplota růstu je 30 – 40 °C, pH 5,5 – 6,2. Požadují bohaté substráty, neredukují nitráty, nehydrolyzují želatinu a jsou katalasa negativní. Laktobacily jsou velmi rozšířené v prostředí, můžeme je nalézt v potravinách rostlinného i živočišného původu (mléčné výrobky, masné výrobky, víno, kysané zelí, siláže aj.), v trávicím traktu savců, ptáků i člověka. Na základě produktů fermentace cukrů je možno rozdělit laktobacily do tří skupin [1, 2, 3, 4, 10, 11, 12]:

a) obligátně homofermentativní [1, 2]:

1. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* – fermentuje materiál rostlinného původu.
2. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* – výskyt v sýrech, mléce, granulovaných krmivech.
3. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* – výskyt v sýrech, startér do jogurtů.
4. *Lactobacillus acidophilus* – výskyt v trávicím traktu savců a ptáků.
5. *Lactobacillus helveticus* – startér pro sýry, syrové mléko.

b) fakultativně heterofermentativní [3, 11]:

1. *Lactobacillus casei* – výskyt v sýrech, mléce.
2. *Lactobacillus plantarum* – izolován ze sýrů, fermentovaného materiálu rostlinného původu.
3. *Lactobacillus sakei* – původně jako startér pro sake, dnes hlavně výroba kysaného zelí.

c) obligátně heterofermentativní [3, 11]:

1. *Lactobacillus buchneri* – mléko, sýry.

2. *Lactobacillus fermentum* – mléčné výrobky.

3. *Lactobacillus kefir* – výroba kefiru.

1.1.2 Rod *Pediococcus*

Bakterie tohoto rodu se někdy označují jako mléčné koky. Buňky tvaru koků tvoří pravidelné tetrády, mohou se také vyskytovat jednotlivě nebo ve dvojicích. Jsou grampozitivní, nepohyblivé, nesporulující, fakultativně anaerobní. Vyžadují na živiny bohatá media s fermentovatelnými cukry. Jsou katalasa negativní, neredukují nitráty. Optimální teplota růstu se pohybuje v rozmezí 25 – 40 °C [3, 4].

Mezi nejčastější druhy patří [3, 4]:

1. *Pediococcus damnosus* – výroba alkoholických nápojů.

2. *Pediococcus pentosaceus* – mléko a mléčné výrobky.

3. *Pediococcus acidilactici* – mléko a mléčné výrobky.

1.1.3 Rod *Enterococcus*

Enterokoky patří do čeledi *Enterococcaceae*. Buňky jsou ovoidní nebo sférické, vyskytují se po dvou, ve shlucích nebo krátkých řetězcích. Jsou fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní, vyžadují média bohatá na živiny. Jsou katalasa negativní a hlavním produktem fermentace je kyselina mléčná. Enterokoky jsou poměrně odolné vůči prostředí, mají široké rozmezí teplot růstu od 10 – 45 °C, rostou v přítomnosti NaCl nebo žluče [1, 2, 4, 10, 13].

Mezi nejvýznamnější druhy lze zařadit [1, 2, 12, 13]:

1. *Enterococcus faecalis* – působí jako kontaminant, vyskytuje se ve stolici živočichů, v potravinách i rostlinách.

2. *Enterococcus faecium* – stolice živočichů, potraviny, klinický materiál.

3. *Enterococcus durans* – mléčné výrobky, hlavně jogurty.

4. *Enterococcus malodoratus* – mléčné výrobky a sýry.

1.1.4 Rod *Leuconostoc*

Leuconostoc patří do čeledi *Leuconostocaceae*, buňky jsou ovoidní nebo sférické, jsou uspořádány v řetězcích nebo po dvou, někdy mají tvar kokotyčinek. Jsou grampozitivní, nepohyblivé, nesporulující, fakultativně anaerobní. Rostou pomalu a vyžadují média bohatá na živiny. Rostou při teplotě 20 – 30 °C, hlavním produktem fermentace je etanol. Jsou katalasa a indol negativní, hydrolyzují arginin, neredukují nitráty, nehemolytické [3, 4, 10].

Mezi nejvýznamnější zástupce patří [1, 2, 3, 12]:

1. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* – fermentované rostlinné produkty.
2. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* – mléko a mléčné výrobky.
3. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* – mléko a mléčné výrobky.
4. *Leuconostoc lactis* – mléčné výrobky.

1.1.5 Rod *Streptococcus*

Streptokoky patří do čeledi *Streptococcaceae*, jejich buňky jsou ovoidní nebo sférické, vyskytují se ve dvojicích nebo řetězcích. Jsou nesporulující, nepohyblivé, fakultativně anaerobní, grampozitivní. V některých případech mohou tvořit pouzdra. Rostou v rozmezí teplot 25 – 45 °C, nerostou při nízkých teplotách pod 10 °C. Jsou katalasa negativní, hemolytické. Produkují převážně kyselinu mléčnou. Některé druhy streptokoků jsou patogenní. Streptokoky jsou rozděleny do čtyř skupin: anaerobní, orální, pyogenní a ostatní streptokoky. V posledních letech bylo mnoho změn v klasifikaci streptokoků, kdy byly vyčleněny a daly základ novým rodům (*Vagococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*) [3, 4, 10].

Mezi potravinářsky nejvýznamnější druhy lze zařadit [1, 2, 4, 12]:

1. *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* – jogurtová kultura.
2. *Streptococcus bovis* – trakt býložravců a mléčné výrobky.
3. *Streptococcus uberis* – přirozená mikroflóra vemene, syrové mléko.

1.1.6 Rod *Lactococcus*

Laktokoky se řadí rovněž do čeledi *Streptococcaceae*, jejich buňky jsou ovoidní, sférické, vyskytují se v krátkých řetízcích nebo po dvou. Laktokoky jsou grampozitivní bakterie, chromogenní, nesporulující, bez pouzder, jsou nepohyblivé a fakultativně anaerobní. Jejich hlavním fermentačním produktem je kyselina mléčná, jsou katalasa i a oxidasa negativní. Optimální teplotu růstu mají okolo 37 °C a rovněž rostou kolem teploty 10 °C. Všeobecně jsou nepatogenní pro člověka [1, 2, 3, 4, 10].

Mezi nejčastější zástupce patří [1, 2, 3, 12]:

1. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* – mléčné výrobky, mléko, potraviny rostlinného původu.
2. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* – mléko a mléčné výrobky.
3. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* – mléko a mléčné výrobky.

2 VÝROBA SÝRU TYPU EIDAM

2.1 Charakteristika eidamských sýrů

Eidamské sýry patří v rámci skupiny přírodních sýrů z hlediska obsahu sušiny mezi tvrdé sýry. Podle hlavních technologických znaků patří do skupiny sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou, přihřívání a dosoušení sýrového zrna probíhá v závislosti na obsahu tuku v sušině při teplotách 34 – 42 °C. Přihřívání a dosoušení probíhá za přídavku prací vody, 20 – 40 % z množství odpuštěné syrovátky podle obsahu tuku v sušině [14].

Mléko pro výrobu sýra je pečlivě vybíráno, upravováno, standardizováno a skladováno tak, abychom dosáhli výrobku požadovaného složení a kvality [15].

2.2 Původ eidamských sýrů

Eidam má svůj původ v Holandsku, kde se začal vyrábět již na začátku 11. století. Své jméno získal podle místa vzniku, města Edamu v severním Holandsku. Slovo “ Eidam“ znamená sýr s nízkodohřívanou sýřeninou ve tvaru koule [14].

V českých zemích se Eidam začal vyrábět poprvé v 19. století díky zahraničním odborníkům, kteří k nám přivezli technologii výroby Eidamu. O rozvoj tvrdého sýrařství se u nás zasloužili především pracovníci Zemské mlékařské a sýrařské školy v Kroměříži. Velký rozvoj výroby tvrdých sýrů nastal po 2. světové válce, kdy byla těmto sýrům věnována pozornost z hlediska rozvoje technologie, mechanizace zpracování sýřeniny, tvarování sýrů a jejich ošetřování během zrání [14, 16].

2.3 Mikrobiologické kultury vyskytující se v sýrech eidamského typu

Původně se Eidam vyráběl pouze v oblastech, kde byly vhodné klimatické podmínky pro jeho výrobu. Vyráběl se ze syrového mléka, které spolu se syřidlem mělo takovou mikroflóru, která umožňovala jeho výrobu [14, 17, 18]. Vše se změnilo při používání čistých bakteriálních kultur. Díky nim se výroba Eidamu rozšířila téměř do celého světa [14, 19]

Bakteriální kultury, které se používají při výrobě Eidamu, jsou: *Lactobacillus plantarum*, *Lbc. casei*, *Lbc. helveticus*, *Lbc. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lbc. casei*, *Lbc. curvatus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L.*

lactis subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, *Enterococcus faecalis*, dále pro doplnění chuťových vlastností to mohou být *Lbc. brevis*, *Lbc. fermentum* [1, 10, 14, 19, 20, 21,].

2.4 Úprava mléka

Důležitým činitelem při výrobě tvrdých sýrů je kvalita zpracovávaného mléka, která je dána jeho fyzikálními, chemickými a mikrobiálními vlastnostmi. Na těchto vlastnostech přímo závisí syřitelnost mléka a jeho schopnost vytvářet vhodné podmínky pro rozvoj mikroorganismů [3, 17, 22]. Při výrobě sýrů je z chemického složení spolu s obsahem tuku významný hlavně obsah bílkovin, především kaseinu, protože na jeho obsahu závisí výtěžnost [14, 17].

Prvním krokem ošetření mléka je pasterizace. Pasterizace probíhá z důvodů zničení patogenních mikroorganismů, včetně listerií, spory bakterií *Clostridium tyrobutyricum* však přežívají [22, 23]. Dochází rovněž ke zničení bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, bakterií octového, propionového a smíšeného kvašení [24]. Účelem pasterizace je rovněž inaktivace některých enzymů, např. lipas a proteinas. Pasterizace probíhá zpravidla při teplotách 71 – 75 °C po dobu 10 – 20 sekund, u nás se také rozšířila pasterace při teplotách 80 – 85 °C [14, 15, 17, 19]. Doba pasterizace nesmí být dlouhá, protože by mohly být inaktivovány potřebné enzymy, např. sérové proteiny a tím by mléko ztratilo koagulační efekt nebo by se doba sýření nadměrně prodloužila [15, 23].

V současnosti se využívá moderní metoda pro vylučování mikroorganismů z mléka, baktofugace [22]. Jedná se o druh centrifugace. Samotná baktofugace se používá pro výrobu přírodních sýrů nebo pro výrobu sýrů z čerstvého mléka. Při výrobě sýru typu Eidam se pasterizace i baktofugace kombinují tak, že baktofugace se zařazuje do pasterizačního cyklu. Sediment vzniklý baktofugací se ošetřuje UHT záhřevem, který ničí i spory bakterií a vrací se zpět do mléka, protože obsahuje velké množství kaseinů, které jsou důležité u srážení mléka [14, 15, 23].

2.5 Standardizace mléka a přídavek komponent

Po pasterizaci se mléko ochladí a přidají se potřebné komponenty pro tvorbu sýra. Ve většině případů se po pasterizaci mléko standardizuje podle požadavků FDM (Food, Drink and Milk Industries), při kterých dochází k odstraňování určitého množství smetany [22].

Smetana je tepelně ošetřena a následně vrácena zpět do mléka. Takto standardizované mléko je připraveno pro další postup. V dnešní době, kdy se využívá tzv. in-line výrobních linek, kdy mléko putuje ihned dále do výroby. Klesají tak náklady na jeho skladování [14, 17, 25].

Do mléka jsou přidávány tyto komponenty [14, 17, 18]:

- a) CaCl_2 , který urychluje srážení sýra, synerezi a zabraňuje kolísavosti těchto procesů, rovněž upravuje pH prostředí,
- b) smetanový zákys a kultury,
- c) dusičnan draselný jako prevence při odstraňování zbylých koliformních bakterií, zamezení růstu *Clostridium tyrobutyricum*. V dnešní době se z důvodu snížení spotřeby dusičnanů přidávají až v pozdějších fázích výroby, tj. při prvním vypouštění syrovátky ze sýřeniny, čímž dochází k produkci většího množství sýřeniny, která dusičnany obsahuje,
- d) voda, která upravuje požadovanou kyselost sýra před sýřením,

2.6 Sýření mléka

Sýření probíhá obvykle za teplot 28 – 34 °C a krájení sýřeniny o 30 – 40 minut později. Volba vhodné teploty sýření závisí na použité technologii a vazbě jednotlivých technologických operací. Doba sýření je velmi důležitá, neboť při krátké době srážení se tvoří větší množství sýrařského prachu a při dlouhém sýření dochází k tzv. přestřelování a sýrařské zrno má nepravidelný tvar [14]. Do 100 litrů upraveného mléka se přidává zhruba 20 ml syřidla, reninu (150 IMCU; International Milk Clotting Units) a 10 – 20 g CaCl_2 . pH je při sýření upravováno pomocí CaCl_2 a ideální hodnota je pH 6,5 – 6,55 [19]. Cílem sýření je tvorba sýřeniny (gelu), která bude snadno krájitelná a nebude rychle podléhat synerezi.

Po 30 – 40 minutách od zasýření, kdy vznikne sýřenina, dochází k jejímu krájení pomocí speciálních nožů, harf, po dobu 10 – 15 minut, aby bylo dosaženo požadované velikosti zrna. Sýřenina se krájí na sýrařské zrno o velikosti 8 – 15 mm. Velikost zrna ovlivňuje děrování eidamských sýrů. Míchání a harfování by mělo probíhat velmi opatrně, aby nedošlo ke ztrátám tuku a vzniku sýrařského prachu. Sýrařský prach je definován jako kusy sýřeniny menší než 1 mm. Tento prach je nežádoucí, protože dochází k jeho vyplavování spolu s vypouštěním syrovátky [14, 17, 25]

Následně dochází k odpuštění syrovátky, kdy je odpuštěno 20 – 40 % syrovátky k množství sýřeného mléka. Vypouštění musí být provedeno co nejrychleji. Vypouštění syrovátky za stálého míchání je efektivnější, protože síly působící na sýrařská zrna během míchání podporují synerezi [26]. Po odpuštění se zrno opět míchá se zbylou syrovátkou po dobu 10 – 30 minut. Po této době prvního promíchání se za stálého míchání přidává pitná voda o teplotě 40 – 65 °C v množství 50 – 70 % odpuštěné syrovátky. Je nutno zvýšit obrátky míchání, aby nedošlo ke slepování zrna [14, 17, 27].

Následně dochází k dohřívání sýřeniny. Za předpokladu stejné rychlosti dohřívání se dosahuje většího vylučování syrovátky ze sýřeniny a tím se zvyšuje sušina sýrů. Dohřívání probíhá po dobu 5 – 15 minut při teplotách 31 – 40 °C. V praxi se u eidamských sýrů provádí dohřívání přídavkem teplé vody o teplotě 31 – 36 °C [14].

Po dohřívání následuje dosoušení sýřeniny, jejímž hlavním cílem je dosažení správné vnitřní a hlavně vnější struktury sýrového zrna. Mimoto dochází rovněž k vylučování syrovátky ze zrna [19]. Smyslově se konec dosoušení určuje tak, že po zmáčknutí má zrno držet pohromadě, ale jemným rozetřením se má rozpadnout na jednotlivá zrna. Dosoušení probíhá 15 – 60 minut. Ke konci dosoušení se doporučuje přídavek vody (2 %) pro zlepšení odtoku syrovátky [26].

Sražení (koagulace) sýra a tvorba sýřeniny probíhá v dnešní době v uzavřených nádržích s integrovaným mícháním a krájením sýřeniny. Tyto nádrže jsou automatizovány, takže dochází k automatickému plnění, vyprazdňování a dávkování všech komponent pro výrobu sýra. Dokonce tyto nádrže signalizují, že sýřenina má požadovanou pevnost [17].

Na výrobě sýra se podílejí všechny složky mléka, čím je mléko kvalitnější, tím je větší výnos sýřeniny. Během tvorby sýřeniny a následných kroků ve zpracování dochází především ke ztrátám tuku a sýřeniny. Tuk ze sýřeniny odchází již při jejím krájení, kdy se zvětšuje její povrch, a tuk z ní uniká. Proto první podíl vypuštěné syrovátky obsahuje nejvíce tuku, během další synereze se množství vypuzeného tuku snižuje. Důležitý je rovněž tvar tanků, ve kterém probíhá sýření. Další ztráty tuku a vznik sýrařského prachu vznikají při mechanickém namáhání (tvorba nových tvarů) sýřeniny [26]. Rozdíl mezi obsahem tuku v syrovátce na konci sýření a po zředění s prací vodou by neměl být větší než 2 %. Množství sýrařského prachu by nemělo být více než 150 mg/l. Množství vzniklého sýrařského prachu se však zvyšuje v dalších operacích včetně výdrží ve vyrovnávacích tancích před odvodněním [17].

2.7 Tvarování sýřeniny

Dosušená sýřenina je vkládána do tvořítek (forem), kde získá svůj tradiční čtvercový tvar. Z rohů těchto forem vytéká ještě syrovátka, dokonce v některých rozích může dojít ke kompresi, což má za následek, že lokálně můžeme v sýrech nalézt vodu. V těchto fázích je z důvodů jeho okyselování, dosažení správného tvaru a kůry nezbytné, aby už vznikající sýr měl neustále stejnou teplotu až do doby, kdy je ponořen do solného láku [14, 27]. Za tímto účelem se sýřenina vkládá do předem vyhřátých forem. Pak se za soustavného promíchávání vypouští sýřenina do předlisovací vany. Hladina syrovátky se udržuje nad hladinou sýřeniny. Předlisování probíhá po dobu 10 – 15 minut za tlaku 0,05 – 0,1 kPa/cm². V průběhu předlisování dochází ke kompaktnímu spojování sýřeniny a vypouštění syrovátky. Na konci předlisování se použije šokový tlak 0,2 – 0,3 kPa/cm², aby nedošlo k zalisování syrovátky. Formy jsou se sýřeninou uzavřeny a uloženy do místností, kde se udržuje teplota 20 °C [17]. Důležité je, aby forma zůstala v těchto podmínkách určitou dobu, aby se neurychlilo lisování, jinak by nastalo přerušování fúze, tím by došlo k nerovnoměrnému rozmístění syrovátky v sýřenině, což by mělo za následek vznik měkkého a kyselého sýra, ve kterém by zůstaly prázdné prostory (oka), které by se vyplnily plynem [14, 17].

Prvním krokem mechanizace při výrobě eidamského sýru bylo zavedení tzv. prelisovacích kádí nebo sedimentátoru sýřeniny. Princip tohoto zařízení je takový, že na pás je vkládána sýřenina, která je krájena na kousky a převedena do forem, které jsou lehce slisovány a dávají sýřenině tvar čtverce [17, 27]. Nevýhodou těchto automatizovaných výrob je, že obsah vody je v jednotlivých částech bloků různý díky dávkám sýřeniny z různých tanků [14, 17].

Technologicky má však toto zařízení výhodu v tom, že hmotnost bočnicků sýrů lze naprogramovat přesně, kdy relativní směrodatná odchylka je 0,5 – 1,5 %, což je důležité zejména pro výrobu malých bočnicků. Sedimentátor je flexibilnější než prelis, lze na něm naprogramovat výrobu sýrů různých velikostí a tvarů [17, 27].

