

Vývoj mikroflóry u modelových vzorků přírodních sýrů během jejich zrání

Bc. Michaela Křenková

Diplomová práce
2020

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Michaela Křenková**
Osobní číslo: **T190119**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **Kombinovaná**
Téma práce: **Vývoj mikroflóry u modelových vzorků přírodních sýrů během jejich zrání**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

1. Mikroorganismy využívané v technologii výroby přírodních sýrů
2. Úloha mikroflóry při zrání přírodních sýrů

II. Praktická část

1. Kulturační stanovení vybraných indikátorových skupin mikroorganismů během výroby a zrání modelových vzorků přírodních sýrů
2. Sledování diverzity mikroflóry výroby a zrání modelových vzorků přírodních sýrů non-kultivačními molekulárně-biologickými metodami
3. Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů práce

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] DONNELLY, CATHERINE W. Cheese and microbes. Washington, DC: ASM Press, 2014, 333 s. ISBN 978-1-55581-586-8.
- [2] FOX, P.F. Cheese: chemistry, physics, and microbiology. Volumes 1-2, General aspects. 3rd ed. San Diego: Academic, 2004, 2 sv. ISBN 012263652X.
- [3] QUIGLEY, L., O'SULLIVAN, O., BERESFORD, T.P., ROSS, R.P., FITZGERALD, G.F., COTTER, P.D. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 150: 81-94. 2011.
- [4] NDOYE, B., RASOLOFO, E.A., LAPOINTE, G., ROY, D. A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. *Dairy Science and Technology*, 91: 495-524. 2011.
- [5] Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně.

Vedoucí diplomové práce: **doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **17. února 2020**
Termín odevzdání diplomové práce: **15. května 2020**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. RNDr. Iva Burešová, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 17. února 2020

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou 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;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užit své dílo – diplomovou 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);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové 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.

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Předmětem diplomové práce bylo sledování vývoje mikrobiální diverzity u modelových vzorků přírodních sýrů typu gouda od počátku výroby a během zrání. Pro účely této diplomové práce byly vybrány dva druhy obalových materiálů, ve kterých probíhalo zrání analyzovaných vzorků sýrů. Konkrétně se jednalo o sýrařský vosk a ochranný nátěr Plasticoat. Vybrané indikátorové skupiny mikroorganismů byly následně stanovovány pomocí kultivačních a molekulárně-biologických metod. U kultivačního stanovení byla použita klasická plotnová metoda s využitím selektivně – diagnostických půd. Pro molekulárně-biologické stanovení byla získaná mikrobiální DNA z modelových vzorků zmnožena pomocí metody PCR a následně separována za využití techniky denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE). Pro sekvenování DNA byla využita Sangerova metoda a metoda NGS (Next-Generation Sequencing). Výsledky u obou metod prokázaly výraznou dominanci bakterií mléčného kvašení po celou dobu zrání. Ze všech modelových vzorků sýrů byl izolován *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Izolovaná mikroflóra jednotlivých modelových vzorků sýrů se odvíjela od použitých startovacích kultur.

Klíčová slova: přírodní sýr, zrání sýrů, kultivační stanovení mikroorganismů, izolace DNA z přírodních sýrů, PCR, DGGE, sekvenace DNA

ABSTRACT

The aim of this thesis was to monitor the development of microbial diversity in model samples of natural Gouda cheeses from production and during ripening. For the purpose of this work two types of packaging materials were used for ripening. Specifically it was a wax used for cheeses and protective coating called Plasticoat. Selected indicative groups of microorganisms were analysed with use of cultivation and molecular biological methods. Plate method using selective-diagnostic media was used for the culture assay. Microbial DNA obtained from model samples was multiplied by PCR method and separated using the DGGE technique. The Sanger method and Next-Generation Sequencing (NGS) were used for DNA sequencing. The results of both methods showed a dominance of lactic acid

bacteria during the cheese maturing. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* was isolated from all cheese model samples. The isolated microflora of the model cheese samples was derived from used starter cultures.

Keywords: ripened cheese, cheese ripening, culture determination of microorganisms, DNA isolation from natural cheeses, PCR, DGGE, DNA sequencing

Tímto bych ráda poděkovala především vedoucí své diplomové práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D., za cenné rady a připomínky při vypracovávání této práce a za možnost pracovat na zajímavém tématu. Poděkování patří i paní laborantce Ing. Veronice Kučabové, za odborný dohled při realizaci praktické části.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 TECHNOLOGIE VÝROBY SÝRŮ	12
1.1 TECHNOLOGICKÝ PROCES VÝROBY PŘÍRODNÍCH SÝRŮ	12
1.1.1 Úprava mléka	12
1.1.2 Příprava a přidavek mlékárenských kultur	13
1.1.3 Koagulace mléka (sýření)	13
1.1.4 Zpracování sýřeniny	14
1.1.5 Lisování a formování	14
1.1.6 Solení.....	14
1.1.7 Zrání sýrů	15
2 MIKROORGANIZMY VYUŽÍVANÉ PŘI VÝROBĚ PŘÍRODNÍCH SÝRŮ	16
2.1 PRIMÁRNÍ (STARTOVACÍ) KULTURY	16
2.2 SEKUNDÁRNÍ KULTURY	17
2.3 NON - STARTEROVÉ KULTURY (NSLAB)	17
3 ÚLOHA MIKROFLÓRY PŘI ZRÁNÍ PŘÍRODNÍCH SÝRŮ	19
3.1 VÝZNAM PRIMÁRNÍCH (STARTOVACÍCH) KULTUR	19
3.2 VÝZNAM SEKUNDÁRNÍCH KULTUR	20
3.3 VÝZNAM NON-STARTEROVÝCH KULTUR	21
4 MIKROBIOLOGIE ZRÁNÍ PŘÍRODNÍCH SÝRŮ A MOŽNOSTI SLEDOVÁNÍ VÝVOJE MIKROFLÓRY	22
4.1 ZPŮSOBY SLEDOVÁNÍ VÝVOJE MIKROFLÓRY	22
4.2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ MIKROBIOLOGII SÝRŮ	23
4.3 MIKROBIÁLNÍ DIVERZITA ZRAJÍCÍCH SÝRŮ	23
4.3.1 Interakce mezi LAB a NSLAB	24
5 MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÉ METODY VYUŽÍVANÉ V MIKROBIOLOGII POTRAVIN	25
5.1 IZOLACE DNA.....	25
5.2 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)	26
5.3 DENATURAČNÍ GRADIENTOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA (DGGE).....	27
5.4 METODY SEKVENACE DNA.....	27
5.4.1 Sekvenování druhé generace (NGS)	28
II PRAKTICKÁ ČÁST	29
6 CÍL PRÁCE	30
7 KULTIVAČNÍ STANOVENÍ	31

7.1	ZNAČENÍ VZORKŮ	31
8	IZOLACE DNA.....	34
8.1	PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO IZOLACI DNA	34
8.2	IZOLACE DNA.....	34
8.3	MĚŘENÍ KONCENTRACE DNA	36
9	METODA PCR-DGGE.....	37
9.1	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE	37
9.1.1	1. amplifikační krok	37
9.1.2	2. amplifikační krok	38
9.2	DENATURAČNÍ GRADIENTOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA	39
9.2.1	Sestavení aparatury pro DGGE	39
9.2.2	Příprava gelu	40
9.2.3	Průběh elektroforézy	41
9.2.4	Barvení a vizualizace gelu	42
9.2.5	Purifikace, sekvenace DNA a identifikace mikroorganismů.....	42
10	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	45
10.1	KULTIVAČNÍ STANOVENÍ.....	45
10.2	IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ ZA VYUŽITÍ MOLEKULÁRNĚ- BIOLOGICKÝCH METOD	49
	ZÁVĚR	56
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	58
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	66
	SEZNAM OBRÁZKŮ	67
	SEZNAM TABULEK.....	68

ÚVOD

Přírodní sýry a mléčné výrobky obecně jsou nedílnou součástí ve stravě člověka již řadu let. V současné době je na trhu nabízen rozmanitý sortiment přírodních sýrů. Nejčastější je konzumace sýrů vyrobených z kravského mléka, i přesto však na trhu existují sýry vyráběné z mléka kozího, ovčího nebo buvolího.

Většina přírodních sýrů nebývá konzumována ihned po výrobě. Důležitým faktorem, který ovlivňuje výsledné organoleptické vlastnosti přírodních sýrů, je zrání. Doba zrání se pro každý druh sýru liší. Může se pohybovat v řádu týdnů, měsíců i let. Významnou roli při zrání má přídavek tzv. čistých mlékařských kultur, které v závislosti na vybraném druhu následně ovlivní nejdůležitější sensorické vlastnosti pro spotřebitele, a to chuť a vůni. Důležité je však sledovat i případné kontaminující mikroorganismy, které by mohly zrání a výsledné vlastnosti negativně ovlivnit.

Pro sledování vývoje a změn mikroflóry během zrání sýrů je možno využít klasických kultivačních metod, které jsou poměrně rychlé i finančně a časově nenáročné. Je však nutno dbát na aseptickou práci. Pro stanovení vybraných indikátorových mikroorganismů se často využívá selektivně-diagnostických půd. Kromě kultivačních metod existují i metody non-kultivační, kam jsou řazeny například imunologické metody nebo molekulárně-biologické metody.

Tato diplomová práce je zaměřena na sledování změn mikroflóry v průběhu zrání přírodních sýrů typu gouda za využití kultivačních a molekulárně-biologických metod, přičemž kultivační metody jsou zde používány spíše jako referenční ukazatel vývoje mikroflóry. Pro přesnější stanovení jednotlivých druhů mikroorganismů byla využita technika PCR-DGGE (denaturační gradientová gelová elektroforéza) s následnou sekvenací mikrobiální DNA. Pro sekvenování DNA byly využity Sangerova metoda a pro vybrané vzorky i moderní metoda NGS (Next Generation Sequencing).

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 TECHNOLOGIE VÝROBY SÝRŮ

Správný technologický postup a výběr kvalitních surovin je základem pro výrobek požadované jakosti. V případě přírodních sýrů se výroba, až na některé kroky, příliš neliší. Zpravidla se pro výrobu sýrů používají tzv. kaseinová mléka, tedy mléka od přežvýkavců, z nichž nejvyšší podíl tvoří mléko kravské. Kravské mléko obsahuje přibližně 3,5 % bílkovin, přičemž kaseinové bílkoviny jsou zde zastoupeny až z 80 %. Výroba řady mléčných výrobků je založena právě na srážení bílkovin kaseinu [1, 2].

Základními surovinami pro výrobu sýrů jsou mléko, syřidlo a mlékařské kultury. Dále je možno použít i různé ochucující složky jako bylinky, koření, popřípadě se pro vývoj aroma používá uzení [1].

Popsaný technologický postup v této diplomové práci je vztažen na sýr typu gouda, u jehož vzorků bylo prováděno sledování mikrobiální diverzity od jeho výroby, včetně vstupní suroviny (mléka) a následně během zrání.

1.1 Technologický proces výroby přírodních sýrů

Výroba sýrů je poměrně jednoduchý postup, který však zahrnuje složité fyzikální a chemické procesy, zahrnující koagulaci mléčných bílkovin (především kaseinu). Dodržení vhodně zvoleného postupu je velmi důležité, jelikož výsledná reologické a fyzikální vlastnosti sýru jsou závislé na chemických interakcích molekul kaseinu [3]. Faktory, které ovlivňují tyto, interakce jsou:

- hodnota pH
- rozpuštění koloidního fosforečnanu vápenatého
- proteolýza
- teplota
- složení sýru (především obsah kaseinů a rozptýlení tukových kuliček) [4]

1.1.1 Úprava mléka

Úprava mléka pro výrobu sýrů zahrnuje především pasteraci, tedy tepelné ošetření, které zajistí eliminaci potenciálních patogenních mikroorganismů a inaktivaci jejich enzymů. Tento krok je zásadní, jelikož výskyt patogenů by mohl ovlivnit bezpečnost finálního produktu a ohrozit zdraví spotřebitele. Pasterace je zpravidla záhřev na teplotu 72 °C po dobu 15 sekund. Nejčastěji je pro pasteraci mléka používán deskový průtokový pastér a celý

proces bývá většinou plně automatizován. Ukazatelem správného provedení pasterace je negativní fosfatázový test. Bylo zjištěno, že kombinace doby záhřevu a teploty pro inaktivaci alkalické fosfatázy v mléce byla dostatečná pro usmrcení *Mycobacterium tuberculosis*, jakožto cílový mikroorganismus pro pasteraci. Tudíž se fosfatázový test začal provádět jako jedna z rutinních kontrol kvality surovin [5, 6, 7].

Existují i alternativní postupy pro eliminaci nežádoucích mikroorganismů v mléce. Řadí se mezi ně ultrafiltrace a baktofugace. Tyto postupy je možno využít při odstranění spor mikroorganismů, které běžně přežívají pasterační záhřev a mohou způsobit nežádoucí změny ve finálním produktu. Příkladem mohou být sporulující bakterie *Clostridium* spp., které jsou zodpovědné za pozdní duření sýrů. V případě využití alternativních způsobů eliminace mikroorganismů je však nutno podotknout, že nenahrazují samotnou pasteraci. Nedochází zde totiž k inaktivaci enzymů, které mohou být produkovány patogenními mikroorganismy a rovněž představují zdravotní riziko pro spotřebitele [4, 8].

1.1.2 Příprava a přidavek mlékárenských kultur

Mlékárenské kultury hrají klíčovou roli především při zrání sýrů. Díky produkci kyseliny mléčné dochází ke snížení pH sýru a následně i k biochemickým a fyzikálním změnám během zrání. Pro výrobu sýru typu gouda jsou využívány mezofilní kultury, nejčastěji *Lactococcus lactis*. Kultury se vyskytují buď ve zmrazené koncentrované podobě, nebo v lyofilizované formě. Před samotnou inokulací dochází zpravidla k jejich rekonstituci rozmícháním definované hmotnosti kultury v mírně zahřátém mléce, které bude použito pro výrobu sýru. Kultury se do mléka přidávají 30-45 minut před sýřením. S přidavkem čistých mlékárenských kultur v případě velkého objemu výrobníku a jeho vícenásobného plnění během dne je spojováno riziko kontaminace bakteriofágy, které mohou narušit výrobní proces zejména ve fázi fermentace. Tomuto riziku lze předcházet správnou sanitací výrobního zařízení a zvolením fágově rezistentních kultur [1, 5, 9].

1.1.3 Koagulace mléka (sýření)

Sýření je proces zahrnující přidavek koagulačního činidla do mléka, přeměnu mléka na polotuhý gel a následnou synerezi. Při synerezi dochází k uvolňování syrovátky a vzniku sýřeniny. Koagulační činidla bývají kapalné koncentráty, které je možno přidávat v odměřeném množství přímo do výrobníku. V současné době se z etických a ekonomických důvodů již nepoužívá chymozin získaný z žaludků telat. Používaná syřidla jsou často mikro-

biálního původu, odvozené například od mikroorganismu *Rhizomucor miehei* nebo jiných geneticky modifikovaných mikroorganismů [4, 5, 9, 10].

Srážení mléka nastává po přidavku koagulačního činidla rozrušením vazeb κ -kaseinu mezi 105 a 106 aminokyselinou za vzniku hydrofobního para- κ -kaseinu, který zůstává v sýřenině a hydrofilního κ -kaseinmakropeptidu, který odchází do syrovátky. Tímto procesem dojde k destabilizaci kaseinových micel a následnému spojování do trojrozměrné struktury (gel). Popsaný způsob bývá jiným způsobem nazýván jako sladké srážení. Po přidavku koagulačního činidla je míchání pozastaveno, aby došlo ke tvorbě gelu. Tento proces trvá okolo 40 minut [1, 9].

1.1.4 Zpracování sýřeniny

Po vytvoření kompaktní sýřeniny přichází na řadu proces krájení na kostky o velikosti 6-10 mm. Pro tento účel jsou používány speciální sýrařské harfy, které mohou mít různé tvary. Nejčastější je však tvar obdélníku. Krájení sýřeniny se provádí za účelem podpory synereze. Zpravidla čím drobnější jsou sýrařská zrna, tím tvrdší bude výsledný sýr. Při tomto procesu opět dochází k míchání sýřeniny, aby se zamezilo shlukování sýrařských zrn. Někdy bývá do procesu zahrnuto i tzv. dohřívání sýřeniny a praní sýrařského zrna. U sýrů s nízkodohřívanou sýřeninou (gouda, eidam) dohřívání probíhá současně při praní sýrařského zrna při teplotě 36 - 37 °C. Prací proces slouží ke snížení obsahu laktózy [4, 5, 10].

