



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

MOLEKULÁRNÍ IDENTIFIKACE VYBRANÝCH PROBIOTICKÝCH BAKTERIÍ V RŮZNÝCH DRUZÍCH SÝRŮ S VYUŽITÍM TECHNIKY REAL-TIME PCR A ANALÝZY KŘIVEK TÁNÍ (HRM)

MOLECULAR IDENTIFICATION OF SELECTED PROBIOTIC BACTERIA IN DIFFERENT TYPES OF CHEESES
USING REAL-TIME PCR AND HIGH-RESOLUTION MELTING (HRM) TECHNIQUES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Dominik Klaška

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. Jan Smetana, Ph.D.

BRNO 2023

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1782/2022 Akademický rok: 2022/23
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student: **Bc. Dominik Klaška**
Studijní program: Chemie přírodních látek
Studijní obor: bez specializace
Vedoucí práce: **Mgr. Jan Smetana, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Molekulární identifikace vybraných probiotických bakterií v různých druzích sýrů s využitím techniky real-time PCR a analýzy křivek tání (HRM)

Zadání diplomové práce:

- 1) literární rešerše na zadané téma
- 2) zvládnutí techniky izolace bakteriální DNA z různých druhů sýrů
- 3) určení kvality a kvantity izolované DNA
- 4) Real-time PCR a analýza křivek tání

Termín odevzdání diplomové práce: 8.5.2023:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Dominik Klaška
student

Mgr. Jan Smetana, Ph.D.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

prof. Ing. Michal Veselý, CSc.
děkan

ABSTRAKT

Práce byla zaměřena na průkaz probiotických bakterií ve čtyřech komerčně dostupných sýrech (čedar, eidam, ementál a gouda). DNA byla izolována fenolovou extrakcí a komerčním kitem. Pomocí spektrofotometru byla u izolované DNA prokázána dostatečná koncentrace i kvalita pro další analýzu pomocí PCR v reálném čase a vysokorozlišovací analýzy křivek tání. K amplifikaci pomocí real-time PCR byly použity druhově specifické primery. Ve výrobcích byla zkoumána přítomnost sedmi různých bakterií z rodů *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium* a *Streptococcus*.

ABSTRACT

The study aimed to detect probiotic bacteria in four commercially available cheeses (cheddar, edam, emmental and gouda). DNA was isolated by phenol extraction and a commercial kit. Using a spectrophotometer, the isolated DNA demonstrated sufficient concentration and quality for further analysis by real-time PCR and high-resolution melt analysis. Species specific primers were employed for real-time PCR amplification. The presence of seven different bacterial species from the genera *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Propionibacterium* and *Streptococcus* was investigated in the cheese products.

KLÍČOVÁ SLOVA

PCR v reálném čase, probiotické bakterie, sýr, izolace DNA, HRM analýza

KEYWORDS

Real-time PCR, probiotics bacteria, cheese, isolation of DNA, HRM analysis

KLAŠKA, Dominik. *Molekulární identifikace vybraných probiotických bakterií v různých druzích sýrů s využitím techniky real-time PCR a analýzy křivek tání (HRM)* [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-08]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149072>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Jan Smetana.

PROHLÁŠENÍ

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

PODĚKOVÁNÍ

Chtěl bych touto cestou poděkovat Mgr. Janu Smetanovi, Ph.D. za ochotu a cenné rady při zpracovávání této diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Lence Fialové, Ph.D. za pomoc a vstřícnost, která mi byla poskytnuta při práci v laboratoři. Velké díky patří i mé manželce a rodině za jejich neutuchající podporu a zázemí během studia.

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Probiotika.....	9
2.1.1	Narušení mikrobiomu.....	10
2.1.2	Požadavky na probiotika	11
2.1.3	Využívané probiotické bakterie	11
2.1.4	Potraviny s obsahem probiotik.....	12
2.1.5	Rod Lactococcus	12
2.1.6	Rod Propionibacterium	13
2.1.7	Rod Lactobacillus.....	13
2.2	Sýry.....	14
2.2.1	Technologie výroby sýrů.....	15
2.2.2	Sýry s nízkodohřívanou sýřeninou.....	17
2.2.3	Sýry s vysokodohřívanou sýřeninou	17
2.3	Metody izolace DNA.....	18
2.3.1	Fenol-chloroformová extrakce	18
2.3.2	Izolace pomocí kolonek	18
2.4	Stanovení koncentrace a čistoty nukleových kyselin	19
2.5	Real-time PCR.....	19
2.5.1	Průběh reakce	19
2.5.2	Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM).....	20
3	CÍL PRÁCE.....	21
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
4.1	Komerční výrobky	22
4.1.1	Eidam sýr 30 % TVS.....	22
4.1.2	Gouda sýr	22
4.1.3	Ementál sýr 45 % TVS.....	23
4.1.4	Čedar sýr 48 % TVS.....	23
4.2	Bakteriální kultury	24
4.3	Vybavení laboratoře	24
4.3.1	Chemikálie	24
4.3.2	Přístroje a pomůcky.....	24

4.4	Příprava roztoků	25
4.4.1	Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů bakteriálních buněk	25
4.4.2	Roztoky pro izolaci bakteriální DNA.....	26
4.4.3	Roztoky pro agarózovou elektroforézu	26
4.4.4	Komponenty PCR	26
4.5	Metody.....	27
4.5.1	Příprava hrubých lyzátů	27
4.5.2	Fenolová extrakce bakteriální DNA.....	27
4.5.3	Srážení DNA ethanolem.....	27
4.5.4	Izolace DNA pomocí sady Omni Bacterial DNA Purification Kit	28
4.5.5	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA	28
4.5.6	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	29
4.5.7	Gelová elektroforéza genomové DNA.....	30
5	VÝSLEDKY	32
5.1	Příprava hrubých lyzátů a izolace bakteriální DNA	32
5.2	Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA	32
5.3	Gelová elektroforéza genomové DNA	34
5.4	Výběr vzorků pro práci s real-time PCR a HRM	38
5.5	Real-time PCR a HRM analýza křivek tání pro druh <i>Lacticaseibacillus casei</i>	39
5.6	Real-time PCR a HRM analýza křivek tání pro druh <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	41
5.7	Real-time PCR a HRM analýza křivek tání pro druh <i>Lactobacillus helveticus</i>	44
5.8	Real-time PCR a HRM analýza křivek tání pro druh <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	46
5.9	Real-time PCR a HRM analýza křivek tání pro druh <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> 48	
5.10	Real-time PCR a HRM analýza křivek tání pro druh <i>Propionibacterium freudenreichii</i> 50	
5.11	Real-time PCR a HRM analýza křivek tání pro druh <i>Streptococcus thermophilus</i> ..	52
5.12	Seznam analyzovaných bakteriálních druhů v jednotlivých druzích sýrů	54
6	DISKUZE.....	55
6.1	Koncentrace a čistota DNA izolované ze sýrů	55
6.2	Real-time PCR.....	56
6.2.1	Real-time PCR a HRM analýza specifická pro druh <i>Lacticaseibacillus casei</i> ..	56