Synereze je během tvarování sýra zpomalena pomocí míchání sýřeniny. Sýřenina je před tvarováním jímána do vyrovnávacích nádrží, kde se shromažďuje sýřenina z více tanků, aby byla homogenní. První dávka sýřeniny, která přichází do nádrží má více vlhkosti, tomuto kolísání vlhkosti se předchází odvodňováním ve vyrovnávacích nádržích. Tímto

způsobem je možno regulovat obsah vlhkosti a hmotnost bochníků v kombinaci s časem před lisováním [14]. Metoda vyrovnávacích nádrží pracuje na základě vodního sloupce a hydrostatického tlaku. Ve finále syrovátka odtéká přes perforovanou stěnu ven ze zařízení [17].

Na výstupu z tohoto zařízení vychází sýr v dlouhém válci, je krájen na pravidelné kulaté bloky požadované hmotnosti. Poté je lehce stlačen, aby se neporušila jeho struktura, a následně je převeden do formy, které se naplněné vkládají do lisu [17].

2.8 Lisování

Lisování se provádí z důvodů zbavení se volné vody – syrovátky a spojení sýrového zrna v sýrovou hmotu. Sýry jsou lisovány ve formách, kdy získají svůj typický tvar a zároveň dojde k uzavření kůry sýra. Kůra je nezbytná, aby se zabránilo úniku vody do solného láku a zároveň pronikání soli do sýra. Kůra slouží rovněž jako bariéra proti mikroorganismům, které se nachází v solném láku a zároveň chrání sýr proti zvýšenému osmotickému tlaku v láku [14, 17, 27].

V současnosti jsou bochníky tvarovány pomocí jemných kovových nebo plastových forem nebo plastových forem vyložených sýrašskou tkaninou pro podporu odvodnění a tvorby kůry. V dnešní době se používá menších tlaků a doba jejich působení je podstatně kratší. Použitím vysokých tlaků dochází k uzavření povrchu sýra kůrou a tím by nedošlo k propouštění syrovátky [17]. Použitím menších tlaků a kratší dobou lisování je kůra, která se tvoří na sýru, slabší, bez viditelných otvorů, ale není úplně účinná proti mikroorganismům, které se do sýra mohou dostat ze solného láku. Vznik kvalitní a pevné kůry je kombinací postupného zvětšování tlaku v čase, pevnosti sýřeniny a nepřerušování procesu lisování. Vznikem kůry je ukončena fúze syrovátky kolem vnějších vrstev sýra, podporovaná deformací sýřeniny [14, 16].

V současnosti se používají lisovací tlaky, které nejsou dostatečné, a tím nedojde dokonalému slisování bochníku sýra. Z toho vyplývá, že v sýru je poměrně dost nerovnoměrně rozložené vlhkosti, která zapříčiní malá oka v hmotě sýra. Tato oka poté zanikají v solném láku, kde se pomalu snižuje teplota a dochází k vstřebání syrovátky. Během 1 – 2 dní je difúze syrovátky kompletní a sýr má uzavřenou texturu [14, 16, 27]. Moderní lisovací zařízení zkrátilo dobu lisování díky tomu, že se rovněž používají lepší a

moderní formy na sýr, kdy stroj nemusí lisovat každou formu zvlášť, ale dokáže vylisovat celý sloupec forem [17, 27].

2.9 Solení

Solení nastává 1 hodinu po lisování. V sýru ještě zůstalo malé množství laktosy (i ve 2 týdenním sýru mohou vnější vrstvy obsahovat až 0,2 % laktosy), kterou je potřeba odstranit. Laktosa zde působí jako zdroj živin pro nežádoucí mikroorganismy a spolu s jejím odstraněním, pasterizací mléka, přísnou hygienou výroby a dodržováním výrobního postupu tak zabráníme jejich růstu. Důležitá je rovněž hodnota pH, kdy po výstupu z lisu má sýr pH 5,9 a zhruba po 1,5 hodinách klesne jeho hodnota na 5,4 – 5,5 [14, 16, 17].

Solení sýrů v solné lázni se provádí hlavně z důvodů optimalizace chuti sýra, zpevnění povrchu a zlepšení struktury sýrového těsta. Ze solné lázně přestupuje do sýra sůl a ze sýra uniká syrovátka, která obsahuje rozpustné bílkoviny, kyselinu mléčnou a soli. Tyto látky jsou důležité pro zrání, a proto je důležité nastavit vhodný difúzní spád. Po vložení sýra do solné lázně je potřeba lák ochladit pod 15 °C, kdy se zastavuje synerize a zabraňuje se růstu nežádoucích mikroorganismů. Tyto nízké teploty navíc poskytují bočnickům sýra potřebnou tuhost, kdy dochází ke ztužování především vnitřních částí sýra. Solením se navíc ze sýra ztrácí voda a dochází k rozpouštění veškerých látek v sýru, které jsou rozpustné v solném nálevu (jejich hodnota klesne pod 0,2 %) [17, 27].

Průměrný obsah soli v sýru Eidam je 4 – 5 g na 100 g sýra, aby byla však sůl rozptýlena v celém bočniku rovnoměrně, je potřeba, aby zrál minimálně 2 měsíce [17].

Solná lázeň obsahuje obvykle 17 – 18 % NaCl, v některých případech mohou být použity i lázně s nižšími koncentracemi soli, v těchto případech však sýry musí ležet v této lázni zhruba 1 týden. Solná lázeň by měla obsahovat dostatek Ca^{2+} (až 0,2 % v 17% roztoku NaCl). Důležité je také pH, které by mělo být okolo hodnoty 4,5, aby se zabránilo rozpouštění bílkovin, které způsobují osliznutí sýra. Méně koncentrovanější solné lázně by měly obsahovat více než 0,2 % Ca^{2+} [14, 27].

Při solení se sýry ukládají do solných nádrží, kde se v nich ponechávají přesně stanovenou dobu. Pro stejnoměrné je vhodné vkládat mezi vrstvy sýrů dřevěné rošty, které zabrání přilehání sýrů k sobě. Sýry se v nádržích se solnou lázní pohybují plavením, kdy cirkulují přes celou lázeň [14, 16, 27].

Delší doba ležení sýrů v solných lázních představuje riziko růstu halotolerantních laktobacilů, které mohou proniknout do sýrů a způsobit negativní změnu chuti. Proto je velmi důležité čištění nádob, ve kterých probíhá solení. Sanitace je však velmi složitá, protože rezidua chemických látek nepříznivě ovlivňují chuť sýra. Pokusy z ozařování nálevů nebyly příliš úspěšně, stejně jako používání nejrůznějších filtračních technik [14, 16, 27].

Po prosolení sýra je důležité jeho oschnutí, především kůry sýra. V dnešní době se používají moderní sušárny, které jsou výkonné a zabraňují osliznutí kůry sýra. V případě osliznutí jsou nápravy velice těžké a složité [27].

2.10 Zrání sýrů

Zráním získávají sýry správnou konzistenci, barvu a lesk, chuťové vlastnosti, strukturu a do jisté míry i barvu [20].

Pro sýry typu Eidam a podobných typů je důležité zabránit vývoji nežádoucích mikroorganismů na povrchu sýrů, které negativně ovlivňují jejich kvalitu. Zejména je třeba zabránit růstu plísní, které mohou tvořit mykotoxiny [17, 28]. Dále je potřeba zabránit růstu plísní, které způsobují nežádoucí zbarvení, např. *Scopulariopsis brevicaulis*, *Oospora sulfurea* (žluté zbarvení), *Oospora crostacia* (cihlově červené zbarvení) a různé druhy plísní rodů *Aspergillus* a *Penicillium* [1, 20]. Proto je potřeba dosáhnout vzniku kůry, která je pevná a tvrdá. Tato tvrdá kůra rovněž zabraňuje odpařování vody ze sýrů a tím dosáhneme vzniku sýra, který má pružnou hmotu [20, 28, 29, 30].

V současnosti sýry zrají pod plastickými hmotami, které se aplikují na povrch sýrů speciálními nátěry [20]. Tyto hmoty tvoří sušením souvislý povlak, který má hydrofilní charakter a tvoří rovněž ochranu před mechanickým poškozením. Odpařování vody plastické hmoty snižují až okolo 50 %. Odpařování vody ze sýra probíhá především v prvním týdnu zrání. Nanesený povlak rovněž brání růstu plísní, a může rovněž obsahovat fungicidy, např. natamycin [17, 31].

Po vyjmutí sýra ze solné lázně se sýry suší při pokojové teplotě a zároveň se odstraňuje zbytek solné lázně odsátím z povrchu sýra. V této fázi je vzniklá kůra nejcitlivější, a proto se suší při pokojové teplotě a ne za zvýšené teploty. Po oschnutí se aplikuje první speciální nátěr obsahující antimykotikum natamycin a zároveň zabraňující vysychání sýrů. Sýry se uloží do chladných sklepů, kde zrají po dobu 7 – 10 dnů při teplotě 8 – 10 °C. V těchto

sklepích dochází k útlumu životních funkcí mikroorganismů, na povrchu se tvoří kůra a probíhají hlavně fyzikálně chemické procesy. Důležitá je vlhkost zrání, která se pohybuje okolo 75 %. Sýry je nutno každý den obracet, aby došlo k dokonalému oschnutí a vytvoření silné kůry [14, 30].

Z chladného sklepa se sýry přemístí do kvasného sklepa. Teplota zrání je v těchto sklepích 14 – 16 °C. Dochází zde činností mikroorganismů k tvorbě ok a rozkladu bílkovin. Vlhkost při zrání je okolo 85 % a sýry je potřeba obracet 2 až 3 x týdně [14, 17, 30, 31,].

V těchto podmínkách musí nátěr, kterým byl ošetřen povrch sýra zaschnout rychle, jinak může dojít k popraskání kůry a do kůry sýra by se dostaly kvasinky, plísně či koryneformní bakterie, které by způsobily lepkavost povrchu, nežádoucí příchutě či znečištění povrchu [14, 30, 33]. Sýry zrající pod nátěry plastických hmot se v této době natírají speciálními emulzemi pomocí natíracích strojů. Ve většině případů se aplikují dvě vrstvy těchto nátěrů [19, 20]. Posléze se posoudí jakost sýrů rozkrojením jednoho kusu a v případě uznání dobré jakosti se sýr označí třídou jakosti a přemístí do zracího sklepa [30].

Ve zracím sklepě sýr zraje po dobu 1 – 3 měsíců při teplotě 8 – 10 °C při relativní vlhkosti 85 %. Během zrání se sýry dvakrát týdně obracejí [14].

Během zrání ztrácí sýr vlhkost a klesá jeho hmotnost. Zrací podmínky (teplota, vlhkost a proudění vzduchu) jsou neustále sledovány. Zrací sklepy musí být dobře izolovány, sýry zrají na dřevěných policích, které mají tu výhodu, že pohlcují vlhkost. Nevýhodou dřevěných polic je, že se v nich shromažďují nežádoucí mikroorganismy, proto je důležitá dobrá sanitace, sušení a čištění polic [14, 30, 34].

Během zrání je důležité, aby v sýru zůstala zbytková vlhkost, která způsobuje flexibilitu povrchového filmu. Během začátku se vylučuje ze sýra více vlhkosti, což způsobuje vznik vlhkosti mezi kůrou sýra a policí, na které zraje. Vzniku této vlhkosti se zabraňuje obrácením sýrů, hlavně na začátku zrání. V dalších fázích zrání se frekvence obracení snižuje [17].

Po uzrání je plastová vrstva omyta v kartáčových myčkách. Následuje balení a expedice sýrů. Způsoby balení jsou závislé na tom, zda balíme celé sýry nebo porcované sýry [19, 20]. Sýry neporcované se většinou balí do voskového obalu, kdy na dokonale očištěný sýr se aplikuje tekutý vosk (žlutý nebo červený), který je po zaschnutí opatřen etiketou. Sýry zrající v kryovaku nebo pod plastovým nátěrem se dále nevoskují. Celé sýry jsou následně vkládány do beden či kartonů a skladovány [14, 17]. Porcované sýry se ve většině případů balí vakuově [17, 30].

3 METODA TGGE A JEJÍ VYUŽITÍ V MIKROBIOLOGII

3.1 Historie TGGE

V roce 1979 vyvinuli Fisher, Lehrman a jejich vědecký tým metodu separace fragmentů DNA lišící se pouze jedním párem bází v nukleotidové sekvenci, tato metoda bylo pojmenována DGGE (elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu). Metoda je založena na tom, že denaturace v určitých oblastech fragmentů DNA (oblastech denaturace) je způsobována pomocí denaturačních činidel, močoviny a formamidu, přičemž se lineární gradient močoviny nebo formamidu odděluje kolmo ke směru elektrického pole [35]. Na jejich práci navazovali v dalších letech pánové Myers (1987), Muyzer a Smalla (1998) [37]. Tato metoda byla na počátku své existence populární, díky počátečním úspěchům, ale již v této době měla několik problémů, od schopnosti ustálit gradient gelu, po schopnosti reprodukovatelnost výsledků [9].

V důsledku určitých nedostatků metody DGGE byla o něco později pro separaci dlouhých řetězců DNA a RNA vyvinuta metoda lepší nazvaná TGGE (vyvinuta v roce 1987 pány Rosenbaumem a Raisnerem), která pracuje na jednodušším principu a výsledky jsou reprodukovatelnější [9, 37, 38].

3.2 Princip TGGE

Gelová elektroforéza v teplotním gradientu nebo také teplotní gradientová gelová elektroforéza (TGGE) je separační metoda, pomocí níž lze separovat amplifikované fragmenty DNA, které mají stejnou či podobnou délku, ale liší se svou sekvencí. Metoda TGGE je založena na fyzikálním principu, schopnosti rozvíjení (denaturace) dvouřetězcové struktury DNA na částečně jednořetězcové struktury působením teploty v tzv. přechodu denaturace, čímž částečná denaturace fragmentů DNA ovlivní jejich elektroforetickou pohyblivost [38, 39].

Elektroforetická pohyblivost fragmentů je závislá na několika faktorech, zda je fragment DNA z dvouřetězcové DNA nebo jednořetězcové, na spojení více oblastí denaturace DNA, na disociaci jednoduchých řetězců apod. Každý z těchto faktorů může být vizualizován pomocí kolmé TGGE. Elektroforetická pohyblivost se příliš nemění, jedná-li se o jednořetězcovou nebo dvouřetězcovou DNA, ale závisí hlavně na délce a zakřivení

fragmentů DNA. Proto dva fragmenty DNA, které se liší v jediném místě, např. u heterozygotní bodové mutace, se budou v gelu šířit stejnou rychlostí [35].

Během elektroforézy se amplifikované fragmenty DNA přesouvají do polyakrylamidového gelu, v němž je TGGE prováděna. Během elektroforézy dochází k zahřívání fragmentů DNA na teplotu, při níž dochází k částečnému rozvíjení dvouřetězcových fragmentů DNA na dva jednořetězcové fragmenty DNA (tzv. melting teplota, T_m). Teplota denaturace T_m udává teplotu, při níž denaturuje 50 % jednovláknových řetězců a 50 % dvouvláknových řetězců. T_m silně závisí na zastoupení a pořadí jednotlivých nukleotidů a může být ve velké míře ovlivněna malou substitucí v nukleotidové sekvenci, dokonce i záměnou jednoho nukleotidu za druhý [35].

Vlastní denaturační teplota T_m fragmentů molekul DNA závisí na vodíkových vazbách párů nukleotidů. Báze guanin (G) a cytosin (C) jsou spolu spojeny pomocí tří vodíkových můstků, naopak báze adenin (A) a thymin (T) jsou vázány pomocí dvou vodíkových můstků. K rozštěpení vodíkových vazby mezi G a C je tedy potřeba větší energie ve srovnání s vodíkovými vazbami mezi A a T. Z toho vyplývá, že na rozštěpení vodíkových vazeb mezi bázemi C a G je potřeba vyšší denaturační teplota T_m než na rozštěpení vazeb mezi bázemi A a T. Vazby mezi bázemi jsou však velice citlivé na přesnou denaturační teplotu T_m a změna této teploty byť jen o 1 °C, velice významně změní tvorbu jednotlivých svazků párů bází [9, 39].

Stejná situace je u denaturačních činidel, kdy na rozštěpení vazeb mezi G a C je potřeba použít koncentrovanější denaturační činidlo než u vazeb mezi A a T [37]. Teplotu, při níž DNA denaturuje, rovněž ovlivňuje koncentrace denaturačních činidel a koncentrace solí. Platí obecně, že močovina, která se používá pro separaci nukleových kyselin, má koncentraci 7 – 8 M a druhé denaturační činidlo, formamid, má ideální koncentraci vyšší než 20 %.

Působením optimální teploty dojde v polyakrylamidovém gelu, který obsahuje rovněž denaturační činidla formamid a močovinu, k denuraci DNA a zároveň ke zpomalení jejího pohybu, [7, 35, 39]. Denaturační činidla jsou v gelu přítomna z důvodu usnadnění denaturace DNA přechodů, které jsou ideální pro rozdělení fragmentů a jejich charakterizaci [9]. Denaturační činidla jsou přítomna v celém gelu a jejich množství je určeno empiricky podle zkoumané sekvence nukleotidů. Jednotlivé báze nukleotidové

sekvence se přesouvají z jejich nejméně stabilních oblastí do jiných, stabilnějších, dříve, než dojde ke změně jejich pohybu působením teploty [9, 39]. Fragmenty DNA, které obsahují více nukleotidových párů adenin – thymin denaturují mnohem lépe než fragmenty, které mají převahu nukleotidových párů guanin – cytosin [40].

Před použitím TGGE analýzy je nezbytné určit denaturační teplotu jednotlivých fragmentů DNA. Aby bylo dosaženo co nejlepšího rozlišení jednotlivých fragmentů DNA, je potřeba správně určit dobu trvání elektroforézy a správně nastavit teplotní gradient. Správné nastavení teplotního gradientu je důležité z důvodů denaturačních oblastí, ve kterých jednotlivé mají páry bází identickou denaturační teplotu. [7]. Tyto oblasti se nacházejí v oblasti od 50 do 300 nukleotidu nukleotidové sekvence. V této oblasti při určité teplotě denaturují určité fragmenty DNA a to tím způsobem, že buď zdenaturují všechny, nebo žádné. Jakmile úseky s nejnižší denaturační teplotou dosáhnou teploty T_m , tedy nejnižší teploty denaturace, dochází k zastavení přechodu všech molekul a hlavně zastavení přechodu šroubovicové struktury DNA do částečně rozpuštěné struktury. Sekvenční rozdíly v oblastech denaturace jsou určeny různou teplotou denaturace, a proto se jednotlivé fragmenty DNA s různými sekvencemi zastaví na různých pozicích gelu [7]. S tím jak teplota roste, jednotlivé fragmenty postupně denaturují [35].

TGGE má konstantní teplotní gradient, tzn. lineární nárůst teploty, který je kolmý na směr elektrického pole. Během elektroforézy a průchodu molekul DNA gelem mají jednotlivé molekuly stále stejné termodynamické vlastnosti [7].