1.1.5 Lisování a formování

Po zpracování je sýřenina vypouštěna do předlisovací vany pro oddělení syrovátky od sýrařského zrna. Vana se zakryje víkem a mírným tlakem se ponechá odkapat přebytečná syrovátka. Poté následuje krájení syrové hmoty na bloky a plnění do plastových nebo nerezových forem. Formy se zatíží a dochází k dalšímu uvolňování syrovátky, přičemž formy je nutno pravidelně otáčet [5].

1.1.6 Solení

U sýrů holandského typu solení probíhá v solných lázních. Koncentrace chloridu sodného se pohybuje v rozmezí 18 - 22 % a teplota lázně bývá 10 - 15 °C. Doba solení závisí na velikosti a tvaru sýru a rovněž na požadovaném obsahu soli. Tvrdé sýry zpravidla obsahují více soli než sýry měkké [9].

1.1.7 Zrání sýrů

Zrání sýrů je složitý biochemický proces, který zahrnuje několik fází. Mění se senzorické vlastnosti sýru, reologie a textura, dochází ke změnám mikroflóry. Zrání může probíhat buď v celé hmotě sýru, nebo na jeho povrchu. Většinou se však oba typy zrání vzájemně doplňují. V případě sýrů zrajících v celé hmotě se používají různé typy ochranných nátěrů (vosky) nebo zrací fólie [1, 9].

V první fázi zrání dochází především k přeměnám laktózy, přesněji řečeno probíhá anaerobní glykolýza za vzniku laktátu, který je substrátem pro další reakce [1].

Ve druhé fázi zrání dochází k lipolýze a metabolismu mastných kyselin. V sýrech vyrobených z pasterizovaného mléka je aktivita lipáz snížena, jelikož tyto enzymy byly tepelným záhřevem inaktivovány. Lipolytické enzymy jsou v malém množství produkovány některými mléčnými bakteriemi, avšak u sýrů holandského typu není lipolýza natolik rozsáhlá jako například u plísňových sýrů. Mastné kyseliny jsou zodpovědné za výslednou chuť sýru. Obecně však sýry jako eidam, gouda nebo čedar mají nízký obsah mastných kyselin (udává se 200 - 1000 mg kg⁻¹) v porovnání s nivou, kde je obsah mastných kyselin udáván okolo 30 000 mg kg⁻¹ [1].

Třetí fáze zrání zahrnuje proteolýzu a katabolismus aminokyselin. Jedná se o sled nejsložitějších a u většiny sýrů i nejdůležitějších biochemických reakcí. Při hydrolýze para-κ-kaseinu může dojít ke změně textury. Při proteolýze vlivem zvýšení produkce amoniaku se zvyšuje pH. Přítomnost peptidů může negativně nebo pozitivně ovlivnit chuť. Proteolýza probíhá především díky produkci proteolytických enzymů mléčných bakterií a přítomnosti syřidla. Při reakcích, kde se uplatňují volné aminokyseliny, dochází k tvorbě řady aromatických látek (např. aldehydy, ketony, estery, kyseliny). V přítomnosti volných aminokyselin je častý vznik biogenních aminů, které ve vysokých koncentracích mohou představovat zdravotní riziko [1].

2 MIKROORGANIZMY VYUŽÍVANÉ PŘI VÝROBĚ PŘÍRODNÍCH SÝRŮ

Mikroorganismy využívané pro výrobu přírodních sýrů mohou být rozděleny do dvou skupin, na základě jejich optimální růstové teploty, na mezofilní (optimální růstová teplota okolo 32 °C) a termofilní (optimální růstová teplota mezi 37 - 45 °C) [11].

Tradiční taxonomické dělení udává, že se jedná o širokou skupinu grampozitivních mikroorganismů, jejichž společným znakem je produkce kyseliny mléčné, jakožto primárního produktu. Rody řazené do LAB (LAB - Lactic acid bacteria) jsou následující: *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* a *Weissella*. Rovněž jsou do této skupiny řazeny i bakterie *Bifidobacterium*. Řazení mikroorganismů do skupiny LAB se dnes provádí na základě sekvenčních dat rRNA nebo sekvenací DNA. Tyto metody se ukázaly jako spolehlivější, jelikož nejsou závislé na podmínkách růstu a lze rozlišit i jinak obtížně identifikovatelné skupiny [4, 11, 12].

Dalším možným dělením mikroorganismů využívaných v technologii výroby sýrů je rozdělení na primární (startovací) kultury, sekundární a tzv. non-starterové kultury (NSLAB – Non-starter lactic acid bacteria).

2.1 Primární (startovací) kultury

Startovací kultury hrají klíčovou roli ve všech fázích výroby sýrů a následně i během zrání. Zpravidla se používají bakterie mléčného kvašení, které jsou schopny metabolizovat laktózu za vzniku kyseliny mléčné. Produkce kyseliny mléčné je důležitá z hlediska snižování pH výrobku a následné inhibici možné nežádoucí mikroflóry. U komerčně vyráběných sýrů jsou primární kultury pečlivě vybírány a záměrně přidávány do mléka před samotným sýřením [1, 5].

U sýrů holandského typu jsou využívány především mezofilní kultury, konkrétně *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, často v kombinaci s *Leuconostoc* spp. [1, 5, 13]. U sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou je žádoucí využití termofilních kultur např. *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [1, 5].

Náhodně přítomné kultury vyskytující se v mléce, jako např. *Enterococcus faecium* nebo *Enterococcus faecalis*, jsou využívány pouze u některých lokálně vyráběných druhů sýrů. U komerčně vyráběných sýrů tento postup většinou není možný, jelikož mléko je před vý-

robou podrobena pasteraci a dochází tedy k poměrně významné redukci přítomných mikroorganismů [1, 5].

2.2 Sekundární kultury

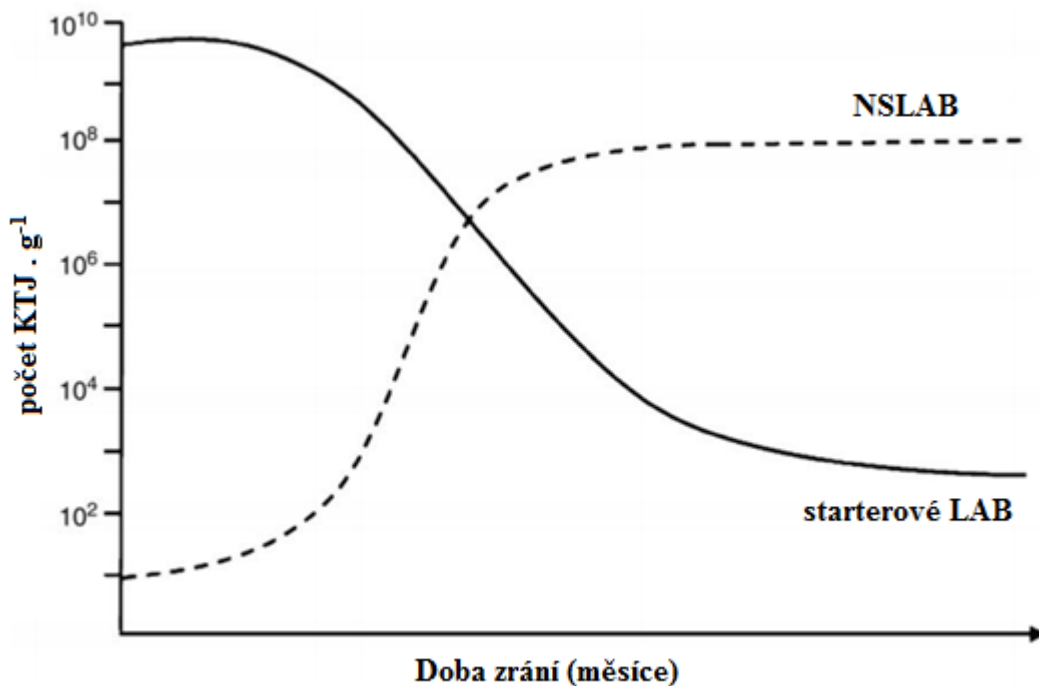
Zatímco primární kultury jsou přidávány za účelem produkce kyseliny mléčné a snižování pH v sýru, sekundární kultury plní hlavní funkci především během zrání. Jedná se o vývoj výsledné chuti a aroma. V neposlední řadě se podílejí i na utváření textury sýru během zrání. Z bakteriálních kultur jsou využívány především *Propionibacterium freudenreichii* nebo *Brevibacterium linens*, z kvasinkových kultur například *Debaryomyces hansenii*. Mezi významné zástupce plísňových kultur jsou řazeny *Geotrichum candidum*, *Penicillium roqueforti* a *Penicillium camemberti* [1, 4].

Některé mikroorganismy jsou schopny utvářet na povrchu i typické zabarvení, způsobené oranžovými, červenými nebo hnědými pigmenty. Tyto pigmenty jsou produkovány např. *Brevibacterium linens* nebo *Staphylococcus equorum*. Tyto pigmenty se stávají viditelnými v případě, že celkový počet životaschopných buněk přesáhne 10^9 CFU/cm², což se projevuje zejména u tzv. kyselých sýrů [4].

2.3 Non - starterové kultury (NSLAB)

Mezi non-starterové kultury jsou řazeny především mezofilní druhy bakterií mléčného kvašení. Jedná se hlavně o fakultativně a obligátně heterofermentativní laktobacily, které se přirozeně vyskytují v syrovém mléce, popřípadě se jedná o mikroorganismy z vnějšího prostředí během zpracování. Mnoho druhů NSLAB bylo izolováno z povrchů technologických zařízení, popřípadě odtokových zařízení nebo podlah, kde jsou schopny vytvářet biofilmy [14, 15, 16, 17].

U sýrů vyrobených z pasterizovaného mléka se jedná o nepatogenní druhy LAB, které nepředstavují zdravotní riziko pro člověka. Vzhledem k moderním hygienickým postupům je počet NSLAB v čerstvém sýru velmi nízký, avšak během zrání se může navyšovat, jak je možno vidět z obrázku 1, který zaznamenává změny v mikrobiální populaci během zrání sýru čedar [18].



Obr. 1: Změny v populaci startovacích LAB a NSLAB, ke kterým obvykle dochází v sýru čedar během zrání [18]

Mezi významné non-starterové mikroorganismy izolované z přírodních sýrů lze přiřadit *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus rhamnosus* nebo *Lactobacillus plantarum* [17, 18].

Non-starterové kultury mohou zrání sýrů ovlivnit jak pozitivně, tak i negativně. Z pozitivního hlediska mohou mít vliv na utváření chuti a aroma, kdy například zesilují určitou chuť nebo naopak vytvářejí atypické, ale přesto žádoucí, vůně. V jiných případech mohou vytvářet bioaktivní peptidy nebo volné aminokyseliny, což může urychlit proces zrání. Rovněž byly prokázány i probiotické účinky NSLAB [18, 19, 20].

3 ÚLOHA MIKROFLÓRY PŘI ZRÁNÍ PŘÍRODNÍCH SÝRŮ

Vlastnosti, které jsou typické pro každý druh sýru, úzce souvisí s mikrobiálním složením a také se vzájemnými interakcemi mezi přítomnými mikroorganismy. Existuje mnoho faktorů, které mohou ovlivnit mikrobiální diverzitu v sýrech. Mezi nejdůležitější z nich patří především typ mléka a složení primárních startovacích kultur. V neposlední řadě jsou rozhodujícími faktory i výrobní prostředí a technologický postup [21, 22, 23].

Jak již bylo uvedeno v kapitole 2, sýrařské kultury mohou být děleny na základě technologického využití na primární, sekundární a popřípadě i non-starterové. Úloha mikroflóry při zrání sýrů je různorodá, závisí na druhu mikroorganismu a s tím související typ metabolismu. Právě znalost fyziologie mikroorganismů umožňuje standardizaci a úpravu chutí sýrů. Aplikací vhodné startovací kultury lze vyrábět sýry o požadovaném chemickém složení a organoleptických vlastnostech [24].

3.1 Význam primárních (startovacích) kultur

Jako primární startovací kultury jsou vybírány homofermentativní bakterie mléčného kvašení, které mají schopnost rychlé tvorby kyseliny mléčné bez jiných vedlejších produktů metabolismu. U sýrů s nízkodohřivanou sýřeninou se jedná o druhy *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. V případě sýrů s vysokodohřivanou sýřeninou se využívá především *Streptococcus thermophilus* [1, 5].

Jak již bylo uvedeno, hlavní úlohou primárních kultur je tvorba kyseliny mléčné. Ta vzniká v malém množství už během přidavku startovacích kultur před sýřením. Substrátem pro tvorbu kyseliny mléčné je disacharid laktóza. Při produkci kyseliny mléčné dochází ke snižování pH, což při výrobě napomáhá k tvorbě sraženiny. Hlavním důvodem je především fakt, že používaná syřidla jsou enzymy, jejichž aktivita je nejvyšší v oblasti kyselého pH. Míra a rozsah okyselení má v pozdějších fázích vliv na utváření textury díky demineralizaci kaseinových micel, jelikož tyto micely jsou náchylnější k proteolýze [1].

Kyselina mléčná ve značné míře poskytuje chuť finálního produktu, zabraňuje růstu nežádoucích mikroorganismů a vytváří optimální podmínky pro zrání, což ve výsledku ovlivňuje kvalitu a bezpečnost výrobku [25, 26, 27].

Některé kmeny *Lactococcus lactis* jsou díky schopnosti produkovat nisin často využívány v potravinářském průmyslu. Nisin je polypeptid využívaný ke konzervaci potravin díky

bakteriocidním účinkům. Nisin je účinný především proti grampozitivním bakteriím, v případě technologie výroby sýrů může být významná inhibice *Listeria monocytogenes*, která se řadí mezi podmíněně patogenní mikroorganismy a může se vyskytovat ve zrajících sýrech. Začlenění těchto kmenů bakterií mezi startovací kultury může sloužit jako alternativa chemických přísad. Důležité je však všechny nově izolované druhy bakterií produkujících bakteriociny řádně charakterizovat a zhodnotit, zda jsou vhodné pro využití při výrobě potravin. V praxi to znamená určit typ produkovaného bakteriocinu, vyhodnotit antimikrobiální spektra a účinnost a v neposlední řadě také technologicky relevantní schopnosti [28].

3.2 Význam sekundárních kultur

Sekundární kultury využívané v technologii výroby sýrů zahrnují bakterie, kvasinky a plísně. Svoji úlohu plní zejména při zrání sýrů, kdy se podílejí na utváření typické chuti a vůně, textury a celkového vzhledu. Kromě rodu *Propionibacterium* a heterofermentativních laktobacilů, sekundární bakteriální kultury rostou hlavně na povrchu sýru. Kvasinkové a plísňové kultury jsou schopny růstu jak na povrchu, tak i uvnitř sýrů, avšak tato schopnost opět závisí na druhu mikroorganismu [1].

Bakterie propionového kvašení (PAB – propionic acid bacteria) jsou využívány u sýrů švýcarského typu, u kterých je charakteristická tvorba ok, jelikož při metabolismu laktátu dochází k tvorbě kyseliny propionové a produkci oxidu uhličitého. Přítomná kyselina propionová pak dává těmto sýrům typickou nasládlou chuť. Některé studie rovněž prokázaly příznivý účinek PAB na střevní mikroflóru u lidí, jelikož jsou schopny přežít v trávicím traktu, inhibovat růst nežádoucích bakterií v tlustém střevě a podporují růst bifidobakterií [1, 29, 30].

Některé druhy koryneformních bakterií a stafylokoků mohou vytvářet na povrchu sýrů typické zbarvení díky produkci pigmentů. Často se využívá například *Brevibacterium linens*, tvořící oranžovo-červený pigment, avšak mnoho druhů *Brevibacterium* neprodukuje žádný pigment. Stafylokoky jsou typické vytvářením oranžových pigmentů. Bakterie rodu *Arthrobacter* mohou produkovat typické červenohnědé pigmenty [1, 4].