6.2.2	Real-time PCR a HRM analýza specifická pro druh <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	56
6.2.3	Real-time PCR a HRM analýza specifická pro druh <i>Lactobacillus helveticus</i> ..	57
6.2.4	Real-time PCR a HRM analýza specifická pro druh <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	57
6.2.5	Real-time PCR a HRM analýza specifická pro druh <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	57
6.2.6	Real-time PCR a HRM analýza specifická pro druh <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	58
6.2.7	Real-time PCR a HRM analýza specifická pro druh <i>Streptococcus thermophilus</i>	58
7	ZÁVĚR.....	59
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	60
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	68

1 ÚVOD

V posledních letech se stále více hovoří o významu probiotik pro zdraví. Vědci zkoumají, jaké prospěšné účinky mohou mít tyto mikroorganismy na trávicí a imunitní systém. Zároveň se také intenzivně zkoumá, v jakých potravinách jsou probiotika přítomna a jakým způsobem je možné je do stravy začlenit.

Sýry jsou tradiční potravinou, kterou lidé konzumují již tisíce let. Vznikají fermentací mléka pomocí sýrařských kultur a jsou bohatým zdrojem bílkovin a vitamínů. Obsahují mnoho živin a mikroorganismů, které mohou mít pozitivní účinky na lidské zdraví. Mezi tyto mikroorganismy patří i probiotika. Pokud je narušena rovnováha mezi jednotlivými probiotickými kulturami v trávicím traktu, může to mít negativní dopad na trávení, alergie, imunitní systém a dokonce i na duševní zdraví, včetně úzkosti a deprese. Probiotické bakterie produkují kyselinu mléčnou, která dává sýru jeho charakteristickou chuť a texturu. Různé druhy sýrů obsahují rozdílné složení probiotických bakterií. Exaktní znalost konkrétního probiotického složení různých druhů sýrů může být užitečná pro vyhodnocení přínosu jednotlivých druhů pro náš střevní mikrobiom. Tyto poznatky mohou také pomoci přiblížit zdravotní benefity sýrů široké veřejnosti.

Pro identifikaci probiotických bakterií v sýrech byla v této práci využita metoda real-time PCR (polymerázová řetězová reakce v reálném čase). Metoda PCR má v potravinářské chemii široké využití, zejména při izolaci DNA probiotických bakterií. Tato metoda umožňuje rychlou a efektivní amplifikaci DNA, což zjednodušuje identifikaci a kvantifikaci probiotických bakterií v potravinových produktech. To je velmi užitečné pro průmyslové výrobce potravin, kteří chtějí zajistit konzistentní kvalitu svých produktů obsahujících probiotika. Metoda PCR se také používá k diagnostice potravinově přenosných chorob a sledování mikrobiální kontaminace potravin.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Probiotika

Termín probiotikum je odvozen z latinského slova „pro“ a řeckého slova „bios“, což znamená „pro život“ [1]. Opakem je slovo „antibiotikum“ – „proti životu“ [2]. Definice probiotik se v průběhu let na základě nových poznatků měnila. Dnes je za všeobecně uznávanou definici považována ta od Světové zdravotnické organizace (WHO) a Organizace pro výživu a zemědělství, které definovaly probiotika jako „živé mikroorganismy, které, pokud jsou podávány v adekvátním množství, prospívají hostiteli“ [3].

Díky četným vědeckým studiím zabývajících se lidským mikrobiomem narůstá v posledních letech u široké veřejnosti zájem o probiotika. Dříve byly mikroorganismy považovány za něco, čemu je třeba se vyhybat, avšak dnes roste povědomí o prospěšnosti některých mikroorganismů v lidském těle [4].

S probiotiky je neslučitelně spojen mikrobiom, tím nejznámějším a nejrozsáhlejším je střevní. Gastrointestinální trakt lidského těla obsahuje obrovské množství mikroorganismů, které hrají zásadní roli při fungování imunitního systému. Mikroorganismy, se kterými žijeme, jsou pro nás životně důležité a rozhodují o našem fyzickém a psychickém zdraví i nemoci. Mohou nám prospívat, ale i škodit, pomáhat vstřebávat živiny, ale mohou i způsobovat trávicí problémy. Je dokázána vysoká spojitost mezi poruchami gastrointestinálního traktu a úzkostí nebo depresemi. U roztroušené sklerózy byla zaznamenána zvýšená propustnost střev. Různé analýzy naznačují, že chronická zácpa může být časným příznakem Parkinsonovy choroby. Důležitost střev si již před více než 2000 lety uvědomoval starověký lékař Hippokrat, který tvrdil: „Všechna onemocnění začínají ve střevech.“ [5].

Trávicí trakt je vstupní bránou do našeho těla, nejen pro jídlo a pití, ale i pro všechny škodliviny, jako jsou různé bakterie, viry a toxické látky. Právě díky mikroorganismům, které se nacházejí v lidském střevním traktu, tyto škodlivé látky odchází z těla pryč stolicí a nedochází k jejich nežádoucímu vstřebání do těla [6].

K prvotnímu osídlení trávicího traktu mikroorganismy dochází při porodu dítěte během průchodu porodními cestami matky. Následným kojením se v trávicím traktu dítěte usídlují především bakterie rodu *Bifidobacterium*. Pokud ke kojení nedochází, nebo je porod veden císařským řezem, je střevní mikrobiom na probiotické bakterie chudý. Vývoj mikrobiomu u dětí narozených císařským řezem je odlišný od vývoje u vaginálně narozených dětí a rozdíly mohou přetrvávat až do 4 let věku. I když jsou tyto rozdíly přechodné, dopady na vývoj mikrobiomu během důležitého období imunitního programování mají trvalé zdravotní následky [7]. Ať už se jedná o zvýšenou pravděpodobnost alergie, atopie nebo astmatu [8]. Porodů císařským řezem celosvětově přibývá, proto se v posledních letech začíná využívat tzv. vaginální výsev, kdy bezprostředně po porodu jsou děti narozené císařským řezem potřeny matčíným vaginálním sekretem. Jedná se o prostředek přenosu vaginálního mikrobiomu matky na novorozence [7].

