

Využití molekulárně-biologických metod při sledování diverzity mikroflóry přírodních sýrů s rozdílným obsahem tuku

Michaela Křenková

Bakalářská práce
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Michaela Křenková**

Osobní číslo: **T15166**

Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**

Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Využití molekulárně-biologických metod při sledování diverzity mikroflóry přírodních sýrů s rozdílným obsahem tuku**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakterizujte technologie výroby sýrů.
2. Mikroflóra přírodních zrajících sýrů.
3. Metody molekulární biologie využívané při sledování biodiverzity.

II. Praktická část

1. Izolace DNA z přírodních sýrů.
2. Denaturační gradientová gelová elektroforéza využívaná při studiu mikroflóry.
3. Vyhodnocení výsledků a formulace závěru.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] ROSYPAL, Stanislav. Úvod do molekulární biologie. 1.díl. 2., rozš. vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 1997, 270 s. ISBN (brož.).

[2] FOX, P. F. Cheese: chemistry, physics, and microbiology. 3rd ed. London: Elsevier, 2004. ISBN 0122636538.

[3] C.B.S. Scientific. Instruction manual – Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Systems [online]. 2012, [cit. 30.8.2017]. Dostupné z: <http://www.cbsscientific.com/pdf/dgge-dggekinstructionmanual2012.pdf>.

[4] DONNELLY, Catherine W. Cheese and microbes. Washington, District of Columbia: ASM Press, 2014. ISBN 978-1-55581-586-8.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

2. února 2018

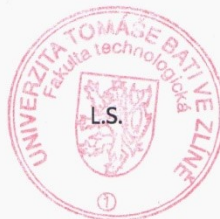
Termín odevzdání bakalářské práce:

3. května 2018

Ve Zlíně dne 2. února 2018



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



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

Příjmení a jméno: MICHAELA KŘENKOVÁ

Obor: TECHNOLOGIE PSTR.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 20.4.2018



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

V této práci byly optimalizovány metody izolace DNA z přírodních sýrů. Cílem bylo zhodnotit, pomocí které metody je možno získat co možná největší koncentraci a čistotu DNA pro následnou analýzu vzorků metodou PCR-DGGE a sekvenaci DNA. K izolaci DNA ze vzorků sýrů a mléka byla použita komerční souprava určená pro potraviny. Pro sledování diverzity mikroorganismů byla využita technika PCR-DGGE. Během výzkumu bylo zjištěno, že na izolaci DNA z přírodních zrajících sýrů má vliv rozdílný obsah tuku. U techniky DGGE byl zkoumán vliv koncentrace gelu na sledování diverzity mikroorganismů. U všech vzorků sýrů byl identifikován *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. U některých vzorků byl zaznamenán výskyt bakterií rodu *Bacillus* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Jiné zastoupení bakterií se nepodařilo stanovit.

Klíčová slova: gouda, přírodní sýry, izolace DNA z přírodních sýrů, PCR, DGGE

ABSTRACT

In this work have been optimized DNA isolation methods from ripened cheeses. The aim was to evaluate, by which method it is possible to obtain as much DNA concentration and purity as possible for subsequent analysis of samples by PCR-DGGE and DNA sequencing. A commercial kit for food was used to isolate DNA from cheeses and milk samples. To monitor the diversity of microorganisms was used PCR-DGGE. During the research, it was found that different amounts of fat affect the DNA isolation from natural maturing cheeses. For DGGE was investigated the effect of gel concentration on the diversity of microorganisms. For all samples was identified *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. In some samples was identified *Bacillus* sp. and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Other species of bacteria were not found.

Keywords: gouda, ripened cheese, DNA isolation from cheese, PCR, DGGE

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí bakalářské práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za možnost pracovat na zajímavém tématu, který rozšířil mé znalosti z oblasti molekulární biologie a mikrobiologie. Chtěla bych jí poděkovat za ochotu a trpělivost, kterou mi věnovala a stejně tak i za cenné rady při realizaci praktické části. Významný dík patří také paní laborantce Bc. Veronice Kučabové z Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí za poskytnutí pomocné ruky a odborný dohled. Stejně tak bych chtěla poděkovat své rodině a příteli, kteří mi byli po celou dobu studia velkou oporou.

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

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 SÝRY A JEJICH ZÁKLADNÍ ROZDĚLENÍ	11
2 TECHNOLOGIE VÝROBY SÝRŮ	12
2.1 SUROVINY PRO VÝROBU SÝRŮ.....	12
2.2 PROCES VÝROBY SÝRŮ	13
2.2.1 Úprava mléka	13
2.2.2 Příprava a přidavek mlékárenských kultur.....	13
2.2.3 Sýření	14
2.2.4 Zpracování sraženiny	14
2.2.5 Formování	14
2.2.6 Solení.....	14
2.2.7 Zrání	15
3 MIKROFLÓRA PŘÍRODNÍCH ZRAJÍCÍCH SÝRŮ	16
3.1 PRIMÁRNÍ STARTEROVÉ KULTURY.....	16
3.2 SEKUNDÁRNÍ KULTURY	16
3.3 NON-STARTEROVÉ MIKROORGANIZMY	17
4 METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE VYUŽÍVANÉ PŘI SLEDOVÁNÍ BIODIVERZITY	18
4.1 PŘÍPRAVA VZORKŮ PŘED PCR.....	18
4.2 INHIBITORY PCR.....	19
4.3 METODA PCR-DGGE.....	19
4.4 SEKVENACE DNA	20
II PRAKTICKÁ ČÁST	21
5 CÍL PRÁCE	22
6 IZOLACE DNA Z PŘÍRODNÍCH SÝRŮ	23
6.1 PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO IZOLACI DNA	23
6.2 IZOLACE DNA Z BAKTERIÁLNÍCH BUNĚK ZA VYUŽITÍ KOMERČNÍHO KITU	24
6.3 KONTROLA ČISTOTY A KONCENTRACE DNA.....	26
7 METODA PCR-DGGE VYUŽÍVANÁ PŘI STUDIU MIKROFLÓRY	27
7.1 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)	27
7.1.1 1. krok amplifikace.....	27
7.1.2 2. krok amplifikace.....	28
7.1.3 Příprava gelu pro elektroforézu.....	30
7.2 DEGRADAČNÍ GRADIENTOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA (DGGE).....	30
7.2.1 Sestavení aparatury pro výrobu gelu.....	30
7.2.2 Příprava gelu	31
7.2.3 Barvení a vizualizace	34
7.3 RE-AMPLIFIKACE, PURIFIKACE, SEKVENACE DNA A IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ	35
8 VÝSLEDKY A DISKUZE	38

8.1	ZNAČENÍ VZORKŮ SÝRŮ	38
8.2	OPTIMALIZACE IZOLACE DNA	38
8.3	OVĚŘENÍ ÚSPĚŠNOSTI AMPLIFIKACE DNA POMOCÍ ELEKTROFORÉZY	39
8.4	OPTIMALIZACE METODY DGGE.....	40
8.5	VÝSLEDKY SEKVENACE DNA A IDENTIFIKACE MIKROORGANIZMŮ.....	42
	ZÁVĚR	44
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	45
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	49
	SEZNAM OBRÁZKŮ	50
	SEZNAM TABULEK.....	51

ÚVOD

Sýry jsou řazeny mezi oblíbené mléčné výrobky nejen v České republice, ale i ve světě. Z hlediska postupu výroby se sýry dělí na přírodní a tavené.

Přírodní sýry jsou až na výjimky vyráběny z pasterovaného mléka, které bylo před výrobou upraveno na požadovanou tučnost. Během zrání dochází u přírodních sýrů k utváření charakteristických vlastností působením mikroorganismů a biochemických změn. Výsledné organoleptické vlastnosti sýru jsou dány především postupem výroby, druhem přidaných mlékárenských kultur a dobou zrání. Zejména během zrání však může dojít k ovlivnění výsledných vlastností mnoha faktory, jako je místo skladování, teplota a vlhkost, popřípadě aktivita přítomných mikroorganismů.

Ke sledování změn během zrání a skladování lze využít různé mikrobiologické metody, ať už kultivační, nebo non-kultivační. Zatímco kultivační metody slouží především ke srovnávání, non-kultivační metody se zaměřují na sledování konkrétních druhů mikroorganismů, které byly použity jako starterové kultury při výrobě, nebo se do potraviny dostaly jako kontaminace z mléka či vnějšího prostředí při výrobě.

Tato bakalářská práce se zaměřuje na sledování biodiverzity přírodních zrajících sýrů pomocí non-kultivačních molekulárně-biologických metod. Konkrétně se jedná o polymerázovou řetězovou reakci, degradační gradientovou gelovou elektroforézu a následnou sekvenaci získané mikrobiální DNA. Získané výsledky z DNA sekvenace vzorků sýrů byly porovnány s druhy mikroorganismů, které byly obsaženy v použité mlékárenské kultuře a s kulturou přítomnou v mléce, které bylo použito při výrobě jednotlivých vzorků. Rovněž byly sledovány případné kontaminující mikroorganismy v mléce a hotovém výrobku.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 SÝRY A JEJICH ZÁKLADNÍ ROZDĚLENÍ

Vyhláška č. 397/2016 Sb., která se zabývá požadavky na mléko, mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje, definuje sýr jako mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel. Tento vysrážený podíl syrovátky je oddělen a následně se nechá prokysat nebo zrát. Čerstvým sýrem se nazývá nezrající sýr. Zde je možno zařadit i nezrající termizované sýry. Zrajícím sýrem se poté rozumí ten, u kterého po prokysání došlo k dalším biochemickým a fyzikálním procesům [1].

Vyhláška rovněž uvádí základní rozdělení sýrů.

Podle obsahu tuku v sušině je možno sýry klasifikovat jako:

- vysokotučný
- plnotučný
- polotučný
- nízkotučný
- odtučněný [1]

Klasifikace přírodních sýrů podle konzistence ve vztahu k obsahu vody v tukuprosté hmotě sýra (jinak řečeno podle tvrdosti):

- extra tvrdý
- tvrdý
- polotvrdý
- poloměkký
- měkký [1]

Další možnost klasifikace sýrů je rozdělení přírodních sýrů na sýry čerstvé a zrající. Zrající sýry mohou být buď zrající pod mazem, nebo zrající v celé hmotě. Dále jsou pak členěny ještě na sýry s plísní na povrchu, s plísní uvnitř hmoty, dvouplísňové, v solném nálevu a pařené sýry [1].

2 TECHNOLOGIE VÝROBY SÝRŮ

Sýry jsou mléčné produkty vyráběné z mléka sýřením. Základní princip výroby přírodních sýrů spočívá v koagulaci mléka enzymovými preparáty, nebo změnou pH do oblasti blízké izoelektrickému bodu kaseinu (~ pH 4.6) [2], za vzniku sýrařského zrna a syrovátky. V praxi se často jedná o kombinaci obou postupů. Složení sýrů se velmi podobá složení sušiny mléka. V sýrech je obsažen především kasein a mléčný tuk. Pro výrobu 1 kg sýra se spotřebuje přibližně 10 litrů mléka [3]. Důležitým cílem je dosažení maximálního výnosu, kontrola složení a co nejkratší proces výroby. Hlavní kritéria z hlediska konečného složení jsou: obsah tuku, obsah vody, hodnota pH sýru, množství fosforečnanu vápenatého, který zůstane v sýru a množství syřidla zachovaného v sýřenině [2].

