



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MIKROBIÁLNÍ PROFIL MODELOVÝCH SÝRŮ VYBRANÉHO TYPU

MICROBIAL PROFILE OF MODEL CHEESE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

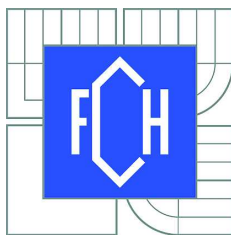
Mgr. Ivana Lavičková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Eva Vítová, Ph.D.

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0973/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Mgr. Ivana Lavičková	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Ing. Eva Vítová, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Štěpánka Trachtová, Ph.D. Ing. Martina Mahdalová	

Název diplomové práce:

Mikrobiální profil modelových sýrů vybraného typu

Zadání diplomové práce:

1. Zpracujte literární přehled dané problematiky:

- sýry – charakteristika, složení, vlastnosti
- mikrobiologická charakteristika sýrů
- kefirová zrna, charakterizace, složení
- molekulárně diagnostické metody – princip, provedení

2. Pomocí vybraných molekulárně diagnostických metod identifikujte mikroorganismy v modelových vzorcích sýrů

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Mgr. Ivana Lavičková
Student(ka)

Ing. Eva Vítová, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá identifikací mikroorganismů ve vzorcích experimentálně vyrobených sýrů. Modelové vzorky sýrů byly vyrobeny ve spolupráci se soukromým výrobcem. Jako surovina bylo použito nepasterované mléko v „bio“ kvalitě.

V teoretické části je uveden přehled dané problematiky obsahující charakteristiku sýrů, jejich vlastností a složek. Zvláštní kapitola je věnována molekulárně diagnostickým metodám sloužícím k identifikaci mikroorganismů.

V experimentální části této práce byly ve vzorcích sýra pomocí polymerázové řetězové reakce identifikovány vybrané mikroorganismy. DNA byla izolována z připravených hrubých lyzátů buněk metodou fenolové extrakce, amplifikována pomocí specifických primerů a prokazována gelovou elektroforézou. V sýrech byla prokázána DNA bakterií mléčného kvašení (*Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp.) a kvasinek. Vzorky neobsahují DNA patogenních rodů *Bacillus* a *Salmonella*.

ABSTRACT

This Diploma thesis deals with the identification of microorganisms in samples of experimentally produced cheese. Model samples of cheese were produced in association with a private manufacturer. Raw organic milk was used to make the cheese.

The theoretical part provides an overview of the issues such as the characteristics of the cheese, its properties and compounds. A special chapter is dedicated to molecular diagnostic methods, which serve for identification of microorganisms.

In the experimental part of the thesis were identified some microorganisms in the samples. A polymerase chain reaction was used. The DNA was isolated from coarse lysates using phenol extraction; it was amplified using specific primers and demonstrated by gel electrophoresis. DNA of lactic acid bacteria (*Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp.) and yeast was ascertained in the cheese. The samples do not contain DNA of pathogenic genera *Bacillus* and *Salmonella*.

KLÍČOVÁ SLOVA

Sýry, mikrobiální profil, molekulární metody

KEYWORDS

Cheese, microbic profile, molecular methods

LAVIČKOVÁ, I. Mikrobiální profil modelových sýrů vybraného typu. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 63 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí své diplomové práce Ing. Evě Vítové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky při vypracovávání této práce. Dále chci také poděkovat Ing. Štěpánce Trachtové, Ph.D. za pomoc a odborné vedení experimentální části práce. Velký dík patří také mé rodině a příteli za podporu po celou dobu mého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	7
2	TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1	Sýry	8
2.2	Složení sýrů	8
2.2.1	Proteiny	9
2.2.2	Sacharidy	9
2.2.3	Lipidy	9
2.2.4	Vitaminy	10
2.2.5	Minerální látky	10
2.3	Vlastnosti sýrů	11
2.4	Mikrobiologická charakteristika sýrů	11
2.5	Kefír a keřirová zrna	12
2.6	Složení keřirových zrn	14
2.7	Výživové a zdravotní účinky keřiru	18
2.8	Diagnostické metody identifikace mikroorganismů	19
2.8.1	Kultivační metody	19
2.8.2	Nekultivační metody	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1	Vzorky	22
3.2	Mikrobiologické hodnocení pomocí molekulárně diagnostických metod	22
3.2.1	Použité chemikálie a roztoky	22
3.2.2	Komponenty pro PCR	23
3.2.3	Použité přístroje a pomůcky	23
3.2.4	Použité metody a postupy	24
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	39
4.1	Výsledky mikrobiologického hodnocení pomocí PCR	39
4.1.1	Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA	39
4.1.2	Důkaz přítomnosti DNA domény <i>Bacteria</i>	41
4.1.3	Důkaz přítomnosti DNA rodu <i>Lactobacillus</i>	42
4.1.4	Důkaz přítomnosti DNA druhu <i>Lactobacillus casei</i>	43
4.1.5	Důkaz přítomnosti DNA rodu <i>Lactococcus</i>	44
4.1.6	Důkaz přítomnosti DNA rodu <i>Bifidobacterium</i> (primery Bif-164, Bif-662)	45

4.1.7	Důkaz přítomnosti DNA rodu <i>Bifidobacterium</i> (primery Rallbif, Fallbif).....	46
4.1.8	Důkaz přítomnosti DNA rodu <i>Streptococcus</i>	47
4.1.9	Důkaz přítomnosti DNA kvasinek	48
4.1.10	Důkaz přítomnosti DNA rodu <i>Bacillus</i>	49
4.1.11	Důkaz přítomnosti DNA rodu <i>Salmonella</i>	50
4.2	Shrnutí výsledků	51
4.3	Diskuze výsledků.....	51
5	ZÁVĚR	53
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	54
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	63

1 ÚVOD

Mikroorganismy se objevily na Zemi již mnohem dříve než samotný člověk. Ač jsou pouhým okem neviditelné, mají pro člověka velký význam, především pro jeho zdraví. Mohou být jak prospěšné, tak patogenní. Mikroorganismy se používají již odnepaměti při výrobě mnoha druhů potravin, jako jsou například sýry, chléb, víno, pivo aj. Tisíce let, až do objevení světelného mikroskopu, však byly mikroorganismy používány nevědomě.

V posledních letech stoupá trend zájmu o složení potravin a jejich vliv na zdraví člověka. Vyrůstá také preference konzumace zdravějších potravin. Právě proto zaujímají mléko a fermentované mléčné výrobky významné místo v oblíbenosti mezi spotřebiteli. Produkce sýrů je ročně 15 milionů tun a tvoří zhruba 30 % světové produkce mléčných výrobků¹.

V potravinářství jsou pro identifikaci mikroorganismů nyní stále více využívány molekulárně diagnostické metody založené na analýze deoxyribonukleové kyseliny (DNA). Nejrozšířenější metodou je polymerázová řetězová reakce umožňující ověření přítomnosti DNA mnoha různých rodů a druhů mikroorganismů. Cílem této práce je identifikace vybraných skupin mikroorganismů v modelových, experimentálně vyrobených vzorcích sýrů pomocí molekulárně diagnostických metod.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Sýry

Současná česká legislativa, vyhláška č. 336/2013 Sb., definuje sýr jako „mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, prokysáním a oddělením podílu syrovátky“².

Na českém trhu existuje nepřeberné množství různých druhů sýrů. Nejjednodušeji můžeme sýry rozdělit dle tvrdosti. Tvrdost sýrů souvisí s obsahem vody. U extra tvrdých sýrů je obsah vody pod 47 %, měkké sýry mají více než 68 % vody. Mezi čerstvé a termizované sýry patří například Mozzarella, Cottage, či Mascarpone. Měkkými sýry jsou například Camembert, Brie a Romadur. Nejrozšířenější skupinou sýrů v České republice jsou zrající polotvrdé sýry typu Eidam a Madeland. Mezi zrající tvrdé a extra tvrdé sýry je zahrnován Ementál, Čedar a Parmazán³.

Mléko a mléčné výrobky poskytují důležité nutriční prvky, imunologickou ochranu a přírodní biologicky aktivní látky. Mléčné bílkoviny jsou zdrojem řady biologicky aktivních peptidů. Některé z těchto peptidů mohou být použity jako nutraceutika zejména při léčbě průjmu, hypertenze, trombózy, či minerální malabsorpce⁴.

Hlavní výhodou konzumace mléka a mléčných výrobků je jejich výživová vyváženost. Jsou to bohaté zdroje důležitých živin (bílkovin, tuků, laktosy, vitaminů, minerálních látek, enzymů, hormonů a imunoglobulinů). Mléko má také detoxikační účinek při otravách, patří mezi dobře stravitelné potraviny, podporuje střevní zdraví a celkovou imunitu. Konzumace mléčných výrobků je spojována s mnoha pozitivními účinky na lidské zdraví jako je třeba snížení rizika osteoporózy, hypertenze, rakoviny tlustého střeva, obezity a inzulinové rezistence⁵.

2.2 Složení sýrů

Sýry jsou z nutričního hlediska velice hodnotné potraviny. Obsahují jak esenciální aminokyseliny, tak zdroj využitelné energie, kterým jsou bílkoviny, či mléčný tuk. Složení sýrů a jejich kvalita jsou závislé především na druhu použitých surovin a výrobní technologii⁶.

2.2.1 Proteiny

Mléčné výrobky obecně, zvláště sýry, jsou významným zdrojem bílkovin. V průběhu zrání a skladování se hodnota proteinů v mléčných výrobcích ještě zvyšuje. Bílkoviny kravského mléka se dělí na kaseinové a sérové (syrovátkové). Kaseiny se dělí na čtyři základní frakce s různým počtem aminokyselin (α_{S1-} , α_{S2-} , β -, a κ -) a v kravském mléce tvoří asi 76 – 86 % z celkového množství proteinů. Obsah kaseinů je ovlivněn plemenem zvířete, stádiem laktace krávy a její potravou⁷. Koncentraci kaseinů ovlivňují i enzymy přirozeně se vyskytující v mléce, proto je pro celkovou kvalitu a výtěžnost sýra důležité stanovení koncentrace nativních kaseinů⁸.

Kasein má komplikovanou kvartérní strukturu. Z hlediska zastoupení aminokyselin je plnohodnotnou bílkovinou. V průběhu zrání většiny odrůd sýrů dochází k proteolýze. Enzymy přidanými v syřidle jsou proteiny postupně degradovány na polypeptidy, peptidy až volné aminokyseliny. Volné aminokyseliny jsou prekurzory mnoha chuťových látek^{6,9}.

Mezi syrovátkové bílkoviny patří α -laktalbumin, β -laktoglobulin, imunoglobuliny, sérový albumin, enzymy a enzymové inhibitory. Tyto bílkoviny obsahují vysoké množství aminokyselin a mají významnou roli při prevenci stresu a řady onemocnění^{6,10}.

2.2.2 Sacharidy

Hlavním sacharidem vyskytujícím se v mléce je laktosa, která se v kravském mléce vyskytuje v koncentraci cca 4 – 5 %. Vlivem probíhající fermentace dochází k jejímu snížení o 20 - 50 %. Proto jsou kysané mléčné výrobky vhodné i pro osoby citlivé na laktosu¹¹. Laktosa je unikátní disacharid, neboť je produkován pouze mléčnou žlázou savců. Je 4x méně sladký než sacharosa, proto i když je v mléce obsažen v poměrně vysoké koncentraci, není mléko sladké. Laktosa patří mezi redukující sacharidy a ochotně vstupuje do Maillardovy reakce, což může způsobovat senzorické ovlivnění barvy, vůně a chutí např. u sušených, nebo sterilovaných mléčných výrobků⁶.

2.2.3 Lipidy

Převážná část mléčných lipidů se nachází ve formě tzv. tukových kuliček. Nepolární triacylglyceroly jsou obaleny membránou z vysoce polárních povrchově aktivních látek,

především fosfolipidů a lipoproteinů¹². V kravském mléku je velikost tukových globulí cca 3,5 – 5,5 μm. Počet tukových kuliček a jejich průměr závisí na endogenních, fyziologických a exogenních faktorech. Tukové globule ovlivňují kvalitu mléka a jeho trávení, v sýrech ovlivňují také jejich nutriční a senzorické vlastnosti¹³.

Mléčný tuk patří mezi nasycené tuky. Je pro něj typický vysoký obsah nízkomolekulárních mastných kyselin (máselné, kapronové, kaprylové a kaprinové). Primární funkcí tuku v mléce je splnění energetických požadavků novorozence, avšak pro dospělou populaci znamená vysoká nasycenost mléčného tuku riziko negativního ovlivnění hladiny cholesterolu. Samotný mléčný tuk je také zdrojem esenciálních mastných kyselin, lipofilních vitaminů, aromatických látek a cholesterolu. Ve srovnání s ostatními potravinami živočišného původu je však obsah tuku v mléce poměrně nízký⁶.

2.2.4 Vitaminy

Mléko a mléčné výrobky jsou nezbytným a významným zdrojem vitaminů. Mléčný tuk obsahuje lipofilní vitaminy A, D, E, K. Mléko obsahuje vyšší dávky vitaminu A, vitaminy D, E a K jsou v mléce obsaženy málo. Obsah vitaminu D je dokonce velice nízký, proto je mléko v některých zemích světa povinně fortifikováno. Vitaminy hydrofilní (B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₈, B₉, B₁₂ a C) jsou součástí vodné fáze mléka¹⁴.

2.2.5 Minerální látky

Pro lidské tělo je nezbytné doplňování obsahu minerálů. Mléko a mléčné výrobky jsou důležitým zdrojem vápníku, hořčíku, sodíku, draslíku, fosforu a chloru, dále železa, mědi, zinku a selenu. Draselné, sodné a chlorné ionty se vyskytují ve vodné fázi. Vápenaté, fosforečné a hořečnaté ionty jsou vázány na kaseinové micely. Obsah minerálních látek v sýrech závisí především na způsobu jejich zpracování. Obsah vápníku také silně souvisí s acidifikací. Mléčné výrobky jsou vynikajícím zdrojem vápníku, který se zde vyskytuje ve vysoké koncentraci a jeho využitelnost je umocněna přítomností vitaminu D. Obsah chloridu sodného závisí na způsobu solení sýra¹⁴.

2.3 Vlastnosti sýrů

S výjimkou nezrajících sýrů, které se konzumují v čerstvém stavu, sýr získává své charakteristické vlastnosti ve fázi zrání, jehož podstatou je oxidace a částečná neutralizace kyseliny mléčné, rozklad bílkovin a tuku. Tyto procesy probíhají jednak postupně, jednak souběžně. Procesy spojené se zráním jsou vyvolány činností syřidlových enzymů, příp. nativních enzymů (v případě sýrů vyrobených ze syrového mléka) a mikroorganismů, specifických pro každý druh sýra.

Zráním sýr získává svou výslednou texturu, vzhled, vůni a chuť. Během zrání dochází v sýru k řadě mikrobiologických a biochemických transformací. Pokud jsou tyto změny vyvážené, vedou k produkci velkého počtu aromatických sloučenin a tím i ke specifické vůni a chuti jednotlivých druhů sýrů. Obecně je sýr zralý, když je po stránce smyslových vlastností nejvhodnější k lidské konzumaci.

Senzorické vlastnosti sýrů můžeme posuzovat senzorickým hodnocením. Při posuzování jsou hlavními parametry textura, barva, chuť, aroma a vzhled sýru¹⁵.

2.4 Mikrobiologická charakteristika sýrů

Při výrobě fermentovaných mléčných výrobků a sýrů jsou využívány mikrobiální mlékařské kultury, které jsou záměrně inokulovány do mléka. Největší význam z nich má skupina bakterií mléčného kvašení (BMK). Vzhledem k obrovskému množství rodů a druhů organismů jsou dále vybrány a popsány pouze určité rody, které byly určovány v experimentální části této práce.

