

# **Izolace a identifikace bakterií mléčného kvašení z měkkých zrajících sýrů**

Bc. Kateřina Svobodová

---

Diplomová práce  
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav biochemie a analýzy potravin  
akademický rok: 2010/2011

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Kateřina SVOBODOVÁ**  
Osobní číslo: **T090271**  
Studijní program: **N 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**

Téma práce: **Izolace a identifikace bakterií mléčného kvašení z měkkých zrajících sýrů**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Bakterie mléčného kvašení a jejich charakteristika.
2. Měkké zrající sýry.

### II. Praktická část

1. Izolace a identifikace bakterií mléčného kvašení z měkkých zrajících sýrů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1]SALMINEN, S., VON WRIGHT, A., OUWEHAND, A. Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects. 3. ed, New York, U.S.A. 2004. s. 633. ISBN 0-8247-5332-1.
- [2]GÖRNER, F., VALÍK, L. Aplikovaná mikrobiologie poživatin. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004. s. 528. ISBN 80-967064-9-7.
- [3]STILES, M., HOLZAPFEL, W. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology, 1997, vol. 36, s. 1-29.
- [4]KLEEREBEZEM, M., HOL, P., HUGENHOLTZ, J. Lactic acid bacteria as a cell factory: rerouting of carbon metabolism in Lactococcus lactis by metabolic engineering. Enzyme and Microbial Technology, 2000, vol. 26, s. 840-848.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Zuzana Míšková, Ph.D.**  
Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce: **25. února 2011**

Termín odevzdání diplomové práce: **20. května 2011**

Ve Zlíně dne 21. března 2011

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.  
*děkan*



doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: SVOBODOVA KATEŘINA

Obor: CHTP / THEVA

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 19.5.2011



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **ABSTRAKT**

Tato práce se zabývá problematikou jednotlivých rodů bakterií mléčného kvašení a měkkých zrajících sýrů. Jsou zde popsány fyziologické i biochemické charakteristiky vybraných zástupců těchto mikroorganismů, možné metody jejich identifikace a dále technologická výroba sýrů.

Cílem této práce bylo zaměřit se na bakterie mléčného kvašení v měkkých zrajících sýrech. Mikroorganismy byly izolovány z povrchu i zevnitř šesti druhů sýrů. Na základě morfologických a biochemických testů byla provedena jejich charakterizace.

Klíčová slova: bakterie mléčného kvašení, měkké zrající sýry

## **ABSTRACT**

This work is concerned with problems of the various genera of lactic acid bacteria and soft-ripened cheese. There are described physiological and biochemical characteristics of selected representatives of these microorganisms, the possible methods of their identifying and further technological production of cheese.

The aim of this study was to focus on lactic acid bacteria in soft ripened cheese. Microorganisms were isolated from the surface and within of six kinds of cheese. Their characterization were performed based on morphological and biochemical tests.

Keywords: lactic acid bacteria, soft ripened cheese

“Naším největším kapitálem jsou lidé a jejich odbornost“

Ráda bych poděkovala vedoucí diplomové práce Ing. Zuzaně Míškové, Ph.D. za odbornou pomoc, konzultace a spolupráci. Rovněž chci poděkovat všem, kteří se jakkoliv podíleli na dokončení této práce. Nemalý dík bych věnovala také Ing. Hance Miklíkové a Olze Haukové za jejich ochotu a vstřícný postoj při práci v laboratoři. Poděkování patří i mé rodině a přátelům, za jejich neustálou podporu.

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

## OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>11</b>
<b>1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ</b> .....	<b>12</b>
1.1 METABOLIZMUS BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	13
1.2 MEZOFILNÍ STARTOVACÍ KULTURY .....	15
1.3 TERMOFILNÍ STARTOVACÍ KULTURY .....	15
1.4 VYBRANÍ ZÁSTUPCI BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	16
1.4.1 Rod <i>Lactobacillus</i> .....	16
1.4.2 Rod <i>Lactococcus</i> .....	19
1.4.2.1 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> .....	20
1.4.2.2 <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> .....	20
1.4.3 Rod <i>Streptococcus</i> .....	21
1.4.3.1 <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	21
1.4.4 Rod <i>Enterococcus</i> .....	22
1.4.5 Rod <i>Leuconostoc</i> .....	23
<b>2 SÝRY</b> .....	<b>26</b>
2.1 ROZDĚLENÍ SÝRŮ .....	26
2.2 ZÁKLADNÍ POSTUP VÝROBY SYRŮ.....	27
2.3 MĚKKÉ ZRAJÍCÍ SÝRY.....	30
2.3.1 Měkké sýry zrající pod mazem.....	30
2.3.2 Měkké sýry zrající s plísní na povrchu.....	31
2.3.3 Měkké sýry zrající s plísní v těstě .....	31
<b>3 METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE</b> .....	<b>32</b>
3.1 PRINCIP POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE .....	32
3.1.1 Složení PCR směsi .....	34
3.1.2 Modifikace PCR.....	35
3.2 STANOVENÍ SEKVENCE DNA .....	36
3.3 ELEKTROFORÉZA V AGARÓZOVÉM GELU .....	37
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>38</b>
<b>4 MATERIÁL</b> .....	<b>39</b>
4.1 ANALYZOVANÉ MĚKKÉ ZRAJÍCÍ SÝRY .....	39
4.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE .....	41
4.3 KULTIVAČNÍ MÉDIA A ROZTOKY .....	41
4.4 BARVÍCÍ ROZTOKY .....	43
4.4.1 Roztoky pro barvení bakteriálních buněk dle Grama.....	43
4.4.2 Barva na OF test.....	43



4.5	GRISSOVA ČINIDLA PRO ZJIŠTĚNÍ REDUKCE DUSIČNANŮ.....	44
4.6	OSTATNÍ POUŽITÉ CHEMIKÁLIE .....	44
<b>5</b>	<b>METODIKA .....</b>	<b>45</b>
5.1	IZOLACE BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ.....	45
5.2	CHARAKTERIZACE BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ POMOCÍ BIOCHEMICKÝCH TESTŮ .....	45
5.2.1	Gramovo barvení.....	45
5.2.2	KOH test.....	46
5.2.3	Test na tvorbu katalázy.....	46
5.2.4	Schopnost redukce dusičnanů .....	46
5.2.5	O-F test (oxidačně-fermentační test).....	46
5.2.6	Schopnost fermentace sacharidů .....	47
5.2.7	V-P test (Voges-Proskauerův test) .....	47
5.2.8	PYRA test.....	47
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>49</b>
6.1	IZOLACE MIKROORGANIZMŮ Z MĚKKÝCH ZRAJÍCÍCH SÝRŮ.....	49
6.2	CHARAKTERIZACE VYBRANÝCH IZOLÁTŮ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ POMOCÍ BIOCHEMICKÝCH.....	50
6.2.1	Gramovo barvení.....	50
6.2.2	KOH test.....	53
6.2.3	Kataláza.....	54
6.2.4	Schopnost redukce dusičnanů .....	56
6.2.5	O-F test (oxidačně-fermentační test).....	57
6.2.6	Schopnost fermentace sacharidů .....	59
6.2.7	PYRA test a VP test (Voges-Proskauerův test).....	63
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>66</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>67</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>73</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>74</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>75</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>76</b>

## ÚVOD

Bakterie mléčného kvašení jsou specifickou skupinou grampozitivních bakterií, které tvoří nezastupitelnou úlohu v potravinářském průmyslu. Uplatňují se především v mlékárenství, při výrobě fermentovaných mléčných výrobků jako jsou například sýry, podmásli nebo kefir. Jsou využívány pro schopnost fermentace laktózy a dalších sacharidů na kyselinu mléčnou, ovlivňují chuť mléčných výrobků a zvyšují trvanlivost. Startovacími kulturami těchto bakterií jsou homofermentativní a heterofermentativní druhy. V současné době jsou využívány k identifikaci mikroorganismů, včetně bakterií mléčného kvašení, metody molekulární biologie, především polymerázová řetězová reakce.

Mnohé sýry jsou charakterizovány rozvojem povrchové mikroflóry při jejich zrání. Sýry jsou vyráběny téměř na celém světě a představují různorodou skupinu mléčných výrobků. Jsou nejen vhodným doplňkem mnoha příležitostí, ale i nezanedbatelným zdrojem nutričně cenných látek. Měkké zrající sýry jsou charakteristické vytvořením povrchové flóry z kvasinek, plísní a bakterií. Dále v sobě koncentrují základní složky sušiny mléka, mezi které se řadí kasein a mléčný tuk. Výroba sýrů zahrnuje spoustu kroků, chemických i biologických přeměn.

Sýry zrající pod mazem a nebo tzv. omývané sýry jsou ve velkém množství vyráběny ve státech západní Evropy jako např. v Rakousku, Francii, Německu a Belgii. Spotřeba sýrů v EU se pohybuje v průměru 19 kg sýra/osobu/rok. V ČR je tato spotřeba nižší a činí kolem 16 kg sýra/osobu/rok.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 BAKTERIE MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Bakterie mléčného kvašení zahrnují skupinu grampozitivních bakterií, které mají podobné morfologické, metabolické a fyziologické vlastnosti [1]. Jedná se o nesporulující, nepohyblivé koky nebo tyčinky, fermentující sacharidy za fakultativně anaerobních (mikroaerofilních) podmínek, které na selektivních půdách specifikovaných mezinárodní normou ČSN ISO 17792 mléko, mléčné výrobky a mezofilní startovací kultury, obsahujících citráty a speciální indikátory, vytvářejí čočkovité kolonie o průměru od 0,5 mm do 1,2 mm [1, 2, 3, 4].

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou rozšířeny v přírodě, velký význam mají v mléku, fermentovaných mléčných výrobcích, zelenině, masu, nápojích, ale také ve střevech a na sliznicích lidí a zvířat [1, 2, 5].

Za bakterie mléčného kvašení jsou považovány následující rody:

*Abiotrophia, Aerococcus, Agitococcus, Alkalibacterium, Allofustis, Alloicoccus, Atopobacter, Atopococcus, Atopostipes, Carnobacterium, Desemzia, Dolosicoccus, Dolosigranulum, Enterococcus, Eremococcus, Globicatella, Granulicatella, Ignavigranum, Isobaculum, Lactobacillus, Lactococcus, Lactosphaera, Lactovum, Leuconostoc, Marinilactibacillus, Melissococcus, Oenococcus, Paralactobacillus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Trichococcus, Vagococcus, Weissella* [1, 2].

Rod *Bifidobacterium* nepatří mezi bakterie mléčného kvašení, pouze s nimi sdílí typické vlastnosti, ale fylogeneticky s nimi nesouvisí a má jedinečný způsob fermentace cukrů.

Hlavní funkce bakterií mléčného kvašení při výrobě mléčných produktů je rozklad laktózy na kyselinu mléčnou, vytváření chuti či zlepšení konzistence. Kyselina mléčná je jedna z nejdůležitějších organických kyselin, která se využívá například jako konzervační prostředek [1, 2, 6, 7, 8].

Klasifikace bakterií mléčného kvašení v odlišnosti od jiných bakterií je velkou měrou založený na morfolologii, způsobu činnosti fermentace glukózy, růstu při odlišných teplotách, na produkci kyseliny mléčné, na růstu při vysoké koncentraci soli a toleranci vůči kyselému či alkalickému prostředí [1, 2, 8, 9, 10].

Tab. 1. Charakteristické znaky zkoumaných bakterií mléčného kvašení v sýrech [1, 9].

Charakteristika	Tyčinky	Koky			
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Streptococcus</i>
CO <sub>2</sub> z glukózy	+/-	-	-	+	-
Růst při 10 °C	+/-	+	+	+	-
Růst při 45 °C	+/-	+	-	-	+/-
Růst při 6,5 % NaCl	+/-	+	-	+/-	-
Růst při 18 % NaCl	-	-	-	-	-
Růst při pH 4,4	+/-	+	+/-	+/-	-
Růst při pH 9,6	-	+	-	-	-

+ pozitivní, - negativní, +/- nestálá schopnost mezi rody reagovat pozitivně či negativně

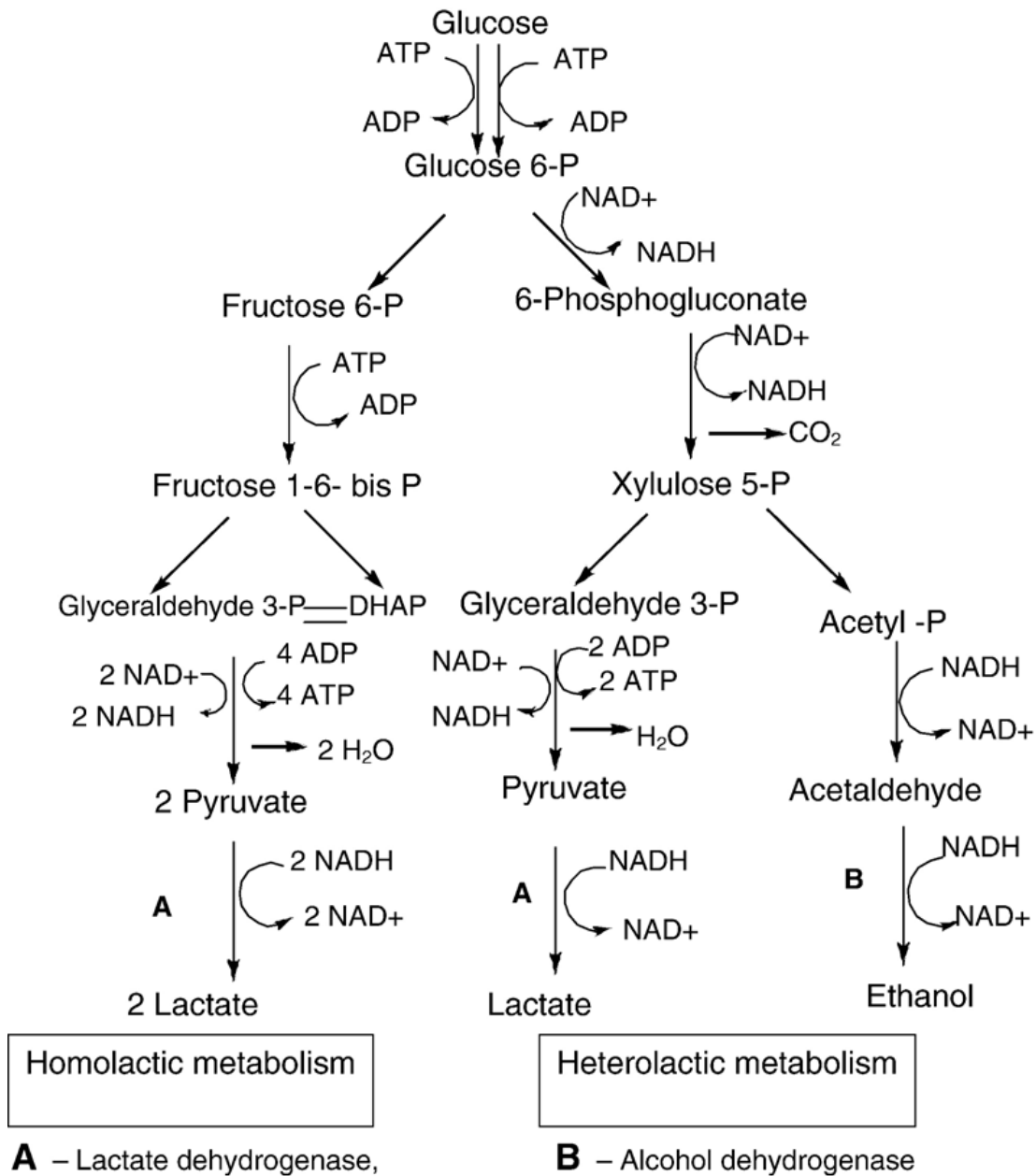
Podle hlavních a vedlejších fermentačních produktů lze bakterie mléčného kvašení rozlišit na homofermentativní a heterofermentativní [3].

Homofermentativní bakterie fermentují sacharidy výhradně na kyselinu mléčnou (více než 90 %), zatímco heterofermentativní bakterie rozkládají sacharidy na více metabolitů, a to kyselinu mléčnou (více než 50 %), kyselinu octovou, oxid uhličitý a v některých případech i etanol [2, 4].

Podle optimální teploty růstu lze tyto bakterie rozdělit také na mezofilní a termofilní. Tyto mikroorganismy jsou záměrně přidávány do mléka k výrobě mnoha typů sýrů [11].

## 1.1 METABOLIZMUS BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Metabolismus představuje organizovaný soubor biochemických reakcí, které jsou na sobě funkčně závislé [12]. Základním znakem metabolismu bakterií mléčného kvašení je schopnost fermentace sacharidů. Bakterie mléčného kvašení se uzpůsobují různým podmínkám a podle těchto podmínek se rozlišuje jejich metabolismus. Toto může vést k významným odlišnostem konečných produktů vzorků. Mléčným kvašením těchto bakterií dochází ke vzniku jak nesmírného obsahu odlišných sacharidů, tak i s nimi spojených sloučenin. Zpravidla, dominantním konečným produktem mléčného kvašení, je kyselina mléčná [1].