Plísňové kultury (*P. camemberti*, *P. roqueforti*) jsou využívány především díky produkci exopeptidázových a endopeptidázových enzymů, které jsou významné především při proteolýze. Pro sýry s obsahem plísňových kultur je rovněž typická rozsáhlá lipolýza, což ve výsledku ovlivňuje texturu sýrů. Plísně vytvářejí také charakteristickou chuť a aroma. Co

se týká produkce mykotoxinů, zdravotní riziko pro spotřebitele je nízké, jelikož používané druhy plísní produkují mykotoxiny ve velmi malém množství. Kvasinky jsou používány především jako doplňkové kultury pro plísňové sýry a sýry zrající na povrchu, kde podporují růst dalších mikroorganismů [1].

3.3 Význam non-starterových kultur

Non-starterové kultury jsou především heterofermentativní laktobacily, které jsou přirozenou součástí mikroflóry tepelně neošetřeného mléka. V hojné míře se vyskytují i ve zrajících sýrech, kde mohou plnit funkci utváření zajímavých chutí a aroma, jelikož vykazují velkou rozmanitost vlastností. Jako substrát pro svůj metabolismus jsou schopny využívat volné peptidy a aminokyseliny, které se nacházejí ve zrajících sýrech [1, 31].

NSLAB mohou mít rovněž negativní účinky v podobě vad sýrů. Může se jednat o negativní dopad na výslednou chuť sýru v podobě různých pachutí nebo hořkých chutí, nežádoucí produkci plynů nebo tvorba krystalů laktátu vápenatého, které spotřebitelé často mylně považují za kontaminaci plísní [20].

Úloha heterofermentativních laktobacilů při vytváření chuti při zrání sýrů je v porovnání s homofermentativními laktobacily stále velmi nejasná, tudíž jejich využití jako doplňkových kultur se nachází v rané fázi. Stále jsou objevovány nové druhy NSLAB a do budoucna se předpokládá i možné častější využití [1].

4 MIKROBIOLOGIE ZRÁNÍ PŘÍRODNÍCH SÝRŮ A MOŽNOSTI SLEDOVÁNÍ VÝVOJE MIKROFLÓRY

Bakterie, kvasinky a plísně, jsou nedílnou součástí sýru a jsou zde přítomny od samotného počátku výroby a po celou dobu zrání. Pozitivně, ale i negativně, přispívají k zrání buď přímo prostřednictvím své metabolické aktivity, nebo nepřímo uvolňováním enzymů do sýrové matrice prostřednictvím autolýzy. Prostředí sýru podporuje růst mikroorganismů, avšak mikrobiální diverzita se v průběhu zrání dynamicky mění. Na rozdíl od většiny mléčných výrobků, které vykazují biologickou, biochemickou a fyzikálně-chemickou stabilitu, jsou sýry kvůli své mikrobiologické a biochemické dynamice přirozeně nestabilní. Během výroby a zrání je tedy nutno předpokládat, že pokud mikrobiologické intervence nejsou kontrolovány, může docházet ke vzniku nežádoucích změn v kvalitě výrobku [1, 32].

4.1 Způsoby sledování vývoje mikroflóry

Existují dva hlavní činitele podílející se na mikrobiální diverzité sýrů. Bakterie mléčného kvašení (LAB), které jsou do sýru přidávány záměrně – tedy startovací kultury a sekundární kultury, a tzv. non-starterové kultury (NSLAB), což je v podstatě náhodně přítomná mikroflóra. Pro sledování vývoje mikroorganismů v sýrech je důležité, aby mikroflóra byla sledována jako jeden celek. To znamená identifikaci a charakterizaci jednotlivých komponentů. Postupy používané k dosažení těchto cílů zahrnují:

- 1) kultivační metody s fenotypovou charakterizací
- 2) kultivační metody následované metodami charakterizace na molekulární úrovni
- 3) metody závislé pouze na molekulární charakterizaci [1, 33].

Kultivační metody s využitím selektivně-diagnostických půd mohou poskytovat užitečný přehled o mikrobiálním složení sýru. Fenotypové znaky jsou však závislé na podmínkách kultivace a rovněž je tato metoda limitována z hlediska citlivosti, jelikož existují i mikroorganismy náročné na kultivaci [33].

Z pohledu přesnějšího stanovení mikrobiální diverzity se jako vhodnější jeví metody závislé na molekulární charakterizaci. Tyto metody jsou nejčastěji založeny na analýze nukleových kyselin (DNA, RNA), proteinů nebo mastných kyselin [33].

4.2 Faktory ovlivňující mikrobiologii sýrů

Růst mikroorganismů v sýrech je ovlivněn řadou fyzikálních parametrů. Zásadní vliv mají především obsah vody, koncentrace solí, pH a přítomnost organických kyselin a teplota zrání.

Zvýšená aktivita vody (a_w) podporuje růst mikroorganismů. Během prvních fází výroby je $a_w \sim 0,99$, což umožňuje růst startovacích kultur. Ke snižování obsahu vody dochází až během odtoku syrovátky, během lisování a solení. Bakterie používané jako primární kultury, tj. *Lactococcus lactis* nebo *Streptococcus thermophilus* mají obecně vyšší minima a_w potřebné pro růst. Udávají se hodnoty vyšší než 0,93 [33, 34].

Optimální pH pro růst mikroorganismů se pohybuje v neutrální až mírně kyselé oblasti hodnot. V případě poklesu pH pod hodnotu 5 se růst často pozastavuje. Při akumulaci organických kyselin v raných fázích zrání, především kyseliny mléčné, se pH sýru pohybuje v rozmezí 4,5 – 5,3, což neumožňuje růst bakterií citlivých na nízké pH. Rovněž nedisociované formy organických kyselin jsou účinnými inhibitory růstu nežádoucích mikroorganismů [33, 35].

Mikroorganismy podílející se na zrání mikroorganismů mohou být mezofilní (optimální teplota růstu ~ 32 °C) nebo termofilní (optimální teplota růstu 35-45 °C). Výsledná zračí teplota je kompromis mezi potřebou podporovat zrání a růst sekundární mikroflóry a snahou o zabránění růstu nežádoucích mikroorganismů. Vyšší teploty podporují rychlejší zrání, avšak je zde riziko výskytu nežádoucích změn v textuře a sensorických vlastností [33, 36].

4.3 Mikrobiální diverzita zrajících sýrů

Rozmanitost bakterií mléčného kvašení v sýrech je velmi široká. Literární údaje popisují přibližně 35 různých hlavních druhů bakterií mléčného kvašení náležících do 7 rodů. Obvykle nejvyšší rozmanitosti je dosaženo do dvou měsíců od počátku zrání. Počty buněk bakterií mléčného kvašení se pohybují v rozmezí $10^8 - 10^9$ KTJ g^{-1} několik měsíců během zrání, avšak během této doby dochází ke změnám druhového zastoupení. Zpočátku zde převažují vysoké počty LAB, které byly použity jako startovací kultury. Jejich počet se postupně s dobou zrání snižuje. Naopak počty NSLAB, které byly původně nízké (10^2-10^3 KTJ g^{-1}) se mohou zvyšovat a ve výsledku dosáhnout 10^7-10^9 KTJ g^{-1} po několika měsících zrání [14, 32, 37, 38].

Mikrobiální diverzita byla sledována například u zrajícího sýru čedar, kde byly nejčastěji izolovány *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus*, *Lb. brevis*. Naopak u holandských sýrů, jako je gouda, je biologická rozmanitost LAB zdokumentována jen slabě. Ze sýru gouda byly nejčastějšími izoláty *Lactococcus lactis*, z non-starterových kultur pak *Lb. casei*, *Lb. paracasei* a *Lb. rhamnosus*. Vyšší mikrobiální rozmanitost obecně vykazují sýry vyráběné z tepelně neošetřeného mléka v porovnání se sýry, které byly vyrobeny z pasterizovaného mléka. NSLAB jsou však v pasterizovaném mléce stále přítomny, jelikož některé druhy laktobacilů a enterokoků jsou schopny přežít pasterační teploty [1, 39, 40, 41, 42].

4.3.1 Interakce mezi LAB a NSLAB

V původní surovině, tedy v mléce, se zpočátku počet laktobacilů pohybuje okolo 10^2 KTJ ml⁻¹ při zachování správných hygienických podmínek. Přítomná laktóza nejprve podporuje růst startovacích kultur, avšak po vyčerpání substrátu dochází k postupnému zpomalení růstu. Naopak dochází ke zvyšování počtu non-starterových bakterií. Některé studie naznačují, že NSLAB jsou schopny využívat i jiné alternativní zdroje pro svůj růst. Například lyzáty starterových LAB mohou sloužit jako zdroj energie pro NSLAB. Bakteriální autolýza nastává právě po vyčerpání zdrojů uhlíku, popřípadě se jedná o reakci na zahřívání nebo přítomnost soli. Většina NSLAB je schopna fermentovat ribózu, což indukuje acetát kinázovou cestu pentózového cyklu a získá další energii ve formě ATP [1, 20, 32, 43].

5 MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÉ METODY VYUŽÍVANÉ V MIKROBIOLOGII POTRAVIN

Jelikož mnoho běžně se vyskytujících mikroorganismů není možno kultivovat v laboratorních podmínkách, molekulárně-biologické metody umožňují detekci i obtížně kultivovatelných mikroorganismů. Principem molekulárně-biologických metod je analýza nukleových kyselin, které byly izolovány z určitého vzorku, a je zde tedy zahrnuta celá mikrobiální populace. Separace jednotlivých molekul nukleových kyselin probíhá pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), většinou v kombinaci s denaturační gradientovou gelovou elektroforézou (DGGE). Postup pro detekci mikroorganismů pomocí molekulárně-biologických metod zahrnuje izolaci nukleových kyselin (nejčastěji DNA), amplifikaci DNA, detekci PCR produktů a následnou identifikaci mikroorganismů [44, 45, 46].

5.1 Izolace DNA

Izolace mikrobiální DNA z potravin je poměrně složitý proces, v porovnání s izolací DNA z kultivačních médií, jelikož potraviny jsou heterogenní směsí, které kromě mikroorganismů obsahují i jiné složky. Především se jedná o látky organického původu, tedy sacharidy, bílkoviny, lipidy, organické kyseliny, alkoholy apod. Anorganické látky se zde nacházejí především ve formě solí nebo iontů [46, 47, 48].

Výše uvedené chemické sloučeniny mohou působit jako tzv. PCR inhibitory, proto má extrakce DNA o dostatečné koncentraci a čistotě zásadní význam. Proces získání DNA je kombinací fyzikálních a chemických metod, které zahrnují 4 klíčové body:

- homogenizace vzorků
- aplikace lyzačních činidel
- přečištění vzorků za pomoci pufřů, detergentů nebo enzymů
- extrakce DNA za využití organických činidel [48]

Pro homogenizaci jsou využívány homogenizační zařízení, tzv. stomachery, popřípadě mixéry. Jako lyzační činidla jsou nejčastěji využívány lysozym, proteináza K nebo mutanolysin, které jsou schopny rozrušovat stěny bakterií. Především některé druhy grampozitivních mikroorganismů jsou odolné vůči lyzačním činidlům díky chemickému složení jejich buněčné stěny. V tomto případě může být vhodná i mechanická lýza buněk, která je založena na rozbíjení buněčných stěn bakterií za využití mikročastic v kombinaci s vibracemi při vysokých rychlostech [48, 49].

Extrakce DNA se provádí za využití organických rozpouštědel. Velmi známá je metoda extrakce pomocí fenol-chloroformu v kombinaci se srážením pomocí etanolu. Nicméně vzhledem ke snaze omezit používání toxických látek je možno dnes využít k izolaci DNA komerční kity, které jsou založeny na vazbě DNA na pevný nosič. Pevným nosičem může být například membrána na bázi oxidu křemičitého. Při vazbě DNA na daný nosič dochází k odstraňování nečistot pomocí pufrů a následné eluci z membrány za využití pufru s nízkým obsahem soli např. Tris-EDTA (tris(hydroxymethyl)aminopentan - ethylendiaminotetraoctová kyselina = TE pufr [48].

5.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR (polymerase chain reaction) je metoda používaná k amplifikaci specifického úseku DNA. Tato reakce probíhá v zařízení zvaném termocykler. Složení reakční směsi bývá následující:

- mikrobiální DNA
- primery
- reakční pufr
- DNA polymerázu (velmi často Taq DNA polymeráza)
- chlorid hořečnatý
- směs modifikovaných nukleotidů [50]

Specifické primery jsou zde využívány k ohraničení požadovaného úseku DNA, který je určen k amplifikaci. Jedná se o krátké jednořetězové úseky DNA, které se navážou na jednotlivé konce mikrobiální DNA. Odtud následně probíhá syntéza nového komplementárního řetězce DNA s pomocí DNA polymerázy. Z původně jednořetězové molekuly DNA tak vzniká dvouřetězová molekula, která je poté denaturována za vzniku dvou jednořetězových molekul. Ty jsou poté opět pomocí DNA polymerázy doplněny na dvouřetězové. Tento cyklus je několikrát opakován a mikrobiální DNA je tak několikrát zmnožena [51, 52].

Jeden cyklus má celkem 3 fáze:

- 1) denaturace (94 °C, 30 s)
- 2) nasedání primerů – annealing (50-65 °C, 90 s)
- 3) syntéza DNA (72 °C, 60 s) [52]

Tyto cykly jsou opakovány 25-35krát. Celková doba PCR reakce trvá přibližně 2-3 hodiny [52].

5.3 Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

Technika DGGE je založena na rozdílné mobilitě částečně denaturovaných molekul DNA v gradientovém gelu. Rychlost denaturace závisí v tomto případě i na počtu vodíkových můstků. Úseky obsahující A-T páry denaturují rychleji než úseky obsahující G-C páry, které jsou stabilnější z důvodu obsahu trojné vazby. Z toho důvodu jsou používány primery obsahující tzv. G-C svorku, jedná se tedy o úsek bohatý na G-C páry, který denaturuje pomaleji, což ve výsledku způsobí lepší a viditelnější proužky při vizualizaci gelu.

Pro DGGE je využíván polyakrylamidový gel s postupně se zvyšující koncentrací denaturujících látek - močoviny a formamidu. Reakce probíhá za zvýšené teploty (60 °C) a v závislosti na velikosti elektrického napětí probíhá v řádu několika hodin (až 18 h). Pro lepší vizualizaci je gel obarvován, velmi často se používá barvivo SYBR Green. Jedná se o zelené fluorescenční barvivo s vysokou afinitou k dvouřetězové DNA, které se naváže mezi vlákna DNA a umožňuje tak vizualizaci. Vázané barvivo se adsorbuje při vlnové délce 497-520 nm. Stejně tak může být použit i ethidiumbromid (EtB), který má však silnější mutagenní účinky v porovnání se SYBR Green. Z tohoto důvodu je preferováno spíše použití barviva SYBR Green [52, 53, 54, 55].

5.4 Metody sekvenace DNA

V současné době existuje celá řada technik, které jsou využívány pro sekvenování DNA. Neustále dochází k jejich zdokonalování, aby vyhovovaly potřebám biotechnologií. Především je snaha vyvíjet techniky, které by byly vysoce citlivé, rychlé a aby množství potřebného vzorku bylo co možná nejnižší. Principem sekvenování je detekce separované DNA s následnou analýzou dat. Separace DNA probíhá pomocí elektroforézy. Nejběžnější metody detekce jsou založeny na principu fluorescence [56].

Nejstarší technikou je Maxam-Gilbertova metoda sekvenování, která je založena chemické degradaci jednotlivých typů bází. Čtyři vzorky radioaktivně zakončených fragmentů jsou štěpeny dle typů bází, přičemž jejich separace probíhá pomocí elektroforézy [56].

V současnosti je nejvíce používanou metodou Sangerovo sekvenování. Po denuraci DNA analyzovaného vzorku je jednovláknová DNA smíchána s DNA polymerázou, primery, deoxyribonukleotid trifosfáty všech čtyř bází a směs je rozdělena do čtyř zkumavek. Ke směsi je přidán do každé zkumavky vždy jeden typ dideoxynukleotid trifosfátu (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), které se náhodně začlení do syntetizovaného řetězce místo pří-

slušného deoxyribonukeotid trifosfátu. Separace fragmentů probíhá opět pomocí elektroforézy. Následná analýza zahrnuje značení fragmentů DNA fluorescenčními barvivy a po analýze kapilární elektroforézou je výsledkem sekvenogram [56, 57, 58].