Bakterie mléčného kvašení

Jedná se o heterogenní skupinu grampozitivních bakterií s přísně fermentačním metabolismem. Tyto mikroorganismy mají schopnost enzymaticky přeměňovat laktosu na kyselinu mléčnou a další produkty. Hlavní rody BMK jsou *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* a *Lactococcus*¹⁶.

Kvasinky

Kvasinky patří mezi jednobuněčné eukaryotní organismy náležící do říše *Fungi* (houby). Řada kvasinek má pro potravinářství velký význam, některé druhy mohou být ovšem patogenní. Kvasinky štěpí sacharidy za vzniku ethanolu a oxidu uhličitého. Kvasinky jsou v přírodě velmi rozšířené, vyskytují se i na ovoci, či ve střevním traktu lidí a živočichů. Zpravidla mají nízkou tepelnou odolnost. Často se uplatňují při kažení potravin. Patogenní druhy kvasinek mohou u oslabených jedinců vyvolat vážná onemocnění. Kulturní kmeny kvasinek se mohou používat při výrobě některých druhů sýrů a fermentovaných mlék¹⁷.

Rod Bacillus

Jedná se o grampozitivní sporotvorné bakterie tyčinkovitého tvaru s aerobním, či fakultativně aerobním metabolismem. Tyto bakterie jsou kontaminanty a ukazatele znečištění při výrobě sýra. Trvanlivost a kvalita sýrů je ovlivněna mikrobiologickou kvalitou použitých surovin, přísnými hygienickými podmínkami během výrobního procesu, typem obalových materiálů a skladovacích podmínek. Nejznámějšími druhy jsou *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. coagulans* a *B. circulans*. Tvorbou spor si zaručují vysokou rezistenci proti působení vyšších teplot a mohou přežít v prostředí s minimálním množstvím živin. V příznivých podmínkách spory vyklíčí a transformují se ve vegetativní buňky s normálním metabolismem schopné růstu a množení. Bacily způsobují kažení mléka¹⁸.

Rod Salmonella

Jedná se o patogenní, gramnegativní bakterie, které mohou sekundárně kontaminovat sýry. Jsou to fakultativně anaerobní organismy netvořící spory. Preferují životní prostředí s vyšším obsahem tuku a bývají detekovány spíše u syrového mléka a nezrajících sýrů ze syrového mléka vyrobených. Způsobují průjemová onemocnění¹⁸.

2.5 Kefír a keфіrová zrna

Vzhledem k typu vzorků sýrů analyzovaných v rámci této práce jsou v této kapitole stručně charakterizovány fermentované mléčné výrobky se zvláštním zaměřením na kefir a keфіrová zrna.

Kefír patří mezi fermentované mléčné výrobky tepelně neošetřené po prokysání. Fermentované neboli kysané mléčné výrobky je označení pro mléčné výrobky, jejichž základní surovina pro výrobu je inokulována speciální kulturou BMK. Jejich nejdůležitější vlastností je přeměnit laktosu na kyselinu mléčnou. Při této přeměně stoupá kyselost mléka a vytváří se nepříznivé prostředí pro ostatní mikroorganismy. Dále vzniká oxid uhličitý, kyselina octová, biacetyl a acetaldehyd, které dodávají těmto výrobkům specifickou chuť a vůni^{19,20}.

Fermentované mléčné výrobky obsahují živé buňky BMK. Jedná se o heterogenní skupinu grampozitivních bakterií se striktně fermentačním metabolismem. Tyto bakterie jsou přítomné ve vysokém množství i ve finálních výrobcích¹⁶. Existují 2 hlavní fermentační dráhy. Homofermentativní poskytuje jako konečný produkt kyselinu mléčnou. Heterofermentativní drahou vznikají i další sloučeniny jako je kyselina octová, ethanol, oxid uhličitý aj.²¹.

Mezi fermentované mléčné výrobky patří například jogurtové výrobky, kysané mléko, kysané podmáslo, kefír, kumys, kysaná smetana a acidofilní mléko²².

Tyto výrobky jsou značně oblíbené pro svoje senzorické vlastnosti, prodlouženou dobu trvanlivosti, dobrou stravitelnost, nutriční a fyziologické účinky. Od ostatních mléčných výrobků se liší složením, konzistencí, složením bakteriálních kultur a technologickým postupem výroby⁶.

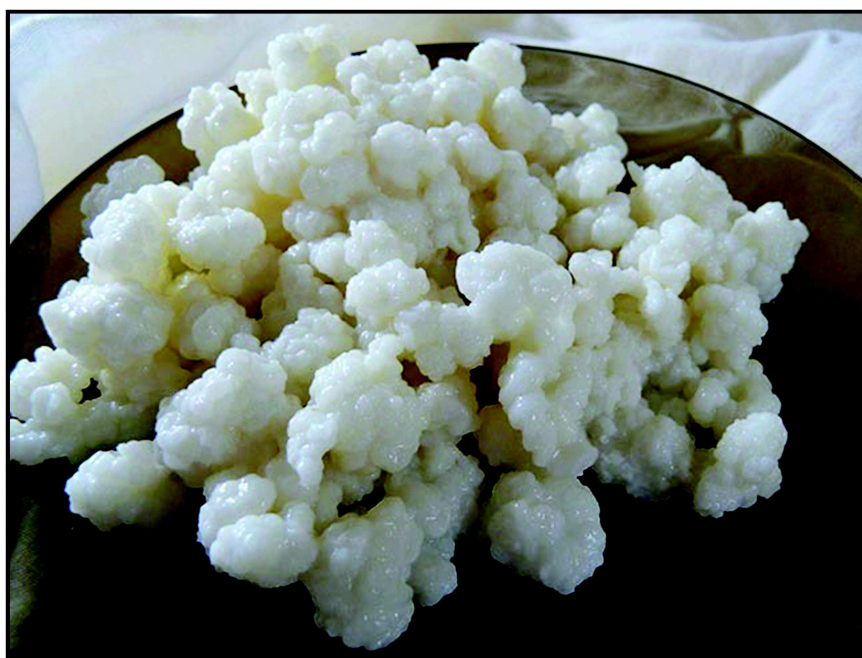
Jeden z nejstarších fermentovaných mléčných výrobků je právě kefír. Pochází z oblasti Kavkazu²³. Vyrábí se z kravského, koziho, ovčího, velbloudího, či bývolího mléka. Obsah alkoholu je od 0,5 – 2 % a pH odpovídá stupni 4,0. Obsah tuku je závislý na typu použitého mléka²⁴.

Kefír má viskózní, mírně napěněnou konzistenci a bílou barvu. Od jiných fermentovaných nápojů se odlišuje přítomností kvasinek a odlišným charakterem biochemických procesů. Kefír patří mezi unikátní fermentované mléčné výrobky z důvodu kombinace homo- a heterofermentativního mléčného kvašení a zároveň i alkoholového kvašení. Kultury použité při výrobě kefiru tedy produkují i alkohol. Kefír je produkován mikrobiální činností kefirových zrn, která jsou tvořena přidáním bakterií mléčného kvašení a kvasinek do mléka²⁵.

Chuť kefiru je mírně kyselá, kvasinková, osvěžující a lehce šumivá. Charakteristickou chuť a senzorické vlastnosti vytváří směs kyseliny mléčné, ethanolu, oxidu uhličitého a aromatických produktů jako je diacetyl, acetaldehyd a acetoin²⁶.

Dle typu mléka lze ovlivnit jak senzorické, tak chemické a texturní vlastnosti. Složení zrn lze ovlivnit i výrobním procesem. Kefír obsahuje 89 – 90 % vody, 6 % sacharidů, 3 % proteinů, 0,2 % tuku, 1 % kyseliny mléčné a alkoholu, 0,7 % popela²⁷.

Základem mikrobiální kultury použité pro výrobu kefiru jsou kefirová zrna. Kefirová zrna mají obvykle velikost 10 – 30 mm a více. Jsou to elastické hrudky, nepravidelného tvaru s nerovným povrchem, které se podobají kvěťáku. Mají pevnou strukturu a slizký vzhled. Po omytí a vysušení je barva kefirových zrn nejčastěji smetanové až slonovinové barvy. Zrna vznikají nahromaděním polysacharidů, mléčných proteinů, mikroorganismů a produktů jejich metabolismu v mléce²⁸.



Obrázek 1 – Kefirová zrna (převzato²⁹)

2.6 Složení kefirových zrn

Složení kefirových zrn se liší v závislosti na mnoha faktorech jako je například typ použitého mléka či mikrobiologické složení kultur jak samotných kefirových zrn, tak komerčních startovacích kultur²⁶.

O detailním bílkovinném složení kefirových zrn je dostupné pouze omezené množství informací. Pokud jsou zrna kultivována v syrovátce, či sójovém mléce, zvyšuje se obsah bílkovin v konečném produktu. V plnotučném mléce obsah bílkovin naopak klesá³⁰. Kefír obsahuje kompletní proteiny, což ho činí snadno stravitelným. Obsah aminokyselin se mění

v průběhu fermentace. Obsahuje vyšší hladiny threoninu, serinu, alaninu, lysinu a amoniaku než mléko. Jsou zde přítomné i další aminokyseliny – valin, izoleucin, methionin, lysin, fenylalanin a tryptofan³¹.

Typický kefir obsahuje cca 6 % sacharidů. Sacharid vyskytující se v kefiru se nazývá kefiran. Jedná se o přírodní rozvětvený heteropolysacharid obsahující stejné množství glukosy a galaktosy³².

Kromě základních živin obsahují kefirová zrna vitaminy, minerály a esenciální aminokyseliny³¹. Z minerálů se vyskytují fosfor a vápník, dále se zde vyskytuje hořčík a mikroprvky zinek, měď, mangan, železo, molybden a kobalt^{33,34}.

Kefír obsahuje hydrofilní vitaminy B₁, B₂, B₅ a C, také obsahuje lipofilní vitaminy A, K a karoteny³¹. Obsah vitaminů je ovlivněn druhem mléka a mikroflórou²⁷. Kravské mléko má nejvyšší hladinu thiaminu. Ovčí, kozí a koňské mléko má vyšší obsah pyridoxinu. Ovčí, kozí a kravské mléko obsahuje také vysoké hodnoty kyseliny listové³⁵. V průběhu fermentace dochází ke zvýšení produkce a celkového obsahu vitamínu B₆, vitamínu B₁₂, kyseliny listové a biotinu. Může docházet k poklesu hladiny vitaminu B₁ a B₂³⁴.

U kysaných mléčných výrobků je zvýšena využitelnost vápníku a fosforu o 7 – 11 % díky přítomnosti kyseliny mléčné a bioaktivním peptidům vznikajícím v gastrointestinálním traktu štěpením kaseinu trypsinem⁶.

Mikroflóra kefirových zrn

V kefirových zrnech dochází ke složité symbióze celé řady druhů bakterií a kvasinek. Právě tato symbiotická metabolická aktivita vytváří jedinečnou kefirovou chuť²³. Konkrétní složení kefirových zrn závisí vždy také na zemi původu, výrobní technologii a skladovacích technikách. Všechny tyto faktory ovlivňují fyzikálně-chemické, mikrobiologické a senzorické vlastnosti kefiru³⁶.

Obecně lze říci, že mikrobiální populace v kefirových zrnech je nejvíce zastoupena laktobacily (65 – 80 %), laktokoky (16 %) a kvasinkami (18 %) z celkové mikroflóry^{6,37}.

Arslan²⁶ uvádí, že se jedná o velmi komplexní probiotikum s převládajícími mikroorganismy rodu *Lactobacillus*. Podle Irigoyen a kol.²⁴ typickou mikroflórou kefirových zrn jsou BMK

(*Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp.), kvasinky, bakterie octového kvašení a další bakteriální populace.

Zkoumáním mikrobiologického složení kefiru a keřirových zrn se zabývala už řada níže citovaných publikací s použitím široké škály mikrobiologických a molekulárních metod²⁶. Pro identifikaci a zjišťování mikrobiálních populací se nejčastěji používá polymerázová řetězová reakce (PCR) a denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)³⁸. I přesto však mnoho druhů laktobacilů a kvasinek zůstává v keřirových zrnech neidentifikováno⁶.

Podle dostupných publikací hlavní bakteriální populací, vyskytující se ve všech keřirových zrnech, je *Lactobacillus keřiranofaciens* a *Lactobacillus keřir*³⁸. Dalšími identifikovanými bakteriálními druhy jsou např.: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lb. brevis*, *Lb. casei*, *Lb. acidophilus*, *Lb. fermentum*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Lb. parakeřir*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. fructivorans*, *Lb. hilgardii*, *Lb. paracasei*, *Lb. fermentum*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecalis*, *E. durans*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremonis*, *Pediococcus acidilactici*, *Acetobacter aceti*, *A. syzygii* a další³⁹⁻⁴⁸.

Z některých keřirových zrn mohou být izolovány i octové bakterie – *Acetobacter* spp.. Tyto bakterie hrají také významnou roli v chuti a celkové konzistenci zrn⁴³.

Z kvasinek se v keřiru nacházejí tyto druhy: *Kluyveromyces marxianus*, *K. lactis*, *Zygosaccharomyces* spp., *Z. rouxii*, *Pichia*, *Torulaspora delbrueckii*, *Torulopsis holmii*, *Candida lipolytica*, *C. holmii*, *C. keřyr*, *C. lambica*, *C. krusei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. fragilis*, *S. lactis*, *S. unisporus* a *Geotrichum candidum*^{28,41,43,45,47,49,50,51}.

Mezi kvasinky fermentující laktosu s minimální tvorbou alkoholu patří nejběžněji *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus* a *Torula keřir*. Vyskytují se i kvasinky nefermentující laktosu – *Saccharomyces cerevisiae*⁵².

V tabulce 1 je uveden aktuální přehled mikroorganismů dosud identifikovaných v keřiru a keřirových zrnech. Rozmístění populací mikroorganismů v keřirových zrnech není jednotné. *Lactobacillus keřir* se vyskytuje převážně ve vnější vrstvě, zatímco *Lactobacillus keřiranofaciens* je distribuován po celém zrně. Laktosu fermentující kvasinky jsou umístěny v okrajových vrstvách zrn, kde se mohou vyskytovat také kontaminanty jako např. koliformní bakterie a rody *Geotrichum*, *Pediococcus*, *Micrococcus* a *Enterococcus*^{6,53}.

Tabulka 1 – Hlavní mikroflóra keřirových zrn (upraveno⁶)

<i>Lactobacillus</i> ($10^8 - 5 \times 10^9 \text{ g}^{-1}$)	<i>Lactococcus</i> a <i>Leuconostoc</i> ($10^8 - 10^9 \text{ g}^{-1}$)	Kvasinky ($10^6 - 10^8 \text{ g}^{-1}$)
Homofermentativní <i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. kefiranofaciens</i> <i>Lb. kefirgranum</i>	Homofermentativní <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Sc. thermophilus</i>	Fermentující laktosu <i>Kluyveromyces marxianus</i> <i>Brettanomyces anomalus</i> <i>Debaryomyces hansenii</i>
Fakultativně nebo obligátně heterofermentativní <i>Lb. kefir</i> <i>Lb. parakefir</i> <i>Lb. brevis</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. casei</i>	Heterofermentativní <i>Lc. lactis</i> <i>Ln. lactis</i> <i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> <i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Ln. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	Nefermentující laktosu <i>Saccharomyces unisporus</i> <i>S. turicensis</i> <i>S. cerevisiae</i> <i>S. exiguus</i> <i>Torulaspora delbrueckii</i> <i>Pichia fermentans</i>

Hlavními produkty, vytvořenými během fermentace, jsou kyselina mléčná, oxid uhličitý a ethanol. Množství ethanolu a oxidu uhličitého vznikajícího při fermentaci je závislé na výrobních podmínkách⁵⁴. Biacetyl, acetoin a acetaldehyd jsou aromatické sloučeniny produkované bakteriemi *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* a *Leuconostoc* spp.³¹. Mikroorganismy z keřirových zrn jsou schopny produkce slabých organických kyselin, antibiotik s baktericidním účinkem pro patogenní mikroorganismy⁵². Produkci homofermentativních laktobacilů, především *Lactobacillus kefiranofaciens* a *Lactobacillus kefir* vzniká polysacharid keřiran⁵⁵.

