Studium vybraných vlastností mléčných koků

Bc. Veronika Nováková

Diplomová práce
2008

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav potravinářského inženýrství
akademický rok: 2007/2008

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Bc. Veronika NOVÁKOVÁ**
Studijní program:	**N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Téma práce:	**Studium vybraných vlastností mléčných koků**

Zásady pro vypracování:

1. **V teoretické části zpracujte literární rešerši týkající se taxonomického zařazení, charakteristiky, významu a využití bakterií mléčného kvašení v potravinářství.**
2. **Zaměřte se zejména na skupinu mléčných koků.**
3. **V praktické části sledujte zvolené fenotypové vlastnosti vybraných kmenů mléčných koků využívaných v mlékárenství, zejména jejich biochemickou aktivitu, profil aminokyselin a proteinů.**
4. **Tyto vlastnosti srovnejte se sbírkovými kmeny stejného druhu.**
5. **Na základě teoretické části a výsledků praktické části formulujte závěry o vlastnostech vybraných kmenů mléčných koků.**

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

GÖRNER, F.,VALÍK, Ľ., Aplikovaná mikrobiológia poživatín, Bratislava: Malé centrum, 2004. první vydání, ISBN 80-967064-9-7.
RUDOLFOVÁ, J., ČURDA, L., Prebiotický účinek galaktooligosacharidů a využití laktosy pro jejich produkci, [online]. [cit. 2008-02-06]. Dostupný z WWW:
TEPLÝ, M., Čisté mlékařské kultury, Praha: SNTL,1984.
FLACKLAM, R., ELLIOTT, J.A, Identification, Classification, and Clinacal Relevance of Catalase-negative, Gram-positive Cocci, Excluding the Streptococci and Enterococci, Clinical microbiology reviews: Oct. 1995, vol.8, no.4, p.479-495.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Leona Buňková, Ph.D.**
Ústav potravinářského inženýrství

Datum zadání diplomové práce: **22. listopadu 2007**

Termín odevzdání diplomové práce: **31. května 2008**

Ve Zlíně dne 2. května 2008

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan

L.S.

UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ
Fakulta technologická

v.z.
prof. Ing. Ignác Hoza, CSc.
vedoucí katedry

ABSTRAKT

Tato práce popisuje taxonomické zařazení, charakteristiky, význam a využití bakterií mléčného kvašení v potravinářství.

Cílem praktické části této práce bylo studium zvolených fenotypových vlastností vybraných kmenů bakterie *Streptococcus thermophilus*, který se hojně využívá v mlékárenském průmyslu. Byla studována jejich biochemická aktivita,vybrané fyziologické vlastnost, profil aminokyselin a proteinů. A tyto vlastnosti byly srovnány se sbírkovými kmeny stejného druhu.

Klíčová slova: mléčné bakterie, probiotika, *Streptococcus thermophilus*

ABSTRACT

Abstrakt ve světovém jazyce

This work describes taxonomy submission, characteristics, signification and using of lactic acid bacteria fermentation in grocery.

The practical part goal of this work was study of selected fenotypic properties of chosen strains of the bacteria *Streptococcus thermophilus*, which is widely used in dairy industry. Their biochemical activity as well as profile of amino-acids and proteins were studied. And these properties have been compared with collection strains of the same kind of bacteria.

Keywords: Lactic acid bacteria, probiotics, *Streptococcus thermophilus*

Úvodem této diplomové práce bych chtěla poděkovat Mgr. Leoně Buňkové, PhD. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při realizaci mé diplomové práce a za její pomoc při vyhodnocování výsledků. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Zuzaně Vaňátkové za spolupráci v laboratořích a v neposlední řadě své rodině, která mě po celou dobu studia plně podporovala.

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvolněno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně

.....

Podpis diplomanta

OBSAH

ÚVOD **9**

I TEORETICKÁ ČÁST **10**

1 MLÉČNÉ KVAŠENÍ **11**

1.1 ZKVAŠOVANÉ CUKRY 11

1.2 TYPY MLÉČNÉHO KVAŠENÍ 11

1.2.1 Homofermentativní kvašení 11
1.2.2 Heterofermentativní kvašení 11
1.2.3 Nečisté kvašení 11

1.3 KYSELINA MLÉČNÁ 12

2 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ **13**

2.1 TŘÍDĚNÍ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ A JEJICH VLASTNOSTI 13

2.2 ROD *STREPTOCOCCUS* 14

2.3 MLÉČNÁ SKUPINA, ROD *LACTOCOCCUS* 15

2.3.1 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 15
2.3.2 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* 16
2.3.3 *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* 16
2.3.4 *Lactococcus raffinolactis* 16
2.3.5 *Lactococcus plantarum* 16
2.3.6 *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* 17

2.4 ENTEROKOKOVÁ SKUPINA, ROD *ENTEROCOCUS* 17

2.4.1 *Enterococcus faecalis* 17

2.5 ROD *LEUCONOSTOC* 18

2.5.1 *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* 18
2.5.2 *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum* 19
2.5.3 *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* 19
2.5.4 *Leuconostoc lactis* 19
2.5.5 *Leuconostoc oenos* 19

2.6 ROD *PEDIOCOCCUS* 20

2.6.1 *Pediococcus damnosus* 20
2.6.2 *Pediococcus acidilacti* 21
2.6.3 *Pediococcus halophilus* 21

2.7 ROD *LACTOBACILLUS* 21

2.7.1 Třídění laktobacilů 22
2.7.1.1 I. skupina = obligátně homofermentativní laktobacily 22
2.7.1.2 II. skupina = fakultativně heterofermentativní laktobacily 23
2.7.1.3 III. skupina obligátně heterofermentativní laktobacily 23
2.7.2 Laktobacily v rostlinných materiálech 23
2.7.3 Laktobacily v mléku a mléčných produktech 23
2.7.4 Laktobacily na mase a masných výrobcích 24
2.7.5 Laktobacily u lidí a zvířat 24

2.8 ROD *BIFIDOBACTERIUM* ... 25
3 STREPTOCOCCUS SALIVARIUS SSP. THERMOPHILUS ... 27
4 VYUŽITÍ MLÉČNÝCH BAKTERIÍ ... 29
4.1 VYUŽITÍ MLÉČNÝCH BAKTERIÍ JAKO ČISTÝCH MLÉKAŘSKÝCH KULTUR ... 29
4.1.1 Dělení čistých mlékařských kultur ... 29
4.1.1.1 Dělení podle obsažených skupin mikroorganismů ... 29
4.1.1.2 Dělení podle druhové a kmenové skladby ... 29
4.1.2 Mezofilní bakteriální kultury ... 30
4.1.2.1 Základní, smetanová kultura ... 30
4.1.2.2 Kefírová kultura ... 30
4.1.3 Termofilní bakteriální kultury ... 31
4.1.3.1 Jogurtová kultura ... 31
4.1.3.2 Acidofilní kultura ... 31
4.1.3.3 Sýrařské kultury ... 31
4.2 VYUŽITÍ MLÉČNÝCH BAKTERIÍ JAKO PROBIOTIKA ... 32
4.2.1 Požadavky na probiotika ... 32
4.2.2 Mikroorganismy zařazující se mezi probiotika ... 32
4.2.3 Formy probiotok ... 33
4.2.4 Možnosti využití probiotik ... 33
4.3 KVAŠENÍ ZELENINY ... 34
4.3.1 Mléčné bakterie uplatňující se při kvašení zeleniny ... 34
4.3.2 Průběh mléčného kvašení zeleniny ... 34
4.3.2.1 Předběžná, přípravná fáze ... 34
4.3.2.2 Hlavní fáze ... 35
4.3.2.3 Třetí fáze mléčného kvašení ... 35
II PRAKTICKÁ ČÁST ... 36
5 CÍLE PRÁCE ... 37
6 POUŽITÉ MIKROORGANISMY ... 38
6.1 STRUČNÁ CHARAKTERISTIKA A VYUŽITÍ NĚKTERÝCH POUŽITÝCH KMENŮ ... 39
7 MATERIÁL A METODY ... 40
7.1 BIOCHEMICKÉ TESTY ... 40
7.1.1 kultivační půdy ... 40
7.1.2 Roztoky a ostatní chemikálie ... 41
7.1.3 Streptotesty ... 41
7.1.4 Další biochemické a fyziologické testy ... 42
7.2 STANOVENÍ AMINOKYSELIN ... 43
7.2.1 Roztoky a ostatní chemikálie ... 43
7.2.2 Postup stanovení aminokyselin ... 43
7.3 STANOVENÍ PROTEINŮ ... 45
7.3.1 Roztoky pro SDS-PAGE ... 45
7.3.2 Stanovení profilu proteinů ... 47
7.3.2.1 Příprava vzorků pro SDS-PAGE ... 48
7.3.2.2 Analýza proteinů metodou SDS-PAGE ... 48

8 VÝSLEDKY A DISKUSE 52

8.1 BIOCHEMICKÉ A FYZIOLOGICKÉ VLASTNOSTI SLEDOVANÝCH KMENŮ STREPTOKOKŮ 52

8.2 AMINOKYSELINOVÝ PROFIL ANALYZOVANÝCH STREPTOKOKŮ 54

8.3 PROTEINOVÝ PROFIL ANALYZOVANÝCH STREPTOKOKŮ 57

ZÁVĚR 62

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 63

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 67

SEZNAM OBRÁZKŮ 68

SEZNAM TABULEK 69

ÚVOD

K nejdůležitějším bakteriím využívaných v mlékárenském průmyslu patří bakterie mléčného kvašení. Tyto bakterie se mlékárenském průmyslu využívají jako čisté mlékařské kultury k výrobě zakysaných mléčných výrobků, kefírů, jogurtů, zakysaných smetan, acidofilních mlék, tvarohů a sýrů. Jde nejen o jejich funkci ve výrobě, kde je díky nim zajištěn správný průběh výrobního procesu a tím dosažení žádoucí jakosti výrobku, ale i o dieteticko-léčebnou funkci mléčných bakterií.

Probiotika se také řadí mezi bakterie mléčného kvašení. Jde o živé mikroorganismy, dodávané do lidského organismu v potravinách nebo jako potravinové doplňky, přežívají průchod lidským zažívacím traktem a pozitivně ovlivňují činnost střevní mikroflóry. V současné době kysané mléčné výrobky představují v Evropě spolu s probiotiky trh s miliardovým obratem.

Bakterie mléčného kvašení se nevyužívají pouze v mlékárenském průmyslu. Jejich schopnosti okyselovat substrát a tím ho chránit před vnikem nežádoucích bakterií se využívá při kvašení zeleniny. Bývají také součástí startovací kultur používaných v masném průmyslu při výrobě a zrání klobás a salámů.

Streptococcus thermophilus je považovaný za jednu z nejdůježitějších v průmyslu využívanou mléčnou startovací kulturu. Tato bakterie je využívána spolu s *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* k výrobě jogurtů nebo *Lactobacillus helveticus* k výrobě sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou (např. Ementál).

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MLÉČNÉ KVAŠENÍ

Bakterie mléčného kvašení vytvářejí z cukrů kyselinu mléčnou jako hlavní produkt, která chrání prostředí před ostatními mikroorganismy, které nesnášejí kyselé prostředí. [1]

1.1 Zkvašované cukry

Bakterie mléčného kvašení zkvašují všechny běžné cukry, tj. hexosy a pentosy, monosacharidy, disacharidy a dokonce i vícemocné alkoholy (glycerol, mannitol apod.). Škrob, celulosa a jiné nerozpustné sacharidy jsou vůči běžným formám mléčného kvašení odolné. [1, 2]

1.2 Typy mléčného kvašení

1.2.1 Homofermentativní kvašení

Homofermentativní mléčné kvašení probíhá dle rovnice:

$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_3\text{-}CHOH\text{-}COOH.$

Produktem homofermentativního kvašení je kyselina mléčná. Mezi hlavní mikroorganismy provádějící homofermentativní kvašení patří *Lactobacillus plantarum, Lactococcus lactis.* [1]

1.2.2 Heterofermentativní kvašení

Heterofermentativní mléčné kvašení probíhá dle rovnice:

$C_6H_{12}HO_6 \rightarrow CH_3\text{-}CHOH\text{-}COOH + CH_3COOH + C_2H_5OH + CO_2 + H_2$

Produkty heterofermentativního kvašení jsou kromě kyseliny mléčné také kyselina octová, propionová, etanol, glycerol, oxid uhličitý, popř. vodík. Mezi hlavní mikroorganismy provádějící heterofermentativní kvašení patří *Lactobacillus brevis, Leuconostoc, Pediococcus.* [1, 2]

1.2.3 Nečisté kvašení

Při nečistém kvašení vznikají nepříjemně páchnoucí látky: NH_3 (hnití), kyselina máselná (máselné kvašení), kříš. Mezi hlavní mikroorganismy provádějící nečisté kvašení patří hnilobné bakterie (příslušníci rodu *Escherichia* a *Enterobacter*), bakterie máselného kvašení

(obligátně anaerobní *Clostridium butyricum, Clostridium pasteurianum, Clostridium tyrobutyricum*), plísně a křísové kvasinky (*Candida*, *Oospora*, *Torulopsis*). [1, 2]

1.3 Kyselina mléčná

Kyselina mléčná je čirá, nažloutlá, sirupovitá kapalina, molekulové hmotnosti 1,294 g/mol při 25 °C. Je dobře rozpustná ve vodě, alkoholu a éteru. Je nerozpustná v chloroformu. Ve vyšších koncentracích je hygroskopická. S chloridem železitým dává charakteristické žlutozelené zbarvení. [3]

Kyselina mléčná obsahuje jeden asymetrický uhlík. Existuje ve dvou optických formách jako levotočivá a pravotočivá a ve formě opticky inaktivní, racemické. Některé mikroorganismy produkují opticky aktivní kyseliny, ale ve většině případů se fermentací získává opticky inaktivní kyselina, což se připisuje účinku enzymu racemasy. Průmyslově vyrobená kyselina mléčná je obvykle racemická. [3]

Potravinářská kyselina mléčná, o koncentraci 50 nebo 80 % se používá v potravinářském průmyslu při výrobě džemů, cukrovinek, ovocných šťáv, esencí a často jako náhrada kyseliny citronové a vinné. [3]

Chemicky čistá kyselina mléčná se používá ve farmaceutickém průmyslu a na úpravu kravského mléka pro dětskou výživu za účelem zlepšení jeho stravitelnosti. [3]

2 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Pod pojmem bakterie mléčného kvašení se zpravidla rozumí skupina kokovitých a tyčinkovitých bakterií zahrnující některé druhy rodů *Lactococcus, Streptococcus, Enterococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus a Bifidobacterium.* [4]

Bakterie mléčného kvašení představují různorodou skupinu grampozitivních, nesporulujících bakterií, které jsou katalása negativní, i když v ojedinělých případech se může vyskytnout pseudokatalása. [5]

Bakterie mléčného kvašení se vyskytují na více přírodních stanovištích, nejenom v mléce a mléčných výrobcích. Nachází se na rostlinách a v zažívacím traktu člověka i zvířat. [4,6]

Bakterie mléčného kvašení hrají důležitou roli v potravinářském průmyslu např. při tvorbě aroma a textury mléčných výrobků a inhibují růst sporulujících bakterií. [5]

Pro většinu bakterií mléčného kvašení není kyslík toxický, rostou proto i za přítomnosti vzduchu. Jsou aerotolerantní, mikroaerofilní nebo fakultativně anaerobní. Výjimku tvoří přísně anaerobní bifidobakterie, které rostou optimálně v atmosféře s 10 % CO_2. Při přípravě speciálních kysaných mléčných výrobků na bázi bifidobakterií se používají kmeny za daných podmínek aerotolerantní (např. *Bifidobacterium longum* BB536). [4]

Mléčné bakterie jsou velmi náročné na živiny, které jim v přírodě poskytují rozkládající se rostliny a potraviny. Na tyto bohaté zdroje jsou natolik přivyklé, že nejsou schopny samy syntetizovat určité růstové faktory jako aminokyseliny, vitaminy skupiny B a jiné. Některé vyžadují pro svůj růst až 6 vitaminů. Koncentrace vitaminů se potřebná k dosažení maximálního růstu se u různých vitaminů liší. Nejnáročnější je *Leuconostoc mesenteroides*, který vyžaduje 17 aminokyselin, některé mléčné bakterie potřebují 2 až 3 aminokyseliny. [4, 6]

2.1 Třídění bakterií mléčného kvašení a jejich vlastnosti

Společným znakem bakterií mléčného kvašení je tvorba kyseliny mléčné ze zkvasitelných sacharidů. Dělí se podle hlavních a vedlejších produktů na homofermentativní a heterofermentativní. U některých rodů bakterií mléčného kvašení je možno použít jako identifikační znak i konfiguraci a optickou otáčivost vzniklé kyseliny mléčné. [4,5]

Z morfologického hlediska se u bakterií mléčného kvašení setkáváme s menší pestrostí. Nachází se zde koky v párech, kratších a delších řetízcích, tyčinky izolované a v řetízcích a u bifidobakterií větvené tyčinky. [4]