Obr. 1. Metabolismus bakterií mléčného kvašení [6].

Základním anaerobním katabolickým procesem sacharolytických mikroorganismů je **glykolýza**, která spočívá v přeměně hexóz, tzn. glukózy, fruktózy, galaktózy nebo mannózy. Pro většinu mikroorganismů je také společný úsek glykolýzy k **pyruvátu**, ve kterém je jeden dehydrogenační stupeň. K hlavním reakcím glykolýzy patří postupná **fosforylace** hexóz až ve fruktózu-1,6-bifosfát, štěpení fruktózy-1,6-bifosfátu ve dva triózafosfáty a oxidace triózafosfátů v 1,3-bifosfoglycerát. Tato oxidace, při které se redukuje koenzym NAD<sup>+</sup> v NADH + H<sup>+</sup>, je u některých mikroorganismů jediným zdrojem energie glykolýzy.

Jedna část takto získané energie se ihned uloží v ATP a další část se uvolní až při přeměně makroergické sloučeniny fosfoenolpyruvátu v pyruvát za vzniku další ATP. Pyruvát vzniklý glykolýzou je u **homofermentativních mléčných bakterií** dále redukován za anaerobních podmínek za součinnosti redukovaného kofaktoru v **laktát**, což je anion mléčné kyseliny. Homofermentativní bakterie mléčného kvašení tak produkují více než 85 % kyseliny mléčné z glukózy. Tyto bakterie zkvašují z 1 mol glukózy 2 mol kyseliny mléčné [1, 6, 12].

**Heterofermentativní mléčné bakterie** neobsahují glykolytický enzym, který štěpí hexóza-1,6-bisfosfát ve dva triózafosfáty, a proto převádějí hexózy oxidačním mechanismem hexózafosfátového zkratu v pentóza-5-fosfát a oxid uhličitý. Za spoluúčasti anorganického fosfátu se pak enzymově štěpí pentóza-5-fosfát v **acetylfosfát** a **glyceraldehyd-3-fosfát**. Z acetylfosfátu vzniká poté za spoluúčasti redukovaného kofaktoru etanol. Glyceraldehyd-3-fosfát je přeměněn v pyruvát a postupně v laktát. Tím vzniká z hexózy ekvimolární množství **laktátu**, **oxidu uhličitého** a **etanolu**. Tyto heterofermentativní bakterie tedy produkují jen 50 % kyseliny mléčné a zkvašují z 1 mol glukózy 1 mol kyseliny mléčné, 1 mol etanolu a 1 mol oxidu uhličitého [6, 12].

## 1.2 MEZOFILNÍ STARTOVACÍ KULTURY

Mezofilní kultury rostou při teplotách 10 – 40 °C, avšak optimální teplota se pohybuje kolem 30 °C. Zmíněné kultury jsou používány při výrobě mnoha druhů sýrů, kysaných mléčných výrobků, kysané smetany, másla a dalších. Jako nejdůležitější mezofilní bakterie mléčného kvašení se uvádí *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* a *Leuconostoc lactis*. Uvedené druhy a kmeny se vhodně kombinují na složené nebo smíšené kultury za účelem získání stabilních vlastností vyráběných produktů. Vytvářet a kombinovat se můžou jen ty kmeny a druhy, jejichž snášenlivost je přijatelná a dle možností se mají v růstu a metabolismu doplňovat [1, 2].

První skupinou mezofilních bakterií, která byla nejvíce prostudována v souvislosti se zrání sýrů je *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* [11].

## 1.3 TERMOFILNÍ STARTOVACÍ KULTURY

Termofilní startovací kultury jsou nejznámější kultury používané při kvašení mléka. Mají své optimální teploty růstu mezi 40 – 50 °C. Zmíněné kultury se rozlišují na skupinu pří-

rodních smíšených kultur s neúplně známým složením a složené kultury se známým složením. Tyto kultury jsou používány k výrobě sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou a dále se využívají k výrobě jogurtů, měkkých sýrů i tvarohů. Přírodní smíšené kultury jsou široce využívány k výrobě sýra ve Švýcarsku, Itálii i Francii. Mezi startovací termofilní kultury se řadí *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus casei*. Při výrobě sýrů je významnou úlohou termofilních kultur nejen proteolytická aktivita, ale dochází i k fermentaci laktózy na kyselinu mléčnou [1, 2, 13].

Mezi nejprostudovanější termofilní bakterie v sýrech se řadí *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus helveticus* [11].

## 1.4 VYBRANÍ ZÁSTUPCI BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Bakterie mléčného kvašení jsou používány celosvětově ve výrobě fermentovaných potravin. Jejich nejdůležitější aplikace je v tomto ohledu nepochybně v mlékárenském průmyslu [14].

### 1.4.1 Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* se řadí do čeledi *Lactobacillaceae* a je zdaleka nejrozsáhlejší ze všech rodů bakterií mléčného kvašení. Laktobacily jsou velmi heterogenní a řadí se sem druhy s odlišnými fyziologickými, biochemickými a fyziologickými vlastnostmi. Různorodost se odráží v rozmezí 33 – 55 % mol G+C v DNA. Obecně se předpokládá, že by rozsah G+C mol neměl přesahovat rozmezí 10 %. Laktobacily mají tvar tyčinek, jejichž velikost se mění od dlouhých až ke krátkým buňkám. Vyskytují se v palisádách nebo krátkých řetězcích, barví se grampozitivně a jsou nepohyblivé, fakultativně anaerobní, občas mikroaerofilní, s fermentativním metabolismem. Nejméně polovinu konečných produktů metabolismu uhlíku tvoří kyselina mléčná. Kromě fermentovaných sacharidů jako zdroj uhlíku a energie vyžadují laktobacily i nukleotidy, vitaminy skupiny B a aminokyseliny. Optimální teplota růstu se pohybuje v rozmezí od 30 – 40 °C. Tyto kmeny rostou však i při 45 °C a jejich růst je možný i při 15 °C a v přítomnosti 3 % NaCl. Tento rod netvoří katalázu ani cytochromy. Laktobacily rostou pouze na komplexních médiích se všemi výživnými substráty. Jsou náročné na živiny a růstové faktory. Optimální hodnota pH půdy pro růst se pohybuje v

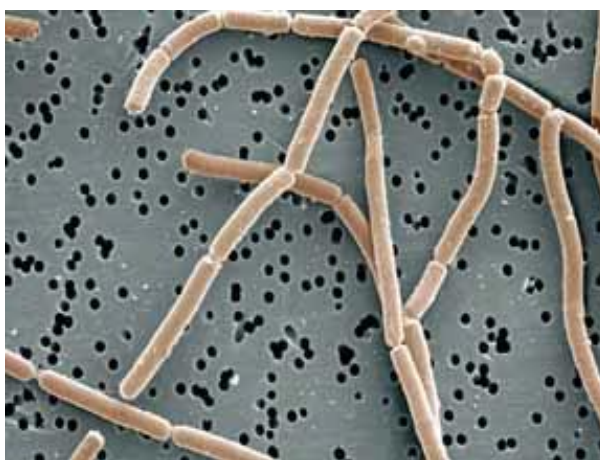


rozmezí 5,6 – 6,2. Růst na povrchu tuhých médií podporuje anaerobní atmosféra nebo redukce tenze kyslíku a přídavek 5 – 10 % CO<sub>2</sub> [1, 2, 10, 15].

Na základě produktů fermentace cukrů se dělí do tří skupin:

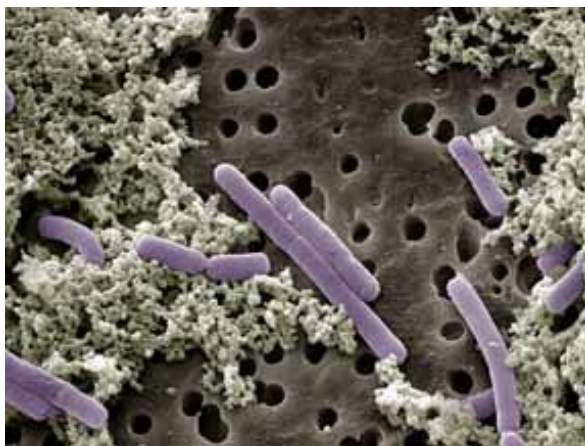
1. **Laktobacily homofermentativní.** Jediným produktem metabolismu sacharidů homofermentativních laktobacilů je kyselina mléčná. Do této skupiny se řadí *Lactobacillus delbrueckii* a jeho poddruhy *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus* a *Lactobacillus helveticus*. *Lactobacillus bulgaricus* je hlavně používán jako startovací kultura k výrobě jogurtů spolu se *Streptococcus thermophilus*, který se řadí také mezi homofermentativní bakterie mléčného kvašení. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* se používá i ve spojení s *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. helveticus* a se *Str. thermophilus* jako startovací kultura pro výrobu sýrů švýcarského (ementál) a italského typu (mozzarella).

Dále do zmíněné skupiny patří *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus farciminis* a *Lactobacillus acidophilus*, který se vyskytuje ve velké koncentraci v obsahu střeva a na sliznicích zažívacího traktu teplokrevných živočichů [1, 2, 7, 10, 16].



Obr. 2. *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [17].

2. **Laktobacily fakultativně heterofermentativní.** Produktem metabolismu je kyselina mléčná nebo směs kyseliny mléčné, mravenčí, octové a etanolu. Do této skupiny se zahrnuje *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum*, *Lactobacillus casei* subsp. *tolerans*, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, *Lactobacillus bavaricus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus alimentarius* a jiné. Význam této skupiny je v mlékárenském a konzervářenském průmyslu, kde se používá ve formě čistých kultur. Dále tyto kultury najdeme v sýrech, v masě a v zelenině [2, 10].



Obr. 3. *Lb. casei* subsp. *casei* [17].

**3. Laktobacily obligátně heterofermentativní.** Tyto laktobacily fermentující hexózy používají metabolickou dráhu závislou na fosfoketoláze. Obligátně heterofermentativní druhy laktobacilů produkují kyselinu mléčnou a v ještě menším množství kyselinu mravenčí, kyselinu octovou, oxid uhličitý a etanol. Pentózy a glukózy obligátně heterofermentativní laktobacily nefermetují. Do této skupiny patří *Lactobacillus kefir* a *Lactobacillus fermentum*. Vyskytují se v mléku, mléčných výrobcích jako jsou zrající sýry, ve fermentovaných rostlinných produktech, ale také v gastrointestinálním traktu [2, 10, 18, 19].

Tab. 2. Zkvašování cukrů u zkoumaných druhů rodu *Lactobacillus* v sýrech [15].

Identifikace	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>pseudoplantarum</i>	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>casei</i>	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>	<i>Lb. casei</i> subsp. <i>tolerans</i>	<i>Lb. plantarum</i>
Cukr					
Fruktóza	+	+	+	+	+
Galaktóza	+	+	+	+	+
Glukóza	+	+	+	+	+
Laktóza	+	+	+	+	+
Maltóza	+	+	+	–	+
Rafinóza	–	–	–	–	+
Sorbitol	+	+	+	–	+
L-Arabinóza	–	–	+	–	+

+ pozitivní, – negativní

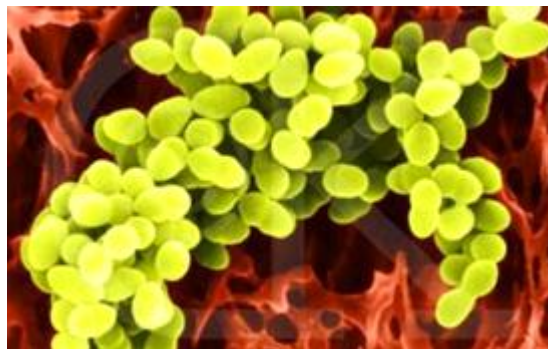
V čerstvě nadojeném mléku se laktobacily nenachází, dostávají se do něj až z vnějšího prostředí prachem, mlékárenským zařízením a stykem s mlékárenským nářadím. Laktobacily

rostou v mléku pomaleji než laktokoky, proto je v čerstvém kyselém mléku méně laktobacilů v porovnání s laktokoky. Jestliže je však kyselé mléko vystaveno delší dobu vhodným teplotním podmínkám, dochází k přerůstání laktobacilů, a to z toho důvodu, že laktobacily jsou vůči kyselějšímu prostředí tolerantnější než laktokoky [2].

Pro výrobu sýrů se používají kultury *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. Ve všech druzích a typech sýrů, které zrají déle než 14 dní se rozmnožují různé mezofilní laktobacily, jako jsou *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis* a další. Při kažení mléčných produktů se uplatňuje řada laktobacilů, ale jen dva z nich mají specifický účinek. *Lactobacillus maltaromaticus* způsobuje sladovou pachut' mléka a *Lactobacillus bifermantans* způsobuje za určitých okolností tvorbu ok u sýrů holandského typu [2].

#### 1.4.2 Rod *Lactococcus*

Rod *Lactococcus* se řadí do čeledi *Streptococaceae*. Laktokoky jsou homofermentativní, fakultativně anaerobní, grampozitivní a katalázanegativní a tvoří buňky izolované v párech nebo řetízcích. V potravinářství se laktokoky používají zejména v mlékárenském průmyslu jako čisté mezofilní zákysové kultury. Optimální teplota růstu je 30 až 37 °C. Laktokoky rostou však i při 10 °C, avšak ne při 45 °C. Rod *Lactococcus* zahrnuje druhy *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*, *Lactococcus plantarum* (izolován hlavně z rostlin), *Lactococcus raffinolactis* (občas nalezen v syrovém mléku a sýrech), *Lactococcus piscium* (izolován z lososa) a *Lactococcus garviae* (izolován z ryb, zvířat, mléka a sýrů) [1, 2, 8, 10, 20, 21].



Obr. 4. *Lactococcus lactis* [22].

Mezofilní laktokoky se používají k výrobě širokého spektra různých typů sýrů i másla, bez ohledu na druh mléka. Tyto kultury byly vybrány na základě jejich výkonnosti v procesu kvašení [13].

V syrovém mléku, sýrech a dalších mléčných výrobcích se obvykle nachází dva typy laktokoků, a to *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Tyto dva poddruhy obecně dosáhnou vysoké hladiny těchto laktokoků již v první den výroby a tuto hladinu si udržují po celou dobu zrání [1, 2, 20].

*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* se poměrně dlouho používaly jako startovací kultury pro mléčné kvašení (v sýrech, u zakysaných smetan a v másle), složené z jednoho nebo více kmenů s kombinací dalších bakterií mléčného kvašení. Tyto druhy také přispívají k vyvíjení textury produkcí exopolysacharidů nebo k rozvoji chuti tím, že produkují aromatické sloučeniny (aldehydy, ketony, alkoholy). Lze je také použít ke konzervaci potravin díky jejich schopnosti produkovat organické kyseliny a bakteriociny [20].

#### **1.4.2.1 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis***

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* je využíván po celém světě k výrobě kysaných mléčných výrobků jako jsou např. sýry [23]. Kmeny tohoto laktokoka tvoří ovoidní buňky v párech a kratších nebo delších řetězcích s průměrem 0,5 – 1 µm, vyznačuje se schopností hydrolyzy argininu a metabolizací řady druhů cukrů. Fermentuje glukózu, laktózu a maltózu homofermentativně na kyselinu mléčnou. Sacharózu fermentují v malé míře jen některé kmeny. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* roste při 10 °C, ale jeho optimální teplota je 30 °C. Roste také v přítomnosti 4 % NaCl, v mléku s 0,3 % metylenové modří a při pH 9,2 [2, 10, 13, 15].

Některé kmeny *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* syntetizují bakteriocin, zejména nizin. Tato látka inhibuje růst řady grampozitivních bakterií. Nizin je antagonistou druhu *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Jiné kmeny tohoto poddruhu *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* metabolizují leucin za vzniku 3-metylbutanal, který způsobuje sladovou chuť a aroma zejména u holandských sýrů [2].

#### **1.4.2.2 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris***

Druh *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* obvykle doplňuje *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. V mléku tvoří tyto uvedené druhy delší řetězky a větší buňky. *Lactococcus lactis* subsp.

*cremoris* roste při 10 °C, ale i při nižší teplotě. Při 40 °C již neroste. V porovnání s *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* neroste v přítomnosti 4 % NaCl, v mléku s 0,3 % metylenové modří a při pH 9,2. Z cukrů fermentuje glukózu a laktózu a jen zřídka fermentuje maltózu a sacharózu. Podobně jako *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* má i tento druh schopnost produkovat oxid uhličitý, kyselinu octovou, diacetyl a acetoin. Je široce využíván ve fermentovaných mléčných výrobcích [1, 2, 10, 13, 15].

### 1.4.3 Rod *Streptococcus*

Streptokoky se řadí do čeledi *Streptococaceae* a patří mezi bakterie, které byly mikrobiology rozpoznány jako první, z důvodu hojného onemocnění na zvířatech i lidech. Rod *Streptococcus* byl původně popsán na základě morfologických, fyziologických, sérologických a biochemických vlastností a zahrnoval celou řadu organismů včetně vysoce patogenní bakterie *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae* a *Streptococcus pyogenes*. Z rodu *Streptococcus* byly vyčleněny v roce 1984 a 1987 rody *Lactococcus* a *Enterococcus* [10].