Probiotické bakterie mají příznivý vliv i na další části lidského těla, kde mikrobiom hraje důležitou roli pro zdraví člověka. Jedná se převážně o urogenitální trakt a dutinu ústní [9]. Probiotika by mohla být užitečná pro prevenci i léčbu urogenitálního traktu zejména u žen, příznivý účinek byl prokázán například při léčbě bakteriální vaginózy [10, 11].

2.1.1 Narušení mikrobiomu

Střevní mikrobiom tvoří několikanásobně větší počet buněk, než je vlastních buněk organismu. Předpokládá se, že obsahuje až 1000 bakteriálních druhů. Celková hmotnost bakteriální biomasy v lidských střevech se odhaduje na jeden až dva kilogramy. I přes velký pokrok v analytických metodách, není možné tato čísla určit přesně. Má se za to, že mnohé druhy nejsou stále objeveny a popsány. Je zajímavé, že při narušení střevního mikrobiomu nemusí docházet ke snížení hmotnosti, ale vždy dochází ke snížení rozmanitosti. Druhová diverzita může klesat i na méně než polovinu bakteriálních druhů [12].

Střevní mikrobiom může být narušen mnoha vlivy, jako například:

- **Narození císařským řezem.**
Porod císařským řezem je spojen s nižší diverzitou bakteriálních kmenů. Zejména rod *Bifidobacterium* je u vaginálně narozených dětí významně častější. Jedná se o rod, který u kojenců podporuje vývoj a správné dozrávání imunitního systému k udržení zdraví [13].
- **Absence kojení.**
Mikrobiom novorozenců je dále velmi ovlivňován kojením. Mateřské mléko je nejlepším zdrojem výživy bohaté na bakteriální kmeny, které osidlují střevní sliznici dítěte. Růst probiotických bakterií ve střevech dítěte je podporováno dalšími složkami, které jsou obsaženy v mléce. Jedná se především o prebiotické oligosacharidy [14].
- **Konzumace antibiotik.**
Antibiotika jsou život zachraňující léky využívající se při bakteriálních infekcích a různých operacích. Mají však i nežádoucí dopad na střevní mikrobiom. Způsobují snížení mikrobiální diverzity, což může mít negativní vliv na zdraví člověka. Zvyšuje se náchylnost k infekci patogeny, jako je *Clostridiodes difficile* [15]. Obnova lidského mikrobiomu po léčbě antibiotiky je velmi pomalá a neúplná. Plné zotavení může trvat měsíce i roky [16].
- **Strava – vysoce průmyslově zpracované potraviny.**
Strava a nutriční stav jsou důležitými faktory lidského zdraví. Současný životní styl vede populaci ke stále méně přirozené stravě, což přispívá k vyšší prevalenci chronických metabolických onemocnění, které souvisí s neurozánětlivými stavy [17]. Mnoho ingrediencí, které se přidávají do vysoce zpracovávaných potravin, má škodlivé účinky na střevní bariéru a vede ke snížení diverzity střevního mikrobiomu, což může vést až k tvorbě střevních zánětů [18]. Zdá se jako ideální konzumovat zejména biopotraviny, které ve srovnání s konvenčními potravinami mají vyšší obsah bioaktivních látek a zejména nižší obsah nezdravých látek, jako jsou pesticidy, které souvisejí s dysbiózou střevního mikrobiomu, toxicitou a imunitními poruchami u lidí [19].
- **Hygiena vedoucí k nedostatku podnětů z okolí.**
Neméně důležitým faktorem, který ovlivňuje střevní mikrobiom jsou hygienické návyky člověka. Předpokládá se, že expozice mikroorganismů hraje jednu z klíčových rolí při formování imunitního systému. Tím se zlepšuje ochrana proti infekcím a snižuje se pravděpodobnost alergií [20].

2.1.2 Požadavky na probiotika

Aby mohl probiotický mikroorganismus uplatnit své příznivé účinky na zdraví hostitele, musí vykazovat určité žádoucí vlastnosti.

- Odolnost vůči podmínkám prostředí, kterým bakterie prochází. Jedná se převážně o kyselé prostředí žaludku, žlučové kyseliny a pankreatické šťávy.
- Adheze na slizniční povrchy a schopnost kolonizace střeva [21].
- Užití dostatečného množství probiotik. Obecně se udává, že probiotické bakterie by měly mít v denní dávce minimální koncentraci $10^6/g$ a denně by mělo být zkonsumováno celkem $10^9/g$ probiotických bakterií [22].
- Zachování životaschopnosti probiotik během výrobního procesu a skladování finálního výrobku. Mnoho mechanismů probiotického účinku je závislých na životaschopnosti a aktivitě buněk, avšak ne všechny mechanismy jsou takto závislé. Jedná se například o adhezi k hostitelským tkáním a modulaci vrozených imunitních odpovědí [23].

2.1.3 Využívané probiotické bakterie

Probiotika jsou prospěšné živé mikroorganismy, jejichž pozitivní vliv je potvrzen klinickými testy. Lze očekávat, že probiotické účinky mohou vykazovat i některé kmeny mikroorganismů, které nebyly přímo testovány, avšak náleží do druhu mikroorganismů, který otestován byl [24].

Tabulka 1 Často používané probiotické organismy v potravinářských technologiích [25, 26, 27]

Druhy rodu <i>Lactobacillus</i>	Druhy rodu <i>Bifidobacterium</i>	Různé rody
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Lactiplantibacillus pentosus</i>
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
		<i>Leuconostoc lactis</i>
		<i>Levilactobacillus brevis</i>
		<i>Ligilactobacillus salivarius</i>
		<i>Propionibacterium</i>
		<i>freudenreichii</i>
		<i>Streptococcus thermophilus</i>
		<i>Streptococcus diacetylactis</i>

2.1.4 Potraviny s obsahem probiotik

Spousta lidí konzumuje probiotika ve formě doplňků stravy. Ty se však vyskytují i v běžných potravinách, které prošly bakteriálním kvašením.