5.4.1 Sekvenování druhé generace (NGS)

I přesto, že Sangerova metoda stále patří mezi nejpoužívanější techniky sekvenování DNA, v současnosti se často využívají i nově objevené metody tzv. sekvenování druhé generace (NGS – Next Generation Sequencing). Principem těchto metod je paralelní sekvenování milionů fragmentů DNA, což ve výsledku vede k získání velkého množství dat, které umožňují přesné nahlédnutí do určité variace DNA. Metoda NGS může být použita pro sekvenování specifických oblastí genu nebo i celých genomů. Sekvenování druhé generace má uplatnění například v klinické genetice při zkoumání genových mutací, v mikrobiologii, kde nahrazuje klasické kultivační metody pro charakterizaci mikroorganismů. V potravinářství je možno využít metod založených na analýze DNA pro zkoumání případného falšování potravin. Rovněž má své využití i v onkologii, jelikož se předpokládá, že rakovina je způsobena somaticky získanými mutacemi a jedná se tedy o onemocnění genomu. Hlavní nevýhodou NGS však zůstává zavedení požadované infrastruktury, zejména se jedná o kapacitu počítače a úložiště, a také potřeba kvalifikovaného personálu pro zpracování komplexní analýzy a interpretaci dat, což ve výsledku znamená, že NGS metoda je v porovnání se Sangerovou metodou nákladnější [59, 60, 61].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo zhodnotit růst a druhové zastoupení mikroflóry v modelových vzorcích sýru holandského typu od počátku výroby a během zrání za využití kultivačních metod a molekulárně-biologických metod.

Dílčí cíle práce zahrnovaly:

- sledování vývoje mikroflóry vně a uvnitř sýru
- zhodnocení, zda typ obalu ovlivňuje složení mikroflóry
- zhodnocení a porovnání mikrobiálního zastoupení s modelovými vzorky, u nichž byla použita odlišná startovací kultura.

7 KULTIVAČNÍ STANOVENÍ

Modelové vzorky byly odebírány v předem dané dny, přičemž kultivační stanovení bylo provedeno v den odběru. Modelové vzorky se lišily v závislosti na přidané kultuře a druhem zracího obalu. Kromě vzorků sýrů bylo v den výroby navíc provedeno kultivační stanovení mikroorganismů mléka (před pasterací a po pasteraci), které bylo použito pro výrobu, a provozního zákyasu. Vzorky určené pro izolaci DNA bylo možno zmrazit a uchovat při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, aby izolace DNA mohla být efektivněji provedena až při větším počtu vzorků.

7.1 Značení vzorků

Při kultivačním stanovení bylo použito jednoduché označení vzorků sýrů kódy, které byly odvozeny od použité kultury a druhu obalového materiálu (tab. 1). Jednotlivé misky byly navíc vždy označeny příslušným datem odběru a místem, z které části sýru byl vzorek odebrán (O – okraj, S – střed). Při izolaci DNA bylo použito značení čísla (tab. 2). Vzorky odeslané na sekvenaci byly rovněž označeny čísly, kdy každé číslo představovalo vyřezaný proužek DNA z gelu (obr. 6).

Tab. 1: Značení vzorků sýrů při kultivačním stanovení

Kód vzorku	Druh obalového materiálu	Kultura
KN	Plasticoat	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
PN		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
DN		<i>Lactobacillus casei</i>
KV	Potravinářský vosk	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
PV		<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
DV		<i>Lactobacillus casei</i>

- K – běžná zákysová kultura (kontrolní vzorek),
- P – kmen produkující biogenní aminy,
- D – kmen degradující biogenní aminy,
- N – obal Plasticoat,
- V – obal potravinářský vosk

Tab. 2: Příklad značení vzorků při izolaci DNA

Číslo vzorku	Kód vzorku	Odebraná část	Datum odběru
43	DVO	sýr okraj	3.6.
44	DVS	sýr střed	
45	KVO	sýr okraj	
46	KVS	sýr střed	
47	PVO	sýr okraj	
48	PVS	sýr střed	
49	KNO	sýr okraj	11.6.
50	KNS	sýr střed	
51	PNO	sýr okraj	
52	PNS	sýr střed	
53	DNO	sýr okraj	
54	DNS	sýr střed	

Zařízení a pomůcky:

- Váhy (KERN)
- Laboratorní sklo
- Mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO)
- Plastové sáčky
- Plynový kahan
- Stomacher Lab Blender 400 (Seward)
- Vortex-Genie 2 (QUIAGEN)
- Chemikálie: 70% etanol, sterilní destilovaná voda, sterilní fyziologický roztok

Použité kultivační půdy:

- Masopeptonový agar (MPA; HiMedia)) – celkový počet aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů (CPM)
- Slanetz-Bartley agar (SB; HiMedia) – stanovení enterokoků
- Endo agar (HiMedia) – stanovení enterobakterií
- M17 agar (Merck) – stanovení mléčných koků

- MRS agar (deMan-Rogosa-Sharpe agar; Merck) – stanovení laktobacilů (mléčných tyčinek)
- Agar s glukózou, kvasničným extraktem a chloramfenikolem (CHYGA; HiMedia) – stanovení kvasinek a plísní

Vzorky byly odebírány z vnější a středové části sýru. K 5 g odebraného vzorku bylo přidáno 45 ml sterilní destilované vody. Takto připravený vzorek v plastovém sáčku byl následně vložen do stomacheru a homogenizován po dobu 5 minut. Po vyjmutí z homogenizačního zařízení bylo pipetováno 500 μ l vzorku do zkumavek se 4500 μ l sterilního fyziologického roztoku. Obsah zkumavky byl důkladně promíchán na vortexu. Z připravené zkumavky bylo odebráno 500 μ l vzorku a opět přeneseno do další zkumavky s fyziologickým roztokem. Tímto postupem bylo provedeno tzv. desítkové ředění vzorků.

Na jednotlivé plotny s kultivační půdou bylo pipetováno vždy 100 μ l připravené suspenze o určitém ředění. Suspenze byla důkladně rozetřena sterilní hokejkou a ponechána uschnout. Kultivace probíhala dle typu kultivačního média:

- 24 h při teplotě 30 °C – CPM, mléčné koky,
- 24 h při teplotě 37 °C – enterobakterie, enterokoky
- anaerobní kultivace 48 h při teplotě 30 °C – mléčné tyčinky
- 5 dní při teplotě 25 °C – kvasinky a plísně

Po kultivaci byl spočítán nárůst jednotlivých kolonií.

8 IZOLACE DNA

Izolace DNA z modelových vzorků byla provedena za využití komerčního kitu PowerFood Microbial DNA Isolation Kit (Quiagen), který je speciálně určen pro izolaci mikrobiální DNA z potravin. Využití komerčního kitu je efektivní z hlediska poskytování dostatečné koncentrace a čistoty DNA.

8.1 Příprava vzorků pro izolaci DNA

Zařízení a pomůcky:

- Váhy (KERN)
- Laboratorní sklo
- Mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO)
- Plastové sáčky
- Plynový kahan
- Stomacher Lab Blender 400 (Seward)
- Vortex-Genie 2 (QUIAGEN)
- Centrifuga Hermle Z 300 K (Biotech)
- Chemikálie: 70% etanol, sterilní destilovaná voda

Modelové vzorky byly opět odebírány z vnější a středové části sýru. K 5 g vzorku bylo přidáno 15 ml sterilní destilované vody a celý obsah byl homogenizován po dobu 5 minut. Homogenizovaná suspenze byla přefiltrována přes sterilní gázu do 15ml plastových zkumavek. Zkumavky s připravenou suspenzí byly centrifugovány 20 minut při teplotě 4 °C. Vzniklý supernatant byl postupně odpipetován a sediment byl následně použit pro izolaci mikrobiální DNA.

8.2 Izolace DNA

Zařízení a pomůcky:

- PowerFood Microbial DNA Isolation Kit (QUIAGEN)
- Mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO)
- Vortex-Genie 2 (QUIAGEN)
- Vortex V-1 plus (Biosan)
- Termostat blokový Bio TDB-100 (Biosan)

- Centrifuga minispin plus (Eppendorf)
- Ostatní jednorázové plastové a ochranné pomůcky

Postup při izolaci DNA byl proveden na základě přiloženého návodu od výrobce komerčního kitu:

1. K získanému buněčnému sedimentu po centrifugaci v kapitole 8.1 bylo přidáno 450 μ l roztoku PF1 (lyzační roztok). Před použitím byl roztok zahřát na teplotu 55 °C, aby nedošlo k jeho vysrážení. Za účelem lepšího rozpouštění byly zkumavky s lyzačním činidlem promíchány na vortexu.
2. Resuspendované buňky byly přemístěny do rozbíjecích zkumavek. Zkumavky byly umístěny do vortexového adaptéru do horizontální polohy a intenzivně promíchávány při nejvyšší rychlosti po dobu 10 min.
3. Obsah rozbíjecích zkumavek byl centrifugován 1 min při 14 500 RPM (revolutions per minute - počet otáček za minutu). Při tomto kroku jsou rozbité buňky shromažďovány po stranách zkumavky, zatímco DNA zůstává v supernatantu. Supernatant byl poté přenesen do čisté 2ml zkumavky.
4. K supernatantu bylo přidáno 100 μ l roztoku PF2, který slouží k odstranění organických a anorganických sloučenin a zbytků buněk. Směs byla krátce promíchána na vortexu a následně inkubována 5 min při teplotě 4 °C.
5. Poté byla směs centrifugována 1 min při 14 500 RPM.
6. Supernatant obsahující DNA byl přenesen do čisté 2ml zkumavky. K supernatantu bylo přidáno 900 μ l roztoku PF3. Směs byla krátce promíchána na vortexu. 600 μ l směsi ve zkumavce bylo přeneseno do kolonky a centrifugováno 1 min při 14 500 RPM. Přefiltrovaná tekutina byla vylita. Tento krok bylo podle návodu přiloženého výrobcem nutno rozdělit na 3 fáze.
7. Kolonka se zachycenou DNA byla přemístěna do čisté 2ml zkumavky a naplněna 650 μ l promývacího roztoku PF4. Vzorky centrifugovány po dobu 1 min.
8. Do kolonky bylo přidáno 650 μ l promývacího roztoku PF5. Obsah byl opět centrifugován (1 min, 14 500 RPM), aby došlo k odstranění zbytků roztoku PF4 z membrány.
9. Přefiltrovaná tekutina byla ze zkumavky vylita a kolonka byla opět centrifugována, po dobu 2 min při 14 500 RPM za účelem odstranění roztoku PF5.
10. Kolonka byla přenesena do čisté 2ml zkumavky. Do kolonky bylo přidáno 30 μ l roztoku PF6 (eluční pufr). Před samotnou centrifugací byla kolonka ponechána

10 min při pokojové teplotě, z důvodu lepšího uvolnění DNA z membrány do pufru.

11. Kolonka byla centrifugována po dobu 1 min při 14 500 RPM a následně byla ze zkumavky vyjmuta.

Množství DNA bylo změřeno pomocí fluorimetrické spektroskopie.

8.3 Měření koncentrace DNA

Zařízení a pomůcky:

- Mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO)
- QFX fluorimetr (DeNovix)
- AccuGreen High Sensitivity dsDNA kit (Biotium)

Na základě množství vzorků byla připravena směs pufru a fluorescenčního barviva (množství pro jeden vzorek: 200 μ l pufru a 1 μ l barviva). Připravená směs byla napipetována do malých zkumavek v množství 190 μ l. Ke směsi bylo přidáno 10 μ l DNA. Princip měření DNA fluorimetrickou metodou spočívá v excitaci a emisi použitého fluoroforu. Fluorofor je detekován pomocí přístroje, který je vybaven filtry pro detekci zelené fluorescence [62].

9 METODA PCR-DGGE

Polymerázová řetězová reakce se provádí z důvodu namnožení konkrétního úseku ohraničeného specifickými primery za účelem získání vyšší koncentrace DNA. Princip polymerázové řetězové reakce byl podrobněji popsán v kapitole 5. 2. Byly provedeny 2 amplifikační kroky, které se odlišovaly počtem cyklů a druhem použitých primerů (viz dále). Po dvou amplifikačních krocích následovala denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE), jejíž princip je podrobněji popsán v kapitole 5. 3.

9.1 Polymerázová řetězová reakce

Zařízení a pomůcky:

- PCR box AURA PCRTM (BIOAIR)
- Vortex V-1 plus (Biosan)
- Termocykler AerisTM (ESCO)
- Mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO)
- Ostatní jednorázové plastové a ochranné pomůcky
- Chemikálie: sterilní destilovaná voda pro PCR, GoTaq Hot Start Green MasterMix (Promega), primery (FD1, RD1, 341F-GC, 907R)

9.1.1 1. amplifikační krok

První amplifikační krok slouží především ke zmnožení úseku 16S rDNA. Celkový objem reakční směsi byl 20 μ l. Reakční směs (tab. 3) byla napipetována do sterilních PCR stripů. Jeden PCR strip je složen z 8 mikrozkušavek s víčky. Do každé mikrozkušavky byl k reakční směsi přidán 1 μ l izolované DNA. PCR stripy byly poté vloženy do termocykleru. Podle druhů přidávaných primerů byl nastaven teplotní a časový profil PCR reakce (tab. 4). Po skončení reakce byly produkty použity ve 2. amplifikačním kroku.

Tab. 3: Složení reakční směsi pro 1. amplifikační krok

Složky	Množství pro 1 reakci [μ l]
Sterilní destilovaná voda	7
Master mix	10
Primer FD1	1
Primer RD1	1
DNA	1

Tab. 4: Teplotní a časový profil první reakce

Fáze PCR	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas [s]	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	120	1
Denaturace	95	30	9
Nasedání primeru (annealing) FD1	60	30	
Elongace	72	90	
Denaturace	95	30	24
Nasedání primeru (annealing) RD1	56	30	
Elongace	72	90	
Závěrečná extenze	72	600	1

9.1.2 2. amplifikační krok

Druhý amplifikační krok slouží opět k dalšímu zmnožení úseku 16S rDNA. Jsou však využívány jiné primery, jelikož poté následuje separace DNA pomocí techniky DGGE. Pro lepší vizualizaci gelu po DGGE jsou využívány primery, obsahující tzv. G-C svorku. G-C svorka je úsek bohatý na G-C páry (tab. 7), který denaturuje pomaleji, což ve výsledku způsobí ostřejší a lépe viditelné proužky při vizualizaci gelu (viz kapitola 5.3). Celkový objem reakční směsi pro druhý amplifikační krok byl 30 μ l. Složení reakční směsi je uvedeno v tab. 5, teplotní a časový profil PCR reakce je uveden v tab. 6.

Tab. 5: Složení reakční směsi pro druhý amplifikační krok

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

Tab. 6: Teplotní a časový profil druhé reakce

Fáze PCR	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	120	1
Denaturace	95	30	35
Nasedání primeru (annealing)	60	30	
Elongace	72	60	
Závěrečná extenze	72	600	1

Tab. 7: Sekvence použitých primerů

Primer	Pořadí bází
FD1	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' [63]
RD1	5' AAGGAGGTGATCCAGCC 3' [63]
341F-GC	5' (GC-svorka)CCTACGGGAGGCAGCAG 3' [64]
G-C svorka	CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG [64]
907R	5' CCGTCAATTCMTTTRAGTTT 3' [65]

9.2 Denaturační gradientová gelová elektroforéza

9.2.1 Sestavení aparatury pro DGGE

Zařízení a pomůcky:

- DGGE set skleněných desek (C. B. S. Scientific Company)
- Gumové těsnění pro DGGE (C. B. S. Scientific Company)

- Svorky, spacers, vertikální hřebínky pro DGGE (C. B. S. Scientific Company)
- Kazeta pro DGGE z plexiskla (C. B. S. Scientific Company)

Postup pro sestavení aparatury pro DGGE byl následující:

1. Skleněné desky byly před použitím důkladně omyty etanolem a vyleštěny.
2. Po obvodu zaobleného skla bylo nataženo těsnění do tvaru písmene U. Sklo bylo poté položeno na laboratorní stůl trubkovitou částí těsnění nahoru.
3. U vnitřních okrajů těsnění byly umístěny spacers (oddělovače), které zajišťovaly vytvoření prostoru mezi skleněnými deskami.
4. Na sklo s těsněním bylo položeno silnější sklo s výřezem. Skla byla po obvodu zajištěna klipsy. Takto sestavená aparatura byla postavena do vertikální polohy.