Rod *Streptococcus* se v současné době dělí na tři skupiny:

1. Pyogenní streptokoky
2. Orální streptokoky
3. Jiné streptokoky

Rod *Streptococcus* tvoří grampozitivní koky uspořádané do řetízků, jsou fakultativně anaerobní a katalázanegativní. Prosperují v prostředí s velmi dobrou zásobou sacharidů a bílkovin. Všechny druhy streptokoků přeměňují kyselinu mléčnou jako hlavní metabolit. Druh *Streptococcus thermophilus* se řadí mezi orální streptokoky a je významnou složkou čistých mlékařských kultur. Kromě použití jako startovacích kultur při výrobě jogurtů, je tento druh velmi důležitý k výrobě mnoha druhů sýrů [1, 2, 10, 24, 25, 26].

#### 1.4.3.1 *Streptococcus thermophilus*

*Streptococcus thermophilus* tvoří ovoidní buňky v párech nebo dlouhých řetízcích o velikosti 0,7 – 0,9 µm. Tento druh se vyznačuje tvorbou dvou mléčných dehydrogenáz, které produkují L-laktát, čímž se liší od jiných bakterií mléčného kvašení. Ostatní bakterie mléčného kvašení mající více než jednu dehydrogenázu tvoří DL-laktát [2]. *Str. thermophilus* je

výborný regulátor kyselosti mléka a je relativně odolný vůči teplu, roste při teplotě 45 °C, ale i 50 °C. Při 15 °C neroste [2, 10, 27]. Optimální teplotou růstu *Str. thermophilus* je 40 °C, kdy dochází k hydrolyzaci laktózy přes  $\beta$ -galaktozidázy. *Str. thermophilus* je výživově náročný a vyžaduje komplexní směs aminokyselin pro růst.

*Str. thermophilus* tvoří kyselinu mléčnou a mravenčí. Kyselina mléčná snižuje pH prostředí na optimum pro růst bakterie *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a kyselina mravenčí růst této bakterie stimuluje. *Str. thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* jsou tedy ve vzájemné symbióze [13].



Obr. 5. *Streptococcus thermophilus* [28].

*Streptococcus thermophilus* fermentuje glukózu, manózu, fruktózu a laktózu a u některých kmenů je možná i fermentace sacharózy. Nesnáší koncentraci NaCl vyšší než 2 %. Nejvhodnějším prostředím pro růst tohoto druhu je mléko. Nejlépe roste v mléku lakmusovém, které nejdříve zružoví, pak se sráží a postupně se od spodu redukuje [2].

#### 1.4.4 Rod *Enterococcus*

Rod *Enterococcus* se řadí do čeledi *Streptococaceae* a tvoří grampozitivní koky. Morfologicky, ale i fermentačně jsou tyto koky podobné druhu *Streptococcus thermophilus* a rodu *Lactococcus*. Od zmíněného druhu a rodu se liší fyziologickou odolností a sérologickou skupinou. Enterokoky byly popsány jako organizmy, které rostou při teplotě 10 °C a 45 °C a pH 9,6 [5, 2, 10]. Tyto bakterie jsou vysoce rezistentní vůči vysoké koncentraci soli, tedy až 6 % NaCl [5, 29].

Mezi enterokoky se v současnosti zařazují tyto samostatné druhy: *Enterococcus faecalis* (nachází se ve střevech lidí i zvířat a v medicíně souvisí se subakutními endokarditidami), *Enterococcus faecium* (původním stanovištěm jsou střeva lidí i zvířat a zdrojem mléko, mléčné produkty i sušené mléko), *Enterococcus avium* (ve střevech drůbeže), *Enterococcus gallinarum* (u domácí drůbeže), *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus durans* (běžně izolován z mléka a mléčných výrobků), *Enterococcus maloduratus*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus mundtii* [1, 2, 5, 10, 29].

Enterokoky podobně jako jiné bakterie mléčného kvašení fermentují sacharidy. V mléku byla při laboratorní teplotě u *Enterococcus durans* dosažena kyselost 34,5 °SH. Tyto bakterie jsou stálou součástí mikroflóry syrových fermentovaných klobás a dalších rostlinných potravin [2, 10].



Obr. 6. *Enterococcus faecalis* [30].

Bakterie tohoto rodu byly také udávány v různých stádiích zrání odlišných typů sýrů. V těchto stádiích jsou enterokoky poměrně stabilní, protože mají schopnost růst v nepříznivých podmínkách a jsou také schopné přežít pasterizaci. Počty enterokoků bývají obzvláště vysoké v mléku ovcí, a tedy v ovčích sýrech. Pro vytvoření aroma je důležitá lipolytická a proteolytická aktivita enterokoků [29].

#### 1.4.5 Rod *Leuconostoc*

Rod *Leuconostoc* se řadí mezi heterofermentativní bakterie mléčného kvašení [1, 2, 4, 10] a je opět zařazen do čeledi *Streptococaceae*. Tyto bakterie se vyskytují v párech nebo v řetězcích, buňky jsou grampozitivní a katalázanegativní, dále nepohyblivé a tvoří spory. Je prokázáno, že všechny bakterie mléčného kvašení včetně rodu *Leuconostoc* neredukují dusičnany na dusitany a tvoří drobné, světle bílé kolonie. Optimální teplotou tohoto

rodu je rozmezí 20 – 30 °C. Rostou však i v 5 °C a v bujónu s obsahem 3 % NaCl. Tyto bakterie nerostou při 45 °C nebo v bujónu s 5 – 6 % NaCl a žádný druh nehydrolyzuje arginin. V živných půdách vyžadují rod *Leuconostoc* přítomnost růstových faktorů, vitamínů skupiny B a aminokyselin [2, 15].

V současnosti se mezi druhy řadí *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (využívá se jako kultura v konzervářství), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (vyskytuje v rostlinných materiálech a mléku), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* (může být v mlékárenském průmyslu použit účelově), *Leuconostoc lactis* (izoluje se poměrně málo, nejčastěji z mléka a mléčných produktů) [1, 2, 10].

*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* a *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* obecně představují největší podíl leukonostoků izolovaných ze sýrů. Vysoký podíl těchto poddruhů byl nalezen v sýrech s moudrou plísní uvnitř [5].



Obr. 7. *Leuconostoc mesenteroides* [31].

Rod *Leuconostoc* může tvořit významné množství diacetylu disimilací citrátu v mléku. Při fermentaci zeleniny je rod *Leuconostoc* také důležitý, hlavně ve výrobě kyselého zelí, kde pak dochází k mléčnému kvašení. Druhy a poddruhy tohoto rodu se rozlišují určitými charakteristikami jako jsou kvašení sacharidů, vznik dextranu ze sacharózy, hydrolyza eskulinu, potřebou růstu za podmínek odlišného pH a teploty a disimilací citrátu. Klasifikace rodu *Leuconostoc* je velmi obtížná [1].



Tab. 3. Fyziologická a biochemická charakteristika rodu *Leuconostoc* v sýru [15].

Rod <i>Leuconostoc</i>	
CO <sub>2</sub> z glukózy	+
Růst v 0 °C	+
Růst v 45 °C	-
Růst v bujónu s 3,5 % NaCl	+
Růst v bujónu s 6,5 % NaCl	-
Hydrolyza argininu	-
Izomer kyseliny mléčné	D (-)
Dextran ze sacharózy	+/- dle typu sýru
Acetoin z citratu	+/- dle typu sýru

## 2 SÝRY

Sýry jsou čerstvé nebo prozralé produkty, které člověk poznal už před 8 000 lety. První písemné zprávy o výrobě sýrů v Čechách pocházejí z desátého století. Sýry patří k nejhodnotnějším potravinám z hlediska složení, jsou důležitým zdrojem vápníku, ale i vitamínů A, B, D a E. Nejslavnější pověst mají právě Olomoucké tvarůžky, dříve nazývané Olomoucké syrečky, které se jako jediný sýr domácího původu udržuje na trhu dodnes. Výroba sýrů se řadí k náročným mlékárenským technologiím, kdy všechny složky mléka podléhají řadě biologických a fyzikálně-chemických změn [32, 33, 34].

### 2.1 ROZDĚLENÍ SÝRŮ

Sýry lze rozdělit podle řady hledisek. Základní je rozdělení na sýry sladké a kyselé. Kyselé sýry jsou historicky nejstarší sýry a termínem „kyselé“ se označují proto, že při srážení bílkovin mléka se nepoužívá enzymatická koagulace působením syřidla, avšak mléko se sráží pouze kyselinou mléčnou. Tato kyselina vzniká z laktózy činností mikroorganismů čistých kultur, které se do mléka přidávají záměrně ve formě zákysu. Termínem „sladké“ sýry se označují sýry, u kterých se ke srážení mléka používají enzymy obsažené v syřidle [34, 35].

Podle sortimentu dělíme sýry na [34, 35, 36, 37]:

- přírodní, tzn. vyráběné přímo z mléka,
- tavené, tzn. vyráběné dalším zpracováním přírodních sýrů,
- speciální, tzn. s náhradou mléčného tuku rostlinnými tuky.

Podle obsahu vody v tukuprosté sušině rozeznáváme:

- měkké ( minimálně 67 %),
- polotvrdé (54 – 69 %),
- tvrdé (49 – 56 %),
- extra tvrdé (méně než 51 %).

Dělení podle tučnosti:

- vysokotučné (nad 60 % t.v.s.),

- plnotučné (45–60 t.v.s.),
- polotučné (25–45 t.v.s.),
- nízkotučné (10–25 t.v.s.),
- odtučněné (pod 10 t.v.s.).

Podle druhu použitého mléka:

- kravské,
- ovčí,
- kozí.

Podle způsobu zrání:

- sýry čerstvé, včetně tvarohů,
- sýry zrající v celé hmotě, (např. Eidam, Ementál),
- sýry zrající od povrchu do vnitřní hmoty, (např. Romadúr, Hermelín),
- sýry s plísní uvnitř těsta (např. Niva) a na povrchu těsta (např. Camembert).

## 2.2 ZÁKLADNÍ POSTUP VÝROBY SYRŮ

Výroba sýrů je složitý proces a každý krok je rozhodující pro kvalitu sýra. Principem výroby sýrů je odstraňování vody nebo syrovátky z mléka a následné kysání mléčné hmoty, tzv. sýřeniny, kontrolovaným způsobem. První část procesu zahrnuje sběr a přípravu mléka, dále je to výroba sýřeniny, zahušťování sýřeniny krájením, zahříváním a vysolováním a v poslední fázi se sýr nechává zrát [32].

Základní surovinou k výrobě sýrů je u nás kravské mléko, ale vyrábějí se také z mléka koziho a ovčího. Mléko musí odpovídat požadavkům daným vyhláškou, od zdravých dojníc, správně krmených a s rovnováhou minerálních látek (vápník, fosfor, hořčík). Pro výrobu sýrů je nevhodné mléko na začátku a na konci laktace a mléko s obsahem psychrotrofních mikroorganismů, především jejich enzymů. Důležité je chemické složení mléka, které má zásadní význam pro výtěžnost výroby. Výtěžnost určuje obsah kaseinu, který je v poměru s tukem rozhodující pro výsledný obsah tuku v sušině. Mléko musí mít zachovanou kysací schopnost [32, 33, 34].

Sýry se vyrábějí šetrnou pasterací, při které se mléko zahřívá na teplotu 71 °C a udržuje se při této teplotě 15 vteřin. Před vlastním sýřením se upravuje tučnost mléka. Přidává se chlorid vápenatý pro zachování syřitelnosti a zlepšení kvality sýřeniny a dusičnan draselný, který chrání sýry před pozdním duřením. Mléko se zaočkuje přídavkem smetanové kultury (0,01 – 0,05 %) a ponechá se do druhého dne. Úprava mikroflóry má vliv nejen na průběh sýření, ale i zrání sýrů. Mléko se zahřeje na sýřicí teplotu a do mléka se za stálého míchání přidá 1 % smetanového zákysu 30 – 45 minut před sýřením. Sýření je základní výrobní stupeň, který lze rozlišit do několika fází. V primární, enzymové fázi sýření, dochází účinkem syřidla k destabilizaci kaseinových micel hydrolyzou  $\kappa$ -kaseinu na para- $\kappa$ -kasein a glykomakropeptid. V této fázi dochází současně k poklesu náboje micel a tím je usnadňován proces shlukování. V sekundární, koagulační fázi sýření, dochází při teplotě vyšší než 6 °C a za přítomnosti vápenatých iontů k tvorbě gelu. V poslední tzv. terciární fázi sýření se působení syřidla uplatňuje při zrání sýrů. Na průběh sýření má vliv zejména teplota, kyselost mléka a koncentrace syřidlového enzymu [33, 34].

Dalším důležitým krokem je zpracování sýřeniny, které zajišťuje tvorbu sýrového zrna vhodného pro formování a oddělení syrovátky ze struktury gelu. První operací je krájení, které je zahájeno po dosažení požadované tuhosti gelu. Krájení je prováděno v různých výškových rovinách. Používají se výrobníky opatřené strunnými nebo plochými noži uloženými v rámu, tzv. harfě. Po rozkrojení sýřeniny se vypouští syrovátka a provádí se vymíchání, které zajišťuje ztužování zrna. U některých druhů sýrů, zejména tvrdých a polotvrdých, se provádí ještě dohřívání, při kterém se zvyšuje teplota z teploty sýření na teplotu dosoušení. U sýrů nízkodohříváných s obsahem 30 % tuku v sušině se teplota dosoušení pohybuje při 36 – 37 °C, zatímco u sýrů s obsahem 45 % tuku v sušině je vhodnou teplotou 39 – 40 °C. U sýrů vysokodohříváných se dohřívá na teplotu 48 – 56 °C [32, 33, 34].

Při výrobě eidamu i goudy se zařazuje mezi výrobní operace praní sýrového zrna. Tím dochází ke snižování obsahu laktózy a současně k dohřívání sýřeniny, proto se k praní používá teplá voda. Kromě vody se může sýřenina dohřívát přes plášť výrobníku nebo kombinací obou způsobů [33].

Tab.4. Jednotlivé operace zpracování sýřeniny v minutách [34].

Jednotlivé operace	Eidam sýr (v minutách)	Měkký sýr (v minutách)
Sýření	30	40
Krájení	15	15
Odpouštění syrovátky	5	–
Míchání	15	10
Přídavek vody	15	–
Dosoušení	60	–
Celkem zpracování	140	65
Vypouštění	10	10

Velikost a tvar sýrům dodávají 3 kroky, mezi které patří:

1. lisování,
2. odkapávání,
3. formování.

Lisováním se sýřenina zbavuje syrovátky a laktózy, spojí se a vytvoří sýrovou hmotu. V současnosti jsou využívány moderní linky s předlisovacím zařízením a vlastní lisovací vanou. U měkkých sýrů se používá lisování vlastní vahou a je nutné obracení, zatímco tvrdé a polotvrdé sýry se lisují postupně narůstajícím tlakem 0,005 – 0,04 MPa po dobu jedné hodiny. K formování sýrů se používají kovová nebo plastová tvořítka s možností odtoku syrovátky. Mezi nejdokonalejší tvořítka z plastické hmoty patří tvořítka s kovovou výztuží [33, 34].

Posledními technologickými operacemi při výrobě sýrů je jejich solení a zrání. Solení je nezbytnou operací, která má vliv na výslednou chuť. Solením se zpevní povrch sýrů a dochází k regulaci obsahu vody. Obsah soli většiny sýrů je v rozmezí 0,5 – 2 %, s výjimkou sýrů s plísní uvnitř a bílých sýrů, u kterých se obsah soli pohybuje od 3 do 7 %. Při solení dochází k difuzi soli do sýrů. Solení se provádí na sucho, do zrna nebo nejčastěji v solné

lázni. Zrání sýrů představuje souhrn změn způsobených nativními enzymy, enzymovou činností kultur a syřidlovými enzymy, které přeměňují chemické složení sýrů ze složitých organických molekul v jednodušší. Zrání probíhá aerobně (od povrchu dovnitř) působením povrchové mikroflóry nebo anaerobně (v celé hmotě sýra). Procesem zrání procházejí všechny druhy sýrů, s výjimkou sýrů nezrajících, které se konzumují v čerstvém stavu. Pro zrání je důležitá doba zrání, teplota a u sýrů, které nezrají ve fóliích i relativní vlhkost [32, 33, 34].

## 2.3 MĚKKÉ ZRAJÍCÍ SÝRY

Podle způsobu zrání rozdělujeme tuto skupinu sýrů na [38]:

1. Sýry zrající pod mazem,
2. Sýry zrající s plísní na povrchu,
3. Sýry zrající s plísní v těstě.

Měkkými zrajícími sýry jsou smetanové nebo krémové sýry a jejich charakteristickou chuť jim dodává smetanová kultura, která obsahuje druhy *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* a *dextranicus* [39].