Tabulka 1: Rody bakterií mléčného kvašení, jejich typ a produkty [4]

rod (skupina)	typ fermentace	hlavní produkty (molární poměr)		konfigurace kyseliny mléčné
Lactococcus	homofermentativní	laktát		L(+)
Streptococcus	homofermentativní	laktát		L(+)
Pediococcus	homofermentativní	laktát		DL, L(+)
Lactobacillus	homofermentativní	laktát		
Thermobacterium	homofermentativní	laktát		D(-), L(+),DL
Streptobacterium	homofermentativní	laktát		D(-), L(+),DL
	heterofermentativní *	laktát:acetát	1:1	
Betabacterium	heterofermentativní	laktát:acetát:CO_2	1:1:1	DL
Leuconostoc	heterofermentativní	laktát:acetát:CO_2	1:1:1	D(-)
Bifidobacterium	heterofermentativní	laktát:acetát	2:3	L(+)

* při fermentaci pentos

2.2 Rod *Streptococcus*

V taxonomii streptokoků se často užívají dva klasifikační systémy vedle sebe. Ve starším pojetí jejich klasifikace se rod *Streptococcus* dělí na šest skupin: pyogenní streptokoky, orální streptokoky, jiné streptokoky, anaerobní streptokoky, enterokoky a mléčné streptokoky. V novějším klasifikačním systému je rozdělení do výše uvedených skupin ponechané s výjimkou vynechání anaerobních streptokoků a povýšení enterokoků a mléčných streptokoků na samostatné rody: *Enterococcus* a *Lactococcus*. [4]

Streptokoky tvoří sférické nebo vejčité buňky. Pokud rostou v tekutém médiu jsou uspořádany v párech, kratších či delších řetízcích. Jsou nepohyblivé, nesporulující, jsou grampozitivní, většinou fakultativně anaerobní a katalasa negativní. [8]

Bakterie rodu *Streptococcus* jsou homofermentativní, tzn. že fermentují sacharidy hlavně na kyselinu mléčnou. Neredukují dusičnan na dusitan. [4]

Streptokoky rostou v rozmezí 25 až 45 °C s optimem 37 °C a nerostou při 10 °C. [8]

Rod *Streptococcus* obsahuje druhy komenzální, parazitické až patogenní pro lidi a zvířata i saprofytické. Saprofytické druhy se vyskytují v přírodě a v potravinách a mají významné

využití v potravinářském průmyslu. Ty jsou ale nověji zařazeny v nových rodech *Lactococcus* a *Enterococcus* a řadí se k nim i *Streptoccocus salivarius* ssp. *thermophilus*. [4]

Streptokoky jsou náročné na živiny. Pro svůj růst a metabolismus vyžadují aminokyseliny, peptidy, puriny, pyrimidiny a vitaminy. Pro optimální růst v syntetických živných médiích je potřebná glukosa nebo jiný fermentovatelný sacharid. [4]

2.3 Mléčná skupina, rod *Lactococcus*

V mléčné skupině streptokoků, nebo-li v rodě *Lactococcus* nacházíme tyto druhy: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *hordniae*, *Lactococcus raffinolactis*, *Lactococcus garviae* a *Lactococcus plantarum*. [4]

2.3.1 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*

Lactococcus lactis ssp. *lactis* je v mlékárenství nejrozšířenějším mikroorganismem. V čerstvém, za hygienických podmínek nadojeném mléce a pouze tekoucí studniční vodou ochlazeném mléku se velmi dobře rozmnožuje a způsobuje kvašení. [4]

Lactococcus lactis ssp. *lactis* je součástí používaných „čistých mlékařských kultur“ na výrobu některých kyselých mlék, zakysaných smetan a na výrobu všech druhů sýrů. [9]

Buňky mají vejčitý tvar o průměru 0,5 – 1,0 μm, většinou jsou v párech nebo v krátkých řetízcích. V bujónové kultuře s glukosou dosahuje *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* při teplotě 30 °C konečnou hodnotu pH 4,5 až 4,0. [4]

Charakteristickým znakem je, že nefermentuje sacharosu nebo jenom v nepatrné míře. V mléku tvoří 0,8 až 0,9 % kyseliny mléčné a mléko sráží při 20 až 30 °C do druhého dne. Neštěpí kyselinu citronovou, netvoří acetoin, diacetyl ani CO_2. [4]

Pro svůj růst v syntetickém médiu vyžaduje přítomnost 4 až 5 vitaminů skupiny B, 10 až 13 aminokyselin, octan, oleát nebo lipoát.[4]

Některé kmeny produkují antibiotikum nisin, které inhibuje rozvoj řady grampozitivních bakterií, zvláště anaerobních sporotvorných, jako jsou klostrídie v tavených sýrech. Toto antibiotikum se používá jako pomocná látka při konzervaci potravin. Některé kmeny metabolizují aminokyselinu leucin. [4, 6]

2.3.2 *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*

Tento biovar má podobnou charakteristiku jako *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*. Liší se tím, že za přítomnosti fruktosy tvoří hlavně CO_2 a kyselinu octovou. Štěpí kyselinu citronovou, přičemž se ve značné míře tvoří acetoin. Diacetyl se potom z acetoinu tvoří oxidací vzdušným kyslíkem. *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* bývá v mezofilních čistých mlékařských kulturách, ve kterých se požaduje tvorba aroma (diacetyl). [4]

2.3.3 *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*

Lactococcus lactis ssp. *cremoris* se v mlékárenské technické mikrobiologii používá jako jedna ze složek mezofilních zákysů. Tvoří buňky o průměru 0,6 – 1,0 μm (často jsou větší jak *Lactococcus lactis*). Buňky zůstávají u sebe ve směru jejich dělení, proto vznikají dlouhé řetízky složené často z 20 i více buněk. [4]

Lactococcus lactis ssp. *cremoris* má některé charakteristické vlastnosti, kterými se liší od *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis*. Má nižší optimální teplotu růstu, tvoří měřitelné množství CO_2. Morfologicky se vyznačuje většími buňkami a tvorbou dlouhých řetízků, které jsou charakteristické jen pro čerstvé kultury pěstované v mléku. U starších kultur se řetízky rozpadají na páry. Některé kmeny tvoří sliz. [4]

2.3.4 *Lactococcus raffinolactis*

V mlékárenské mikrobiologii není tento druh běžný. Z fermentačního hlediska se od *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* liší hlavně fermentací sacharosy. Jeho původním stanovištěm jsou přirozeně zkysnutá mléka.[4]

2.3.5 *Lactococcus plantarum*

Lactococcus plantarum tvoří grampozitivní a nepohyblivé buňky, které mají kulovitý až vejčitý tvar a jsou protáhlé ve směru dělení, uspořádané v párech nebo krátkých řetízcích. Netvoří pigment a není β-hemolytický. Je fakultativně anaerobní a katalasa negativní. Roste při 10 °C a přestává růst při 45 °C. Snáší přítomnost NaCl do koncentrace 4 %. [10]

Lactococcus plantarum zkvašuje na kyseliny fruktosu, glukosu, maltosu, D-manosu, manitol, sorbitol, N-acetylglukosamin a celobiosu, nezkvašuje D-arabinosu, L-arabinosu, galaktosu, laktosu, rafinosu, ribosu, rhamnosu, L-sorbosu, D-xylosu, glykogen a inulin. [10]

2.3.6 *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*

O *Streptococus salivarius* ssp. *thermophilus* bude pojednáno v samostatné kapitole.

2.4 Enterokoková skupina, rod *Enterococus*

Význam a úloha rodu *Enterococcus* jsou v potravinářské mikrobiologii na první pohled protichůdné. Využívají se jejich pozitivní vlastnosti z původní příslušnosti k rodu *Streptococcus*. Enterokoky intenzivně fermentují sacharidy a někdy se účastní na tvorbě aroma a chuti potravin. Připisuje se jim i toxicita, tvorba biogenních aminů a využívají se mikrobiologii pitné vody jako indikátory recentního (nedávného) znečištění. Rod *Enterococcus* byl pojmenován podle jeho původního stanoviště, což jsou střeva lidí a zvířat. [4]

Enterokoky jsou odolné vůči zvýšené koncentraci soli v potravinách a tím i vůči snížené aktivitě vody, mohou přežívat nižší pasterační a termizační teploty. [4]

Enterokoky fermentují sacharidy podobně jako jiné bakterie mléčného kvašení. Neredukují dusičnan na dusitan, nerozkládají celulosu, pektin a tuky. Významnou proteolýzu vykazuje pouze proteolytický druh *Enterococcus faecalis*. [4]

Enterokoky jsou, i když se nepoužívají jako technické mikroorganismy, stálou součástí mikroflóry sýrů, syrových fermentovaných klobás, šunky a jiných i rostlinných potravin. Ementálské sýry, které obsahovaly málo enterokoků, měly málo výraznou chuť. Enterokoky mohou být synergisty užitečné mikroflóry. Stimulace je pravděpodobně způsobená rychlou tvorbou štěpných produktů bílkovin proteolytickými kmeny, které jsou poté snadno dostupným zdrojem dusíku pro jiné bakterie mléčného kvašení. Z tohoto důvodu mohou enterokoky, i pokud nejsou plynotvorné, stimulovat i dostatečnou tvorbu ok (jinými než propionovými bakteriemi) u tvrdých dlouhozrajících sýrů. [4]

2.4.1 *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis tvoří buňky prodloužené ve směru dělení o průměru 0,5 – 1,0 μm, uspořádané v párech a krátkých řetízcích. Zpravidla jsou nepohyblivé a na polotuhých živných půdách tvoří hladké smetanové až bílé kolonie. Je odolný vůči záhřevu na 60 ˚C po dobu 30 min, což je ale podmíněné hodnotou pH prostředí a stářím buněk. [4]

Enterococcus faecalis fermentuje glukosu za tvorby hlavně kyseliny mléčné. Aminokyselinu tyrosin dekarboxyluje na biogenní amin tyramin. [4]

V ementálských sýrech může způsobit *Enterococcus faecalis* pokud bude ve větším množství (5.10^5 až 1.10^6 KJT.g^{-1}) „bílou hnilobu“ a inhibovat tak tvorbu ok propionovými bakteriemi i vznik normální chuti těchto sýrů. Bílá hniloba se projevovuje na řezu tvorbou bílých skvrn s měkkým a hořkým obsahem. [4]

2.5 Rod *Leuconostoc*

Buňky těchto bakterií jsou kulaté, a uspořádané v párech a řetízcích. Jsou grampozitivní, nepohyblivé a netvoří spory. Jsou fakultativně anaerobní a katalasa negativní. [11]

Leukonostoky nejsou proteolytické a neredukují dusičnan na dusitan. V živných půdách vyžadují přítomnost růstových faktorů, aminokyseliny a vitaminy skupiny B. Jejich růst je podmíněný přítomností fermentovatelného sacharidu. Tvoří kyselinu mléčnou, CO_2 a etanol, což znamená že jsou heterofermentativní. Některé kmeny mají oxidační metabolismus a proto produkují místo etanolu kyselinu octovou. [4, 6, 8]

Většina leukonostoků disimiluje za přítomnosti fermentovatelného sacharidu citrát za tvorby diacetylu (CH_3-CO-CO-CH_3), acetoinu (CH_3-CHOH-CO-CH_3) a 2,3-butylenglykolu. Diacetyl je v mlékařství významnou aromatickou látkou. Naproti tomu v pivě a ve víně je nežádoucí. Vlastnost produkovat diacetyl ztrácejí některé kmeny, pokud jsou pasážovány v laboratorních podmínkách. [4]

Některé leukonostoky snášejí v prostředí vysoké koncentrace sacharosy (55 až 60 %) a jsou dobře přizpůsobitelné na prostředí cukrovarů, rafinérií a v potravinářských výrobách s větší spotřebou sacharosy, hlavně v roztocích (výroba limonád a slazených minerálních vod). Jejich růst a metabolismus způsobuje v cukrovarech významné ztráty sacharosy (1 až 2 %), korozi zařízení v důsledku produkce kyselin a pro tvorbu dextranových slizů poruchy v difuzérech. [4]

Kmeny leukonostoků tvořící dextranový sliz mají v buněčné stěně enzym dextran-sacharasu. [4]

2.5.1 *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*

Leuconostoc mesenteroides ssp. *mesenteroides* se vyznačuje tvorbou charakteristického dextranového slizu, který produkuje ze sacharosy, hlavně při teplotách 20 až 25 °C. [4]

Tento druh, přítomný jako kontaminace cukru, může způsobit úplné zrosolovatění slazených minerálních vod, ucpávat potrubí v cukrovarech a jako kontaminace v drožďářství má za následek aglutinaci droždí, a tím snížení jeho kvasné schopnosti. [6]

2.5.2 *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *dextranicum*

Leuconostoc mesenteroides ssp. *dextranicum* se vyznačuje tvorbou dextranu, ale je méně aktivní než *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*. Je méně náročný na živiny a růstové faktory. [4]

Dextran se vyrábí průmyslovou fermentací pro lékařské účely, jako náhražka krevní plazmy. [6]

Tento druh disimiluje citrát na aromatickou látku diacetyl, používá se proto v mlékárenské technologii jako složka smetanového zákysu. [4]

2.5.3 *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*

Leuconostoc mesenteroides ssp. *cremoris* netvoří ze sacharosy sliz. Mezi leukonostoky je nejméně aktivní a nejnáročnější na růstové faktory, vitaminy skupiny B a aminokyseliny. Vyznačuje se disimilací citrátu a tvorbou acetoinu a diacetylu. Je stalou složkou mezofilních smetanových kultur. Jeho přírodním stanovištěm je mléko a mléčné produkty. Jiné přírodní stanoviště není známé. [4]

2.5.4 *Leuconostoc lactis*

Leuconostoc lactis fermentuje laktosu rychleji než jiné druhy. Zjevně okyseluje a sráží i neobohacené mléko. Citrát disimiluje za tvorby acetoinu a diacetylu. Je termorezistentnější než ostatní druhy, snáší záhřev na 60 ˚C trvající 30 min. Tento druh bývá izolován pouze zřídka a pokud ano, tak nejčastěji z mléka a mléčných produktů. [4]

2.5.5 *Leuconostoc oenos*

Leuconostoc oenos se vyskytuje pouze ve víně a podobných produktech. Od ostatních leukonostoků se liší více charakteristickými znaky. Dobře roste v kyselém prostředí (počáteční pH 4,2 – 4,8), snáší prostředí s 10 % etanolu. Jeho růst je pomalý a vyžaduje 5 – 7 dní při 22 ˚C. Jiné leukonostoky v takto kyselém prostředí nerostou. [4]

2.6 Rod *Pediococcus*

Bakterie rodu *Pediococcus* patří mezi homofermentativní bakterie mléčného kvašení. Jejich hlavním metabolitem při fermentaci sacharidů je racemická (DL) a pravotočivá L(+) kyselina mléčná. Jejich původním stanovištěm jsou rostliny a z nich se dostávají do příslušných potravin. [4]

Pediokoky mají kokovité buňky, často jsou uspořádané v párech, tetrádách nebo tvoří shluky. Jsou grampozitivní, nepohyblivé a nesporulující. Jsou fakultativně anaerobní a katalasa negativní. [11]

Pediokoky neredukují dusičnan na dusitan. Jako všechny bakterie mléčného kvašení, jsou náročné na růstové faktory, aminokyseliny a vitaminy skupiny B. Růst je podmíněný přítomností fermetovatelného sacharidu. Nejsou proteolytické a jako typické saprofyty nejsou patogenní pro lidi a zvířata. [4]

V pivovarnictví jsou nežádoucí, protože produkují acetoin, který se oxidací vzdušným kyslíkem mění na aromatickou látku diacetyl a to nepříznivě ovlivňuje chuť piva. Do piva se dostávají ze sladovnického ječmene nebo z vyrobeného sladu. [4, 6]

Pediokoky se příležitostně, vedle jiných bakterií a kvasinek, zúčastňují kažení majonéz.[4]

Pozitivní úlohu mají pediokoky při fermentaci rostlinných potravin: zelí, okurek, zeleninových směsí, siláži a v asijských sojových a rýžových fermentovaných produktech. V asijských produktech se uplatňuje jejich halotolerantnost až halofilnost [4]

Při kvašení zelí se uplatňuje jejich acidotolerantnost. Rozmnožují se v třetí fázi kvašení, i při nižších teplotách, když je v prostředí už 1,5 až 2 % kyselin. Fermentují i hůře fermentovatelné pentosy (arabinosa, xylosa). [4]

Pediokoky jsou součástí startovacích kultur používaných při výrobě a zrání klobás a salámů, kde dojde k rychlé tvorbě kyseliny mléčné, která inhibuje rozvoj hnilobných bakterií a příznivě ovlivňuje chuť hotového výrobku.. [4, 6]

2.6.1 *Pediococcus damnosus*

Pediococcus damnosus se nachází v kazícím se pivě, mladině a pivovarských kvasnicích. Bývá složkou startovacích kultur v masném průmyslu. Fermentuje maltosu za tvorby kyselin, ne plynu. Z pyruvátu tvoří acetoin a diacetyl, který je nosnou aromatickou látkou tvořící

se v kazícím se pivě, tzv. sarcinový pach. Je značně tolerantní k chmelovým mikrobicidním látkám. [4]

2.6.2 *Pediococcus acidilacti*

Pediococcus acidilacti byl izolovan ze zkaženého rmutu a nechmelené mladiny. Neroste v pivě, protože je citlivý na chmelové mikrobicidní látky. Je termorezistentnější než ostatní pediokoky a bývá součástí startovacích kultur v masném průmyslu. [4]