Dvouvláknové molekuly DNA podstupují dva konformační přechody: při nízkých teplotách nebo nízké koncentraci denaturačního činidla se nachází v částečně denaturovaném stavu neboli reverzibilním přechodu, zatímco při vyšších teplotách nebo vyšší koncentraci denaturačního činidla se nachází ve zcela denaturovaném stavu neboli nereverzibilním přechodu. V průměru však mobilita molekul DNA závisí na stupni přechodu. Oba tyto přechody molekul DNA jsou jasně definovány určitými teplotami a koncentracemi denaturačních činidel. Částečně zdenaturované molekuly procházejí gelem mnohem pomaleji než zcela denaturované molekuly. Ve velmi úzkém přechodu je možno přepínat mezi reverzibilním a nereverzibilním přechodem [36].

Jedním z dalších faktorů, který ovlivňuje metodu TGGE, je systém pufrů, tzv. pufrovací systém. Mezi nejpoužívanější pufrů patří: TAE (tris – acetát – EDTA), MOPS (3-(N-

morfolino) propansulfanová kyselina) a TBE (tris – borát – EDTA). Tyto pufrы je možno používat opakovaně 4 – 8 x, bez toho, že by se snížila jejich pufrovací aktivita [9].

Fragmenty DNA jsou produkovány pomocí další metody molekulární biologie, polymerázové řetězové reakce (PCR). Tyto vytvořené fragmenty mohou následně podrobeny DGGE nebo TGGE [35].

Vzhledem k velké závislosti bodu denaturace T_m , větvení (disociaci) DNA a následnému zpomalení elektroforetické pohyblivosti, nastává v různých místech gelu zastavování jednotlivých skupin DNA. Kromě dvou různých homoduplexních molekul a dvou různých heteroduplexních molekul, mohou být rozlišovány i disociované a reannealované fragmenty DNA. V praxi je to také možno provést pomocí PCR, kdy *Taq* polymeráza je vyčerpána v posledním cyklu, kdy jsou heteroduplexy vytvořeny tak efektivně, že nejdříve dojde k disociaci DNA a následně k reannealingu DNA. Heteroduplexní fragmenty pak obsahují nepárové skupiny nebo jiné fragmenty DNA, které jsou vypouklé, což vede k významnému snížení denaturační teploty T_m . Denaturační teploty obou heteroduplexů jsou od sebe odlišné, takže každý heteroduplex má patrně své pásmo. V případě jednonukleotidové substituce bude AT vyměněn párem GC, zároveň bude denaturační teplota růst. V souvislosti s nukleotidovou substitucí hraje důležitou roli i pořadí párů (AT nebo TA i dvojice GC nebo CG), které určuje teplotu odloučení párů nukleotidů z DNA [35].

Technika je založena na principu amplifikace 16S rRNA genů v DNA pomocí PCR. Nicméně na rozdíl od běžné PCR, obsahuje jeden z primerů větší množství GC nukleotidů [41]. Toho se využívá, chceme-li zvýšit detekční schopnost metody. V tomto případě se sekvence nukleotidů, která je bohatá na sekvenci GC, tzv. GC svorka, upevní na jednu stranu fragmentu DNA [7]. Sekvence bází guaninu a cytosinu se připojuje na 5' konec jednoho z PCR primerů, čímž dojde k jeho zesílení. Takto upravený primer se zavádí do amplifikovaných fragmentů DNA. Délka GC svorky se může pohybovat od 30 do 50 nukleotidů. GC svorka brání, i za vysoké denaturační teploty a vysoké koncentrace denaturačních činidel, úplné disociaci fragmentů DNA. Jako náhradu GC svorky je možno použít nejrůznějších chemických svorek [41]. Další z primerů má na svém 5' konci fotoaktivační látku, např. psoralen, který je po ozáření UV světlem interkalován (vmezeřen) mezi obě vlákna DNA, které spojuje kovalentní vazbou [9].

Používání GC svorky má tu výhodu, že oba primery mají podobnou délku. GC svorka má však i své nevýhody. Zaprvé, TGGE skupiny s GC svorkou nelze z důvodů přítomnosti kovalentní vazby reamplifikovat přímo, za druhé, ozáření PCR produktů UV zářením může poškodit amplifikovanou DNA [9].

Denaturace fragmentů DNA je možno určit experimentálně pomocí gelů s kolmým gradientem. Gely s kolmým gradientem mají rostoucí gradient a denaturační teplotu směrem zleva doprava (Obr. 1). Vzorek fragmentů DNA se aplikuje přes celou šířku gelu a elektroforéza trvá zhruba 3 hodiny při napětí 200 V. Po obarvení vzorků etidiumbromidem nebo xylencyanolem a prosvícením UV zářením se vzorky jeví ve tvaru písmene S [9]. U kolmé TGGE se vzorky aplikují na jeden pás široký 15 cm na obvykle 0,5 mm silném gelu. Molekuly DNA na levé straně, kde je nízká koncentrace denaturačního prostředku a nízká teplota (4 °C), přecházejí jako dvouvláknové molekuly DNA, močovina přidaná do směsi gelu jako denaturační činidlo, usnadňuje rozplétání řetězců DNA. Na druhé straně gelu, kde je naopak koncentrace denaturačních prostředků a teplota vysoká (65 °C), dochází k rozplétání molekuly DNA na dvě samostatná vlákna, tím pádem se jednotlivé vzorky zastavují v určité oblasti gelu [7, 9]. Ve střední oblasti gelu, kde je úroveň denaturačních faktorů zhruba průměrná, se vzorky pohybují většinou pomalu v závislosti na své schopnosti pohybu. Strmý přechod v pohybu vzorků fragmentů DNA nastává v místě, kde koncentrace denaturačního činidla odpovídá teplotě denaturace fragmentu DNA s nejnižším denaturačním bodem [9].

Profily denaturačních teplot jednotlivých fragmentů DNA poskytují důležité informace o celkové stabilitě DNA. Profily denaturačních teplot se však špatně určují u fragmentů DNA, které mají denaturační přechod neostrý, a díky tomu může být profil denaturačních teplot fragmentu DNA špatně identifikován. Naopak ostrý denaturační přechod DNA naznačuje, že směsi DNA mají podobné termodynamické vlastnosti. Informace získané z kolmé TGGE jsou dále používány pro nastavení podmínek paralelní TGGE. Všechny gely používané v kolmé analýze TGGE se suší a vkládají na PhosphoImager, kde se zkoumají teploty tání jednotlivých přechodů DNA [9].

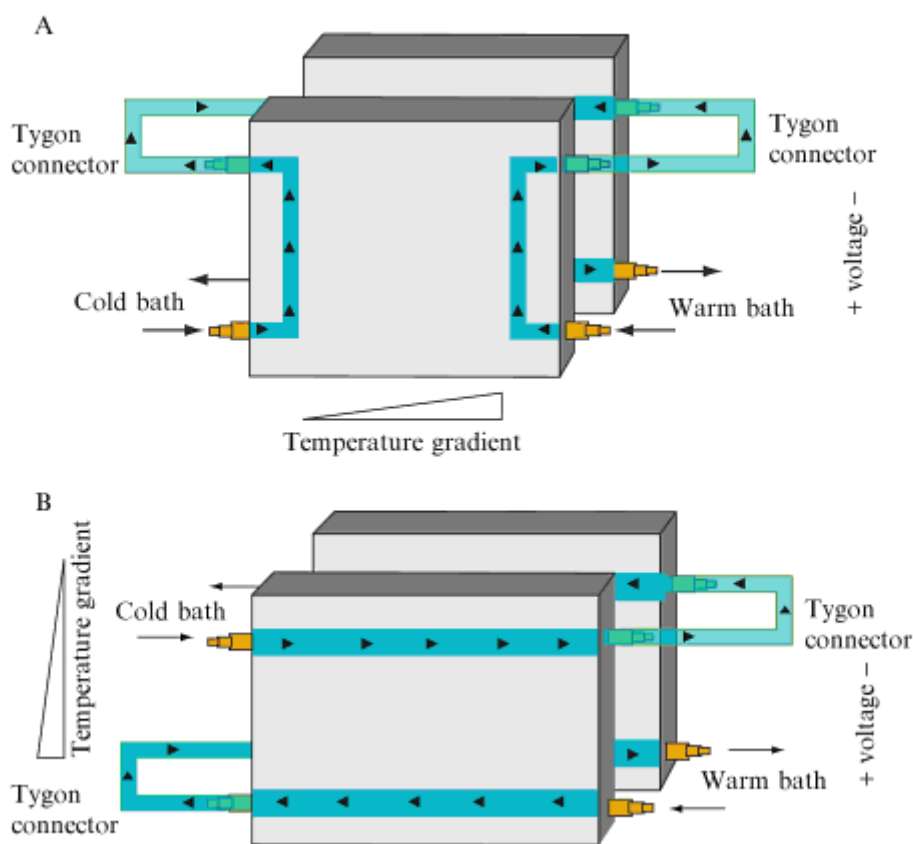
3.3 Paralelní TGGE

V gelech s paralelním gradientem stoupá teplota a množství denaturačních prostředků ve směru od horní po spodní část rovnoběžně ke směru elektroforézy (Obr. 1). V horní části

přístroje pro TGGE je teplota nízká a naopak ve spodní části přístroje je vysoká [7, 9]. Paralelní elektroforéza se používá pro více vzorků na stejném gelu. Před analýzou vzorků na paralelním gelu musí být určena doba trvání elektroforézy, abychom získali maximální možné rozdíly mezi jednotlivými fragmenty DNA [7].

Vzorky jsou v gelu silném asi 1,5 mm aplikovány jako proužky široké zhruba 10 mm. Ve srovnání s kolmou TGGE je aplikované množství vzorků v gelu menší. V paralelní TGGE procházejí vzorky menším teplotním gradientem, než je tomu u kolmé TGGE [9]. Koncentrace denaturačního činidla (močoviny) je stejná [7].

Paralelní TGGE má tu výhodu, že lze na jednom gelu aplikovat více páسů vzorků, což umožňuje zkoumání jak jednotlivých fragmentů DNA, tak jejich směsí. Stejně jako u kolmé TGGE, při průchodu vzorků gelem následuje i průchod barviv, která jsou rovněž stejná jako u kolmé TGGE. Pomocí paralelní TGGE byly rovněž zkoumány denaturační teploty přechodů DNA, ale paralelní TGGE má menší elektroforetickou pohyblivost než kolmá TGGE. Stejně jako u kolmé TGGE, i v tomto případě nejméně stabilní fragmenty DNA denaturují dříve a tím pádem se i zastavují na gelu dříve než stabilnější fragmenty.



Obr. 1. Porovnání kolmé (A) a paralelní (B) TGGE elektroforézy [9].

3.4 Barvení gelů

Fragmenty DNA v gelu je možné barvit etidiumbromidem. V nedávné době bylo objeveno nové barvivo tzv. SYBR green. Výhodou tohoto barviva je, že dokáže vybarvit i méně výrazné fragmenty DNA. Nejlepším a nejcitlivější vizualizace fragmentů je pomocí stříbra, které obarví i ty nejméně výrazné fragmenty DNA. Stříbro má však tu nevýhodu, že gely jím obarvené nelze použít pro další hybridizaci [9].

3.5 Výhody a nevýhody TGGE

Princip průběhu TGGE během separace amplifikovaných fragmentů DNA se stejnou nebo podobnou délkou řetězce, ale rozdílnou sekvencí je velmi dobře prostudován a popsán v odborné literatuře, což patří mezi hlavní výhody použití této metody v praxi [35].

Fragmenty DNA, u kterých byla provedena TGGE, mohou být z gelu odstraněny a použity pro jiné analýzy, např. sekvencování. Fragmenty DNA použité pro TGGE nemusí být izolovány pouze z kultur, které byly kultivovány, ale mohou být extrahovány téměř z jakéhokoliv prostředí [42].

Znalost teorie denurací DNA a schopnosti částečně denaturované DNA zpomalovat pohyb v gelu vyústilo k tvorbě počítačových programů, které jsou schopny vyhledat vhodné fragmenty DNA pro TGGE, naplánovat přesný průběh experimentů a vyhodnocovat výsledky. Několik studií prokázalo, že díky těmto programům došlo k omezení chyb, které by vznikly během experimentů, kdy výsledek experimentů byl jiný, než se plánovalo a tyto programy nasimulovaly jejich správný průběh. Práce s těmito počítačovými programy však předpokládá dokonalou znalost metody separace fragmentů DNA pomocí TGGE [7].

Nevýhodou této metody je nalezení správné techniky pro izolaci fragmentů DNA, dále je potřeba určité praxe při použití této metody a dodržování bezpečnosti práce s toxickými chemikáliemi jako je akrylamid. Metoda poskytuje informace pouze o přítomnosti organismů, ne o jejich činnosti. Velkou nevýhodou je, že je třeba brát na vědomí, že sekvence mezi operony 16S rRNA se může u některých organismů výrazně měnit, takže některé organismy mohou ve výsledku potencionálně produkovat více pruhů [42].

3.6 Použití TGGE v praxi

Tradiční mikrobiologické izolační techniky, které se neustále používají, jsou stále více nahrazovány novými technikami molekulární biologie. TGGE je jedna z mnoha metod molekulární biologie, která umožňuje lepší sledování dynamiky mikrobiální populace a usnadnění úspěšné izolace bakterií. Dále umožňuje lepší pochopení fyziologie mikroorganismů, jejich roli v cyklu chemických prvků aj., protože umožňuje rychlou a simultánní analýzu smíšených kultur za různých podmínek z různých vzorků [8].

V současnosti je metoda TGGE dobře zavedeným nástrojem v oblasti mikrobiologie, molekulární biologie, oblasti životního prostředí, umožňuje studium složitosti a chování mikrobiálních společenstev. Tato metoda je rychlá, spolehlivá, reprodukovatelná a relativně levná. TGGE umožňuje simultánní analýzu ve více vzorcích, díky čemuž je možné sledovat komunitní změny mikroorganismů v průběhu času [35].

Další silnou stránkou této techniky je možnost identifikovat zástupce mikrobiálních společenství sekvencováním nebo hybridizací se specifickými sondami [8, 43]. SONDY mohou být navrženy pomocí TGGE bez předchozího sekvencování zkoumaných skupin [8].

TGGE může být použita k oddělování směsí nukleových kyselin o stejné délce na základě jejich podobných termodynamických parametrů. TGGE poskytuje informace o mutačních změnách, neshodách v párování bází a přechodech helixových šroubovic. V případě jednoduché šroubovice mohou být popsány změny jednoduše detekovány [9].

Pomocí paralelní TGGE je možno oddělit oligonukleotidové sondy, které řídí syntézu nových vláken. Podobně se používá horizontální TGGE pro analýzu dvou pevně spojených přechodů v dsRNA. Tepelnou stabilitu pevných interakcí v jednotlivých párech bází v dlouhém řetězci RNA je možno určit také pomocí TGGE. TGGE lze rovněž použít pro analýzu konformačních přechodů a sekvenčních variací interakcí RNA a protein [9].

Pomocí TGGE bylo prokázáno, že kruhové viroidy jsou schopny přechodu do pomalejších migračních skupin. Pracovníkovi jsou navíc hlášeny odlišné denaturační křivky DNA genomů virů, které se jen málo liší ve svém základním složení sekvencí [9].

Při nedávných studiích bylo pomocí TGGE zkoumáno složení vod, kde byly sledovány geny 16S rRNA různých bakterií a bylo zjištěno, že v tomto prostředí žije větší množství

bakterií, než se předpokládalo. V jiných studiích byly zkoumány pomocí TGGE a PCR zdroje cesty a kontaminace bakterie *Listeria monocytogenes* [9].

Metoda TGGE má i svá omezení, kromě obecných potencionálních chyb (např. špatná manipulace se vzorkem, špatně vyizolovaná DNA nebo nedostatečná lyze buněk při PCR), mezi tato omezení patří např. špatná identifikace heteroduplexních molekul, špatná identifikace molekul s různými operony rRNA u téhož organismu. Problémy způsobují i relativně malé fragmenty DNA s různými sekvencemi či omezená schopnost odhalení mikroorganismů, které se vyskytují velmi vzácně [8].

Stejně jako jiné metody molekulární biologie, se i metoda TGGE stále vylepšuje a zdokonaluje. Mezi tato vylepšení bude patřit používání dvojitého teplotního gradientu, tzn. kombinovaného použití gradientu akrylamidu a gradientu denaturačních prostředků, používání fluoreskujících produktů PCR nebo používání tzv. fluoreskujících intra-lane standardů, které budou schopny odhalit i vzácně se vyskytující mikroorganismy [35].

Existuje jasný trend propojování metody TGGE a jiných molekulárních, mikrobiálních a geochemických metod, abychom lépe pochopili a získali reálnější představu o funkci a struktuře mikrobiálních společenství [8].

4 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

Polymerázovou řetězovou reakci (PCR, polymerase chain reactin) objevil v roce 1983 Karry Mullis, první publikace, ve které byla použita metoda PCR, byla vydána v roce 1985. Tato základní metoda molekulární biologie spočívá v několikanásobné amplifikaci určitého úseku DNA [45, 46, 47].

PCR umožňuje zmnožení určitého úseku DNA *in vitro*, aniž by byla nutnost přítomnosti živého organismu. Principem metody PCR je enzymová syntéza nově vzniklých vybraných úseků DNA. Pro úspěšnou amplifikaci konkrétních požadovaných úseků templátové DNA je potřeba vybrat vhodný pár primerů. Primery jsou oligonukleotidové sekvence, které jsou připraveny chemicky, musí být komplementární k daným úsekům DNA na obou řetězcích molekuly DNA a mají přibližnou délku 18 – 30 bází. Syntéza nových řetězců nastává, když se dva primery navážou na protilehlé řetězce DNA tak, aby jejich 3`OH konce směřovaly proti sobě [46, 47, 48, 49, 50, 51]. Primery při jejich návrhu musí hybridizovat jen s určitou sekvencí DNA za stejných teplot. Takto navržené primery musí mít téměř stejnou nebo stejnou denaturační teplotu. Tato denaturační teplota závisí na délce a poměru CG a AT párů v nukleotidové sekvenci. Vhodný pár primerů je v současnosti vybírán počítačovými programy [47, 52, 53].

V polymerázové řetězové reakci jsou používány termostabilní polymerázy, enzymy vyizolované z termofilních bakterií. Tyto bakterie díky své proteinové struktuře běžně přežívají teploty kolem 95 °C, jsou tudíž schopny snášet i denaturační teploty DNA. Nejběžnější termostabilní polymeráza je *Taq* polymeráza izolovaná z *Thermus aquaticus* [45, 46, 47]. Díky odolnosti *Taq* polymerázy je možno provádět syntézu DNA v opakujících se cyklech. V těchto cyklech se pravidelně střídají 3 kroky se 3 různými teplotami [47, 48, 53]:

1. teplota 94 – 98 °C, kdy dochází k denuraci dvouřetězcových molekul,
2. teplota 30 – 65 °C, kdy se primery připojují k řetězcům DNA, které byly odděleny,
3. teplota 65 – 75 °C, kdy nastává polymerace (prodlužování řetězce).