### 2.3.1 Měkké sýry zrající pod mazem

Tyto sýry patří do skupiny sladkých sýrů. Jsou pevné, měkčí konzistence a rozlišují se velikostí a tvarem na malé hranolky a válečky. Vyrábí se z plnotučného mléka zaočkovaného mezofilním zákysem a sráží se pomocí syřidla. Po krájení a drobení získaného zrna se část syrovátky odpustí a nahradí se teplou vodou. Po určité době míchání zrna a odpuštění syrovátky se zrno formuje v závislosti na typu sýra. Společnou charakteristikou těchto sýrů je zrání, které převládá od povrchu směrem do středu sýra. Sýry zrají téměř 2 týdny při 14 – 16 °C a 95% vlhkosti. Mezi charakteristický sýr zrající pod mazem se řadí Romadúr, dále sýr Dezertní a Limburský [2, 33, 34, 35, 38, 39].

Během technologického procesu se uplatňují bakterie i kvasinky. Z bakterií se jedná o druhy *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *lactis*, které jsou součástí zákysové kultury. Z kvasinek, které vytváří na povrchu sýra bílý až nažedlý povlak *Candida vini*, *Candida lipolytica* a *Geotrichum candidum*. Oranžový maz na povrchu těsta vytváří aerobní bakterie druhu *Brevibacterium linens* a rod *Micrococcus* [2, 39].

Samostatnou skupinu měkkých sýrů tvoří Olomoucké tvarůžky. Zmínky o jejich výrobě se datují na našem území do 15. století a postupným vývojem se jejich výroba koncentrovala v Lošticích, v oblasti Hané. Poté tvarůžky získaly název Olomoucké. Tento sýr se vyrábí z tvarohu pomocí smetanové nebo termofilní zákysové kultury bez použití syřidla. Termofilní zákysovou kulturou jsou proteolytické mazové bakterie *Brevibacterium linens*, popř. *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* a *Lactobacillus helveticus*. Tvaroh tvoří 32 % sušiny. Sýry mají tvar válečků, které se formují na formovacím stroji a zrají pod žlutohnědým mazem [2, 33, 34, 38, 39, 40, 41]. V průběhu mikrobiálního zrání se na povrchu sýrů množí kvasinky rodů *Torulopsis* a *Candida*, které způsobují oxidační procesy. Kvasinky tak zoxidují nadbytečnou kyselinu mléčnou na oxid uhličitý a vodu, a tím je umožněn rozvoj proteolytických bakterií [2, 39].

### 2.3.2 Měkké sýry zrající s plísní na povrchu

Tyto druhy sýrů se vyrábí srážením mléka pomocí syřidla, bez dohřívání sýřeniny a lisování, s obsahem soli 3,5 % a s vnějším porostem plísně *Penicillium camemberti*. Plíseň se přidává do upraveného mléka a před vlastním sýřením se přidává přesné množství smetanového zákysu. Sýření probíhá při teplotě 31 °C po dobu 30 minut. Po solení se sýry nechávají osychat ve sklepě s teplotou do 20 °C a relativní vlhkosti do 85 %. Mezi měkké sýry zrající s plísní na povrchu se zařazuje u nás Hermelín a ve Francii Camembert. Povrch musí být porostlý bílou plísní s jemnou, máslovitou konzistencí [2, 34, 38].

### 2.3.3 Měkké sýry zrající s plísní v těstě

Sýry zrající s plísní v těstě jsou charakteristické plísní *Penicillium roqueforti*. Vyznačuje se tvorbou modrozelených žilek. Tato plíseň roste a fermentuje ve vnitřní hmotě sýrů za dostatečného přístupu kyslíku a přidává se do mléka před sýřením. Pro růst plísní je důležitá vhodná konzistence s dutinkami. Solení se provádí do těsta 3 dny na sucho nebo 2 dny v solné lázni, před vypuštěním syrovátky. Sýry zrají 5 týdnů při teplotách 12 – 14 °C, relativní vlhkosti 97 % a dozrávají při 10 °C. Mezi nejznámější zástupce u nás patří sýr Niva [2, 34].

### 3 METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

V současné době jsou využívány metody molekulární biologie, jako jsou například polymerázová řetězová reakce, sekvenace DNA i elektroforéza nukleových kyselin, které mohou posloužit k identifikaci mikroorganismů, včetně bakterií mléčného kvašení. Tyto metody jsou běžně zaváděny do klinické praxe z důvodu kultivační nezávislosti, specifické a vysoké citlivosti. Molekulární techniky jsou založeny na detekci specifického úseku DNA nebo RNA zkoumaného mikroorganismu. V potravinářské mikrobiologii je často využívanou aplikací konfirmace přítomnosti určitých mikroorganismů v analyzované potravíně. Základní využívanou metodou molekulární biologie je polymerázová řetězová reakce [42, 43].

#### 3.1 PRINCIP POLYMERÁZOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE

Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla poprvé popsána v roce 1986 a od této doby se stala jednou z nejpoužívanějších metod molekulární biologie. Nicméně její zavedení se datuje od roku 1985 Kary Mullisem, kterému byla udělena díky této metodě Nobelova cena za chemii [44, 45]. Polymerázová řetězová reakce nachází uplatnění při syntéze fragmentů DNA, v genetice, medicíně, diagnostice při mapování genomů a charakterizaci genů, izolaci genů ze vzorků tkáně, prenatální diagnostice dědičných chorob, určování paternity, k detekci infekčních mikroorganismů v potravinách, vodě, půdě a klinických vzorcích a při kontrole výrobků [46].

Princip polymerázové řetězové reakce je založen na replikaci nukleových kyselin, kterých je pro detekci a analýzu této techniky potřebné jen velmi malé množství. Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků DNA. PCR probíhá za podmínek *in vitro* ve směru 5' => 3' prostřednictvím DNA polymerázy. Syntéza DNA je řízena krátkými oligonukleotidy tzv. primery, které se váží na protilehlé řetězce DNA na počátku a na konci amplifikovaného fragmentu. Tyto primery se párují každý s jiným vláknem původní molekuly DNA [42, 43, 44, 47, 48, 49].

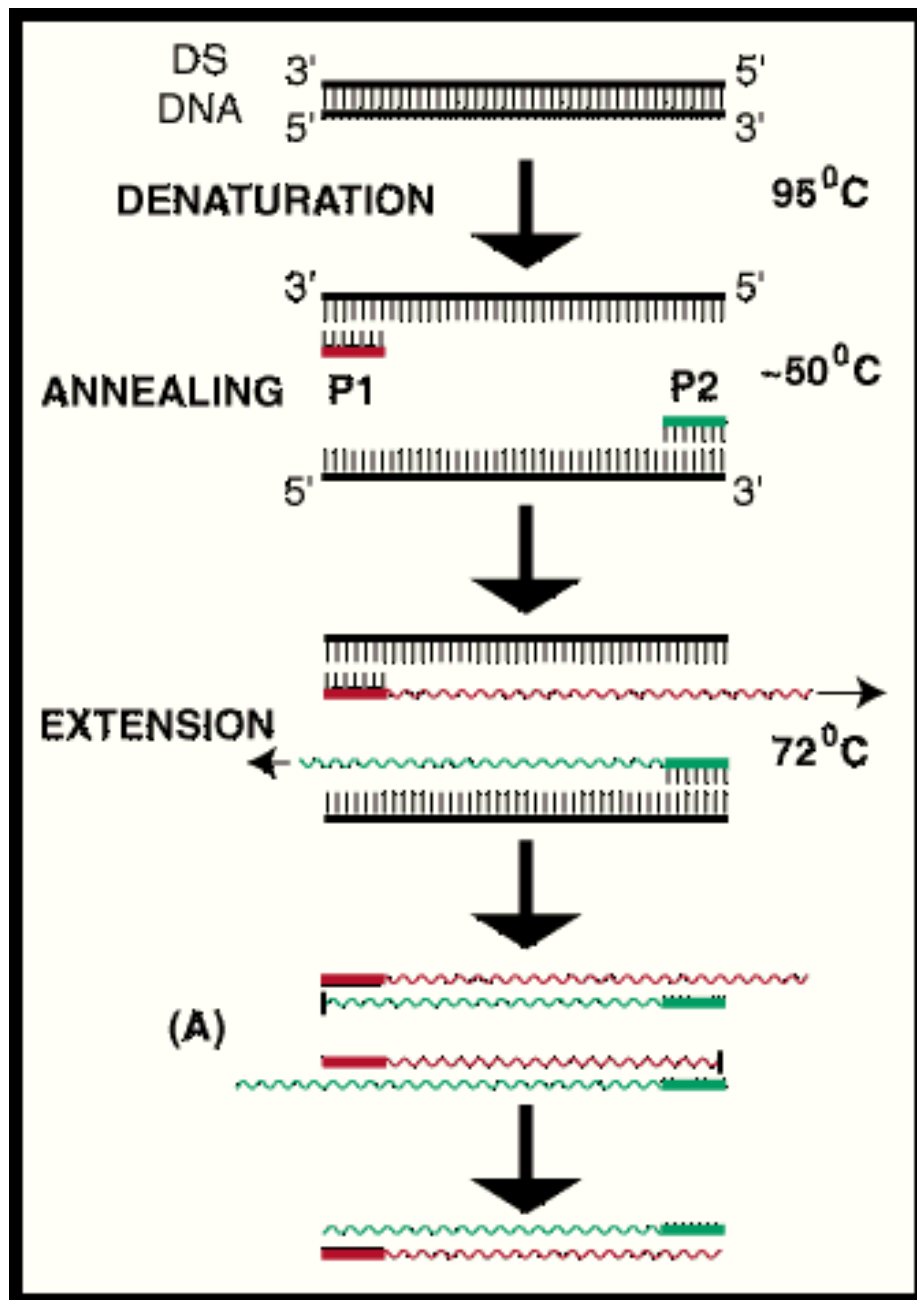
K syntéze DNA se používají termostabilní polymerázy izolované z termofilních mikroorganismů. Nejvíce využívaná je *Taq* DNA – polymeráza z *Thermus aquaticus*, která odolává teplotám, při nichž DNA denaturuje a je tak umožněna syntéza nových řetězců DNA opakovaně ve formě cyklů. [42, 44, 48, 49].



Jeden cyklus se skládá ze tří kroků, během kterých probíhají tři odlišné děje s různými nároky na teplotu [44, 45, 48].

1. krok: denaturace dvouřetězcových molekul DNA při teplotě 95 °C,
2. krok: připojení primerů k odděleným řetězcům DNA při teplotě 30 – 65 °C,
3. krok: syntéza nových řetězců DNA pomocí DNA-polymerázy při teplotě 65 – 75 °C.

Průběh PCR:



Obr.8. Základní cyklus PCR složený ze tří kroků [50].

V prvním kroku cyklu je PCR směs zahřátá na teplotu 95 °C po dobu 1 – 5 minut. Při této teplotě dojde k porušení vodíkových můstků, které k sobě pojí dvě vlákna dvouvláknové molekuly DNA. Vysoká teplota tedy způsobí denaturaci molekuly [44, 49, 51, 52, 53].

Směs je dále ochlazena na 50 – 60 °C. Při této teplotě se obě vlákna každé molekuly mohou zase spojit, ale nestane se tak, protože směs obsahuje nadměrné množství oligonukleotidů tzv. primerů, které se rychle připojují (annealing) na specifická místa molekuly DNA [44, 49, 51, 52]. V další fázi dochází ke zvýšení teploty na 72 °C a tím se aktivuje enzym *Taq* DNA-polymeráza, který je přítomen ve směsi. V tomto kroku PCR se *Taq* DNA-polymeráza připojuje k jednomu konci každého primeru a syntetizuje vlákna nová, která jsou komplementární k templátovým molekulám DNA (extension). Nyní vznikla čtyři vlákna molekuly DNA. Teplota se opět zvýší na 95 °C a molekuly dvouvláknové DNA, z nichž každá obsahuje jedno vlákno původní molekuly a jedno nové vlákno DNA, denaturují opět na jednotlivá vlákna. Tímto krokem začíná druhé kolo cyklu denaturace – připojení – syntéza. Opakováním cyklu 25x z jedné dvouvláknové molekuly vznikne více než padesát milionů nových dvouvláknových molekul [43, 44, 47, 48, 49, 51, 52, 53, 54].

K provedení této reakce PCR se používá termocykler, který umožňuje automatické změny teplot v daných časových intervalech. V reakční směsi musí být kromě templátové DNA, primeru a *Taq* DNA-polymerázy i 2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty (dNTP) a hořečnaté ionty [44, 47, 54].

Výsledným produktem reakce jsou úseky DNA definované délky, jejichž obvyklá velikost je desítky až tisíce nukleotidů. Většina PCR experimentů se ověřují elektroforézou části amplifikované reakční směsi v agarózovém gelu [48, 51].

### 3.1.1 Složení PCR směsi

- **PCR voda**
- **Reakční pufr** – je optimálním chemickým prostředím pro funkci DNA-polymerázy. Stabilitu *Taq* DNA-polymerázy mohou podporovat neionogenní detergenty, a také hovězí sérum albumin (BSA).
- **Deoxynukleotidtrifosfáty (dNTP)** – jsou používány jako stavební kameny pro syntézu nových řetězců DNA.

- **Primery** – vymezují oblast kopírování templátové DNA a označují se FORWARD (směrem tam) a REVERSE (směrem zpět). Jejich označení se určuje podle směru syntézy nového vlákna. Primery jsou chemicky syntetizovány jako sekvence komplementární ke specifickým místům na obou řetězcích molekuly DNA [42, 45, 48, 49].
- **DNA-polymeráza** – nejvíce používaná je termostabilní DNA-polymeráza. Tento enzym pochází z termofilních bakterií *Thermus aquaticus*.
- **DNA matrice** – jako DNA matrice se může použít malé množství jakékoliv jednořetězcová nebo dvouřetězcová DNA. Detekce amplifikované DNA je provedena obvykle pomocí agarózové gelové elektroforézy [42, 45, 48, 49].

### 3.1.2 Modifikace PCR

Polymerázová řetězová reakce je v dnešní době používána v mnoha variantách. Tyto varianty jsou upraveny podle potřeby použití. Mezi využívané PCR modifikace se zařazují:

- **Mnohonásobná PCR („Multiplex“)** je takový druh PCR, kdy je do reakční směsi přidáno několik párů primerů. Páry primerů rozpoznávají několik rozdílných cílových sekvencí, což umožňuje detekci několika genů současně v jedné reakční směsi. Používá se pro vyhledávání změn na dlouhých úsecích DNA a pro amplifikaci vnitřních kontrol současně se vzorky [44, 48].
- **Odstupňovaná PCR („Nested“)**. Tato PCR je velice citlivá metoda, která využívá vnějších a vnitřních primerů. Odstupňovaná PCR umožňuje detekovat i jedinou molekulu templátové DNA [44, 48].
- **PCR kolonií** je PCR, vhodná pro přípravu DNA z klonovaných inzertů v plazmidových vektorech. Pro tuto PCR jsou potřebné univerzální primery.
- **Obrácená neboli inverzní PCR** je varianta, která umožňuje amplifikovat úseky DNA o neznámé sekvenci [44, 48].
- **Modifikace konců DNA prostřednictvím 5' - konců primerů**. Primery této varianty PCR mohou být navrženy tak, že kromě sekvence požadované pro hybridizaci s cílovou DNA obsahují navíc další sekvenci adaptoru na 5' - konci, tzv. lepivý konec.

- **Alelově specifická PCR** je PCR pro detekci bodových mutací v genomech prováděna ve dvou nebo více paralelních reakcích.
- **Zpětná PCR** je určena k amplifikaci molekul RNA a současná technika využívá termostabilní DNA-polymerázu. Tato DNA-polymeráza je schopná účinně a specificky převést RNA na DNA při vysoké teplotě 72 °C [44, 48].
- **Asymetrická DNA.** Tato varianta PCR se od ostatních metod PCR liší tím, že jeden z primerů je ve 100<sup>x</sup> vyšší koncentraci než druhý. Tato metoda se využívá především pro účely automatického sekvencování.
- **PCR s degenerovanými oligonukleotidovými primery.** Metoda používaná pro uniformní náhodnou amplifikaci DNA.
- ***In situ* PCR** využívána pro lokalizaci určité sekvence nukleových kyselin uvnitř jednotlivých buněk. Metoda *In situ* má uplatnění jak v diagnostice, tak ve výzkumu [44, 48].

Mezi další metody PCR se zahrnují:

- Degenerovaná PCR
- Rychlá amplifikace konců cDNA
- Amplifikace vnitřních přepisovaných mezerníků
- Polymorfismus délky jednoduchých repetitivních sekvencí
- Náhodná PCR neboli náhodná amplifikace polymorfní DNA
- Interrepetitivní PCR [44, 48]

### 3.2 STANOVENÍ SEKVENCE DNA

Sekvencování DNA je stanovení primární struktury, posloupnosti nukleotidů v molekulách DNA. V současné době se k sekvencování DNA používá metoda chemická, která je založena na odbourávání řetězců DNA chemickými látkami a označuje se podle autorů jako Maximovo-Gilbertovo sekvencování.

Druhou používanou metodou je metoda enzymová. Tato metoda využívá inhibice enzymatické syntézy DNA a označuje se jako Sangerova metoda sekvencování. Při obou metodách je výchozí materiál stejný. Jsou to fragmenty DNA získané například restričním štěpením a naklonované ve vektoru. Mohou to být také produkty polymerázové řetězové reakce [44, 45].