2.7 Výživové a zdravotní účinky kefíru

Pro své pozitivní léčebné účinky, výživovou hodnotu a lehkou stravitelnost byl kefír konzumován v Rusku a centrální Asii již celá staletí. Nyní je stále více konzumován i v dalších oblastech světa jako jsou evropské země, severní Amerika a Japonsko³¹.

Kefír obsahuje vyšší dávky vitaminů B₁, B₂ a kyseliny listové než mléko. Kefíru jsou již celá staletí připisována různá tvrzení o jeho léčivých účincích. Většina výhod spojených s konzumací kefíru je podobná klasickým probiotikům. Především jsou důležité nutriční vlastnosti kefiranu⁶.

Jsou potvrzeny následující pozitivní účinky kefíru na zdraví. Pravidelnou konzumací kefíru dochází ke stimulaci imunitního systému. Kefír má antialergenní vlastnosti, protizánětlivé účinky a protinádorové účinky. Kefírová zrna absorbují cholesterol a mají tak hypocholesterolemický efekt, dále ovlivňují hodnotu krevního tlaku. Mezi nejdůležitější vlastnosti patří inhibice růstu patogenních mikroorganismů – antimikrobiální aktivita⁵⁶.

Další významnou vlastností může být stimulace produkce bakteriocinů a celkově blahodárné účinky na lidské zdraví a pohodu, neboť kefiran a lipidy z kefirových zrn jsou považovány za antistresové složky potravy a snižují tedy stres^{6,57}.

Podle studie Liu a kol.⁵⁸ při orálním podávání kefíru z klasického a sójového mléka došlo k inhibici růstu nádoru u myší. Výsledky této studie naznačují, že kefír může být považován za velmi slibnou složku potravin sloužících k prevenci a zvýšení odolnosti vůči rakovině gastrointestinálního traktu.

Konzumace kefíru je dobrou volbou pro jedince trpící intolerancí laktosy. Obsah laktosy v kefíru je totiž, podobně jako v dalších fermentovaných výrobcích, značně snížen³¹.

2.8 Diagnostické metody identifikace mikroorganismů

V této kapitole jsou podrobněji popsány metody aplikované v experimentální části této práce.

2.8.1 Kultivační metody

Kultivační metody patří mezi tradiční metody zahrnující vysévání mikroorganismů na selektivní média a následnou identifikaci izolátů. Hlavní nevýhodou této metody je nemožnost identifikovat nekultivovatelné organismy. Může docházet také ke vzájemné inhibici růstu mezi mikroorganismy.

2.8.2 Nekultivační metody

V posledních letech jsou pro spolehlivé určování mikrobiálních druhů stále více využívány molekulárně diagnostické metody založené na amplifikaci DNA.

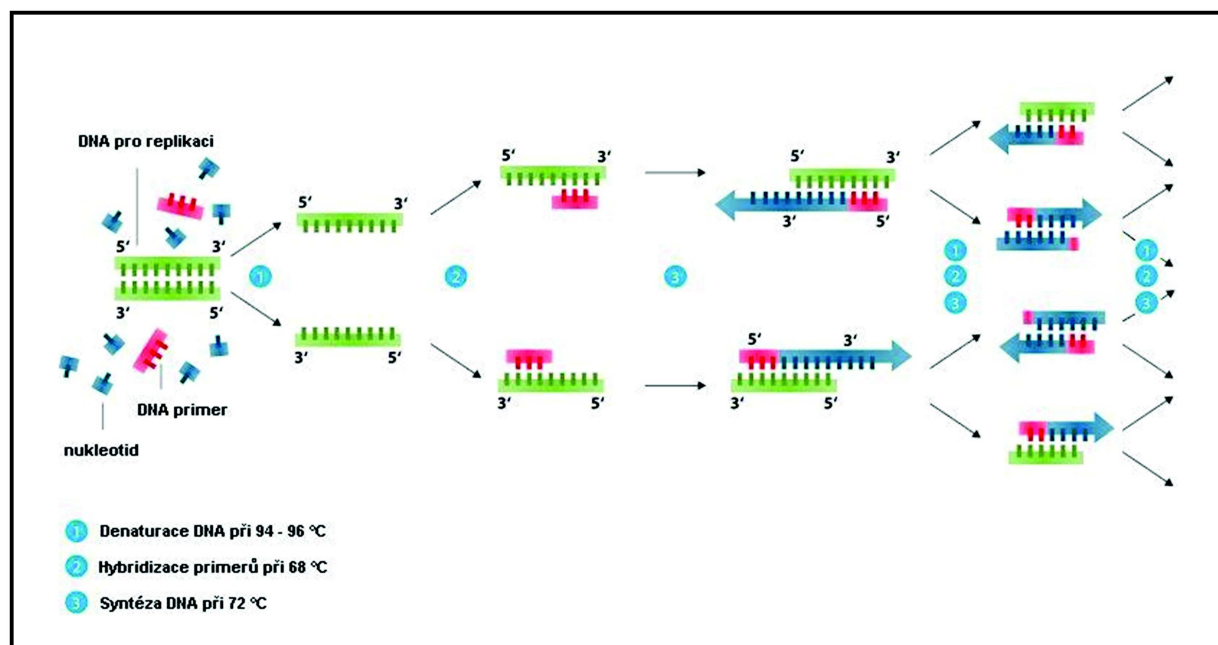
Polymerázová řetězová reakce (PCR) je technika založená na syntéze specifické sekvence DNA. Amplifikované sekvence jsou nezbytné pro diagnostické účely a například i genetické manipulace. Metodu PCR lze využít pro detekci patogenů v potravinách, složkách potravin, krmiv a zemědělských komodit. Tyto metody jsou používány ve velkém množství zemědělských a potravinářských provozů⁵⁷.

Amplifikační metody vynikají vysokou sensitivitou a specifitou a jsou použitelné i při nízkém počtu cílových nukleových kyselin v analyzovaném vzorku⁵⁹.

Amplifikace DNA metodou polymerázové řetězové reakce

PCR je založena na amplifikaci templátové DNA pomocí dvou primerů (krátkých oligonukleotidů). Primery se komplementárně párují s templátovou DNA a vymezují specifický úsek DNA. K tomuto úseku je pomocí enzymu polymerasy vytvořen komplementární řetězec DNA a tvoří se tak až miliony kopií konkrétní vybrané sekvence. V průběhu PCR se střídají 3 kroky. V prvním kroku dochází k denaturaci DNA, tedy uvolnění vodíkových můstků a z dvouřetězcové DNA (dsDNA) vzniknou dvě jednořetězcové DNA (ssDNA). Dalším krokem je hybridizace (připojení) primerů k templátové ssDNA, tedy ohraničení cílového úseku, který bude následně amplifikován. Posledním krokem je syntéza nového vlákna DNA (vznik dsDNA). Hodnoty teplot se u daných kroků liší stejně jako doba

trvání jednotlivých cyklů. Kroky PCR se 25 – 35x cyklicky opakují. Nově vytvořená DNA se vždy v dalším cyklu stává templátovou DNA. Celý proces probíhá v přístroji zvaném termocykler, který automaticky mění teplotu v naprogramovaných časových intervalech⁵⁹.



Obrázek 2 – Polymerázová řetězová reakce (upraveno⁶⁰)

PCR směs připravená pro průběh PCR se skládá z PCR vody, reakčního pufru, hořčnatých iontů, dNTPs, DNA polymerasy, primerů a templátové DNA. Pro zhodnocení správného průběhu PCR je nezbytné použití kontrol. Negativní kontrola ověřuje čistotu PCR komponent a pozitivní funkčnost všech složek reakce. Pro potlačení kontaminace je nezbytná práce ve speciálních laminárních boxech vyzářených UV světlem. DNA je nutné přidávat v oddělených prostorech, aby nedocházelo ke kontaminaci.

Identifikace PCR produktů za pomoci gelové elektroforézy

Pro identifikaci a separaci fragmentů DNA, které byly získány pomocí metody PCR, je možné využít řadu různých metod. Nejčastěji se však vzhledem k ceně a náročnosti používá elektroforéza v agarosovém, nebo polyakrylamidovém gelu. Výběr typu gelu a jeho koncentrace je závislý na velikosti produktu PCR, tedy fragmentů DNA o různých

molekulových hmotnostech. Fragmenty DNA jsou děleny v elektrickém poli dle velikosti. Velikost fragmentů je udávána v počtu párů bází (pb).

PCR produkty jsou nanесeny na gel a vloženy do elektroforetické vany. Na základě záporného náboje ampliconů dochází po vložení napětí k migraci gelem od katody ke kladně nabitě anodě. Rychlost pohybu molekul DNA je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti. PCR produkty jsou obarveny ethidium bromidem, aby mohly být pozorovány v ultrafialovém světle. Velikost amplifikovaného fragmentu DNA je porovnávána se standardem obsahujícím různě dlouhé fragmenty DNA a podle toho je posuzována přítomnost genu ve vzorku⁵⁹.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Vzorky

Modelové vzorky sýrů byly vyrobeny v poloprovozních podmínkách ve spolupráci se soukromým výrobcem s použitím standardního technologického postupu pro kyselé sýry. Jako surovina bylo použito syrové (nepasterizované) mléko v „bio“ kvalitě. Vzhledem k tomu, že výrobek bude v dohledné době patentován, není zde uveden z důvodu utajení přesný postup výroby, použité kultury apod. Vzorky byly uchovávány v lednici při teplotě nižší než 6 °C až do doby analýzy.

3.2 Mikrobiologické hodnocení pomocí molekulárně diagnostických metod

3.2.1 Použité chemikálie a roztoky

- Agarosa pro elektroforézu (Serva, Heidelberg, SRN)
- CIZ (směs chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, ČR)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma, St. Louis, USA)
- Ethanol 96% (Lachema, Brno, ČR)
- Ethidium bromid (5 mg.ml^{-1}) (Sigma, St. Louis, USA)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) (Serva, Heidelberg, SRN)
- Fenol (Lachema, Brno, ČR)
- Chloroform (Lachema, Brno, ČR)
- Isoamylalkohol (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina boritá (Lachema, Brno, ČR)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, ČR)
- Lysozym (Serva, Heidelberg, SRN)
- Lyzační roztok (1 M Tris-HCl (pH 7,8), 0,5 M EDTA (pH 8,0) a destilovaná voda)
- Octan sodný (Lachema, Brno, ČR)
- Proteináza K (Serva, Heidelberg, SRN)
- $0,5 \times$ TBE pufr (Tris-base (54 g.l^{-1}), kyselina boritá ($27,5 \text{ g.l}^{-1}$), destilovaná voda a 0,5 M EDTA)
- TE pufr (1 M Tris-HCl (pH 7,8), 0,5 M EDTA (pH 8,0) a destilovaná voda)

- Tris-HCl (1M Tris-base (121 g.l^{-1}), destilovaná voda, koncentrovaná HCl pro úpravu pH)
- Tris-hydroxymethyl-aminomethan (Tris-base) (Serva, Heidelberg, SRN)

3.2.2 Komponenty pro PCR

- Master mix (qPCR 2x SYBR Mastermix 2x conc. + Mg^{2+}) (Top-Bio, Praha ČR)
- Reakční pufr kompletní 1.1 (10x koncentrovaný) (Top-Bio, Praha, ČR)
- PCR voda (Top-Bio, Praha, ČR)
- dNTP směs (10 mM) (Top-Bio, Praha, ČR)
- *Taq* DNA polymerasa 1.1 ($1 \text{ U.}\mu\text{l}^{-1}$) (Top-Bio, Praha, ČR)
- Specifické primery
- Nanášecí pufr Yeallow load (Top-Bio, Praha, ČR)
- DNA standard (100 bp) (Top-Bio, Praha, ČR)

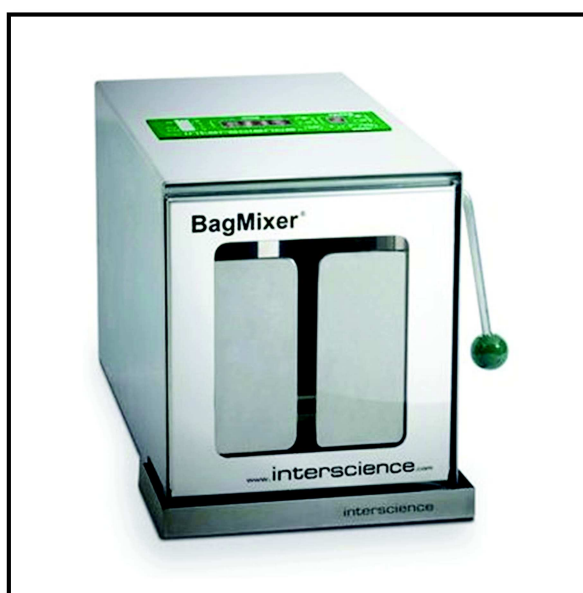
3.2.3 Použité přístroje a pomůcky

- Analytické váhy OHAUS Pioneer (Ohaus, New Jersey, USA)
- BagMixer 400 W (Interscience, Francie)
- Běžné laboratorní sklo, pomůcky a plastový materiál
- Centrifuga MINI Spin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Exsikátor N 86 KN.18 (KNF Neuberger Labport, Freiburg, SRN)
- Mikropipety Discovery Comfort (HTL Lab Solutions, Varšava, Polsko)
- Mikrovlnná trouba PROLINE SM117
- Mraznička a chladnička
- Nanodrop 2000 Spectrophotometer Thermo Scientific (Thermo Scientific, USA)
- Termostat – Mini inkubator (Labnet, New Jersey, USA)
- Thermal cycler BIOER (BIOER, Čína)
- Transiluminátor TVR 3121 (Spectroline, USA)
- UV-cleaner box (BioSan, Riga, Litva)
- Zařízení pro elektroforézu (OWL Buffer Puffer, Loughborough, UK)
- Zdroj elektrického napětí Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)

3.2.4 Použité metody a postupy

Příprava hrubých lyzátů buněk pomocí přístroje BagSystem

- bylo naváženo 10,0 g vzorku sýru
- toto množství sýru bylo vloženo do sterilního sáčku s membránou BagFilter, dále bylo přidáno 2,5násobné množství sterilní vody (25 ml)
- sáček byl vložen do stomacheru a vzorek byl 25 minut homogenizován
- ze sáčku (z prostoru za membránou) bylo pipetou odebráno 1,5 ml homogenizovaného vzorku, který byl centrifugován 3 minuty při $10\,000\text{ ot.min}^{-1}$
- supernatant byl slit a k sedimentu byl přidán další 1 ml vzorku, opět následovala centrifugace po dobu 3 minut při $10\,000\text{ ot.min}^{-1}$
- supernatant byl opět slit a sediment byl promyt 1 ml sterilní vody, opět následovala centrifugace po dobu 3 minut při $10\,000\text{ ot.min}^{-1}$
- supernatant byl opět slit a sediment byl rozsuspendován v 1 ml lyzačního roztoku (roztok lysosymu 0,1 g/ml)
- vzorek byl ponechán 1 hodinu při laboratorní teplotě
- ke vzorku bylo přidáno 50 μl 20% SDS a 5 μl proteinasy K (100 $\mu\text{l/ml}$)
- roztok byl ponechán v inkubátoru při $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ lyzovat se do dalšího dne
- získaný roztok byl skladován v mrazničce při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$



Obrázek 3 – BagMixer (převzato⁶¹)