Tradičně jsou probiotika součástí mléčných výrobků, mezi ty nejznámější patří jogurt. Vyrábí se kvašením mléka za využití bakterií rodu *Lactobacillus*, *Streptococcus* a případně *Bifidobacterium* [28]. Dalším, a na probiotika bohatším, kvašeným mléčným výrobkem je kefir, který se vyrábí přidáním kefírových zrn k mléku. Kefír je na rozdíl od jogurtu probioticky rozmanitější, obsahuje desítky různých druhů bakterií a kvasinek [29]. Dokonce i velké množství sýrů, jako jsou gouda, čedar a mozzarella, obsahuje zdraví prospěšné probiotické bakterie [30, 31].

Probiotika je však možné nalézt i u nemléčných potravin. Jsou to výrobky z ovoce, zeleniny, masa, cereálií a sóji. Producenti se pro výrobu inspiroují v tradičních fermentačních procesech zpracování matric [32]. Konkrétně se jedná zejména o kvašené zelí, okurky a kimchi [33].

2.1.5 Rod *Lactococcus*

Rod *Lactococcus* náleží do domény *Bacteria*, kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales* a čeledi *Streptococcaceae* [34]. Jedná se o grampozitivní nesporeující a nepohyblivé bakterie, které tvoří pouzdra. Bakterie rodu *Lactococcus* jsou fakultativně anaerobní a vyskytují se po dvojicích nebo v krátkých řetězcích. Fermentací sacharidů vzniká jako hlavní produkt kyselina mléčná [35].

Bakterie tohoto rodu se převážně vyskytují na rostlinném materiálu a konkrétně druhy *Lactococcus lactis ssp. lactis* a *Lactococcus lactis ssp. cremoris* slouží v mléčných výrobcích jako startovací kultury na výrobu zakysaných smetan, mlék a sýrů všeho druhu. Mohou se používat samostatně nebo spolu s jinou specifickou kulturou mikroorganismů [6, 35].

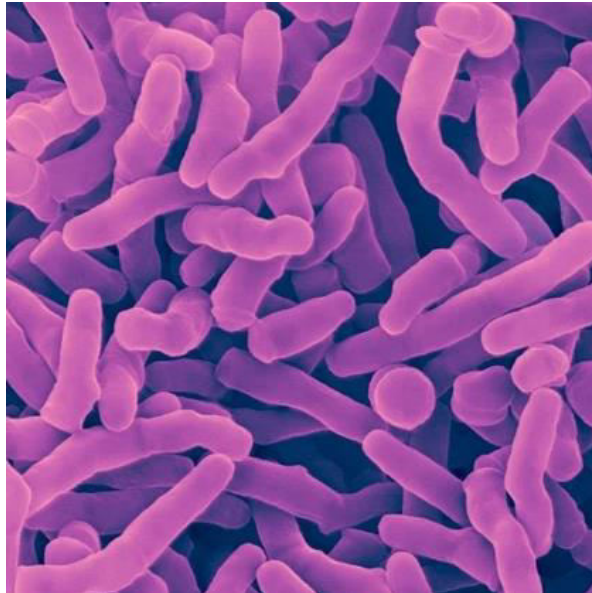


Obrázek 1 *Lactococcus bacteria* [36]

2.1.6 Rod *Propionibacterium*

Rod *Propionibacterium* se řadí do domény *Bacteria*, kmene *Firmicutes*, třídy *Actinomycetota*, řádu *Propionibacteriales* a čeledi *Propionibacteriaceae* [37]. Bakterie rodu *Propionibacterium* jsou grampozitivní nesporulující a fakultativně anaerobní tyčinky. Tvoří krátké a často i široké tyčinky, které jsou samostatně, v párech nebo v řetízcích [38].

Pro své vlastnosti se nejčastěji využívá druh *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *freudenreichii*. Své uplatnění nachází v sýrařství, kde způsobuje tvorbu „ok“ v sýrech sýrařského typu [38].



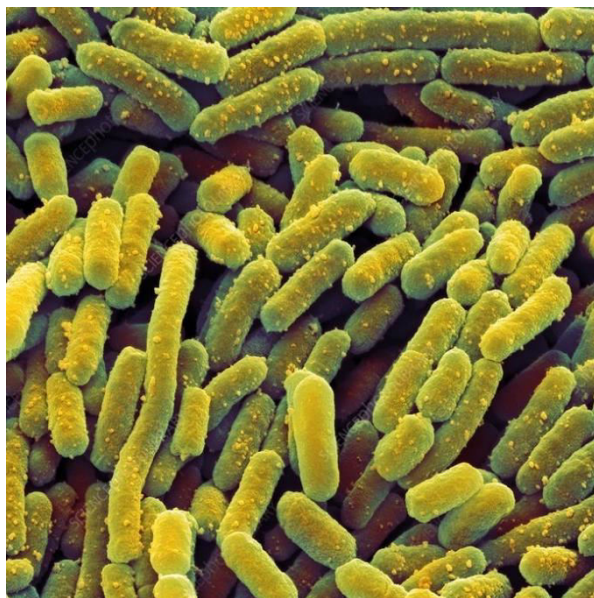
Obrázek 2 *Propionibacterium freudenreichii* bacteria [39]

2.1.7 Rod *Lactobacillus*

Rod *Lactobacillus* se řadí do domény *Bacteria*, kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales* a čeledi *Lactobacillaceae* [40]. Jedná se o rozšířený rod, který se hojně vyskytuje v ústech, trávicím traktu savců a převážně v mléce, kde způsobuje přirozené kysání [41].

Bakterie rodu *Lactobacillus* jsou nesporulující anaerobní grampozitivní tyčinky nebo kokobacily [42]. Podle produktů metabolismu se dělí na dvě skupiny, homofermentativní mléčné bakterie a na heterofermentativní mléčné bakterie. První skupina při fermentaci sacharidů produkuje pouze kyselinu mléčnou. U druhé skupiny dochází fermentací sacharidů k tvorbě kyseliny mléčné a dále ethanolu, oxidu uhličitého a kyseliny octové [43].

Díky schopnosti mléčné kyseliny zpomalovat rozmnožování hnilobných bakterií a stafylokoků, jsou mléčné bakterie využívány ke konzervování zeleniny nebo různých krmiv [44]. *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a často i *Lactobacillus acidophilus* se využívají při přípravě jogurtů. Homofermentativní druhy *Lactobacillus casei* a *Lactobacillus helveticus* se používají při výrobě sýrů [41].