Posledním pokrokem v technikách sekvencování je zavedení přístrojů pro automatické sekvencování. Tento postup využívá enzymatickou Sangerovu metodu a umožňuje stanovit a zpracovat sekvence DNA mnohem rychleji než při standardních postupech [44, 45].

### 3.3 ELEKTROFORÉZA V AGARÓZOVÉM GELU

Základní metodou identifikace, separace a purifikace nukleových kyselin nebo fragmentů DNA je elektroforéza v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Fragmenty DNA jsou rozděleny v elektrickém poli od katody k anodě. Jako mobilní fáze se používá agarózový nebo polyakrylamidový gel. Rychlost pohybu DNA v agarózovém gelu při elektroforéze závisí na koncentraci agarózy, rozměru molekuly, konformaci DNA, přítomnosti interkalčního barviva, typu používané agarózy a elektroforetickém pufru.

Elektroforéza musí probíhat ve vodném roztoku o stálém pH, proto jsou pro přípravu gelu a naplnění elektroforetické vany používány pufrы. Jejich úkolem je především neutralizovat ionty  $H^+$  a  $OH^-$ , které vznikají hydrolyzou vody na elektrodách. Pokud jsou molekuly správně rozříděny, pak každý pruh zářící po obarvení fluorescenčním barvivem v UV-světle představuje určité množství určité molekuly dané délky. Tuto molekulu můžeme z gelu izolovat a dále s ní pracovat samostatně, izolovaně od ostatních molekul jiných velikostí, se kterými byla původně smíšena ve vzorku nukleové kyseliny, který byl nanesen na start elektroforézy [42, 51, 56].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 4 MATERIÁL

### 4.1 ANALYZOVANÉ MĚKKÉ ZRAJÍCÍ SÝRY

Na obalech všech výrobců níže znázorněných výrobků je uvedeno použití – mlékařských kultur. Mezi žádoucí mezofilní kyselé kultury řadíme *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* a *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*.

Termofilní kyselé kultury: *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *laris*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Lactobacillus helveticus* [2].

- a) **Romadur** – měkký zrající středně tučný sýr, slaný

Výrobce: MADETA a.s., České Budějovice, ČR



- b) **Sedlčanský Pepin** – zrající sýr s oranžovou kůrkou, jemně prorůstá bílou plísní

Výrobce: Povltavské mlékárny, a.s., Sedlčany, ČR



- c) **Král sýrů Hermadur** – měkký zrající vysoko-tučný sýr s povrchovou kulturou

Výrobce: PRIBINA spol. s.r.o., Přibyslav, ČR



- d) **Sedlčanský Romadůžek** – pravý zrající sýr

Výrobce: Povltavské mlékárny, a.s., Sedlčany, ČR



- e) **Pravé olomoucké tvarůžky** – měkký pod mazem zrající sýr, odtučněný

Výrobce: A.W. spol. s.r.o., Loštice, ČR



- f) **Pravé olomoucké tvarůžky, kousky s kmínem** – odtučněný zrající sýr

Výrobce: A.W. spol. s.r.o., Loštice, ČR





## 4.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE

- Anaerostat Shellab, Cornelius, Spojené státy
- Autokláv 135 S, H+P VARIOKLAV- H+P Labortechnik AG, Německo
- Biohazard box EUROFLOW EF/S, Clean AIR, Holandsko
- Centrifuga laboratorní – chlazená Z 300 K, HERMLE, Labortechnik, Německo
- Vortex Heidolph REAX top, Německo
- Denzitometr DENZI-LA-METER, EMO Brno, CZ
- Digitální fotoaparát Sony Cyber-shot, Japonsko
- Mikrobiologický inkubátor Memmert, Německo
- Mikropipety: Nichipet (Japonsko), Hirschmann Laborgerate (Německo), BioHit (Fisher Scientific, Anglie), Eppendorf Reseach (Fisher Scientific, Anglie)
- Mikroskop laboratorní Motic BA200, Wedgwood AV Ltd., Anglie
- Stomacher Seward, Anglie
- Termoblog Bio TDB-100, Biotech, Praha, CZ
- Termocycler DNA Engine, Biotech, Praha, CZ
- Termostat BT 120, Praha, CZ
- Vortex Heidolph REAX top, Německo
- Laboratorní sklo, běžný laboratorní materiál

## 4.3 KULTIVAČNÍ MÉDIA A ROZTOKY

Dané navážky jsou uvedeny na 1 000 ml destilované vody:

### 1) MRS agar

- 67,15 g MRS bujón
- 15 g agar

### 2) M17 agar

- 39,21 g M17 bujón
- 15 g agar
- 100 ml 10% glukóza
- 52 ml 10% laktóza

**3) MRS bujón**

- 67,15 g MRS bujón

**4) M17 bujón**

- 39,21 g M17 bujón
- 100 ml 10% glukóza
- 52 ml 10% laktóza

**5) MPB – masopeptonový bujón**

- 3 g masový výtažek
- 5 g NaCl
- 10 g pepton
- 1 ml barva na OF test
- 1-2 g cukr: glukóza, laktóza, rafinóza, fruktóza, arabinóza, sorbit, galaktóza, sacharóza

Byla provedena úprava pH na 7,2 pomocí HCl nebo NaOH.

**6) OF médium**

- 3 g masový výtažek
- 5 g NaCl
- 10 g pepton
- 1 ml barva na OF test
- 1-2 g glukóza
- 3 g agar
- 1 g bromkresolová červeň

**7) Peptonová voda**

- 20 g pepton

**8) Fyziologický roztok**

- 8,5 g NaCl

**9) 0,1 % KNO<sub>3</sub>**

- 1,0 g KNO<sub>3</sub>

**4.4 BARVÍCÍ ROZTOKY****4.4.1 Roztoky pro barvení bakteriálních buněk dle Grama****a. Krystalová violet'**

- 10 g krystalová violet'
- 100 ml 96% etanol

10g krystalové violeti bylo rozpuštěno ve 100 ml 96% etanolu a doplněno do objemu 0,5 l roztokem 0,1% šťavelanu amonného, poté byl roztok zfiltrován.

**b. Lugolův roztok**

- 1 g I<sub>2</sub>
- 2 g KI
- 100 ml destilovaná voda

**c. Karbolfuchsin**

- 0,1 g fuchsin bazický
- 10 ml 96% etanol
- 100 ml fenol

Roztok byl před použitím zfiltrován.

**4.4.2 Barva na OF test**

- 1 g bromthymolová modř
- 25 ml NaOH
- 475 ml destilovaná voda

1 g bromthymolové modři a 25 ml NaOH bylo rozpuštěno v 475 ml destilované vody a na 1 - 2 dny byla směs uložena do termostatu při 37 °C. Během dne byla tato směs několikrát promíchána a po úplném rozpuštění zfiltrována.

#### 4.5 GRIESSOVA ČINIDLA PRO ZJIŠTĚNÍ REDUKCE DUSIČNANŮ

▪ **Griessovo činidlo I:**

1 g kyseliny sulfanilové byl rozpuštěn v 75 ml destilované vody a v 25 ml ledové kyseliny octové.

▪ **Griessovo činidlo II:**

0,3 g 1-naftylaminu bylo povařeno v 70 ml destilované vody, zfiltrováno a k filtrátu bylo přidáno 30 ml ledové kyseliny octové.

#### 4.6 OSTATNÍ POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

- PYRA test (Souprava MIKRO-LA-TEST, Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Brno)
- VP test (Souprava MIKRO-LA-TEST, Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Brno)
- Činidlo pro PYRA test (Souprava MIKRO-LA-TEST, Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Brno)
- Činidlo pro VP test I (Souprava MIKRO-LA-TEST, Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Brno)
- Činidlo pro VP test II (Souprava MIKRO-LA-TEST, Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Brno)
- Dusičnan draselný
- Etanol
- Imerzní olej
- Parafín
- Peroxid vodíku
- Zinek práškový

## 5 METODIKA

### 5.1 IZOLACE BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Bylo naváženo 10 g vzorků sýrů z povrchů i zevnitř, které byly zhomogenizovány s 90 ml fyziologického roztoku pomocí přístroje Stomacher.

Dále bylo připraveno ředění  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ . Z každého ředění bylo přeneseno 0,1 ml inokula na předem připravená živná média MRS a M17 a naočkováno roztěrem.

Naočkované Petriho misky byly vloženy do termostatu a kultivovány při 30 °C a 37 °C po dobu dvou dní. Poté byly narostlé kolonie izolovány křížovým roztěrem na příslušné živné půdy pro získání čistých kultur.

### 5.2 CHARAKTERIZACE BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ POMOCÍ BIOCHEMICKÝCH TESTŮ

K identifikaci bakterií mléčného kvašení nestačí pouze určení morfologických, mikroskopických a makroskopických znaků, pro dobrou identifikaci je třeba zjistit celou řadu biologických vlastností mikroorganismů.

#### 5.2.1 Gramovo barvení

1. Do středu podložního sklíčka byla nanesa kapka sterilní vody.
2. Pomocí vyžíhané kličky bylo do sterilní vody přeneseno malé množství dané kultury.
3. Suspenze mikroorganismů se nechala zaschnout při laboratorní teplotě a poté byla provedena fixace trojitým protažením plamenu.
4. Fixovaný preparát byl převrstven krystalovou violetí po dobu 60 sekund.
5. Barvivo bylo slito a preparát opláchnut vodou cca 2 sekundy.
6. Preparát byl převrstven Lugolovým roztokem po dobu 30 sekund.
7. Dále bylo barvivo opět slito, preparát opláchnut vodou a odbarvován etanolem po dobu 20-30 sekund.
8. Dobarveno zředěným karbolfuchsinem po dobu 30-60 sekund.

9. Preparát byl opatrně opláchnut pod tekoucí vodou, osušen a pozorován mikroskopem zvětšením 10x100 pod olejovou imerzí [42, 57, 58, 59].

### 5.2.2 KOH test

1. Na sterilní podložní sklíčko byla nanесena kapka 3% KOH.
2. Očkovací kličkou byla přenesena testovaná kultura bakterií a rozetřena v kapce KOH.
3. Bylo sledováno, zda kultura tvoří táhnoucí se hmotu či nikoli [60].

### 5.2.3 Test na tvorbu katalázy

1. Na sterilní podložní sklíčko byla nanесena kapka 3% peroxidu vodíku.
2. Očkovací kličkou byla přenesena testovaná kultura bakterií a rozetřena v kapce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
3. V pozitivním případě byla sledována tvorba bublinek kyslíku [18, 42, 47, 59, 61].

### 5.2.4 Schopnost redukce dusičnanů

1. Do zkumavky bylo pipetováno 5 ml peptonové vody a vysterilizována.
2. K peptonové vodě byl přidán 1 ml 0,1% roztoku KNO<sub>3</sub> a 1 ml testované kultury bakterií.
3. Zkumavka byla vložena do termostatu a inkubována při 37 °C po dobu 2 dní.
4. Poté bylo přidáno Griessovo činidlo I (kys. sulfanilová) a Griessovo činidlo II ( $\alpha$ -naftylamin) v poměru 1:1.
5. V případě pozitivní reakce se vytvořilo růžové až červené zbarvení do 10 minut. Jestliže nebyl zaznamenán průběh barevné reakce, jednalo se o negativní nález a byl přidán zinek v práškové podobě [42, 61].

### 5.2.5 O-F test (oxidačně-fermentační test)

1. Testované kmeny byly naočkovány vpichem do celého sloupce OF média vždy do dvou zkumavek.
2. Jedna ze zkumavek byla vždy převrstvena parafinovým olejem.

3. Zkumavky byly vloženy do termostatu a inkubovány při 37 °C po dobu 24 hod.
4. Pozitivní reakce se projevila změnou barvy média ze zelené na žlutou [42, 61].

### 5.2.6 Schopnost fermentace sacharidů

1. Byla připravena média pro fermentaci cukrů s obsahem 1 % daného cukru.
2. Tato média byla pipetována po 5 ml do zkumavek a vysterilizována v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut.
3. Po vychladnutí byly tyto zkumavky naočkovány a vloženy do termostatu.
4. Inkubace trvala 2 dny při 30 °C a 37 °C.
5. Pozitivní reakcí došlo ke změně barvy z červené na žlutou. [42, 57].

### 5.2.7 V-P test (Voges-Proskauerův test)

1. Z čisté kultury testovaného kmene byla připravena suspenze ve zkumavce s fyziologickým roztokem, která odpovídala zákalu 3. stupně McFarlandovy stupnice a do suspenze byl vložen proužek VP testu.
2. Inkubovalo se v termostatu při 37 °C po dobu 2 hod.
3. Byly přikápnuty 3 kapky činidla pro VPT I a VPT II a zkumavky byly ve stojánku protřepány.
4. Inkubovalo se dalších 30 minut při teplotě 37 °C pro vývoj barevné reakce.
5. Pozitivní reakce se projevila červeným popř. růžovým zbarvením.

[Souprava MIKRO-LA-TEST® STREPTOtest 16 Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Brno, CZ, 59].

### 5.2.8 PYRA test

1. Čistá kultura testovaného kmene byla nanesena sterilní kličkou na navlhčenou zónu proužku PYRA testu.
2. Tento proužek byl inkubován při teplotě laboratoře 10 minut a poté byl zakápnut činidlem pro PYRA test.

3. Po 2 minutách byla odečtena barevná reakce.
4. Pozitivní reakce se projevila červeným popř. červenooranžovým zbarvením.

[MIKRO-LA-TEST® Pyratest 16 Pliva-Lachema Diagnostika s.r.o., Brno, CZ, 59].



## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 6.1 IZOLACE MIKROORGANIZMŮ Z MĚKKÝCH ZRAJÍCÍCH SÝRŮ

Celkem bylo náhodně vybráno 80 vyizolovaných kolonií. Bakterie mléčného kvašení měly většinou pravidelné kolonie, okrouhlé, s hladkým povrchem a mléčnou barvou, s nakyslou vůní, o průměru 0,5 – 2 mm. Podle druhu sýra a způsobu odběru byly vzorky pro snadnější orientaci zařazeny pod čísla pro 1. odběr (*Tab. 5*) a písmeny pro 2. odběr (*Tab. 6*). Při každém odběru byly mikroorganismy kultivovány jak na půdě MRS, tak na půdě M17.

*Tab. 5. Zařazení a identifikace druhů sýrů z 1. odběru pod čísla.*

<b>Vzorek č.</b>	<b>Druh sýra</b>	<b>Místo odběru sýra</b>
<b>1</b>	Romadur	z povrchu
<b>2</b>	Romadur	zevnitř
<b>3</b>	Pepin	z povrchu
<b>4</b>	Pepin	zevnitř
<b>5</b>	Romadůžek	z povrchu
<b>6</b>	Romadůžek	zevnitř
<b>7</b>	Hermadur	z povrchu
<b>8</b>	Hermadur	zevnitř
<b>9</b>	Tvarůžky čisté	z povrchu
<b>10</b>	Tvarůžky čisté	zevnitř
<b>11</b>	Tvarůžky s kmínem	z povrchu
<b>12</b>	Tvarůžky s kmínem	zevnitř

Tab. 6. Zařazení a identifikace druhů sýrů z 2. odběru pod písmeny.

Vzorek č.	Druh sýra	Odběr sýra
A	Romadur	z povrchu
B	Romadur	zevnitř
C	Hermadur	z povrchu
D	Hermadur	zevnitř
G	Romadůžek	z povrchu
H	Romadůžek	zevnitř
E	Pepin	z povrchu
F	Pepin	zevnitř
I	Tvarůžky čisté	z povrchu
J	Tvarůžky čisté	zevnitř
K	Tvarůžky s kmínem	z povrchu
L	Tvarůžky s kmínem	zevnitř

## 6.2 CHARAKTERIZACE VYBRANÝCH IZOLÁTŮ BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ POMOCÍ BIOCHEMICKÝCH

### 6.2.1 Gramovo barvení

Barvení podle Grama je jednou z nejdůležitějších a nejpoužívanějších diagnostických metod při určování grampozitivních či gramnegativních organismů. Podstatou rozdílného výsledku jsou odlišnosti ve složení a molekulární struktuře buněčné stěny obou skupin bakterií. Grampozitivní mikroorganismus má tmavě fialové až modročerné zbarvení, zatímco gramnegativní organismy se barví do růžova nebo červena [42, 57, 58, 59]. Pozitivně se při Gramově barvení barví i buňky kvasinek, i když odstín jejich zbarvení je mírně odlišný. Odlišení bakteriálních a kvasničných buněk je obvykle možné podle velikosti a tvaru buněk. Výsledky Gramova barvení byly zaznamenány do *Tab. 7, 8* [2].

Tab. 7. Výsledky Gramova barvení u izolovaných kmenů z 1.a 2. odběru na půdě MRS.