2.6.3 *Pediococcus halophilus*

Pediococcus halophilus se aktivně účastní fermentace sojové zápary a sojových bobů při výrobě asijského rostlinného sýru „miso“. Nejlépe roste za přítomnosti 6 až 8 % NaCl, dobře snáší 18 % NaCl a některé kmeny 20 až 26 % NaCl. [4, 6]

2.7 Rod *Lactobacillus*

Buňky laktobacilů mají tvar nepohyblivých tyčinek. Jejich tvar však vykazuje značnou variabilitu přes dlouhé, rovné, mírně ohnuté až po koryneformní (kyjovité) tyčinky a kokotyčky. Délka buněk a stupeň jejich ohnutí je závislý na stáří kultury, složení kultivačního média a přítomnosti kyslíku v prostředí. Charakteristické vlastnosti buněk jednotlivých druhů však zůstávají zachovány. Některé plynotvorné druhy mají v kultuře směs dlouhých a krátkých buněk např. *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*. Kokotyčky bývají tak krátké, že je možná jejich záměna s leukonostoky nebo laktokoky. Buňky se dělí pouze v jedné rovině. Tendence tvorby řetízků není tak typická a závisí na růstové fázi a pH média. [4]

Laktobacily jsou velmi náročné na živiny a růstové faktory. Vedle fermentovatelných sacharidů jako zdroje uhlíku a energie, vyžadují i nukleotidy, aminokyseliny a vitaminy skupiny B. [4]

Většina laktobacilů roste nejlépe při mezofilních teplotách s horní hranicí asi 40 °C, některé rostou i při nižších teplotách jako 15 °C i 5 °C. Termofilní laktobacily mají horní teplotní hranici 55 °C a nerostou pod při teplotách 15 °C. [4]

Laktobacily jsou acidotolerantní až acidofilní, nejlépe rostou v slabě kyselých médiích s počáteční hodnotou pH 6,4 až 4,5. Růst se zastavuje, když pH dosáhne hodnoty 4,0 až 3,6, což závisí na druhu. Kyseliny mléčná a octová jsou v kyselém prostředí málo disocio-

vané a v tomto stavu působí spolu s nižším pH inhibičně až mikrobicidně na ostatní mikroorganismy v prostředí, s výjimkou jiných mléčných bakterií a kvasinek. Tyto vlastnosti laktobacilů jsou užitečné a uplatňují se v potravinářské technologii a v intestinálním traktu lidí a zvířat mají také pozitivní vliv. [4, 6]

Většina druhů je aerotolerantní, optimálního růstu však dosahuje za mikroaerofilních nebo anaerobních podmínek. Zvýšený obsah CO_2 v prostředí (asi 5 %) jejich růst stimuluje. [4]

Laktobacily při růstu v běžných médiích netvoří charakteristický pach, v potravinách však přispívají ke tvorbě jejich charakteristických chuťových a aromatických vlastností tvorbou těkavých látek jako acetaldehydu, diacetylu, kyseliny octové, aminokyselin a v sýrech i sulfanu. [4]

Nepřítomnost katalásy umožňuje kvantitativní zjišťování mléčných bakterií v potravinách nebo jiném prostředí. Kolonie vyrostlé na živné agarové půdě se přelijí 3 % roztokem peroxidu vodíku a ty, jež neuvolňují bublinky kyslíku jsou s největší pravděpodobností příslušníci rodu *Lactobacillus*. Podobně sice reagují např. někteří příslušníci rodu *Clostridium*, schopní pomalého růstu na vzduchu, avšak ty lze rozlišit na základě jejich schopnosti sporulovat. [7]

Laktobacily hrají důležitou roli při fermentaci mnoha druhů potravin, ale zároveň se také podílejí na kažení jídla, včetně piva. Pivo obsahuje látky z chmele, které přispívají k jeho hořkosti a zároveň ho chrání před škodlivými mikroorganismy, ale mnoho bakterií, včetně několika druhů laktobacilů, jsou v pivě schopny se rozrůstat. *Lactobacillus brevis, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus lindnery, Lactobacillus paracacei* a *Lactobacillus buchneri* se nacházejí v pivu a prostředí pivovarů po celém světě a působí jako kontaminanty. [12]

2.7.1 Třídění laktobacilů

2.7.1.1 I. skupina = obligátně homofermentativní laktobacily

Laktobacily zařazené v této skupině fermentují hexosy výhradně na kyselinu mléčnou a nefermentují pentosy ani glukonát. Do této skupiny se řadí např. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii, Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis, Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus Lactobacillus acidophilus* a *Lactobacillus helveticus.* [8]

2.7.1.2 II. skupina = fakultativně heterofermentativní laktobacily

Laktobacily zařazené v této skupině fermentují hexosy výhradně na kyselinu mléčnou, či na směs kyseliny mléčné, octové, mravenčí a etanolu a pentosy fermentují na kyselinu mléčnou a octovou. Do této skupiny se řadí např. *Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus sake.* [8]

2.7.1.3 III. skupina obligátně heterofermentativní laktobacily

Laktobacily zařazené v této skupině fermentují hexosy výhradně na kyselinu mléčnou, octovou (etanol) a oxid uhličitý a pentosy fermentují na kyselinu mléčnou a octovou. Do této skupiny se řadí např. *Lactobacillus buchneri, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus kefir.* [8]

2.7.2 Laktobacily v rostlinných materiálech

Laktobacily se v přírodě nacházejí v menších množstvích na povrchu neporušených rostlin. Naproti tomu spolu s ostatními bakteriemi mléčného kvašení rostou ve velkém množství na rozkládajících se rostlinných materiálech, zejména na kazícím se ovoci. Z tohoto důvodu mají velký význam při výrobě mnohých rostlinných fermentovaných produktů, jako i při kažení potravin a krmiv rostlinného původu: kyselé zelí, kvašené okurky, kvašená zelenina, siláž, pivo, víno, ovocné šťávy a jiné. V této souvislosti byli nejčastěji identifikované a izolované: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus fermentum*. [4]

Určité druhy jsou specifické pro určité produkty. Např. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* je charakteristickým termofilním mikroorganismem v bramborové nebo obilné zápaře a fermentuje při 40 až 55 °C. Používá se i jako technický mikroorganismus při výrobě kyseliny mléčné z melasy. [3, 4]

2.7.3 Laktobacily v mléku a mléčných produktech

Mléko po opuštění vemene při aseptickém dojení neobsahuje laktobacily. Ty se do něj dostávají z vnějšího prostředí prachem, stykem s mlékárenským nářadím a zařízením. Mléčné streptokoky (*Lactococcus* ssp.) rostou v mléku rychleji jak laktobacily, proto v čerstvém kyselém mléku je laktobacilů v poměru s laktokoky málo. Pokud však kyselé mléko stojí za

vhodných teplotních podmínek delší čas, přerůstají laktobacily, protože jsou vůči kyselému prostředí tolerantnější než laktokoky. V nativní kyselé syrovátce se zpravidla rozmnoží nejkyselinotolerantnější *Lactobacillus helveticus*, který tvoří až 3 % kyseliny mléčné. *Lactobacillus helveticus* je stálou složkou tzv. ementálského zákysu na výrobu tvrdých sýrů. Nověji se při výrobě sýrů používají i kultury *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* nebo *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*. [4]

Ve všech druzích sýrů, které zrají déle než 14 dní, se rozmnoží různé mezofilní laktobacily (*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*), jejichž původ je v mléku a na příslušném nářadí a zařízení. [4]

Velmi specifický na mléko adaptovaný laktobacilus je *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, který je vedle *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* složkou mikrobiální kultury na výrobu kysaných nápojů. [4]

2.7.4 Laktobacily na mase a masných výrobcích

Laktobacily hrají významnou úlohu při nakládání masa a zrání masa v láku a při fermentaci tepelně neopracovaných uzenin obsahujících přidanou sacharosu nebo jiný fermentovatelný sacharid. [4]

Ze zrajících tepelně neopracovaných uzenin se obyčejně izolují *Lactibacillus plantarum*, *Lactibacillus brevis*, *Lactibacillus farciminis*, *Lactibacillus alimenetarius* a jiné „atypické“ laktobacily. Ve startovacích kulturách pro masný průmysl se spolu se streptokoky, pediokoky a mikrokoky někdy nachází i *Lactobacillus plantarum*. [4]

Při skladování masných produktů za chladírenských teplot se v nich rozmnožují různé laktobacily. Ty svojí metabolickou činností chrání před kažením proteolytickými bakteriemi. Samotné však mohou způsobit závady, jako je kyselá chuť, jiné pachutě, tvorbu plynu, slizu, nebo zelenání. Zelenání způsobuje *Lactobacillus viridescens*. [4]

2.7.5 Laktobacily u lidí a zvířat

Intestinální trakt lidí a zvířat obsahuje více druhů laktobacilů, které v něm žijí jako komenzální mikroflóra na mukozním povrchu epitelu. Nejvýznamnějším druhem v intestinálním traktu lidí a zvířat je *Lactobacillus acidophilus*. Připisuje se mu blahodárný účinek na zdraví lidí a zvířat. [4]

Využívá se i v průmyslovém měřítku na výrobu acidofilního mléka pro lidi a sušeného acidofilního mléka pro krmné účely. Kyselá mléka a farmaceutické preparáty s obsahem tohoto mikroorganismu se používají na obnovení normálního složení střevní mikroflóry po aplikaci antibiotik. [4]

Lactobacillus salivarius je pravděpodobně nejtypičtějším druhem ústní dutiny, ale nachází se i v intestinálním traktu. Laktobacily se nachází i v bachoru přežvýkavců. [4]

2.8 Rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterie jsou velmi nepravidelné, často se větvící grampozitivní, zpravidla striktně anaerobní tyčinky, které nesporulují. Jsou nepohyblivé a nesnáší velmi kyselé prostředí. Rostou jednotlivě, v řetízcích, ve hvězdicovém nebo palisádovém uspořádání. [4]

Bifidobakterie jsou citlivé na kyslík a kyselé prostředí, proto je jejich životaschopnost v mléčných výrobcích velmi omezená. Látky, které ji zlepšují, jsou tzv. růstové faktory a patří mezi ně například κ-kasein, α-laktalbumin, β-laktoglobulin, kvasničný extrakt, threonin, cystein, pepton, dextrin, maltosa a hydrolyzáty kaseinu. Kaseinomakropeptid (CMP) obsažený v hydrolyzátech syrovátkových bílkovin (WPC) je lepším růstovým faktorem, než čistý CMP. Významnými růstovými faktory jsou galaktooligosacharidy (GOS), inulin, rafinosa nebo fruktooligosacharidy (FOS), které jsou zároveň také prebiotiky. GOS jsou pro bifidobakterie kultivované *in vitro* lepší substrát než laktulosa či rafinosa. Výborným médiem pro bifidobakterie je sojové mléko obsahující sacharosu, rafinosu a stachyosu, proto se vyrábí jogurt ze sojového mléka zakysaný standardní jogurtovou kulturou s přídavkem bifidobakterií. Výsledek je dvojí, konzument přijímá probiotika a senzorické vlastnosti sojového mléka se fermentací výrazně zlepší. [13]

Některé druhy tolerují jistou přítomnost kyslíku, ale pouze za přítomnosti CO_2 a nebo bifidogenních faktorů. Na Petriho miskách za aerobních podmínek nerostou. [4]

Jejich optimální růst je v rozmezí 37 až 41 °C, hraniční teploty jsou v rozmrzí 25 až 28 °C (minimum) a 43 až 45 °C (maximum). Jejich optimální pH pro růst je 6,5 až 7,0. Nerostou při pH 5,0 až 4,5 a 8,0 až 8,5. [4]

Bifidobakterie mají významnou úlohu v intestinálním traktu kojenců. Z fermentovatelných sacharidů produkují kyselinu octovou a mléčnou, které inhibují nežádoucí bakterie a stimulují intestinální peristaltiku. Kyselina octová, kterou bifidobakterie produkují ve větším

množství než kyselinu mléčnou (v poměru 3:2), má silnější antagonistický účinek na nežádoucí gramnegativní bakterie než kyselina mléčná. [4]

Bifidobakterie se nacházejí ve velkém množství ve stolici kojenců krmených mateřským mlékem. V menším množství se vyskytují i ve stolici kojenců krmenými přípravky z kravského mléka. [4]

3 STREPTOCOCCUS SALIVARIUS SSP. THERMOPHILUS

Streptococus salivarius ssp. *thermophilus* (dále jen *Streptococcus thermophilus*) nepatří z hlediska systematiky k tzv. mléčným streptokokům. Zařazuje se mezi „jiné streptokoky".

Tvoří kulovité až vejčité buňky o průměru 0,7 – 0,9 μm, v párech až řetízcích. Při nižší teplotě, než je optimální teplota, vytváří pouze krátké řetízky nebo dvojice koků. [4, 24]

Roste v teplotním rozmezí 20 až 50 °C, jeho optimální teplota růstu je 40 až 45 °C, přičemž dobře roste i při 37 °C. Dobře rostoucí kultury snáší teplotu 67 až 68 °C po dobu 50 minut. Pro poměrně nízkou optimální teplotu růstu se *Streptococcus thermophilus* nezařezuje mezi pravé termofilní bakterie. [4]

Divoké nekulturní kmeny *Streptococcus thermophilus* se někdy hromadí ve výměníkových sekcích pasterizačních zařízení. [4]

Nejvhodnějším prostředím pro jeho kultivaci je mléko. V syntetických médiích je náročný na živiny a růstové faktory. Mléko sráží při 30 až 45 °C do druhého dne, přitom tvoří pouze o něco málo více kyseliny mléčné než *Lactococcus lactis*. Čerstvé kultury dobře fermentují sacharosu a laktosu. Glukosovou část laktosy fermentuje na kyselinu mléčnou a galaktosu vylučuje do prostředí nebo mírně fermentuje. [4]

Streptococcus thermophilus je nejvýznamější pro potravinářský průmysl, protože je hojně využívaný pro výrobu mléčných výrobků a je považovaný za druhý nejdůležitější v průmyslu využívanou mléčnou startovací kulturu hned po *Lactococcus lactis*. [25]

V mlékárenské technické mikrobiologii se však často využívá pro schopnost fermentovat laktosu na kyselinu mléčnou spolu s jinými bakteriemi mléčného kvašení ve formě termofilních zákysů. Tato vlastnost se uplatňuje při výrobě jogurtu a na rychlé zvýšení kyselosti, resp. snížení hodnoty pH ještě ve výrobníku, při výrobě sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou. Později při zrání sýrů odumírá, protože nesnáší zvýšené koncentrace NaCl (>2 %) [4]

Tento druh je velmi citlivý na antibiotika a jiné inhibiční látky, z tohoto důvodu se v mlékařské analytice využívá na zjišťování přítomnosti inhibičních látek v mléce. [4]

Tato bakterie patří ke skupině termofilních mléčných bakterií a je tradičně využívaný v kombinaci s *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* nebo *Lactobacillus helveticus* výrobě jogurtů a sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou (např. Ementál). [25]

Mikroorganismy jogurtové kultury žijí v symbiose. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* uvolňuje aminokyseliny, které využívá *Streptococcus thermophilus*. *Streptococcus thermophilus* vytváří kyselinu mléčnou, která snižuje pH média na optimum pro růst bakterie *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, a kyselinu mravenčí, která stimuluje její růst. [16]

Streptococcus thermophilus lze dobře kombinovat s bifidobakteriemi, protože spotřebovává kyslík, čímž podporuje jejich růst. [16]

Streptococcus thermophilus je pro výrobu jogurtu užívaný vždy v kombinaci s *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, což vedlo k rozvoji komplexního symbiotického vztahu mezi těmito mikroorganismy, které sdílejí stejné ekosystémy. [25]

Streptococcus thermophilus je také používaný samostatně nebo v kombinaci s laktobacily při výrobě sýrů typů mozzarella a chedar. [25]

4 VYUŽITÍ MLÉČNÝCH BAKTERIÍ

4.1 Využití mléčných bakterií jako čistých mlékařských kultur

Čisté mlékařské kultury jsou definovány jako klíčové výrobní prostředky, kterými se do suroviny (mléka, smetany, syrovátky), zbavené všech patogenních, nežádoucích a technologicky škodlivých mikroorganismů, zavádějí vybrané, účelově zaměřené druhy specifických mikroorganismů, aby byl jimi vyvolán a zajištěn správný průběh výrobního procesu a dosažena žádoucí jakost hotového výrobku. [14]

Pojem „čisté mlékařské kultury“ je však nutno si vykládat pouze technicky. Nejde totiž o čisté kultury v pravém slova smyslu tohoto pojmu, ani o absolutní druhovou čistotu kultur, ale o jejich pojmové odlišení od dříve používaných přírodních kyšek neznámého mikrobiologického složení. [14]

4.1.1 Dělení čistých mlékařských kultur

4.1.1.1 Dělení podle obsažených skupin mikroorganismů

- Bakteriální kultury, které se dále dělí podle optimální teploty růstu na mezofilní a termofilní,
- kvasinkové,
- plísňové,
- smíšené (obsahují bakterie i kvasinky). [15]

4.1.1.2 Dělení podle druhové a kmenové skladby

- Jednokmenové (Single Strain Starters) obsahující jeden kmen určitého druhu,
- vícekmenové (Multiple Strain Starters) obsahující různé známé kmeny jednoho druhu,
- směsné vícekmenové (Multiple-Mixed-Strain Starters) obsahující různé definované kmeny různých druhů,
- tradiční kultury (Traditional Starters or Raw Mixed Strain Starters) obsahující druhy a kmeny částečně nebo zcela neznámé. [15]