Obrázek 3 *Lactobacillus* bacteria [45]

2.2 Sýry

Podle současné vyhlášky č. 397/2016 Sb., o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje, je sýr definován jako mléčný výrobek vyrobený vysrážením mléčné bílkoviny z mléka působením syřidla nebo jiných vhodných koagulačních činidel, oddělením podílu syrovátky a následným prokysáním nebo zráním [46].

Sýry se dělí do skupin: přírodní, tavené a syrovátkové. Přírodní sýry jsou vyráběny přímo z mléka, kdežto na výrobu tavených sýrů je potřeba sýrů přírodních, které projdou řadou úprav. Přírodní sýr je možno dělit na podskupiny: zrající, zrající pod mazem, zrající v celé hmotě, s plísní na povrchu, s plísní uvnitř hmoty, dvouplísňový, v solném nálevu a pařený, extra tvrdý (ke strouhání), tvrdý, polotvrdý, poloměkký a měkký [47].

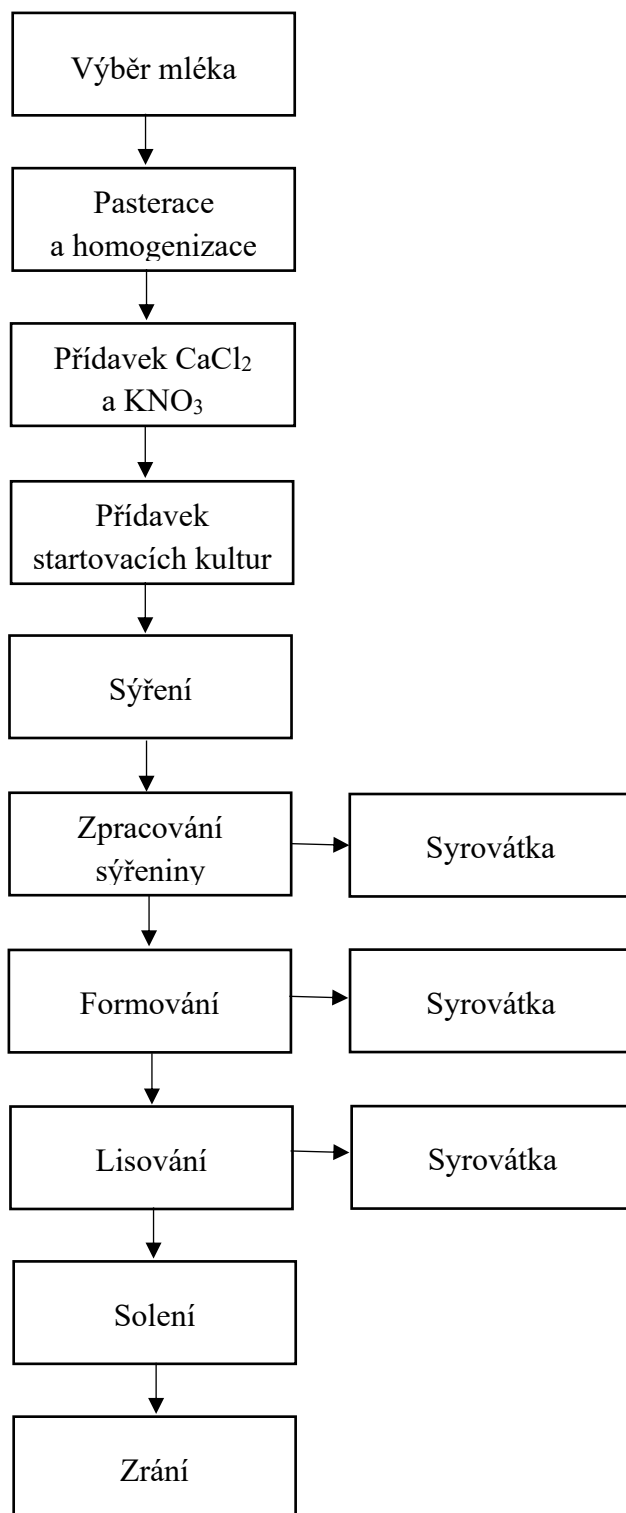
Časté je dělení podle obsahu sušiny:

- Tvrdé (obsah vody maximálně 45 %)
- Měkké (obsah vody minimálně 45 %) [48].

A podle procentuálního zastoupení tuku v sušině:

- Vysokotučné (nad 60 %)
- Plnotučné (45–60 %)
- Polotučné (25–45 %)
- Nízkotučné (10–25 %)
- Odtučněné sýry (pod 10 %) [48].

2.2.1 Technologie výroby sýrů



Obrázek 4 Schéma výroby sýru [49]

Výroba jakéhokoliv druhu sýru začíná výběrem vhodného mléka, nejčastěji kravského. Na některé druhy sýrů se používá mléko ovčí nebo kozí, případně jejich směs. Na získání vhodného mléka o přijatelné jakosti má vliv mnoho faktorů (volná pastva, plemeno zvířete, vhodné klimatické podmínky). Konzumací nevhodných druhů bylin (česnek, cibule a další) dojde ke znehodnocení sensorických vlastností mléka a následně i sýrů. Naopak pozitivní vliv na složení mléka má volná pastva dobytka, která vede k nárustu koncentrace omega-3 MK a lepšímu aromatickému profilu mléka [50].

Mléko pro výrobu sýrů je obvykle pasterováno, aby byla zajištěna jeho zdravotní nezávadnost a trvanlivost. Běžně se provádí po dobu 15–20 s a při teplotě 72–75 °C. Pasterace inaktivuje patogeny (*Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* a mnohé další) včetně velmi nebezpečné bakterie *Mycobacterium tuberculosis* [50]. Aby se minimalizovalo vyvstávání mléčného tuku na povrch mléka, provádí se zejména u plísňových sýrů proces zvaný homogenizace. Mléko je pod vysokým tlakem hnáno úzkou šterbinou, čímž dochází ke zmenšování tukových kuliček [51].

Do tepelně ošetřeného mléka se přidávají aditivní látky, které slouží k vylepšení technologických vlastností. Jedním z aditiv je chlorid vápenatý, který zlepšuje syřitelnost a zvyšuje pevnost gelu. Dusičnan draselný je druhý z běžně používaných aditiv. Jeho redukováná forma se využívá pro svou schopnost zabránit klíčení spor bakterií, které mohou způsobovat defekty při tzv. duření sýrů [50, 52].