2.1 Suroviny pro výrobu sýrů

Mléko

Mléko je produkt mléčných žláz samic savců. Jeho základní chemickou složkou je voda, která zde tvoří až 85% podíl. Další důležitou složkou jsou bílkoviny, kterých je zde obsaženo v průměru 3,2 %. Pro výrobu mléčných výrobků je důležité zastoupení zejména kaseinových a syrovátkových bílkovin. Kasein tvoří asi čtyři pětiny mléčných bílkovin. Syrové kravské mléko obsahuje přibližně 4 % tuku, který se zde nachází ve formě emulze v tzv. mléčné plazmě. Další z hlavních složek je laktóza (obsah 4,6 %). Laktóza (mléčný cukr) se skládá z D-galaktózy a D-glukózy, které jsou navzájem propojeny glykosidickou vazbou. Laktóza většinou slouží jako hlavní substrát pro rozvoj bakteriálních kultur. Z minerálních látek se v mléce vyskytují především vápník, fosfor a hořčík. Důležité jsou zde i mléčné enzymy [3].

Syřidlo

Syřidlo je možno definovat jako enzymatický preparát, který je zodpovědný za vysrážení mléčných bílkovin z mléka. Základní složkou syřidla jsou enzymy chymosin a pepsin. V praxi se využívají nejčastěji syřidla mikrobiální. Z ekonomických a etických důvodů se pomalu ustupuje od používání chymosinu získávaného z telecích žaludků. Mnohem častěji se k produkci chymosinu využívá mikroorganismu *Rhizomucor miehei* nebo geneticky modifikovaných organismů [4, 5]. Koagulace mléka syřidlem je založena na enzymovém štěpení specifické peptidové vazby v kaseinové frakci [3].

Mlékárenské kultury (startovací kultury)

Při výrobě většiny mléčných výrobků se nejčastěji používají tzv. čisté mlékárenské kultury. Jedná se o specifické bakterie mléčného kvašení, které se inokulují do mléka o vhodné teplotě. Mlékárenské kultury mohou být stejného definovaného kmene jednoho druhu nebo i smíšené. Z mikrobiologického pohledu se pro výrobu sýrů využívají kvasinkové, plísňové i bakteriální druhy mikroorganismů. Přídavkem mlékárenských kultur dochází během zrání ke snížení pH díky fermentaci laktózy a produkci kyseliny mléčné a následnému utváření organoleptických vlastností sýra (chuť, aroma, textura a konzistence) [3].

V této bakalářské práci byl jako vzorek použit sýr vyrobený technikou nízkodohřívání sýřeniny. Při výrobě byla využita lyofilizovaná mezofilní kultura Flora Danica (Chr. Hansen, Dánsko). Složení této kultury je *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* a *Leuconostoc* sp. [6].

2.2 Proces výroby sýrů

2.2.1 Úprava mléka

Po odstředění a následné standardizaci mléka na požadovaný obsah tuku se jako základní technologická úprava mléka pro výrobu sýrů používá pasterace. Pasterace probíhá při teplotě 72 °C po dobu 15 s, což je standardní doba pro usmrcení většiny patogenních mikroorganismů. K redukci mikroorganismů se někdy využívají i různé alternativní metody, jako například mikrofiltrace nebo použití speciálně navržených odstředivek, tzv. baktofugace. Tyto alternativní metody se častěji využívají pro odstranění spor, především bakterií rodu *Clostridium* [4]. Samotná baktofugace nemusí odstranit všechny patogenní a podmíněně patogenní mikroorganismy. To znamená, že nenahrazuje pasteraci, jelikož zde chybí tepelný záhřev a z hlediska legislativních předpisů nedojde k inaktivaci alkalické fosfatázy, která je ukazatelem správného tepelného ošetření mléka [7].

2.2.2 Příprava a přídavek mlékárenských kultur

Startovací kultury bývají zpravidla mléčné bakterie. U přírodních sýrů typu gouda se nejčastěji využívají mezofilní kultury rodu *Lactococcus*. Tyto kultury bývají uchovávány zpravidla lyofilizací. Před použitím je tedy nutné provést jejich rekonstituci [4]. Ta se provádí tak, že se definované množství přidá do mírně ohřátého mléka, které bude použito pro výrobu sýru. Kultura se rozmíchá a vlastní přídavek starteru následuje po záhřevu na teplotu sýření (30–33 °C) 30–45 minut před sýřením v dávce 0,5–2 % [3].

2.2.3 Sýření

Koagulace mléka syřidlem je založena na štěpení specifické peptidové vazby, kdy v primární fázi vzniká para- κ -kasein a glykomakropeptid. V sekundární fázi dochází k tvorbě gelu [3]. Koagulanty jsou obvykle dodávány jako kapalné koncentráty, které mohou být odměřovány a ihned přidávány přímo do sýrařské vany [4]. Syřidlo se přidává ve formě zředěného roztoku, kdy dávka syřidla se pohybuje do 30 ml na 100 kg mléka. Následně dochází 2-3 minuty k míchání a během 8-10 minut se mléko uvede do klidu, aby se nenarušila tvorba gelu a nedocházelo ke ztrátám do syrovátky. Doba trvání procesu koagulace je obvykle 30-40 minut [3].

2.2.4 Zpracování sraženiny

Zpracování sraženiny slouží k vytvoření sýrařského zrna a k oddělení potřebného množství syrovátky ze struktury gelu. Dochází k tomu přibližně po 40 minutách, kdy má gel požadovanou tuhost. Do hmoty se vloží speciální krájecí forma a gel se nakrájí na částice o velikosti 6-10 mm, tzv. sýrařské zrno [4]. Při krájení gelu dochází k synerezi, což je smršťování sýrových částic a uvolňování syrovátky. U polotvrdých a tvrdých sýrů jsou zařazeny ještě operace dohřívání a dosoušení. U sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou se teplota dosoušení pohybuje v rozmezí 36-37 °C. U sýrů typu gouda a eidam se navíc provádí ještě tzv. praní sýrařského zrna, při kterém se snižuje obsah laktózy. Praní probíhá v horké vodě za současného dohřívání [3].

2.2.5 Formování

Způsoby formování závisí na typu sýra. V případě, že se jedná o sýr s tvorbou ok, se nejprve vypustí syrovátka i se zrnem do předlisovací vany, která má dno potažené látkou z tkaniny. Víkem vany se předlisuje plát sýřeniny. Následně se nakrájené bloky vkládají do nerezových nebo plastových forem, ve kterých jsou sýry následně lisovány. Při lisování dochází k dalšímu uvolňování syrovátky a k formování konečného tvaru [3].

2.2.6 Solení

Existuje několik různých postupů solení sýra: solení do zrna, solení na sucho a solení v solné lázni. Nejčastěji se využívá solení v solné lázni o koncentraci 18-22 % chloridu sodného při teplotě 10-15 °C přibližně hodinu po lisování. Doba solení je závislá na požadovaném obsahu soli, velikosti a tvaru sýra [3]. Zpravidla platí, že čím vyšší má sýr obsah soli, tím je tvrdší. Průměrný obsah soli v mladé goudě je obvykle 2-3 g na 100 g vody v sýru. Pro

rovnoměrné rozložení soli je potřeba poměrně dlouhá doba, která u velkých bochníků může trvat až 2 měsíce zrání ve zracích sklepech [5].

2.2.7 Zrání

Během zrání sýru dochází k významným změnám ve struktuře i složení, které ve výsledku dávají sýru jeho specifické organoleptické vlastnosti jako chuť, aroma, texturu a vzhled. Zráním dochází rovněž k mikrobiologickým změnám, především k rozvoji sekundární mikroflóry, zodpovědné zejména za vznik charakteristického aroma a chuti sýrů. Nastávají i významné chemické procesy, jako například změna pH nebo tvorba plynů u sýrů s propionovou kulturou. Biochemické procesy probíhající během zrání sýrů jsou rozděleny na metabolismus zbytkové laktózy a katabolizmus laktátu a citrátu, lipolýzu a katabolizmus volných mastných kyselin a proteolýzu a katabolizmus aminokyselin. Doba zrání je závislá na typu sýru. U některých sýrů, jako například mozzarella, může trvat zrání v řádu týdnů. Naopak u tvrdých sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou (parmezán) může doba zrání trvat až dva roky [4].

3 MIKROFLÓRA PŘÍRODNÍCH ZRAJÍCÍCH SÝRŮ

Mikroflóra přírodních zrajících sýrů je charakteristická přítomností velkého množství mikroorganismů, zahrnující bakterie, kvasinky a plísně. Tyto mikroorganismy je možno rozdělit do tří typů: primární starterové kultury, sekundární kultury a non-starterové mikroorganismy. Starterové kultury jsou do mléka přidávány před samotným zpracováním sýrů a podílejí se především na produkci kyseliny mléčné, zatímco sekundární kultury plní svou hlavní funkci při zrání sýrů. Výsledkem jsou pak typické organoleptické vlastnosti výrobku, v závislosti na kombinaci použitých kultur. Non-starterové mikroorganismy mohou pocházet z mléka nebo z prostředí při zpracovávání. Může se jednat o jiné druhy bakterií, kvasinky nebo vláknité houby. Stejně jako starterové kultury mohou hrát roli při dozrávání sýru [2, 8].

3.1 Primární starterové kultury

Hlavní funkcí primárních starterových kultur je produkce kyseliny mléčné z laktózy. Následně dochází k biochemickým změnám během zrání sýru a utváření specifických organoleptických vlastností. Starterové kultury bývají vybírány velmi pečlivě a přidávají se do mléka ještě před samotnou výrobou sýru. Mezi hlavní druhy starterových kultur u sýrů holandského typu se řadí *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc* sp., *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* nebo *Lactobacillus helveticus*. U většiny sýrů jsou využívány bakterie rodu *Lactococcus* a *Leuconostoc*. Uvedené rody *Lactobacillus* jsou využívány především při výrobě sýrů ementálského typu. Existují i sýry, u kterých se starterové kultury před výrobou nepřidávají a využívá se zde spíše náhodně přítomné mikroflóry v mléce, jako například *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* nebo *Staphylococcus* sp.. Jedná se především o sýry vyráběné v Itálii nebo ve Španělsku [2].

3.2 Sekundární kultury

Bakterie, které jsou řazeny k tzv. sekundárním kulturám, neplní funkci tvorby kyseliny mléčné. Při výrobě sýrů jsou přidávány za účelem biochemických změn a utváření specifických organoleptických vlastností. Jedná se například o mikroorganismy produkující oxid uhličitý a kyselinu propionovou, jako *Propionibacterium freudenreichii* u sýrů ementálského typu, popřípadě o plísňové kultury, jako *Penicillium roqueforti* pro sýry s plísní v těstě nebo *Penicillium camemberti* pro sýry s plísní na povrchu [2].

3.3 Non-starterové mikroorganismy

Mezi non-starterové mikroorganismy nacházející se v sýrech můžeme zařadit bakterie mléčného kvašení. Neřadí se však mezi zákysové kultury. Jejich zdrojem je syrové mléko, které díky své vysoké nutriční hodnotě, vysokému obsahu vody a příznivému pH umožňuje růst velkému množství mikroorganismů. Ty se ojediněle mohou nacházet i v pasterovaném mléce a často jsou řazeny mezi kontaminanty. Může se jednat o *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* nebo non-starterové laktobacily jako *Lactobacillus plantarum* nebo *Lactobacillus fermentum*, případně i *Staphylococcus* sp. [2, 9, 10]. I přesto jsou využívány při výrobě u některých odrůd italských nebo španělských sýrů, jelikož mají vysokou biosyntetickou kapacitu a mohou se podílet na utváření sensorických vlastností sýrů během zrání. Tyto kmeny mohou hrát důležitou roli při inovaci produktů, tudíž stále pokračuje výzkum ohledně jejich využití v potravinářském průmyslu. Bylo například zjištěno, že přídavek NSLAB (Non starter lactic acid bacteria) jako doplňkových kultur pro výrobu sýrů zvyšuje hladinu volných aminokyselin, peptidů a volných kyselin, což vede k zrychlené tvorbě sensorických vlastností a zrání [10, 11].