9.2.2 Příprava gelu

Zařízení a pomůcky:

- Analytické váhy ADVENTURER Pro d=0,0001 g (OHAUS)
- Mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO)
- 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 jednorázové plastové a ochranné pomůcky
- Chemikálie: sterilní destilovaná voda, 70% ethanol, 40% bis-akrylamid, amonium persulfát, močovina, formamid, tetramethylethylendiamin

Pro přípravu gelu byly použity denaturační roztoky, obsahující akrylamid (Sigma-Aldrich/Merck), formamid (Sigma/Aldrich/Merck) a močovinu (Sigma-Aldrich/Merck). Tyto roztoky byly připraveny v 30% a 70% koncentraci (tab. 8).

1. Před přípravou gelu byly marker gradientu, spojovací hadička a jehla důkladně promyty destilovanou vodou. Po promytí byly oba ventily markeru gradientu uzavřeny a jehla byla umístěna mezi skla aparatury pro přípravu gelu.
2. Do 50ml plastové zkumavky bylo odměřeno 15 ml 30% denaturačního roztoku. Stejně množství 70% denaturačního roztoku bylo odměřeno i do druhé zkumavky.

3. Následně bylo do každé zkumavky přidáno 104,4 μ l 10% roztoku APS (persíran amonný – amonium persulfát; Sigma-Aldrich/Merck) a 6,5 μ l TEMED (tetramethylethylendiamin; Sigma-Aldrich/Merck). Zkumavky byly důkladně promíchány.
4. Do levé části markeru gradientu byla nalita směs obsahující 30% denaturační roztok a do pravé části byla nalita směs obsahující 70% denaturační roztok.
5. Bylo zapnuto magnetické míchání a zároveň mini-peristaltická pumpa. Oba ventily byly současně otevřeny.
6. Po naplnění prostoru mezi skly byl do aparatury zasazen hřebínek s 22 zuby.
7. Polymerace gelu trvala při pokojové teplotě přibližně 1 hodinu.

Tab. 8: Složení denaturačních roztoků

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

9.2.3 Průběh elektroforézy

1. Elektroforetický tank obsahující 1% TAE pufr (Tris-acetát-EDTA; Sigma-Aldrich/Merck) byl vytemperován na teplotu 60 °C.
2. Z připraveného gelu byl opatrně vyjmut hřebínek. Rovněž byly odstraněny i svorky a těsnění na spodní hraně desek bylo uvolněno.
3. Skleněné desky s gelem byly výřezem dovnitř přiloženy ke kazetě z plexiskla a zajištěny svorkami.
4. Kazeta byla ponořena do tanku s pufrům. Ke kazetě byla připojena hadička, která zajišťovala protékání pufru vytvořeným prostorem mezi sklem a kazetou.
5. Jamky byly důkladně vymyty pufrům s pomocí pipety, aby došlo k odstranění zbytků nezpolymerovaného roztoku.
6. Do jamek bylo následně nanášeno 8 μ l PCR produktu, přičemž do první a poslední jamky bylo nanášeno 6 μ l markeru Gene Ruler 100bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).
7. Elektroforéza probíhala při napětí 90 V po dobu 999 minut.

9.2.4 Barvení a vizualizace gelu

Zařízení a pomůcky:

- Třepačka Titramax 100 (Heidolph)
 - Mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO)
 - UVP Visi-Blue transiluminátor (Analytik Jena)
 - Chemikálie: 1% TAE pufr, barvivo SYBR Green (ThermoFisher Scientific)
1. Barvení gelu po elektroforéze probíhalo v barvicí lázni, která byla připravena odměřením 400 ml 1% TAE pufru. K pufru bylo přidáno 40 μ l fluorescenčního barviva SYBR Green (ThermoFisher Scientific).
 2. Kazeta se skleněnými deskami byla vyjmuta z tanku. Po odstranění těsnění a spacerů byla skla od sebe opatrně oddělena, aby nedošlo k poškození gelu. Zároveň byl celý proces prováděn tak, aby gel zůstal na silnějším skle s výřezem.
 3. Skleněná deska s gelem byla vložena do barvicí lázně a celá nádoba byla překryta hliníkovou fólií.
 4. Barvení probíhalo 30 minut při mírném protřepávání lázně na třepačce, aby došlo k důkladnému obarvení gelu.
 5. Obarvený gel byl přenesen ze skla na transiluminátor a prosvícen modrým světlem. Pomocí programu GeneSnap byla pořízena fotografie osvětleného gelu.

9.2.5 Purifikace, sekvenace DNA a identifikace mikroorganismů

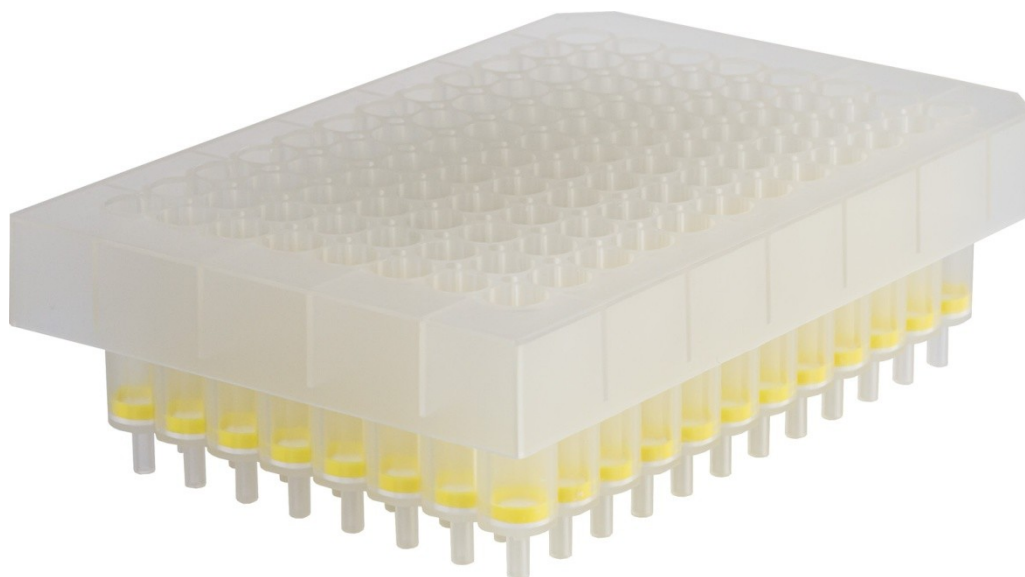
Vybrané úseky DNA (proužky; bandy) byly po vizualizaci z gelu vyříznuty skalpelem a vloženy do 1,5ml sterilních eppendorfových mikrozkušavek se skleněnými kuličkami. Následně bylo do zkumavek přidáno 200 μ l destilované vody určené pro PCR a obsah zkumavek byl míchán na vortexu v horizontální poloze po dobu 30 minut. Vzorky byly poté ponechány 24 h při teplotě 4 °C, aby došlo k difuzi DNA z gelu do vodného prostředí.

Následně byla provedena PCR, kdy složení reakční směsi bylo obdobné jako v druhém amplifikačním kroku (viz tab. 5). Rozdíl byl pouze v použitém primeru, kdy namísto 341F-GC byl použit primer 341F. Teplotní a časový profil PCR reakce byl rovněž stejný jako v druhém amplifikačním kroku (viz tab. 6).

Purifikace byla provedena za pomoci kitu NucleoMag 96 PCR (Macherey-Nagel), který využívá principu reverzibilní adsorpce nukleové kyseliny na paramagnetické kuličky obsažené ve speciálním pufru.

Postup purifikace DNA (PCR produktu) byl následující:

1. Jelikož byl objem PCR produktu 30 μl , dle návodu bylo nutno navýšit objem na 50 μl . Ke každému PCR produktu bylo přidáno 20 μl sterilní destilované vody určené pro PCR reakce. Takto připravená směs byla napipetována do speciální magnetické destičky (obr. 2)
2. Následně bylo ke každému PCR produktu v magnetické destičce přidáno 150 μl roztoku, který byl připraven smícháním 138 μl vazebného pufru MP1 a 12 μl roztoku NucleoMag P-Beads, který obsahoval paramagnetické kuličky. Destička se směsí byla poté míchána na třepačce po dobu 5 min.
3. Po promíchání byla destička položena na magnetický separátor (obr. 3) po dobu 2 minut. Supernatant byl odstraněn.
4. Destička byla sejmuta z magnetického separátoru a sediment byl promyt 300 μl roztoku MP2. Směs byla promíchána pomocí pipety a destička byla opět vložena na magnetický separátor na dobu 2 min. Po separaci byl supernatant odstraněn.
5. Následovalo promytí 300 μl roztoku MP3, kdy směs byla opět míchána za pomoci pipety a magneticky separována po dobu 2 minut. Po separaci byl vždy odstraněn supernatant. Tento krok byl opakován celkem 2x.
6. Sediment na dně destičky byl poté důkladně vysušen při teplotě 55 $^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut.
7. K vysušenému sedimentu bylo přidáno 50 μl roztoku MP4, směs byla promíchána pomocí pipety a inkubována 5 minut při pokojové teplotě. Následovala magnetická separace po dobu 2 minut a přenesení supernatantu do eluční destičky.
8. Takto připravené vzorky byly přeneseny do mikrozkušavek s příslušným označením vzorku. Vzorky bylo možno krátkodobě uchovat při teplotě 4 $^{\circ}\text{C}$, než byly odeslány na sekvenaci. Sekvence byla provedena společností SEQme s.r.o.



Obr. 2: Magnetická destička [66]



Obr 3: Magnetický separátor [67]

Obdržené výsledky ze sekvenace bylo nejprve nutno opravit v programu GATCViewer. Oprava byla provedena na základě kontroly chromatogramu, kdy byly doplněny chybějící nukleotidy, popřípadě byly některé nukleotidy nahrazeny. Následně byly zjištěné nukleotidové sekvence porovnávány se známými sekvencemi bakterií v databázi BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Tato databáze je založena na principu vyhledávání nejvíce podobných sekvencí bakterií k zadané sekvenci DNA. Program vypíše jednotlivé druhy bakterií s nejvíce podobnou sekvencí včetně spolehlivosti identifikace. Ideální spolehlivost identifikace se pohybuje v rozmezí 96-99 %.

Výsledky vzorků analyzovaných metodou NGS byly zpracovány společností SEQme s.r.o.

10 VÝSLEDKY A DISKUZE

10.1 Kultivační stanovení

Bylo použito celkem 6 druhů kultivačních pūd. Kultivační stanovení bylo použito jako referenční ukazatel, kdy byla sledována přítomnost indikátorových mikroorganismů za využití selektivně-diagnostických pūd. V případě významných rozdílů byla vypočítána hodnota KTJ ml⁻¹ (počet kolonií tvořících jednotek na 1 ml vzorku):

$$\frac{\text{průměrný počet kolonií}}{\text{hodnota ředění}} \times 10 = \text{KTJ ml}^{-1}$$

Pūda MPA (masopeptonový agar) je univerzální kultivační médium, které je využíváno ke stanovení celkového počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů. Je vhodné spíše pro růst nenáročných, respektive méně náročných, bakterií. Již od počátku bylo možno na této pūdě pozorovat velký nárůst bakterií, který se s postupem zrání příliš neměnil. Je to pravděpodobně dáno tím, že během zrání se celkový počet mikroorganismů nesnižuje, pouze se mění jejich druhové zastoupení. Z tohoto důvodu byly využity právě selektivně-diagnostické pūdy. Významné rozdíly v počtu mikroorganismů mezi jednotlivými druhy obalů nebyly zaznamenány. Rovněž nebyly pozorovány významné rozdíly v počtu mikroorganismů v případě odběrů z okraje nebo středu. Celkový počet mikroorganismů byl určován i u surovin použitých pro výrobu, tedy u mléka před záhřevem a po záhřevu. Celkový počet mikroorganismů v nepasterizovaném mléce by neměl překročit 10⁵ KTJ ml⁻¹. V případě překročení této hodnoty se může jednat o nežádoucí zdravotní stav zvířete, od kterého bylo mléko získáno, popřípadě o nesprávnou sanitaci prostředí a použitých zařízení. Počet mikroorganismů v nepasterizovaném mléce byl cca 3,8.10⁴ KTJ ml⁻¹.

CHYGA agar (Chloramphenicol Yeast Glucose Agar) je selektivně-diagnostická pūda, využívaná pro zjištění přítomnosti a počtu kvasinek, popřípadě plísni, v mléčných produktech. Přítomnost kvasinek a plísni byla zaznamenána u vzorků mléka, které bylo použito pro výrobu. V případě nepasterizovaného mléka byla vypočítána průměrná hodnota kolonií tvořících jednotek 1,9.10² KTJ ml⁻¹. U pasterizovaného mléka byl počet kolonií v průměru 45 KTJ ml⁻¹. Nepasterizované mléko obsahuje velmi různorodou mikroflóru, které zahrnuje bakterie, kvasinky i plísně. Po pasteraci dochází k významné, ne však úplné, redukci

počtu mikroorganismů [1]. Kvasinky a plísně mohou být v nepasterizovaném mléce přítomny. Jedná se pravděpodobně o kontaminanty z vnějšího zpracovatelského prostředí. Po tepelném záhřevu nemusí být zcela inhibovány z důvodu možné tvorby spor, které jsou tepelně rezistentní [68]. U modelových vzorků nebyla zaznamenána přítomnost kvasinek ani plísní. Zdůvodněním by mohl být fakt, že již v raných fázích zrání dochází k rychlému snižování pH sýru díky rychlému pomnožení startovacích kultur, které produkují kyselinu mléčnou. Nízké pH může zpomalovat růst plísní, které potřebují delší dobu pro svůj růst než bakterie. Dalším faktorem, který může ovlivnit růst plísní je i přítomnost obalového materiálu, který zabraňuje přístupu vzduchu (kyslíku) a omezuje kontaminaci povrchu sýru plísněmi.

Pro zjištění přítomnosti a počtu enterobakterií je využívána půda Endo. Jeho selektivita je vytvořena kombinací siřičitanu a bazického fuchsínu, které potlačují růst gram-pozitivních bakterií. U nepasterizovaného mléka byl zjištěn počet mikroorganismů cca 100 KTJ ml⁻¹. U pasterizovaného mléka nebyla zjištěna přítomnost koliformních bakterií. Koliformní bakterie zpravidla nepřežívají pasterační záhřev. Tudíž jejich případná přítomnost ve výsledném výrobku je spíše důsledkem sekundární kontaminace způsobené nesprávnou manipulací při výrobě. U žádného z modelových vzorků sýrů nebyla zjištěna přítomnost koliformních mikroorganismů během zrání.

Pro stanovení přítomnosti bakterií rodu *Enterococcus* byl využit Slanetz-Bartley agar. Enterokoky jsou bakterie nenáročné na kultivaci v porovnání s jinými bakteriemi, jsou tedy schopny růst na této selektivně-diagnostické půdě. V nepasterizovaném mléce byla zjištěna přítomnost enterokoků v množství cca 500 KTJ ml⁻¹. U pasterizovaného mléka byl počet enterokoků cca 100 KTJ ml⁻¹. Přítomnost enterokoků byla zaznamenána i při kultivaci vzorků provozních zákysů. V malém množství byl zaznamenán růst enterokoků u modelových vzorků během celé doby zrání. Enterokoky obecně patří mezi mikroorganismy, které jsou poměrně rezistentní vůči vysokým teplotám. Rovněž dobře rostou v přítomnosti NaCl. Jedná se o přirozenou mikroflóru trávicího traktu zvířat i člověka, mohou se však nacházet i v půdě, vodě a na rostlinách [69]. Jejich četná přítomnost může poukazovat na možné fekální znečištění, avšak v řadě mléčných výrobků mohou mít technologický význam [1].