Jedním z klíčových kroků při výrobě sýrů je přidavek startovacích kultur. Jedná se o mikrobiální dodání velkého počtu buněk alespoň jednoho mikroorganismu, jehož hlavní funkcí je způsobit rychlé okyselení. Přídavek vybraných startovacích kultur do pasterizovaného mléka umožňuje řídit fermentační proces a získat standardizovaný produkt [53]. Tyto bakterie se používají při výrobě fermentovaných potravin již mnoho let a jsou bezpečné. Nejčastěji používanými bakteriemi jako startovací kultury jsou zástupci rodů *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* a *Enterococcus* [54]. Zvyšují trvanlivost a mikrobiální bezpečnost, zlepšují texturu a přispívají k sensorickému profilu konečného produktu [54]. Okyselení ve vhodném tempu a čase je pravděpodobně nejkritičtější krokem při výrobě sýru, protože zabráňuje růstu patogenních mikroorganismů, ovlivňuje aktivitu enzymů během zrání a tím chuť konečného produktu [55].

Po přidavku startovacích kultur a jejich namnožení následuje sýření. Jedná se o proces, při kterém dochází ke srážení mléčné bílkoviny kaseinu, což vede k přeměně tekutého mléka na hmotu o konzistenci podobné pudinku [52].

Zpracování sýřeniny je u různých druhů sýrů odlišné. Hlavním cílem je co nejvíce podpořit synerezi. Proces začíná krájením, kdy je sýřenina krájena speciálními noži na kusy o požadované velikosti, obvykle o velikosti 8–15 mm [56]. Velikost sýrového zrna je stěžejním faktorem ovlivňující obsah vlhkosti sýru. Na čím menší kousky je sýřenina krájena, tím je větší povrch, ze kterého se může uvolňovat syrovátka. Z toho vyplývá, že tvrdé sýry mají menší zrno a měkké naopak větší. Zrno se dále šetrně míchá v uvolněné syrovátce [52].

U tvrdých a polotvrdých sýrů pokračuje proces dohříváním sýřeniny. Teplota se zvýší na teplotu dosoušení, která je však závislá na typu sýru. Při výrobě nízkodohříváných sýrů se teplota pohybuje okolo 34–42 °C. U vysokodohříváných sýrů se sýrové zrno přihřívá na 52–56 °C [57].

Při dosažení požadovaného stupně synereze se přistupuje k formování, čímž se sýřenině začne dávat tvar. Z forem odtéká syrovátka a sýr se odvodňuje a tvaruje. U tvrdých a polotvrdých sýrů je odvodňování podpořeno lisováním. Lisování však musí být pozvolné a tlak nesmí narůstat rychle, jinak by to vedlo k předčasnému uzavření struktury sýra, čímž by se zamezilo odtoku syrovátky. Měkké sýry jsou lisovány pouze vlastní vahou [52].

Solení při zrání sýrů plní různé funkce. Zejména ovlivňuje růst a přežití bakterií, podporuje synerezi sýřeniny, což má za následek vypuzení syrovátky a tím snížení vlhkosti sýra a v neposlední řadě má pozitivní vliv na sensorické vlastnosti sýru. Z hlediska způsobu solení se sýr buď ponoří do solné lázně, nebo se povrch sýra potírá solí, nebo se přidává sůl přímo do sýřeniny [50].

Během finálního kroku zrání sýra se sýřenina, která je bez chuti, mění na žádoucí sýr s charakteristickým vzhledem, chutí a vůní. V průběhu zrání dochází k řadě biochemických reakcí, jako jsou glykolýza, proteolýza a lipolýza. Dále k různým sekundárním přeměnám, které jsou zodpovědné především za jemnější aspekty sýrové chuti. Doba zrání je závislá na typu sýru. Obecně platí, že tvrdé sýry zrají dlouhé týdny až roky, zatímco měkké sýry se uchovávají v řádu dní [50].

2.2.2 Sýry s nízkodohřivanou sýřeninou

Působením pasterace je velká část mikroorganismů obsažených v mléce zničena, proto je nutné do něj přidávat mikroorganismy nové. Jejich hlavním úkolem je fermentovat sacharidy za produkce kyseliny mléčné a dalších látek.

Mezi sýry s nízkodohřivanou sýřeninou patří holandské polotvrdé sýry. Hlavními zástupci jsou eidam, gouda a čedar [56]. Eidam je u nás nejrozšířenějším tvrdým sýrem. Vyrábí se s různým obsahem tuku v sušině, obvykle mezi 30 a 60 % [58].

Pro holandské sýry jsou typické kultury ve složení:

- *Lactococcus lactis subsp. lactis*
- *Lactococcus lactis subsp. cremoris*
- *Lacticaseibacillus casei*
- *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*
- *Lactobacillus helveticus* [59]

2.2.3 Sýry s vysokodohřivanou sýřeninou

Při výrobě sýrů se obecně jako základ používá mezofilní (tzv. smetanová) kultura. U sýrů s vysokodohřivanou sýřeninou se tato kultura kombinuje s termofilní kulturou a případně s propionovou kulturou. Ta je složena z bakterií rodu *Propionibacterium*. Používá se při výrobě sýrů s tvorbou ok v těstě (např. ementál). Působením bakterií vznikají v těstě oka vytvořená oxidem uhličitým, který vzniká fermentací laktátu.

Složení mezofilní kultury:

- *Lactococcus lactis subsp. lactis*
- *Lactococcus lactis subsp. cremoris*
- *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*
- *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum* [59]

Složení termofilní kultury:

- *Streptococcus thermophilus*
- *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*
- *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*
- *Lactobacillus helveticus*
- *Lacticaseibacillus casei* [59]

2.3 Metody izolace DNA

Izolace nukleových kyselin je klíčovým procesem analyzačních metod molekulární biologie. Jde o metodu čištění DNA pomocí různých fyzikálních a chemických metod, kdy se DNA izoluje od buněčných membrán, proteinů a dalších buněčných složek [60]. Je známo mnoho způsobů získávání nukleových kyselin, všechny však fungují na společném principu. V první řadě je třeba vyvolat lyzi buněk, tzn. narušit buněčnou stěnu a plazmatickou membránu. Toho lze docílit několika způsoby. Chemicky, fyzikálně, enzymaticky nebo kombinací všech předchozích metod. Z enzymů se často používá lysozym a z detergentů dodecylsulfát sodný (SDS). Fyzikálních metod, zejména drcení a mletí, je třeba využít u strukturovanějších materiálů [61]. Vzniklá směs DNA, RNA, zbytků buněčné stěny a plazmatické membrány, proteinů a dalších složek je označována jako tzv. hrubý lyzát. Proteiny, které jsou schopny se vázat na DNA, je třeba odstranit působením proteinasy K. Zatímco odstranění RNA není vždy nutné. V případě, že byla izolace prováděna za účelem použití pro PCR, není přítomnost RNA na škodu. V průběhu PCR dojde pouze k amplifikaci specifického úseku DNA [62].