Izolace DNA z hrubých lyzátů buněk pomocí fenolové extrakce

- rozmrazení DNA při laboratorní teplotě
- k 500 μl hrubého lyzátu buněk je přidán stejný objem fenolu (předestilovaného, pH upraveno na 7,8)
- směs se nejdříve opatrně promíchává 4 minuty kývavým pohybem, poté se centrifuguje při 13 400 $\text{ot} \cdot \text{min}^{-1}$ po dobu 5 minut
- do čisté Eppendorfovy zkumavky se odebere vodní fáze obsahující DNA
- vodní fáze se doplní TE pufrém na objem 500 μl a poté se přidá 700 μl směsi chloroform-isoamylalkohol (24:1)
- směs se nejdříve opatrně promíchává 4 minuty kývavým pohybem, poté se centrifuguje při 13 400 $\text{ot} \cdot \text{min}^{-1}$ po dobu 5 minut
- do čisté Eppendorfovy zkumavky se opět odebere horní vodní fáze s DNA
- DNA je dále přečištěna srážením ethanolem

Přečištění DNA srážením ethanolem

- ke vzorku se přidá 1/20 objemu (25 μl) octanu sodného ($c = 3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a promíchá se
- 96% ethanolem vychlazeným na teplotu -20°C je směs doplněna na objem 1,5 ml
- DNA se sráží při -20°C po dobu 30 minut
- směs se centrifuguje při 13 400 $\text{ot} \cdot \text{min}^{-1}$ po dobu 15 minut
- poté je opatrně odlit supernatant a dále se pracuje se sedimentem
- sediment DNA se suší v exsikátoru po dobu asi 15 minut
- DNA se rozpustí ve 100 μl TE pufru a dále se uchovává při 4°C

Měření koncentrace DNA

- vzorky DNA byly promíchány a následně centrifugovány
- koncentrace DNA je měřena na přístroji NANODROP 2000 Spektrofotometr Thermo Scientific
- nejprve je nutné očištění přístroje 2 μl destilované vody
- poté je nanesen 1 μl blanku (v tomto případě TE pufru)
- dále jsou proměřeny jednotlivé vzorky (vždy 1 μl , každý minimálně 2x)

- po další použití se vzorky DNA naředí na koncentraci $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$



Obrázek 4 – NanoDrop 2000 Thermo Scientific (převzato⁶²)

PCR

- PCR byla provedena za použití primerů specifických pro doménu *Bacteria*, rod *Lactobacillus*, druh *Lactobacillus casei*, rod *Lactococcus*, rod *Bifidobacterium*, rod *Streptococcus*, celkové kvasinky, rod *Bacillus* a rod *Salmonella*
- připraví se komponenty PCR reakce, promíchají se a krátce centrifugují
- pracuje se ve sterilním prostředí UV boxu, který byl zapnutý 15 minut
- do Eppendorfovy zkumavky připravíme směs komponent o složení odpovídající jednotlivým primerům vynásobený počtem vzorků a kontrol – tzv. master mix
- master mix rozpipetujeme do jednotlivých Eppendorfových zkumavek a přidáme DNA
- připraví se negativní kontrola – PCR směs bez DNA matrice (místo DNA se do směsi může přidat PCR voda)
- připraví se pozitivní kontrola – PCR směs s DNA ze sbírkového kmene odpovídající použitému primeru
- vzorky PCR směsi se promíchají a krátce centrifugují

- vzorky se umístí do cykleru, který je nastaven dle programu specifického pro dané stanovení (primer)

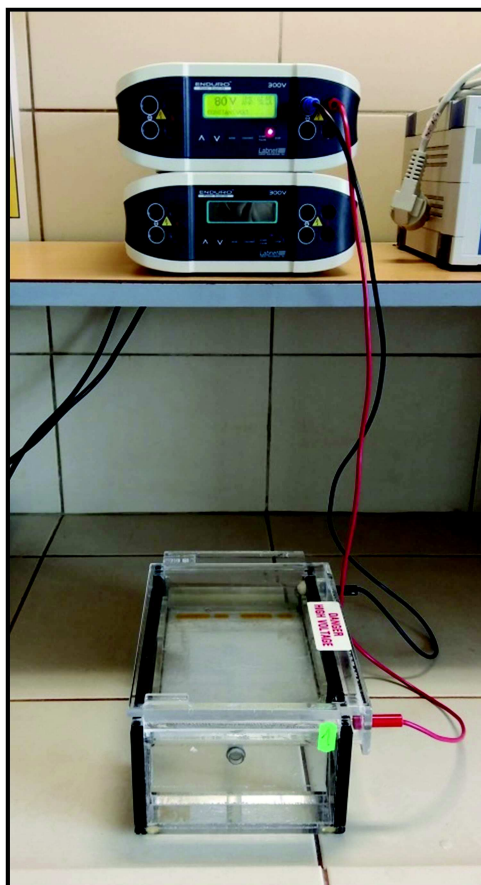


Obrázek 5 – Thermo cycler BIOER (upraveno⁶³)

Detekce produktu PCR pomocí agarosové gelové elektroforézy

- je připraven 1,8% agarosový gel (navážka 0,9 g agarosy je smíchána s 50 ml 0,5x TBE pufrem)
- suspenze se pečlivě rozvaří v mikrovlnné troubě a poté je nalita do elektroforetické vaničky s hřebínkem a nechá se asi 30 minut tuhnout
- před nanášením vzorků se hřebínek opatrně vyjme
- na podložce je smícháno 25 μ l DNA s 5 μ l nanášecího pufu (6x koncentrovaného)
- směs je nanášena do komůrek gelu
- gel je vložen do elektroforetické vaničky v orientaci, aby DNA migrovala směrem k anodě
- vanička s gelem je opatrně převrstvena 0,5x TBE pufrem a zapne se zdroj gelové elektroforézy
- separace je ukončena v okamžiku, kdy bromfenolová modř obsažená v nanášecím pufu doputuje do 2/3 délky agarosového gelu

- po skončení elektroforézy je gel vložen pro obarvení do vaničky s ethidium bromidem po dobu cca 25 minut
- gel se poté opláchne v destilované vodě a umístí na transluminátor a vyhodnotí se v UV světle při vlnové délce $\lambda=305$ nm
- gel je zdokumentován vyfotografováním digitálním fotoaparátem



Obrázek 6 – Gelová elektroforéza

3.2.4.1 PCR pro doménu Bacteria

Tabulka 2 – Použité PCR primery pro doménu Bacteria⁶⁴

Primer	Sekvence (5'-3')	Velikost produktu [bp]
F_eub	TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	466
R_eub	GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	

Tabulka 3 – Složení PCR směsi pro doménu Bacteria

Komponenta	Objem [μl]
qPCR 2x SYBR Master mix	12,5
PCR voda	7,5
Primer F_eub (10 pmol/μl)	1
Primer R_eub (10 pmol/μl)	1
DNA matrice (10 ng/μl)	3
Celkový objem	25

Tabulka 4 – Amplifikační program pro doménu Bacteria

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
Iniciace	95	300	1
Denaturace DNA	95	30	30
Hybridizace primerů	55	30	30
Syntéza DNA	72	30	30
Terminace	72	300	1

3.2.4.2 PCR pro rod *Lactobacillus* podle Duberneta

Tabulka 5 – Použité PCR primery pro rod *Lactobacillus*⁶⁵

Primer	Sekvence (5'-3')	Velikost produktu [bp]
LbLMA-1	CTC AAA ACT AAA CAA AGT TTC	250
R16-1	CTT GTA CAC ACC GCC CGT CA	

Tabulka 6 – Složení PCR směsi pro rod *Lactobacillus*

Komponenta	Objem [μl]
qPCR 2x SYBR Master mix	12,5
PCR voda	7,5
Primer LbLMA-1 (10 pmol/μl)	1
Primer R16-1 (10 pmol/μl)	1
DNA matrice (10 ng/μl)	3
Celkový objem	25

Tabulka 7 – Amplifikační program pro rod *Lactobacillus*

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
Iniciace	95	300	1
Denaturace DNA	95	30	30
Hybridizace primerů	55	30	30
Syntéza DNA	72	30	30
Terminace	72	600	1

3.2.4.3 PCR pro druh *Lactobacillus casei*

Tabulka 8 – Použité PCR primery pro druh *Lactobacillus casei*⁶⁶

Primer	Sekvence (5'-3')	Velikost produktu [bp]
Pr-I	CAG ACT GAA AGT CTG ACG G	400 a 200
Cas-II	GCG ATG CGA ATT TCT TTT TC	

Tabulka 9 – Složení PCR směsi pro druh *Lactobacillus casei*

Komponenta	Objem [μl]
Voda pro PCR	13,5
10x reakční pufr kompletní	2,5
Směs dNTP	1
Primer Pr-I (10 pmol/μl)	1
Primer Cas-II (10 pmol/μl)	1
Tag DNA polymeráza (1 U/μl)	1
DNA matrice (10 ng/μl)	5
Celkový objem	25

Tabulka 10 – Amplifikační program pro druh *Lactobacillus casei*

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
Iniciace	94	300	1
Denaturace DNA	94	30	30
Hybridizace primerů	55	30	30
Syntéza DNA	72	60	30
Terminace	72	300	1

3.2.4.4 PCR pro rod *Lactococcus*

Tabulka 11 – Použité PCR primery pro rod *Lactococcus*⁶⁷

Primer	Sekvence (5'-3')	Velikost produktu [bp]
PALA4	CTT CAA CAG ACA AGT CC	1131
PALA14	GAT AAA TGA TTC CAA GC	

Tabulka 12 – Složení PCR směsi pro *Lactococcus*

Komponenta	Objem [μl]
qPCR 2x SYBR Master mix	12,5
PCR voda	8,5
Primer PALA4 (10 pmol/μl)	1
Primer PALA14 (10 pmol/μl)	1
DNA matrice (10 ng/μl)	2
Celkový objem	25

Tabulka 13 – Amplifikační program pro *Lactococcus*

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
Iniciace	94	300	1
Denaturace DNA	94	60	30
Hybridizace primerů	45	60	30
Syntéza DNA	68	120	30
Terminace	68	600	1

3.2.4.5 PCR pro rod *Bifidobacterium* (Bif-164, Bif-662)

Tabulka 14 – Použité PCR primery pro rod *Bifidobacterium* (Bif-164, Bif-662)⁶⁸

Primer	Sekvence (5'-3')	Velikost produktu [bp]
Bif-164	GGG TGG TAA TGC CGG ATG	523
Bif-662	CCA CCG TTA CAC CGG GAA	

Tabulka 15 – Složení PCR směsi pro rod *Bifidobacterium* (Bif-164, Bif-662)

Komponenta	Objem [μl]
qPCR 2x SYBR Master mix	12,5
PCR voda	8,5
Primer Bif-164 (10 pmol/μl)	1
Primer Bif-662 (10 pmol/μl)	1
DNA matrice (10 ng/μl)	2
Celkový objem	25

Tabulka 16 – Amplifikační program pro rod *Bifidobacterium* (Bif-164, Bif-662)

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
Iniciace	94	300	1
Denaturace DNA	94	60	35
Hybridizace primerů	55	60	35
Syntéza DNA	72	60	35
Terminace	72	300	1

3.2.4.6 PCR pro rod *Bifidobacterium* (Rallbif, Fallbif)

Tabulka 17 – Použité PCR primery pro rod *Bifidobacterium* (Rallbif, Fallbif)⁶⁹

Primer	Sekvence (5'-3')	Velikost produktu [bp]
Rallbif	GGG ATG CTG GTG TGG AAG AGA	231
Fallbif	TGC TCG CGT CCA CTA TCC AGT	

Tabulka 18 – Složení PCR směsi pro rod *Bifidobacterium* (Rallbif, Fallbif)

Komponenta	Objem [μl]
qPCR 2x SYBR Master mix	12,5
PCR voda	7,5
Primer Rallbif (10 pmol/μl)	1
Primer Fallbif (10 pmol/μl)	1
DNA matrice (10 ng/μl)	3
Celkový objem	25

Tabulka 19 – Amplifikační program pro rod *Bifidobacterium* (Rallbif, Fallbif)

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
Iniciace	94	600	1
Denaturace DNA	94	60	30
Hybridizace primerů	55	60	30
Syntéza DNA	72	120	30
Terminace	72	300	1

3.2.4.7 PCR pro rod *Streptococcus*

Tabulka 20 – Použité PCR primery pro rod *Streptococcus*⁷⁰

Primer	Sekvence (5'-3')	Velikost produktu [bp]
S.therm-1	CAC TAT GCT CAG AAT ACA	968
S.therm-2	CGA ACA GCA TTG ATG TTA	

Tabulka 21 – Složení PCR směsi pro rod *Streptococcus*

Komponenta	Objem [μl]
Voda pro PCR	15
10x reakční pufr kompletní	2,5
Směs dNTP	0,5
Primer S.therm-1 (10 pmol/μl)	0,5
Primer S.therm-2 (10 pmol/μl)	0,5
Tag DNA polymeráza (1 U/μl)	1
DNA matrice (10 ng/μl)	5
Celkový objem	25

Tabulka 22 – Amplifikační program pro rod *Streptococcus*

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
Iniciace	95	300	1
Denaturace DNA	95	60	30
Hybridizace primerů	58	60	30
Syntéza DNA	72	60	30
Terminace	72	300	1

3.2.4.8 PCR pro kvasinky

Tabulka 23 – Použité PCR primery pro kvasinky⁷¹

Primer	Sekvence (5'-3')	Velikost produktu [bp]
Oli-F	CGT CAT AGA GGG TGA GAA TCC	152
Oli-R	ACT TGT TCG CTA TCG GTC TC	

Tabulka 24 – Složení PCR směsi pro kvasinky

Komponenta	Objem [μl]
qPCR 2x SYBR Master mix	12,5
PCR voda	8,5
Primer Oli-F (10 pmol/μl)	1
Primer Oli-R (10 pmol/μl)	1
DNA matrice (10 ng/μl)	2
Celkový objem	25

Tabulka 25 – Amplifikační program pro kvasinky

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
Iniciace	94	300	1
Denaturace DNA	94	60	30
Hybridizace primerů	51	30	30
Syntéza DNA	72	60	30
Terminace	72	300	1

3.2.4.9 PCR pro rod *Bacillus*

Tabulka 26 – Použité PCR primery pro rod *Bacillus*⁷²

Primer	Sekvence (5'-3')	Velikost produktu [bp]
BK1F	TCACCAAGGCRACGATGCG	1100
BK1R	CGTATTACCGCGGCATG	

Tabulka 27 – Složení PCR směsi pro rod *Bacillus*

Komponenta	Objem [μl]
qPCR 2x SYBR Master mix	12,5
PCR voda	7,5
Primer BK1F (10 pmol/μl)	1
Primer BK1R (10 pmol/μl)	1
DNA matrice (10 ng/μl)	3
Celkový objem	25

Tabulka 28 – Amplifikační program pro rod *Bacillus*

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
Iniciace	95	300	1
Denaturace DNA	95	60	30
Hybridizace primerů	63	60	30
Syntéza DNA	72	60	30
Terminace	72	300	1

3.2.4.10 PCR pro rod *Salmonella*

Tabulka 29 – Použité PCR primery pro rod *Salmonella*⁷³

Primer	Sekvence (5'-3')	Velikost produktu [bp]
ST11	GCC AAC CAT TGC TAA ATT GGC GCA	429
ST15	GGT AGA AAT TCC CAG CGG GTA CTG G	

Tabulka 30 – Složení PCR směsi pro rod *Salmonella*

Komponenta	Objem [μl]
Voda pro PCR	17
10x reakční pufr kompletní	2,5
Směs dNTP	1
Primer ST11 (10 pmol/μl)	1
Primer ST15 (10 pmol/μl)	1
Tag DNA polymeráza (1 U/μl)	0,5
DNA matrice (10 ng/μl)	2
Celkový objem	25

Tabulka 31 – Amplifikační program pro rod *Salmonella*

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
Iniciace	95	300	1
Denaturace DNA	95	30	35
Hybridizace primerů	57	30	35
Syntéza DNA	72	30	35
Terminace	72	600	1

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce je pilotní částí rozsáhlé studie, která se bude zabývat výrobou a charakterizací sýrů. Ve spolupráci se soukromým výrobcem budou vyrobeny modelové vzorky s použitím standardního technologického postupu pro kyselé sýry; jako surovina bude použito syrové mléko získané jako produkt ekologického zemědělství („bio“). Vzorky budou podrobeny komplexnímu chemickému a mikrobiologickému rozboru. Z hlediska mikrobiologického bude zvláštní pozornost věnována eventuální přítomnosti patogenních mikroorganismů. Cílem bude zhodnotit senzorickou a nutriční kvalitu a především zdravotní nezávadnost sýrů s ohledem na to, jaká surovina byla použita pro jejich výrobu.