4.1.2 Mezofilní bakteriální kultury

Mezofilní bakteriální kultury jsou složeny z mezofilních koků rodů *Lactococcus* a *Leuconostoc*. V kulturách obvykle dominují (obsah více než 90 %) tzv. kyselinotvorné koky *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* které při homofermentativním rozkladu laktosy obsažené v mléce produkují L(+) isomer kyseliny mléčné, který je fyziologicky výhodnější. *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* je z uvedené dvojce mikroorganismů citlivější k působení různých vnějších a vnitřních faktorů např. teplot (neroste při 45 °C) nebo koncentrace NaCl (neroste při 4% NaCl) a při opakovaném přeočkovávání se jeho podíl v mezofilních kulturách snižuje. [15]

Druhou složku mezofilních kultur tvoří tzv. aromatvorné koky, které se kromě produkce kyseliny mléčné z laktosy vyznačují rozkladem citrátů v mléce, z nichž produkují oxid uhličitý a směs čtyřuhlíkatých sloučenin, z nichž diacetyl je nositelem typického aroma. Aromatvorné koky jsou zastoupeny *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, který se vyznačuje homofermentativním rozkladem laktosy na L(+) isomer kyseliny mléčné a heterofermentativní druhy *Leuconostoc lactis* a *Leuconostos mesenteroides* ssp. *cremoris*, které tvoří z laktosy D(-) isomer kyseliny mléčné, oxid uhličitý a etanol nebo acetát. [15]

4.1.2.1 Základní, smetanová kultura

Dřívější název smetanová kultura neodpovídá širokému spektru mlékárenské výroby, ve kterém se kultura používá. Je to v každém směru kultura základní, určená k výrobě celého sortimentu kysaných mléčných výrobků, ať už nápojových, tvarohových nebo sýrových a dále k výrobě másla. [14]

Základní kultura je směsná kultura mezofilního charakteru. Obsahuje kyselinotvorné *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* a *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* a aromatvorné *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* a *Leuconostoc cremoris*. Optimální poměr mezi aromatvornými a kyselinotvornými bakteriemi je 1:9. [14]

4.1.2.2 Kefírová kultura

Kefírová kultura se připravuje buď z nálevu originálních kefírových zrn nebo se sestavuje z čistých mlékařských kultur bakteriálních a kvasinkových. Jako základní kmeny k přípravě kefírové kultury se většinou používají tradičně *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactococcus*

lactis, Lactobacillus acidophilus, Kluyveromyces fragilis, Candida kefyr. Kromě uvedených kultur lze kefírovou kulturu doplnit o další kmeny čistých mlékařských kultur pro zlepšení chuti a dieteticko-léčebných účinků kefíru a kefírového mléka. Kefír vyráběný z kefírových zrn obsahuje i menší podíl bakterií mléčného kvašení. [4]

4.1.3 Termofilní bakteriální kultury

Mikroorganismy termofilních kultur náleží k rodům *Lactobacillus, Streptococcus* a *Bifidobacterium*. Z rozsáhlého rodu *Lactobacillus* s více než 50 buď homofermentativními nebo heterofermentativními druhy se pro mlékárenské fermentace využívají tradičně *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* a *Lactobacillus helveticus* pro výrobu sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* jako složka jogurtové kultury společně se *Streptococcus thermophilus*, který nalézá uplatnění i při výrobě sýrů. [15]

4.1.3.1 Jogurtová kultura

Kultura klasického jogurtu je směsná termofilní kultura, která obsahuje bakterie *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus* (*Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*) v poměru 2:1 až 1:2. Laktobacily stimulují růst streptokoků uvolňováním aminokyselin při proteolytickém rozkladu bílkovin mléka a streptokoky působí stimulačně na růst laktobacilů produkcí kyseliny mravenčí, která snižuje redox potenciál prostředí. [14, 15, 16]

4.1.3.2 Acidofilní kultura

Acidofilní kultura je jednodruhová termofilní kultura která obsahuje mikroorganismus *Lactobacillus acidophilus*. Jedná se mikroorganismus intestinálního původu, který se využívá pro výrobu různých mléčných výrobků z důvodu pozitivního působení na organismus člověka i zvířat. [14]

4.1.3.3 Sýrařské kultury

Výchozí kulturou ve výrobě všech druhů sýrů zůstává základní kultura. Teprve ke specifikaci určitého typu sýra se přidávají při výrobě v menším množství další kultury, ať už ve formě čistých kmenů nebo směsných kultur. [14]

Ve formě čistých kmenů se používají mikroorganismy *Lactobacillus helveticus, Lactobacillus lactis, Lactobacillus casei a Lactococcus lactis.* Ve formě směsných kultur se používá ementálská kultura, která osahuje *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus helveticus* a eidamská kultura, která obsahuje *Streptococcus thermophilus a Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus.* [14]

4.2 Využití mléčných bakterií jako probiotika

Probiotika jsou živé mikroorganismy (většinou bakterie), dodávané organismu jako potravinové doplňky. Termín probiotický je v podstatě opakem slova antibiotický. Probiotika jsou obvykle vybírána z několika druhů mléčných bakterií, které patří do těchto hlavních skupin: *Lactobacillus, Bifidobacterium* a *Streptococcus*. Laktobacily patří do první skupiny která byla použita jako probiotikum. Později se začala využívat i skupina bifidobakterií. Tato „biologická agens“ jsou ve velké míře používána v mlékárenském průmyslu při výrobě jogurtů a dále i v některých jiných potravinách. [17, 18]

4.2.1 Požadavky na probiotika

Zárodky musí být jasně definované a musí být zaručena jejich čistota a dále je důležitá typizace mikroorganismu a jeho mikrobiologické, genetické, serologické a biochemické vlastnosti. Musí být vyloučeny faktory patogenity (tvorba enterotoxinů, cytotoxinů, hemolýza atd.) a prokázány zdraví prospěšné účinky na hostitele. Musí být součástí stravy ve formě živých buněk a ve velkých množstvích. Nesmí být zničeny během výrobního procesu a jejich životnost musí přesahovat dobu trvanlivosti výrobku. Musí mít odolnost k žaludeční šťávě, žluči, pankreatickým enzymům a enzymům tenkého střeva a schopnost uchytit se v dostatečné míře v tlustém střevě a optimálně kolonizovat tračník. [19, 20]

4.2.2 Mikroorganismy zařazující se mezi probiotika

Mezi mukroorganismy, které mají vlastnosti probiotik lze zařadit:

- *Lactobacillus* spp. *(L. acidophilus, L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus, L. casei/paracasei, L. fermentum, L. gasseri, L. helveticus, L. johnsonii, L. plantarum, L. rhamnosus, L. reuteri, L. salivarius*)

- *Bifidobacterium* spp. (*B. bifidum, B. longum, B. breve, B. infantii, B. lactis, B. adolescentis, B. animalis*)
- *Enterococcus* spp. (*E. faecium, E. faecalis*)
- *Lactococcus lactis*
- *Propionibacterium freudenreichii*
- *Saccharomyces boulardii*
- *Streptococcus thermophilus* [16, 21, 22]

Ačkoliv jsou *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus* uváděny jako probiotika, nepřežívají tyto bakterie průchod horní částí gastrointestinálního traktu. Pozitivní vliv na lidské zdraví však mohou mít i mrtvé buňky. [16, 22]

4.2.3 Formy probiotok

Probiotické mikroorganismy jsou nejčastěji používány jako doplňky stravy nebo jako součást specifických mléčných výrobků, v posledních letech také jako součást kojenecké a dětské výživy. V případě doplňků stravy jde nejčastěji o lyofilizované kultury, které mohou sestávat z jednoho nebo více druhů probiotických bakterií, a které jsou samostatně nebo s dalšími látkami vyráběny ve formě kapslí, tobolek, tablet, dražé. Zakysané mléčné výrobky s obsahem probiotické mikroflóry bývají nejčastěji vyráběny jako speciální nápoje a jogurty a jejich různé formy (jogurtové nápoje, krémy, deserty aj.), mléčná a cereální dětská výživa jsou dodávány jako dehydrované produkty. Existují i méně typické případy spojení probiotických bakterií s potravinami. Na trhu se např. vyskytují oplatky s náplní obohacenou o bifidobakterie nebo trvanlivé masné výrobky, u nichž se však většinou jedná o startovací kultury [21]

4.2.4 Možnosti využití probiotik

Experimentální vědecké studie popisují pozitivní účinek probiotik u mnoha zdravotních potíží, např. průjmy, recidivující kolitida způsobená bakterií *Clostridium difficile*, idiopatické střevní záněty, chronická pouchitida, kolorektální karcinom, akutní pankreatitida, průjem při infekci HIV a dětský atopický ekzém. Probiotika se při těchto zdravotních problémech účastní tvorby nutričních substrátů střevní sliznice a tvorby steroidů z cholesterolu, také redukují celkový cirkulující cholesterol. Dále mají příznivý účinek na střevní imunitu, upra-

vují porušené slizniční bariéry, eliminují toxiny a patogenní mikroorganismy. Probiotika přinášejí nové terapeutické možnosti u řady chorob. [29]

4.3 Kvašení zeleniny

Homofermentativní mléčné bakterie se používají pro kvasnou výrobu kyseliny mléčné. Samovolné mléčné kvašení se uplatňuje při konzervaci zelí, okurek, píce (tzv. silážování), protože zabraňuje rozvoji hnilobných bakterií. Na použití mléčného kvašení je založeno také sýrařství a výroba kysaných mléčných nápojů (kysaného mléka, acidofilního mléka, kefíru, kumysu aj.) [6]

4.3.1 Mléčné bakterie uplatňující se při kvašení zeleniny

Pro kvašení zeleniny mají význam druhy rodu *Lactobacillus*, především *Lactobacillus plantarum*. Uvedené bakterie kvasí při teplotách 15 až 27 ˚C, v prostředí mohou vytvořit asi 1,5 % kyseliny mléčné. Ze začátku kvasného procesu se rozmnožují heterofermentativní mléčné bakterie (tzv. beta-bakterie), které jsou žádoucí, protože vytvářejí kromě kyseliny mléčné i kyselinu octovou, acetylcholin a jiné aromatické produkty. Většina mléčných bakterií heterofermentativního kvašení přestává růst od koncentrace 1 % kyseliny. Dokvašování zeleniny způsobují hluboko prokvašující mléčné bakterie typu *Lactobacillus plantarum.* [2]

4.3.2 Průběh mléčného kvašení zeleniny

Při mléčném kvašení zeleniny se rozlišují tři fáze kvasného procesu.

4.3.2.1 Předběžná, přípravná fáze

V této fázi se rozmnožují všechny druhy mikroorganismů, kterým vyhovují podmínky prostředí. Nálev se začíná kalit a na povrchu se tvoří pěna. Rozmnožují se jak mléčné bakterie, tak bakterie ze skupiny Coli-aerogenes, které jsou rozšířeny především v půdě. Vlivem rozvoje mléčných bakterií se zvyšuje kyselost prostředí, činnost doprovodné mikroflóry slábne a převahy nabývají mléčné bakterie. Koliformní mikroorganismy přestávají růst od pH 4,2. Okyselení na toto pH však musí být dostatečně rychlé, jinak je nebezpečí ochuzení prostředí o cukr doprovodnou mikroflórou za vzniku nepříjemně chutnajících a zapáchajících produktů. [2]

Po dosažení kyselosti vhodné pro rozvoj kvasinek nastává přechodná symbióza mléčných bakterií s kvasinkami. Činností kvasinek vzniká etanol a CO_2. Etanolu může vzniknout nejvýše 1 %, současně se tvoří vonné estery, potřebné k vytvoření typické chuti kvašené zeleniny. [2, 23]

4.3.2.2 Hlavní fáze

Vlivem zvýšené kyselosti se potlačí rozvoj doprovodné mikroflóry a mléčné bakterie za vhodných podmínek kvasí až do koncentrace 2 % kyseliny mléčné. Důležitým chuťovým a regulujícím činitelem je přítomnost NaCl, který se přidává do celkové koncentrace 2 %. Brání rozvoji některých hnilobných mikroorganismů, ale činnost mléčných bakterií i při vyšších koncentracích neomezuje. [2, 23]

4.3.2.3 Třetí fáze mléčného kvašení

Po dokvašení mohou v prostředí růst především aerobní odkyselující mikroorganismy, které rozkládají i kyselinu mléčnou. Snižováním kyselosti se vytvářejí podmínky pro rozvoj máselných a hnilobných mikroorganismů. [technologie konzervárenství]

K odkyselujícím mikroorganismům patří plísně *Oospora lactis, Penicillium* a křísové kvasinky. Jsou vesměs přísně aerobní, jejich rozvoj je potlačován zamezením přístupu vzduchu k zelenině uzavřením nádob, udržováním zeleniny pod nálevem a nízkou skladovací teplotou. [2, 23]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo studium zvolených fenotypových vlastností vybraných kmenů bakterie *Streptococcus thermophilus*, který se hojně využívá v mlékárenském průmyslu. Byla studována jejich biochemická aktivita a to především produkce některých enzymů, zkvašované cukry, růst při různých teplotách, různém pH a v přítomnosti vyšší koncentrace NaCl. Dále byl stanoven profil aminokyselin a proteinů. Vlastnosti byly srovnány se sbírkovým kmenem.

6 POUŽITÉ MIKROORGANISMY

V experimentální části této práce bylo použito patnáct kmenů *Streptococcus thermophilus*, které byly získány z České sbírky mlékárenských kultur (Czech Collection of Dairy Mikroorganisms):

- *Streptococcus thermophilus* CCDM 7
- *Streptococcus thermophilus* CCDM 33
- *Streptococcus thermophilus* CCDM 45
- *Streptococcus thermophilus* CCDM 50
- *Streptococcus thermophilus* CCDM 69
- *Streptococcus thermophilus* CCDM 70
- *Streptococcus thermophilus* CCDM 126
- *Streptococcus thermophilus* CCDM 128
- *Streptococcus thermophilus* CCDM 129
- *Streptococcus thermophilus* CCDM 130
- *Streptococcus thermophilus* CCDM 131
- *Streptococcus thermophilus* CCDM 133
- *Streptococcus thermophilus* CCDM 224
- *Streptococcus thermophilus* CCDM 431
- *Streptococcus thermophilus* CCDM 438

Dále byl použit kmen *Streptococcus thermophilus*, který byl získán pro srovnání z České sbírky mikroorganismů (Czech Collection of Mikroorganisms):

- *Streptococcus thermophilus* CCM 4757

6.1 Stručná charakteristika a využití některých použitých kmenů

CCDM 7 ***Streptococcus thermophilus***

zdroj: lyofilizovaná kultura

optimální teplota: 37 °C

využití: výzkum, součást mikroflóry jogurtových kultur, sýrařství

CCDM 69 ***Streptococcus thermophilus***

zdroj: jogurt Německo

optimální teplota: 37 °C

využití: výzkum, součást mikroflóry jogurtových kultur, sýrařství

CCDM 70 ***Streptococcus thermophilus***

zdroj: izolát z jogurtové kultury

optimální teplota: 37 °C

zvláštní znaky: mírně táhlovitá konzistence

využití: výzkum, součást mikroflóry jogurtových kultur, sýrařství

CCDM 129 ***Streptococcus thermophilus***

zdroj: horské porosty ČR

optimální teplota: 37 °C

využití: výzkum, součást mikroflóry jogurtových kultur, sýrařství

CCDM 133 ***Streptococcus thermophilus***

zdroj: lyofilizovaná kultura

optimální teplota: 37 °C

využití: výzkum, součást mikroflóry jogurtových kultur, sýrařství [katalog]

7 MATERIÁL A METODY

7.1 Biochemické testy

7.1.1 kultivační půdy

Bujón M17 pro kultivaci

M17…….……..67,25 g

10% roztok glukosy……..95 ml

10% roztok laktosy……49,4 ml

voda…….…..950 ml

Příprava půdy: Bylo naváženo 67,25 g půdy M17 a rozpuštěno v 950 ml vody. Sterilace proběhla v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut. Poté bylo přidáno 95 ml 10% sterilního roztoku glukosy a 49,4 ml a 10% sterilního roztoku laktosy.

Půda M17 (agar)

M17…….……..67,25 g

10% roztok glukosy……..95 ml

10% roztok laktosy……49,4 ml

voda…….…..950 ml

agar……14,25 g

Příprava půdy: Bylo naváženo 67,25 g půdy M17, 14,25 g agaru a rozpuštěno v 950 ml vody. Sterilace proběhla v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut. Poté bylo přidáno 95 ml 10% sterilního roztoku glukosy a 49,4 ml a 10% sterilního roztoku laktosy. Takto připravená půda byla rozlita na Petriho misky.

Půda M17 s 6,5 % NaCl

M17…….…….67,25 g

10% roztok glukosy……..95 ml

10% roztok laktosy……49,4 ml

agar……14,25 g

NaCl.....61,75 g

voda…….…...950 ml

Příprava půdy: Bylo naváženo 67,25 g půdy M17, 61,75 g NaCl a rozpuštěno v 950 ml vody. Sterilace proběhla v autoklávu při 121°C po dobu 15 minut. Poté bylo přidáno 95 ml 10% sterilního roztoku glukosy a 49,4 ml a 10% sterilního roztoku laktosy.