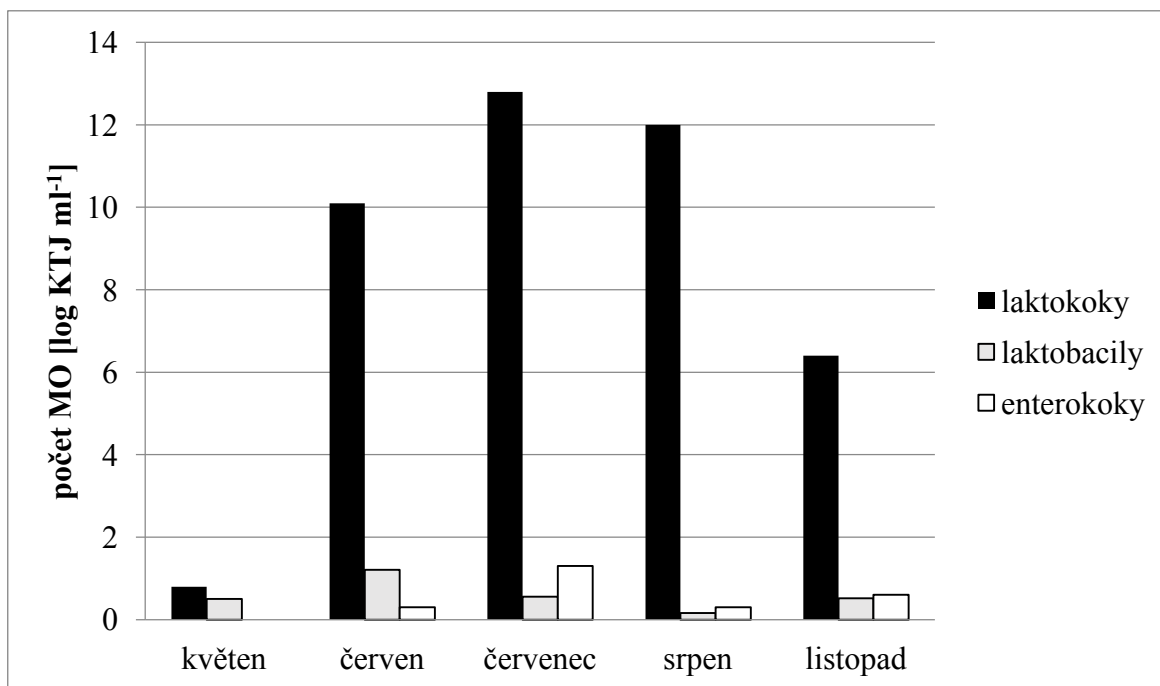
Půda M17 je využívána pro detekci bakterií rodu *Lactococcus*, případně dalších mléčných koků. Obsahuje glycerofosfát disodný, který inhibuje růst většiny druhů laktobacilů [70]. V nepasterizovaném mléce byl počet laktokoků cca 1,1.10⁴ KTJ ml⁻¹. V pasterizovaném

mléce byl naopak počet těchto bakterií ve srovnání s nepasterizovaným mlékem poměrně nízký, přibližně 700 KTJ ml^{-1} . Značné množství bakterií rodu *Lactococcus* bylo zaznamenáno v provozních zákysech, kde *Lactococcus* byl použit jako startovací kultura, jednalo se konkrétně o zákysy pro sýry s kódem K a P. V provozním zákyse použitém pro výrobu sýrů s kódem D byly laktokoky rovněž přítomny, avšak v nižším počtu. Během zrání jednotlivých modelových vzorků sýrů bylo možno pozorovat poměrně rychlý nárůst bakterií rodu *Lactococcus*. Nejvyšší počet mikroorganismů byl u všech modelových vzorků zaznamenán po dvou měsících zrání. Poté se počet těchto mikroorganismů pozvolna snižoval (obr. 4, obr. 5). Jak poukazuje obr. 1 v kapitole 2.3, je předpokladem, že počty primárních startovacích kultur se po určité době zrání snižují na úkor růstu non-starterových mikroorganismů. Je to dáno především dostupností substrátu, v případě primárních kultur se jedná o laktózu [1] (viz kapitola 4.3.1).

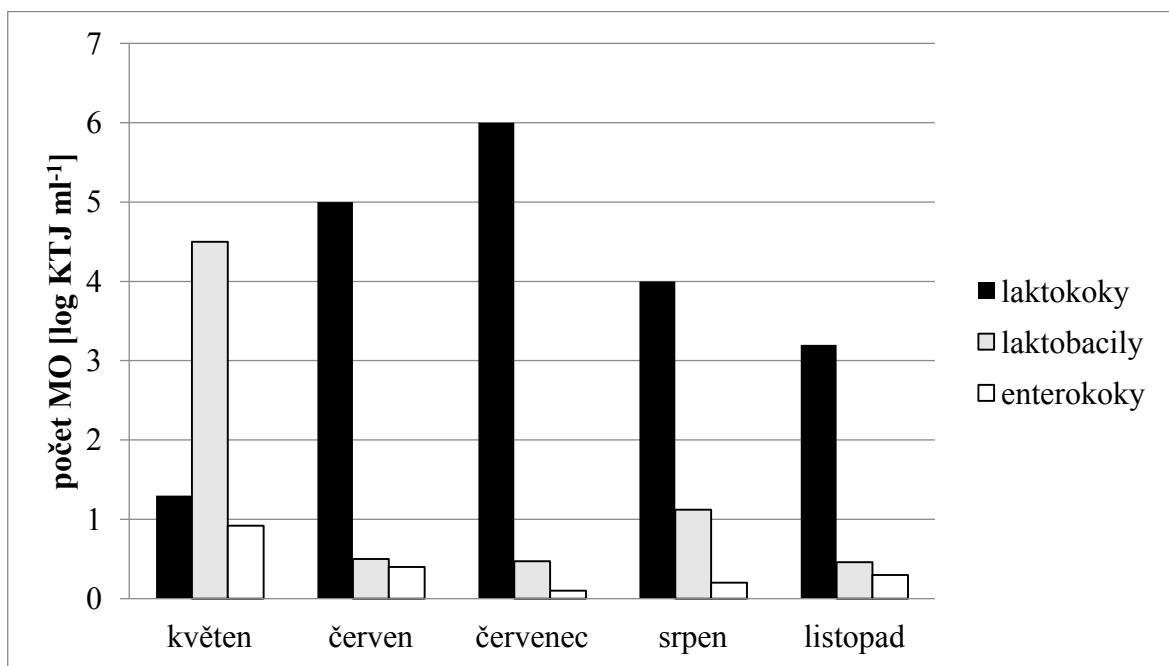
MRS agar je využíván pro kultivaci bakterií rodu *Lactobacillus*. Jeho selektivitu zajišťuje přítomnost acetátu sodného. Nepasterizované mléko produkované za hygienických podmínek může obsahovat až 10^2 KTJ ml^{-1} laktobacilů [71]. V tomto případě byl počet mikroorganismů 190 KTJ ml^{-1} , což přibližně odpovídá hodnotě v uvedené studii. Většina laktobacilů je inaktivována tepelným záhřevem, avšak některé kmeny mohou pasterační záhřev přežít. U vzorků pasterizovaného mléka však nebyla zaznamenána přítomnost laktobacilů. Výskyt laktobacilů byl zaznamenán u provozního zákyse pro výrobu sýrů s kódem D, kdy *Lactobacillus casei* byl použit jako startovací kultura. Výraznější nárůst bylo možno pozorovat rovněž po dvou měsících zrání. Především u vzorků s kódy P a D (kultury s přidavkem producenta biogenních aminů - P a degradéra biogenních aminů - D), u kterých byl použit jako obalový materiál potravinářský vosk. Stejně rozdíly v růstu laktobacilů byly u vzorků s kódy P a D zaznamenány i v následujících měsících zrání. Modelové vzorky balené potravinářským voskem vykazovaly vyšší nárůst laktobacilů, než vzorky balené materiálem Plasticoat, u kterých byl naopak zaznamenán vyšší nárůst laktokoků (obr. 4, obr. 5). Jelikož laktobacily jsou fakultativně anaerobní, popřípadě i mikroaerofilní mikroorganismy, potřebují pro svůj metabolismus pouze minimální množství kyslíku a malé množství oxidu uhličitého (2 – 10 %) [72], lze předpokládat, že v sýrech balených materiálem nepropustným pro kyslík (vosk) mohou růst a množit se. Rozdílný růst laktobacilů a laktokoků při použití různých obalových materiálů by tak mohl poukazovat na různou propustnost materiálu pro plyny. Laktokoky jsou obecně řazeny mezi fakultativně anaerobní mikroorganismy. To znamená, že mohou růst i bez přítomnosti kyslíku, avšak

aerobní metabolismus umožňuje vyšší zisk ATP [68]. Dalo by se tedy předpokládat, že při vyšším množství kyslíku (obalový materiál Plasticoat) porostou rychleji laktokoky než laktobacily. U modelových vzorků s kódem K nebyl pozorován tak výrazný nárůst laktobacilů jako u vzorků P a D.

Jak je patrné na obr. 4 a 5, obecně laktokoky rostou výrazně rychleji než laktobacily. Laktokoky tedy vykazovaly nejvyšší počty KTJ ml⁻¹ během celé doby zrání.



Obr. 4: Graf vývoje mikroflóry u sýrů s kulturou *L. lactis* subsp. *cremoris* (obal Plasticoat)



Obr. 5: Graf vývoje mikroflóry u sýru s kulturou *Lb. casei* (obal Plasticoat)

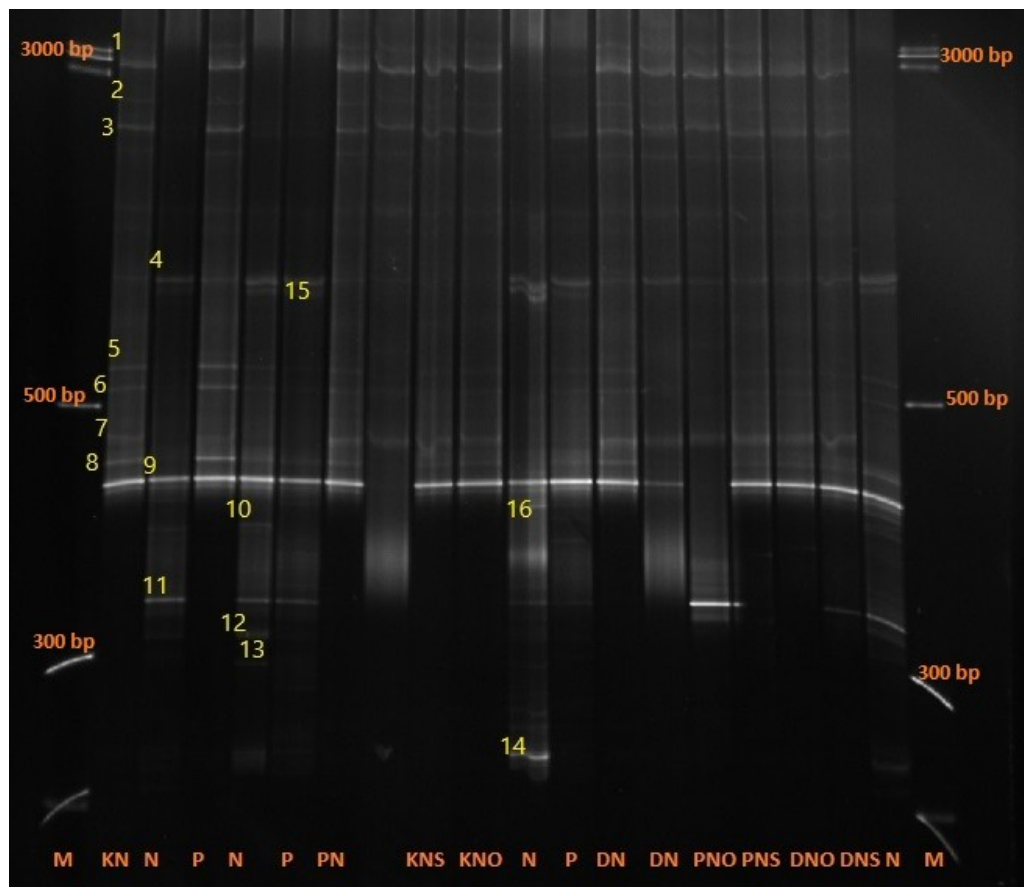
10.2 Identifikace mikroorganismů za využití molekulárně-biologických metod

Ve všech fázích zrání modelových vzorků sýrů byla prokázána poměrně značná variabilita mikroorganismů. Zatímco v raných fázích zrání byly nalezeny především mléčné bakterie, které byly použity jako startovací kultury, u pozdějších odběrů se podařilo identifikovat i zástupce non-starterových mikroorganismů.

Velká rozmanitost mikroflóry byla pozorována u nepasterizovaného mléka, kde se podařilo identifikovat mikroorganismy *Brevibacillus brevis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus paracasei* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. U pasterizovaného mléka byl identifikován především *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Brevibacillus brevis*, *Streptococcus thermophilus* a ojediněle i *Enterococcus faecium*. Právě *Brevibacillus brevis* byl nalezen u pasterizovaného mléka a dále pak i u sýrů s kódem P (startovací kultura *L. lactis* subsp. *cremoris*) a D (startovací kultura *Lb. casei*). Výskyt tohoto mikroorganismu u sýrů šarže D rovněž prokázala metoda NGS (viz obr. 7 a 8). *Brevibacillus brevis* je sporotvorná bakterie běžně se vyskytující ve vodě nebo v půdě. Právě díky tvorbě spor, které jsou obecně termorezistentní [68], byl jeho výskyt prokázán u tepelně ošetřeného mléka a následně i u modelových vzorků sýrů během celé doby zrání. Stejně tak byl ze všech modelových vzorků sýrů, včetně mléka, izolován i *Enterococcus faecium*, který sice netvoří spory, avšak enterokoky

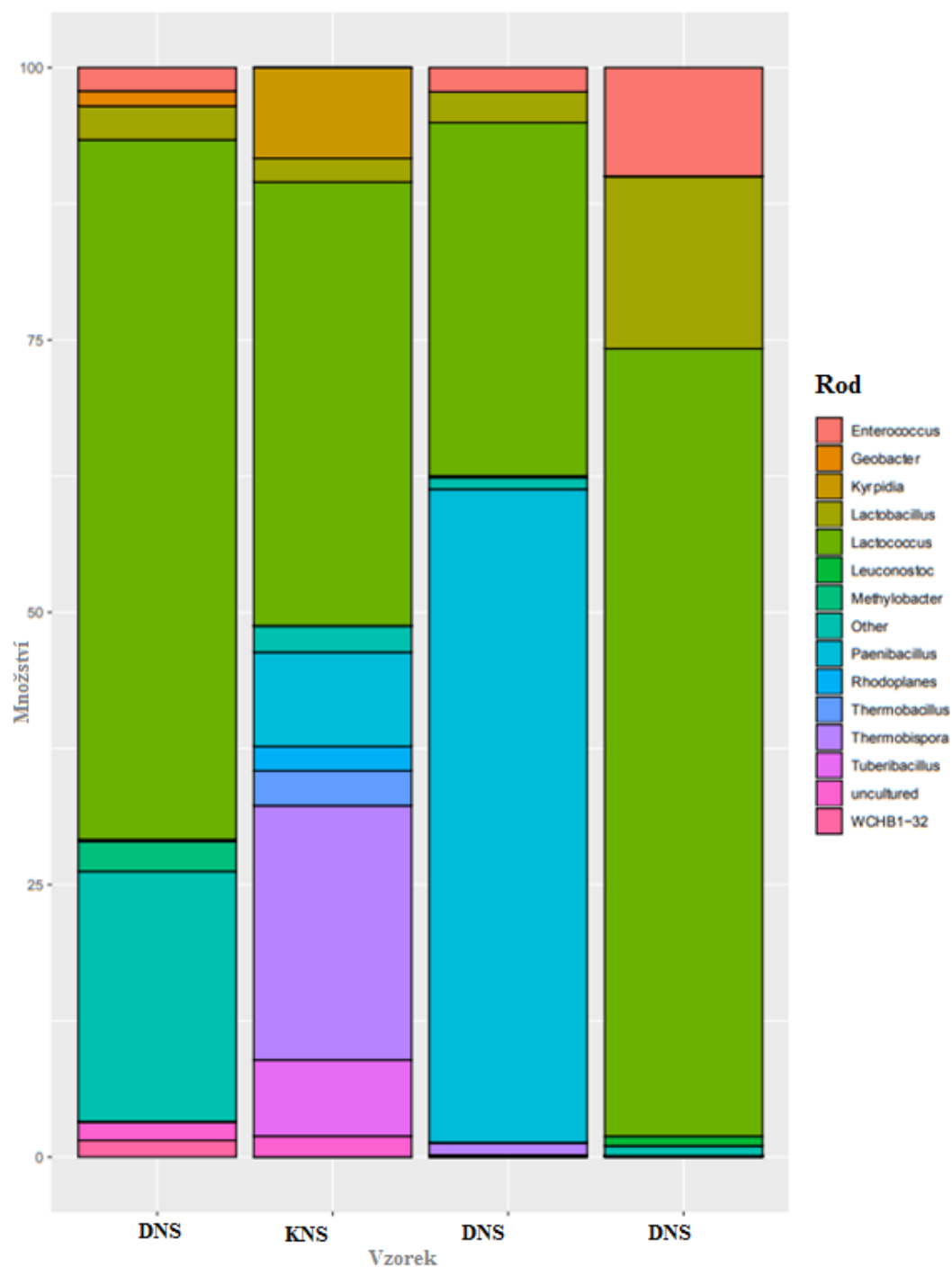
obecně patří mezi poměrně odolné mikroorganismy, které mohou přežít pasterizační teploty [73]. *Lactobacillus paracasei* byl izolován společně s *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus casei* z modelových vzorků sýrů D, kde *Lactobacillus casei* byl použit jako startovací kultura. Zatímco *Lactobacillus casei* bylo možno nalézt ve vzorcích již na počátku zrání, *Lactobacillus paracasei* a *Lactobacillus fermentum* byly z modelových vzorků izolovány přibližně po dvou měsících zrání. Avšak *Lb. casei* a *Lb. paracasei* vykazují vzájemnou podobnost sekvencí, tudíž genová analýza, založená na sledování ribozomu 16S, nemusí být v tomto ohledu zcela spolehlivá a je zde možná záměna těchto mikroorganismů [74]. Enterokoky a laktobacily patří mezi významné zástupce non-starterových mikroorganismů, jejichž výskyt se s postupem doby zrání pozvolna zvyšuje na úkor primárních starterových mikroorganismů [18]. Dominantní mikroorganismus u všech modelových vzorků sýrů po celou dobu zrání byl *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Výskyt většiny výše uvedených mikroorganismů byl rovněž prokázán ve studii zaměřené na sledování mikrobiální diverzity mléčných bakterií v sýrech holandského typu, kde byly navíc izolovány i druhy jako *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* nebo *Lb. curvatus* [40].