Je důležité sledovat mikrobiální zastoupení jak v mléce, tak i ve výsledném produktu. Konečná kvalita sýru je závislá na přídavku primárních starterových a sekundárních kultur i na možném výskytu non-starterových mikroorganismů. Ke sledování diverzity mikroflóry je možno využít molekulárně-biologických metod jako polymerázové řetězové reakce (PCR) a degradační gradientové gelové elektroforézy (DGGE). Tyto metody umožňují analyzovat rozmanitost mikroorganismů, identifikovat jednotlivé druhy a porovnat možné změny mikroflóry během zrání a skladování [8].

4 METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE VYUŽÍVANÉ PŘI SLEDOVÁNÍ BIODIVERZITY

Ke sledování biodiverzity v potravinách lze využít buď kultivační, nebo non-kultivační metody. Kultivační metody jsou využívány spíše jako metody referenční, umožňují však kvalitativní i kvantitativní stanovení. Non-kultivační metody mohou být imunologické (ELISA - enzyme-linked immuno sorbent assay), sérologické nebo molekulárně-biologické (PCR-DGGE metoda). Rovněž se mezi non-kultivační molekulárně-biologické metody řadí i sekvenace mikrobiální DNA. V posledních letech jsou stále více využívány non-kultivační metody, jelikož poskytují citlivější a rychlejší výsledky. Navíc umožňují detekovat i mikroorganismy, které jsou náročné na kultivaci. Molekulárně-biologické metody jsou založeny na analýze nukleových kyselin izolovaných z celé mikro biální populace. Pomocí molekulárně-biologických metod je možno dosáhnout i diferenciaci mezi mrtvými a živými buňkami za využití ethidium- monoazidu (EMA) v kombinaci s real-time PCR [9, 12, 13, 14, 15].

4.1 Příprava vzorků před PCR

Cílem přípravy vzorků před PCR je vyrobit homogenní vzorek pro amplifikaci, který umožní opakovat zkoušku i vícekrát, a vyloučit látky, které by mohly snížit schopnost amplifikace DNA a tím ovlivnit výslednou koncentraci nukleových kyselin ve vzorku. Nejčastěji využívané metody jsou biochemické a fyzikální [16].

Nejvíce používaná biochemická metoda je extrakce DNA. K tomu je možno využít velké nabídky komerčních kitů, které jsou určeny pro různé aplikace. Může se jednat o izolaci DNA z rostlinných buněk nebo hub, popřípadě virové DNA a jiné. Rovněž existují speciální komerční kity na izolaci DNA z potravin. Jedná se o soupravy obsahující lyzační činidla, promývací, vazebné a eluční pufrů. Tato metoda se využívá v kombinaci s fyzikálními metodami, které jsou založeny na fyzikálních vlastnostech buňky, jako je například velikost nebo hmotnost. Tyto metody zahrnují především centrifugaci a filtraci. Výhodou použití extrakce DNA v kombinaci s fyzikálními metodami je odstranění většiny PCR inhibitorů a dosažení požadované čistoty a koncentrace DNA, jelikož vzorky jsou několikrát purifikovány a uchovávány ve vhodném pufru (např. TAE pufr). Nevýhodou zůstávají poměrně vysoké náklady [16].

4.2 Inhibitory PCR

Inhibitory PCR pocházejí buď z původního vzorku, nebo z vnějšího prostředí při přípravě vzorku. Jedná se o různorodou skupinu látek s rozmanitými vlastnostmi a mechanismy účinku. Přírodně přítomné inhibitory se nacházejí i v potravinách. V mase jsou to třeba kolagen, myoglobin nebo hemoglobin. V mléce a mléčných výrobcích to mohou být např. proteinázy, vápenaté ionty, tuk nebo přítomnost nukleáz [16, 17, 18, 19].

Mechanismy účinku jsou různorodé. Přítomnost tuku může ovlivnit resuspendování buněk lyzačními činidly, popřípadě v kombinaci s vápenatými ionty amplifikaci DNA. Vysoká koncentrace vápenatých iontů může způsobit kompetitivní inhibici, kdy se na DNA polymerázu místo hořčíku a komplexotvorných činidel naváže vápník. Tím dojde ke snížení aktivity DNA polymerázy, jelikož hořčík zde nebude přítomen jako kofaktor. Tyto inhibiční účinky vápenatých iontů lze ovlivnit zvýšením koncentrace hořčíku v reakci nad úroveň standardně požadované pro PCR [20, 21].

4.3 Metoda PCR-DGGE

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je založena na opakované replikaci vybraného úseku DNA. Tento úsek je na každém konci ohraničen primery, což jsou krátké řetězce DNA nebo RNA. K syntéze DNA se využívá termostabilní DNA polymeráza a celý proces probíhá v termocykleru. Níže popsané fáze se během procesu cyklicky opakují.

Reakce má několik fází:

1. Denaturace – dochází k rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA a rozvolnění dvoušroubovice. Vznik jednovláknové DNA je důležitý k nasednutí primerů. Tento proces probíhá za vysokých teplot (nad 90 °C)
2. Nasednutí primerů (annealing) – dochází k nasednutí primerů na specifická místa vlákna DNA. Teplota se při tomto kroku sníží na 40-60 °C. Na místo nasednutí primeru se zároveň váže DNA polymeráza.
3. Elongace – tento krok zahrnuje syntézu DNA a ve směru od 5' konce ke 3' konci se připojuje komplementární vlákno k původní molekule DNA [21, 22, 23].

Degradační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) je metoda založená na separaci DNA fragmentů o různé sekvenci nukleotidů v polyakrylamidovém gelu. Gel obsahuje lineární

gradient formamidu a močoviny. Mobilita dvouvláknové DNA je ovlivněna její molekulovou hmotností až do doby, než vstoupí do části gelu, kde je taková koncentrace denaturačních látek, že způsobí denaturaci DNA na jednovláknovou molekulu. Koncentrace denaturačních látek se zvyšuje lineárně ve směru od shora dolů. Konečná pozice fragmentu DNA v gelu závisí tedy na denaturačním bodu. K vizualizaci jednotlivých úseků DNA v gelu je možno použít ethidium-bromid nebo jiná fluorescenční barviva v kombinaci s UV-transiluminátorem [24, 25, 26].

Metoda PCR-DGGE doplňuje i preventivní přístup k bezpečnosti potravin, který sleduje především výskyt patogenních mikroorganismů v potravinách. U mléka a mléčných výrobků se jedná především o výskyt bakterií jako *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter* spp. nebo patogenních kmenů *Escherichia coli* [27, 28, 29, 30, 31].

4.4 Sekvence DNA

Sekvenací DNA se rozumí biochemická metoda, která je schopna určit pořadí jednotlivých nukleotidů v analyzovaném vzorku DNA. Existují různé metody sekvenování DNA. V této bakalářské práci byla pro identifikaci mikroorganismů využita Sangerova metoda sekvence DNA. Tato metoda se využívá spíše k sekvenování krátkých úseků jednovláknové DNA a využívá biologického procesu replikace DNA. Vybraná sekvence DNA se vloží do radioaktivní reakční směsi s vhodným primerem, DNA polymerázou, esenciálními deoxyribonukleotidy a dideoxynukleotidy. Dideoxynukleotid je uměle připravený derivát nukleotidů, který neobsahuje hydroxylovou skupinu a je chopen se začlenit do replikující se DNA. Po začlenění zároveň způsobí zastavení elongace řetězce. Vzniká směs různě dlouhých sekvencí DNA, které na začátku obsahují radioaktivní primer a na konci jeden ze čtyř přidaných dideoxynukleotidů. Pomocí elektroforézy lze poté porovnat čtyři různé gely, obsahující různé délky sekvencí a zjistit, jak za sebou následovaly jednotlivé nukleotidy zkoumané sekvence DNA [23, 24, 32, 33].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo pomocí molekulárně-biologických metod v průběhu výroby a zrání sledovat mikrobiální diverzitu přírodních zrajících sýrů, které se lišily obsahem tuku v sušině. Dílčí cíle práce lze charakterizovat následovně:

- optimalizovat metodu, pomocí které bude možno získat co možná nejvyšší koncentraci a čistotu DNA pro následnou analýzu vzorků metodou PCR-DGGE a sekvenací DNA,
- sledovat mikrobiální diverzitu modelových vzorků sýrů metodou PCR-DGGE s následnou sekvenací vybraných fragmentů DNA,
- zhodnotit druhové zastoupení technologicky významných, popřípadě i kontaminujících, mikroorganismů detekovaných v sýrech ve srovnání s mikroflórou mléka, které bylo použito při výrobě.

6 IZOLACE DNA Z PŘÍRODNÍCH SÝRŮ

Metodika práce byla částečně převzata z diplomové práce Ivety Kalousové, kde byly pomocí molekulárně-biologických metod diskutovány změny mikroflóry u fermentovaného masného výrobku [34].

6.1 Příprava vzorků pro izolaci DNA

Zařízení a pomůcky:

- Stomacher Lab Blender 400 (Seward)
- Váhy (KERN)
- Mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO)
- Centrifuga Hermle Z 300 K (Biotech)
- Centrifuga minispin plus (Eppendorf)
- Laboratorní sklo
- Chemikálie: 70% ethanol, sterilní destilovaná voda
- Ostatní plastové a ochranné pomůcky

Byly testovány dvě metody přípravy vzorků sýrů pro izolaci DNA.

1. metoda: Vzorek sýru byl přenesen do sterilního plastového sáčku a smíchán s destilovanou vodou v poměru 3:1 (15 ml sterilní destilované vody a 5 g sýru). Obsah sáčku byl homogenizován za použití Stomacheru po dobu 10 minut. Homogenizovaná směs byla přefiltrována přes sterilní gázu do 15 ml plastových zkumavek určených pro centrifugaci. Obsah zkumavek byl centrifugován při pokojové teplotě po dobu 20 minut. Supernatant byl postupně odpipetován a takto připravený sediment byl použit pro izolaci DNA.

2. metoda: Vzorek sýru byl přenesen do sterilního plastového sáčku a smíchán s destilovanou vodou v poměru 3:1 (15 ml sterilní destilované vody a 5 g sýra). Obsah sáčku byl homogenizován za použití Stomacheru po dobu 10 minut. Homogenizovaná směs byla přefiltrována přes sterilní gázu do 15 ml plastových zkumavek určených pro centrifugaci. Obsah zkumavek byl centrifugován při teplotě 4 °C po dobu 20 minut. Supernatant byl postupně odpipeťován a vytvořená vrstva tuku na povrchu filtrátu byla opatrně vytřena za pomoci sterilního vatového tamponu. Takto upravený filtrát byl použit pro izolaci DNA.

U vzorků mléka nebylo potřeba provádět homogenizační úpravy. Byl však testován různý objem mléka pro centrifugaci, a to 1,8 ml a 15 ml vzorku.

6.2 Izolace DNA z bakteriálních buněk za využití komerčního kitu

Zařízení a pomůcky:

- Centrifuga minispin plus (Eppendorf)
- Vortex V-1 plus (Biosan)
- Vortex-Genie 2(QUIAGEN)
- Termostat blokový Bio TDB-100 (Biosan)
- Mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO)
- PowerFood Microbial DNA Isolation Kit (QUIAGEN)
- Ostatní jednorázové plastové a ochranné pomůcky

K izolaci DNA ze vzorků mléka a sýrů byla použita komerční souprava určená pro aplikaci v potravinářství (Power Food Microbial DNA Isolation Kit, QUIAGEN).