	1. odběr			2. odběr		
	Vzorek	G +/-	tvar	Vzorek	G +/-	tvar
Půda MRS	1 I.	+	oválné koky	A I.	+	oválné koky
	1 II.		kvasinky	A II.		kvasinky
	1 III.	+	kokotyčinky	B II.	+	oválné koky
	2 I.	+	tyčinky	C I.		kvasinky
	2 II.	+	koky	D I.	+	koky
	2 III.	+	oválné koky	F I.		kvasinky
	2 IV.		kvasinky	F II.		kvasinky
	2 V.	+	kokotyčinky	H I.		kvasinky
	2 VI.	+	kokotyčinky	H II.		kvasinky
	3 I.		kvasinky	J I.	+	kokotyčinky
	3 II.	-	koky	J II.	+	koky
	3 III.	+	koky	J III.	+	tyčinky
	7 I.	+	kokotyčinky	K II.	+	koky
	7 II.		kvasinky	L II.	+	tyčinky
	8 I.		kvasinky	L III.	+	koky
	9 I.		kvasinky	L IV.	+	tyčinky
	9 II.	+	koky	L V.	+	kokotyčinky
	10 I.	+	tyčinky	I I.		kvasinky
	10 II.	+	koky	I II.	+	koky
	11 I.	+	koky	I III.	+	oválné koky
	11 II.	+	tyčinky			

Tab. 8. Výsledky Gramova barvení u izolovaných kmenů z 1. a 2. odběru na půdě M17.

	1. odběr		Barvení dle Grama		2. odběr		Barvení dle Grama	
	Vzorek	G +/-	tvary		Vzorek	G +/-	tvary	
Půda M17	1 I.	+	oválné koky		A I.	+	oválné koky	
	1 II.	+	tyčinky		A II.	+	oválné koky	
	2 I.	+	koky		A III.		kvasinky	
	2 II.	+	koky		B I.	+	oválné koky	
	2 III.		kvasinky		B II.	+	koky	
	3 I.	+	tyčinky		B III.	+	koky	
	3 II.	+	koky		C I.		kvasinky	
	4 I.	+	koky		D I.		kvasinky	
	5 I.	+	koky		F I.		kvasinky	
	6 II.	+	oválné koky		G I.		kvasinky	
	9 III.	+	koky		H I.	+	koky	
	10 I.	+	koky		I I.	+	oválné koky	
	10 III.		kvasinky		I II.		kvasinky	
	11 I.	+	koky		J I.	+	oválné koky	
	11 II.	+	koky		J III.		kvasinky	
	12 I.	+	koky		J IV.		kvasinky	
	12 II.	+	koky		L I.	+	koky	
					L II.		kvasinky	
					L III.	+	koky	
					L IV.	+	koky	
				L V.	+	tyčinky		
				K I.	+	koky		

Na základě mikroskopického pozorování byly kvasinky z dalších testů vyřazeny. Jak již bylo zmíněno v bodu 2.3, měkké zrající sýry obsahují grampozitivní druhy bakterií mléčného kvašení *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *cremoris*, a také *Leuconostoc mesenteroi-*

*des* subsp. *cremoris* a *dextranicus* [39]. Proto bylo předpokládáno, že mikroskopickým pozorováním bude převážná většina izolovaných kmenů grampozitivních. Podle výše uvedených výsledků bylo zjištěno, že 55 izolovaných kmenů bylo grampozitivních ve tvaru koků, v párech, řetězcích nebo v krátkých válcovitých tyčinkách. Dle bakterií ve tvaru tyčinek se dá usuzovat, že je zde přítomen i rod *Lactobacillus*. Gramovo barvení však nemusí vždy poskytovat správné výsledky o charakteru barvených kultur (např. u starších kultur), tudíž je vhodné provádět doplňkové testy pro jeho ověření [2].

### 6.2.2 KOH test

Nejběžnějším testem ověření grampozitivity je KOH test, založený na účinku 3% roztoku KOH, který hydrolyzuje buněčnou stěnu gramnegativních bakterií. Kapka KOH se stává viskózní, buňky se rozpouští a za kličkou se táhne vlákno uvolněného buněčného obsahu (pozitivní KOH test). Grampozitivní bakterie účinku 3% KOH odolávají, kapka KOH tak zůstává tekutá a vlákno buněčného obsahu se za kličkou netvoří (negativní KOH test) [60]. Výsledky KOH testu byly uvedeny v *Tab. 9, 10*.

*Tab. 9. Výsledky KOH testu u izolovaných kmenů z 1.a 2. odběru na půdě MRS.*

Půda MRS	Vzorek č.	KOH test	Vzorek č.	KOH test
	1 I.	–	A I.	–
	1 III.	–	B II.	–
	2 I.	–	D I.	–
	2 II.	–	J I.	–
	2 III.	–	J II.	–
	2 V.	–	J III.	–
	2 VI.	–	K II.	–
	3 II.	+	L II.	–
	3 III.	–	L III.	–
	7 I.	–	L IV.	–
	9 II.	–	L V.	–
	10 I.	–	I II.	–
	10 II.	–	I III.	–
	11 I.	–		
	11 II.	–		

+ pozitivní reakce, – negativní reakce

Tab. 10. Výsledky KOH testu u izolovaných kmenů z 1. a 2. odběru na půdě M17.

Půda M17	Vzorek č.	KOH test	Vzorek č.	KOH test
	1 I.	–	A I.	–
	1 II.	–	A II.	–
	2 I.	–	B I.	–
	2 II.	–	B II.	–
	3 I.	–	B III.	–
	3 II.	–	H I.	–
	4 I.	–	I I.	–
	5 I.	–	J I.	–
	6 II.	–	L I.	–
	9 III.	–	L III.	–
	10 I.	–	L IV.	–
	11 I.	–	L V.	–
	11 II.	–	K I.	–
	12 I.	–		
12 II.	–			

+ pozitivní reakce, – negativní reakce

KOH test byl negativní u 55 izolátů, čímž byla potvrzena grampozitivita bakterií. Kmen, který dával pozitivní reakci z 1. odběru na půdě MRS 3 II., byl vyloučen z důvodu gramnegativity.

### 6.2.3 Kataláza

Dále byl proveden test na tvorbu katalázy, který spočívá v ponoření bakteriální kultury na bakteriologické kličce do kapky 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Rozklad peroxidu vodíku na vodu a kyslík je redukován enzymem katalázou. Pozitivní test se projeví uvolňováním bublinek kyslíku. Bakterie mléčného kvašení enzym katalázu netvoří [18, 42, 47, 57, 59].

Výsledky testu na katalázu byly uvedeny v Tab. 11, 12.

Tab. 11 . Výsledky testu na katalázu u izolátů z 1. a 2. odběru na půdě MRS.

Půda MRS	Vzorek č.	Kataláza	Vzorek č.	Kataláza
	1 I.	–	A I.	–
	1 III.	+	B II.	–
	2 I.	–	D I.	+
	2 II.	–	J I.	+
	2 III.	–	J II.	–
	2 V.	+	J III.	–
	2 VI.	+	K II.	–
	3 III.	+	L II.	–
	7 I.	+	L III.	–
	9 II.	–	L IV.	–
	10 I.	–	L V.	+
	10 II.	–	I II.	–
	11 I.	–	I III.	–
	11 II.	–		

+ pozitivní reakce, – negativní reakce

Tab. 12. Výsledky testu na katalázu u izolátů z 1. a 2. odběru na půdě M17.

Půda M17	Vzorek č.	Kataláza	Vzorek č.	Kataláza
	1 I.	–	A I.	–
	1 II.	+	A II.	–
	2 I.	–	B I.	–
	2 II.	–	B II.	–
	3 I.	–	B III.	+
	3 II.	+	H I.	+
	4 I.	–	I I.	–
	5 I.	–	J I.	–
	6 II.	–	L I.	+
	9 III.	+	L III.	+
	10 I.	–	L IV.	–
	11 I.	+	L V.	–
	11 II.	+	K I.	+
	12 I.	+		
12 II.	+			

+ pozitivní reakce, – negativní reakce

Ze všech uvedených izolátů byly vyloučeny kmeny, u kterých byla zaznamenán pozitivní test na katalázu, neboť, jak již bylo řečeno, bakterie mléčného kvašení jsou katalázaneaktivní. V tomto případě se mohlo jednat o bakterie rodu *Micrococcus* nebo druh bakterií *Brevibacterium linens*, které vytváří, jak již bylo zmíněno, oranžový maz na povrchu těsta. Obě tyto bakterie jsou grampozitivní, striktně aerobní a katalázapozitivní [2, 12, 39, 62]. Následné analýzy tedy byly prováděny s izoláty určenými jako grampozitivní a katalázaneaktivní.

#### 6.2.4 Schopnost redukce dusičnanů

Tento test slouží k potvrzení, že zbylé vyizolované kmeny jsou bakterie mléčného kvašení, poněvadž neredukují dusičnany na dusitany, a proto po přidání Griessových činidel neprobíhá žádná barevná změna [2, 63]. Pozitivní reakce se projeví vytvořením růžového až červeného zbarvení a to nejpozději do 10 minut. Nedojde-li ke zčervenání, ověří se negativní reakce přidáním práškového zinku. Ten zredukuje dusičnany na dusitany a to způsobí zčervenání půdy. Jestliže však půda nezčervená ani po přidání zinku, znamená to, že dusičnany během inkubace byly zredukovány na amoniak a v živné půdě nebyly v okamžiku přidání činidel žádné dusitany přítomny. Je to tedy důkaz, že k redukci dusičnanů došlo a daná reakce je pozitivní [42, 61]. Pozorované reakce byly zaznamenány do *Tab. 13, 14*.

*Tab. 13. Projev změny barvy u izolovaných kmenů z 1. a 2. odběru na půdě MRS.*

	1. odběr		2. odběr			
	Vzorek	Redukce dusičnanů na dusitany	Vzorek	Redukce dusičnanů na dusitany		
Půda MRS		Griessovo činidlo	Zinek	Griessovo činidlo	Zinek	
	1 I.	beze změny	zčervenání	A I.	beze změny	zčervenání
	2 I.	beze změny	zčervenání	B II.	beze změny	zčervenání
	2 II.	beze změny	zčervenání	J II.	beze změny	zčervenání
	2 III.	beze změny	zčervenání	J III.	beze změny	zčervenání
	9 II.	beze změny	zčervenání	K II.	beze změny	zčervenání
	10 I.	beze změny	zčervenání	L II.	beze změny	zčervenání
	10 II.	beze změny	zčervenání	L III.	beze změny	zčervenání
	11 I.	beze změny	zčervenání	L IV.	beze změny	zčervenání
	11 II.	beze změny	zčervenání	I II.	beze změny	zčervenání
				I III.	beze změny	zčervenání



Tab. 14. Projev změny barvy u izolovaných kmenů z 1.a 2. odběru na půdě M17.

Půda M17	1. odběr	Redukce dusičnanů na dusitany		2. odběr	Redukce dusičnanů na dusitany	
	Vzorek	Griessovo činidlo	Zinek	Vzorek	Griessovo činidlo	Zinek
	1 I.	beze změny	zčervenání	A I.	beze změny	zčervenání
	2 I.	beze změny	zčervenání	A II.	beze změny	zčervenání
	2 II.	beze změny	zčervenání	B I.	beze změny	zčervenání
	3 I.	beze změny	zčervenání	B II.	beze změny	zčervenání
	4 I.	beze změny	zčervenání	I I.	beze změny	zčervenání
	5 I.	beze změny	zčervenání	J I.	beze změny	zčervenání
	6 II.	beze změny	zčervenání	L IV.	beze změny	zčervenání
	10 I.	beze změny	zčervenání	L V.	beze změny	zčervenání

Z uvedených výsledků vyplývá (Tab. 13, 14), že studované kmeny neredukovaly dusičnany na dusitany a tím byla potvrzena úvaha, že zbylé studované izoláty jsou bakterie mléčného kvašení. K bližší identifikaci bakterií mléčného kvašení byly provedeny následující testy.

### 6.2.5 O-F test (oxidačně-fermentační test)

Pomocí tohoto testu lze zjistit, zda mikroorganismy využívají glukózu fermentací nebo jen aerobní oxidací za přístupu kyslíku. Bakterie, které oxidují glukózu aerobně způsobí změnu barvy indikátoru v půdě. Tím vznikne žluté zbarvení postupující od hladiny ke dnu zkumavky. Ve zkumavce s parafinem půda nezežloutne. Naopak bakterie fermentující glukózu způsobí zežloutnutí po celém objemu půdy v obou zkumavkách. Ty bakterie, které nerozkládají glukózu, nezpůsobí změnu barvy v žádné zkumavce [42, 61]. Bakterie mléčného kvašení jsou fakultativně anaerobní [1, 2, 10]. Výsledky reakcí byly uvedeny v Tab. 15, 16.

Tab. 15. Barevné změny u izolovaných kmenů z 1. a 2. odběru na půdě MRS.

Půda MRS	1. odběr	OF test		2. odběr	Redukce dusičnanů na dusitany	
	Vzorek	Rozklad aerobní	Rozklad anaerobní	Vzorek	Rozklad aerobní	Rozklad anaerobní
	1 I.	+	+	A I.	+	-
	2 I.	+	+	B II.	+	+
	2 II.	+	+	J II.	+	+
	2 III.	+	+	J III.	+	+
	9 II.	+	+	K II.	+	+
	10 I.	+	+	L II.	+	+
	10 II.	+	+	L III.	+	+
	11 I.	+	+	L IV.	+	+
11 II.	+	+	I II.	+	+	
			I III.	+	+	

+ pozitivní reakce, - negativní reakce

Tab. 16. Barevné změny u izolovaných kmenů z 1. a 2. odběru na půdě M17.

Půda M17	1. odběr	Redukce dusičnanů na dusitany		2. odběr	Redukce dusičnanů na dusitany	
	Vzorek	Griessovo činidlo	Zinek	Vzorek	Griessovo činidlo	Zinek
	1 I.	+	+	A I.	+	+
	2 I.	+	+	A II.	+	+
	2 II.	+	+	B I.	+	+
	3 I.	+	+	B II.	+	+
	4 I.	+	+	I I.	+	+
	5 I.	+	+	J I.	+	+
	6 II.	+	+	L IV.	+	+
	10 I.	+	+	L V.	+	+

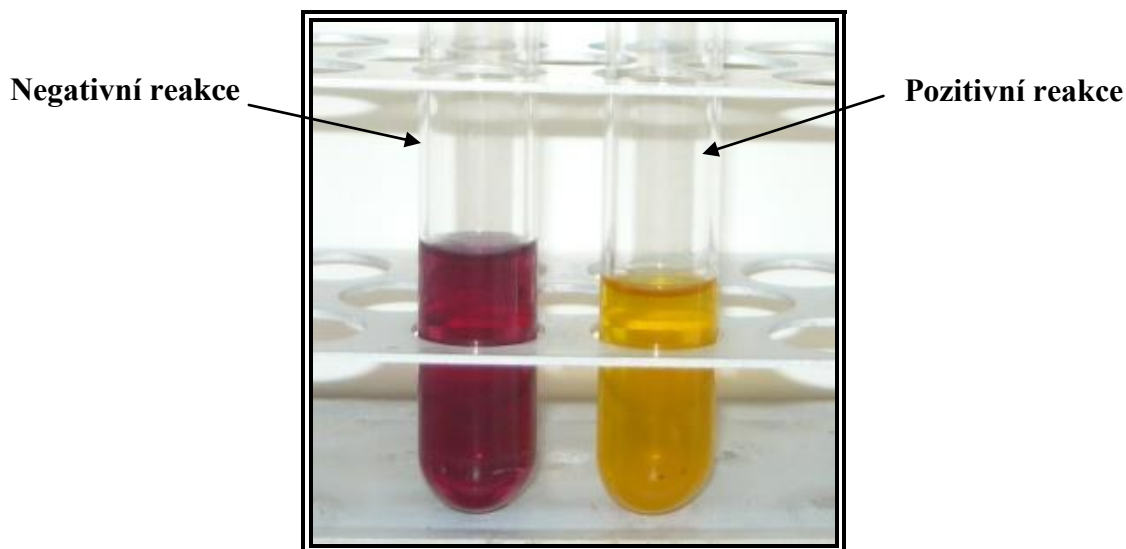
+ pozitivní reakce, - negativní reakce

Tento test byl proveden u všech izolovaných kmenů. Pouze u kmenu z druhého odběru na půdě MRS tj. A I. bylo zjištěno, že se jedná o mikroorganismus s oxidativním metabolismem. V tomto případě by se mohlo jednat o rod *Enterococcus*. U ostatních izolátů bylo tímto prokázáno, že se jedná o fakultativně anaerobní mikroorganismy, protože dokáží využít sacharidy jak aerobně, tak anaerobně.