V rámci této práce byly provedeny první experimenty zaměřené na mikrobiologický rozbor vzorků s cílem identifikovat mikrobiální druhy přítomné ve vzorcích. Pro identifikaci mikroorganismů v sýrech byla použita metoda PCR, která má oproti klasickým kultivačním metodám řadu výhod. Mezi ty hlavní patří vysoká specifita a citlivost, jednoduchost a robustnost. Je zvláště vhodná k detekci mikroorganismů, u kterých není možná klasická kultivace, nebo je příliš náročná a zdlouhavá.

4.1 Výsledky mikrobiologického hodnocení pomocí PCR

4.1.1 Spektrofotometrické stanovení čistoty a koncentrace DNA

DNA z modelového vzorku sýru byla izolována metodou fenolové extrakce a purifikována následným vysrážením ethanolem. Takto izolovaná DNA je v kvalitě vhodné pro molekulárně genetické aplikace. Koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky. Postup je uveden v kapitole 3.3.5. Výsledky spektrofotometrického stanovení jsou shrnuty v tabulce 32.

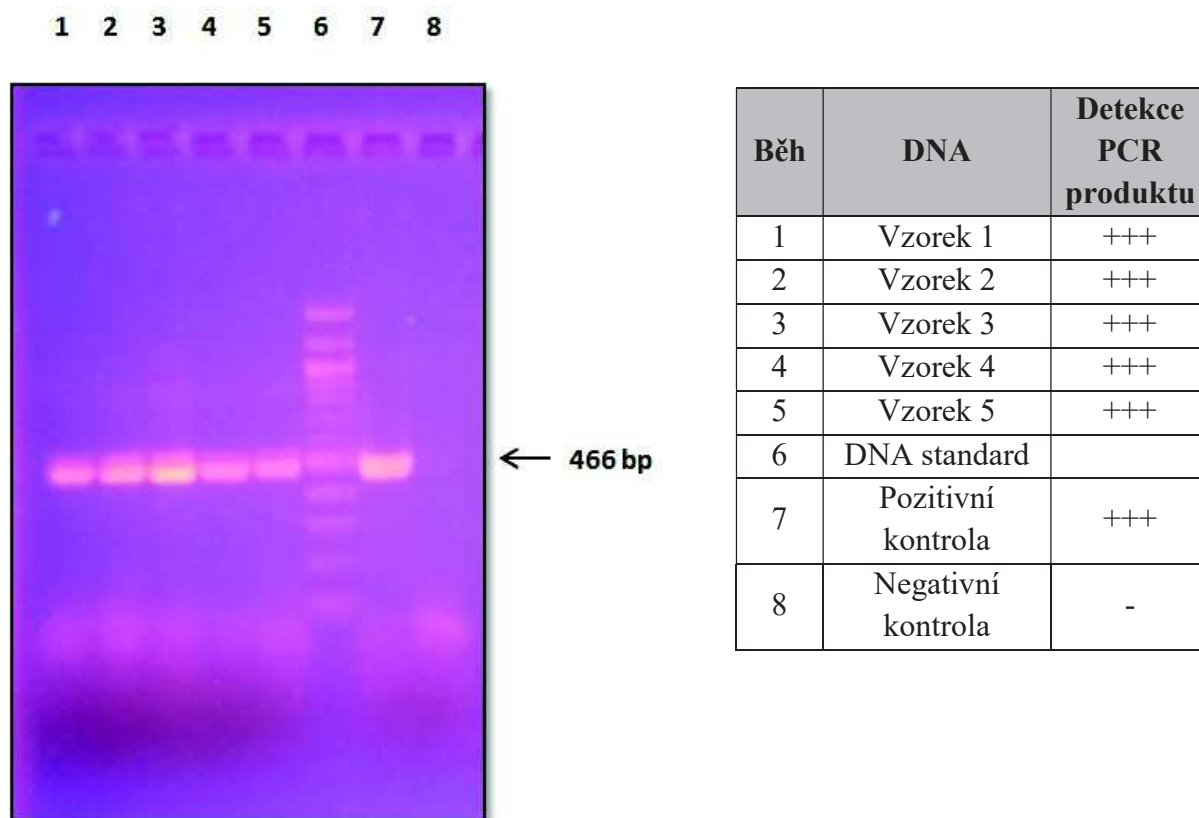
DNA byla změřena v rozmezí vlnových délek 230 – 320 nm. Čistota byla stanovena z poměru absorbancí A_{260}/A_{280} . Hodnoty se pohybovaly v rozmezí 1,310 – 1,440, což značí znečištění proteiny. Koncentrace DNA v jednotlivých vzorcích se pohybovala od 21,00 – 113,50 ng.μl⁻¹. Po zjištění hodnoty koncentrací DNA byly vzorky naředěny na koncentraci 10 ng.μl⁻¹ a dále použity v polymerázové řetězové reakci.

Tabulka 32 – Spektrofotometrické stanovení DNA

Vzorek	Koncentrace DNA (ng,µl⁻¹)	A₂₆₀	A₂₈₀	A₂₆₀/A₂₈₀	A₂₆₀/A₂₃₀
1	113,50	2,270	1,578	1,440	1,015
2	21,85	0,437	0,335	1,310	0,345
3	21,00	0,419	0,292	1,435	0,490
4	96,35	1,927	1,455	1,325	1,105
5	82,5	1,651	1,259	1,315	1,140

4.1.2 Důkaz přítomnosti DNA domény *Bacteria*

Dle postupu PCR uvedeného v kapitole 3.3.5.1 byla ověřena přítomnost bakteriální DNA. Za použití specifických primerů (F_eub a R_eub) pro doménu *Bacteria*⁶⁴ byl amplifikován (dle programu uvedeného v tabulce 4) specifický úsek DNA (466 bp). PCR produkty byly detekovány pomocí gelové elektroforézy. Pro pozitivní kontrolu byla použita DNA druhu *Lactobacillus casei* o koncentraci 10 ng.μl⁻¹. Výsledky jsou znázorněny na obrázku 7.



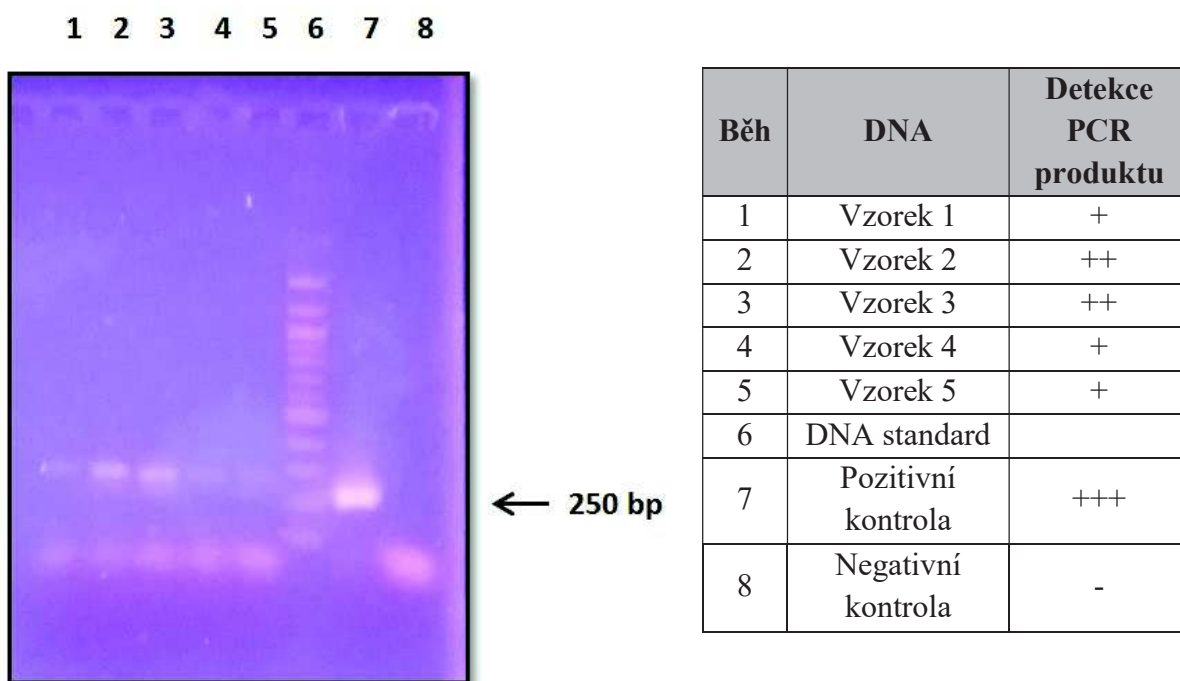
pozn.: +++ produkt PCR detekován silně, ++ produkt PCR detekován zřetelně, + produkt PCR detekován slabě, - produkt PCR nedetekován

Obrázek 7 – Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro doménu *Bacteria*⁶⁴ se schématem nanesení a vyhodnocením detekce PCR produktu

Provedení PCR za použití daných primerů potvrdilo přítomnost bakteriální DNA ve vzorcích modelového sýru (obrázek 7).

4.1.3 Důkaz přítomnosti DNA rodu *Lactobacillus*

Dle postupu PCR uvedeného v kapitole 3.3.5.2 byla ověřena přítomnost DNA rodu *Lactobacillus*. Za použití specifických primerů (LbLMA-1 a R16-1) pro tento rod⁶⁵ byl amplifikován (dle programu uvedeného v tabulce 7) specifický úsek DNA (250 bp). PCR produkty byly detekovány pomocí gelové elektroforézy. Pro pozitivní kontrolu byla použita DNA druhu *Lactobacillus casei* o koncentraci 10 ng.μl⁻¹. Výsledky jsou znázorněny na obrázku 8.



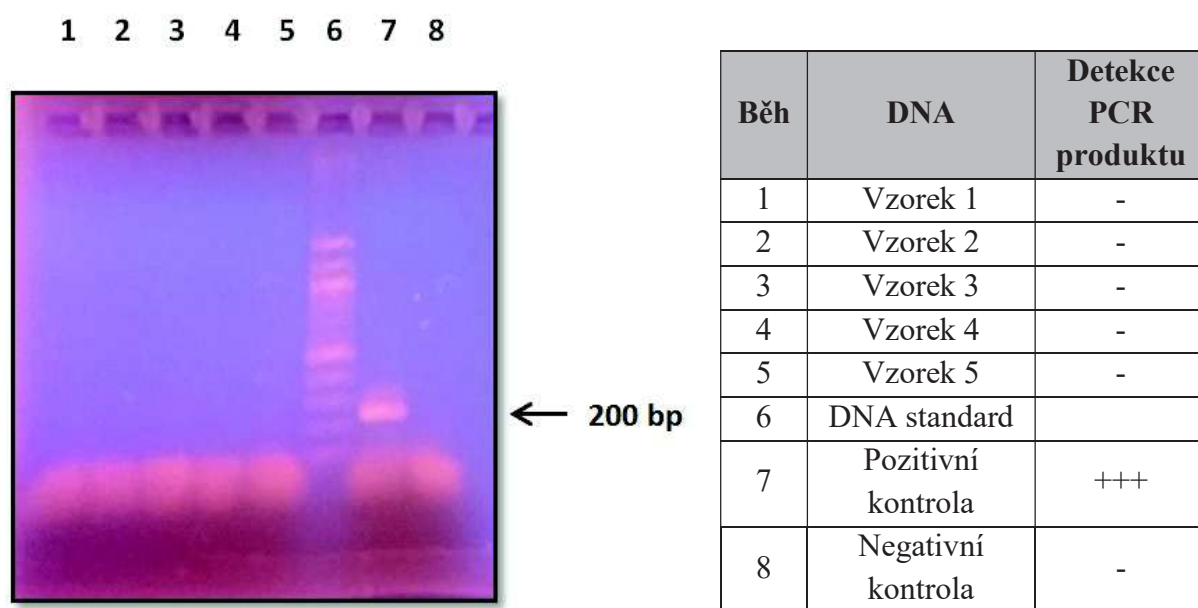
pozn.: +++ produkt PCR detekován silně, ++ produkt PCR detekován zřetelně, + produkt PCR detekován slabě, - produkt PCR nedetekován

Obrázek 8 - Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Lactobacillus*⁶⁵ se schématem nanesení a vyhodnocením detekce PCR produktu

Provedení PCR za použití daných primerů potvrdilo přítomnost DNA rodu *Lactobacillus* ve vzorcích modelového sýru (obrázek 8).

4.1.4 Důkaz přítomnosti DNA druhu *Lactobacillus casei*

Dle postupu PCR uvedeného v kapitole 3.3.5.3 byla ověřena přítomnost DNA druhu *Lactobacillus casei*. Za použití specifických primerů (Pr-I a Cas-II) pro tento rod⁶⁶ byl amplifikován (dle programu uvedeného v tabulce 10) specifický úsek DNA (400 a 200 bp). PCR produkty byly detekovány pomocí gelové elektroforézy. Pro pozitivní kontrolu byla použita DNA druhu *Lactobacillus casei* o koncentraci 10 ng.μl⁻¹. Výsledky jsou znázorněny na obrázku 9.



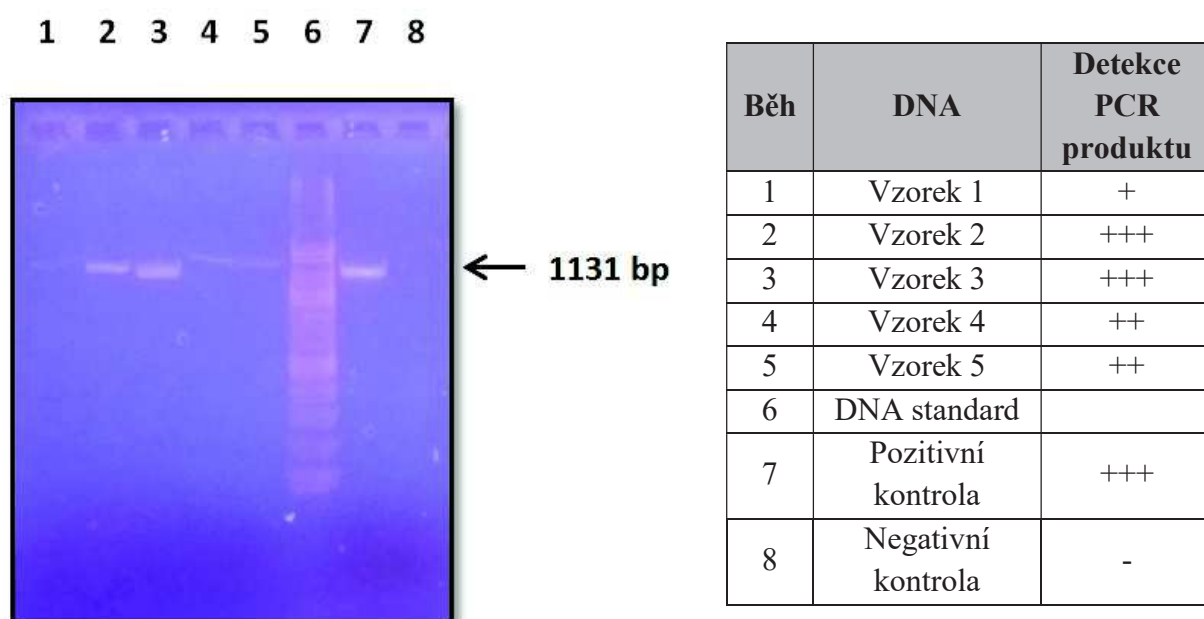
pozn.: +++ produkt PCR detekován silně, ++ produkt PCR detekován zřetelně, + produkt PCR detekován slabě, - produkt PCR nedetekován

Obrázek 9 – Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro druh *Lb. casei*⁶⁶ se schématem nanesení a vyhodnocením detekce PCR produktu

Provedení PCR za použití daných primerů nepotvrdilo přítomnost DNA druhu *Lactobacillus casei* ve vzorcích modelového sýru (obrázek 9).