Izolace DNA probíhala ve dvou fázích. První fází byla izolace DNA v rámci optimalizace metody přípravy vzorků a druhou fází byla izolace DNA ze vzorků připravených metodou, která poskytovala nejvyšší koncentraci a nejčistší DNA, což byla metoda 2, uvedená v kapitole 6.1. Tyto vzorky byly rovněž dále využity k optimalizaci dalších kroků PCR-DGGE analýzy a k vlastnímu stanovení mikroflóry přírodních zrajících sýrů.

Postup při izolaci DNA z připraveného a centrifugovaného vzorku byl následující:

1. Buněčná peleta filtrátu připraveného v kapitole 5.1 byla rozpuštěna ve 450 μ l roztoku PF1 (lyzační roztok). Před samotným použitím bylo nutno roztok zahřát na teplotu 55 $^{\circ}$ C, aby nedošlo k jeho vysrážení. Kvůli lepšímu rozpouštění byly zkumavky s lyzačním činidlem promíchány pomocí vortexu.
2. Resuspendované buňky byly poté přemístěny do rozbíjecích zkumavek a nejdříve zahřáty na 70 $^{\circ}$ C. Následně byly umístěny do vortexového adaptéru do horizontální polohy a promíchány na vortexu při nejvyšší rychlosti po dobu 10 minut.

3. Obsah rozbíjecích zkumavek byl centrifugován 1 minutu při 14 500 RPM (revolutions per minute; počet otáček za minutu). Při tomto kroku se rozbité buňky shromáždí po stranách zkumavky, zatímco DNA zůstává v supernatantu. Supernatant byl přenesen do čisté 2ml zkumavky.
4. K supernatantu bylo přidáno 100 μ l roztoku PF2, který odstraňuje organické a anorganické sloučeniny a zbytky buněk. Směs byla krátce promíchána na vortexu a následně inkubována asi 5 minut při teplotě 4 °C.
5. Směs byla centrifugována 1 minutu při 14 500 RPM g a pokojové teplotě.
6. Veškerý supernatant obsahující DNA byl přenesen do čisté 2ml zkumavky. Do zkumavky bylo přidáno 900 μ l roztoku PF3 (vazebný pufr). Směs byla krátce promíchána na vortexu. Roztok PF3 je vysoce koncentrovaný solný roztok, proto je nutno jej před použitím zkontrolovat a případně, že jsou patrné sraženiny, zahřát na teplotu 55 °C.
7. Přibližně 650 μ l směsi ve zkumavce bylo přeneseno do kolonky a centrifugováno 1 minutu při 14 500 RPM. Přefiltrovaná tekutina byla vylita. Tento krok bylo podle návodu přiloženého výrobcem nutno rozdělit na 3 fáze.
8. Kolonka se zachycenou DNA byla přemístěna do čisté 2ml zkumavky a naplněna 650 μ l promývacího roztoku PF4, který je nutno před použitím protřepat. Takto byly vzorky centrifugovány po dobu 1 minuty.
9. Do kolonky bylo přidáno 650 μ l promývacího roztoku PF5. Obsah byl opět centrifugován (1 minuta, 14 500 RPM). Tímto způsobem byly z membrány odstraněny zbytky roztoku PF4.
10. Přefiltrovaná tekutina byla ze zkumavky vylita. Kolonka byla podrobena další centrifugaci, tentokrát však po dobu 2 minut při 14 500 RPM.
11. Kolonka byla opatrně přenesena do čisté 2ml zkumavky. Do kolonky bylo přidáno 30 μ l roztoku PF6. Jedná se o sterilní eluční pufr, který je nutno nanášet doprostřed membrány tak, aby byla pokryta celá membrána. Tento pufr zajistí uvolnění DNA z membrány, protože neobsahuje žádné soli, které by podporovaly vazbu DNA na membránu. Před samotnou centrifugací byla kolonka ponechána 10 minut při pokojové teplotě, z důvodu lepšího uvolnění DNA z membrány do pufru.
12. Kolonka byla centrifugována po dobu 1 minuty při 14 500 RPM. Kolonka byla poté ze zkumavky vyjmuta.

U takto připravené DNA byla poté provedena kontrola čistoty a koncentrace pro další využití v technice PCR-DGGE.

6.3 Kontrola čistoty a koncentrace DNA

Zařízení a pomůcky:

- Spektrofotometr Infinite 200 PRO (Tecan)
- Mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO)
- Chemikálie: roztok PF6
- Ostatní pomůcky

Čistota a koncentrace vyizolované DNA byla ověřena pomocí spektrofotometru při vlnových délkách 260 a 280 nm. Vlastní měření probíhá tak, že se nanese 2 μ l elučního pufru (roztok PF6) do jamek patentované NanoQuant desky, která je součástí spektrofotometru. V přístroji je poté změřena absorbance pro dané rozpouštědlo, které slouží jako kalibrační pozadí. V druhém kroku se provádí měření již se samotnou DNA. Před každým měřením i po něm bylo provedeno důkladné očištění destičky 70% etanolem. Nukleové kyseliny absorbují nejvíce záření při vlnové délce 260 nm. Čistota DNA je pak dána poměrem absorbancí při obou vlnových délkách 260 a 280 nm. Ideální poměr se pohybuje mezi hodnotami 1,8 – 2,0. Výsledky jednotlivých kontrol byly uloženy v programu Microsoft Office Excel.

7 METODA PCR-DGGE VYUŽÍVANÁ PŘI STUDIU MIKROFLÓRY

Principy polymerázové řetězové reakce (PCR) a degradační gradientové gelové elektroforézy (DGGE) jsou popsány v teoretické části v kapitole 4.3. Byly provedeny celkem dva amplifikační kroky, přičemž u každého kroku byly využity jiné primery a k nim odpovídající programy pro PCR.

7.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Zařízení a pomůcky:

- PCR box AURA PCR™ (BIOAIR)
- Vortex V-1 plus (Biosan)
- Termocykler Aeris™ (ESCO)
- Váhy (KERN)
- Elektroforetická vana vč. příslušenství MultiSUB Mini (Consort)
- Elektrický zdroj pro elektroforézu EV243 (Consort)
- Mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO)
- UV-Transiluminátor InGeniusLHR (SYNGENE)
- Software GeneSnap
- Laboratorní sklo
- Chemikálie: sterilní destilovaná voda pro PCR, 1% TAE pufr, agaróza, ethidiumbromid, 100 bp DNA Ladder (Biolabs. Inc.), GoTaq Hot Start Green MasterMix (Promega), primery (FD1, RD1, 341F-GC, 907R), Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific)
- Ostatní jednorázové plastové a ochranné pomůcky

7.1.1 1. krok amplifikace

Celkový objem reakční směsi pro PCR byl 20 μ l. Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 1. Příprava reakční směsi byla provedena v PCR boxu, který bylo nutno sterilizovat ultrafialovým zářením po dobu minimálně 20 minut. Pro první amplifikaci byly použity primery FD1 a RD1 (tab. 5). Rovněž byla namíchána také negativní kontrola. Negativní kontrola

znamená, že místo vzorku DNA byl do směsi přidán 1 µl sterilní destilované vody. Tím bylo možno zjistit, zda některá ze směsí pro PCR nebyla kontaminována cizorodou DNA v důsledku nesprávné a neseptické manipulace. Připravená směs byla poté vložena do termocyklu. Teplotní a časový profil prvního amplifikačního kroku je uveden v tabulce 2.

Tab.1: Složení reakční směsi – 1. amplifikační krok

Složky	Množství pro 1 reakci [µl]
Sterilní destilovaná voda pro PCR	7
Master mix	10
FD1 primer	1
RD1 primer	1
DNA	1

Tab. 2: Teplotní a časový profil – 1. amplifikační krok

Krok PCR	Teplota [° C]	Čas [s]	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	120	1
Denaturace	95	30	9
Nasedání primeru (annealing)	61	30	
Elongace	72	90	
Denaturace	95	30	24
Nasedání primeru (annealing)	56	30	
Elongace	72	90	
Závěrečná extenze	72	600	1

7.1.2 2. krok amplifikace

Celkový objem reakční směsi byl 30 µl. Příprava reakční směsi byla provedena za aseptických podmínek opět v PCR boxu. Pro druhý krok amplifikace byly použity primery 341F-GC a 907R (tab. 5). Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 3. Teplotní a časový profil druhého amplifikačního kroku je uveden v tabulce 4.

Tab. 3: Složení reakční směsi – 2. amplifikační krok

Složky	Množství pro 1 reakci [μ l]
Sterilní destilovaná voda pro PCR	10,5
Master mix	15,0
341F-GC primer	1,5
907R primer	1,5
DNA	1,5

Tab. 4: Teplotní a časový profil – 2. amplifikační krok

Krok PCR	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas [s]	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	120	1
Denaturace	95	30	35
Nasedání primeru (annealing)	61	30	
Elongace	72	60	
Závěrečná extenze	72	600	1

Tab. 5: Sekvence vybraných primerů

Primer	Pořadí bází
FD1	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' [35]
RD1	5' AAGGAGGTGATCCAGCC 3' [35]
341F-GC	5' (GC-svorka)CCTACGGGAGGCAGCAG 3' [36]
907R	5' CCGTCAATTCMTTTRAGTTT 3' [37]

GC-svorka: CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG [36]

7.1.3 Příprava gelu pro elektroforézu

Pro elektroforetickou detekci DNA fragmentů byl připraven 1% agarózový gel.

1. Do Erlenmayerovy baňky byl navážen 1 g agarózy.
2. K agaróze bylo přidáno 100 ml 1% TAE pufru
3. Připravená směs byla v mikrovlnné troubě přivedena k varu, aby došlo k rozpuštění agarózy. Směs byla opatrně promíchána, aby nedošlo ke vzniku bublin.
4. K rozpuštěné a mírně ochlazené směsi byly přidány 2 kapky ethidiumbromidu.
5. Roztok byl nalit do formy na gel s připraveným hřebínkem. Gel se poté nechal ztuhnout.

Ze ztuhlého gelu byl vyjmut hřebínek a gel s formou bez bočního těsnění byl vložen do elektroforetické vany naplněné 1% TAE pufrům tak, aby gel byl zcela ponořen v pufru.

1. Do první jamky gelu byly nanесeny 3 μ l markeru (Gene Ruler 100bp DNA Ladder, Thermo Scientific).
2. Další jamky byly naplněny 5 μ l vzorku včetně negativní kontroly.
3. Elektrody elektroforetické vany byly napojeny na zdroj elektrického napětí. Vlastní elektroforéza probíhala přibližně 20 minut při napětí 90 V. Po ukončení elektroforézy byl gel přesunut do UV-transiluminátoru a pozorován pod UV světlem prostřednictvím kamery. Pomocí programu GeneSnap byla pořízena fotografie osvětleného gelu.

7.2 Degradční gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

7.2.1 Sestavení aparatury pro výrobu gelu

Zařízení a pomůcky:

- DGGE set skleněných desek (C.B.S. Scientific Company)
- Těsnění pro DGGE 1,0 mm (C.B.S. Scientific Company)
- Svorky, spacers, vertikální hřebínky pro DGGE (C.B.S. Scientific Company)
- Jednoduchá kazeta pro DGGE z plexiskla (C.B.S. Scientific Company)

Pro sestavení jedné aparatury se využívá úzké sklo se zaoblenými spodními rohy a silné sklo s výřezem.