Každý cyklus trvá asi 5 minut a vše se děje pomocí zautomatizovaných technik. K reakci je možno použít pouze úsek DNA, který je vytyčený výše zmíněnými dvěma primery. Cyklické změny jednotlivých teplot reakčních směsí v daných časových intervalech jsou

řízeny v termocykleru (Obr. 2) [46, 47, 48]. Nastavení teplot a jejich časových intervalů řídí samotný uživatel. Jednotlivé reakční směsi jsou namíchany v malých eppendorffových mikrozkuvkách, které jsou v termocykleru uchyceny v bloku, jenž je vyhříván na požadované teploty [46, 47, 49].



Obr. 2. Piko™ Thermal Celer [54].

Přesná teplota a délka jednotlivých kroků samotné syntézy DNA je optimalizována podle délky amplifikovaného úseku DNA a dané sekvence primerů. K samotnému zahájení reakce stačí velmi malé množství molekul DNA, v teoretické rovině by stačila jen jedna molekula [55]. Během 20 – 30 cyklů dochází k požadovanému zdvojnásobení a exponenciálnímu nárůstu potřebných úseků DNA. Abychom dosáhli produkce molekul, které mají stejnou sekvenci a stejnou délku, tzv. převažující produkt reakce, je potřeba, aby se oba primery navazovaly jen na vybrané sekvence DNA. Tyto nově vzniklé molekuly, které mají stejnou délku i sekvenci, se budou při rozdělávání v gelech pohybovat stejnou rychlostí. Po obarvení těchto molekul se zobrazuje jeden určitý fragment, jehož molekulová hmotnost, při srovnání s markerem, vyhovuje předpokládané délce amplifikované sekvence DNA [47, 49, 53, 58].

Výsledné fragmenty DNA můžeme prokázat několika způsoby [47, 48, 55]:

1. prokázání jejich velikosti v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu,
2. hybridizací dle Southerna se značenou sondou, která je komplementární k části sekvence amplifikovaného úseku,
3. stanovením sekvence DNA.

4.1 Modifikace PCR

Existuje několik modifikací metody PCR [49, 56, 57]:

1. online PCR neboli real-time PCR – PCR v reálném čase,
2. AP-PCR, RAPD – PCR s náhodně amplifikovanými úseky,
3. DOP-PCR – PCR s degenerovanými oligonukleotidovými primery,
4. odstupňovaná (nested) PCR – PCR pomocí vnitřních a vnějších primerů,
5. *in situ* PCR,
6. asymetrická PCR,
7. RT-PCR – reverzní neboli zpětná PCR,
8. I-PCR – inverzní neboli obrácená PCR.

4.2 Praktické použití PCR

Techniky molekulární biologie založené na PCR našly velké uplatnění díky své jednoduchosti a citlivosti. PCR se používá hlavně pro identifikaci virových a bakteriálních patogenů, identifikaci mutací, vyhledávání a klonování specifických sekvencí, určení druhu nádoru či v soudním lékařství [47, 48, 57]. Pomocí polymerázové řetězové reakce můžeme detekovat různé polymorfismy DNA týkající se chorob, zvláště geneticky podmíněných [44, 47, 55, 58].

PCR vzhledem ke své vysoké citlivosti, dokáže vyhledat virové infekce již v počátečních stadiích. Primery jsou při těchto identifikacích odvozeny od krátkých úseků DNA virové sekvence. Takto lze prokázat, po mnohonásobném zmnožení, absenci či přítomnost i jediné kopie virové DNA ve velmi malém vzorku krve [46, 47].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍLE PRÁCE

Diplomová práce měla dva cíle. Prvním cílem diplomové práce bylo studium metod molekulární biologie, mezi něž patřila, především metoda TGGE (elektroforéza v teplotním gradientu), dále metody PCR (polymerázová řetězová reakce) a elektroforéza v agarózovém gelu.

Druhým cílem diplomové práce bylo sledovat změny zastoupení mikroorganismů během zrání sýra eidamského typu. Změny zastoupení mikroorganismů v sýrech byly sledovány porovnáním se sbírkovými kmeny bakterií mléčného kvašení.

Postup pro dosažení cílů:

- studovat a zpracovat literaturu týkající se principu a použití metod molekulární biologie (TGGE, PCR),
- stručně popsat princip a fungování metod molekulární biologie.

Ke zpracování praktické části diplomové práce bylo nutno splnit tyto jednotlivé cíle:

- stanovit správnou a reprodukovatelnou metodu izolace DNA z bakterií mléčného kvašení, jak ze sbírkových kmenů, tak také ze vzorků sýra,
- ovládnout metodiku TGGE s použitím přístrojů TGGE Maxi Systém a PikoTM Thermal Celer pro PCR,

porovnat jednotlivé kmeny bakterií mléčného kvašení vyskytující se ve vzorcích sýra se sbírkovými kmeny.

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Charakteristika vzorků

Pro studium bakterií mléčného kvašení byl použit sýr Eidam o obsahu sušiny 50 % a obsahu tuku v sušině 30 % v různém stádiu zrání. Rozměry bloků sýra byly 90 mm výška, 90 mm šířka a 140 mm hloubka, hmotnost bloků byla cca 1,4 kg. Vzorky sýra byly odebírány z jedné výrobní šarže v pravidelných intervalech (tabulka 1), kromě prvního a posledního odběru. Zrání sýru probíhalo přímo ve sklepích výrobce při teplotách 9 – 10 °C.

Tab. 1. Odběry sýrů.

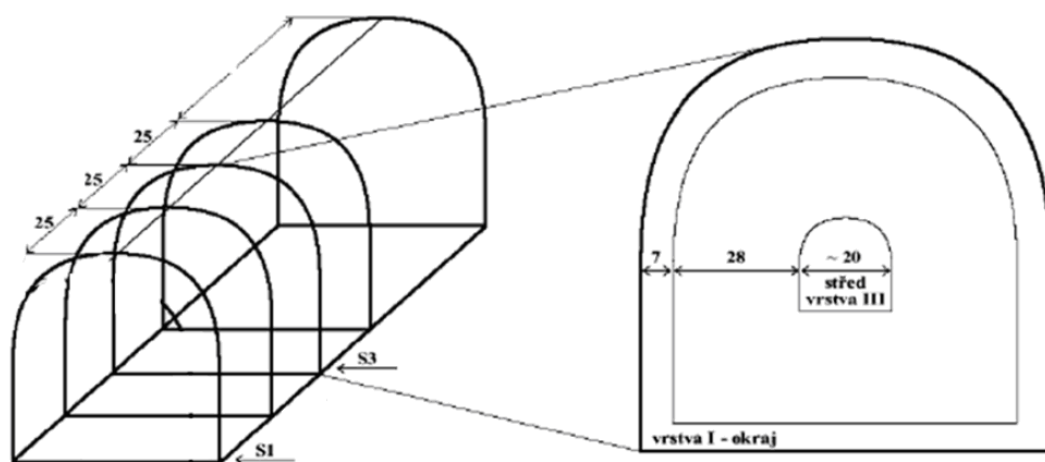
Datum odběru	Den odběru
22. 11. 2011 (den výroby)	1. den, sýr před vložením do solné lázně
24. 11. 2011	3. den sýr po solení a zabalení do kryovakového obalu
29. 11. 2011	7. den
6. 12. 2011	14. den
20. 12. 2011	28. den
3. 1. 2012	42. den
17. 1. 2012	56. den
7. 2. 2012	77. den

Z každého sýra z daného odběru byly za aseptických podmínek odebrány 4 vzorky, a to ze 2 plátů (okrajový a středový) vždy ze středu a z okraje (Obr. 3).

Pracovní postup:

1. První vzorek sýra byl odebrán z prvního plátu sýra, na obrázku označen jako S1, asi 25 mm širokého, pořízeného z konce sýra. Vzorek byl odkrojen z krajní části plátu, maximálně 7 – 10 mm do hloubky sýra (vrstva I). Tyto vzorky byly označeny jako S1 I (tabulka 2).
2. Druhý vzorek byl odebrán z prvního plátu sýra, na obrázku označen jako S1, asi 25 mm širokého, pořízeného z konce sýra. Vzorek byl vykrojen ve středu plátu (vrstva III). Tyto vzorky byly označeny jako S1 III (tabulka 2).

Třetí vzorek byl odebrán z druhého plátu sýra, na obrázku označen jako S3, asi 25 mm širokého, který byl pořízen tak, že cihla sýra byla rozkrojená na dvě poloviny a z vnitřní části poloviny byl odkrojen plát sýra. Z tohoto plátu byl vzorek odkrojen z krajní části plátu, maximálně 7 – 10 mm do hloubky sýra (vrstva I). Tyto vzorky byly označeny jako S3 I (tabulka 2).



Obr. 3. Schéma odběrů vzorků [34].

3. Čtvrtý vzorek byl odebrán ze stejného plátu sýra jako třetí vzorek s tím rozdílem, že byl vykrojen ze středu plátu (vrstva III). Tyto vzorky byly označeny jako S3 III (tabulka 2).

Tab. 2. Použité vzorky sýrů a jejich značení.

Stáří sýra	Vrstva sýra	Stáří sýra	Vrstva sýra
1. den	S1 I	28. den	S1 I
1. den	S1 III	28. den	S1 III
1. den	S3 I	28. den	S3 I
1. den	S3 III	28. den	S3 III
3. den	S1 I	42. den	S1 I
3. den	S1 III	42. den	S1 III
3. den	S3 I	42. den	S3 I
3. den	S3 III	42. den	S3 III
7. den	S1 I	56. den	S1 I
7. den	S1 III	56. den	S1 III
7. den	S3 I	56. den	S3 I
7. den	S3 III	56. den	S3 III
14. den	S1 I	77. den	S1 I
14. den	S1 III	77. den	S1 III
14. den	S3 I	77. den	S3 I
14. den	S3 III	77. den	S3 III

6.2 Použité kultury bakterií

Pro porovnání přítomnosti bakterií mléčného kvašení ve vzorcích sýra eidamského typu byly použity kultury bakterií ze Sbírký mlékárenských kultur Laktoflora[®] (Czech Collection of Dairy Microorganisms - CCDM), České sbírky mikroorganismů (CCM) a ze sbírky Ústavu technologie tuků a tenzidů (vzorky označeny jako DCT). Jednotlivé bakterie byly kultivovány nejdříve v tekutém médiu a poté byly přeočkovány na tuhé půdy [59].

6.2.1 Kultury bakterií

Pro porovnání přítomnosti bakterií byly použity tyto sbírkové kultury:

- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 421
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 823
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DCT Z-1
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DCT Z-3
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DCT Z-6
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 412
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 416
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DCT AIV-9
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* CCDM 48
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* CCDM 141
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* CCDM 354
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* CCDM 414
- *Lactobacillus casei* CCDM 422
- *Lactobacillus curvatus* CCDM 834

- *Lactobacillus curvatus* DCT AI-2
- *Lactobacillus curvatus* DCT AI-3
- *Lactobacillus curvatus* DCT AI-15
- *Lactobacillus paracasei* CCDM 393
- *Lactobacillus paracasei* CCDM 394
- *Lactobacillus paracasei* CCDM 741
- *Lactobacillus paracasei* CCDM 818
- *Lactobacillus plantarum* CCDM 183
- *Lactobacillus plantarum* CCDM 375
- *Lactobacillus plantarum* CCDM 38
- *Lactobacillus plantarum* DCT AI-7
- *Lactobacillus casei/paracasei* DCT AI-5
- *Lactobacillus casei/paracasei* DCT AIV-1
- *Lactobacillus casei/paracasei* DCT AIV-3
- *Lactobacillus casei/paracasei* DCT AIV-11
- *Lactobacillus casei/paracasei* DCT AIV-18
- *Enterococcus durans* CCDM 53
- *Enterococcus durans* CCDM 437
- *Enterococcus faecium* CCDM 816
- *Enterococcus faecium* CCDM 917
- *Enterococcus faecalis* CCM 2665
- *Enterococcus faecalis* CCM 3956
- *Enterococcus faecalis* CCM 4224
- *Enterococcus faecalis* CCM 7247
- *Escherichia coli* CCM 3954

6.2.2 Kultivační média

Bujón M17

Tab. 3. Složení bujónu M17.

Půda M17	14,9 g
Laktóza	2 g
Destilovaná voda	400 ml

Pracovní postup:

1. Bylo naváženo 14,9 g půdy M17 (Oxoid, Basingstoke, Velká Británie), 2 g laktózy (LachNer, Neratovice) a odměřeno 400 ml destilované vody.
2. Všechny komponenty byly smíchány a rozpuštěny.
3. Poté byl bujón rozpipetován do zkumavek, přičemž do každé zkumavky bylo napipetováno 5 ml bujónu.
4. Následně byly zkumavky autoklávovány při teplotě 121,1 °C po dobu 20 minut.

Agar M17 (pevná půda)

Tab. 4. Složení agaru M17.

Půda M17	14,9 g
Laktóza	2 g
Agar	5 g
Destilovaná voda	400 ml

Pracovní postup:

1. Bylo naváženo 14,9 g půdy M17 (Oxoid), 2 g laktózy (LachNer), 5 g agaru (HiMedia, Bombai, Indie) a odměřeno 400 ml destilované vody.
2. Všechny komponenty byly smíchány a rozpuštěny.
3. Poté byl agar autoklávován při teplotě 121,1 °C po dobu 20 minut.

4. Následně byl agar rozlit do Petriho misek, přičemž do každé misky bylo nalito cca 20 ml agaru.

Bujón MRS

Tab. 5. Složení bujónu MRS

Půda MRS	22 g
Destilovaná voda	400 ml

Pracovní postup:

1. Bylo naváženo 22 g půdy MRS (HiMedia) a odměřeno 400 ml destilované vody.
2. Všechny komponenty byly smíchány a rozpuštěny.
3. Poté byl bujón rozpipetován do zkumavek, přičemž do každé zkumavky bylo napipetováno 5 ml bujónu.
4. Následně byly zkumavky autoklávovány při teplotě 121,1 °C po dobu 20 minut.

Agar MRS (pevná půda)

Tab. 6. Složení agaru MRS.

Půda MRS	22 g
Agar	5 g
Destilovaná voda	400 ml

Pracovní postup:

1. Bylo naváženo 22 g půdy MRS (HiMedia), 5 g agaru (HiMedia) a odměřeno 400 ml destilované vody.
2. Všechny komponenty byly smíchány a rozpuštěny.
3. Poté byl agar autoklávován při teplotě 121,1 °C po dobu 20 minut.
4. Následně byl agar rozlit do Petriho misek, přičemž do každé misky bylo nalito cca 20 ml agaru.

6.2.3 Kultivace bakterií

Kmeny laktokoků, enterokoků a *Lactobacillus casei/paracasei* byly kultivovány v bujónu M17 při teplotě 37 °C po dobu 24 – 48 hodin, v závislosti na nárůstu bakterií. Laktobacily byly kultivovány v bujónu MRS při teplotě 37 °C po dobu 24 – 48 hodin.

Escherichia coli byla kultivována v bujónu Nutrient Broth (HiMedia) při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

Z bujónů byly kultury přeočkovány na tuhá média křížovým roztěrem. Laktokoky, enterokoky a *Lactobacillus casei/paracasei* byly přeočkovány na misky s M17 agarem a kultivovány při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. Laktobacily byly přeočkovány na misky s agarem MRS a kultivovány při teplotě 37 °C po dobu 48 hodin. *Escherichia coli* byla přeočkována na misky s PCA agarem a kultivována při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

6.3 Izolace bakteriální DNA ze vzorku sýra

Celková DNA bakterií obsažených ve vzorcích sýrů byla izolována dle následujícího postupu (modifikace dle [60]):

1. Bylo naváženo 5 g vzorku sýra, který byl rozetřen v třecí misce v 7,5 ml sterilní vody.
2. Směs byla přefiltrována přes sterilní gázu do zkumavky.
3. Z filtrátu bylo odebráno 3 ml (2 x 1,5 ml) suspenze do ependorffovy zkumavky a poté byl vzorek centrifugován při 14 000 ot/min po dobu 5 min.
4. Poté byl supernatant slit, sediment byl resuspendován a promyt 1 ml sterilní vody, opět centrifugován při 14 000 ot/min po dobu 5 minut. Promytí bylo provedeno pětkrát.
5. K sedimentu byl přidán 1 ml lyzačního roztoku (10 mM Tris-HCl /Serva, Heidelberg, SRN/, pH 7,8; 5 mM EDTA /LachNer/; lysozym /Serva/ 3 mg/ml), ve kterém byl sediment resuspendován.
6. Vzorek byl inkubován 1 hodinu při laboratorní teplotě.
7. Ke směsi bylo přidáno 50 µl 20% SDS (Serva) a 5 µl proteinasy K (1 mg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

8. Vzorčky byly inkubovány při 55°C do druhého dne.

6.4 Izolace nukleových kyselin z bakterií pomocí izolačního kitu

Pro izolaci bakteriální DNA byl použit HighPCR Template Preparation Kit (Roche, Basilej, Švýcarsko). Pracovní postup byl následující [61]:

1. Do ependorffovy zkumavky bylo napipetováno 200 μ l suspenze bakterií, které byly kultivovány v příslušných bujónech přes noc.
2. Poté byl vzorek centrifugován při 3 000 ot/min po dobu 5 minut.
3. Následně byl supernatant slit a sediment resuspendován a promyt v 200 μ l 0,01 M PBS pufru (Phosphate Buffered Saline, pufovaný fyziologický roztok; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄.12H₂O; 1,76 mM KH₂PO₄; vše LachNer). Promytí bylo provedeno dvakrát.
4. Po druhém promytí byla suspenze buněk v PBS ponechána ve zkumavce a do každé zkumavky bylo přidáno cca 4 – 5 sterilních skleněných kuliček o průměru 0,5 mm.
5. Ependorffovy zkumavky byly vloženy do kovového válce se 7 otvory pro zkumavky. Válec byl uzavřen a vložen do kulového mlýnku, kdy proběhla desintegrace buněk pomocí sterilních skleněných kuliček. Desintegrace byla třikrát opakována po dobu 3,33 minuty a frekvence 30 úderů za sekundu.
6. Zkumavky byly vyjmuty z kovového válce, do každé z nich bylo k suspenzi PBS a lyzátu přidáno 5 μ l lysozymu (0,1 mg/ml; Serva). Mikrozukumavky byly vloženy do termostatu, kde byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 10 minut,
7. K této suspenzi bylo přidáno 200 μ l vazebného pufru (Binding Buffer, Roche) a 40 μ l proteinasy K (5 mg/ml; Sigma-Aldrich). Suspenze byla inkubována při teplotě 70 °C po dobu 10 minut.
8. Směs byla přepipetována z ependorffovy zkumavky do tzv. kolonky (plastové uzavíratelné zkumavky s filtrem na dně, která byla vložena do další plastové neuzavíratelné zkumavky). Směs byla centrifugována po dobu 1 minuty při 8000 ot/min.

9. Supernatant, jenž prošel filtrem, byl slit a do filtrační zkumavky bylo přidáno 500 μ l inhibičního pufru (Inhibitor Removal Buffer, Roche). Směs byla centrifugována po dobu 1 minuty při 8000 ot/min.
10. Supernatant, jenž prošel filtrem, byl slit a do filtrační zkumavky bylo přidáno 500 μ l promývacího pufru (Wash Buffer, Roche). Směs byla centrifugována po dobu 1 minuty při 8000 ot/min. Tento krok byl dvakrát opakován. Následně byl supernatant slit a filtrační zkumavky byly centrifugovány na maximální otáčky po dobu 10 sekund.