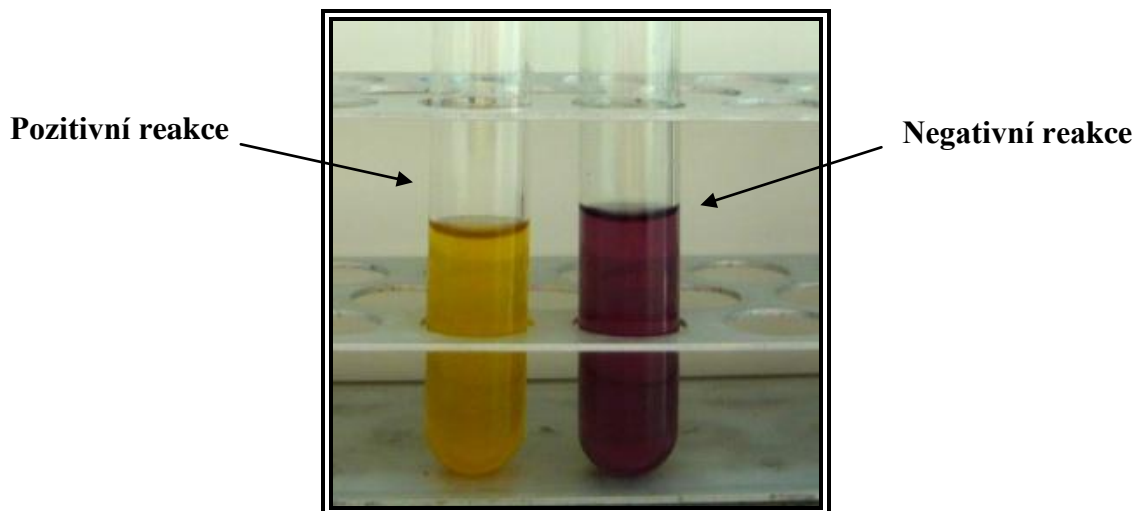
### 6.2.6 Schopnost fermentace sacharidů

V této části práce bylo zjišťováno, zda izolované kmeny mají schopnost fermentovat sacharidy, které byly vybrány na základě studie Guessase a Kihala [64]. Mezi zvolené cukry patří glukóza, sorbitol, sacharóza, galaktóza, laktóza, arabinóza, fruktóza a rafinóza.

Pozitivní reakce se projevila tvorbou kyseliny a tím došlo ke změně barvy z fialově červené na žlutou. U negativního výsledku zůstala barva nezměněna (Obr. 9, 10) [42]. Výsledky reakcí byly uvedeny v Tab. 17, 18.



Obr. 9. Sacharid galaktóza.



Obr. 10. Sacharid glukóza.

Tab. 17. Výsledky testu na zkvašování cukrů u izolátů z 1. a 2. odběru na půdě MRS.

	Vzorek	Glu	Sor	Sach	Gal	Lak	Ara	Fru	Raf
Půda MRS 1. odběr	1 I.	+	+	+	+	-	-	+	-
	2 I.	+	+	+	+	+	+	+	+
	2 II.	+	+	+	+	-	-	+	-
	2 III.	+	-	+	+	+	+	+	-
	9 II.	+	-	+	+	+	+	+	-
	10 I.	+	+	+	+	+	-	+	-
	10 II.	+	-	-	+	+	+	+	-
	11 I.	+	-	+	+	+	+	+	+
	11 II.	+	+	+	+	+	-	+	-
Půda MRS 2. odběr	A I.	+	+	+	+	+	-	+	-
	B II.	+	-	+	+	+	+	+	-
	J II.	+	-	+	+	+	+	+	-
	J III.	+	+	+	+	+	+	+	-
	K II.	+	-	-	+	+	+	+	-
	L II.	+	+	+	+	+	+	+	+
	L III.	+	-	-	+	+	+	+	-
	L IV.	+	-	-	+	+	+	+	-
	I II.	+	-	+	+	+	+	+	-
I III.	+	+	+	+	-	-	+	-	

+ pozitivní reakce, - negativní reakce

Tab. 18. Výsledky testu na zkvašování cukrů u izolátů z 1. a 2. odběru na půdě M17.

	Vzorek	Glu	Sor	Sach	Gal	Lak	Ara	Fru	Raf
Půda M17 1. odběr	1 I.	+	–	+	+	+	+	+	–
	2 I.	+	–	+	+	+	+	+	–
	2 II.	+	+	+	+	–	–	+	–
	3 I.	+	+	+	+	+	+	+	–
	4 I.	+	–	+	+	+	+	+	–
	5 I.	+	–	+	–	+	–	–	+
	6 II.	+	–	–	–	+	–	–	+
	10 I.	+	–	+	–	+	–	–	+
Půda M17 2. odběr	A I.	+	+	+	+	+	+	+	–
	A II.	+	–	+	+	+	+	+	–
	B I.	+	–	+	+	+	+	+	–
	B II.	+	+	+	+	+	+	+	–
	I I.	+	+	+	+	+	+	+	+
	J I.	+	–	+	+	+	+	+	–
	L IV.	+	+	+	+	+	+	+	+
	L V.	+	+	+	+	+	–	+	–

+ pozitivní reakce, – negativní reakce

Jak již bylo uvedeno, termofilní zákysovou kulturou sýrů zrajících pod mazem jsou bakterie ve tvaru tyčinek *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* a *Lactobacillus helveticus*. Je známo, že *Lactobacillus casei* zkvašuje fruktózu, galaktózu, glukózu, laktózu, maltózu a sorbitol, nikoliv arabinózu a rafinózu [15]. Guessase a Kihala [64] ve své studii potvrdili, že laktobacily zkvašovaly uvedené sacharidy, stejně jako *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. Rozdíl ve výsledcích z těchto dvou odkazových článků se tedy lišil jak ve stanovení druhů laktobacilů, tak ve fermentaci arabinózy. Proto se lze domnívat, že kmeny 10 I., 11 II (MRS), 3 I. (M17), J III. (MRS) a L V. (M17) jsou s největší pravděpodobností laktobacily.

Enterokoky fermentují sacharidy podobně jako jiné bakterie mléčného kvašení [2]. Podle dostupných výsledků Facklama a Elliotta [66], a také López-Díaze [5] enterokoky fermentovaly glukózu a sorbitol, nikoliv však arabinózu a rafinózu. Stejných výsledků bylo dosaženo i u izolátů 1 I., 2 II. (MRS), 2 II. (M17), A I., I III. (MRS) a A I. a B II. (M17), proto

se lze domnívat, že uvedené izoláty jsou enterokoky. Laktobacily a enterokoky byly rozlišeny na základě tvarů koků a tyčinek, a také pomocí VP a PYRA testu.

Ze všech izolátů pouze 3 z 1. odběru na půdě M17, tj. 5 I., 6 II. a 10 I. zkvašovaly glukózu, laktózu a rafinózu, navíc i sacharózu. Zkvašování těchto cukrů naznačuje, že by se mohlo jednat o leukonostoky [64]. Izolát 6 II. sacharózu nezkvašoval, což by podle Martinise a Freitase [65] vylučovalo domněnku, že se jedná o zmíněný rod. Tyto izoláty však dávaly stejné reakce jako izolovaný kmen *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* studovaný Guessase a Kihala [64], proto se zde nabízí možnost, že jde o bakterie rodu *Leuconostoc* [64].

Laktokoky fermentují glukózu, laktózu, galaktózu, arabinózu, jedinou sacharózu jen v malé míře některé kmeny [2]. Dle studie Facklama a Elliotta [66] bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nefermentovaly sorbitol a rafinózu. Na základě této studie lze předpokládat, že izolát 9 II. (MRS) byl jedním z uvedených druhů laktokoků. Při srovnání vyizolovaného kmene 11 I. (MRS) by se dalo usuzovat, že se také jedná o laktokoky i přesto, že Guessase a Kihala [64] uváděli, že laktokoky zkvašovaly i rafinózu. Z výsledků výzkumu Vančuříkové [67] vyplývalo, že *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* se lišily fermentací sacharózy a rafinózy. Zatímco *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* zkvašoval sacharózu a nikoliv rafinózu, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* zkvašoval rafinózu, ale nikoliv sacharózu. Výsledky izolátů K II., L III., L IV. (MRS) a 10 II. (MRS) také potvrzovaly předchozí předpoklad, že by se mohlo jednat o rod *Lactococcus*, jelikož nezkvašovaly sorbit, rafinózu a tentokrát nebyla zkvašena ani sacharóza. V případě izolátů I I., L IV., a L II. (M17) a 2 I. (M17), se jednalo s velkou pravděpodobností také o laktokoky, a to o *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* nebo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis diacetalis*. To potvrdila i níže uvedená tvorba acetoinu těmito kmeny. Z porovnávání publikací tedy vyplývalo, že vyhodnocování zkvašování cukrů se lišilo a bylo závislé na daném kmenu [66, 68].

Izoláty 2 III. (MRS), 1 I., 2 I., 4 I.(M17), B II., I II., J II. (MRS) a A II., B I., J I. (M17) . zkvašovaly glukózu a sacharózu, nezkvašovaly rafinózu a sorbitol. Poskytované výsledky byly shodné s výsledky získanými pro bakterii *Streptococcus thermophilus* jak ve studii Guessase a Kihala [64], tak Cheriguene [68]. Zmíněné poznatky tedy naznačovaly, že by se v případě výše uvedených izolátů jednalo právě o druh *Streptococcus thermophilus*.

### 6.2.7 PYRA test a VP test (Voges-Proskauerův test)

Uvedené testy sloužily jako doplňkové testy k biochemické identifikaci, především však pro potvrzení přítomnosti rodu *Enterococcus* a druhu *Streptococcus thermophilus*. PYRA testem lze stanovit aktivitu pyrrolidonylarylamidázy, zatímco VP test byl použit pro rychlou detekci produkce acetoinu. Pozitivní reakce u PYRA testu se projevila červeným zbarvením, zatímco negativní reakce zbarvením žlutým. V případě VP testu byla pozitivní reakcí červené nebo růžové zbarvení a negativní reakce byla bezbarvá, popř. mírně narůžovělá barva [42, 59, 69, 70]. Výsledky reakcí byly uvedeny v Tab. 19, 20.

Tab. 19. Výsledná barevná reakce u izolátů z 1. a 2. odběru na půdě MRS.

	1. odběr		Výsledná barevná reakce		2. odběr		Výsledná barevná reakce	
	Vzorek	VP test	PYRA test	Vzorek	VP test	PYRA test		
Půda MRS	1 I.	+	+	A I.	+	+		
	2 I.	+	+	B II.	-	-		
	2 II.	+	+	J II.	-	-		
	2 III.	-	-	J III.	-	-		
	9 II.	+	-	K II.	+	-		
	10 I.	-	-	L II.	+	+		
	10 II.	+	-	L III.	+	-		
	11 I.	+	-	L IV.	+	-		
	11 II.	-	-	I II.	-	-		
				I III.	+	+		

Tab. 20. Výsledná barevná reakce u izolátů z 1. a 2. odběru na půdě M17.

Půda MRS	1. odběr	Výsledná barevná reakce		2. odběr	Výsledná barevná reakce	
	Vzorek	VP test	PYRA test	Vzorek	VP test	PYRA test
	1 I.	–	–	A I.	+	+
	2 I.	–	–	A II.	–	–
	2 II.	+	+	B I.	–	–
	3 I.	–	–	B II.	+	+
	4 I.	–	–	I I.	+	+
	5 I.	–	+	J I.	–	–
	6 II.	–	+	L IV.	+	+
	10 I.	–	+	L V.	–	–
	10	–	+			

Pomocí PYRA a VP testu byla potvrzena předchozí úvaha, že se jednalo u izolátů 1 I. a 2 II. (MRS), 2 II. (M17), A I., I III. (MRS) a A I. a B II. (M17) o enterokoky, z důvodu pozitivní reakce u obou uvedených testů [66, 69, 70].

V případě negativního PYRA i VP testu u kmenů 10 I., 11 II. (MRS), 3 I. (M17), J III. (MRS) a L V. (M17), se jednalo o laktobacily. Taktéž podle Guessase a Kihala [64] laktobacily neprodukovaly acetoin a neměly aktivní pyrrolidonylarylamidázu.

Na základě studie Facklama a Elliotta [66] byla potvrzena správná identifikace druhu *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, díky negativní aktivitě pyrrolidonylarylamidázy.

V případě izolátů 2 I. (MRS), L II. (MRS) a I I., L IV. (M17) se potvrdila předchozí spekulace, že se jednalo o druh *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*, a to díky pozitivní reakci na acetoin. To souhlasí také s tvrzeními Görnera a Valíka [2] a Guessase a Kihala [64]. Izoláty 9 II., 11 I. (MRS) neprodukovaly acetoin, ale měly aktivní pyrrolidonylarylamidázu. Tento poznatek vyvrátil předchozí domněnku, že se jednalo o druh *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, avšak dokazuje, že by se mohlo jednat o druh *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Izoláty 10 II. (MRS) a MRS L III., K II., L IV. (MRS) byly negativ-



ní na acetoin a pozitivní na aktivitu pyrrolidonylarylamidázy, a proto se jednalo o výše uvedené kmeny.

Negativní PYRA i VP test naznačil přítomnost jak laktobacilů, tak streptokoků. Proto na základě tvaru bakterií, byly izoláty 2 III. (MRS), 1 I., 2 I., 4 I. (M17) a B II., I II., J II. (MRS), A III., B I., J I. (M17) identifikovány jako streptokoky. Uvedené tvrzení lze podpořit výsledky studie Facklama a Elliotta [66], kteří u streptokoků zaznamenali negativní aktivitu pyrrolidonylarylamidázy a studií Guessase a Kihala [64], kteří u stanovili negativní reakci na produkci acetoinu.

## ZÁVĚR

Pro sýry zrající pod mazem je typický postup jejich zrání. Zrání probíhá v místnostech s přesně vysokou relativní vlhkostí vzduchu, stanoveným klimatem a teplotou, která se v průběhu zrání mění. Hlavní změny v procesu zrání sýra jsou způsobeny přítomností mikroorganismů. Bakterie měkkých zrajících sýrů jsou grampozitivní a katalázanegativní. Na základě těchto vlastností bylo vybráno 35 vyizolovaných kmenů, které byly podrobeny mnoha testům, které pomohly k bližší identifikaci bakterií mléčného kvašení. Ostatní izolované kmene byly vyloučeny z důvodu gramnegativity nebo se vyznačovaly pozitivní reakcí na katalázu. Přítomnost bakterií mléčného kvašení byla potvrzena testem, negativní schopností redukovat dusičnany na dusitany, a také pomocí oxidačně-fermentačního testu, který prokázal, že se jednalo o fakultativně anaerobní mikroorganismy, protože dokázali využít cukry jak aerobně, tak anaerobně. Jediný izolát s oxidativním metabolismem byl z druhého odběru na půdě MRS A I. V tomto případě byla potvrzena úvaha, že se jednalo o rod *Enterococcus*. Ze získaných výsledků bylo dále zjištěno, že kmene 10 I., 11 II., J III. (MRS) a 3 I., L V. (M17) jsou s největší pravděpodobností laktobacily, a to *Lactobacillus casei* nebo *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. Správnost určení by mohlo být prokázáno výše uvedenou polymerázovou řetězovou reakcí nebo některými pracovišti v ČR, které se na tuto práci specializují. U kmenů 1 I., 2 II., I III. (MRS) a 2 II., A I., B II. (M17) se jednalo o rod *Enterococcus* a v případě kmenů 5 I., 6 II. a 10 I. (M17) se jednalo o rod *Leuconostoc*. U kmenů klasifikovaných jako *Streptococcus thermophilus* 2 III., B II., I II., J II. (MRS) a 1 I., 2 I., 4 I., A II., B I., J I. (M17) byla správnost určení ověřena studií Guessase a Kihala, a také Cheriguene, která poskytovala shodné výsledky. V případě izolátů 9 II., 10 II., 11 I., K II., L III., L IV., (MRS) a I I., L IV., L II., 2 I. (M17) se jednalo o rod *Lactococcus*. U kmenů I I., L IV., L II., 2 I. (M17) byla pozorována navíc i tvorba acetoinu, což vedlo k bližšímu určení rodu *Lactococcus*, a to *Lactococcus lactis* subsp. *lactis diacetalis*.

Klasifikace bakterií mléčného kvašení je založena na biochemických a fyziologických charakteristikách. Je výhodná pro bližší identifikaci určitých BMK. Zmiňované kmene jsou však náročné na podmínky růstu a jejich diferenciaci je velmi obtížná. Fenotypové metody jsou z hlediska časového velmi zdoluhavé, proto se často používají metody genotypové. Tyto metody jsou rychlejší, ale finančně náročnější.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SALMINEN, S., VON WRIGHT, A., OUWEHAND, A. *Lactic Acid Bacteria, Microbiological and Functional Aspects*. 3. ed, New York, U.S.A. 2004. s. 633. ISBN 0-8247-5332-1.
- [2] GÖRNER, F., VALÍK, L. *Aplikovaná mikrobiologie poživatin*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004. s. 528. ISBN 80-967064-9-7.
- [3] ČESKÁ TECHNICKÁ NORMA, [online]. [cit. 2010-09-27]. Dostupný z WWW: <<http://eshop.normservis.cz/norma/csniso/17792/1.9.2007.html>>.
- [4] ZAUNMÜLLER, T., EICHERT, M., RICHTER, H., UNDEN, G. Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Applied microbiology and biotechnology*, 2006, vol. 72, s. 421-429.
- [5] LÓPEZ-DÍAZ, T.M., ALONSO, C., ROMÁN, C., GÁRCIA-LOPÉZ, M. L., MORENO, B. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food-Microbiology*, 2000, vol. 17, s. 23-32.
- [6] REDDY, G., ALTAF, M., NAVEENA, B.J., VENKATESHWAR, E., KUMAR, E.V. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation – A review. *Biotechnology Advances*, 2008, vol. 26, s. 22-34.
- [7] URBACH, G., Contribution of Lactic Acid Bacteria to Flavour Compound Formation in Dairy Products. *International Dairy Journal*, 1995, vol. 8, s. 877-903.
- [8] GUILLOT, A., GITTON, CH., ANGLADE, P., MISTOU, M.-Y. Proteomic analysis of *Lactococcus lactis*, a lactic acid bacterium. *Proteomics*, 2003, vol. 3, s. 337-354.
- [9] LIU S.-Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, vol. 83, s. 115-131.
- [10] STILES, M., HOLZAPFEL, W. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 1997, vol. 36, s. 1-29.
- [11] CROW, V.L., COOLBEAR T., GOPAL P.K., MARTLEY F.G., McKAYB L.L., RIEPEB, H. The Role of Autolysis of Lactic Acid Bacteria in the Ripening of Cheese. *International Dairy Journal*, 1995, vol. 5, s. 855-875.
- [12] ŠILHÁNKOVÁ, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologie*. 3. vyd. Praha, 2008. s. 364. ISBN 978-80-200-1703-1.
- [13] WOUTERS, J.T.M., AYAD, E.H.E., HUGENHOLTZ, J., SMITH G. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 2002, vol. 12, s. 91-109.