1. Obě skla byla před použitím omyta etanolem a důkladně vyleštěna.
2. Po obvodu skla se zaoblenými rohy bylo nataženo těsnění do tvaru písmene U. Sklo bylo poté položeno na laboratorní stůl trubkovitou částí těsnění nahoru.
3. Vedle vnitřních okrajů těsnění byly umístěny tzv. spacers (oddělovače), které zajišťovaly vytvoření prostoru mezi skleněnými deskami.
4. Na sklo s těsněním bylo položeno silnější sklo výřezem nahoru. Po obvodu byla skla zajištěna klipsy a celá aparatura byla postavena do vertikální polohy.

7.2.2 Příprava gelu

Zařízení a pomůcky:

- Analytické váhy ADVENTURER Pro d=0,0001 g (OHAUS)
- Plastové 50ml zkumavky
- Mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO)
- Míchadlo s ohřevem MR Hei-Tec (Heidolph)
- Gradient maker, 2x 20 ml (C.B.S. Scientific Company)
- Magnetické míchadlo včetně magnetů Hei-Mix S (Heidolph)
- Mini-peristaltická pumpa MPP-100-220 (C.B.S. Scientific Company)
- Ostatní: kanyla, sterilní špičky, sterilní 1,5ml zkumavky, stojan na zkumavky, rukavice
- Chemikálie: sterilní destilovaná voda, 70% ethanol, 40% bis-akrylamid, amonium persulfát, močovina, formamid, tetramethylethylendiamin

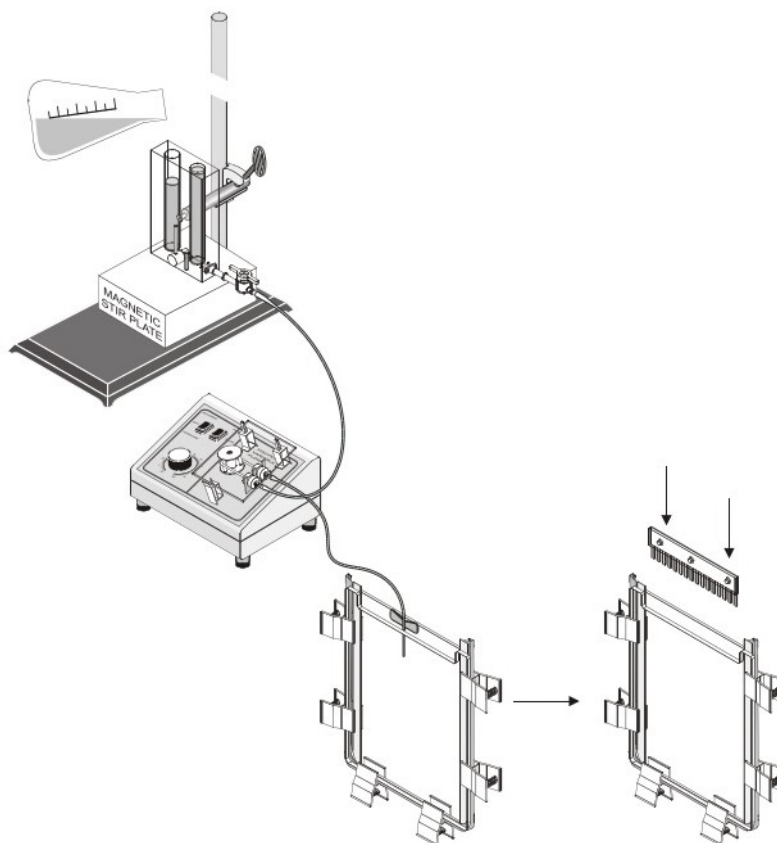
Pro přípravu 7,5% gelu byl namíchán 30% a 70% zásobní roztok akrylamidu (tab. 6) a 10% roztok APS (amonium persulfát). Při přípravě denaturačních roztoků se vždy začínalo navazováním močoviny, teprve až poté byly přidávány kapalné složky. Směs byla míchána pomocí magnetického míchadla při teplotě 55 °C, dokud se močovina zcela nerozpustila. Nakonec byly oba roztoky doplněny destilovanou vodou na objem 100 ml. Roztoky byly skladovány při teplotě 4 °C. Pro přípravu 10% APS bylo naváženo 0,025 g APS do 1,5ml sterilních mikrozkuvek a následně rozpuštěno ve 250 µl sterilní destilované vody

Tab. 6: Složení denaturačních a zásobních roztoků

Složka	20%	30%	70%	80%
40% bis-akrylamid [ml]	18,8	18,8	18,8	18,8
Formamid [ml]	8,0	12,0	28,0	32,0
50% TAE pufr [ml]	2,0	2,0	2,0	2,0
Močovina [g]	8,4	12,6	29,4	33,6

Postup přípravy gelu byl následující (obr. 1):

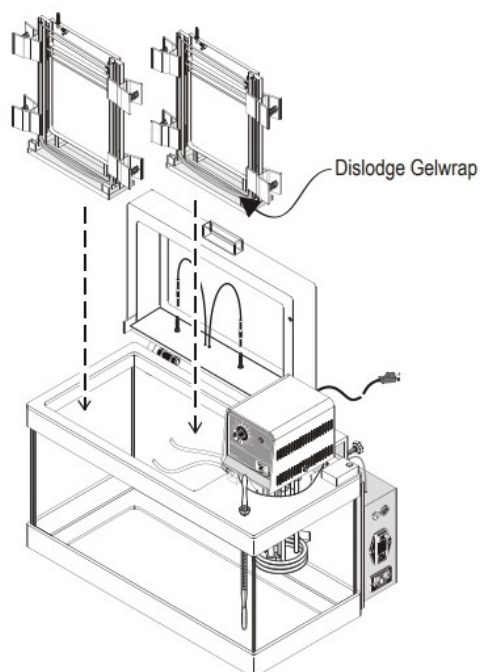
1. Marker gradientu, spojovací hadička a jehla byly důkladně promyty destilovanou vodou.
2. Po promytí byly uzavřeny oba ventily markeru gradientu a jehla byla umístěna mezi skla aparatury pro přípravu gelu.
3. Dvě plastové 50ml zkumavky byly označeny jako 30% a 70%.
4. Do zkumavky 30% bylo odměřeno 15 ml 30% zásobního roztoku a do zkumavky 70% bylo odměřeno 15 ml 70% zásobního roztoku.
5. Do obou zkumavek bylo následně přidáno 104,4 μ l 10% roztoku APS a 6,5 μ l TEMED (tetramethylethyldiamin).
6. Obsah obou zkumavek byl ihned důkladně promíchán.
7. Do levé části markeru gradientu byl nalit roztok ze zkumavky 30% a do pravé části byl nalit roztok ze zkumavky 70%. Bylo zapnuto magnetické míchání a rovněž mini-peristaltická pumpa. Následně byly zároveň otevřeny oba ventily.
8. Jakmile byl celý prostor mezi skly zaplněn roztokem, byl do aparatury zasazen hřebínek s 16 nebo 22 zuby, podle množství vzorků.
9. Marker gradientu, spojovací hadička a jehla byly znovu důkladně promyty destilovanou vodou.
10. Polymerace gelu trvala přibližně 1 hodinu při pokojové teplotě.



Obr. 1: Schéma aparatury pro přípravu gelu [38]

Příprava a průběh elektroforézy

1. Elektroforetický tank (obr. 3) byl naplněn 1% TAE (Tris-acetát-EDTA) pufrem a vytemperován na teplotu 60 °C.
2. Po proběhnutí polymerace byl z gelu opatrně vyjmut hřebínek a odstraněny svorky. Těsnění na spodní hraně desek bylo uvolněno.
3. Skleněné desky s gelem byly přiloženy k jednoduché kazetě z plexiskla výřezem dovnitř a zajištěny svorkami (obr. 1).
4. Kazeta byla vložena do tanku s pufrem a byla k ní připojena hadička, kterou protéká pufr, čímž byl prostor jamek naplněn pufrem (obr. 2).
5. Jamky byly důkladně vymyty pufrem za pomoci speciální pipety. Tímto krokem byly z jamek odstraněny zbytky nezpolymerovaného roztoku.
6. Do jamek bylo nanášeno 8 μ l vzorku. Do první a poslední jamky byl nanesen marker Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) v množství 6 μ l.
7. Ke kazetě byla připojena katoda. Elektroforéza probíhala při napětí 150 V po dobu 420 minut. Pouze u vzorků G elektroforéza probíhala při napětí 150 V po dobu 360 minut.



Obr. 2: Schéma vkládání kazety s gelem do tanku s pufrem [38]



Obr. 3: Elektroforetický tank

7.2.3 Barvení a vizualizace

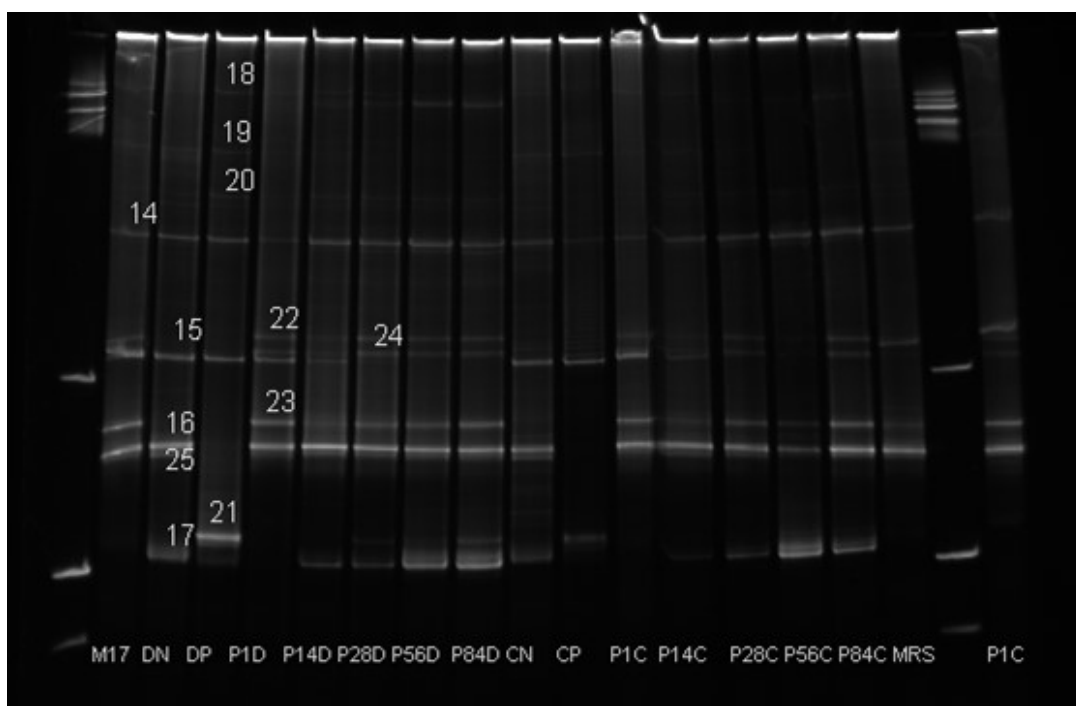
Zařízení a pomůcky:

- Třepačka Titramax 100 (Heidolph)
- 2 nádoby pro barvicí lázeň
- Mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO)
- Chemikálie: 1% TAE pufř, barvivo GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium)
- Ostatní: skalpel, sterilní špičky, odměrný válec

Při barvení gelu se postupovalo následovně:

1. Byla připravena barvicí lázeň skládající se ze 400 ml 1% TAE pufru a 40 μ l fluorescenčního barviva GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium).
2. Lázeň byla zakryta alobalem z důvodu nestálosti barviva na světle.
3. Kazeta byla vyjmuta z tanku a rozebrána. Bylo odstraněno těsnění, spacery a skla byla od sebe opatrně oddělena, aby nedošlo k poškození gelu. Zároveň byl celý proces prováděn tak, aby gel zůstal na silnějším skle s výřezem.
4. Skleněná deska s gelem byla vložena do barvicí lázně.