Filtrační zkumavky byly vloženy do ependorffových zkumavek a do filtrační zkumavky bylo napipetováno 200 μ l elučního pufru (Elution Buffer, Roche). Směs byla centrifugována po dobu 1 minuty při 8000 ot/min. Filtrační zkumavky byly odstraněny a čistá DNA, která byla v ependorffových zkumavkách, byla uložena do mrazničky k dalšímu použití.

6.5 Izolace nukleových kyselin z bakterií pomocí fenol – chloroformové extrakce

Pracovní postup [60]:

1. Do ependorffovy zkumavky bylo napipetováno 1,5 ml suspenze bakterií, které byly kultivovány přes noc v příslušných bujónech.
2. Poté byl vzorek centrifugován při 3 000 ot/min po dobu 5 minut.
3. Následně byl supernatant slit a sediment resuspendován a promyt v 200 μ l 0,01 M PBS pufru. Promytí bylo provedeno 2x.
4. K suspenzi buněk v PBS bylo přidáno 5 μ l lysozymu (0,1 mg/ml; Serva) a 20 μ l 10% SDS (Serva). Mikrozkušavky byly vloženy do termostatu, kde byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny.
5. K této suspenzi bylo přidáno 10 μ l proteinasy K (5 mg/ml; Sigma-Aldrich). Suspenze byla inkubována při teplotě 50 °C po dobu 30 minut nebo až do projasnění suspenze.
6. K takto připravenému lyzátu bylo přidáno stejné množství předestilovaného fenolu. Poté byla kývavým pohybem směs promíchávána po dobu 4 minut.

7. Směs byla centrifugována po dobu 1 minuty při 4 °C a 12 000 ot/min.
8. Vodná fáze s DNA byla odebrána do čisté ependorffové zkumavky. Odebírání bylo potřeba provádět opatrně, aby nebyla odebrána rovněž proteinová vrstva.
9. Do odebrané vodné fáze byl přidán stejný objem směsi fenol:chloroform (1:1). Poté byla kývavým pohybem směs promíchávána po dobu 4 minut.
10. Následně byla opět provedena centrifugace 1 minutu při 4 °C a 12 000 ot/min.
11. Vodná fáze s DNA byla odebrána do čisté ependorffové zkumavky, do níž bylo přidáno 300 µl směsi CIZ (chloroform:izoamylalkohol 24:1; LachNer).
12. Směs byla řádně promíchána a centrifugována po dobu 1 minuty při 4 °C a 12 000 ot/min.
13. Poté byla opět odebrána vodná fáze s DNA do čisté zkumavky.
14. K DNA ve vodné fázi bylo přidáno 1/10 objemu octanu sodného (LachNer) na konečnou koncentraci 0,1 – 0,3M a směs byla důkladně promíchána.
15. Ke směsi bylo poté přidáno 2,5 objemu etanolu a opět promícháno.
16. Směs byla inkubována po dobu 30 minut při -20 °C.
17. Následně byla opět provedena centrifugace po dobu 30 minut při 4 °C a 12 000 ot/min a supernatant byl řádně slit.
18. Sediment byl usušen v termostatu.

Poté byl sediment rozpuštěn v 50 µl TE pufru (Serva). Izolovaná DNA byla uložena do mrazničky k dalšímu použití.

6.6 PCR reakce

6.6.1 Příprava směsi pro PCR

Směs pro PCR musí obsahovat několik chemikálií (tabulka 7): sterilní vodu pro molekulární biologii, DNA, polymerázu (Roche) s 2 primery (Roche), v našem případě primery označené 518r, GC 341f. Díky GC 341f primeru (označován také jako tzv. GC svorka), lze identifikovat maximální počet úseků DNA. Oba primery, jak 518r tak i GC

341f, mají velmi podobnou denaturační teplotu. Aby se zamezilo kontaminaci vzorků, byl do směsi přidán psoralen (Roche).

Tab. 7. Složení směsi pro PCR.

Složení směsi	25 μ l
Sterilní voda pro molekulární biologii	9,5 μ l
<i>Taq</i> polymeráza	12,5 μ l
Primer GC 341 f	1 μ l
Primer 518 r	1 μ l
DNA	1 μ l
Psoralen	2 μ l na 50 μ l <i>Taq</i> polymerázy

Reakční směs pro PCR byla připravena v tzv. stripech, což je 8 spojených malých (100 μ l) endorffových zkumavek pro PCR, v laminárním boxu za aseptických podmínek, aby nedošlo ke kontaminaci jednotlivých komponent podle následujícího postupu.

1. Do stripů byly napipetovány jednotlivé komponenty v následujícím pořadí: sterilní voda pro molekulární biologii, *Taq* polymeráza (Roche), primer 518r (Roche), primer GC 341f (Roche).
2. Tato směs byla poté vložena na 4 minuty do transiluminátoru a z důvodu zamezení kontaminace DNA vzorků byla ozářena UV paprsky.
3. Následně byla ke směsi přidána DNA izolována ze sýrů či mikroorganismů.
4. Po přidání DNA byly stripy se směsí centrifugovány a vloženy do termocykleru PikoTM Thermal Celer (Finnzymes; Vanda, Finsko), kde probíhala amplifikace po dobu 2 hodin a 6 minut podle následujícího programu (tabulka 8):

Tab. 8. Průběh PCR a počet cyklů [62].

Počáteční denaturace (separace řetězců DNA)	94 °C po dobu 5 minut	
Denaturace	94 °C po dobu 30 sekund	10 cyklů
Annealing	61 °C po dobu 30 s a poté se teplota snižovala o 0,5 °C	
Extenze	72 °C po dobu 1 minuty	
Denaturace	94 °C po dobu 30 sekund	25 cyklů
Annealing	53 °C po dobu 30 sekund	
Extenze	72 °C po dobu 1 minuty	

Takto připravené PCR amplikony byly detekovány pomocí agarózové elektroforézy a následně pomocí elektroforézy s teplotním gradientem.

6.6.2 Elektroforéza v agarózovém gelu a detekce PCR produktu

K detekci amplifikovaných PCR produktů byla použita elektroforéza v agarózovém gelu. Pomocí elektroforézy v agarózovém gelu lze detekovat jak amplifikované fragmenty DNA, tak i jejich kvalitu. K detekci DNA fragmentů byl v našem případě použit 0,8% agarózový gel, který byl připraven dle následujícího postupu:

1. Do erlenmeyerovy baňky bylo naváženo 8 g agarózy (Sea[®]Kem LE Agarose, Lonza, Basilej, Švýcarsko). Do agarózy bylo přidáno 100 ml 0,5x TAE pufru (Serva). Tato směs byla promíchána a vložena do mikrovlnné trouby, kde došlo k jejímu zahřátí na bod varu a rozpuštění.
2. Do rozpuštěné agarózy bylo přidáno 5 μ l etidiumbromidu (Serva). Rozpuštěný agarózový gel byl nalit do plastové vaničky pro elektroforézu, do které byly poté vloženy 2 nebo 1 hřeben.
3. Poté gel polymeroval po dobu 30 – 40 minut při pokojové teplotě.
4. Mezitím bylo do stripů s DNA amplikony přidáno 5 μ l nanášecího pufru.
5. Po utužení gelu byly hřebeny vyjmuty a do každé jamky bylo napipetováno 7 μ l vzorku, přičemž do první jamky byl použit 100 bp DNA standard (New England BioLabs, Londýn, Velká Británie) k výpočtu velikostí DNA frakcí.
6. Elektroforéza probíhala po dobu 45 – 50 minut při napětí 90 V.

Po proběhnutí separaci byly vzorky vizualizovány v UV transiluminátoru, kde proběhla i dokumentace pomocí fotoaparátu. Vzniklé fotografie byly označeny a uloženy do počítače.

6.7 TGGE

6.7.1 Příprava chemikálií

Ještě před vlastním provedením TGGE bylo nutno připravit následující roztoky: 50x TAE pufr, nanášecí pufr, Thermal coupling roztok.

50x TAE pufr

1000 ml TAE pufr bylo připraveno následujícím postupem [63]:

1. 2, 242 g Tris báze (Serva) bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody.
2. Do této směsi bylo poté přidáno 57,1 ml ledové kyseliny octové (LachNer) a 100 ml 0,5 M EDTA (kyselina etylendiamintetraoctová), která byla připraven rozpuštěním 18,61 g EDTA (LachNer) ve 100 ml destilované vody. Následně bylo upraveno pH pomocí NaOH na hodnotu pH 8
3. Roztok byl doplněn na objem 1000 ml.

Thermal coupling roztok

Bylo připraveno 100 ml Thermal coupling roztoku, který se skládá z 0,1% Tweenu 20 (Roche).

2x TAE pufr

1000 ml tohoto pufru bylo připraveno zředěním 50x TAE pufru (Serva). Tento roztok, jenž musí být skladován v temnu, je možno recyklovat až 8x.

6.7.2 Příprava gelu pro TGGE

Příprava gelu je poměrně náročná především z důvodů správného složení skleněné aparatury pro polymeraci gelů a plnění aparatury roztokem gelu. Během práce s přípravou gelu a celé manipulace s monomery i polyakrylamidovým gelem je potřeba mít ochranné pomůcky (rukavice, při lití gelu ochranné brýle), protože je manipulováno s karcinogenními nebo toxickými látkami.

Celá skleněná aparatura je složena ze dvou skleněných desek (jedna bez spaceru a druhá se spacerem), gumového těsnění a polybond folie. Skleněná aparatura byla připravena podle následujícího postupu [63]:

1. Obě skleněné desky byly důkladně omyty saponátem, osušeny a poté byla vnitřní strana desek opláchnuta etanolem, který se nechal odpařit.
2. Na skleněnou desku bez spaceru byly nanесeny 2 ml destilované vody, na kterou byla přitisknuta polybond folie, která byla na horní straně opatřena lepicí páskou.

- Poté bylo na vnitřní stranu skleněné desky se spacerem přiloženo těsnění. Těsnění musí být důkladně přiloženo, jinak by došlo k vytečení roztoku gelu. Na takto připravenou desku s těsněním byla pečlivě přiložena druhá skleněná deska.
- Obě skleněné desky byly k sobě přichyceny 11 kovovými sponami.

Příprava gelu

Polyakrylamidový gel pro TGGE byl připraven dle následujícího postupu [63]:

- Do 100 ml kádinky s míchadlem byla navážena močovina (Promega; Edison, USA), poté byl přidán akrylamid (Sigma-Aldrich), formamid (Sigma-Aldrich), TAE (Serva) a glycerol (Sigma-Aldrich) v množství uvedeném v tabulce 9.

Tab. 9. Složení roztoku pro přípravu polyakrylamidového gelu [63].

Složení gelu	50 ml
Akrylamid (8%)	10 ml
Formamid (20%)	10 ml
Močovina	24 g
TAE (50x)	2 ml
Glycerol	2,5 ml
Voda pro molekulární biologii	cca 5 ml

- Směs byla zahřívána při 50 °C a míchána po dobu 20 – 30 minut dokud nebyly rozpuštěny krystaly močoviny.
- Po rozpuštění močoviny byla směs chlazená mícháním na pokojovou teplotu.
- Když byla směs zchlazená na pokojovou teplotu, byla přidána polymerační činidla: 50 µl persíranu amonného (APS 10%, Sigma-Aldrich) a 110 µl N,N,N',N'-tetrametylenediaminu (TEMED, Sigma-Aldrich).
- Po přidání polymeračních činidel byla směs dokonale promíchána a ihned injekční stříkačkou dávkována přes sterilní filtr mezi připravená skla. Dávkování bylo nutné provést z důvodu rychlé polymerace směsi rychle.
- Naplněná skleněná aparatura byla přenesena do termostatu, kde docházelo po dobu 3 hodin při teplotě 30 °C k polymeraci gelu.

7. Během polymerace byla připravena elektroforetická jednotka TGGE Maxi Systém (Biometra; Goettingen, Německo).

Po uplynutí polymerační doby byly ze skleněné aparatury odstraněny kovové spony a gel byl opatrně vyjmut, aby nedošlo k jeho poškození.

6.7.3 Elektroforéza v teplotním gradientu

Vlastní elektroforéza probíhá v přístroji TGGE Maxi System od německé společnosti Biometra. Vedení elektrického proudu v tomto přístroji s horizontálním elektroforetickým systémem je zprostředkováváno pomocí dvou speciálních žínek namočených do pufru (2x TAE), které přiléhají druhou stranou na gel.

Pracovní postup [63]:

1. Z přístroje TGGE Maxi Systém byl odejmut kryt s elektrodami a poté kryt termobloku a oba zásobníky na pufr byly po rysku naplněny 2x TAE pufrem.
2. Na plochu termobloku byly napipetovány 2 ml thermal coupling roztoku, který byl dokonale rozetřen po jeho povrchu.
3. Gel, který byl vyjmut ze skleněné aparatury, byl položen a upevněn lepicí páskou na termoblok s rozetřeným thermal coupling roztokem.
4. Speciální žínky, které byly vyvařeny v destilované vodě, byly namočeny do pufru, poté jedním koncem položeny na gel, přičemž druhý konec byl vložen do pufru.
5. Na gel byl přiložen aplikátor, do něhož se aplikují vzorky DNA. Aplikátor musí být přiložen na první pokus, jinak by z něj vzorky vytekly do gelu.
6. Následně byla na gel přiložena krycí folie tak, že jedna strana končila pod aplikátorem a druhá strana končila těsně před žínkou.
7. Na aplikátor byly nanесeny vzorky připravené v předešlém kroku pomocí PCR. Do každé jamky bylo pipetováno 5 μ l vzorku DNA.
8. Po nadávkování DNA byl termoblok přikryt víkem a celá aparatura byla přikryta víkem s elektrodami.

Následně byl přístroj zapnut a celá separace trvala 18 hodin za podmínek uvedených v tabulce 10, přičemž teplota t_1 je počáteční teplota a t_2 je konečná teplota. Separace

probíhala při konstantním napětí 130 V. Změny proudu byly způsobeny v závislosti na Ohmově zákonu.

Tab. 10. Podmínky detekce pomocí TGGE.

teplota t_1	35 °C
teplota t_1	55 °C
napětí U	130 V
proud A	35 - 41 mA

6.7.4 Barvení gelu

Jak již bylo zmíněno v teoretické části, gel s fragmenty DNA může být barven několika barvivy. Nejpoužívanější barviva jsou etidiumbromid, stříbro, SYBR green a GelStar. Každé z uvedených barviv se liší citlivostí. V našem případě bylo použito barvivo GelStar, což je fluorescenční barvivo o vysoké citlivosti.

Pro zobrazení výsledků sloužil UV transiluminátor.

Pracovní postup [63]:

1. GelStar barvivo (Cambrex) bylo vyjmut z mrazničky, kde musí být skladováno při -20 °C , promícháno a zcentrifugováno.
2. Gel vyjmutý z TGGE aparatury byl vložen do plastové vany.
3. Do plastové vany bylo přidáno vypočítané množství GelStar barviva, v našem případě bylo k 5 μl barviva přidáno 50 ml elektroforetického pufru.
4. Plastová vana s gelem byla vložena na třepačku, u které byla nastavena frekvence třepání 450 ot/min, třepačka byla zakryta hliníkovou folií. Poté byla plastová vana s gelem třepána 2 – 3 hodiny.

Následně byl gel z vany vyjmut a vložen do transiluminátoru, kde proběhla jeho vizualizace a dokumentace pomocí fotoaparátu (Canon, Power Shot G6, Japonsko). Výsledky byly pro další zpracování uloženy do počítače.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

Ve studii bylo použito 15 kmenů bakterií rodu *Lactococcus*, 18 kmenů rodu *Lactobacillus*, 8 kmenů bakterií rodu *Enterococcus* a 1 kmen *Escherichia coli*. Z těchto 42 kmenů různých rodů bakterií bylo následně vybráno 8 rodů, které byly použity jako kontrolní mikroorganismy pro porovnání výskytu bakterií mléčného kvašení v sýrech.

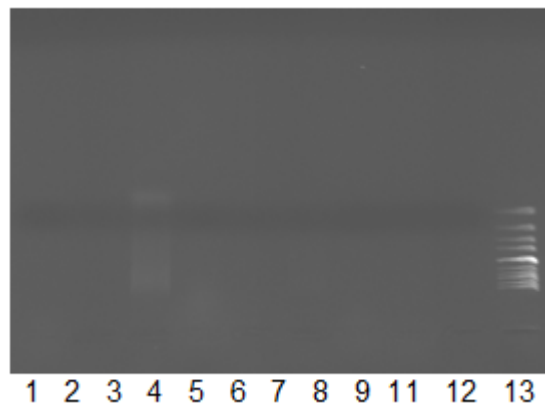
U všech 8 vzorků sýra, které byly odebírány v různých fázích výroby nebo zrání, byla izolována DNA mikroorganismů, která byla následně porovnávána s DNA kontrolních mikroorganismů. Pomocí tohoto srovnání bylo možné posoudit změny v zastoupení mikroorganismů během zrání sýrů.

7.1 Optimalizace metod izolace DNA z bakterií mléčného kvašení

Jedním z cílů diplomové práce byla optimalizace metod izolace DNA z bakterií mléčného kvašení. Izolace DNA z BMK byla složitá, protože BMK patří mezi grampozitivní bakterie a mají tudíž silnou buněčnou stěnu tvořenou peptidoglykanem. Peptidoglykan dodává buněčné stěně těchto bakterií dostatečnou tvrdost a tuhost, a proto je velmi obtížné buněčnou stěnu rozbít a získat tak potřebnou genetickou informaci [2, 3]. Pro izolaci DNA z BMK bylo vyzkoušeno několik níže popsaných metod.

7.1.1 Izolace DNA pomocí kitu

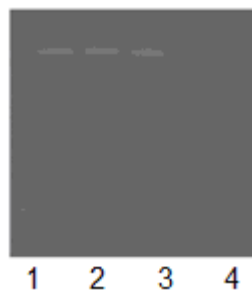
Prvním pokusem izolace DNA byla metoda popsaná v kapitole 6.4 bez mechanické desintegrace buněk (tj. bez použití sterilních skleněných kuliček), pouze pomocí High PCR Template Preparation Kit. V tomto případě byl výtěžek izolace velmi nízký, množství vyizolované DNA bylo na agarózovém gelu prakticky neznatelné. Ve výsledku se na gelu nepatrně objevila pouze DNA mikroorganismu *Lactobacillus curvatus*, DNA ostatních mikroorganismů byla vyizolována v ještě nižší koncentraci (Obr. 5).



Obr. 4. Izolovaná DNA vybraných BMK. 1. *Lbc. casei/paracasei* DCT AIV-1, 2. *Lbc. plantarum* DCT AI-7, 3. *Lbc. plantarum* DCT AI-7, 4. *Lbc. Curvatus* CCDM 834, 5. *L. lactis* subsp. *lactis* DCT LIV-9, 6. *E. durans* CCDM 437, 7. *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, 7. *L. lactis* subsp. *lactis* DCT Z-3, 8. *Lbc. casei/paracasei* DCT AI-5, 9. *L. lactis* subsp. *lactis* DCT Z-3, 10. *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004, 11. *L. lactis* subsp. *lactis* CCDM 53, 12. marker 100 bp.