4.1.5 Důkaz přítomnosti DNA rodu *Lactococcus*

Dle postupu PCR uvedeného v kapitole 3.3.5.4 byla ověřena přítomnost DNA rodu *Lactococcus*. Za použití specifických primerů (PALA4 a PALA14) pro tento rod⁶⁷ byl amplifikován (dle programu uvedeného v tabulce 13) specifický úsek DNA (1131 bp). PCR produkty byly detekovány pomocí gelové elektroforézy. Pro pozitivní kontrolu byla použita DNA druhu *Lactococcus lactis* o koncentraci 10 ng.μl⁻¹. Výsledky jsou znázorněny na obrázku 10.



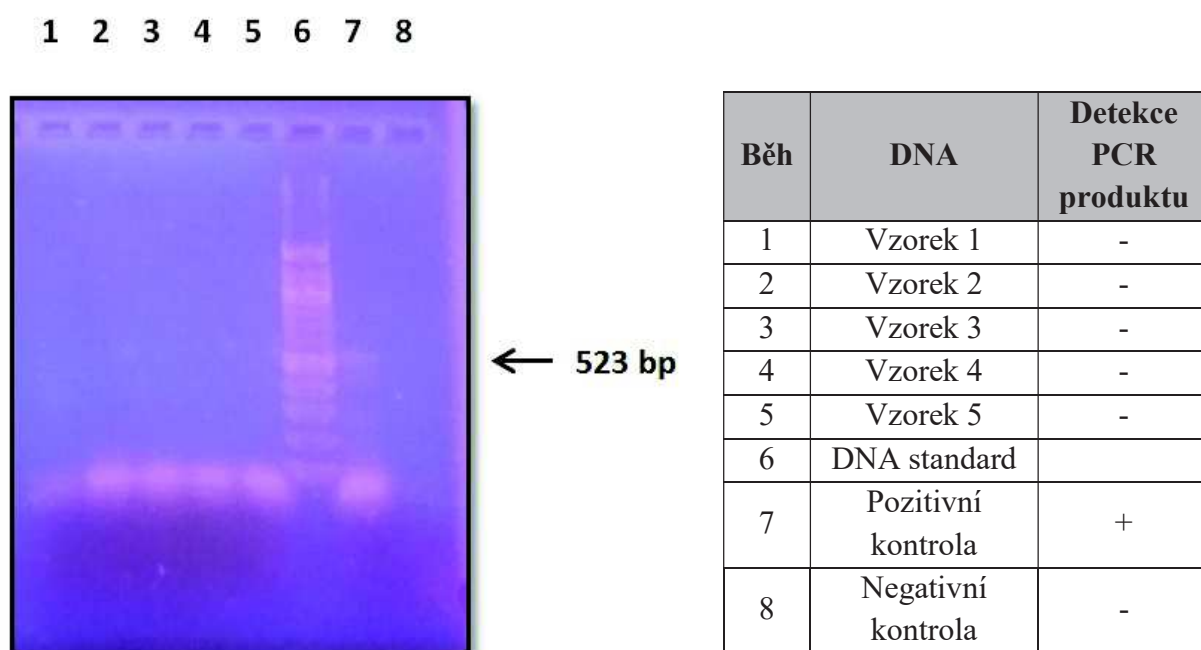
pozn.: +++ produkt PCR detekován silně, ++ produkt PCR detekován zřetelně, + produkt PCR detekován slabě, - produkt PCR nedetekován

Obrázek 10 – Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Lactococcus*⁶⁷ se schématem nanesení a vyhodnocením detekce PCR produktu

Provedení PCR za použití daných primerů potvrdilo přítomnost DNA rodu *Lactococcus* ve vzorcích modelového sýru (obrázek 10).

4.1.6 Důkaz přítomnosti DNA rodu *Bifidobacterium* (primery Bif-164, Bif-662)

Dle postupu PCR uvedeného v kapitole 3.3.5.5 byla ověřena přítomnost DNA rodu *Bifidobacterium*. Za použití specifických primerů (Bif-164, Bif-662) pro tento rod⁶⁸ byl amplifikován (dle programu uvedeného v tabulce 16) specifický úsek DNA (523 bp). PCR produkty byly detekovány pomocí gelové elektroforézy. Pro pozitivní kontrolu byla použita DNA druhu *Bifidobacterium catenulatum* o koncentraci 10 ng.μl⁻¹. Výsledky jsou znázorněny na obrázku 11.



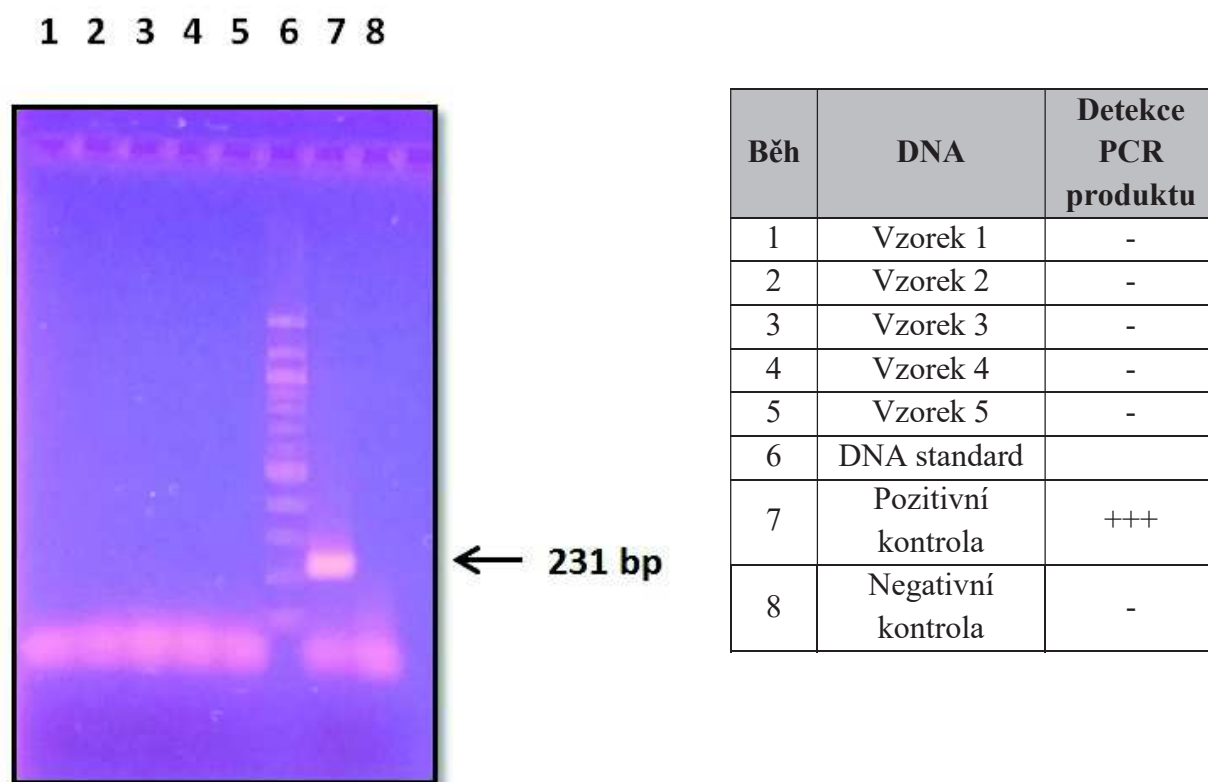
pozn.: +++ produkt PCR detekován silně, ++ produkt PCR detekován zřetelně, + produkt PCR detekován slabě, - produkt PCR nedetekován

Obrázek 11 – Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Bifidobacterium* (Bif-164, Bif-662)⁶⁸ se schématem nanesení a vyhodnocením detekce PCR produktu

Provedení PCR za použití daných primerů nepotvrdilo přítomnost DNA rodu *Bifidobacterium* ve vzorcích modelového sýru (obrázek 11).

4.1.7 Důkaz přítomnosti DNA rodu *Bifidobacterium* (primery Rallbif, Fallbif)

Dle postupu PCR uvedeného v kapitole 3.3.5.6 byla ověřena přítomnost DNA rodu *Bifidobacterium*. Za použití specifických primerů (Rallbif a Fallbif) pro tento rod⁶⁹ byl amplifikován (dle programu uvedeného v tabulce 19) specifický úsek DNA (231 bp). PCR produkty byly detekovány pomocí gelové elektroforézy. Pro pozitivní kontrolu byla použita DNA druhu *Bifidobacterium catenulatum* o koncentraci 10 ng.μl⁻¹. Výsledky jsou znázorněny na obrázku 12.



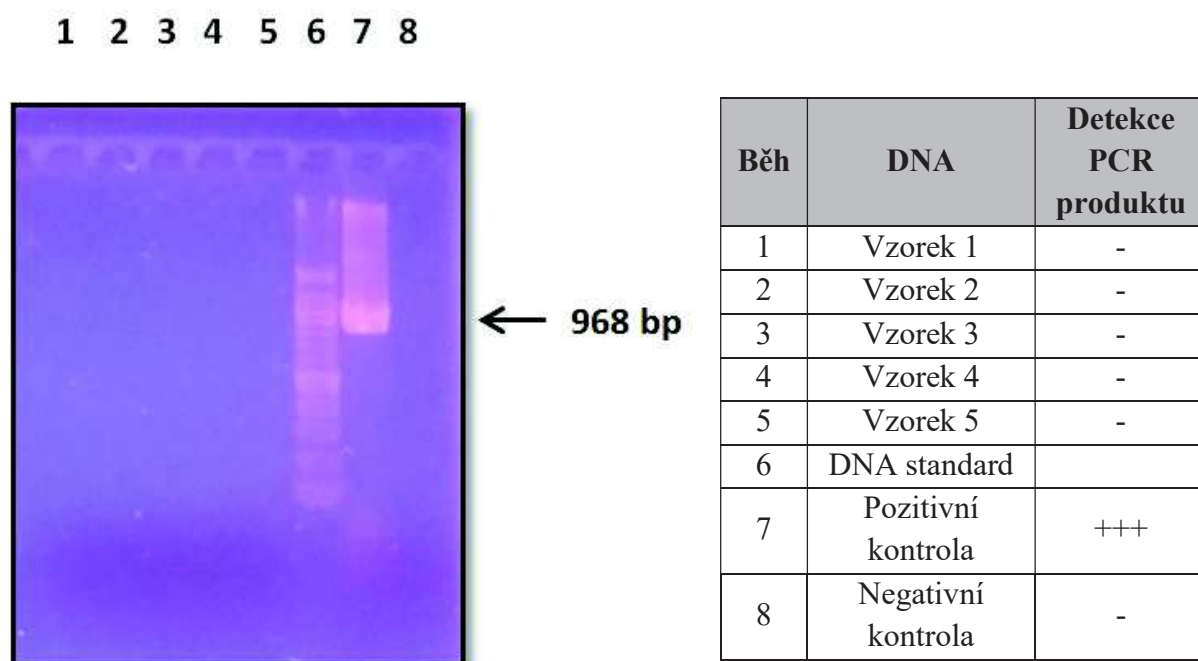
pozn.: +++ produkt PCR detekován silně, ++ produkt PCR detekován zřetelně, + produkt PCR detekován slabě, - produkt PCR nedetekován

Obrázek 12 – Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Bifidobacterium* (Bif-164, Bif-662)⁶⁹ se schématem nanesení a vyhodnocením detekce PCR produktu

Provedení PCR za použití daných primerů nepotvrdilo přítomnost DNA rodu *Bifidobacterium* ve vzorcích modelového sýru (obrázek 12).

4.1.8 Důkaz přítomnosti DNA rodu *Streptococcus*

Dle postupu PCR uvedeného v kapitole 3.3.5.7 byla ověřena přítomnost DNA rodu *Streptococcus*. Za použití specifických primerů (S.therm-1 a S.them-2) pro tento rod⁷⁰ byl amplifikován (dle programu uvedeného v tabulce 22) specifický úsek DNA (968 bp). PCR produkty byly detekovány pomocí gelové elektroforézy. Pro pozitivní kontrolu byla použita DNA druhu *Streptococcus thermophilus* o koncentraci 10 ng.μl⁻¹. Výsledky jsou znázorněny na obrázku 13.



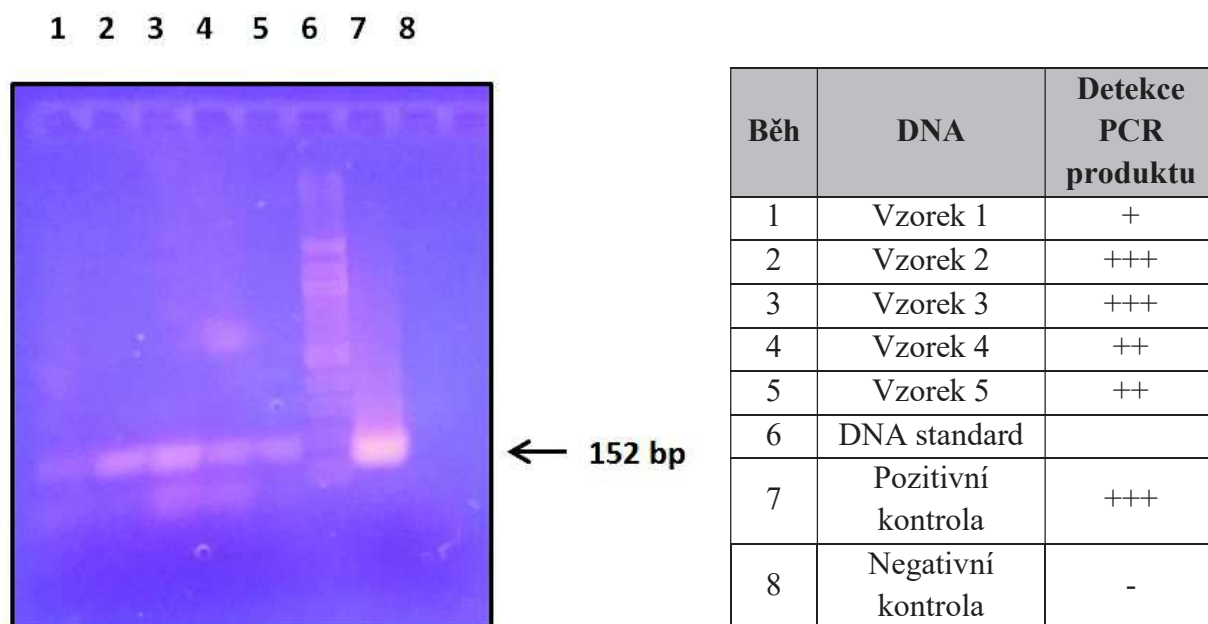
pozn.: +++ produkt PCR detekován silně, ++ produkt PCR detekován zřetelně, + produkt PCR detekován slabě, - produkt PCR nedetekován

Obrázek 13 – Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Streptococcus*⁷⁰ se schématem nanesení a vyhodnocením detekce PCR produktu

Provedení PCR za použití daných primerů nepotvrdilo přítomnost DNA rodu *Streptococcus* ve vzorcích modelového sýru (obrázek 13).

4.1.9 Důkaz přítomnosti DNA kvasinek

Dle postupu PCR uvedeného v kapitole 3.3.5.8 byla ověřena přítomnost celkových kvasinek. Za použití specifických primerů (Oli-F a Oli-R) pro kvasinky⁷¹ byl amplifikován (dle programu uvedeného v tabulce 25) specifický úsek DNA (152 bp). PCR produkty byly detekovány pomocí gelové elektroforézy. Pro pozitivní kontrolu byla použita DNA druhu *Saccharomyces cerevisiae* o koncentraci 10 ng.μl⁻¹. Výsledky jsou znázorněny na obrázku 14.