7.1.2 Roztoky a ostatní chemikálie

fyziologický roztok	suspenzní médium pro STREPTOtest 16
1M NaOH	sterilizovaný parafinový olej
10M HCl	činidlo pro test HIPPURÁT
NaCl	činidlo pro test FOSFATASA

7.1.3 Streptotesty

Při stanovení biochemckých vlastností analyzovaných streptokoků bylo postupováno dle návodu STREPTOtest 16 od firmy PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o., který byl přiložen.

Jednotlivé kmeny streptokoků byly naočkovány do bujónu M17 a vždy dvakrát na Petriho misku pro kontrolu čistoty kultury křížovým roztěrem a kultivovány po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Následně byly jednotlivé bujóny s narostlými kulturami odstředěny při 3500 ot./min., 4 °C, po dobu 10 minut a dvakrát promyty fyziologickým roztokem. Poté byly buňky resuspendovány ve fyziologickém roztoku tak, aby vzniklý zákal odpovídal 3. stupni McFarlandovy zákalové stupnice.

Do prvních osmi jamek destičky s testy (sloupce H-A prvého řádku, tj. testy HIP až URE, tabulka 2) bylo inokulováno 0,1 ml suspenze bakterií ve fyziologickém roztoku. Dále byl odpipetován 1 ml suspenze k obsahu jedné ampulky suspenzního média pro STREPTOtest 16, takto zředěná suspenze byla promíchána a inokulována v množství 0,1 ml do zbývajících osmi jamek sloupce H-A druhého řádku, tj. testy MAN až RIB (tabulka 2). K testům ARG a URE byly přidány dvě kapky sterilního parafinového oleje. Do zbytku suspenze ve fyziologickém roztoku ve zkumavce byl vložen proužek VPtestu, tak aby obě zóny proužku byly

ponořeny. STREPTOtest 16 byl vložen do inkubačního sáčku a spolu s VPtestem vloženy do termostatu nastaveného na 37 °C.

Po dvou hodinách inkubace byla zhodnocena reakce s VPtestem a to tak, že do zkumavky s VPtestem bylo přidáno po 3 kapkách činidla pro VPT I a činidla VPT II, obsah byl protřepán a inkubován dalších 30 minut při 37 °C. Po uplynutí této doby byla odečtena VP reakce. Po 24 hodinách inkubace byl hodnocen STREPTOtest 16. K testům hipurát a fosfatasa byly přidány dvě kapky příslušných činidel a po inkubaci 5 až 10 minut při teplotě laboratoře (pro vývoj barevné reakce testu HIP), byly odečteny všechny testy podle tabulky „Interpretace reakcí".

Tabulka 2: Interpretace reakcí STREPTOtestu 16

sloupec	zkratka testu	test	reakce	
			pozitivní	negativní
řádek 1				
H	HIP	Hippurát	modrá	bezbarvá, slabě namodralá
G	PHS	Fosfatasa	červenofialová, červená	bezbarvá, narůžovělá
F	LAP	Leucin aminopeptidasa	žlutá	bezbarvá
E	GRL	α–Glukuronidasa	žlutá	bezbarvá
D	aGA	β–Galaktosidasa	žlutá	bezbarvá
C	ESL	Eskulin	černá, tmavě hnědá	bezbarvá, světle hnědá
B	ARG	Arginin	červenofialová, červená	žlutá, světle oranžová
A	URE	Ureasa	červená, červenooranžová	žlutá, světle oranžová
řádek 2				
H	MAN	Mannitol	žlutá, žlutooanžová	červená, červenooranžová
G	SOR	Sorbitol	žlutá, žlutooanžová	červená, červenooranžová
F	TRE	Trehalosa	žlutá, žlutooanžová	červená, červenooranžová
E	LAC	Laktosa	žlutá, žlutooanžová	červená, červenooranžová
D	RAF	Raffinosa	žlutá, žlutooanžová	červená, červenooranžová
C	INU	Inulin	žlutá, žlutooanžová	červená, červenooranžová
B	MLB	Melibiosa	žlutá, žlutooanžová	červená, červenooranžová
A	RIB	Ribosa	žlutá, žlutooanžová	červená, červenooranžová

7.1.4 Další biochemické a fyziologické testy

Dalšími biochemickými a fyziologickými testy byla sledována schopnost růstu jednotlivých kmenů streptokoků při teplotách 10 °C, 25 °C, 37 °C, 42°C a 45 °C, při pH 5, pH 5,5, pH 6 a pH 8,5 a na půdě s 6,5 % NaCl.

Jednotlivé půdy byly připraveny běžným způsobem. Pouze půdy pro růst mikroorganismů při různém pH byly upraveny pomocí 1M NaOH a 1M HCl před autoklávováním na pH o

dvě desetiny vyšší (při autoklávování dojde ke snížení pH o 0,2). Vyautoklávované půdy byly rozlity na Petriho misky a jednotlivé kmeny očkovány, vždy 8 kmenů na jednu misku. Naočkované misky o různém pH a misky s 6,5 % NaCl byly inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu dvou dní. Ostatní misky byly inkubovány v termostatech při 25 °C, 37 °C, 42°C a 45 °C po dobu dvou dní. Misky na kterých byl sledován růst při 10 °C, byly inkubovány v lednici po dobu jednoho týdne.

7.2 Stanovení aminokyselin

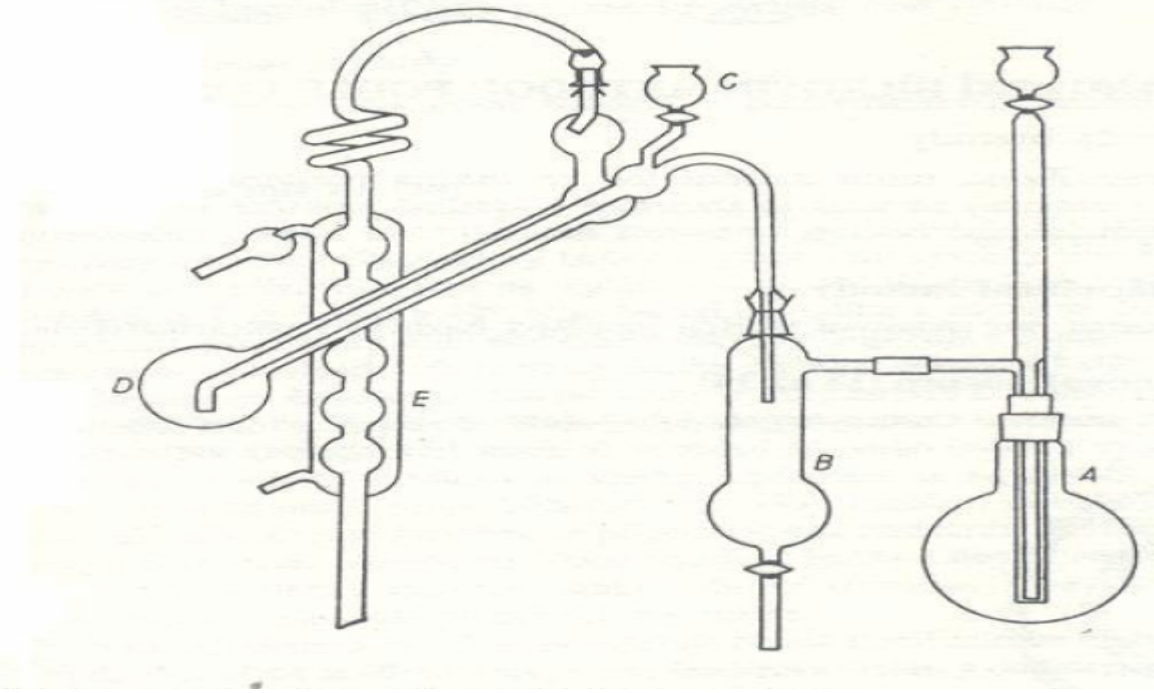
7.2.1 Roztoky a ostatní chemikálie

Fyziologický roztok	85% kyselina mravenčí
1M roztok HCl	30% NaOH
6M roztok HCl	2% H_3BO_3
H_2SO_4 – koncentrovaná	0,025M H_2SO_4
30% H_2O_2	

7.2.2 Postup stanovení aminokyselin

Jednotlivé kmeny byly kultivovány v bujónu M17 po dobu dvou dnů při teplotě 37 °C. Poté byly jednotlivé bujóny s narostlými kulturami odstředěny při 3500 ot./min., 4 °C, po dobu 10 minut a dvakrát promyty fyziologickým roztokem. Buňky byly vysušeny acetonem a dosušeny v sušárně.

Bylo stanoveno celkové množství dusíku v buňkách metodou dle Kjeldahla. Bylo naváženo přibližně 0,005 g vzorku do mineralizační baňky, přidáno 5 ml koncentrované H_2SO_4 a mineralizováno při 430 °C po dobu 15 minut. Poté bylo přidáno 5 ml 30% H_2O_2 po kapkách do doby než byl mineralizát čirý. Při mineralizaci dusík přítomný ve vzorku přechází na $(NH_4)_2SO_4$. Po vychladnutí byl mineralizát kvantitativně převeden do 50 ml odměrné baňky a doplněn vodou. Takto připravený vzorek byl destilován na Parnas-Wagnerově přístroji (obr.1).



Obrázek 1: Parnas-Wagnerův destilační přístroj pro stanovení dusíku

A – vyvíječ páry, B – kondenzační baňka, C – nálevka, D – destilační baňka, E - chladič

Nejdříve byl zahříván vyvíječ páry a puštěna voda do chladiče. Pod ústí chladiče byla postavena titrační baňka s 50 ml 2 % H_3BO_3, tak že ústí chladiče bylo ponořeno pod hladinou kyseliny. Do destilační baňky přístroje bylo odpipetováno 10 ml vzorku a přidáno 20 ml 30 % NaOH. Pomocí NaOH byl uvolněn amoniak a oddestilován vodní parou asi 15 minut a jímán do titrační baňky s H_3BO_3. Navázaný NH_3 byl stanoven titrací odměrným roztokem 0,025M H_2SO_4 a přepočten na dusík.

Stanovení obsahu aminokyselin ve vzorcích buněk předcházela kyselá hydrolýza. Do vialek bylo naváženo přibližně 0,01 g buněk, bylo přidáno 15 ml 6M HCl a zbytek prostoru byl vyplněn argonem. Takto připravené vzorky byly hydrolyzovány v termobloku při teplotě 115 °C po dobu 23 hodin. Po vychladnutí byla provedena filtrace, odpaření na vakuové odparce při 50 °C do sirupovité konzistence, dvakrát promyto vodou a znovu odpařeno. Odparek byl převeden do 10 ml odměrné baňky pomocí sodnocitrátového pufru (pH 2,2).

Pro stanovení sirných aminokyselin byla provedena oxidativní hydrolýza. Nejprve byla připravena oxidativní směs, která byla složena z 85% kyseliny mravenčí a 30% H_2O_2 v poměru 9:1 (v/v) a před vlastním použitím ponechána po dobu 16 hodin při 2 °C. Do zábrusové baňky bylo naváženo přibližně 0,01 g buněk a k nim bylo přidáno 15 ml oxidativní směsi.

Následovala hydrolýza v olejové lázni při 110 °C po dobu 23 hodin. Další postup byl shodný s kyselou hydrolýzou.

Analýza aminokyselin byla provedena na automatickém analyzátoru aminokyselin AAA 400 (Ingos Praha) pomocí sodnocitrátových pufrů a ninhydrinové detekce. Množství jednotlivých aminokyselin ve vzorcích bylo vyjádřeno v g/16 g N.

7.3 Stanovení proteinů

7.3.1 Roztoky pro SDS-PAGE

Tris pufr pro separační gel, pH 8,8 [26]

Tris (Serva)	18,15 g
Deionizovaná voda	50 ml

Pomocí koncentrované HCl (Lach-Ner) upravit pH na hodnotu 8,8 a doplnit deionizovanou vodou do 100 ml. Uchovávat při +4 °C.

Tris pufr pro koncentrační gel, pH 6,8 [26]

Tris (Serva)	6,0 g
Deionizovaná voda	50 ml

Pomocí koncentrované HCl (Lach-Ner) upravit pH na hodnotu 6,8 a doplnit deionizovanou vodou do 100 ml. Uchovávat při +4 °C.

Elektroforetický (elektrodový) pufr dle Laemliho 10x koncentrovaný (Serva)

Před použitím zředěn deionizovanou vodou v poměru 1:9.

30% roztok akrylamidu ; 2,67%C [26]

Akrylamid (Serva)	29,2 g
N,N´-metylen-bisakrylamid (Serva)	0,8 g

Doplnit do 100 ml deionizovanou vodou. Uchovávat při +4 °C v tmavé láhvi.

Vzorkový pufr [26]

(0,062 M Tris-HCl, 5% merkaptoetanol a 10% glycerol)

Tris-HCl (Serva)	0,0977 g
Merkaptoetanol (Serva)	0,5 g
Glycerol (Serva)	1,0 g
Bromfenolová modř (Serva)	0,01 g

Upravit pH na hodnotu 6,8 a doplnit deionizovanou vodou do 10 ml.

Coomassie brilliant blue G-250 [27]

Coomassie brilliant blue (Serva)	0,1 g
Etanol, 96% (Lach-Ner)	50 ml
Kyselina fosforečná 85% (Lach-Ner)	100 ml

Doplnit do 1000 ml deionizovanou vodou. Uchovávat při +4 °C v tmavé lahvi.

Fixační roztok (10% kyselina octová, 30% etanol)

Etanol, 96% (Lach-Ner)	30 ml
Kyselina octová (Lach-Ner)	10 ml

Doplnit do 100 ml deionizovanou vodou.

Roztoky pro barvení stříbrem [28]

40% etanol, 10% kyselina octová

Etanol, 96% (Lach-Ner)	41.6 ml
Kyselina octová (Lach-Ner)	10 ml
Deionizovaná voda do 100 ml	

2,5% uhličitan sodný v 0,02% formaldehydu

Uhličitan sodný, bezvodý (Lach-Ner)	3,75 g
Formaldehyd, 37% (Lach-Ner)	75 μl
Deionizovaná voda do 150 ml	

0,05% glutaraldehyd, 0,01% formaldehyd, 40% etanol

Etanol, 96% (Lach-Ner)	41.6 ml
Glutaraldehyd, 25% (Sigma)	0,2 ml
Formaldehyd, 37% (Lach-Ner)	25 µl
Deionizovaná voda do 100 ml	

0,5% Farmerův zeslabovač

Ferrikyanid draselný (Lach-Ner)	150 mg
Thiosíran sodný (Lach-Ner)	300 mg
Uhličitan sodný, bezvodý (Lach-Ner)	50 mg
Deionizovaná voda do 100 ml	

7.3.2 Stanovení profilu proteinů

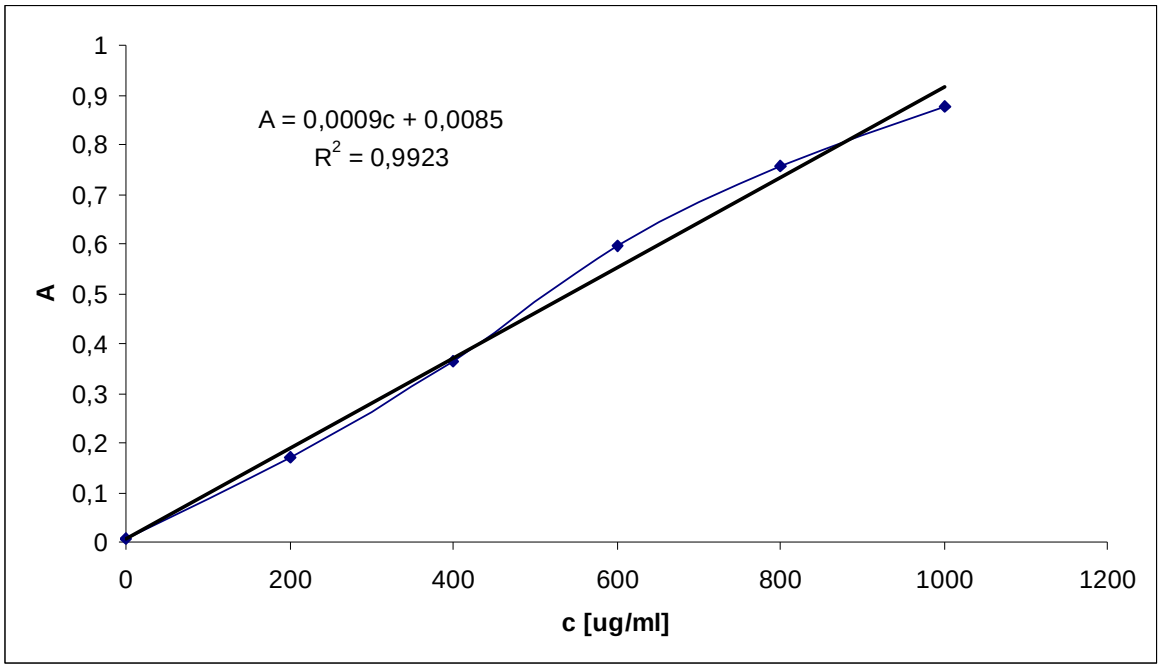
Analýza proteinů byla provedena metodou SDS PAGE. Byly srovnávány kmeny *Streptococcus thermophilus* uvedené v kapitole 5. Ke stanovení proteinů byly použity zamražené kultury, které byly kultivovány při stanovení aminokyselin. Tyto zmražené kultury byly rozmraženy, odstředěny při 3500 ot./min., 4 °C, po dobu 10 minut, dvakrát promyty destilovanou vodou a resuspendovány v destilované vodě.