7.1.2 Izolace DNA pomocí desintegrace buněk

Dalším pokusem izolace DNA byla izolace genetické informace způsobem popsaným v kapitole 6.4 s použitím sterilních skleněných kuliček a následně pomocí High PCR Template Preparation Kit. Výsledek byl lepší než u předcházející metody bez mechanické desintegrace buněk. Ve výsledku byla na gelu patrná DNA mikroorganismů (Obr. 6). *Lactobacillus. casei/paracasei*, *Lactobacilus plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus curvatus* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*.



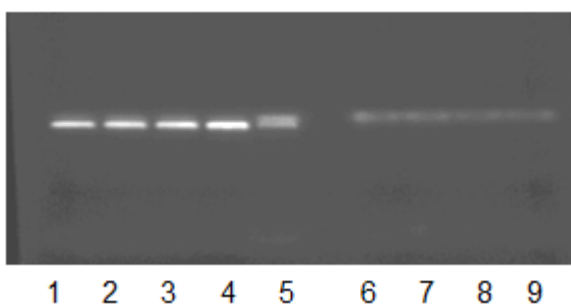
Obr. 5. DNA vybraných BMK izolovaná pomocí desintegrace buněk a kitu. 1. *L. lactis* subsp. *cremoris* DCT Z-3, 2. *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, 3. *Lbc. curvatus* DCT LI-2, 4. *Lbc. plantarum* DCT LI-7.

7.1.3 Izolace nukleových kyselin pomocí fenol – chloroformové extrakce

Fenol – chloroformová extrakce bakteriální DNA byla použita ke srovnání izolace DNA různými metodami. Základem metody je lyze buněk, která se nejčastěji provádí pomocí lysozymu. Díky lyzi buňky se buněčný obsah uvolní do extrakčního pufu, ke kterému se přidává proteínasa K štěpící proteiny. Přidáním fenolu a chloroformu dochází k extrakci, kdy se do fenolu vysráží lipidy, bílkoviny, polysacharidy a nukleové kyseliny zůstanou ve vodné fázi. K vysrážení nukleových kyselin z vodného prostředí se používá absolutní etanol [64].

Tato metoda má nejvyšší výtěžnost izolované DNA, má však jednu velkou nevýhodu, je časově velmi náročná a jedna izolace trvá několik hodin. Z tohoto důvodu nebyla použita pro izolaci DNA ze sýrů a BMK.

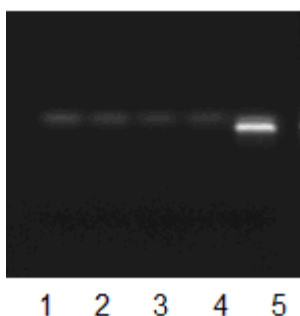
V našem případě byla tato metoda zkoušena ve dvou variantách, s použitím závěrečného kroku, tj. vysrážení DNA absolutním etanolem a z důvodu zkrácení doby izolace i bez vysrážení nukleových kyselin etanolem. Na Obr. 7 byly u vzorků 1 – 4 nukleové kyseliny vysráženy pomocí absolutního etanolu, u vzorků 6 – 9 byl krok srážení pomocí absolutního etanolu vypuštěn. Vysrážení absolutním etanolem napomohlo k získání čisté DNA ve vyšší koncentraci, avšak výsledné množství roztoku DNA je menší. V případě nevysrážení DNA absolutním etanolem byla získána rovněž DNA, která však v nižší koncentraci, avšak pro další použití v PCR byla pro naše účely dostačující.



Obr. 6. DNA vybraných BMK izolovaná fenol-chloroformovou extrakcí se závěrečným vysrážením etanolem (jamky 1 – 4) a bez vysrážení etanolem (jamky 6 – 9). 1. *L. lactis* subsp. *cremoris* DCT Z-3, 2. *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, 3. *Lbc. curvatus* DCT LI-2, 4. *Lbc. plantarum* DCT LI-7, 5. pozitivní kontrola, 6. *L. lactis* subsp. *cremoris* DCT Z-3, 7. *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, 8. *Lbc. curvatus* DCT LI-2, 9. *Lbc. plantarum* DCT LI-7.

7.1.4 PCR s použitím FastStart PCR Master

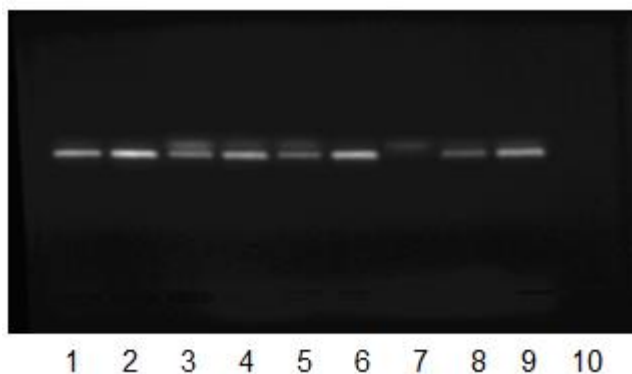
V tomto pokusu byl použit FastStart PCR Master (Roche), neboli master mix pro přípravu PCR. Master mix se liší složením od používané směsi pro PCR uvedené v tabulce 6. Použitý master mix obsahuje *Taq* polymerázu, pufr pro polymerázu, deoxyribonukleotidy (dNTP). Dále byly použity primery 518r (Roche) a GC 341f (Roche). Pomocí této modifikace byly amplifikovány PCR produkty, jak je vidět na Obr. 8. FastStart PCR Master mix však nebyl pro další experimenty použit z finančních důvodů.



Obr. 7. PCR amplicony s použitím FastStart PCR Master mixu. 1. *L. lactis* subsp. *cremoris* DCT Z-3, 2. *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, 3. *Lbc. curvatus* DCT LI-2, 4. *Lbc. plantarum* DCT LI-7, 5. pozitivní kontrola.

7.1.5 PCR s izolovanou DNA

V tomto pokuse byla provedena PCR s DNA izolovanou postupem popsaným v kapitole 6.4 s použitím sterilních skleněných kuliček a následně pomocí izolačního kitu. Pomocí PCR bylo dosaženo požadovaného výsledku, kdy byly syntetizovány DNA amplicony v dostatečné koncentraci. Ve výsledku byly na gelu zobrazeny PCR produkty všech použitých mikroorganismů. Zároveň byl z důvodů zjištění možné kontaminace použit také kontrolní vzorek, který místo templátové DNA obsahoval sterilní vodu pro PCR. Kontrolní vzorek byl negativní, tudíž se kontaminace reagentů pro PCR nevyskytovala (Obr. 9).

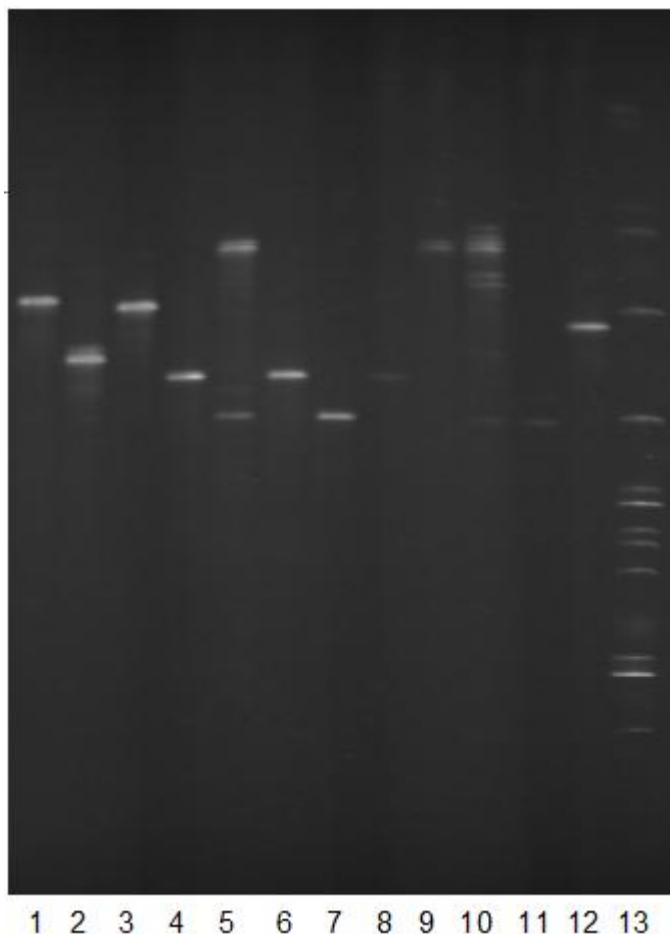


Obr. 8. PCR s izolovanou DNA 1. *E. faecalis* CCDM 3954, 2. *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 7247, 3. *Lbc. plantarum* DCT AI-7, 4. *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 824, 5. *Lbc. curvatus* DCT LI-2, 6. *L. casei* CCDM 422, 7. *Lbc. casei/paracasei* DCT LI-5, 8. *Lbc. helveticus* CCDM 807, 9. *L. lactis* subsp. *lactis* DCT AIV-9, 10. kontrolní vzorek bez DNA.

7.2 Detekce mikroorganismů pomocí TGGE

7.2.1 Detekce bakterií mléčného kvašení

Na základě předchozí detekce mikroorganismů pomocí PCR, několika „testovacích“ gelů TGGE a předpokládaného mikrobiálního složení sýra Eidam 30 %, bylo ze 42 kmenů mikroorganismů vybráno 12 mikroorganismů, které sloužily pro porovnání výskytu mikroorganismů v sýrech v různém stadiu zrání. Na obrázku 10 je vizualizováno 12 kmenů, které byly použity jako srovnávací mikroorganismy: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DCT AIV-9, *Lactobacillus plantarum* DCT AI-7, *Lactobacillus casei* CCDM 422, *Lactobacillus curvatus* CCDM 834. *Enterococcus durans* CCDM 53, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* CCDM 141, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM, 946, *Enterococcus faecalis* CCM 7247, *Escherichia coli* CCM 3954.



Obr. 9. TGGE – skrining vybraných bakterií. 1. *E. coli* CCM 3954, 2. *E.s faecalis* CCM 7247, 3. *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, 4. *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* CCDM 141, 5. *Lbc. casei/paracasei* DCT AI-5, 6. *E. durans* CCDM 53, 7. *Lbc. curvatus* CCDM 834, 8. *E. faecium* CCM 917, 9. *Lbc. casei* CCDM 422, 10. *Lbc.s paracasei* CCDM 393, 11. *Lbc. plantarum* DCT AI-7, 12. *L. lactis* subsp. *lactis* DCT AIV-9, 13. standard 100 bp.

7.2.2 Detekce mikroorganismů v sýrech ve stadiu zrání 1 – 14 dnů

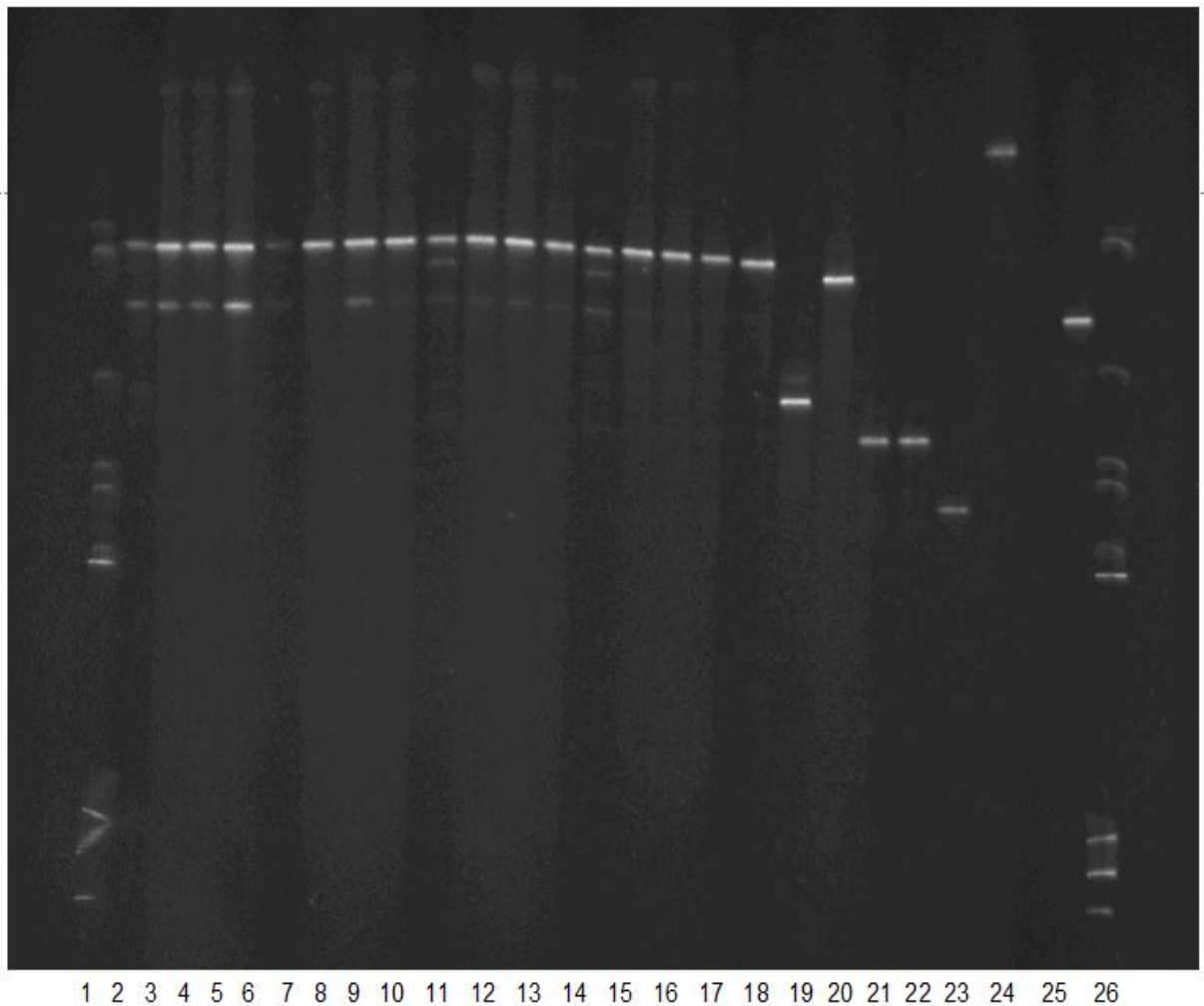
Na obrázku 11 jsou zobrazeny sýry ve stadiu zrání 1 – 14 dnů a 8 kontrolních mikroorganismů. Z obrázků jasně vyplývá, že v prvních 14 dnech převládá v sýrech mikroorganismus *E. coli*. Konkrétně byl tento mikroorganismus nalezen v největším množství ve vzorku ze 14. dne ze středového plátu ze střední vrstvy (14 S3 III), v nejmenším množství byla *E. coli* nalezena ve vzorku ze 7. dne z okrajového plátu ze střední vrstvy (7 S1 III). *E. coli* byla rovněž nalezena ve velkém množství na začátku zrání, z 1. dne z okrajového plátu z krajní vrstvy (1 S1 I), s tím, že se její množství od vzorku z 1.

dne z okrajového plátu z krajní vrstvy (1 S1 I) plynule zmenšovalo do vzorku ze 7. dne z okrajového plátu ze střední vrstvy (7 S1 III) a od vzorku ze 7. dne ze středového plátu ze střední vrstvy (7 S3 III) se její přítomnost opět zvětšovala.

Druhým nejvíce vyskytovaným mikroorganismem byl *L. lactis* subsp. *cremoris*. *L. lactis* subsp. *cremoris*, který je součástí startérové kultury. Tento mikroorganismus se vykytoval v největším množství ve vzorku ze 14. dne ze středového plátu ze střední vrstvy (14 S3 III), v nejmenším množství byl nalezen ve vzorku ze 7. dne z okrajového plátu ze střední vrstvy (7 S1 III). Dále byl *L. lactis* subsp. *cremoris* nalezen ve velkém množství na začátku zrání ve vzorku z 1. dne z okrajového plátu z krajní vrstvy (1 S1 I) a na konci zrání zobrazeného gelu vzorku ze 14. dne ze středního plátu ze střední vrstvy (14 S3 III) byla jeho přítomnost největší s tím, že jeho množství se od vzorku z 1. dne z okrajového plátu z krajní vrstvy (1 S1 I), plynule zmenšovalo do vzorku ze 7. dne z okrajového plátu ze střední vrstvy (7 S1 III) a od vzorku ze 7. dne ze středového plátu ze střední vrstvy (7 S3 III) se jeho přítomnost opět zvětšovala.

Třetím nejvíce vyskytovaným mikroorganismem ve vzorcích sýrů z 1 – 14 dne byl *L. lactis* subsp. *lactis*, který je opět součástí startovací kultury. V největším množství byl tento mikroorganismus nalezen v nejméně vyžralých vzorcích sýra, tzn. vzorky z 1. dne z okrajového plátu z krajní vrstvy (1 S1 I), z 1. dne z okrajového plátu ze střední vrstvy (1 S1 III), z 1. dne ze středového plátu z krajní vrstvy (1 S3 I) a z 1. dne ze středového plátu ze střední vrstvy (1 S3 III). Postupně však jeho množství ubývalo až do vzorků ze 14. dne ze středového plátu ze středové vrstvy (14 S3 III), kde nebyl téměř detekován.

Ve vzorcích sýra starých 1 – 14 dnů nebyly nalezeny jiné mikroorganismy. Pro tyto mikroorganismy byla pravděpodobně doba prvních 14 dnů velmi krátká pro jejich rozvoj. V těchto vzorcích nebyly detekovány tyto mikroorganismy: *E. faecalis*, *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, *E. durans*, *Lbc. casei* a *Lbc. plantarum*.



Obr. 10. Zastoupení mikroorganismů ve vzorcích sýrů z období 1 – 14 dnů. 1. standard 100 bp 2. 1. den S1 I, 3. 1. den S3 III 4. 1. den S3 I, 5. 1. den S3 III, 6. 3. den S1 I, 7. 3. den S1 III, 8. 3. den S3 I, 9. 3. den S3 III, 10. 7. den S1 I, 11. 7. den S1 III, 12. 7. den S3 I, 13. 7. den S3 III, 14. 14. den S1 I, 15. 14. den S1 III, 16. 14. den S3 I, 17. 14. den S3 III, 18. *E. coli* CCM 3954, 19. *E. faecalis* CCM 7247, 20. *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, 21. *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* CCDM 141 A, 22. *E. durans* CCDM 53, 23. *Lbc. casei* CCDM 422, 24. *Lbc. plantarum* DCT AI-7, 25. *L. lactis* subsp. *lactis* DCT AIV-9, 26. standard 100 bp.

7.2.3 Detekce mikroorganismů v sýrech ve stadiu zrání 28 – 77 dnů

Na obrázku 12 jsou zobrazeny sýry ve stadiu zrání 28 – 77 dnů a 8 mikroorganismů pro srovnání zastoupení mikroorganismů. V těchto déle zrajících sýrech bylo složení mikroorganismů rozmanitější.