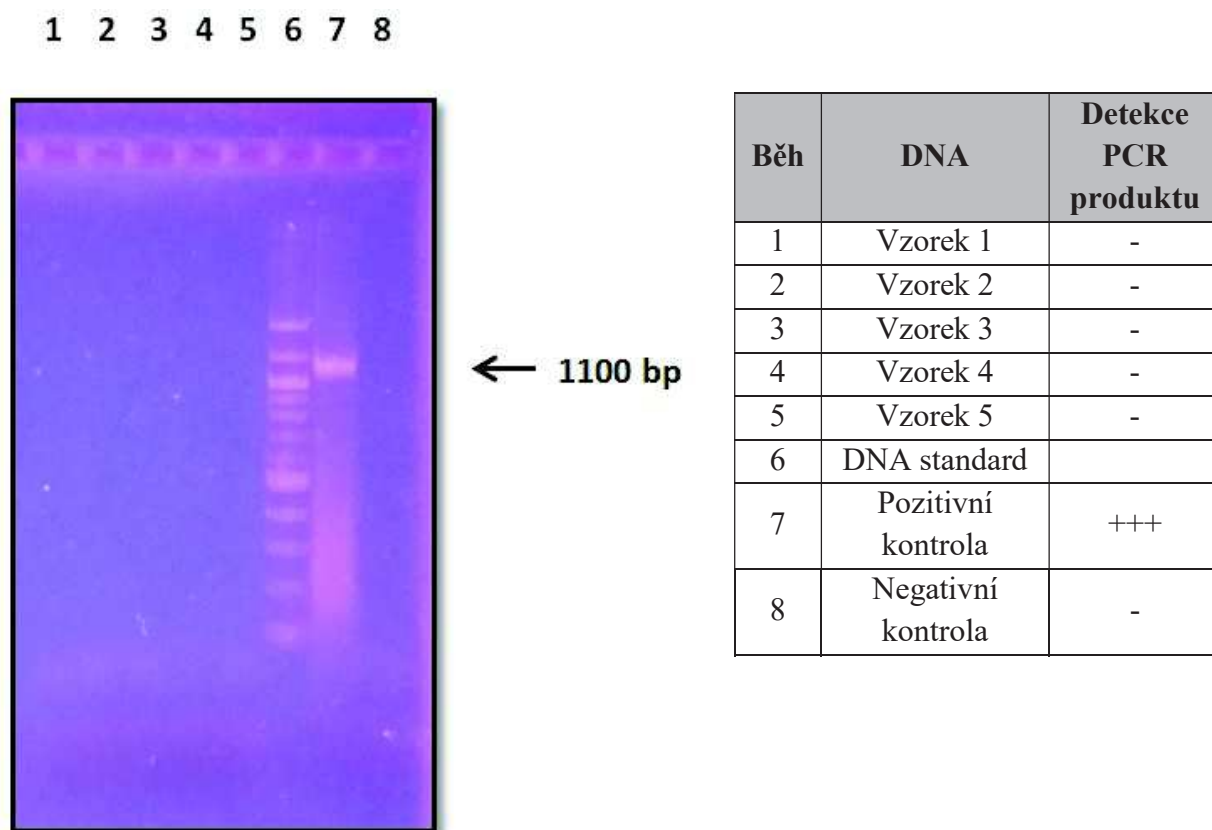
pozn.: +++ produkt PCR detekován silně, ++ produkt PCR detekován zřetelně, + produkt PCR detekován slabě, - produkt PCR nedetekován

Obrázek 14 – Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro celkové kvasinky⁷¹ se schématem nanesení a vyhodnocením detekce PCR produktu

Provedení PCR za použití daných primerů potvrdilo přítomnost DNA kvasinek ve vzorcích modelového sýru (obrázek 14).

4.1.10 Důkaz přítomnosti DNA rodu *Bacillus*

Dle postupu PCR uvedeného v kapitole 3.3.5.9 byla ověřena přítomnost DNA rodu *Bacillus*. Za použití specifických primerů (BK1F a BK1R) pro tento rod⁷² byl amplifikován (dle programu uvedeného v tabulce 28) specifický úsek DNA (1100 bp). PCR produkty byly detekovány pomocí gelové elektroforézy. Pro pozitivní kontrolu byla použita DNA druhu *Bacillus thuringiensis* o koncentraci 10 ng.μl⁻¹. Výsledky jsou znázorněny na obrázku 15.



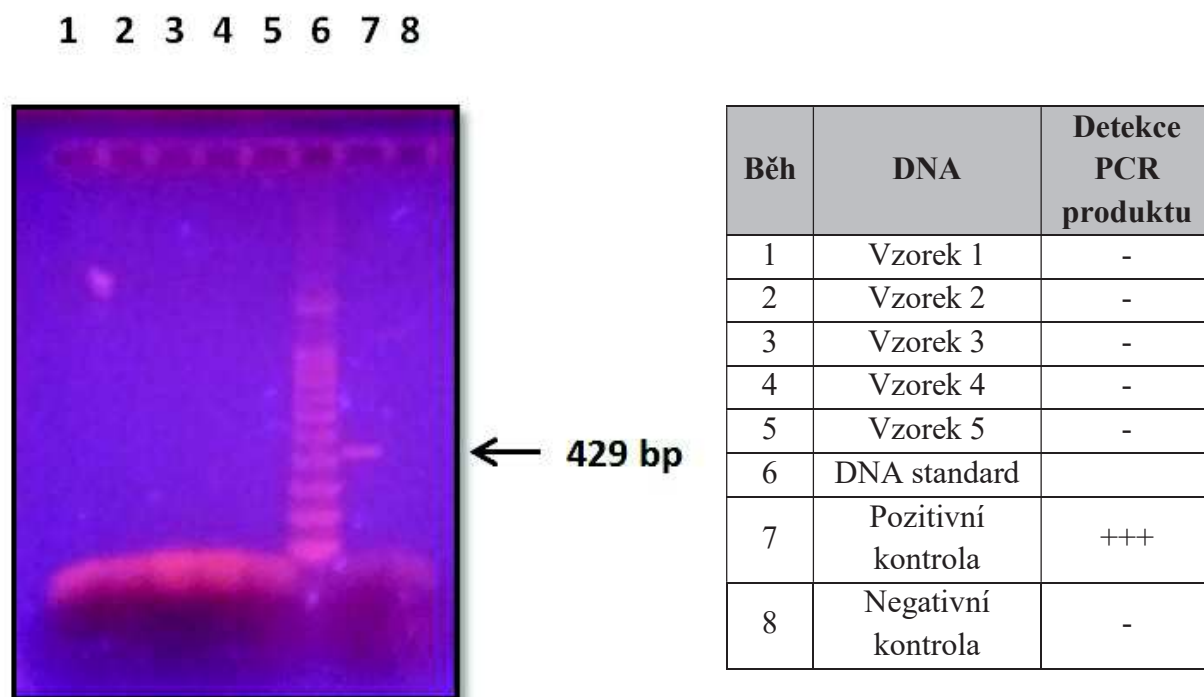
pozn.: +++ produkt PCR detekován silně, ++ produkt PCR detekován zřetelně, + produkt PCR detekován slabě, - produkt PCR nedetekován

Obrázek 15 – Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Bacillus*⁷² se schématem nanesení a vyhodnocením detekce PCR produktu

Provedení PCR za použití daných primerů nepotvrdilo přítomnost DNA rodu *Bacillus* ve vzorcích modelového sýru (obrázek 15).

4.1.11 Důkaz přítomnosti DNA rodu *Salmonella*

Dle postupu PCR uvedeného v kapitole 3.3.5.10 byla ověřena přítomnost DNA rodu *Salmonella*. Za použití specifických primerů (ST11 a ST15) pro tento rod⁷³ byl amplifikován (dle programu uvedeného v tabulce 31) specifický úsek DNA (429 bp). PCR produkty byly detekovány pomocí gelové elektroforézy. Pro pozitivní kontrolu byla použita DNA rodu *Salmonella* o koncentraci 10 ng.μl⁻¹. Výsledky jsou znázorněny na obrázku 16.



pozn.: +++ produkt PCR detekován silně, ++ produkt PCR detekován zřetelně, + produkt PCR detekován slabě, - produkt PCR nedetekován

Obrázek 16 – Agarosová gelová elektroforéza produktů PCR specifických pro rod *Salmonella*⁷³ se schématem nanesení a vyhodnocením detekce PCR produktu

Provedení PCR za použití daných primerů nepotvrdilo přítomnost DNA rodu *Salmonella* ve vzorcích modelového sýru (obrázek 16).

4.2 Shrnutí výsledků

V tabulce 33 jsou přehledně uvedeny výsledky detekce přítomnosti amplifikované DNA ve vzorcích sýrů.

Tabulka 33 – Detekce specifických domén a rodů pomocí PCR

Doména, či rod	Detekce PCR metodou
<i>Bacteria</i>	+
<i>Lactobacillus</i>	+
<i>Lactococcus</i>	+
<i>Kvasinky</i>	+
<i>Bifidobacterium</i>	-
<i>Streptococcus</i>	-
<i>Bacillus</i>	-
<i>Salmonella</i>	-

+ detekovaná přítomnost

- nedetekovaná přítomnost

4.3 Diskuze výsledků

Jak již bylo zmíněno, v keřirových zrnech dochází ke složité symbióze celé řady druhů bakterií a kvasinek, jejichž metabolická aktivita vytváří jedinečnou chuť²³. V kapitole 2.6 je uveden kompletní přehled mikrobiálních druhů dosud identifikovaných v keřiru. Citované publikace^{6,24,37} uvádějí v keřirových zrnech přítomnost především bakterií mléčného kvašení, nejčastěji laktobacilů, laktokoků a kvasinek. V rámci této práce byly identifikovány pouze vybrané a nejčastěji zastoupené mikroorganismy, jejichž přítomnost lze předpokládat v testovaných vzorcích sýrů. Pomocí PCR byla potvrzena přítomnost laktobacilů, laktokoků a kvasinek. Z nepřeberného množství druhů rodu *Lactobacillus* byla provedena druhově specifická PCR pouze pro druh *Lactobacillus casei*. Tato PCR potvrdila přítomnost této konkrétní DNA v modelových vzorcích sýrů.

Předpokládaná přítomnost bakterií mléčného kvašení rodu *Bifidobacterium* nebyla potvrzena podobně jako přítomnost *Streptococcus thermophilus*.

Přítomnost rodu *Leuconostoc* a bakterií octového kvašení, předpokládaná v keřirových zrnech, nebyla prokazována. Dále nebylo provedeno podrobnější zařazování do jednotlivých rodů a druhů kvasinek. Byla prokázána pouze přítomnost DNA celkových kvasinek.

Dalším významným zdrojem mikroorganismů ve vzorcích sýrů může být použitá surovina, tj. syrové mléko. Původní rozmanitá mikroflóra syrového mléka je základem pro výrobu tradičních farmářských sýrů, kde se účastní důležitých procesů zrání a významně přispívá ke vzniku specifických aromatických látek, které mají výrazný vliv na výsledné senzorické vlastnosti sýrů.

Na druhou stranu se zde mohou nacházet některé nežádoucí mikroorganismy, které se do mléka dostanou vlivem špatné hygieny při jeho získávání a zpracování, nekvalitní stravou zvířat apod. Jedná se o koliformní a psychrotrofní bakterie a především patogenní a potenciálně patogenní mikroorganismy. Z hlediska technologie výroby jsou nejobávanější bakterie *Clostridium* spp., které způsobují tzv. duření sýrů.

Co se týče patogenních mikroorganismů, v některých případech byla konzumace sýrů z nepasterovaného mléka spojována s tuberkulózou (*Mycobacterium tuberculosis*), listeriózou (*Listeria monocytogenes*), brucelózou (*Brucella melitensis*), nemocemi způsobenými koliformními bakteriemi (*Escherichia coli*), salmonelami (*Salmonella* spp.), kampylobakteriemi (*Campylobacter* spp.) a bakterií *Staphylococcus aureus*⁷⁴.

Pomocí PCR bylo zatím prokázáno, že vzorky sýrů neobsahují kontaminaci patogenními bakteriemi rodu *Bacillus* a *Salmonella*.

5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo identifikovat mikroorganismy přítomné ve vzorcích sýrů. Modelové vzorky sýrů byly vyrobeny v poloprovozních podmínkách s použitím standardního technologického postupu pro kyselé sýry. Jako základní surovina bylo použito nepasterizované mléko v „bio“ kvalitě.

V teoretické části této diplomové práce je zpracována literární rešerše zabývající se sýry, jejich složením, kefírovými zrny a jejich vlivem na zdraví člověka a molekulárně diagnostickými metodami, které lze použít v rámci analýzy DNA získané ze sýru.

Pro identifikaci mikroorganismů v experimentální části této práce byla použita metoda PCR. Sýr byl homogenizován ve sterilní vodě a buňky lyzovány. DNA byla izolována z hrubých lyzátů pomocí fenolové extrakce v kvalitě vhodné pro PCR. Pomocí specifických primerů byla DNA amplifikována a prokazována pomocí gelové elektroforézy.

Bylo prokázáno, že sýr obsahuje DNA bakterií mléčného kvašení (*Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp.) a kvasinek. Neobsahuje DNA rodu *Bifidobacterium*, *Streptococcus* a patogenní DNA rodů *Bacillus* a *Salmonella*. Lze tedy předpokládat, že tyto mikroorganismy nejsou v testovaných vzorcích sýrů přítomny.

Jelikož se jedná o jednu z prvních prací týkajících se mikrobiologického vyšetření těchto modelových vzorků sýrů, námětem pro další práce může být identifikace a následně i kvantifikace dalších bakterií mléčného kvašení, především rodu *Leuconostoc*, jednotlivých rodů kvasinek (*Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Zygosaccharomyces*, *Torulaspora* nebo *Pichia*), případně i jednotlivá zařazení do druhů.

Pro posouzení zdravotní nezávadnosti sýrů bude další pozornost zaměřena na detekci patogenních bakterií, především bakterie *Listeria monocytogenes*, v současnosti nejobávanějšího patogenu kontaminujícího mléčné výrobky, jehož výskyt je spojován právě s požitím sýrů z nepasterovaného mléka.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

LITERATURA:

- [1] GUINEE, T. P. Role of Protein in Cheese and Cheese Products. *Advanced Dairy Chemistry-1 Proteins*. Boston, MA: Springer US, 2003, s. 1083. ISBN 978-0-306-47271-8.
- [2] Vyhláška č. 336/2013 Sb., o mléku a mléčných výrobcích, mražených krémech a jedlých tucích a olejích. In: *Sbírka zákonů*. 21. 10. 2013.
- [3] Sýry a jejich druhy. *Bezpečnost potravin A-Z: Informační centrum bezpečnosti potravin, Ministerstvo zemědělství* [online]. [cit. 2016-02-05]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/92086.aspx>.
- [4] SÉVERIN, S. and X. WENSHUI. Milk Biologically Active Components as Nutraceuticals: Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2005, 45(7-8), 645-656. ISSN 1040-8398.
- [5] WEAVER, C. M. Dairy nutrition beyond infancy. *Australian Journal of Dairy Technology*. 2003, 2(58), 58-60. ISSN 0004-9433.
- [6] ROGINSKI, H., FUQUAY, J. W. and FOX, P. Encyclopedia of dairy sciences. New York: Academic Press, 2003. ISBN 01-222-7235-8.
- [7] STORRY, J. E., GRANDISON, A.S., MILLARD, D., OWEN, A. J. and FORD, G. D. Chemical composition and coagulating properties of renneted milks from different breeds and species of ruminant. *Journal of Dairy Research*, 183, 50(02), 215–299. ISSN 0022-0299.
- [8] MULLER-RENAUD, S., D. DUPONT and P. DULIEU. Quantification of κ -casein in milk by an optical immunosensor. *Food and Agricultural Immunology*. 2010, 15(3-4), 265-277. ISSN 0954-0105.
- [9] Cheese Science. CheeseScience.net [online]. [cit. 2016-02-29]. Dostupné z: <http://www.cheesescience.net/>.