Koncentrace proteinů byla stanovena spektrofotometricky metodou dle Bradfordové.[27]

Bylo smícháno 60 µl vzorku a 3 ml Coomassie brilliant blue a měřena A_{595} proti slepému vzorku. Obsah proteinů ve vzorku byl určen z kalibrační křivky získané ředěním lidského albuminu.

Tabulka 3: Kalibrační křivka

koncentrace albuminu (ug/ml)	A_1	A_2	průměr A
0	0,005	0,006	0,0055
200	0,186	0,154	0,1700
400	0,328	0,402	0,3650
600	0,571	0,621	0,5960
800	0,708	0,808	0,7580
1000	0,845	0,906	0,8755



Obrázek 2: Kalibrační křivka

7.3.2.1 Příprava vzorků pro SDS-PAGE

Resuspendované buňky byly rozbity pomocí lysozymu. Ke 100 µl suspenze buněk bylo přidáno 20 µl lysozymu (3 mg/ml) a inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu tří hodin. Množství přidaného lysozymu a doba inkubace v termostatu byla stanovena experimentálně. K takto připravenému vzorku bylo přidáno vždy 25 µl 20% SDS a vzorkový pufr v takovém objemu, aby celková koncentrace proteinů ve vzorku byla 100 µg/ml (optimální koncentrace proteinů zjištěná experimentálně) a celkový objem byl 250 µl. Vzorky byly dobře promíchány a inkubovány při +100 °C po dobu 10 minut. Takto zpracované vzorky byly připraveny pro analýzu pomocí SDS-PAGE.

7.3.2.2 Analýza proteinů metodou SDS-PAGE

Vertikální elektroforetická aparatura pro dva gely, která se skládá z vlastní vany, víka, dvou tvarovaných skel v párovém uspořádání, teflonového těsnění a hřebínku, byla sestavena podle přiloženého návodu výrobce. Použitá aparatura byla chlazená vodou na +4 °C.

Pro separaci proteinů byl zvolen 12% separační gel tloušťky 1 mm. Pro přípravu gelu byly smíchány následující roztoky [26]:

30% roztok akrylamidu	13,65 ml
Tris pufr, pH 8,8	9,1 ml
Deionizovaná voda	12,25 ml
10% SDS (Serva)	0,35 ml
10% persíran amonný (Serva)	140 μl
N,N,N´,N´-tetra-metylendiamin (TEMED, [Serva])	17,5 μl

Roztok persíranu amonného byl připraven čerstvý před každou elektroforézou. Po přidání persíranu amonného a TEMEDu byl roztok dobře promíchán a ihned aplikován pomocí pasteurovy pipety mezi skla do výšky cca 15 cm tak, aby nedošlo ke vzniku bublin. Pro získání hladkého povrchu a zamezení polymerace na vzduchu byl gel přelit 700 μl vodou nasyceného izobutanolu. Polymerace probíhala při pokojové teplotě. Po 45 minutách byla vrstva izobutanolu slita a povrch gelu byl opláchnut destilovanou vodou. Zbytky vody byly vysušeny filtračním papírem a byl aplikován 5% koncentrační gel, který byl smíchán z následujících roztoků [26]:

30% roztok akrylamidu	1,36 ml
Tris pufr, pH 6,8	2,0 ml
Deionizovaná voda	4,6 ml
10% SDS	80 μl
10% persíran amonný	40 μl
TEMED	10 μl

Po důkladném promíchání všech komponent byl roztok naléván na ztuhlý separační gel až těsně pod horní hranu skla. Poté byl opatrně vsunut teflonový hřeben tak, aby byly z jeho prostoru odstraněny všechny vzduchové bubliny. Takto připravený gel byl i se stojanem vložen do vlhké komůrky a nechal se polymerovat do druhého dne při pokojové teplotě.

Elektroforetická aparatura umožňuje elektroforézu dvou gelů současně. Oba gely je pak nutné připravit v dvojnásobném objemu.

Z gelu byl opatrně vyjmut hřebínek a bylo odstraněno teflonové těsnění. Do spodního prostoru aparatury byl nalit elektrodový pufr. Bylo zapnuto chlazení ultratermostatem a skla

byla upevněna tak, aby byly eliminovány bubliny ve spodní části gelu. Do horní části vany byl nalit elektrodový pufr, tak aby došlo k převrstvení jamek.

Vzorky byly nanášeny pomocí automatické pipety v objemu 20 μl. Kromě vzorků proteinů byl nanášen i molekulový hmotnostní standard Protein Marker, Broad Range (NEW ENGLAND Bio Labs) v objemu 15 μl.

Po nanesení vzorků byla elektroforetická komora překryta víkem a připojena ke zdroji stejnosměrného proudu. Jako konstantní veličina byla nastavena hodnota proudu, ostatní veličiny byly nastaveny tak, aby nebyly limitující. Díky svým vlastnostem vyžadoval každý gel odlišné podmínky. Pro koncentrační gel byla hodnota proudu nastavena na 25 mA (v případě, že běžely dva gely současně na hodnotu 35 mA). Jakmile doputovalo čelo elektroforézy vizualizované bromfenolovou modří k rozhraní koncentračního a separačního gelu (asi po 90 min.), byla hodnota proudu nastavena na 40 mA (pro dva gely na hodnotu 50 mA). Po doputování čela elektroforézy ke spodní hranici separačního gelu byl dělící proces ukončen.

Po ukončení elektroforézy byl z gelu odstraněn koncentrační gel a takto upravený dělící gel byl fixován 20 min. fixačním roztokem. Po fixaci se gely barví. Je možné je však ponechat ve fixačním roztoku v chladničce (při + 4 ^{o}C) do druhého dne a barvit až poté.

Gely s fixovanými proteiny byly barveny dusičnanem stříbrným se zkráceným fixačním časem dle Kirkeby a kol. [28]

1. 30% etanol, 10% kyselina octová	20 min.
2. 0,05% glutaraldehyd, 0,01% formaldehyd, 40% etanol	5 min
3. 96% etanol	20 min
4. destilovaná voda	20 min.
5. 0,5 % Farmerův zeslabovač	2,5 min.
6. destilovaná voda	3 x 10 min.
7. 0,1% dusičnan stříbrný (Lach-Ner)	20 min
8. opláchnout gel destilovanou vodou	
9. 2,5% uhličitan sodný	5 min
10. opláchnout gel destilovanou vodou	

11. 2,5% uhličitan sodný, 0,02% formaldehyd	3 x 2,5 min.
12. opláchnout gel destilovanou vodou	
13. 1% kyselina octová	5 min.
14. opláchnout gel destilovanou vodou	

Každý gel se barví samostatně v misce. Misky byly potom umístěny na třepačce a roztoky byly odsávány pomocí vakuové pumpy. Obarvené gely byly uchovávány při +4 °C v destilované vodě.

Gely byly snímány digitální fotoaparátem Olympus Camedia C-4000 ZOOM (Olympus, Japonsko) s objektivem Pentax C31204 (Japonsko) v automatickém režimu.

Snímky gelů byly analyzovány pomocí programu UltraQuant (Ultra.Lum, USA). Molekulové hmotnosti proteinových frakcí byly vypočteny programem UltraQuant. Byl použit Protein Marker, Broad Range (BioLabs) s proteiny definovaných molekulových hmotností kDa: 212; 158; 116; 97,2; 66,4; 55,6; 42,7; 34,6; 27; 20; 14,3; 6,5; 3,4; a 2,3.Analyzované gely byly statisticky vyhodnoceny metodou shlukové analýzy (průměry mezi skupinami, Euklidovské vzdálenosti) v programu Unistat, v.5.5., pomocí které byly sestrojeny dendrogramy.

8 VÝSLEDKY A DISKUSE

8.1 Biochemické a fyziologické vlastnosti sledovaných kmenů streptokoků

Streptotesty byly prováděny pomocí soupravy MIKRO-LA-TEST® STREPTOtest 16 (PLIVA Lachema Diagnostika s.r.o.). Byly srovnávány kmeny *Streptococcus thermophilus* uvedené v kapitole 5.

Z tabulky 4 vyplývá, že většina kmenů neprodukuje fosfatasu, kromě kmenů CCDM 69, 438 a 4754, β-galaktosidasu s výjimkou kmenů CCDM 33 a 4757, eskulin s výjimkou kmenů CCDM 33, 438, 4757.

Z tabulky 5 vyplývá, že žádný ze zkoumaných kmenů nezkvašovaly sorbitol, rafinosu a inulin. Naopak všechny kmeny zkvašují laktosu, což je dáno jejich příslušností k bakteriím mléčného kvašení. Dále většina kmenů zkvašovala trehalosu s výjimkou kmenů CCDM 55, 126, 129 a 131 a většina kmenů nezkvašuje melibiosu s výjimkou kmenů CCDM 33, 45, 438, 4757 a ribosu s výjimkou kmenů 33, 438, 4757.

Tabulka 4: Sledované biochemické vlastnosti streptokoků (1. řádek)

kmen č.	VPT	HIP	PHS	LAP	GLR	aGA	ESL	ARG	URE
7	+	+	-	-	+	-	-	-	+
33	+	+	-	+	+	+	+	+	-
45	+	+	-	-	+	-	-	+	+
55	-	-	-	+	-	-	-	-	-
69	+	+	+	-	+	-	-	+	+
70	+	-	-	+	-	-	-	-	-
126	-	-	-	+	-	-	-	-	-
128	+	+	-	-	+	-	-	-	+
129	-	-	-	+	-	-	-	-	-
130	+	+	-	-	+	-	-	+	+
131	-	-	-	+	+	-	-	-	-
133	+	-	-	-	-	-	-	-	+
224	+	+	-	-	+	-	-	+	+
437	+	+	-	-	+	-	-	+	+
438	-	-	+	+	-	-	+	+	-
4757	-	+	+	+	-	+	+	+	+

Tabulka 5: Sledované biochemické vlastnosti streptokoků (2. řádek)

kmen č.	MAN	SOR	TRE	LAC	RAF	INU	MLB	RIB
7	+	-	+	+	-	-	-	-
33	+	-	+	+	-	-	+	+
45	-	-	+	+	-	-	+	-
55	-	-	-	+	-	-	-	-
69	-	-	+	+	-	-	-	-
70	-	-	+	+	-	-	-	-
126	-	-	-	+	-	-	-	-
128	+	-	+	+	-	-	-	-
129	-	-	-	+	-	-	-	-
130	-	-	+	+	-	-	-	-
131	-	-	-	+	-	-	-	-
133	-	-	+	+	-	-	-	-
224	-	-	+	+	-	-	-	-
437	-	-	+	+	-	-	-	-
438	+	-	+	+	-	-	+	+
4757	+	-	+	+	-	-	+	+

Z dalších testů (tabulka 6) zkoumajících fyziologické vlastnosti, zejména schopnost růstu při různých teplotách, pH a v přítomnosti vyšší koncentrace NaCl, vyplývá, že jednotlivé kmeny rostly při různých teplotách, ale optimální teplotou růstu je teplota 37 °C, kdy rostou všechny sledované kmeny. Mezi nejcitlivější kmeny co se týče jak různé teploty, pH tak i přítomnosti 6,5 % NaCl patřily kmeny CCDM 7, 55, 126, 129 a 131, mezi nejodolnější potom kmeny CCDM 45, 69, 70, 128, 130, 224, 437 a 4757. Mezi kmeny citlivé pouze k 6,5 % NaCl náležely kmeny CCDM 33 a 438. Mezi kmeny produkující pigment patřily kmeny CCDM 70, 128 a CCM 4757, které produkovaly pigment oranžové barvy, pokud byly kultivovány za optimálních podmínek. Tolerance vůči NaCl byla poměrně vysoká, což je způsobeno příslušností ke grampozitivním kokům.

Tabulka 6: Odečtené výsledky fyziologických testů

kmen	pH 5	pH 5,5	pH 6	ph 8,5	NaCl	10℃	25℃	37℃	42℃	45℃
7	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
33	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
55	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
69	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
70	+ ***	+ ***	+ ***	+ ***	+ **	+ ***	+ **	+ **	+ ***	+ ***
126	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
128	+ **	+ **	+ **	+ **	+	+ ***	+ ***	+ **	+	+ **
129	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
130	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
131	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
133	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-
224	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
437	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
438	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
4757	+ **	+ **	+ ***	+ ***	+ ***	+ ***	+ ***	+ **	+ *	+ **

*** silná pigmentace, ** slabá pigmentace, * velmi slabá pigmentace

8.2 Aminokyselinový profil analyzovaných streptokoků

Pomocí chromatografické analýzy byly u kmenů *Streptococcus thermophilus* (kap. 5) detekovány tyto aminokyseliny: cystein, methionin, kyselina asparagová (+asparagin), threonin, serin, kyselina glutamová (+glutamin), prolin, glycin, alanin, valin, izoleucin, leucin, tyrosin, fenylalanin, histidin, lysin a arginin. Množství jednotlivých aminokyselin bylo vyjádřeno v g/16 g N (tab. 5 a 6). U všech kmenů byla nejméně zastoupena sirná aminokyselina cystein v množství 0,13-0,48 g/16 g N. Mezi další málo zastoupené aminokyseliny patří sirná aminokyselina methionin v množství 1,15-2,80 g/16 g N, prolin v množství 1,10-2,92 g/16 g N, tyrosin v množství 1,31-2,79 g/16 g N a histidin v množství 1,37-1,97 g/16 g N. U všech kmenů byla nejvíce zastoupena kyselina glutamová (+glutamin) a to v množství 8,99-11,36 g/16 g N. Mezi další aminokyseliny přítomné ve velkém množství se zařadily lysin v množství 6,96-8,90 g/16 g N, kyselina asparagová (+asparagin), které byly obsaženy 6,22-8,63 g/16 g N, glycin v množství 8,45-11,19 g/16 g N. Výjimkou byly kmeny CCDM 33, 55, 70, 126, 129, 131 a 438, které obsahovali této aminokyseliny podstatně méně a to 3,79-4,05 g/16 g N. Další významně zastoupenou aminokyselinou byl alanin, obsažený v množství 8,14-13,89 g/16 g N, výjimkou byly kmeny CCDM 33,128 a 438, které obsahovaly tuto aminokyselinu v množství 6,29-7,59 g/16 g N.