2.3.1 Fenol-chloroformová extrakce

Izolace DNA pomocí fenol-chloroformové extrakce patří mezi dříve často využívané metody. Její výhodou je schopnost poskytnout velké množství DNA o vysoké čistotě. Naopak nevýhodou je pracnost a časová náročnost izolace. Velkým problémem této metody je práce s toxickými rozpouštědly [63].

Princip metody je založen na přidavku směsi fenolu s chloroformem k hrubému lyzátu, díky čemuž dochází k denaturaci a vysrážení proteinů. Následnou centrifugací je rozdělena vodná fáze od organické. Vodná fáze obsahuje nukleové kyseliny a v organické fázi jsou proteiny s tuky. Nakonec je třeba DNA získat z vodného roztoku. Toho se dosáhne vysrážení ethanolem [63].

2.3.2 Izolace pomocí kolonek

Izolace s využitím komerčně dostupných kolonek je v dnešní době nejčastějším způsobem izolace DNA. Tato metoda má velké pozitivum ve své rychlosti a nepoužívání toxických rozpouštědel. Na druhou stranu je finančně nákladná [64].

Materiál kolonky je schopen za určité koncentrace solí a určitého pH absorbovat DNA. Ostatní buněčné složky hrubého lyzátu zůstanou v roztoku a neabsorbují se na matici kolonky. Roztok je odstraněn centrifugací a DNA je vyplavena do vhodného pufri [65].

2.4 Stanovení koncentrace a čistoty nukleových kyselin

Pro správné fungování zvolených molekulárně diagnostických metod, je nezbytné vybrat spolehlivé metody stanovení koncentrace a čistoty NK. Obvykle používanými metodami jsou optické metody, mezi které patří spektrofotometrie a fluorimetrie [66].

Stanovení koncentrace a čistoty NK pomocí přístroje NanoDrop 2000c je velmi rychlé a spolehlivé. Minimální objem potřebný pro přesný údaj přístroje je jednou z hlavních výhod oproti použití běžného spektrofotometru. Přístroj měří kromě koncentrace vzorku a poměru absorpance při 260 a 280 nm celé spektrum absorpance. Což umožňuje lépe detekovat případné kontaminanty na základě jejich vlnových délek absorpance. Maximální absorpance NK nastává při vlnové délce 260 nm. Intenzita této absorpance je úměrná koncentraci NK. K určení čistoty vzorku využívá poměru A_{260}/A_{280} . Obecně se uznává, že dostatečně čistá DNA poskytuje poměr A_{260}/A_{280} v rozmezí 1,8 až 2,0. Nižší poměr značí proteinovou kontaminaci [66].

Citlivější metodou kvantifikace NK jsou fluorimetrické metody. Poté, co se barviva navážou na nukleové kyseliny, jsou barviva excitována na jedné vlnové délce. Z toho důvodu budou různé koncentrace NK vykazovat rozdílnou intenzitu signálu. Tato metoda je vhodná pro silně zředěné vzorky o nízké koncentraci NK. Oproti přístroji NanoDrop 2000c neposkytuje informaci o čistotě vzorku [66, 67].

2.5 Real-time PCR

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce je metoda založena na principu klasické PCR, kdy dochází k amplifikaci vybraného úseku DNA. Kombinace vynikající citlivosti, specifčnosti a zkrácené doby, kdy je třeba po klasické PCR provést analýzu, činí z real-time PCR více než dobrou alternativou ke konvenční PCR [68].

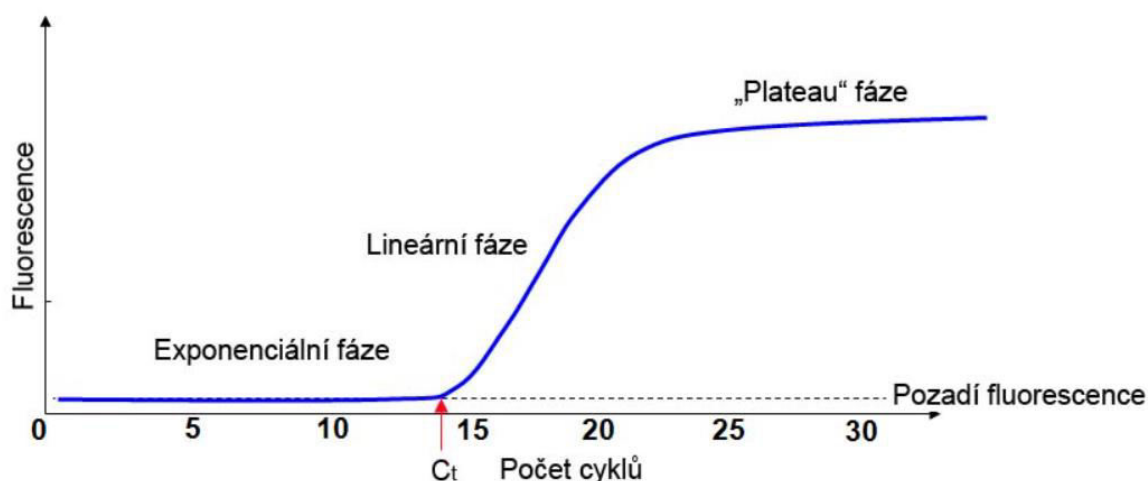
2.5.1 Průběh reakce

Amplifikace vybraných úseků DNA je dosaženo díky tzv. primerům, což jsou fragmenty DNA o přibližně 20 nukleotidech. Při reakci, podobně jako u konvenční PCR, je využíváno cyklicky se opakujících změn teplot, při kterých dochází k denaturaci DNA, hybridizaci primerů a syntéze nových řetězců DNA [69]. Rozdílné je to, že v průběhu každého cyklu je zaznamenávána fluorescence. Obvykle jsou používána interkalační barviva, která při navázání na dvouřetězcovou DNA výrazně fluoreskují, zatímco pokud jsou v reakční směsi pro PCR ve volné formě, téměř záření neemitují. Jako interkalační barvivo se nejčastěji využívá SYBR Green I, jehož výhodou je jednoduchost a dobrá finanční dostupnost. Jelikož SYBR Green I patří k nespecifickým fluorescenčním substrátům, není schopné rozlišit specifické a nespecifické produkty PCR. Barvivo se totiž může vázat do jakékoliv dvouvláknové struktury, např. do dimerů primerů [68, 69].