- [14] KLEEREBEZEM, M., HOL, P., HUGENHOLTZ, J. Lactic acid bacteria as a cell factory: rerouting of carbon metabolism in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, vol. 26, s. 840-848.
- [15] CENTENO, J., CEPADA, A., RODRIGUEZ-OTEIRO, J. Lactic Acid Bacteria Isolated from Arzba Cows' Milk Cheese. *International Dairy Journal*, 1996, vol. 63 s. 65-78.
- [16] TILSALA-TIMISJÄRVI, A., ALATOSSAVA, T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *International Journal of Food Mikrobiology*, 1997, vol. 35, s. 49-56.
- [17] STEEL, J. , BROADBENT, J. The Microscopy Facility, [online]. [cit. 2010-10-12]. Dostupný z WWW: <<http://bioweb.usu.edu/microscopy/Research.htm>>
- [18] KLABAN, V. *Svět mikrobů – Malý mikrobiologický slovník*. 1. vyd. Hradec Králové: Gaudeamus, 1999. s. 303. ISBN 80-7041-639-4.
- [19] ROGINSKI, H., FUQUAY, J.W., FOX, P.F. *Encyklopedia of dairy sciences*. Academic press by Elsevier Science Ltd., 2003. s. 2500. ISBN 0-12-227235-8.
- [20] CASALTA, E., MONTEL, M. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactococcus* genus. *International Journal of Food Mikrobiology*, 2008, vol. 126, s. 271-273.
- [21] HOLLER, B.J., STEEL, J. L. Characterization of Lactococci Other than *Lactococcus lactis* for Possible Use as Starter Cultures. *International Dairy Journal*, 1995, vol. 5, s. 275-289.
- [22] HEBL, G. [online]. [cit. 2010-10-12]. Dostupný z WWW: <<http://www.liberazione.it/rubrica-file/Il-Lactococcus---il-microbo-ufficiale-dello-stato-del-Wisconsin.htm>>
- [23] ITOI, S., ABE, T., WASHIO, S., IKUNO, E., KANOMATA, Y., SUGITA, H. Isolation of halotolerant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from intestinal tract of coastal fish. *International Journal of Food Mikrobiology*, 2008, vol. 125, s. 214-214.
- [24] BINETTI, A.G., RÍO, B.D., MARTÍN, M.C., ÁLVAREZ, M.A. Detection and Characterization of *Streptococcus thermophilus* Bacteriophages by Use of the Antireceptor Gene Sequence. *Applied and environmental mikrobiology*, 2005, vol. 71, s. 6096-6103.
- [25] BINETTI, A.G., BAILO, N.B., REINHEIMER, J.A. Spontaneous phage-resistant mutants of *Streptococcus thermophilus*: Isolation and technological characteristics. *International Dairy Journal*, 2007, vol. 17, s. 343-349.

- [26] HORÁČEK, J. a kol. *Základy lékařské mikrobiologie*. Univerzita Karlova v Praze, 2000. s. 130. ISBN 80-246-0006-4.
- [27] ASTERI, I.-A., KITTAKI, N., TSAKALIDOU, E. The effect of wild lactic acid bacteria on the production of goat's milk soft cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 2010, vol. 63, s. 234-242.
- [28] Databáze probiotik [online]. [cit. 2010-10-18]. Dostupný z WWW: <[http://www.buyprobiotics.com/Probiotic\\_Gallery.html](http://www.buyprobiotics.com/Probiotic_Gallery.html)>
- [29] ARIZCUN, C., BARCINA, Y., TORRE, P. Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idiazábal cheese. *International Journal of Food Mikrobiology*, 1997, vol. 38, s. 17-24.
- [30] Stránky vědy [online]. [cit. 2010-10-21]. Dostupný z WWW: <<http://news.bbc.co.uk/2/hi/health/7625192.stm>>
- [31] Články z mikrobiologie [online]. [cit. 2010-10-21]. Dostupný z WWW: <<http://sciencelay.com/biology/microbiology/isolation-and-characterization-of-leuconostoc-mesenteroides-from-cheese-3/>>
- [32] RIDGWAYOVÁ, J. *Sýry – průvodce světem sýrů*. 2. vyd. Praha, 2004. s. 224. ISBN 80-7321-108-4.
- [33] KADLEC, P., MELZUCH, K., VOLDŘICH, M. *Co byste měli vědět o výrobě potravin? Technologie potravin*. 1. vyd. Ostrava, 2009. s. 534. ISBN 978-80-7418-051-4.
- [34] LUKÁŠOVÁ, J. *Hygiena a technologie mléčných výrobků*. 1. vyd. VFU, Brno, 2001. s. 180. ISBN 80-7305-415-9.
- [35] PAVELKA, A. *Mléčné výrobky pro Vaše zdraví*. 1. vyd. Brno, 1996. s. 105. ISBN 80-85763-09-5.
- [36] HRABĚ, J., BŘEZINA, P., VALÁŠEK, P. *Technologie výroby potravin živočišného původu*. 1. vyd. UTB Zlín, 2006. s. 180. ISBN 80-7318-405-2.
- [37] ROBINSON, K. R. *Dairy Mikrobiology Handbook*. The Microbiology of milk and milk products. 3. ed, New York, U.S.A. 2002. s. 784. ISBN 0-471-38596-4.
- [38] ZADRAŽIL, K. *Mlékařství*. 1. vyd. ČZU, Praha, 2002. s. 127. ISBN 80-86642-15-1.
- [39] TOMÁNKOVÁ, E., RADA, V., KILLER, J. *Potravinářská mikrobiologie*. 1. vyd. ČZU v Praze, 2006. s. 168. ISBN 80-213-1583-0.
- [40] IBURG, A. *Lexikon sýrů*. 1. vyd. , Dobřejovice, 2004. s. 180. ISBN 80-7234-379-3.

- [41] LIKLER, L. *Historie mlékárenství v Čechách, na Moravě a ve Slezsku*. 1. vyd., 2. díl, Praha, 2001. s. 219. ISBN 80-86098-19-2.
- [42] BURDYCHOVÁ, R., SLÁDKOVÁ, P. *Mikrobiologická analýza potravin*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2007. ISBN 978-80-7375-116-4.
- [43] ALBERTS, B. et. al. *Základy buněčné biologie – Úvod do molekulární biologie buňky*. 2. vyd., *Espero Publishing*, 2005. ISBN 80-902906-0-4.
- [44] ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTUČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita. 2008. s. 188. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [45] CREIGHTON, T.E. *The Encyclopedia of molecular biology*. John Wiley&Sons, Inc., New York. 1999. s. 4900. ISBN 0-471-15302-8.
- [46] RUMML, T., RUMLOVÁ, M., PAČES, V. *Genové inženýrství*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2002. s. 270. ISBN 80-7080-499-8.
- [47] CUPÁKOVÁ, Š., DUŠKOVÁ, M., KAŠPÍRKOVÁ, M. *Mikrobiologie potravin – Praktická cvičení I. – Obecná mikrobiologie*. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2008. ISBN 978-80-7305-043-6.
- [48] ROZSYPAL, S. a kol. *Úvod do molekulární biologie*, 4. díl (3. inovované vydání). Brno, 2002. ISBN 80-902562-4-4.
- [49] EVANS, M.F. The polymerase chain reaction and pathology practice. REVIEW, Elsevier, DIAGNOSTIC HISTOPATHOLOGY 15:7, 2009.
- [50] Principle of the PCR [online]. [cit. 2010-06-12]. Dostupný z WWW: <<http://flmnh.ufl.edu/cowries/amplify.html>>
- [51] BROWN, T.A. *Klonování genů a analýza DNA*. 1. vyd. Olomouc, 2007. s. 359. ISBN 978-80-244-1719-6.
- [52] FLEGR, J. *Evoluční biologie*. 2005. s. 514. ISBN 80-200-1270-2.
- [53] SAMBROOK, J., RUSSELL, D. *Molecular cloning*. 3. ed. Cold Spring Harbor, New York, 2000. s. 2344. ISBN 0879695773.
- [54] SACHSE, K. and performance of PCR detection assays for microbial pathogens. *Molecular Biotechnology*, 2004, vol. 26, s. 61-79.
- [55] BRUMBAUGH, J. A., MIDDENDORF, L.R., GRONE, D. L., RUTH, J. L. Continuous, on-line DNA sequencing using oligodeoxynucleotide primers with multiple fluorophores. *Genetics*, 1998, vol. 85, s. 5610-5614.

- [56] VÍTÁMVÁS, P., KOSOVÁ, K., ŠKODÁČEK, Z., PRÁŠIL, I. T. Metoda dvourozměrné diferenční gelové elektroforézy (2-D DIGE) a její využití v proteomice. *Chemické listy*, 2010, vol. 104, s. 671-676.
- [57] JANDOVÁ, B., KOTOUČKOVÁ, L. *Praktikum z mikrobiologie*. 1.vyd. Brno: Vydavatelství MU, 1996. ISBN 80-210-1374-5.
- [58] BLACK, J.G. *Microbiology: principles and applications*. 3. vyd. New Jersey: Prentice-Hall, 1996. s. 790. ISBN 0-13-190745-X.
- [59] VOTAVA, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Neptun Brno, 2010. s. 495. ISBN 978-80-86850-04-8.
- [60] HALEBIAN, S., HARRIS, B., FINEGOLD, S. M., ROLFE, R. D. Rapid method that aids in distinguishing Gram-positive from Gram-negative anaerobic bacteria. *Journal of clinical mikrobiology*, 1981, vol. 13, s. 444-448.
- [61] Identifikace bakterií [online]. [cit. 2010-11-9]. Dostupný z WWW: <[http://fv1.vfu.cz/sekce\\_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie\\_pro\\_farmaceuty/praktikum04/index.html](http://fv1.vfu.cz/sekce_ustavy/mikrobiologie/mikrobiologie_pro_farmaceuty/praktikum04/index.html)>
- [62] BARROW, G.I., FELTHAM, R.K.A. *Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*. 3. ed. Cambridge Univerzity Press, 2004. s. 331. ISBN 0521-54328-2.
- [63] TAYLOR, S. *Advances in Food and Nutrition Research*. Elsevier Academic Press. 2005, s. 320. ISBN-13: 978-0-12-016450-9.
- [64] GUESSAS, B., KIHAL, M. Characterization of lactic acid bacteria isolated from Algerian arid zone raw goat's milk. *African Journal of Biotechnology*, 2004, vol. 3, s. 339-342.
- [65] MARTINIS, E. C. P., FREITAS, F. Z. Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacterion formation. *Food Kontrol*, 2003, vol. 14, s. 197-200.
- [66] FACKLAM, R., ELLIOTT, J.A. Identification, Classification, and Clinical Relevance of Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci, Excluding the Streptococci and Enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 1995. s. 479-495.
- [67] VANČUŘÍKOVÁ, J.: Produkce bakteriocinů izolovanými bakteriemi mléčného kvašení, diplomová práce, UTB Zlín, 2010.
- [68] CHERIGUENE, A., CHOUGRANI, F., BENSOLTANE, A. Identification and Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Algerian Goat's Milk. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2006, vol. 9, s. 1242-1249.
- [69] PYRA test [online]. [cit. 2011-19-03]. Dostupný z WWW: <<http://www.lachema.com/attachments/PYRAtest-CZ+SK+EN.pdf>>

- [70] VP test [online]. [cit. 2011-19-03]. Dostupný z WWW:  
<http://www.lachema.com/attachments/VPtest-CZ+SK+EN.pdf>



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

ADP	Adenosindifosfát
ATP	Adenosintrifosfát
BMK	Bakterie mléčného kvašení.
BSA	Hovězí sérový albumin
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTP	2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty
H <sup>+</sup>	Vodíkový ion
LDH	Laktátdehydrogenasa.
NAD <sup>+</sup>	Nikotinamidadeninukleotid
NADH	Redukovaná forma NAD
G+C	Báze DNA
OF test	Oxidačně-fermentační test
OH <sup>-</sup>	Hydroxyl
RNA	Ribonukleová kyselina
t.v.s.	Obsah tuku v sušině
UV	Ultrafialové záření
VP test	Voges-Proskauerův
Str.	Streptococcus
Lb.	Lactobacillus

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<i>Obr. 1. Metabolismus bakterií mléčného kvašení</i> [3] .....	14
<i>Obr. 2. Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> [15] .....	17
<i>Obr. 3. Lb. casei subsp. casei</i> [15] .....	18
<i>Obr. 4. Lactococcus lactis</i> [16] .....	19
<i>Obr. 5. Streptococcus thermophilus</i> [19] .....	22
<i>Obr. 6. Enterococcus faecalis</i> [25] .....	23
<i>Obr. 7. Leuconostoc mesenteroides</i> [27] .....	24
<i>Obr. 8. Základní cyklus PCR složený ze tří kroků</i> [42] .....	33
<i>Obr. 9. Sacharid galaktóza</i> .....	59
<i>Obr. 10. Sacharid glukóza</i> .....	60

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1. Charakteristické znaky zkoumaných bakterií mléčného kvašení v sýrech [1, 9].....</i>	13
<i>Tab. 2. Zkvašování cukrů u zkoumaných druhů rodu Lactobacillus v sýrech [11] .....</i>	18
<i>Tab. 3. Fyziologická a biochemická charakteristika rodu Leuconostoc v sýru [11] .....</i>	25
<i>Tab. 4. Jednotlivé operace zpracování sýřeniny v minutách [54] .....</i>	29
<i>Tab. 5. Zařazení a identifikace druhů sýrů z 1. odběru pod čísly.....</i>	49
<i>Tab. 6. Zařazení a identifikace druhů sýrů z 2. odběru pod písmeny.....</i>	50
<i>Tab. 7. Výsledky Gramova barvení u izolovaných kmenů z 1. a 2. odběru na půdě MRS .....</i>	51
<i>Tab. 8. Výsledky Gramova barvení u izolovaných kmenů z 1. a 2. odběru na půdě M17.....</i>	52
<i>Tab. 9. Výsledky KOH testu u izolovaných kmenů z 1. a 2. odběru na půdě MRS.....</i>	53
<i>Tab. 10. Výsledky KOH testu u izolovaných kmenů z 1. a 2. odběru na půdě M17 .....</i>	54
<i>Tab. 11 . Výsledky testu na katalázu u izolátů z 1. a 2. odběru na půdě MRS.....</i>	55
<i>Tab. 12. Výsledky testu na katalázu u izolátů z 1. a 2. odběru na půdě M17.....</i>	55
<i>Tab. 13. Projev změny barvy u izolovaných kmenů z 1. a 2. odběru na půdě M17.....</i>	56
<i>Tab. 14. Projev změny barvy u izolovaných kmenů z 1. a 2. odběru na půdě MRS.....</i>	57
<i>Tab. 15. Barevné změny u izolovaných kmenů z 1. a 2. odběru na půdě MRS .....</i>	58
<i>Tab. 16. Barevné změny u izolovaných kmenů z 1. a 2. odběru na půdě M17 .....</i>	58
<i>Tab. 17. Výsledky testu na zkvašování cukrů u izolátů z 1. a 2. odběru na půdě MRS.....</i>	60
<i>Tab. 18. Výsledky testu na zkvašování cukrů u izolátů z 1. a 2. odběru na půdě M17.....</i>	61
<i>Tab. 19. Výsledná barevná reakce u izolátů z 1. a 2. odběru na půdě MRS.....</i>	63
<i>Tab. 20. Výsledná barevná reakce u izolátů z 1. a 2. odběru na půdě M17 .....</i>	64

## SEZNAM PŘÍLOH

P I Technologické schéma měkkých zrajících sýrů

# PŘÍLOHA P I: TECHNOLOGICKÉ SCHÉMA MĚKKÝCH ZRAJÍCÍCH SÝRŮ [38]