Tabulka 7: Obsah aminokyselin v g/16 g N

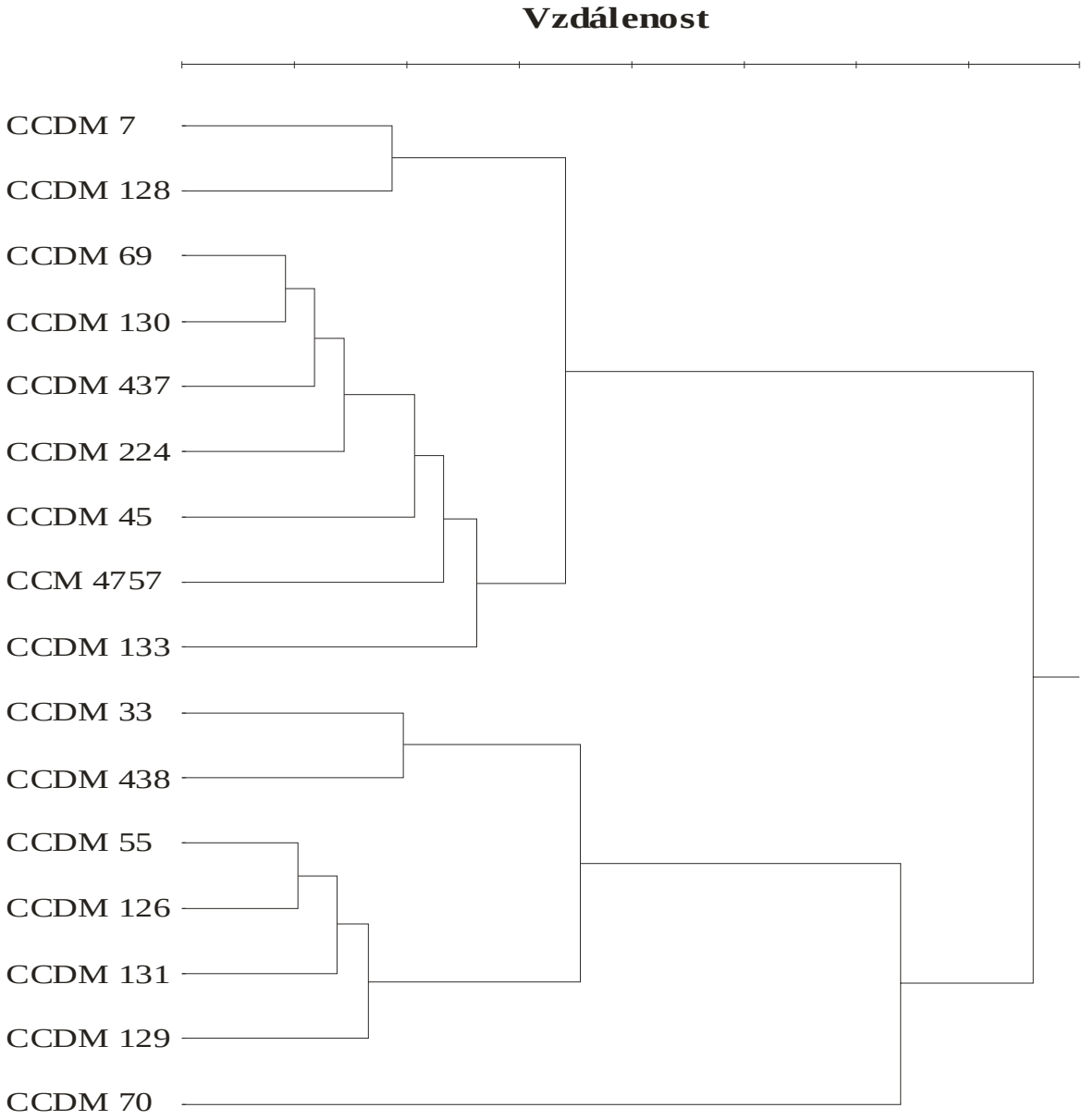
AK	CCDM 7	CCDM 33	CCDM 45	CCDM 55	CCDM 69	CCDM 70	CCDM 126	CCDM 128
Cys	0,28±0,021	0,60±0,015	0,19±0,028	0,33±0,051	0,28±0,007	0,47± 0,017	0,43±0,019	0,39±0,015
Met	1,28±0,190	2,80±0,057	2,31±0,205	1,34±0,147	1,44±0,045	1,20±0,031	1,90±0,066	2,07±0,085
Asp	7,78±0,499	8,57±0,343	6,65±0,586	7,58±0,687	6,22±0,352	6,50±0,405	7,53±0,575	6,82±0,377
Thr	3,39±0,286	3,176±0,176	2,70±0,421	3,26±0,352	2,33±0,132	3,24±0,225	3,46±0,360	2,89±0,362
Ser	3,04±0,201	2,20±0,089	2,68±0,163	2,26±0,157	2,58±0,128	2,39±0,122	2,29±0,205	3,03±0,225
Glu	10,24±0,598	10,01±0,600	9,76±0,624	9,67±0,516	9,07±0,566	11,36±0,569	9,62±0,763	9,13±0,443
Pro	1,86±0,288	2,58±0,185	1,94±0,371	2,51±0,316	1,34±0,120	2,92±0,209	2,12±0,202	1,85±0,573
Gly	8,93±0,374	3,79±0,173	11,19±0,456	4,03±0,199	10,34±0,723	3,83±0,158	3,91±0,372	8,45±0,536
Ala	8,14±0,408	6,98±0,233	10,11±0,618	9,68±0,605	9,08±0,702	13,89±1,600	9,09±0,740	7,59±0,447
Val	4,13±0,190	4,35±0,221	3,46±0,280	4,77±0,501	3,55±0,208	4,74±0,269	5,00±0,424	3,76±0,375
Ile	4,00±0,211	3,80±0,133	3,75±0,202	3,99±0,405	3,74±0,166	2,86±0,163	4,08±0,331	3,77±0,146
Leu	4,65±0,259	4,75±0,197	4,18±0,204	5,03±0,477	4,04±0,202	5,29±0,265	5,13±0,385	4,36±0,165
Tyr	1,57±0,408	2,79±0,268	1,40±0,248	2,12±0,341	1,49±0,079	1,57±0,69	2,11±0,226	1,57±0,212
Phe	2,84±0,143	2,74±0,212	3,02±0,160	2,85±0,315	2,70±0,147	2,23±0,097	2,94±0,238	2,70±0,122
His	1,89±0,145	1,60±0,079	1,49±0,133	1,71±0,114	1,45±0,066	1,81±0,105	1,55±0,146	1,79±0,198
Lys	7,99±0,377	7,56±0,269	8,90±0,503	7,92±0,387	8,36±0,549	6,96±0,501	7,79±0,580	7,66±0,367
Arg	3,51±0,338	4,11±0,185	2,93±0,293	4,62±0,344	2,85±0,193	6,05±0,294	4,86±0,327	3,31±0,330

Tabulka 8: Obsah aminokyselin v g/16 g N

AK	CCDM 129	CCDM 130	CCDM 131	CCDM 133	CCDM 224	CCDM 437	CCDM 438	CCM 4757
Cys	0,48±0,065	0,28±0,031	0,18±0,016	0,27±0,011	0,13±0,012	0,36±0,015	0,31±0,030	0,22±0,009
Met	2,34±0,309	1,97±0,231	0,79±0,029	0,86±0,131	0,75±0,024	1,15±0,037	1,35±0,136	0,97±0,014
Asp	7,74±0,710	6,22±0,272	7,87±0,646	6,55±0,319	6,61±0,593	6,50±0,462	8,63±0,549	6,44±0,527
Thr	3,43±0,320	2,31±0,179	3,53±0,286	2,52±0,167	2,54±0,178	2,46±0,219	3,23±0,156	2,49±0,202
Ser	2,33±0,242	2,62±0,186	2,14±0,230	3,61±0,189	2,54±0,234	2,44±0,207	2,02±0,098	1,64±0,115
Glu	10,33±0,770	8,99±0,406	9,98±0,715	10,33±0,402	9,85±0,647	9,27±0,679	10,31±0,433	9,56±0,755
Pro	2,14±0,141	1,10±0,077	2,26±0,242	1,33±0,183	1,33±0,420	1,07±0,314	2,78±0,180	1,45±0,120
Gly	3,83±0,314	10,86±0,559	3,81±0,306	10,45±0,577	10,81±0,669	10,22±0,549	4,05±0,226	9,56±0,690
Ala	9,94±0,373	9,17±0,670	8,91±0,715	10,71±0,684	9,40±0,669	8,98±0,336	6,29±0,304	8,38±0,638
Val	4,98±0,373	3,46±0,065	4,94±0,435	3,34±0,155	3,50±0,313	3,30±0,330	4,12±0,210	3,28±0,242
Ile	4,20±0,321	3,85±0,105	3,99±0,311	3,44±0,183	3,66±0,228	3,60±0,229	3,67±0,203	3,37±0,308
Leu	5,32±0,407	4,10±0,102	4,97±0,377	3,56±0,168	4,14±0,264	3,99±0,293	4,44±0,226	3,78±0,278
Tyr	2,25±0,251	1,58±0,090	2,19±0,207	1,32±0,139	1,40±0,260	1,31±0,277	2,14±0,170	1,66±0,102
Phe	3,05±0,210	3,01±0,154	2,38±0,233	2,46±0,129	2,74±0,191	2,78±0,227	2,49±0,159	2,38±0,221
His	1,73±0,05	1,68±0,309	1,51±0,128	1,49±0,093	1,97±0,410	1,85±0,333	1,51±0,118	1,37±0,113
Lys	8,19±0,323	8,54±0,499	7,35±0,617	8,04±0,338	8,47±0,540	8,06±0,350	7,22±0,376	7,69±0,596
Arg	4,77±0,491	2,79±0,336	4,42±0,427	2,55±0,365	2,66±0,209	2,40±0,232	3,67±0,170	2,89±0,242

Dále byla při stanovení aminokyselin provedena shluková analýza (obr. 2), která rozdělila zkoumané kmeny do dvou skupin. První skupina byla tvořena 9 kmeny a rozdělena na dvě podskupiny. První podskupinu tvořily kmeny CCDM 7 a 128, druhou podskupinu tvořily

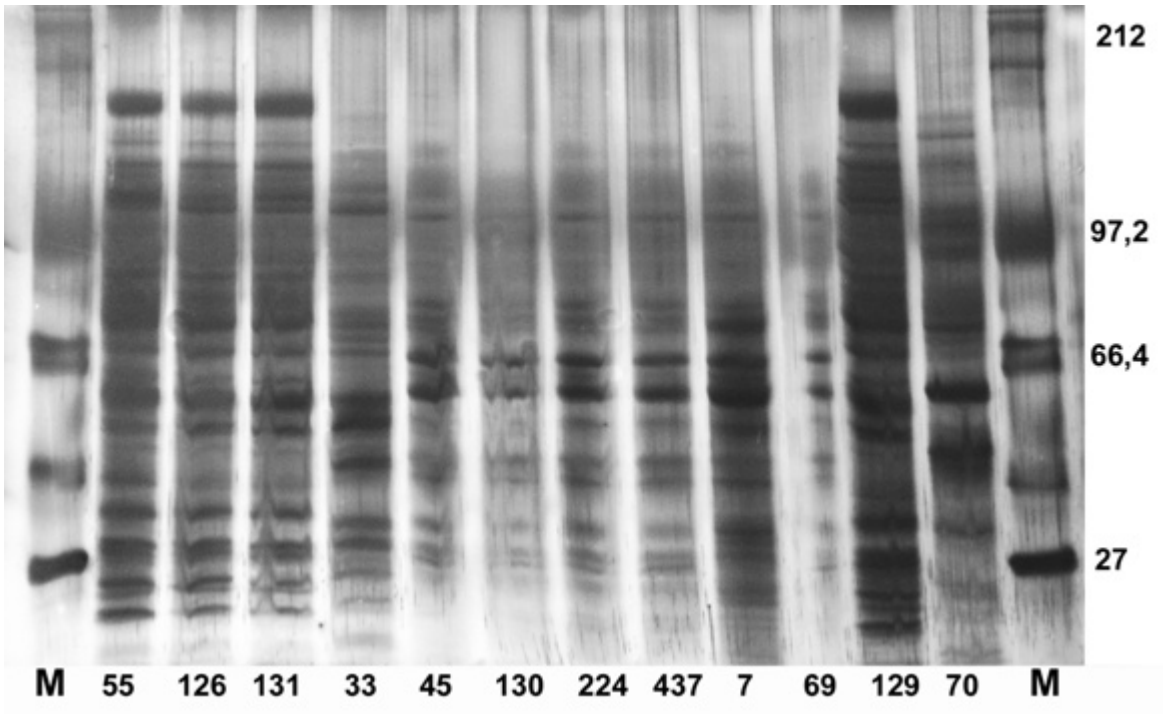
kmeny CCDM 69 a 130. Spolu s těmito 2 kmeny měli podobný aminokyselinový profil také kmeny CCDM 45, 133, 224, 437 a CCM 4757. Druhou skupinu reprezentovalo 7 kmenů analyzovaných streptokoků. Tato skupina byla rozdělena na 3 klustery. První podskupina byla tvořena 2 kmeny (CCDM 33 a 438). Ve druhé podskupině byly zastoupeny 4 kmeny s podobným aminokyselinovým profilem (CCDM 55, 126, 131 a 129). Aminokyselinový profil kmeny CCDM 70, který tvořil samostatný kluster v rámci této skupiny, byl odlišný prakticky od všech testovaných kmenů streptokoků, protože ke spojení tohoto kmene s dalšími analyzovanými kmeny došlo v dendrogramu až v poměrně značné vzdálenosti (čím je vzdálenost mezi kmeny kratší, tím jsou si kmeny bližší.



Obrázek 3: Dendrogram vytvořený z aminokyselinového profilu streptokoků

8.3 Proteinový profil analyzovaných streptokoků

Analýza proteinů byla provedena metodou SDS PAGE PAGE s následnou fixací proteinů dusičnanem stříbrným.. Byly srovnávány kmeny *Streptococcus thermophilus* uvedené v kapitole 5. Obr. 4 ukazuje proteinový profil studovaných kmenů bakterie *Streptococcus thermophilus*.



Obrázek 4: Proteinový profil studovaných kmenů *Streptococcus thermophilus* získaný metodou SDS PAGE (15% gel)

Po normalizaci gelů prostřednictvím molekulového hmotnostního standardu Protein Marker, Broad Range (BioLabs) byly pomocí vyznačených pozic molekulového standardu vypočteny programem UltraQuant (Ultra.Lum, USA) velikosti jednotlivých proteinů (tabulka 7).

Tabulka 7 srovnává množství proteinů u jednotlivých studovaných kmenů bakterie *Streptococcus thermophilus* v rozmezí molekulových hmotností 10-160 kDa.

U kmene CCDM 129 bylo v celém rozmezí identifikováno celkem 47 proteinů, z toho bylo nejvíce v rozmezí 60-130 kDa. U kmene CCDM 55 bylo identifikováno celkem 45 proteinů a nejvíce v rozmezí 60-110 kDa a 130-140 kDa. U kmene CCDM 126 bylo určeno celkem 44 proteinů, nejvíce jich bylo nalezeno v rozmezí 130-140 kDa, 60-110 kDa a 40-50kDa.

Kmen CCDM 131 obsahoval celkem 44 proteinů, nejvíce jich bylo identifikováno v rozmezí 60-110 kDa a dále potom v rozmezí 130-140 kDa.

Sbírkový kmen CCM 4757 obsahoval rovněž 44 proteinů, ale nebyly lokalizovány v tak velkém rozpětí jak tomu bylo u kmenů CCDM 126 a 131, které obsahovaly taktéž 44 proteinů. Sbírkový kmen CCM 4757 se lišil od všech ostatních kmenů vyjma kmene CCDM 129, a to přítomností tří proteinů v rozmezí molekulových hmotností 150-160 kDa.

Kmen CCDM 70 obsahoval celkem 43 proteinů, z toho 5 proteinů bylo lokalizováno v rozmezí molekulových hmotností 70-80 kDa a dále po čtyřech proteinech v rozmezí 40-50 kDa a 120-130 kDa. U kmenů CCDM 7 a 437 bylo identifikováno shodné množství proteinů, a to 40. Kmen CCDM 70 jich nejvíce obsahoval v rozmezí 100-120 kDa, 60-70 kDa a 30-40 kDa, úplně však chyběly proteiny o velikosti 150 kDa výše. U kmene CCDM 437 bylo identifikováno nejvíce proteinů v nejmenším rozmezí molekulových hmotností ze všech sledovaných kmenů, 7 proteinů v rozmezí 110-120 kDa, další větší množství proteinů bylo lokalizováno v rozmezí 100-110 kDa a 30-40 kDa. U tohoto kmene byla zaznamenána absence proteinů rozmezí 140-150 kDa.

Kmen CCDM 69 obsahoval celkem 39 proteinů, největší množství jich bylo nalezeno v rozmezí 100-120 kDa, 60-80 kDa a 30-40 kDa, zcela zde chyběly proteiny nad 150 kDa. U kmene CCDM 224 bylo identifikováno celkem 37 proteinů, nejvíce jich bylo lokalizováno v rozmezí molekulových hmotností 110-150 kDa, 60-70 kDa a zcela zde chyběly proteiny nad 150 kDa.

U kmenů CCDM 45 a 130 bylo nalezeno stejné množství proteinů, každý kmen obsahoval 35 proteinů. U obou kmenů byla zjištěna absence proteinů nad 150 kDa. U kmene CCDM 45 bylo nejvíce proteinů lokalizováno v rozmezí molekulových hmotností 100-120 kDa a 50-60 kDa. Kmen CCDM 130 obsahoval nejvíce proteinů v rozmezí 110-120 kDa a 60-80 kDa.

U kmenů CCDM 33 a 133 bylo identifikováno 34 proteinů, u obou kmenů byla zjištěna absence proteinů nad 150 kDa. Kmen CCDM 133 navíc postrádal proteiny v rozmezí molekulových hmotností 130-140 kDa, nejvíce proteinů u tohoto kmene bylo nalezeno v rozmezí 100-110 kDa a 40-60 kDa. Kmen CCDM 33 obsahoval nejvíce proteinů pouze v rozmezí 40-50 kDa.

Nejmenší počet celkového množství proteinů bylo zaznamenáno u kmenů CCDM 128 a 438. U každého z nich bylo identifikováno pouze 29 proteinů. U obou kmenů zcela chyběly proteiny větší než 140 kDa a dále oba tyto kmeny postrádaly proteiny v rozmezí molekulových hmotností 120-130 kDa. Nejvíce proteinů u kmene CCDM 128 bylo nalezeno v rozmezí 30-40 kDa a u kmene CCDM 438 v rozmezí 100-120 kDa a 40-50 kDa.