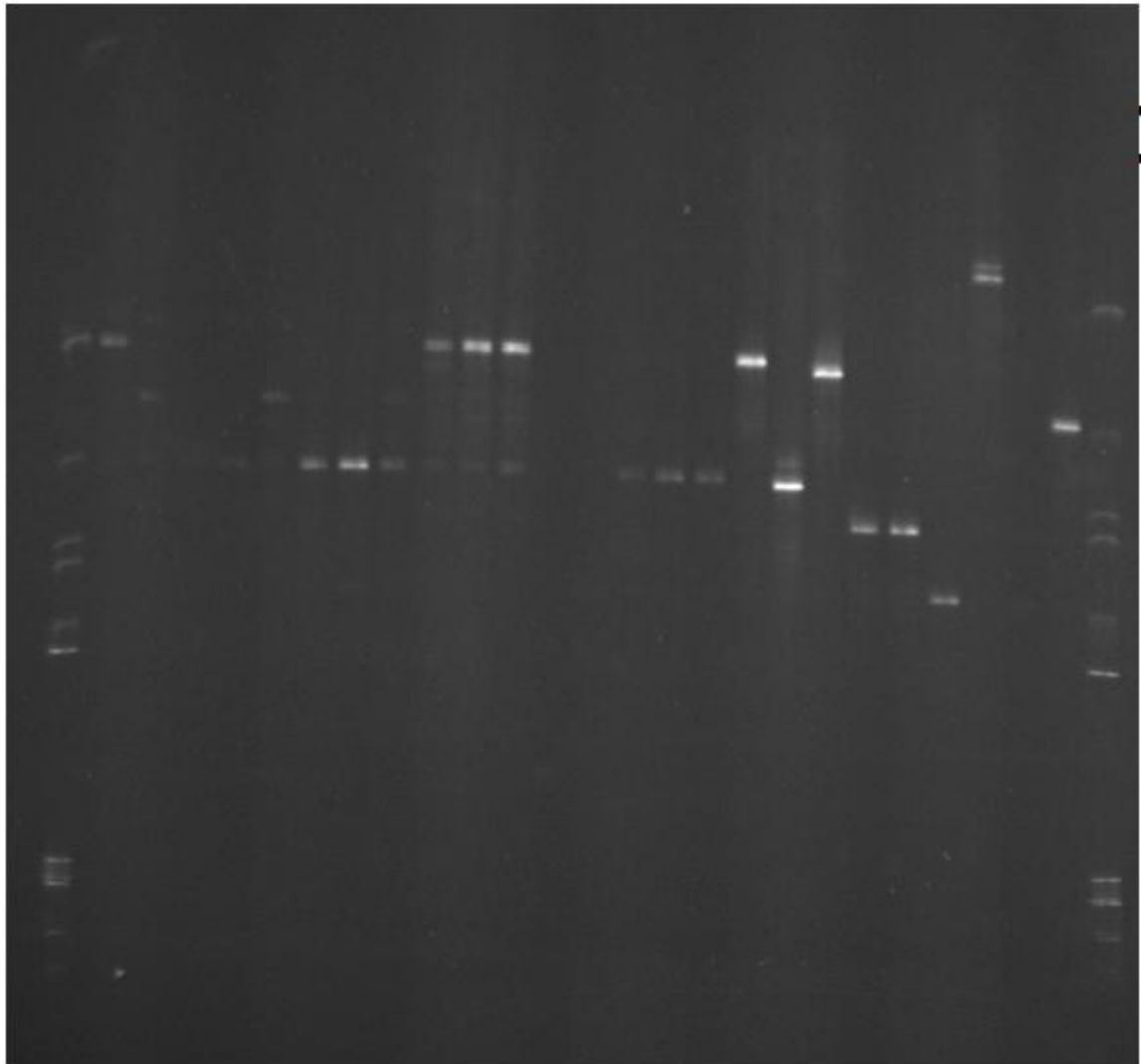
V poměrně velkém množství byl na gelu nalezen mikroorganismus *L. lactis* subsp. *cremoris*, který byl nalezen ve všech vzorcích sýra. Nicméně toto množství bylo nižší než u sýrů v 1. fázi výroby (1. – 14. den). *L. lactis* subsp. *cremoris* byl nejvíce zastoupen ve vzorcích ze 42. dne z okrajového plátu ze střední vrstvy (42 S1 III) a ze 42. dne ze středového plátu z krajní vrstvy (42 S3 I), dále ve vzorcích ze 77. dne z okrajového plátu ze střední vrstvy (77 S1 III), ze 77. dne ze středového plátu z krajní vrstvy (77 S3 I) a ze 77. dne ze středového plátu ze střední vrstvy (77 S3 III). Naopak ve vzorcích z 56. dne ze středového plátu ze střední vrstvy (56 S3 III) a ze 77. dne z okrajového plátu z krajní vrstvy (77 S1 I) nebyl nalezen.

Escherichia coli byla nalezena ve vzorcích sýra ze 42. dne z okrajového plátu z krajní vrstvy (42 S1 I), ze 42. dne z okrajového plátu ze střední vrstvy (42 S1 III) a ze 42. dne ze středového plátu z krajní vrstvy (42 S3 I) a v menším množství byla nalezena ve vzorku z 28. dne z okrajového plátu z krajní vrstvy (28 S1 I).

Třetím nejvíce zastoupeným mikroorganismem byl *L. lactis* subsp. *lactis*, který byl nejvíce viditelný ve vzorcích z 28. dne z okrajového plátu ze střední vrstvy (28 S1 III) a ze 42. dne z okrajového plátu z krajní vrstvy (42 S1 I), dále se pak vyskytoval ve vzorcích z 28. dne ze středového plátu z krajní vrstvy (28 S3 I), z 28. dne ze středového plátu ze střední vrstvy (28 S3 III), ze 42. dne z okrajového plátu ze střední vrstvy (42 S1 III), ze 42. dne z okrajového plátu z krajní vrstvy (42 S3 I) a ze 42. dne ze středového plátu ze střední vrstvy (42 S3 III).

Dalším detekovaným mikroorganismem byl *E. faecalis*, který byl nalezen ve vzorku z 56. dne z okrajového plátu z krajní vrstvy (56 S1 I).

Ve více zralých vzorcích sýra (28 – 77 dnů) nebyly nalezeny kromě laktokoků jiné kontrolní mikroorganismy. Některé mikroorganismy pravděpodobně během zrání zlyzovaly a jiné nebyly přítomny. V těchto vzorcích nebyly detekovány tyto mikroorganismy: *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, *E. durans*, *Lbc. casei* a *Lbc. plantarum*.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26

Obr. 11. Zastoupení mikroorganismů ve vzorcích sýrů z období 28 – 77 dnů 1. standard 100 bp, 2. 28. den S1 I, 3. 28. den S1 III, 4. 28. den S3 I, 5. 28. den S3 III, 6. 42 den S1 I, 7. 42. den S1 III, 8. 42. den S3 I, 9. 42. den S3 III, 10. 56. den S1 I, 11. 56. den S1 III, 12. 56. den S3 I, 13. 56. den S3 III, 14. 77. den S1 I, 15. 77. den S1 III, 16. 77. den S3 I, 17. 77. den S3 III, 18. *E. coli* CCM 3954, 19. *E. faecalis* CCM 7247, 20. *L. lactis* subsp. *cremoris* CCDM 946, 21. *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* CCDM 141, 22. *E. durans* CCDM 53, 23. *Lbc. casei* CCDM 422, 24. *Lbc. plantarum* DCT AI-7, 25. *L. lactis* subsp. *lactis* DCT AIV-9, 26. standard 100 bp.

7.3 Souhrnná diskuse

Diplomová práce se zabývala jednak výběrem vhodné a účinné metody izolace DNA z BMK a zkoumáním změn zastoupení mikroorganismů během zrání v sýrech eidamského typu pomocí metod molekulární biologie.

Hlavním problémem v rámci diplomové práce byla izolace DNA, jak ze sbírkových kmenů BMK, tak ze samotných vzorků sýra eidamského typu. BMK jsou grampozitivní bakterie a mají tedy velice silnou buněčnou stěnu, vyztuženou peptidoglykanem, který výrazně omezuje její poškození či desintegraci. [2, 3]. Navíc mnohé z těchto bakterií mají tvar koků nebo kokotyčinek, které jsou ještě více odolné vůči lyzi než tyčinkovité bakterie. Z tohoto důvodu bylo testováno několik neúspěšných metod izolace DNA, než byla nalezena správná a účinná metoda, která úspěšně desintegrovala jejich buněčnou stěnu a umožnila tak izolaci DNA jednotlivých mikroorganismů.

U izolace patogenní bakterie *E. coli* byla situace jiná, protože se jedná o gramnegativní mikroorganismus, který má tenčí buněčnou stěnu a tyčinkovitý tvar. Buněčná stěna *E. coli* neobsahuje tak velké množství peptidoglykanu jako BMK, a je tedy mnohem jednodušší docílit desintegrace její buněčné stěny, tím i lyze bakterie a získat tak DNA v potřebném množství a kvalitě (čistotě). Aby byla metodika izolace DNA u všech námi používaných mikroorganismů stejná, byla rovněž *E. coli* izolována stejným postupem jako BMK, i když by bylo možné použít šetrnější metody.

Mezi neúspěšné pokusy izolace DNA z BMK lze zařadit použití izolačního kitu (High PCR Template Preparation Kit) pro izolaci bakteriálních nukleových kyselin, který nebyl dostatečně účinný pro izolaci DNA z grampozitivních koků. Použitím tohoto kitu nebylo dosaženo potřebné desintegrace bakteriálních buněk, a proto získané množství genetické informace bylo nedostačující pro další zkoumání.

Rovněž byla zkoušena izolace DNA pomocí fenol – chloroformové extrakce, což je metoda, která je poměrně stará, reprodukovatelná. Získaná DNA je čistá a použitelná pro další metody molekulární biologie [64]. Fenol - chloroformová extrakce má však několik nevýhod, je poměrně pracná a náročná na přesnost a hlavně je velmi časově náročná, jejím použitím by vznikl velký časový skluz.

Izolace DNA v dostatečné koncentraci a patřičné kvalitě bylo dosaženo kombinací mechanického rozbití buněk pomocí sterilních skleněných kuliček a kitu. Pomocí sterilních

skleněných kuliček, které dokázaly dokonale rozrušit buněčné stěny BMK, bylo dosaženo desintegrace bakteriálních buněk a tím uvolnění potřebné DNA. Z takto rozrušených buněk byla následně DNA izolována pomocí kitu. Použitím kitu pro izolaci DNA a sterilních skleněných kuliček bylo dosaženo požadovaného výsledku, čili byla získána DNA čistá a v dostatečném množství pro další výzkum.

Po optimalizaci vhodné izolační techniky DNA z bakteriálních buněk bylo možné stanovit přítomné mikroorganismy ve vzorcích sýra Eidam 30 %, který byl vybrán jako zástupce mléčného výrobku pro zkoumání změn výskytu bakterií mléčného kvašení během zrání. Všechny použité sýry byly vyrobeny u tradičního českého výrobce a byly z jedné výrobní šarže, byly tedy vyrobeny v jeden den (22. 11. 2011). Odběr vzorků byl prováděn v následujících dnech: 1. den, 3. den, 7. den, 14. den, 28. den, 42. den, 56. den a 77. den. Vzorky sýra Eidam 30 % byly tedy v různých stádiích zrání a lze u nich tak očekávat odlišné zastoupení mikrobiální populace. Vzorky sýra byly odebírány přímo ze zrcího sklepa výrobce, kde zrály při teplotě 9 – 10 °C. Z každého sýra Eidam 30 %, který byl ve tvaru cihly o hmotnosti cca 1,4 kg, byly odebrány 4 vzorky: z okrajového plátu z krajní vrstvy, z okrajového plátu ze střední vrstvy, ze středového plátu z krajní vrstvy a ze středového plátu ze střední vrstvy. Jednotlivé vzorky pro analýzu přítomnosti BMK byly uchovávány v mrazničce za stálé teploty -20 °C, kde bylo zaručeno, že nedojde k sekundární kontaminaci z okolí a zároveň při této teplotě nedochází ke změnám mikrobiální populace.

Po úspěšné izolaci DNA z výše uvedených vzorků sýra byly vzorky nejdříve podrobeny amplifikaci metodou PCR a následné analýze v agarózovém gelu, aby byla stoprocentně ověřena přítomnost genetické informace mikroorganismů, ale také DNA těchto bakterií.

Pro lepší identifikovatelnost jednotlivých mikroorganismů metodou TGGE, byl do PCR směsi přidán primer GC 341f, tzv. GC-svorka, který umožňuje až o 50 % přesnější detekci jednotlivých mikroorganismů ve zkoumaných vzorcích.

Metodou TGGE, pomocí níž bylo zjišťováno mikrobiologické zastoupení v jednotlivých vzorcích sýra, bylo provedeno několik zkušebních pokusů, během kterých bylo zjištěno, které mikroorganismy se v sýrech eidamského typu vyskytují nejčastěji. Ze 42 vybraných kmenů ze sbírek mlékařských kultur (Czech Collection of Dairy Microorganisms - CCDM), České sbírky mikroorganismů (CCM) a ze sbírky Ústavu technologie tuků a

tenzidů (vzorky označeny jako DCT) bylo vybráno 8 kontrolních mikroorganismů, které mohou být nejčastěji zastoupeny v sýru eidamského typu. Mezi vybrané mikroorganismy patřily hlavně BMK, ale také *E. coli*, která bývá často označována jako kontaminant těchto sýrů [65]. S kontrolními mikroorganismy byly porovnávány detekované mikroorganismy nalezeny ve vzorcích sýra.

Z výsledků metody TGGE vyplývá, že ve všech vzorcích byl nalezen *L. lactis* subsp. *cremoris*, který je součástí smetanového zákysu jako startovací kultura, a který se dle informace od dodavatele (výrobce) používá při výrobě sýru Eidam 30 %. Největší množství tohoto mikroorganismu bylo na začátku zrání sýra ve vzorku z 1. dne, což lze vysvětlit tím, že došlo k dobrému pomnožení startérové kultury. Poté množství této bakterie postupně klesalo až do zhruba 7. dne. Od tohoto dne se jeho množství opět zvětšovalo, až do vzorku ze 14. dne. Počáteční pokles množství bakterií startérové kultury byl pravděpodobně způsoben tím, že se bakterie přizpůsobovaly novým podmínkám, v tomto případě pravděpodobně vyšší koncentraci soli. Od 28. dne se přítomnost *L. lactis* subsp. *cremoris* plynule zmenšovala až do konce experimentu (do 77. dne), což je v souladu s postupnou lyzí těchto buněk. Jestliže v některých vzorcích sýrů nebyl *L. lactis* subsp. *cremoris* identifikován vůbec, tak pravděpodobně došlo k jeho lyzí (zejména u vzorků sýrů z konce experimentu) nebo nebylo vyizolováno dostatečné množství jeho DNA postačující pro jeho identifikaci. Zároveň pomocí metody TGGE nebyly zjištěny výraznější rozdíly v distribuci těchto mikroorganismů v různých částech sýrů. Tento výsledek je v souladu s tím, že se jedná o semikvantitativní metodu a taky s tím, že při výrobě sýru byla startérová kultura rovnoměrně rozptýlena v celé hmotě, kde měla dobré podmínky pro svůj rozvoj.

V sýrech byl rovněž identifikován také *L. lactis* subsp. *lactis*, který je, podobně jako *L. lactis* subsp. *cremoris*, součástí smetanového zákysu jako startérová kultura. Tento mikroorganismus se opět na základě informace od výrobce používá pro výrobu tohoto sýra. Největší množství BMK *L. lactis* subsp. *lactis* bylo detekováno na začátku zrání sýrů, ve vzorku z 1. dne ve všech 4 odběrových místech, což se opět shoduje s informací výrobce, že se jedná o startérovou kulturu. Od vzorku z 3. dne až do vzorku ze 14. dne množství tohoto laktokoka kontinuálně klesalo. *L. lactis* subsp. *lactis* nebyl detekován vůbec nebo ve velmi malém množství ve vzorku z 28. dne, kde došlo pravděpodobně k jeho lyzí těchto buněk nebo nebylo vyizolováno dostatečné množství jeho DNA postačující pro jeho identifikaci. Ve velmi malém množství byl detekován ve vzorcích sýra ze 42. dne. Od

vzorku z 56. dne až do vzorku ze 77. dne nebyl *L. lactis* subsp. *lactis* identifikován vůbec, protože pravděpodobně došlo k jeho lyzi a v této fázi již v síru převládaly non-starterové .

V jednom vzorku byl identifikován mikroorganismus *E. faecalis*, a to ve vzorku z 56. dne z okrajového plátu z krajní vrstvy (56 S1 I). V ostatních vzorcích nebyl nalezen pravděpodobně z důvodů velmi malého množství DNA, které nebylo naší metodou zachytitelné. Je pravděpodobné, že se enterokoky vyskytovaly i v ostatních vzorcích, především ve vzorcích zralejších sýrů (cca od vzorku z 28. dne až po vzorky ze 77. dne), jelikož se jedná o non-starterové bakterie BMK. Fox, McSweeney, Burdychová a mnozí další autoři rovněž popisují výskyt enterokoků v sýrech holandského typu [17, 44]..

Z mikroorganismů, které nepatří mezi BMK, byla identifikována *E. coli*. Bakterie *E. coli*, patří mezi potenciálně patogenní mikroorganismy, a proto je její výskyt v potravinách nežádoucí. Koliformní bakterie, kam se řadí i *E. coli*, jsou poměrně citlivé k vyšším teplotám, proto je pasterační záhřev spolehlivě ničí [17]. Přítomnost tohoto mikroorganismu je tedy nejspíše dána sekundární kontaminací z vnějšího prostředí během výroby sýra, pravděpodobně v důsledku nedodržení hygienických a sanitačních postupů nebo mohou být zdrojem této bakterie i samotní pracovníci. Detekovaná množství *E. coli* ze vzorku z 1. dne se mírně snižovala až k vzorku ze 7. dne, od tohoto dne se množství této bakterie ve vzorcích sýrů zvyšovalo až do vzorku ze 14. dne, kdy bylo detekováno největší množství této enterobakterie. Pokles množství této bakterie a opětovné zvýšené množství lze, podobně jako u laktokoků, přičíst tomu, že se bakterie přizpůsobovaly novým podmínkám, které pro ně mohly být i stresující (např. vyšší koncentrace soli, kyselejší prostředí, apod.). Poté už docházelo k postupnému poklesu, nicméně v malém množství byla *E. coli* identifikována také ve vzorku ze 28. dne a ve vzorku z 56. dne V ostatních vzorcích nebyla *E. coli* identifikována pravděpodobně z důvodů nedostatku živin a její lyze, kdy byla vytlačena právě BMK, ať už startérovými nebo non-starterovými.