Barvení probíhalo 20 minut při současném protřepávání lázně na třepačce, tak, aby se barvicí roztok dostal i pod gel. Obarvený gel byl přenesen ze skla na UV-transiluminátor a prosvícen UV zářením. Pomocí programu GeneSnap byla pořízena fotografie osvětleného gelu (obr. 4).



Obr. 4: Ukázka fotografie osvětleného gelu

7.3 Re-amplifikace, purifikace, sekvenace DNA a identifikace mikroorganismů

Vybrané proužky (bandy) byly z gelu vyříznuty skalpelem a přeneseny do sterilních 1,5ml mikrozkuvek s 200 μ l sterilní destilované vody určené pro PCR a sterilními skleněnými kuličkami (5–10 ks). Obsah zkuvek byl míchán na vortexu v horizontální poloze přibližně

20 minut. Poté byly vzorky umístěny do chladničky a udržovány při 4 °C do druhého dne pro umožnění důkladného rozpuštění gelu a difuze DNA z gelu do kapalné fáze.

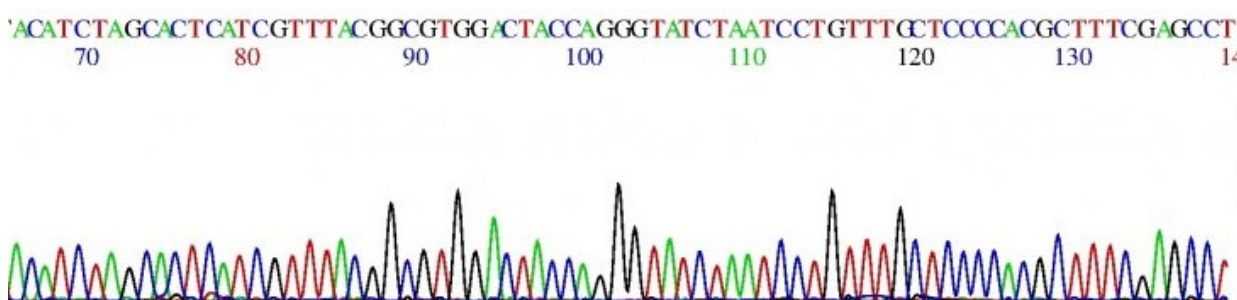
Purifikace PCR produktů byla provedena za účelem odstranění primerů, solí, volných nukleotidů a termostabilní DNA polymerázy, které by jinak mohly inhibovat nebo jinak narušovat sekvenaci. Purifikace byla prováděna s využitím speciálního kitu (High Pure PCR Product Purification Kit, QUIAGEN) podle následujícího protokolu:

1. Přidáním 200 µl absolutního etanolu k promývacímu pufru, který je součástí kitu, byl připraven pracovní roztok promývacího pufru.
2. K 15 µl PCR produktu po re-amplifikaci bylo přidáno 75 µl vazebného pufru. Obsah každé PCR zkumavky byl důkladně promíchán pomocí mikropipety.
3. Obsah každé PCR zkumavky byl přenesen do kolonky umístěné ve zkumavce. Vzorky byly centrifugovány při laboratorní teplotě po dobu 60 s při maximální rychlosti.
4. Přefiltrovaná kapalina byla vylita a do kolonky bylo přidáno 500 µl promývacího pufru připraveného podle 1. bodu. Vzorky byly centrifugovány při pokojové teplotě po dobu 60 s při maximální rychlosti (14 500 RPM).
5. Přefiltrovaná kapalina byla vylita a do kolonky bylo přidáno 200 µl promývacího pufru. Vzorky byly opět centrifugovány při pokojové teplotě po dobu 60 s při maximální rychlosti.
6. Přefiltrovaná kapalina byla vylita. Vzorky byly ještě jednou centrifugovány za stejných podmínek pro dosažení dokonalého odstranění promývacího pufru.
7. Kolonka byla přenesena do čisté 1,5ml mikrozkušavky a bylo do ní přidáno 30 µl elučního pufru. Poté byly vzorky ponechány cca 15 minut v klidu při laboratorní teplotě.
8. Vzorky byly centrifugovány při pokojové teplotě po dobu 60 s při maximální rychlosti. Eluční pufr zajistil vyplavení purifikované DNA z membrány kolonky do mikrozkušavky.

Koncentrace a čistota purifikované DNA byla ověřena spektrofotometricky při vlnových délkách 260 a 280 nm.

Přečištěná DNA byla krátkodobě skladována při teplotě +4 °C. Před odesláním na sekvenaci byla do 0,5ml sterilních mikrozkušavek pro PCR připravena směs 8,75 µl roztoku přečištěné DNA a 1,25 µl primeru 341 F bez GC-svorky. Sekvence byla provedena společností SEQme s.r.o.

Zjištěné nukleotidové sekvence (obr. 5) byly porovnávány se známými sekvencemi bakterií v databázi BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Tento program ve své databázi automaticky vyhledává nejvíce podobné sekvence konkrétních bakterií k zadané hledané sekvenci DNA a zároveň určí spolehlivost identifikace. V případě chybějících nukleotidů bylo nutno provést opravu na základě posouzení záznamu v programu GATCViewer. Oprava sekvencí spočívala v doplnění, odstranění nebo výměně konkrétního nukleotidu. Identifikace mikroorganismů byla provedena až po opravě všech jednotlivých chromatogramů. Vyhodnocení druhového zastoupení mikroorganismů probíhalo na základě procentuální spolehlivosti identifikace. Ideální spolehlivost identifikace byla 96-99 %.



Obr. 5: Část opraveného záznamu sekvence. A – adenin, G – guanin, C – cytosin,
T – tymin

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

8.1 Značení vzorků sýrů

Vzorky přírodních sýrů byly vyrobeny v laboratoři Ústavu technologie potravin v rámci diplomové práce Kristýny Rojíčkové. Jednalo se o přírodní sýry typu gouda s rozdílným obsahem tuku v sušině (1,3 – 51 % t. v s.; viz tab. 7). Značení vzorků bylo rovněž převzato z diplomové práce Kristýny Rojíčkové [39]. U jednotlivých vzorků sýrů bylo ještě doplněno číselné označení (1, 14, 28, 56, 84), které značilo den odebrání vzorku.

Tab. 7: Značení vzorků sýrů

Značení vzorku	Skutečný obsah tuku v sušině (%)
A	51
B	48
C	44
D	40
E	30
F	23
G	14
H	1,3

8.2 Optimalizace izolace DNA

Byly testovány celkem dvě různé metody přípravy vzorků sýrů. První metoda spočívala v centrifugaci homogenizovaného vzorku za pokojové teploty a postupném odpipetování supernatantu. Při kontrole čistoty a koncentrace izolované DNA bylo však zjištěno, že tato metoda neposkytuje výsledky vhodné pro použití následné metody PCR-DGGE. Koncentrace byly buď příliš nízké, nebo čistota neodpovídala stanoveným mezním hodnotám. Pravděpodobně to bylo způsobeno špatným resuspendováním buněk mikroorganismů z důvodu přítomnosti velkého množství tuku a následně horšímu rozrušení buněčných struktur a následkem toho i slabšímu uvolnění DNA z buněk. U druhé metody přípravy vzorků byla homogenizovaná směs centrifugována za teploty 4 °C. Tím došlo ke vzniku tukové vrstvy na povrchu supernatantu, která by za pokojové teploty zůstala rozptýlena v celém objemu zku-

mavky a také na dně spolu s ostatními buňkami, jako tomu bylo u první metody. Druhá metoda přípravy vzorků poskytovala výrazněji lepší výsledky než první, z důvodu částečného odstranění tuku, který pravděpodobně způsoboval nízké výtěžky při izolaci DNA z bakteriálních buněk. Srovnání koncentrace a čistoty DNA u první a druhé metody je uvedeno v tabulce 8. U vzorků mléka nebylo nutno měnit postup přípravy vzorků.

Tab. 8: Srovnání metod na základě naměřené čistoty a koncentrace DNA

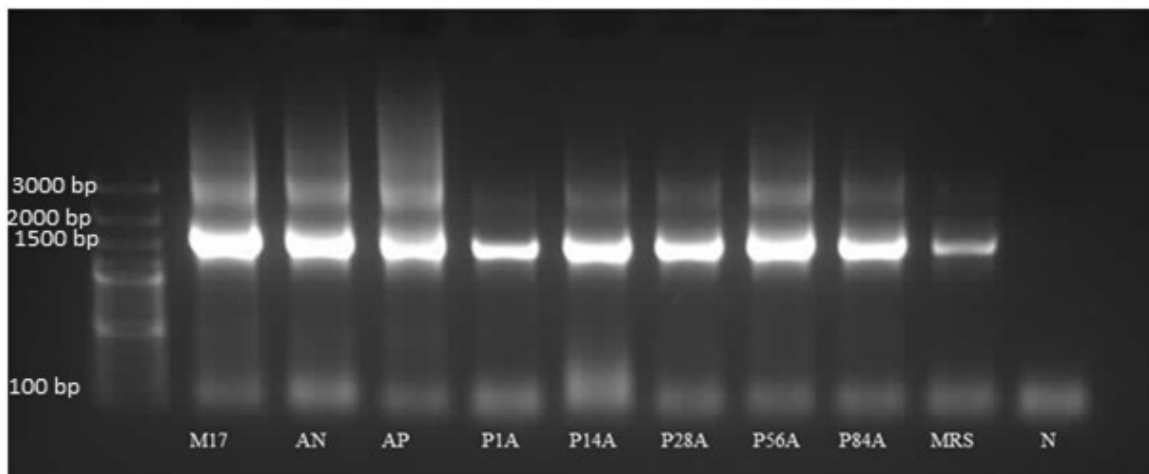
1. metoda			2. metoda		
Vzorek (označení)	Čistota DNA	Koncentrace DNA [ng/μl]	Vzorek	Čistota DNA	Koncentrace DNA [ng/μl]
AN	1,86	28,30	AN	1,80	28,30
AP	1,90	46,10	AP	1,78	17,60
P1A	2,27	13,40	P1A	1,90	46,10
P14A	0,89	3,30	P14A	2,27	13,40
P28A	2,47	4,70	P28A	1,93	5,40
P56A	1,13	4,40	P56A	1,28	8,80
P84A	3,50	3,50	P84A	1,04	7,60

AN – vzorek mléka A (nepasterované), AP – vzorek mléka A (pasterované), P1A-P84A – sýry s obsahem tuku v sušině 51 % v závislosti na době zrání

8.3 Ověření úspěšnosti amplifikace DNA pomocí elektroforézy

Byly provedeny celkem dva amplifikační kroky. Po každém z nich byly PCR produkty naneseny na agarózový gel a koncentrace a kvalita DNA byla ověřena pomocí elektroforézy. Pomocí UV-transiluminátoru a programu GeneSnap byly pořízeny fotografie jednotlivých gelů. Pokud byla nalezena kontaminace u negativní kontroly, bylo nutno provést celý krok znovu. Přítomnost cizorodé DNA u negativní kontroly by mohla být způsobena kontaminací některé ze složek reakční směsi v důsledku nesprávné a neaseptické manipulace. Na obrázku 6 v poslední jamce vpravo nelze pozorovat známku kontaminace. Bílé místo na spodní straně

gelu označuje zbytky nespoteřovaného primeru. Příprava vzorků pro PCR tedy byla provedena správně. Z obrázku 6 lze vyčíst, že použitím primerů FD1 a RD1 došlo k amplifikaci PCR produktů o celkovou délku 1500 bp.