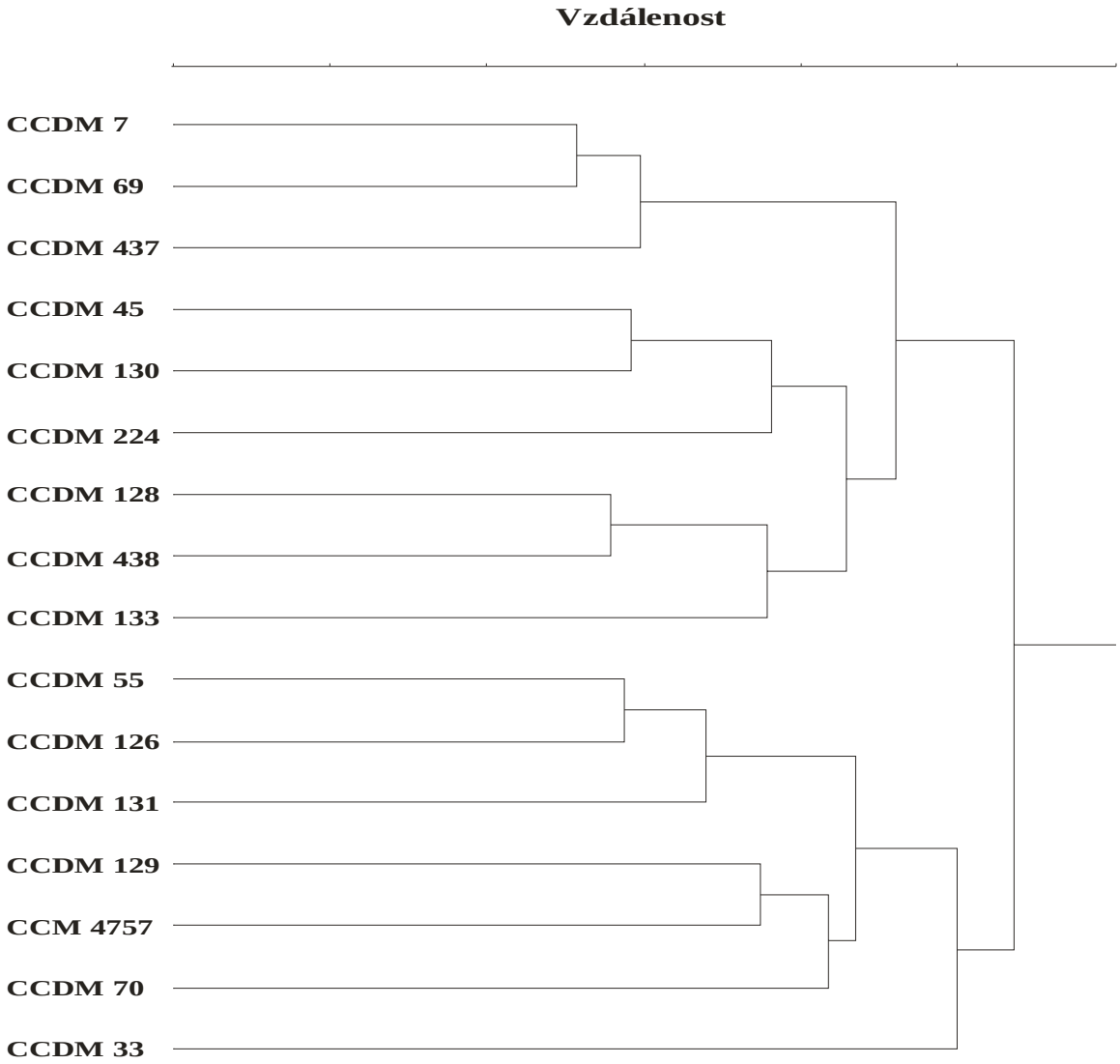
Tyto výsledky jsou ve shodě i s jinými autory. Salzano a kol. [30] studovali kompletní genom *Str. thermophilus* a dospěli k závěrům, že metodou SDS-PAGE lze u této bakterie zjistit přítomnost proteinů v rozmezí 10 -210 kDa. Nejvíce byly zastoupeny proteiny o molekulové hmotnosti mezi 45 – 90 kDa.

Rovněž bylo zjištěno, že proteinový profil *Str. thermophilus* je závislý na teplotě kultivace, zejména pak produkce proteinů teplotního šoku (Hsp proteiny) [31]. Naše kmeny byly kultivovány při 37 °C. Z tohoto důvodu by tedy bylo zajímavé sledovat rozdíly v proteinovém profilu bakterií kultivovaných např. při teplotě optimální, která byla v našem případě 37 °C a při teplotách jiných, ovšem takových, při kterých byl zaznamenán růst těchto bakterií (např. 25 nebo 42 °C).

Tabulka 9: Množství vizualizovaných proteinů u jednotlivých kmenů

molekulová hmotnost proteinů [kDa]	CCDM 55	CCDM 126	CCDM 131	CCDM 33	CCDM 45	CCDM 130	CCDM 224	CCDM 437	CCDM 7	CCDM 69	CCDM 129	CCDM 70	CCDM 4757	CCDM 128	CCDM 438	CCDM 133
150-160	1	1	1	-	-	-	-	1	-	-	3	2	3	-	-	-
140-150	3	3	2	2	1	1	1	-	1	1	3	2	2	-	-	1
130-140	4	4	5	3	1	1	1	1	1	1	3	3	4	1	1	-
120-130	3	3	3	2	2	2	3	3	3	3	4	4	4	-	-	1
110-120	1	1	1	2	5	4	5	7	4	4	4	1	3	2	1	2
100-110	4	4	4	2	4	3	3	4	4	4	3	3	3	3	4	4
90-100	4	4	4	3	2	3	3	2	3	3	4	3	4	3	2	3
80-90	4	4	3	2	1	1	1	1	2	1	4	3	4	1	1	2
70-80	4	3	4	2	3	4	3	3	3	4	3	5	3	2	2	2
60-70	4	4	4	3	3	4	4	4	4	4	4	3	1	2	2	3
50-60	3	2	2	2	4	2	3	4	3	3	2	3	3	3	3	4
40-50	3	4	3	4	2	3	3	3	3	3	3	4	3	3	5	4
30-40	3	3	3	3	2	2	2	2	4	4	3	2	3	4	3	3
20-30	2	2	3	2	3	3	3	3	3	2	2	3	2	3	3	3
10-20	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
celkové množství proteinů	45	44	44	34	35	35	37	40	40	39	47	43	44	29	29	34

Stejně jako u aminokyselinového profilu byla i u proteinů provedena shluková analýza (obr. 5). Na základě proteinového profilu byly sledované kmeny *Streptococcus thermophilus* rozděleny do 2 skupin. První skupina zahrnovala 9 kmenů a byla dále rozdělena na dvě podskupiny. První podskupina obsahovala 3 kmeny (CCDM 7 a 69, 437). Druhá podskupina byla rozdělena na další dvě podskupiny, první z nich obsahovala kmeny CCDM 45, 130, 224 a druhá obsahovala kmeny CCDM 128, 438, 133. Do druhé skupiny se spojilo 7 kmenů analyzovaných streptokoků, přičemž druhou tvořil samostatný kmen CCDM 33.První podskupina byla ještě rozdělena na dva menší klustery, první z nich zahrnoval kmeny CCDM 55,126, 131 a druhý zahrnoval kmeny CCDM 70, 129 a CCM 4757. Sbírkový kmen CCM 4757 se nejvíce podobal kmenu CCM 129. a to zřejmě protože oba tyto kmeny obsahují větší množství proteinů s vysokou molekulovou hmotností.



Obrázek 5: Dendrogram vytvořený z proteinového profilu streptokoků

ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na taxonomické zařazení, charakteristiky a výskyt bakterií mléčného kvašení. Dále je zde popsán význam a možnosti využití těchto bakterií.

V praktické části pak byla studována biochemická aktivita vybraných kmenů *Streptococcus thermophilus* získaných z České sbírky mlékárenských kultur, a to především produkce některých enzymů, zkvašované cukry, růst při různých teplotách, různém pH a v přítomnosti vyšší koncentrace NaCl. Dále byl stanoven profil aminokyselin a proteinů.

Z biochemických testů vyplývá, že všechny studované kmeny bakterie *Streptococcus thermophilus* zkvašují laktosu. Dalším společným znakem byla optimální teplota růstu 37 °C. Sbírkový kmen CCM 4757 ještě spolu s kmeny CCDM 70 a 438 produkoval oranžový pigment.

Analýzou profilu aminokyselin bylo zjištěno, že všechny studované kmeny osahovaly nejvíce kyseliny glutamové (+glutaminu) a nejméně sirné aminokyseliny cysteinu.

Analýzou profilu proteinů bylo zjištěno, že bylo identifikováno nejvíce proteinů se střední molekulovou hmotností. Proteiny s vysokou molekulovou hmotností byly zastoupeny v malé míře a některé kmeny tyto proteiny zcela postrádaly. Pomocí shlukové analýzy bylo zjištěno, že sbírkový kmen CCM 4757 je nejvíce podobný kmenu CCDM 129.

Všechny tyto vlastnosti byly stanovovány bakterie *Streptococcus thermophilus*, kvůli jeho značnému používání v mlékárenských technologiích. Vše však bylo stanovováno v laboratoři na syntetických půdách, dobré by bylo porovnat tyto vlastnosti přímo v potravinách.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] *Vscht: Příprava kysaného zelí*, [online]. [cit. 2006-02-06]. Dostupný z WWW: <http://www.vscht.cz/ktk/www_324/laboratory/OborII/zeli.pdf >

[2] ILČÍK, F., VANGURA, J., ČURDOVÁ, M., *Technologie konzervárenství*, Praha: SNTL, 1980.

[3] ZELINKA, J., *Bakteriálne a plesňové fermentácie*, Bratislava: Vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, 1960. 360 s. první vydání.

[4] GÖRNER, F.,VALÍK, Ľ., *Aplikovaná mikrobiológia poživatín*, Bratislava: Malé centrum, 2004. 528 s. první vydání, ISBN 80-967064-9-7.

[5] SCHLEIFER, K. H., EHRMANN, M., BEIMFOHR, C., BROCKMANN, E., LUDWIG, W., AMANN, R., Application of Molecular Methods for fhe Classification and Identification of Lactic Acid Bacteria, International Dairy Journal 5, 1995, p. 1081-1094.

[6] ŠILHÁNKOVÁ, Ľ., *Mikrobiologie pro potravináře*, Praha: Academia, 2002. třetí opravené a doplněné vydání. ISBN 80-200-1024-6.

[7] ŠILHÁNKOVÁ, L., *Mikrobiologie pro potravináře*, Praha: SNTL, 1983. 304 s. první vydání. ISBN 04-824-83.

[8] SEDLÁČEK, I., *Taxonomie prokaryot*, Brno: Masarykova univerzita, 2007. první vydání. ISBN 80-210-4207-9.

[9] van NIEL, E. W. J., HAHN-HÄGERDAL, B., Nutrient requirements of lactococci in defined growth media, Appl Microbiol Biotechnol 52, 1999, p. 617-627.

[10] SCHLEIFER, K. H., KRAUS, J., DVORAK, C., KILLPER-BÄLZ, R., COLLINS, M. D., FISCHER, W., Transfer of Streptococcus lactis and Related Streptococci to the Genus Lactococcus gen. nov., System. Appl. Microbiol. 6, 1985, p. 183-195.

[11] FLACKLAM, R., ELLIOTT, J.A, Identification, Classification, and Clinacal Relevance of Catalase-negative, Gram-positive Cocci, Excluding the Streptococci and Enterococci, Clin. Microbiol. Rev.: Oct. 1995, vol.8, no.4, p.479-495.

[12] YANSANJAV, A., ŠVEC, P., SEDLÁČEK, I., HOLLEROVÁ, I., NĚMEC, M., Ribotyping of lactobacilli isolated from spoiled beer, FEMS Microbiol. Lett. 229, 2003, p. 141-144.

[13] RUDOLFOVÁ, J., ČURDA, L., *Prebiotický účinek galaktooligosacharidů a využití laktosy pro jejich produkci*, [online]. [cit. 2008-02-06]. Dostupný z WWW: <http://chemicke-listy.cz/docs/full/2005_03_168-174.pdf>

[14] TEPLÝ, M., *Čisté mlékařské kultury*, Praha: SNTL,1984.

[15] KADLEC, P., a kol., *Technologie potravin II*, Praha: VŠCHT. první vydání (dotisk). 236 s. 2007. ISBN 80-7080-510-2.

[16] ČURDA, L., HOLUBOVÁ, J., RUDOLFOVÁ, J., NĚMEČKOVÁ, I., *Stabilita galaktooligosacharidů ve fermentovaných mléčných výrobcích a jejich vliv na probiotické kultury*, [online]. [cit. 2008-02-06]. Dostupný z WWW: <http://www.institut-danone.cz/data/studie/pridelene-granty/2004-04.pdf>

[17] GIBSON, G., WILLIAMS, CH., *Functional foods*, Boca Raton USA: Woodhead Publishing Limited, 2000. první vydání.

[18] VAUGHAN, E. E., MOLLET, B., Probiotics in the millenium, Nahrung 43, 1999, p. 148-153.

[19] BENEŠ, Z., KRTEK, V., *Lacidofil v léčbě dráždivého tračníku*, [online]. [cit. 2006-02-06]. Dostupný z WWW: <http://www.rougier.cz/lacidofil01.pdf>

[20] KLAENHAMMER, T. R., KULLEN M. J., Selection and design of probiotics, International Journal of Food Microbiology 50, 1999, p. 45-57.

[21] DRÁPAL, J., ETTLEROVÁ, K., HAJŠLOVÁ, J., JECHOVÁ, M., KOZÁKOVÁ, M., MALÍŘ, F., MÜLLEROVÁ, D., OSTRÝ, V., RUPRICH, J., SOSNOVCOVÁ, J., ŠPELINA, V., WINKLEROVÁ, D., *Probiotika a startovací kultury*, [online]. [cit. 2008-02-06]. Dostupný z WWW: <http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/dokumenty/informace/Info_2006_16_deklas_Probio_SK.pdf>

[22] KOHOUTKOVÁ, J., *Možnosti využití biologických agens v ochraně potravního řetězce*, [online]. [cit. 2008-02-06]. Dostupný z WWW: <http://www.phytosanitary.org/projekty/2004/vvf-08-04.pdf>

[23] KYZLINK, V., *Teoretické základy konzervace potravin*, Praha: SNTL, 1988. 512 s. první vydání. ISBN 04-812-88.

[24] KLABAN, V., *Mikrobiologický slovník*, Praha: Galén, 2005. první české vydání. ISBN 80-7262-341-9.

[25] HOLS, P., HANCY, F., FONTAINE, L., GROSSIORD, B., PROZZI, D., LEBLOND-BOURGED, N., DECARIS, B., BOLOTIN, A., DELORME, CH., EHRLICH, D., GUÈDON, E., MONNET, V., RENAULT, P., KLEEREBEZEM, M., News insights in the molecular biology and physiology of Streptococcus thermophilus revealed by comparative genomics, FEMS Microbiol. Rev. 5, 2005, p. 435–463

[26] POT, B., VANDAMME, P., KERSTERS, K., Analysis of electrophoretic whole-organism protein fingerprints, 1994, p. 493-522. *In:* Goodfellow M. and O´Donnel A.G. (*ed.*), Modern microbial methods. Chemical methods in procaryotic systematics. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England.

[27] BRADFORD, M. M., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 1976, p. 248-254.

[28] KIRKEBY, S., MOE, D., BOG-HANSEN, T. C., The silver staining procedure of sodium dodecyl sulfate gels may be accelerated by shortening fixation time. Electrophoresis 14, 1993, p. 51-55.

[29] NOVÁKOVÁ, V., *Probiotické kultury a jejich vliv na trávení*, Bakalářská práce. UTB ve Zlíně, 2006.

[30] SALZANO, A.M., ARENA, S., RENZONE, G., D´AMROSIO, C., RULLO, R., BRUSCHI, M., LEDDA, L., MAGLIONE, G., CANDIANO, G., FERRATA, L.

and SCALONI ,A. A widespread picture of the *Streptococcus thermophilus* proteome by cell lysate fractionation and gel-based/ gel-free approaches. Proteomics 7, 2007, p. 1420-1433.

[31] VARCAMONTI, M., ARSENIJEVIC, S., MARTIRANI, L., FUSCO, D., NACLERIO, D. and De FELICE, M. Expression of the heat shock gene *clpL* of *Streptococcus thermophilus* is induced by both heat and cold shock. Microbial Cell Factories 5, 2006, p. 1-6.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CPM	Kaseinomakropeptid
WPC	Hydrolyzát kaseinových bílkovin
GOS	Galaktooligosacharidy
FOS	Fruktooligosacharidy
CCDM	Czech Collection of Dairy Mikroorganisms
CCM	Czech Collection of Mikroorganisms
AK	Aminokyseliny
Cys	Cystein
Met	Methionin
Asp	Kyselina asparagová
Thr	Threonin
Ser	Serin
Glu	Kyselina glutamová
Pro	Prolin
Gly	Glycin
Ala	Alanin
Val	Valin
Ile	Izoleucin
Leu	Leucin
Tyr	Tyrosin
Phe	Fenylalanin
His	Histidin
Lys	Lysin
Arg	Arginin

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Parnas-Wagnerův destilační přístroj pro stanovení dusíku.....44

Obrázek 2: Kalibrační křivka.....48

Obrázek 3: Dendrogram vytvořený z aminokyselinového profilu streptokoků.....56

Obrázek 4: Proteinový profil studovaných kmenů *Streptococcus thermophilus* získaný metodou SDS PAGE (15% gel).....57

Obrázek 5: Dendrogram vytvořený z proteinového profilu streptokoků.....61

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Rody bakterií mléčného kvašení, jejich typ a produkty.....14

Tabulka 2: Interpretace reakcí STREPTOtestů 16.....42

Tabulka 3: Kalibrační křivka.....47

Tabulka 4: Sledované biochemické vlastnosti streptokoků (1. řádek).....52

Tabulka 5: Sledované biochemické vlastnosti streptokoků (2. řádek).....55

Tabulka 6: Odečtené výsledky fyziologických testů.....55

Tabulka 7: Obsah aminokyselin v g/16gN.....54

Tabulka 8: Obsah aminokyselin v g/16gN.....55

Tabulka 9: Množství proteinů u jednotlivých kmenů *Streptococcus thermophilus*.....60