- [10] CLAEYS, W. L., CARDOEN, S., DAUBE, G.; BLOCK, J., DEWETTINCK, K., DIERICK, K. and LIEVEN, Z. Raw or heated cow milk consumption: Review of risks and benefits. *Food Control*, 2013, 31(1), 251 – 262. ISSN 0956–7135.
- [11] HADIZADEH, F., MOGHADAM, M. H. and MOHAJERI, S. A. Application of molecularly imprinted hydrogel for the preparation of lactose-free milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013, 93, 304–09. ISSN 0022-5142.
- [12] LOPEZ, C., BRIARD-BION, V., MÉNARD, O., BEAUCHER, E., ROUSSEAU, F., FAUQUANT, J., LECONTE, N., and BENOIT, R. Fat globules selected from whole milk according to their size: Different compositions and structure of the biomembrane, revealing sphingomyelin-rich domains . *Food Chemistry*. 2011, 125(2), p. 355 – 368. ISSN 0308-8146.
- [13] MARTINI, M., SALARI, F. and ALTOMONTE, I. The macrostructure of milk lipids: the fat globules. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2013, 15(3-4), ISSN 1040-8398.
- [14] GAUCHERON, F. Milk and Dairy Products: A Unique Micronutrient Combination. *Journal of the American College of Nutrition*. 2011, 30(5), 400S-409. ISSN 0731-5724.
- [15] DI MONACO, R, CAVELLA, S. and MASI, P. Predicting sensory cohesiveness, hardness and springiness of solid foods from instrumental measurements. *Journal of Texture Studies*. 2008, 39(2), 129–149. ISSN 0022-4901.
- [16] TEMMERMAN, R., HUYS, G. and SWINGS, J. Identification of lactic acid bacteria: culture dependent and culture independent methods. *Trends in Food Science and Technology*. 2004, 15(7-8), 348–359. ISSN 0924-2244.
- [17] BURSOVÁ, Š., NECIDOVÁ, L. a DUŠKOVÁ M. *Mikrobiologie potravin a mikrobiologické laboratorní metody*. *Obecná mikrobiologie*. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-742-8.
- [18] BUŇKOVÁ, L. and BUŇKA F. Microflora of Processed Cheese and the Factors Affecting It. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015. ISSN 1040-8398.

- [19] CAPLICE, E. and FITZGERALD, G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, 50(1-2), 131–149. ISSN 0168-1605.
- [20] DRIESSEN, F. M. and PUHAN, Z. Technology of Mesophilic Fermented Milk. *Bulletin of the International Dairy Federation*. 1988, 227, 75-80. ISSN: 0250-5118.
- [21] HUGENHOLTZ, J. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 1993, 12(1-3), 165–178. ISSN 0168-6445.
- [22] SHIBY, V. K. and MISHRA, H. N. Fermented Milks and Milk Products as Functional Foods - A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2013, 53(5), 482-496. ISSN 1040-8398.
- [23] TRATNIK, L., BOZANIC, R., HERCEG, Z. and DRGALIC, I. The quality of plain and supplemented kefir from goat's and cow's milk. *International Journal of Dairy Technology*. 2006, 59(1), 40–46. ISSN 1364-727x.
- [24] IRIGOYEN, A., ARANA, I., CASTIELLA, M., TORRE, P. and IBANEZ, F. C. Microbiological, physicochemical and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry*. 2005, 90(4), 613–620. ISSN 0308-8146.
- [25] GUZEL-SEYDIM, Z. B., KOK-TAS, T., GREENE, A. K. and SEYDIM, A. C. Review: Functional Properties of Kefir. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2011, 51(3), 261-268. ISSN 1040-8398.
- [26] ARSLAN, S. A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. *CyTA - Journal of Food*. 2014, 13(3), 340-345. ISSN 1947-6337.
- [27] SARKAR, S. Potential of kefir as a dietetic beverage – a review. *British Journal of Nutrition*. 2007, 109(4), 280–290. ISSN 0007-070x.
- [28] LORETAN, T., MOSTERT, J. F. and VILJEON, B. C. Microbial flora associated with South African house hold kefir. *South African Journal of Science*. 2003, 99(1-2), 92–94. ISSN 0038-2353.
- [29] Poznáte kefir? *Fooddrink.sk* [online]. 2013 [cit. 2016-03-23]. Dostupné z: <http://fooddrink.sk/poznate-kefir/>.

- [30] ABRAHAM, A. G. and DE ANTONI, G. L. Characterization of kefir grains in cow's milk and in soya milk. *Journal of Dairy Research*. 1999, 66(2), 327–333. ISSN: 0022-0299.
- [31] OTLES, S. and CAGINDI, O. Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan Journal of Nutrition*. 2003, 2(2), 54–59. ISSN 1680-5194.
- [32] OZER, D. and OZER, B. H. Product of Eastern Europe and Asia. *Encyclopedia of Food Microbiology*, Edited by: Robinson, R. K. 1999, 2, 798–805. London: Academic Press. ISBN 978-0-12-227070-3.
- [33] VINDEROLA, C. G., MEDICI, M. and PERDIGON, G. Relationships between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell-wall protein profiles in lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 2004, 96(2), 230–243. ISSN 1364-5072.
- [34] LIUT KEVICIUS, A. and SARKINAS, A. A Studies on the growth conditions and composition of kefir grains as a food and forage biomass. *Veteninarija ir zootechnika*. 2004, 25, 903. ISSN 1392-2130.
- [35] KNEIFEL, W. and MAYER, H. K. Vitamin profiles of kefirs made from milks of different species. *International Journal of Food Science and Technology*. 1991, 26(4), 423–428. ISSN 0950-5423.
- [36] KOROLEVA, N. S. Starters for fermented milks: Section 4, Kefir and Kumis Starters. *Bulletin of the International Dairy Federation*. 1988, 227, 35-40. ISSN 0250-5118.
- [37] WOUTERS, J. T. M., AYAD, E. H. E., HUGENHOLTZ, J. and SMIT, G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*. 2002, 12(2-3), 91–109. ISSN 0958-6946.
- [38] LEITE, A. M. O., MAYO, B., RACHID, C. T. C. C., PEIXOTO, R. S., SILVA, J. T., PASCHOALIN, V. M. F. and DELGADO, S. Assessment of the microbial diversity of Brazilian kefir grains by PCR-DGGE and pyrosequencing analysis. *Food Microbiology*. 2012, 31(2), 215–221. ISSN 0740-0020.

- [39] WANG, Y. F., HUO, G. C. and LIU, L. B. Isolation and identification of the lactic acid bacteria from Kefir grains. *China Dairy Industry*. 2004, 32, 17–19. ISSN 1001-2230.
- [40] SABIR, F., BEYATLI, Y., COKMUS, C. and ONAL-DARILMAZ, D. Assessment of potential probiotic properties of *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., and *Pediococcus* spp. strains isolated from kefir. *Journal of Food Science*. 2010, 75(9), 568–573. ISSN 0022-1147.
- [41] KOK-TAS, T., EKINCI, F. Y. and GUZEL-SEYDIM, Z. B. Identification of microbial flora in kefir grains produced in Turkey using PCR. *International Journal of Dairy Technology*. 2012, 65(1), 126–131. ISSN 1364-727x.
- [42] GARBERS, I. M., BRITZ, T. J. and WITTHUHN, R. C. PCR-based denaturing gradient gel electrophoretic typification and identification of the microbial consortium present in kefir grains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2004, 20(7), 687–693. ISSN 1573-0972.
- [43] WITTHUHN, R. C., SCHOEMAN, T. and BRITZ, T. J. Characterisation of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation. *International Dairy Journal*. 2005, 15(4), 383–389. ISSN 0958-6946.
- [44] DELFEDERICO, L., HOLLMANN, A., MARTINEZ, M., IGLESIAS, N. G., DE ANTONI, G. and SEMORILE, L. (2006). Molecular identification and typing of lactobacilli isolated from kefir grains. *Journal of Dairy Research*. 2006, 73(1), 20–27. ISSN 0022-0299.
- [45] MAGALHAES, K. T., DE MELO PEREIRA, G. V., CAMPOS, C. R., DRAGONE, G. and SCHWAN, R. F. Brazilian kefir: Structure, microbial communities and chemical composition. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011, 42(2), 693–702. ISSN 1517-8382.
- [46] YUKSEKDAG, Z. N., BEYATLI, Y. and ASLIM, B. Determination of some characteristics coccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. *LWT – Food Science and Technology*. 2004, 37(6), 663–667. ISSN 0023-6438.

- [47] MOTAGHI, M., MAZAHERI, M., MOAZAMI, N., FARKHONDEH, A., FOOLADI, M. H. and GOLTAPPEH, E. M. Short communication: Kefir production in Iran. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1997, 13(5), 579–581. ISSN 0959-3993.
- [48] MIGUEL, M. G. D. C. P., CARDOSO, P. G., LAGO, L. D. A. and SCHWAN, R. F. Diversity of bacteria present in milk kefir grains using culture-dependent and culture-independent methods. *Food Research International*. 2010, 43(5), 1523–1528. ISSN: 0963-9969.
- [49] SIMOVA, E., BESHKOVA, D., ANGELOV, A., HRISTOZOVA, T., FRENGOVA, G. and SPASOV, Z. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2002, 28(1), 1–6. ISSN 1367-5435.
- [50] IWASAWA, S., UEDA, M., MIYATA, N., HIROTA, T. and AHIKO, K. Novel Kefir yeast having remarkable sugar utilization. Part I. Identification and fermentation character of Kefir yeast. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1982, 46(11), 2631–2636. ISSN: 1881-1280.
- [51] WITTHUHN, R. C., SCHOEMAN, T. and BRITZ, T. J. Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. *International Journal of Dairy Technology*. 2004, 57(1) 33–37. ISSN 1364-727x.
- [52] ANGULO, L., LOPEZ, E. and LEMA, C. Microflora present in kefir grains of the Galician region (north-west of Spain). *Journal of Dairy Research*. 1993, 60(2), 263–267. ISSN 0022-0299.
- [53] SARKAR, S. Biotechnological innovations in kefir production: a review. *British Food Journal*. 2008, 110(3), 283–295. ISSN 0007-070x.
- [54] FARNWORTH, E. R. (2005). Kefir - a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin*. 2005, 2(1), 1–17. ISSN 1476-2137.
- [55] TOBA, T., ARIHARA, K. and ADACHI, S. Comparative study of polyssacharide from kefir grains, an encapsuled homofermentative *Lactobacillus* species and *Lactobacillus* kefir. *Milchwissenschaft*. 1987, 42(9), 565–568. ISSN 0026-3788.

- [56] AHMED, Z., WANG, Y., AHMAD, A., KHAN, S. T., NISA, M., AHMAD, H. and AFREEN, A. Kefir and Health: A Contemporary Perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2013, 53(5), 422-434. ISSN 1040-8398.
- [57] HELDMAN, D. R. *Encyclopedia of biotechnology in agriculture and food*. Boca Raton, Fla: CRC, 2010. ISBN 0849-350271.
- [58] LIU, J., WANG, S., LIN, Y. and LIN, C. Antitumor Activity of Milk Kefir and Soy Milk Kefir in Tumor-Bearing Mice. *Nutrition and Cancer*. 2002, 44(2), 183-187. ISSN 0163-5581.
- [59] BURSOVÁ, Š., DUŠKOVÁ, M., NECIDOVÁ, L., KARPÍŠKOVÁ R. a MYŠKOVÁ, P. *Mikrobiologické laboratorní metody*. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-676-6.
- [60] Polymerase chain reaction. Wikipedia: The free encyclopedia [online]. 2016 [cit. 2016-03-23]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_chain_reaction.
- [61] BagMixer® 400 CC®. Interscience for microbiology [online]. 2016 [cit. 2016-03-23]. Dostupné z: <http://www.interscience.com/en/products/lab-blenders/lab-blender-bagmixer/lab-homogenizer-blender>.
- [62] NanoDrop 2000: UV-Vis Spectrophotometer. Thermo scientific: NanoDrop Products [online]. 2013 [cit. 2016-04-01]. Dostupné z: <http://www.nanodrop.com/Productnd2000overview.aspx>.
- [63] Thermal Cycler GeneQ. BIOER Technology [online]. 2015 [cit. 2016-03-23]. Dostupné z: <http://www.bioer.com.cn/en/html/productcenter/PCRTThermalCycler/83.html#ad-image-0>.
- [64] HAARMAN, M. and KNOL, J. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal Lactobacillus Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, 72(4), 2359-2365. ISSN 0099-2240.
- [65] DUBERNET, S. DESMASURES, N. and GUÉGUE, M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters*. 2002, 214(2), 271-275. ISSN 0378-1097.

- [66] WALTER, J., TANNOCK, G. W., TILSALA-TIMISJÄRVI, A., RODTONG, S., LOACH, D. M., MUNRO, K. and ALATOSSAVA, T. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, 66(1), 297-303. ISSN 0099-2240.
- [67] BUIST, G., KOK, J., LEENHOUTS, K. J., DABROWSKA, M., VENEMA, G. And HAANDRIKMAN, A. J. Molecular Cloning and Nukleotide Sequence of the Gene Encoding the Major Peptidoglycan Hydrolyse of *Lactococcus lactis*, a Muramidase Needed for Cell Separation. *Journal of Bacteriology*. 1995, 177(6), 1554-1563. ISSN: 1098-5530.
- [68] KOK, R. G., DE WAAL, A., SHUT, F., WELLING, G. W., WEENK, G. and HELLINWERF, K. J. Specific detection and analysis of probiotic *Bifidobacterium* strain in infant feces. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996, 62, 3668-3672. ISSN 1098-5336.
- [69] SPEELMANS, G., KNOL, J., HAARMAN, M., GARSSSEN, J. Synbiotic composition for infants [patent]. A2, WO/2005/039319. Uděleno 6. 5. 2005. Dostupné z: <http://www.sumobrain.com/patents/WO2005039319.html>.
- [70] SONJA, L., DRESCHER, K. and HELLER, K. J. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in the terminal ileum of fistulated göttingen minipigs. *Applied and Environmental Microbiology*. 2001, 67(9), 4137-4143. ISSN 1098-5336.
- [71] TOFALO, R., SCHIRONE, M., PERPETUINI, G., SUZZI, G. and CORSETTI A. Development and application of a real-time PCR-based assay to enumerate total yeasts and *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii* and *Pichia kluyveri* in fermented table olives. *Food Control*. 2012, 23(2), 356-362. ISSN 0956-7135.
- [72] FRANCOIS, F., C. LOMBARD, J.-M. GUIGNER, SOREAU, P., BRIAN-JAISSON, F., MARTINO, G., VANDERVENNET, M., GARCIA, D., MOLINIER, A.-L., PIGNOL, D., PEDUZZI, J., ZIRAH, S. and REBUFFAT, S. Isolation and Characterization of Environmental Bacteria Capable of Extracellular Biosorption of Mercury. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012, 78(4), 1097-1106. ISSN 0099-2240.

- [73] PUI, C. F., WONG, W. C., CHAI, L. C., LEE, H. Y., NOORLIS, A., ZAINAZOR, T. C. T., TANG, J. Y. H., GHAZALI, F. M., CHEAH, Y. K., NAKAGUCHI, Y., NISHIBUCHI, M. and RADU, S. Multiplex PCR for the concurrent detection and differentiation of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium. *Tropical Medicine and Health*. 2011, 39(1), 9-15. ISSN 1349-4147.
- [74] MUSILOVÁ, L. Charakterizace vybraných typů mléčných produktů. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015, 94 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Eva Vítová, Ph.D.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BMK	bakterie mléčného kvašení
DGGE	denaturační gradientová gelová elektroforéza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
PCR	polymerázová řetězová reakce