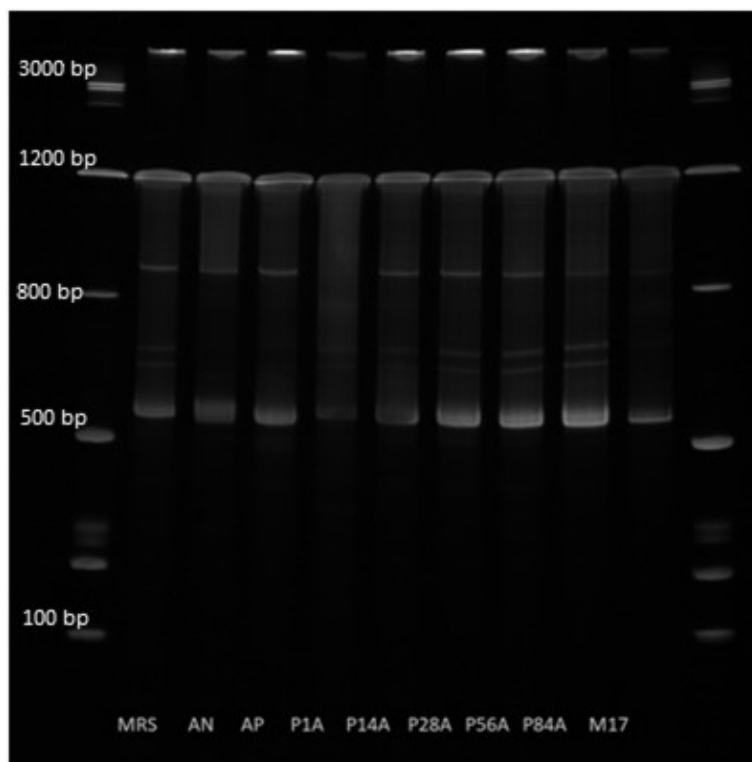


Obr. 6: PCR amplifikace DNA izolované ze sýrů a mléka

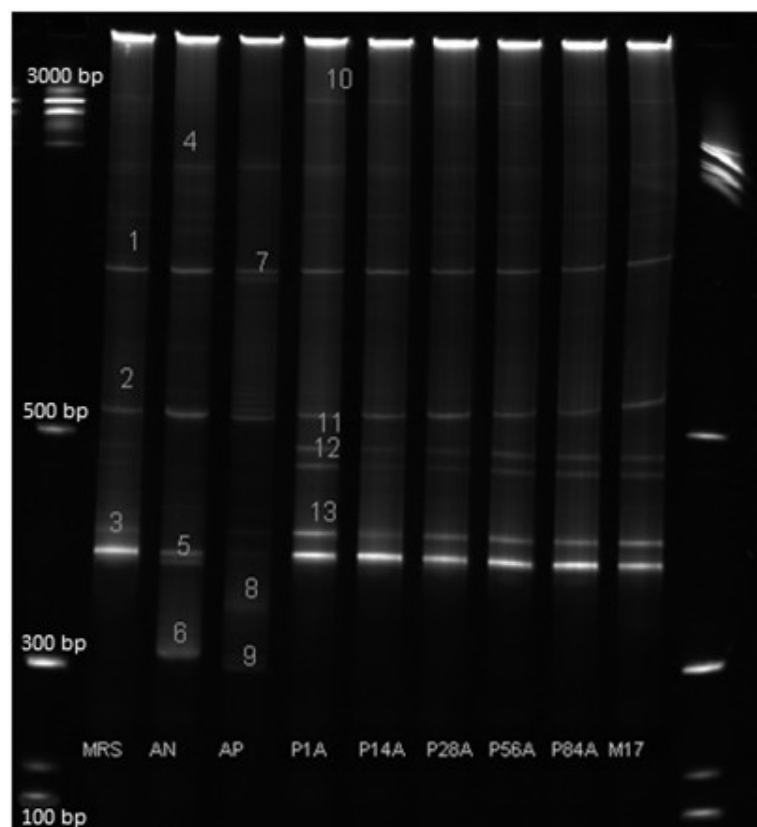
MRS, M17 – kultura získaná kultivací na agarových plotnách, AN – vzorek mléka (nepasterované), AP – vzorek mléka (pasterované), P1A-P84A – vzorky sýrů v různém stadiu zrání, N – negativní kontrola

8.4 Optimalizace metody DGGE

Optimalizace metody DGGE probíhala především na základě zkoušení různé doby, po které gradientová elektroforéza probíhala. Pokud elektroforéza probíhala po dobu 5 h při napětí 150 V, nedošlo k dostatečné separaci fragmentů a denaturaci DNA. Jednotlivé proužky na gelu byly tudíž špatně viditelné, popřípadě nebyly vůbec přítomny (obr. 7). V případě, že elektroforéza probíhala při napětí 150 V po dobu 7 h, úseky s denaturovanou DNA byly dobře viditelné a bylo možno je vyříznout skalpelem a připravit na sekvenaci (obr. 8). Rovněž byly zkoušeny různé kombinace denaturačního gradientu, a to 30/70 % a 20/80 %. V případě denaturačního gradientu 20 a 80 % byly jednotlivé proužky v gelu málo viditelné nebo neostré. Nejspíše to bylo způsobeno příliš nízkou koncentrací gradientu v horní polovině gelu, zatímco dolní polovina měla koncentraci gradientu příliš vysokou a separace fragmentů DNA byla ve výsledku nedostatečná. Nejlepší výsledky byly prokázány u kombinace 30 a 70 %. Optimalizace byla prováděna u vzorků A (51 % t. v s.) a B (48 % t. v s.). Na základě zjištěných výsledků byla gradientová elektroforéza u všech vzorků prováděna při napětí 150 V po dobu 7 h a koncentraci denaturačního gradientu 30/70 %. Vybrané úseky DNA byly z gelu vyříznuty skalpelem, očíslovány a odeslány na sekvenaci (obr. 9).

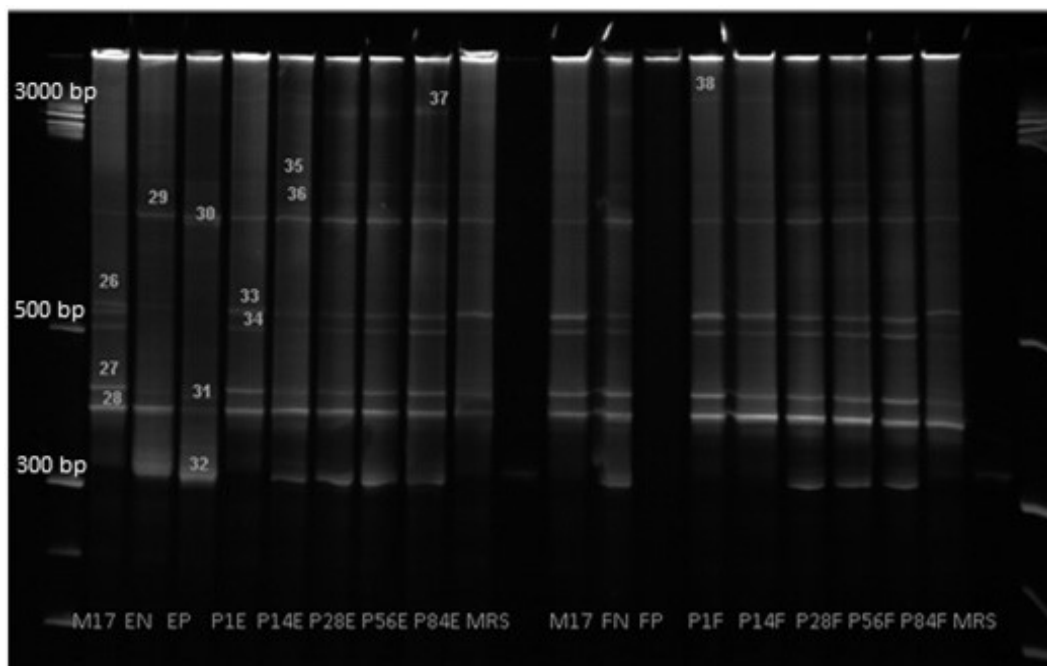


Obr. 7: Gel po DGGE elektroforéze, vzorky s obsahem tuku v sušině 51 %
(150v, 5h, gradient 30/70 %)



Obr. 8: Gel po DGGE elektroforéze, vzorky s obsahem tuku v sušině 51 %

(150v, 7h, gradient 30/70 %)



Obr. 9: Gel po DGGE elektroforéze, vzorky s obsahem tuku v sušině 30 % a 23 % (150v, 7h, gradient 30/70 %), čísla označují úseky DNA, které byly sekvenovány

8.5 Výsledky sekvenace DNA a identifikace mikroorganismů

Ve všech testovaných a vyrobených šaržích sýrů byla prokázána vysoká dominance bakterií mléčného kvašení. Jednalo se především o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, který byl součástí startovací sýrařské kultury. Různorodé zastoupení mikroorganismů bylo pozorováno především u vzorků A, kde byl navíc identifikován *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, který byl rovněž součástí startovacích kultur. Především u nepasterovaných mlék bylo možno pozorovat výskyt kontaminujících bakterií. U vzorku nepasterovaného mléka A byl identifikován *Enterococcus faecalis* a u vzorku nepasterovaného mléka E byl nalezen *Enterococcus faecium*. Enterokoky obecně nejsou schopny tvořit bakteriální spory, tudíž v pasterovaném mléce ani v sýrech tento mikroorganismus již nebyl pozorován. Naopak u mléka D byl v pasterovaném i nepasterovaném mléce identifikován *Bacillus cereus*. Jelikož se jedná o sporo-
 rotvornou grampozitivní tyčinku, běžný pasterační záhřev není schopen spory inhibovat. Součástí startovacích kultur měl být navíc *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* a *Leuconostoc* sp.. Tyto mikroorganismy se však nepodařilo identifikovat. Důvodem mohla být přítomnost PCR inhibitorů, jako například nedostatečné odstranění tuku nebo přítomnost vysoké koncentrace vápenatých iontů, které následně způsobily špatnou purifikaci a nízkou koncentraci izolované DNA [16, 17, 18, 19]. Dalším důvodem mohla být příliš

nízká koncentrace DNA těchto mikroorganismů ve vzorcích, kdy pipetovaný objem byl příliš nízký na to, aby jednotlivé proužky byly viditelné pod UV světlem.

Tab. 9: Identifikované mikroorganismy

Identifikovaný mikroorganismus	Vzorek
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Startovací kultura po kultivaci v MRS bujonu
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Šarže A (51 % t. v s.) – mléko nepasterované
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Sýry A-H (51 – 1,3 % t. v s.)
<i>Bacillus cereus</i>	Šarže D (40 % t. v s.) - mléko pasterované i nepasterované
<i>Enterococcus faecalis</i>	Šarže A (51 % t. v s.) – mléko nepasterované
<i>Enterococcus faecium</i>	Šarže E (30 % t. v s.) – mléko nepasterované

ZÁVĚR

Výroba přírodních sýrů je složitý proces, přičemž zásadními kroky, které utvoří výsledné organoleptické vlastnosti sýru, jsou především technologický postup výroby, typ přidaných mlékářenských kultur a doba zrání. I přes to, že většina sýrů je vyráběna z pasterovaného mléka, je nutno sledovat mikroflóru v primárních surovinách i konečném produktu a zajistit tak mikrobiologickou bezpečnost potravin.