Přítomnost tohoto mikroorganismu je nežádoucí, protože některé kmeny *E. coli* mohou produkovat nebezpečné toxiny, které mohou v některých případech vyvolat závažná onemocnění (zejména průjmového charakteru, někdy spojená i se selháním ledvin) a pro oslabené jedince nebo jedince s nedostatečně vyvinutým imunitním systémem (např. novorozenci a velmi malé děti) mohou být až smrtelné [3, 65]. Právě z tohoto důvodu se výskyt této bakterie v potravinách sleduje. Kromě toho, že některé kmeny *E. coli* mohou být patogenní, je rovněž nežádoucí výskyt i nepatogenních kmenů, protože enterobakterie

se řadí k mikroorganismům, které jsou charakteristické tzv. smíšeným zkvašováním cukrů. Při tomto určitém typu heterofermentativního kvašení může kromě kyseliny mléčné a dalších organických kyselin vznikat také větší množství oxidu uhličitého a dalších organických látek (např. aldehydů, alkoholů, apod.) [17]. Díky tomu může být sýr znehodnocen i organolepticky, např. v důsledku zvýšené produkce CO₂ může dojít k tzv. časnému duření těchto sýrů, nebo v důsledku produkce jiných látek mohou být v sýrech rozeznány nežádoucí chuťové a pachové vjemy [6]. Takový sýr je potom nevhodný pro distribuci do obchodní sítě, navíc sýry s mikrobiálními defekty (zejména zduřené sýry) nelze dále využít pro další technologické aplikace.

Ostatní vybrané kontrolní mikroorganismy, *L. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, *E. durans*, *Lbc. casei* a *Lbc. plantarum*, které mohou být součástí tzv. non-starterových bakterií, nebyly identifikovány. Výskyt non-starterových bakterií lze předpokládat především ve vzorcích sýra zrajících delší dobu (v našem případě 28. dní – 77. dní), kdy dochází k jejich rozvoji na úkor startérových kultur, které postupně odumírají.

V jednotlivých vzorcích analyzovaného sýra Eidam nebyly non-starterové bakterie buď přítomny, nebo jejich množství genetické informace bylo tak malé, že je nebylo možné použitou technikou molekulární biologie identifikovat. Pro jejich identifikaci, pokud byly ve vzorcích sýra přítomny, by bylo pravděpodobně potřeba použít lepších a účinnějších izolačních technik, které by dokázaly dostatečně desintegrovat jejich buněčnou stěnu a dovolily by nám tak získat jejich genetickou informaci v dostatečném množství. Druhou z možností je použití klasické mikrobiologické analýzy, tj. plotnové metody. V tomto případě je třeba však vzít v úvahu to, že ne všechny mikroorganismy vyskytující se v prostředí (v našem případě v sýrech) jsou za běžných laboratorních podmínek kultivovatelné. Výhodou metod založených na analýze genetické informace je ta skutečnost, že tyto metody nám umožňují zachytit nukleové kyseliny i těch mikroorganismů, které se v daném prostředí vyskytují a které mohou být označeny jako tzv. nekultivovatelné.

ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na studium dynamiky zastoupení mikroorganismů ve zrajících sýrech pomocí metod molekulární biologie, především metod TGGE, PCR a elektroforézy v agarózovém gelu. Změny mikroorganismů během zrání v sýrech eidamského typu byly pozorovány porovnáváním se sbírkovými kmeny BMK.

Na základě získaných výsledků lze konstatovat:

- byla zavedena a následně provedena optimalizace metody TGGE pro sledování změn zastoupení mikroorganismů během zrání sýra eidamského typu,
- optimální metodu pro izolaci DNA z bakterií mléčného kvašení je použití sterilních skleněných kuliček pro desintegraci bakterií a kitu pro izolaci DNA,
- složení mikroorganismů během zrání se v sýrech eidamského typu se mění,
- nejčastěji vyskytujícím se mikroorganismem ve vzorcích sýra byl *L. lactis* subsp. *cremoris*, který je součástí startérové kultury, a který se vyskytoval především v prvních dnech zrání (1. den – 14. den). Poté došlo k poklesu jeho množství,
- druhou nejčastěji se vyskytující BMK byl *L. lactis* subsp. *lactis*, který se opět využívá jako startérová kultura. Tento mikroorganismus se vyskytoval ve vzorcích v počátečních dnech zrání až do cca 6. týdne od počátku výroby (1. den – 42. den) a poté dochází k jeho lyzi,
- z non-starterových bakterií byla zjištěna přítomnost *E. faecalis*,
- ve vzorcích sýra, především z počátku výroby a zrání (1. den – 14. den), byla nalezena bakterie *E. coli*, po 14 dnech se její množství zmenšovalo a ve vzorcích sýra ze 77. dne již nebyla detekována vůbec.

Pro detekci změn mikroorganismů během zrání lze metodu molekulární biologie TGGE vyhodnotit jako dostačující.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BLACKBURN, Clive de W. *Food spoilage microorganismns*. 1st ed. Cambridge: CRC, 2006. ISBN 0-8493-9156-3.
- [2] SALMINEN, S., WRIGHT, von A., OUWEHAD, A. *Lactic Acid Bacteria, Microbial and Functional Aspects*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 2004. ISBN 0-8247-5332-1.
- [3] SEDLÁČEK, I. *Taxonomie prokaryot*. 1st ed. Brno: TYPO ART PRES, 2007. ISBN 80-210-4207-9.
- [4] FLICKINGER, C. M., DREW, S. W. *Bioprocess Technology: fermentation, biocatalysis and bioseparation*. 1st ed. New York: A Wiley-Interscience Publication, 1999. ISBN 0-471-13822-3.
- [5] PACHLOVÁ, V. Distribuce vybraných složek v přírodním sýru v průběhu jeho zrání. (Disertační práce) Zlín: UTB, 2011. 120 s.
- [6] McSEENEY, P. L. H., SOUSA, M. J. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*. 2004, vol. 57, no. 2/3, s.127 – 144.
- [7] MUYZER, G; SMALLA, K. Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) in Microbial Ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Mikrobiology*. 1998, vol. 73, no. 1 s. 127-141. ISSN:0003-6072.
- [8] MUYZER, G. DGGE/TGGE a Metod for identifying genes from natural ecosystemes. *Current opinion in mikrobiology*. 1999, vol. 2, no. 3, s. 317-322.

[9] HERSCHLAG, D. *Methods in enzymology, Volume 468: Biophysical, Chemical and Functional Probes of RNA Structure, Interactions and Folding: Part A*. 1st ed. London: Academia Press, 2009. ISBN 978-0-12-374399-2.

[10] KLUWER ACADEMIC. *Microbial ecology of food commodities*. 2nd ed. New York: ICMSF, 2005. ISBN 0-306-48676-8.

[11] MOZZI, F., RAYA, R. R., VIGNOLO, M. G. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria, Novel Applications*. 1st ed. Ames: Blackwell Publishing, 2010. ISBN 978-0-8138-1583-1.

[12] RAY, B., BHUNIA, A. *Foundamental Food Microbiology*. 4th ed. New York: CRC Press, 2008. ISBN 0-8493-7529-0.

[13] MORENO, Foulquié. M. R., REA, M. C. et al. Applicability of a bakteriocin - producing *Enterococcus faecium* as a co - culture in Cheddar cheese manufacture. *International Journal of Food Science and Technology*. 2003. vol. 81, no. 7, s. 73 – 84

[14] OLŠANSKÝ, Č. a KNĚZ, V. *Výroba tvrdých sýrů eidamského a ementálského typu*. 1st ed. Praha: ČAZ, 1971.

[15] FELLOWS, P. J. *Food procesing technology*. 2nd ed. Cambridge: CRC, 2000. ISBN 1-85573-533-4.

[16] ZIMÁK, E. *Technologie*. 1st ed. Praha: SNTL, 1988.

[17] FOX, Patrick F., McSWEENEY, Paul, L. H. et al. *Cheese - Chemistry, Physics and Microbiology*. 3rd ed. Elsevier, 2008. ISBN 978-0-12-263651-6.

[18] PACHLOVÁ, V., BUŇKA, F. et al. The effect of three different ripening/storage conditions on the distribution of selected parameters in individual part of Dutch – type cheese. *International Journal of Food Science and Technology*. 2011, vol. 46, no. 15, s. 101 – 108.

[19] ADAMS, R. Martin, MOSS, O. Maurice. *Food Microbiology*. 3rd ed. Cambridge: RSC Publishing, 2008. ISBN 978-0-85404-284-5.

[20] HUI, Y. H. *Dairy science and Technology Handbook*. 1st ed. New York: VCH, 1993, ISBN 1-56081-078-5.

[21] SOLDATOU, H., PSONI, L. et al. Populations, types and biochemical activities of aerobic bacteria and lactic acid bacteria from the air of cheese factories. *Society of Dairy Technology*. 2006, vol. 59, no. 3.

[22] PAWSEY, K. R. *Case studies in Food microbiology for Safety and Quality*. 1st ed. London: RSC, 2002. ISBN 0-85404-626-7.

[23] KUTZ, M. *Handbook of Farm, Dairy and Food Machinery*. 1st ed. New York: Springer, 2007. ISBN 3-540-21117-9.

[24] VILJOEN, B. C. The interaction between yeasts bacteria in dairy environments. *International journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 69, no. 34, s. 37 – 44.

[25] LAW, B. A., TAMINE, A. Y. *Technology of cheesemaking*. 2nd ed. Oxford: Sheffield Academic Press, 2010. ISBN 978-1-4051-2124-8.

[26] MARTH, E. H., STEELE, J. L. *Applied Dairy Microbiology*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001. ISBN 0-8247-0536-X.

[27] FOX, P. F., GUINEE, T. P. *Fundamentals of Cheese Science*. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. ISBN 0-8342-1260-9.

[28] KURE, C. F., SKAAR, I. Et al. Mould contamination in production of semi – hard cheese. *International Journal of Food Science and Technology*. 2004, vol. 93, no. 8, s. 41 – 49.

[29] RAMESH, C. Ch. *Dairy processing and Quality Assurance*. 1st ed. New Delhi: Blackwell Publishing, 2008. ISBN 0-8138-2756-6.

[30] AYZARNIA, S., ROBERT, N. et al. Biotechnological Methods to Accelerate Cheddar Cheese Ripening. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2006, vol. 26, no. 15, 121 – 143.

[31] McSWEENEY, P. L., Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology*. 2004, vol. 57, no. 2/3, s. 127 – 144.

[32] BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F et al. The effect of ripening and storage conditions on the distribution of tyramine, putrescine and kadaverine in Edam-cheese. *Food Microbiology*. 2010, vol. 27, no. 7, s. 880 – 888.

[33] MOUNIER, J., MONNET, CH. et al. Microbial Interactions within a Cheese Microbial Community. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008, vol. 74, no. 1, s. 172 – 181.

- [34] PACHLOVÁ, V., BUŇKA, F. at al. The effect of elevated temperature on ripening of Dutch type cheese. *Food Chemistry*. 2012, vol. 132, no. 4, s. 1846 – 1854.
- [35] ANSORGE, Wilhelm a PATRINOS, P. Georgie. *Molecular diagnostics*. 2nd ed. London: Academic Press, 2010. ISBN 978-0-12-374537-8.
- [36] KARP, Angela a ISSAC, G. Peter et al. *Screening biodiversity Plants and Animals*. 1st ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. ISBN 0-412-63830-4.
- [37] RAI, Mahendra. *Advances in Fungal biotechnology*. 1st ed. New Delhi: I. K. International, 2009. ISBN 978-81-89866-532.
- [38] COCOLIN, L., DIEZ, A. et al. Optimization of conditions for profiling bacterial populations in food by culture – independent methods. *International Journal of Food Science and Technology*. 2007, vol. 120, no. 11, s. 100 – 109.
- [39] WARTELL, M.R.; HOSSEINI, S.; POWELL, S., et al. Detecting single base substitutions, mismatches and bulges in DNA by temperature gradient gel electrophoresis and related methods. *Journal of Chromatography A*. 1998, vol. 806, s. 169-185.
- [40] SHERAMETI, Irena a VARMA, Ajit. *Soil Heavy Metals*. 1st ed. London: Springer, 2010. ISBN 978-3-642-02435.
- [41] REMACLE, C. a REUSES, B. *Functional foods, ageing and degenerative disease*. 1st ed. Cambridge: CRC Press, 2004. ISBN 1-85573-725-6.
- [42] MAIER, M. Rina a PEPPER, L. Ian et al. *Environmental microbiology*. 2nd ed. Burlington: Academic Press, 2009. ISBN 978-0-12-370519-8.

[43] SAKATA, S., TONOOKA, T. et al. Culture- independent analysis of fecal microbiota in infants with special reference to Bifidobacterium species. *Microbiology Letters*. 2005, vol. 243, no. 21, s. 417 – 423.

[44] BURDYCHOVÁ, R a SLÁDKOVÁ, P. *Mikrobiologická analýza potravin*. 2nd ed. Brno: Editační středisko MZLU, 2007. ISBN 978-80-7375-116-6.

[45] GRENNAN, B, O' SULLIVAN, N. A. PCR-ELISAs for detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Poultry Symplex. *Bio techniques*. 2001, vol. 30, no. 3, s. 602 – 610.

[46] ČIKOŠ, Š., KOPPEL, J., KANTÍKOVÁ, M. *Polymerázová reťazová reakci a její použitie v biologickom výskume a diagnostike*. 1st ed. Košice: Ústav fyziologie hospodárskych zvierat SAV, 2001.

[47] SOBEL, R. Význam a identifikace bakterií rodu *Campylobacter* v potravinách. (Bakalářská práce) Zlín: UTB, 2010. 55 s.

[48] ROSYPAL, S. et al. *Úvod do molekulární biologie*. 3rd ed. Brno: GRAFEX, 2002. ISBN 80-902562-4-4.

[49] BARLETT, J. M. S., STIRLING, D. *PCR Protocols*. 2nd ed. New York: Humana Press, 2008. ISBN 93-8569-45-1.

[50] RUDI, K., NOGVA, H. K. et al. Development and application of new nucleic acid – based technologies for microbial community analyses in foods. *International journal of Food Microbiology*. 2002, vol. 75, no. 35, s. 171 – 180.

[51] HOFSTRA, H. VOSSSEN, van der J. M. B. M. Microbes in food processing technology. *Microbiology Reviews*. 1994, vol. 15, no. 26, s. 175 – 183.

[52] DEBRUYNE, L, SANYM, E, De BRANDT, E. Comparative performance of different PCR assays for the identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Research in microbiology*. 2008, vol. 159, no. 2, s. 88 – 93.

[53] STEVENS, K. A., JAYKUS, L. A. Direkt detection of bacterial pathogens representative dairy products using a combined bacterial concentration – PCR approach. *Journal of Applied Microbiology*. 2004, vol. 97, no. 12, s. 1115 – 1122.

[54] Piko™ Thermal Cycler [on-line]. [cit. 2012-02-24]. Dostupný z WWW: < <http://www.bioke.com/News/183.html> >.

[55] LUDWIG, W. Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification. *International journal of Food Microbiology*. 2007. vol. 120, no. 40, s. 225 – 236.

[56] COCOLIN, L., ERCOLINI, D. *Molecular Techniques in the Microbial Ecology of Fermented Foods*. 1st ed. New York: Springer, 2008. ISBN 978-0-387-74519-0.

[57] TANG, Yi – Wei. STRATTON, Ch. W. *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. 1st ed. New York: Springer, 2006. ISBN 0-387-29741-5.

[58] SAILS, D. A, FOX, J. A, BOLTON, J. F. Development of a PCR ELISA assays for the identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Molecular and Cellular Probes*. 2001, vol. 15, no. 5, s. 291 – 300.

[59] HLOBILOVÁ, M. Srovnání metod pro detekci biogenních aminů u bakterií mléčného kvašení. (Diplomová práce) Zlín: UTB, 2008. 96 s.

[60] ŠPANOVÁ, A., RITTICH, B. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. 1st ed. Brno: VUT, 2010. ISBN 978-80-214-4004-3.

[61] High Pure PCR Template Preparation Kit [on/line]. [cit. 2012-03-15]. Dostupný z WWW: < <ftp://biology.nmsu.edu/incoming/wood/roche-2008a.pdf> >.

[62] ROUDIÉRE, L., AURÉLIEN, J. et al. Optimized PCR – Temporal Temperature Gel Electrophoresis compared to cultivation to assess diversity of gut microbiota in neonates. *Journal of Microbiological Methods*. 2009, vol. 78, no. 2, s. 156 – 165.

[63] TGGE MAXI Systém Instruction Manual Ver. 09/10 [on-line]. [cit. 2012-03-20]. Dostupný z WWW: < http://www.biometra.de/fileadmin/biometra/_products/Electrophoresis/tgge/docs/Manual_TGGE_MAXI_Oct_2009.pdf >.

[64] PENKA, M., TESAŘOVÁ, E. et al. *Hematologie a transfuzní lékařství*. 1st ed. Brno: Grada Publishing, 2011. ISBN 978-80-247-3459-0.

[65] FERNANDES, R. *Microbiologz Handbook Dairy Products*. 1st ed. Cambridge: RSC Publishing, 2008. ISBN 978-1-905224-62-3.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BMK	Bakterie mléčného kvašení
CCDM	Česká sbírka mlékárenských mikroorganismů (Czech Collection of Dairy Microorganisms).
CCM	Česká sbírka mikroorganismů (Czech Collection of Microorganisms).
DNA	Deoxyribonukleová kyselina.
DCT	sbírka Ústavu technologie tuků a tenzidů.
<i>L.</i>	<i>Lactococcus.</i>
<i>Lbc.</i>	<i>Lactobacillus.</i>
<i>E.</i>	<i>Enterococcus.</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli.</i>
MRS	Mangův, Rogosův a Sharpův agar pro stanovení bakterií mléčného kvašení.
M 17	M-17 agar podle Terzaghiho pro stanovení bakterií mléčného kvašení.
PCA	Plate Count Agar pro stanovení celkového počtu mikroorganismů.
DNA	Deoxyribonukleová kyselina.
TGGE	Gelová elektroforéza v teplotním gradientu.
PCR	Polymerázová řetězová reakce.
UV	Ultrafialové záření

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Porovnání kolmé (A) a paralelní (B) TGGE elektroforézy [4].....	31
Obr. 2. Piko™ Thermal Celer [60].....	36
Obr. 3. Schéma odběrů vzorků [43].....	41
Obr. 4. Izolovaná DNA vybraných BMK	57
Obr. 5. DNA vybraných BMK izolovaná pomocí desintegrace buněk a kitu.....	57
Obr. 6. DNA vybraných BMK izolovaná fenol-chloroformovou extrakcí se závěrečným vysrážením etanolem (jamky 1 – 4) a bez vysrážení etanolem (jamky 6 – 9).....	58
Obr. 7. PCR amplikony s použitím FastStart PCR Master mixu.....	57
Obr. 8. PCR s izolovanou DNA.....	60
Obr. 9. TGGE – skríníng vybraných bakterií.....	61
Obr. 10. Zastoupení mikroorganismů ve vzorcích sýrů z období 1 – 14 dnů.....	63
Obr. 11. Zastoupení mikroorganismů ve vzorcích sýrů z období 28 – 77 dnů.....	65

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Odběry sýrů.....	40
Tab. 2. Použité vzorky sýrů a jejich značení.....	41
Tab. 3. Složení bujónu M17.....	44
Tab. 4. Složení agaru M17.....	44
Tab. 5. Složení bujónu MRS.....	45
Tab. 6. Složení agaru MRS.....	45
Tab. 7. Složení směsi pro PCR.....	50
Tab. 8. Průběh PCR a počet cyklů.....	50
Tab. 9. Složení roztoku pro přípravu polyakrylamidového gelu.....	53
Tab. 10. Podmínky detekce pomocí TGGE.....	55