U metody NGS lze z následujících obrázků vyvodit, jak se měnilo zastoupení mikroorganismů v průběhu zrání. Na obrázcích 7 a 8 se nachází vzorky, kdy doba zrání nepřekračuje 2 měsíce. U těchto vzorků byla pozorována poměrně značná rozmanitost. Byli zde prokázáni především zástupci rodů *Lactococcus*, *Paenibacillus*, *Lactobacillus* a *Enterococcus* (obr. 7). Obrázek 9 zobrazuje zástupce identifikovaných rodů u vzorků, kdy doba zrání byla delší než 2 měsíce. Zde byli identifikováni zástupci rodů *Lactococcus* a *Lactobacillus*. V porovnání obrázkem 7 zde nebyla tak významná rodová rozmanitost, jelikož přibližně po dvou měsících zrání se v sýru nachází především zástupci mléčných bakterií, které mají díky optimálním podmínkám a dostatku živin optimální podmínky pro rozmnožování.



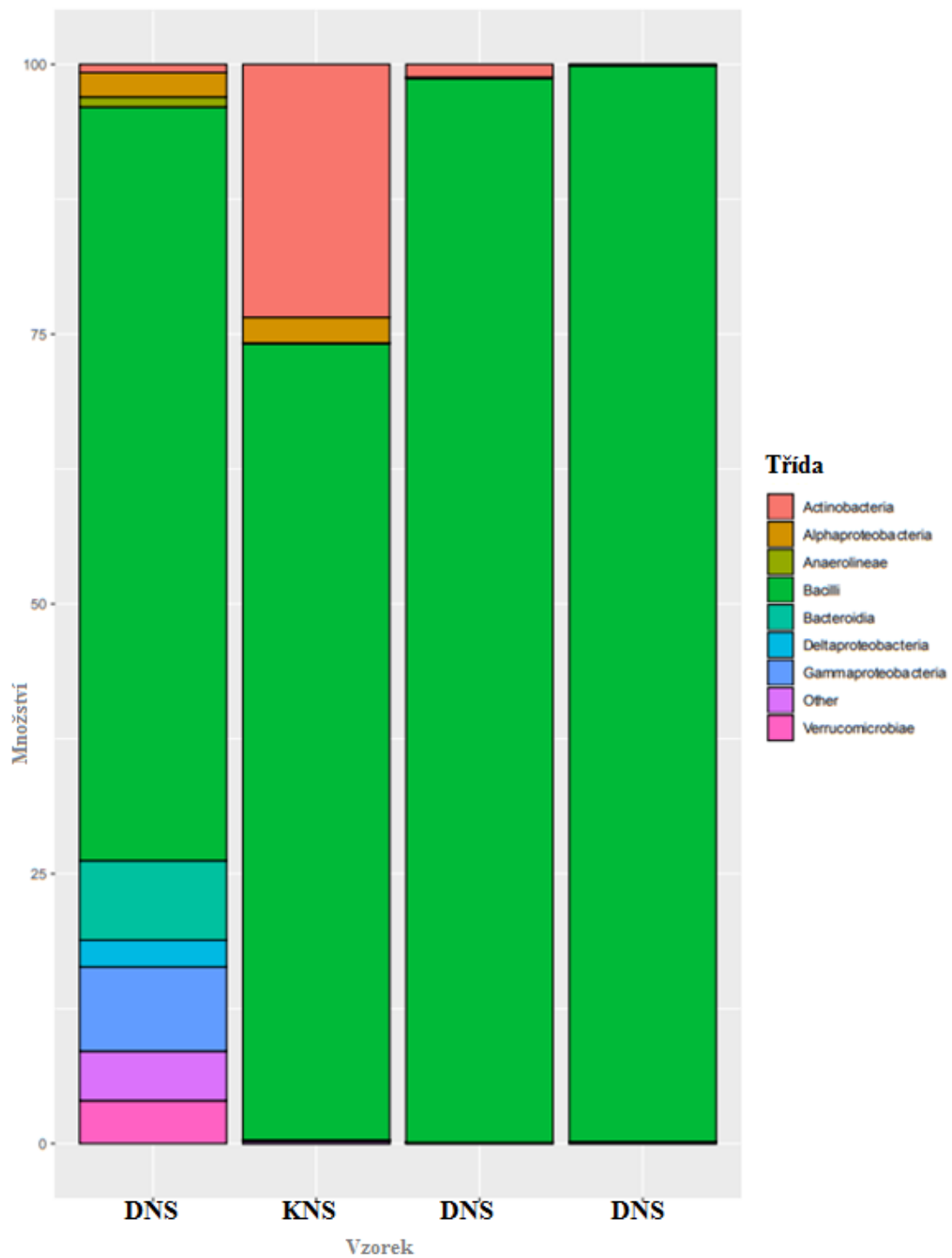
Obr. 6: Gel z DGGE, 1. měsíc zrání

Pozn. (M – marker, N – nepasterizované mléko, P – pasterizované mléko, KN – provozní zákys s *L. lactis* subsp. *lactis*, PN – provozní zákys s *L. lactis* subsp. *cremoris*, DN – provozní zákys s *Lb. casei*, KNO – sýr s *L. lactis* subsp. *lactis* okraj, KNS – sýr s *L. lactis* subsp. *lactis* střed, PNO – sýr s *L. lactis* subsp. *cremoris* okraj, PNS – sýr s *L. lactis* subsp. *cremoris* střed, DNO – sýr s *Lb. casei* okraj, DNS – sýr s *Lb. casei* střed)



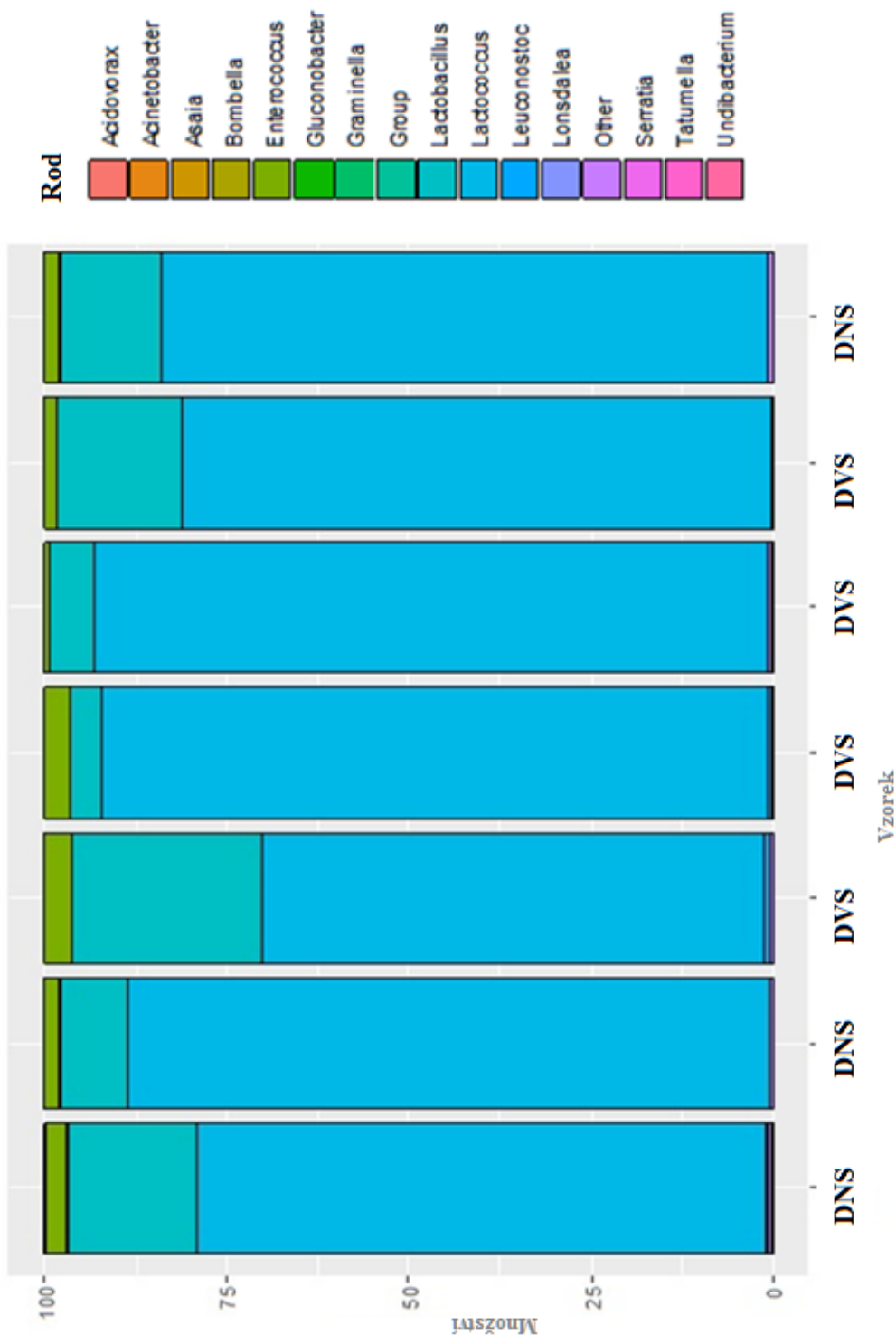
Obr. 7: Výsledky NGS pro vybrané modelové vzorky sýrů rod

Pozn. DNS – sýr s *Lb. casei* střed (obal Plasticoat), KNS – sýr s *L. lactis* subsp. *lactis* střed (obal Plasticoat)



Obr. 8: Výsledky NGS pro vybrané modelové vzorky sýrů - třída

Pozn. DNS – sýr s *Lb. casei* střed (obal Plasticoat), KNS – sýr s *L. lactis* subsp. *lactis* střed (obal Plasticoat)



Obr. 9: Výsledky NGS pro sýr s kulturou *Lb. casei*

Pozn. DNS – sýr s *Lb. casei* střed (obal Plasticoat), DVS – sýr s *Lb. casei* střed (obal potravinářský vosk)

Tab. 9: Shrnutí identifikovaných mikroorganismů

Identifikovaný mikroorganismus	Vzorek
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Nepasterizované mléko Pasterizované mléko Všechny sýry
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Sýry šarže P
<i>Lactobacillus casei</i>	Sýry šarže D
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Nepasterizované mléko Pasterizované mléko Sýry šarže D
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Sýry šarže D
<i>Brevibacillus brevis</i>	Nepasterizované mléko Pasterizované mléko Všechny sýry
<i>Enterococcus faecium</i>	Nepasterizované mléko Pasterizované mléko Všechny sýry
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Pasterizované mléko

ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla věnována sledování vývoje mikrobiální diverzity u modelových vzorků přírodních sýrů typu gouda od výroby a během zrání. Pro účely této diplomové práce byly vybrány dva druhy obalových materiálů, ve kterých probíhalo zrání analyzovaných vzorků sýrů. Jednalo se o sýrařský vosk a ochranný nátěr Plasticoat. Vybrané indikátorové skupiny mikroorganismů byly stanovovány pomocí kultivačních a molekulárně-biologických metod.

U kultivačního stanovení byla použita klasická plotnová metoda s využitím selektivně – diagnostických půd. Kultivační stanovení prokázalo velmi rozmanité zastoupení mikroorganismů nejen u modelových vzorků sýrů, ale také u použitých surovin. Nejvyšší rozmanitost mikroorganismů byla zaznamenána u nepasterizovaného mléka, kde byl pozorován nárůst koliformních bakterií, enterokoků, laktokoků i laktobacilů, jelikož obecně je nepasterizované mléko poměrně rozmanitý mikrobiologický systém. U jednotlivých šarží byla vyvíjející se mikroflóra závislá na přidané startovací kultuře. To znamená, že u šarží K a P byl již od počátku zaznamenán značný nárůst mléčných koků, které byly použity jako startovací kultury. Naopak u šarže D, kde byl jako startovací kultura použit *Lactobacillus casei*, bylo možno pozorovat nárůst laktobacilů již v prvním měsíci zrání. Tento počet se však postupně snižoval na úkor zvyšujícího se počtu laktokoků, které jsou schopny rychlejšího růstu. Nebyl pozorován významný vliv obalu na celkové mikrobiální složení sýrů, avšak byl pozorován rozdíl v počtu mikroorganismů mezi stejnými šaržemi zrajícími v různých obalových materiálech. Tento jev byl nejvýraznější u šarží P a D, kdy u obalového materiálu Plasticoat byl po třech měsících zrání zaznamenán vyšší počet laktokoků než laktobacilů. Naopak u sýrů, které zrály v potravinářském vosku, byl po třech měsících zrání zaznamenán vyšší počet laktobacilů. Tento jev by mohl být způsoben rozdílnou propustností materiálů pro plyny.

Identifikace mikroorganismů založená na sekvenaci izolované bakteriální DNA prokázala výskyt rozmanité mikroflóry během celé doby zrání. U modelových vzorků sýrů byly zastoupeny především bakterie mléčného kvašení, konkrétně *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, který byl izolován ze všech modelových vzorků. V nemalé míře byl u šarže P zaznamenán výskyt *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, u šarže D poté *Lactobacillus casei*. Ze všech šarží byl izolován i *Enterococcus faecium* a *Brevibacillus brevis*, které by mohly být řazeny ke kontaminující mikroflóře. U šarže D se podařilo identifikovat i zástupce non-

starterových bakterií *Lactobacillus paracasei* a *Lactobacillus fermentum*. U žádné šarže nebyl pozorován výskyt jiné kontaminující mikroflóry, jako například koliformní bakterie nebo salmonely.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] 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
- [2] FOX, P. F. a P. L. H. MCSWEENEY. Dairy chemistry and biochemistry. New York, 1998. ISBN 04-127-2000-0.
- [3] JOHNSON, M. E. a J. A. LUCEY. Calcium: A key factor in controlling cheese functionality. Australian Journal of Dairy Technology. 2006, 61(2), 147-153.
- [4] LAW, Barry A. a A. Y. TAMIME. Technology of cheesemaking. 2nd ed. Malden, MA: Blackwell, 2010. ISBN 978-140-5182-980.
- [5] 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.
- [6] KAY, H. D., & GRAHAM, W. R.. The phosphatase test for pasteurised milk. Journal of Dairy Research. (1935), 6, 191–203.
- [7] FOX, P.F. a A.L. KELLY. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 2. International Dairy Journal. 2006, 16(6), 517-532. DOI: 10.1016/j.idairyj.2005.09.017. ISSN 09586946.
- [8] MAUBOIS, J. -L. Membrane microfiltration: A tool for a new approach in dairy technology. Australian Journal of Dairy Technology. 2002, 57(2), 92-96.
- [9] KADLEC, Pavel. Technologie potravin. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. ISBN 8070805102.
- [10] STEELE, James a Elmer MARTH. Applied dairy microbiology. New York: Marcel Dekker, 2001, 744 s. ISBN 978-0-8247-0536-7.
- [11] DONNELLY, Catherine W. Cheese and microbes. Washington, DC: ASM Press, 2014. ISBN 978-1-55581-586-8.
- [12] LUDWIG, W a H. P. KLENK. Overview: A Phylogenetic Backbone and Taxonomic Framework for Prokaryotic Systematics. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. 2005, s. 49-66. ISBN 978-0-387-24143-2.