Ke sledování biodiverzity lze využít buď kultivačních, nebo nekultivačních metod. Stále více jsou využívány metody nekultivační, molekulárně-biologické, protože poskytují rychlejší a přesnější výsledky. Navíc lze prokázat i přítomnost neživotaschopných buněk, což bylo dříve možné jen pomocí kultivačních metod.

V této bakalářské práci byla sledována mikroflóra přírodních zrajících sýrů pomocí metody PCR-DGGE, po které následovala Sangerova metoda sekvenace DNA. Během optimalizace izolace DNA byl zjištěn vliv obsahu tuku jako možného inhibitoru izolace DNA ze sýrů.

Výsledky identifikace mikroorganismů prokázaly dominantní přítomnost bakterií mléčného kvašení, které byly součástí přidaných startovacích kultur. Jednalo se především o grampozitivní koky, konkrétně *Lactococcus lactis*. Ze zástupců kontaminující mikroflóry se podařilo identifikovat *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* a *Bacillus cereus*. Tyto kontaminující mikroorganismy byly izolovány hlavně z nepasterovaných mlék. V pasterovaném mléce byla zjištěna přítomnost *Bacillus cereus*, který je schopen tvořit bakteriální spory. Tyto spory jsou termorezistentní, a tudíž nemusí být inhibovány běžným pasteračním záhřevem. Ve startovací kultuře měl být navíc obsažen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* a *Leuconostoc* sp.. Tyto mikroorganismy se však nepodařilo ve vzorcích identifikovat. Rovněž nebylo pozorováno jiné druhové zastoupení možné kontaminující mikroflóry.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Vyhláška č. 397/2016 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje.
- [2] FOX, Patrick, Paul McSWEENEY, Timothy COGAN a Timothy GUINEE. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Third edition - Volume 1: General Aspects. Amsterdam: London Elsevier, 2004a. ISBN 0-1226-3651-1.
- [3] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. 2002. ISBN 8070805102.
- [4] FOX, Patrick, Paul McSWEENEY, Timothy COGAN a Timothy GUINEE. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, Third edition - Volume 2: General Aspects. Amsterdam: London Elsevier, 2004a. ISBN 0-1226-3651-1.
- [5] STEELE, James a Elmer MARTH. Applied dairy microbiology. New York: Marcel Dekker, 2001, 744 s. ISBN 978-0-8247-0536-7.
- [6] Flora Danica: Informace o výrobku. *Tomscheese*. Dostupné z: https://www.tomscheese.cz/fotky50230/fo-tov/50230_529__ps_231PI_EU_FLORADANICA_713493_CS.pdf.
- [7] BUŇKA, František. *Mlékárenská technologie I*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2013, 258 s. ISBN 978-80-7454-254-1.
- [8] NDOYE, Bassirou, Eric Andriamahery RASOLOFO, Gisele LAPOINTE a Denis ROY. A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. *Dairy Science & Technology*. 2011, 91(5), 495-524. ISSN 1958-5586.
- [9] QUIGLEY, Lisa, Orla O'SULLIVAN, Tom P. BERESFORD, R. Paul ROSS, Gerald F. FITZGERALD a Paul D. COTTER. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, 81-94. ISSN 01681605.
- [10] KIERONCZYK, A., S. SKEIE, T. LANGSRUD a M. YVON. Cooperation between *Lactococcus lactis* and Nonstarter Lactobacilli in the Formation of Cheese Aroma from Amino Acids. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, 69(2), 734-739. ISSN 0099-2240.

- [11] LEROY, Frédéric a Luc DE VUYST. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*. 2004, 15(2), 67-78 ISSN 09242244.
- [12] GIRAFFA, Giorgio, Erasmo NEVIANI, Tom P. BERESFORD, R. Paul ROSS, Gerald FITZGERALD a Paul D. COTTER. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, 67(1-2), 19-34. ISSN 01681605.
- [13] RUDI, K., B. MOEN, S. M. DROMTORP, A. L. HOLCK, Gerald F. FITZGERALD a Paul D. COTTER. Use of Ethidium Monoazide and PCR in Combination for Quantification of Viable and Dead Cells in Complex Samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, 71(2), 1018-1024. ISSN 0099-2240.
- [14] NOCKER, Andreas a Anne K. CAMPER. Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. *FEMS Microbiology Letters*. 2009, 291(2), 137-142. ISSN 03781097.
- [15] GOPINATH, Subash C.B., Thean-Hock TANG, Yeng CHEN, Marimuthu CITARTAN a Thangavel LAKSHMIPRIYA. Bacterial detection: From microscope to smartphone. *Biosensors and Bioelectronics*. 2014, 60, 332-342. ISSN 09565663.
- [16] RÅDSTRÖM, Peter, Rickard KNUTSSON, Petra WOLFFS, Maria LÖVENKLEV, Charlotta LÖFSTRÖM a Paul D. COTTER. Pre-PCR Processing: Strategies to Generate PCR-Compatible Samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, 71(2), 1018-1024. ISSN 0099-2240.
- [17] ROSSEN, L., NØRSKOV, P., HOLMSTRØM, K., and RASMUSSEN, O. F. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*. 1992, 17, 37-45.
- [18] SCHRADER, C., A. SCHIELKE, L. ELLERBROEK, R. JOHNE, Charlotta LÖFSTRÖM a Paul D. COTTER. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal: Strategies to Generate PCR-Compatible Samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, 71(2), 1018-1024. ISSN 0099-2240.
- [19] WILSON, I. G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(10), 3741-3751.

- [20] BICKLEY, J., J.K. SHORT, D.G. MCDOWELL, H.C. PARKES, Charlotta LÖFSTRÖM a Paul D. COTTER. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions: Strategies to Generate PCR-Compatible Samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, 71(2), 1018-1024. ISSN 0099-2240.
- [21] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
- [22] WILSON, Keith a John M. WALKER. *Principles and techniques of biochemistry and molecular biology*. 7th ed. New York: Cambridge University Press, 2009. ISBN 978-0-521-51635-8.
- [23] BROWN, T. A. *Gene cloning and DNA analysis: an introduction*. 6th ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, c2010. ISBN 978-1-4051-8173-0.
- [24] DESMOND S.T. NICHOLL. *An Introduction to Genetic Engineering*. 3rd ed. Leiden: Cambridge University Press, 2008. ISBN 9780511398582.
- [25] MUYZER, Gerard. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*. 1999, 2(3), 317-322. ISSN 13695274.
- [26] MUYZER, Gerard & SMALLA, Kornelia. Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) and Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE) in Microbial Ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1998, 73, 127-41.
- [27] DE MEDICI, D., T. KUČHTA, R. KNUTSSON, et al. Rapid Methods for Quality Assurance of Foods: the Next Decade with Polymerase Chain Reaction (PCR)-Based Food Monitoring. *Food Analytical Methods*. 2015, 8(2), 255-271. ISSN 1936-9751.
- [28] FUSCO, Vincenzina, Grazia Marina QUERO, R. KNUTSSON, et al. Culture-Dependent and Culture-Independent Nucleic-Acid-Based Methods Used in the Microbial Safety Assessment of Milk and Dairy Products: the Next Decade with Polymerase Chain Reaction (PCR)-Based Food Monitoring. *Food Analytical Methods*. 2015, 8(2), 255-271. ISSN 1936-9751.
- [29] SCHEU, P.M, K BERGHOF, U STAHL, et al. Detection of pathogenic and spoilage micro-organisms in food with the polymerase chain reaction: the Next Decade with Polymerase Chain Reaction (PCR)-Based Food Monitoring. *Food Analytical Methods*. 2015, 8(2), 255-271. ISSN 1936-9751.

- [30] GOKULAKRISHNAN, P. a Jess VERGIS. Molecular Methods for Microbiological Quality Control of Meat and Meat Products: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2013, 55(10), 1315-1319. ISSN 1040-8398.
- [31] Mikrobiologická bezpečnost potravin: současné strategie pro efektivní kontrolu. *Chemické listy* [online]. 2012, 920-925 [cit. 2018-04-24]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2012_10_920-925.pdf
- [32] PRIMROSE, S. B. a Richard M. TWYMAN. *Principles of gene manipulation and genomics*. 7th ed. Oxford: Blackwell Pub., 2006. ISBN 1-4051-3544-1.
- [33] NUNNALLY, Brian K. *Analytical techniques in DNA sequencing*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. ISBN 0-8247-5342-9.
- [34] KALOUSOVÁ, Iveta. *Změny vývoje mikroflóry během výroby a skladování masného výrobku*. Zlín, 2016. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [35] Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J.. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2), 697–703.
- [36] MUYZER, Gerard; DE WAAL, Ellen C.; UITTERLINDEN, Andre G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59, 695-700
- [37] Lane, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M., eds., John Wiley and Sons, New York, NY. 1991, 115-175.
- [38] C.B.S. Scientific. *Instruction manual - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Systems* [cit. 2018-04-24]. Dostupné z: https://us.vwr.com/assetsvc/asset/en_US/id/9144414/contents
- [39] ROJÍČKOVÁ, Kristýna. *Vliv obsahu tuku na vlastnosti sýru typu gouda*. Zlín, 2017. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

APS	amonium persulfát
bp	base pairs (páry bází)
BLAST	basic local alignment search tool
DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis (denaturační gradientová gelová elektroforéza)
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
EMA	ethidium monoazid
MRS	<i>Lactobacillus</i> deMan, Rogosa and Sharpe agar
NSLAB	non starter lactic acid bacteria (non-starterové mléčné bakterie)
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
RNA	ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)
RPM	revolutions per minute (počet otáček za minutu)
sp.	species (druh)
subsp.	subspecies (poddruh)
TAE	tris-acetát-EDTA
TEMED	tetramethylethylendiamin
UV	ultraviolet (ultrafialové)

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Schéma aparatury pro přípravu gelu</i>	<i>33</i>
<i>Obr. 2: Schéma vkládání kazety s gelem do tanku s pufrem</i>	<i>34</i>
<i>Obr. 3: Elektroforetický tank</i>	<i>34</i>
<i>Obr. 4: Ukázka fotografie osvíceného gelu</i>	<i>35</i>
<i>Obr. 5: Část opraveného záznamu sekvence</i>	<i>37</i>
<i>Obr. 6: PCR amplifikace DNA izolované ze sýrů a mléka</i>	<i>40</i>
<i>Obr. 7: Gel po DGGE elektroforéze, vzorky s obsahem tuku v sušině 51 %.....</i>	<i>41</i>
<i>Obr. 8: Gel po DGGE elektroforéze, vzorky s obsahem tuku v sušině 51 %.....</i>	<i>41</i>
<i>Obr. 9: Gel po DGGE elektroforéze, vzorky s obsahem tuku v sušině 30 % a 23 % .</i>	<i>42</i>

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1: Složení reakční směsi – 1. amplifikační krok</i>	<i>28</i>
<i>Tab. 2: Teplotní a časový profil – 1. amplifikační krok.....</i>	<i>28</i>
<i>Tab. 3: Složení reakční směsi – 2. amplifikační krok</i>	<i>29</i>
<i>Tab. 4: Teplotní a časový profil – 2. amplifikační krok.....</i>	<i>29</i>
<i>Tab. 5: Sekvence vybraných primerů.....</i>	<i>29</i>
<i>Tab. 6: Složení denaturačních a zásobních roztoků</i>	<i>32</i>
<i>Tab. 7: Značení vzorků sýrů</i>	<i>38</i>
<i>Tab. 8: Srovnání metod na základě naměřené čistoty a koncentrace DNA.....</i>	<i>39</i>
<i>Tab. 9: Identifikované mikroorganismy.....</i>	<i>43</i>