- [13] KHALID, Noraini M. a Elmer H. MARTH. Lactobacilli — Their Enzymes and Role in Ripening and Spoilage of Cheese: A Review. *Journal of Dairy Science*. 1990, 73(10), 2669-2684. ISSN 00220302.
- [14] MONTEL, Marie-Christine, Solange BUCHIN, Adrien MALLET, Céline DELBES-PAUS, Dominique A. VUITTON, Nathalie DESMASURES a Françoise BERTHIER. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *International Journal of Food Microbiology*. 2014, 177, 136-154. ISSN 01681605.
- [15] BOKULICH, Nicholas A. a David A. MILLS. Facility-Specific “House” Microbiome Drives Microbial Landscapes of Artisan Cheesemaking Plants. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013, 79(17), 5214-5223. ISSN 0099-2240.
- [16] SOMERS, E.B., M.E. JOHNSON a A.C.L. WONG. Biofilm Formation and Contamination of Cheese by Nonstarter Lactic Acid Bacteria in The Dairy Environment. *Journal of Dairy Science*. 2001, 84(9), 1926-1936. ISSN 00220302.
- [17] GOBBETTI, Marco, Maria DE ANGELIS, Raffaella DI CAGNO, Leonardo MANCINI a Patrick F. FOX. Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. *Trends in Food Science & Technology*. 2015, 45(2), 167-178. ISSN 09242244.
- [18] BROADBENT, J.R., M.F. BUDINICH a J.L. STEELE. Cheese | Non-Starter Lactic Acid Bacteria. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Elsevier, 2011, 2011, s. 639-644. ISBN 9780123744074.
- [19] 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.
- [20] SETTANNI, Luca a Giancarlo MOSCHETTI. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiology*. 2010, 27(6), 691-697. ISSN 07400020.
- [21] POZNANSKI, E., A. CAVAZZA, F. CAPPÀ a P.S. COCCONCELLI. Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese

- from an alpine natural park. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, 92(2), 141-151. ISSN 01681605.
- [22] ANTONSSON, Martin, Ylva ARDÖ a Göran MOLIN. A comparison between the microflora of Herrgård cheese from three different dairies. *International Dairy Journal*. 2001, 11(4-7), 285-291. ISSN 09586946.
- [23] VAN HOORDE, Koenraad, Marc HEYNDRICKX, Peter VANDAMME a Geert HUYS. Influence of pasteurization, brining conditions and production environment on the microbiota of artisan Gouda-type cheeses. *Food Microbiology*. 2010, 27(3), 425-433. ISSN 07400020.
- [24] BIELECKA, Marika Magdalena a Grażyna CICHOSZ. The influence of an adjunct culture of *Lactobacillus paracasei* LPC-37 on the physicochemical properties of Dutch-type cheese during ripening. *LWT - Food Science and Technology*. 2017, 83, 95-100. ISSN 00236438.
- [25] FERNÁNDEZ, Elena, Ángel ALEGRÍA, Susana DELGADO, M. Cruz MARTÍN a Baltasar MAYO. Comparative Phenotypic and Molecular Genetic Profiling of Wild *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Strains of the *L. lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris* Genotypes, Isolated from Starter-Free Cheeses Made of Raw Milk. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, 77(15), 5324-5335. ISSN 0099-2240.
- [26] SMIT, Gerrit, Bart A. SMIT a Wim J.M. ENGELS. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005, 29(3), 591-610. ISSN 1574-6976.
- [27] RUGGIRELLO, Marianna, Luca COCOLIN a Paola DOLCI. Fate of *Lactococcus lactis* starter cultures during late ripening in cheese models. *Food Microbiology*. 2016, 59, 112-118. ISSN 07400020
- [28] KONDROTIENE, Kristina, Neringa KASNAUSKYTE, Loreta SERNIENE, Greta GÖLZ, Thomas ALTER, Vilma KASKONIENE, Audrius Sigita MARUSKA a Mindaugas MALAKAUSKAS. Characterization and application of newly isolated nisin producing *Lactococcus lactis* strains for control of *Listeria monocytogenes* growth in fresh cheese. *LWT*. 2018, 87, 507-514. ISSN 00236438.

- [29] D. BOUGLÉ, N. ROLAND, F. LEBEURRIER. Effect of Propionibacteria Supplementation on Fecal Bifidobacteria and Segmental Colonic Transit Time in Healthy Human Subjects. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2009, 34(2), 144-148. ISSN 0036-5521.
- [30] KANEKO, Tsutomu, Hiroharu MORI, Megumi IWATA a Sachiko MEGURO. Growth Stimulator for Bifidobacteria Produced by *Propionibacterium freudenreichii* and Several Intestinal Bacteria. *Journal of Dairy Science*. 1994, 77(2), 393-404. ISSN 00220302.
- [31] SGARBI, E., C. LAZZI, G. TABANELLI, M. GATTI, E. NEVIANI a F. GARDINI. Nonstarter lactic acid bacteria volatiles produced using cheese components. *Journal of Dairy Science*. 2013, 96(7), 4223-4234. ISSN 00220302.
- [32] GOBBETTI, Marco, Raffaella DI CAGNO, Maria CALASSO, Erasmo NEVIANI, Patrick F. FOX a Maria DE ANGELIS. Drivers that establish and assemble the lactic acid bacteria biota in cheeses. *Trends in Food Science & Technology*. 2018, 78, 244-254. ISSN 09242244.
- [33] BERESFORD, Tom P, Nora A FITZSIMONS, Noelle L BRENNAN a Tim M COGAN. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*. 2001, 11(4-7), 259-274. ISSN 09586946.
- [34] WEBER, F., RAMET, J. P. Comparative technology of the ripening methods of different types of cheese. In A. Eck (Ed.), *Cheesemaking, science and technology* 1987, 293–309. New York: Lavoiser Publishing.
- [35] BEUCHAT, L.R., GOLDEN, D.A. Antimicrobials Occurring Naturally in Foods. *Food Technology*. 1989, 43, 134-142.
- [36] FOLKERTSMA, B., P.F. FOX a P.L.H. MCSWEENEY. Accelerated ripening of Cheddar cheese at elevated temperatures. *International Dairy Journal*. 1996, 6(11-12), 1117-1134. ISSN 09586946.
- [37] SANTARELLI, Marcela, Benedetta BOTTARI, Camilla LAZZI, Erasmo NEVIANI a Monica GATTI. Survey on the community and dynamics of lactic acid bacteria in Grana Padano cheese. *Systematic and Applied Microbiology*. 2013, 36(8), 593-600. ISSN 07232020.

- [38] FITZSIMONS, N.A., T.M. COGAN, S. CONDON a T. BERESFORD. Spatial and temporal distribution of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Journal of Applied Microbiology*. 2001, 90(4), 600-608. ISSN 1364-5072.
- [39] FITZSIMONS, N. A., T. M. COGAN, S. CONDON a T. BERESFORD. Phenotypic and Genotypic Characterization of Non-Starter Lactic Acid Bacteria in Mature Cheddar Cheese. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, 65(8), 3418-3426. ISSN 1098-5336
- [40] VAN HOORDE, Koenraad, Tine VERSTRAETE, Peter VANDAMME a Geert HUYS. Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. *Food Microbiology*. 2008, 25(7), 929-935. ISSN 07400020.
- [41] BERTHIER, Françoise, Eric BEUVIER, André DASEN a Rémy GRAPPIN. Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comté cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers. *International Dairy Journal*. 2001, 11(4-7), 293-305. ISSN 09586946.
- [42] GIRAFFA, G., CARMINATI, D. a NEVIANI, E.. Enterococci Isolated from Dairy Products: A Review of Risks and Potential Technological Use. *Journal of Food Protection*. 1997, 60(6), 732-738. ISSN 0362-028X
- [43] LANE, C. N., P. F. FOX, E. M. WALSH, B. FOLKERTSMA a P. L.H. MCSWEENEY. Effect of compositional and environmental factors on the growth of indigenous non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Le Lait*. 1997, 77(5), 561-573. ISSN 0023-7302.
- [44] XU, Weihong, Sujatha KRISHNAKUMAR, Molly MIRANDA, et al. Targeted and Highly Multiplexed Detection of Microorganisms by Employing an Ensemble of Molecular Probes. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014, 80(14), 4153-4161. ISSN 0099-2240.
- [45] GIRAFFA, Giorgio a Erasmo NEVIANI. 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.

- [46] RÅDSTRÖM, Peter, Rickard KNUTSSON, Petra WOLFFS, Maria LÖVENKLEV a Charlotta LÖFSTRÖM. Pre-PCR Processing: Strategies to Generate PCR-Compatible Samples. *Molecular Biotechnology*. ISSN 1073-6085.
- [47] ROSSEN, Lone, Pernille NØRSKOV, Kim HOLMSTRØM a Ole F. RASMUSSEN. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*. 1992, 17(1), 37-45. ISSN 01681605.
- [48] QUIGLEY, L., O. O'SULLIVAN, T.P. BERESFORD, R. PAUL ROSS, G.F. FITZGERALD a P.D. COTTER. A comparison of methods used to extract bacterial DNA from raw milk and raw milk cheese. *Journal of Applied Microbiology*. 2012, 113(1), 96-105. ISSN 13645072.
- [49] ODUMERU, J. & GAO, A. & CHEN, S. & Raymond, M & Mutharia, L.. Use of the bead beater for preparation of Mycobacterium paratuberculosis template DNA in milk. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire*. (2001) 65(4). 201-5.
- [50] KHEMARIYA, Priti, Sudhir SINGH, Gopal NATH a Anil K. GULATI. Subspecies-Specific Nested PCR Assay for Detection of *Lactococcus lactis* spp. *lactis* and spp. *cremoris*. *Food Biotechnology*. 2013, 27(3), 222-234. ISSN 0890-5436.
- [51] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [52] 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.
- [53] MIRAGOLI, Francesco, Vania PATRONE, Francesco ROMANIELLO, Annalisa REBECCHI a Maria Luisa CALLEGARI. Development of an S-layer gene-based PCR-DGGE assay for monitoring dominant *Lactobacillus helveticus* strains in natural whey starters of Grana Padano cheese. *Food Microbiology*. 2020, 89. ISSN 07400020.
- [54] SYBR Green. Biocompare [online]. [cit. 2020-02-23]. Dostupné z: <https://www.biocompare.com/26087-SYBR-Green/>

- [55] SINGER, Victoria L, Timothy E LAWLOR a Stephen YUE. Comparison of SYBR® Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 1999, 439(1), 37-47. ISSN 13835718.
- [56] NUNNALLY, Brian K. Analytical techniques in DNA sequencing. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. ISBN 0-8247-5342-9.
- [57] Sanger sequencing & Fragment Analysis. Seqme [online]. [cit. 2020-02-24]. Dostupné z: <https://www.seqme.eu/documents/sanger-brochure-cz.pdf>
- [58] SANGER, F. a A.R. COULSON. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*. 1975, 94(3), 441-448. ISSN 00222836.
- [59] BEHJATI, Sam a Patrick S TARPEY. What is next generation sequencing? *Archives of disease in childhood - Education & practice edition*. 2013, 98(6), 236-238. ISSN 1743-0585.
- [60] HAYNES, Edward, Elisa JIMENEZ, Miguel Angel PARDO a Sarah J. HELYAR. The future of NGS (Next Generation Sequencing) analysis in testing food authenticity. *Food Control*. 2019, 101, 134-143. ISSN 09567135.
- [61] KOLÍSKO, Martin. Moderní metody sekvenování DNA. *Živa. Academia*, 2017, (3), 73-76.
- [62] DeNovix dsDNA High Sensitivity Assay. DeNovix Fluorescence Assays: Technical Note 145 [online]. DeNovix [cit. 2020-03-17]
- [63] 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.
- [64] 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

- [65] 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.
- [66] NucleoSpin 96 PCR Clean-up Plates for PCR clean up. Macherey-Nagel [online]. [cit. 2020-03-23]. Dostupné z: www.mn-net.com
- [67] Takara Bio Magnetic separators for NucleoMag purification kits. Takarabio [online]. [cit. 2020-03-23]. Dostupné z: www.takarabio.com
- [68] BUŇKOVÁ, Leona a Magda DOLEŽALOVÁ. Obecná mikrobiologie. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2007. ISBN 9788073185169.
- [69] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Vyd. 3., opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. Praha: Academia, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [70] SHANKAR, P. A. a F. L. DAVIES. Recent developments in yoghurt starters: A note on the suppression of the *Lactobacillus Bulgaricus* in media containing β -glycerophosphate and application of such media to selective isolation of *Streptococcus thermophilus* from yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*. 1977, 30(1), 28-30. ISSN 1364-727X.
- [71] JORDAN K.N., COGAN T.M. (1999) Heat resistance of *Lactobacillus* spp. isolated from Cheddar cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 29, pp. 136-140.
- [72] HOGG, Stuart. *Essential microbiology*. Hoboken, NJ: John Wiley, c2005. ISBN 0-471-49754-1.
- [73] MCAULEY, Catherine M., Kari S. GOBIUS, Margaret L. BRITZ a Heather M. CRAVEN. Heat resistance of thermotolerant enterococci isolated from milk. *International Journal of Food Microbiology*. 2012, 154(3), 162-168. ISSN 01681605.
- [74] HILL, Daragh, Ivan SUGRUE, Conor TOBIN, Colin HILL, Catherine STANTON a R. Paul ROSS. The *Lactobacillus casei* Group: History and Health Related Applications. *Frontiers in Microbiology*. 2018, 9. ISSN 1664-302X.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

APS	amonium persulfát
bp	base pairs (páry bází)
BLAST	basic local alignment search tool
DGGE	denaturační gradientová gelová elektroforéza
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
EDTA	etylendiamintetraoctová kyselina
EtB	ethidiumbromid
KTJ	kolonie tvořící jednotky
LAB	lactic acid bakteria (bakterie mléčného kvašení)
MRS	deMan, Rogosa and Sharpe agar
NSLAB	non-starter lactic acid bakteria (non-starterové mléčné bakterie)
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
RPM	revolutions per minute (počet otáček za minutu)
sp.	species (druh)
subsp.	subspecies (poddruh)
TAE	tris-acetát-EDTA
TEMED	tetramethylethylendiamin

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Změny v populaci startovacích LAB a NSLAB, ke kterým obvykle dochází v sýru čedar během zrání</i>	18
<i>Obr. 2: Magnetická destička</i>	44
<i>Obr 3: Magnetický separátor</i>	44
<i>Obr. 4: Graf vývoje mikroflóry u sýrů s kulturou <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (obal <i>Plasticoat</i>)</i>	48
<i>Obr. 5: Graf vývoje mikroflóry u sýru s kulturou <i>Lb. casei</i> (obal <i>Plasticoat</i>)</i>	49
<i>Obr. 6: Gel z DGGE, 1. měsíc zrání</i>	51
<i>Obr. 7: Výsledky NGS pro vybrané modelové vzorky sýrů rod</i>	52
<i>Obr. 8: Výsledky NGS pro vybrané modelové vzorky sýrů - třída</i>	53
<i>Obr. 9: Výsledky NGS pro sýr s kulturou <i>Lb. casei</i></i>	54

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1: Značení vzorků sýrů při kultivačním stanovení</i>	31
<i>Tab. 2: Příklad značení vzorků při izolaci DNA</i>	32
<i>Tab. 3: Složení reakční směsi pro 1. amplifikační krok</i>	38
<i>Tab. 4: Teplotní a časový profil první reakce</i>	38
<i>Tab. 5: Složení reakční směsi pro druhý amplifikační krok</i>	39
<i>Tab. 6: Teplotní a časový profil druhé reakce</i>	39
<i>Tab. 7: Sekvence použitých primerů</i>	39
<i>Tab. 8: Složení denaturačních roztoků</i>	41
<i>Tab. 9: Shrnutí identifikovaných mikroorganismů</i>	55