V průběhu reakce stoupá množství dvouvláknové DNA a s ní i množství fluorescence. Vše je zaznamenáváno v závislosti na počtu proběhlých cyklů. Výsledkem je amplifikační křivka. Podle jejího tvaru lze průběh reakce rozdělit na 4 fáze [69].

Během první fáze je v reakční směsi pouze malé množství amplifikované DNA a intenzita fluorescenčního signálu je natolik nízká, že nepřekračuje mez detekce zařízení. Průběh druhé fáze je exponenciální a intenzita fluorescence se dostává nad úroveň pozadí. Cyklus, ve kterém je množství fluorescence daného vzorku detekovatelné, se nazývá cyklus prahu (c_t). Platí, že

čím nižší je hodnota c_t , tím vyšší je počáteční koncentrace templátové DNA, a naopak. Třetí fáze je fáze lineární, kdy rychle roste množství DNA, ale klesá množství DNA polymerázy, a tím pádem i klesá rychlost reakce. V závěrečné, tzv. plateau fázi, dochází v důsledku spotřebování reakčních komponentů k výraznému zpomalení reakce. Množství DNA je maximální a nedochází k žádnému dalšímu nárůstu fluorescence [69].



Obrázek 5 Amplifikační křivka [69]

2.5.2 Vysokorozlišovací analýza křivek tání (HRM)

Analýza křivek tání, nebo její pokročilá forma vysokorozlišovací analýza křivek tání HRM, je často využívána v real-time PCR k ověření, zda v průběhu reakce vznikají nespecifické produkty nebo dimery primerů [69].

Metoda využívá poznatku, že různé PCR produkty mají různou teplotu tání (T_m). Ta je definována jako teplota, při které je 50 % DNA rozděleno na jednotlivé šroubovice. Teplota tání závisí jednak na délce fragmentu DNA, tak i na počtu bází guaninu a cytosinu. Sekvence DNA s vysokým obsahem bází guanin-cytosin mají vyšší teplotu tání než ty, které jich mají méně. Je to dáno tím, že guanin je vázán k cytosinu třemi vodíkovými vazbami, zatímco adenin k thyminu pouze dvěma [70].

Princip HRM spočívá v postupném zvyšování teploty, což má za následek rozdělení amplifikované dvouřetězcové DNA. Z počátku reakce je barvivo vázané k DNA a je tedy možné pozorovat fluorescenci. Následným oteplováním dochází k rozdělování vláken DNA a tím k oddělování barviva do roztoku, kde není schopno emitovat fluorescenci. S narůstající teplotou fluorescence klesá. Výsledkem je křivka tání neboli závislost fluorescence na teplotě. T_m amplikonu může být určena z inflexního bodu křivky tání nebo z píku získaného derivací fluorescence v závislosti na teplotě [70].

3 CÍL PRÁCE

Cílem teoretické části práce bylo charakterizovat probiotické bakterie, které se v poslední době stávají stále populárnější díky svým pozitivním účinkům na lidské zdraví. Dále byl kladen důraz na technologii výroby sýrů a používané sýrařské kultury při této výrobě.

Experimentální část byla zaměřena na zvládnutí techniky izolace bakteriální DNA z různých druhů sýrů a následné detekce a kvantifikace DNA pomocí real-time PCR a vysokorozlišovací analýzy křivek tání (HRM).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Komerční výrobky

Na analýzu byly v komerčních sítích zakoupeny čtyři druhy sýrů.

4.1.1 Eidam sýr 30 % TVS

- Přírodní polotvrdý sýr. Obsah sušiny 50 %.
- Složení: pasterované mléko, jedlá sůl, stabilizátor chlorid vápenatý, sýrařské kultury, syřidlo
- Výrobce: SM Mazowsze, Grunwaldzka 97, Chorzele



Obrázek 6 Sýr eidam

4.1.2 Gouda sýr

- Přírodní polotvrdý sýr.
- Složení: mléko, jedlá sůl, mlékařské kultury, barvivo: karoteny.
- Výrobce: Madeta a.s., Rudolfovska tř. 246/83, 370 01 České Budějovice



Obrázek 7 Sýr gouda

4.1.3 Ementál sýr 45 % TVS

- Plnotučný sýr, Obsah sušiny min. 60 %.
- Složení: pasterované mléko, jedlá sůl, mikrobiální syřidlo, sýrařské kultury
- Výrobce: Goldsteig Käsereien
Bayerwald GmbH,
Siechen 11, D-93413 Cham,
Německo



Obrázek 8 Sýr ementál

4.1.4 Čedar sýr 48 % TVS

- Přírodní tvrdý plnotučný sýr. Obsah sušiny min. 61 %.
- Složení: pasterované mléko, jedlá sůl, mlékárenské kultury, syřidlo, barvivo E 160b
- Země původu surovin: Irsko
- Distributor: Bidfood Czech Republic, spol. s.r.o., V Růžovém údolí 553, 278 01 Kralupy nad Vltavou



Obrázek 9 Sýr čedar

4.2 Bakteriální kultury

- *Lacticaseibacillus casei* CCM 7088
- *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CCM 7190
- *Lactobacillus helveticus* CCDM 1017
- *Lactococcus lactis subsp. cremoris* CCDM 1004
- *Lactococcus lactis subsp. lactis* CCDM 1007
- *Propionibacterium freudenreichii* CCDM 1009
- *Streptococcus thermophilus* CCDM 1008

4.3 Vybavení laboratoře

4.3.1 Chemikálie

- Agaróza
- BB pufr (OMNI International, USA)
- CBH pufr (OMNI International, USA)
- Chloroform-isoamylalkohol (CIS), (Lachema, Brno, Česká republika)
- Destilovaná voda (FCH VUT, Brno, Česká republika)
- DNA standard (100 bp), (Malamité, Moravské Prusy, Česká republika)
- DLB pufr (OMNI International, USA)
- Dodecylsulfát sodný (SDS), (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- DW pufr (OMNI International, USA)
- EB pufr (OMNI International, USA)
- Ethanol (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Fenol (Lachema, Brno, Česká republika)
- Hydroxid sodný
- Chloroform (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Isoamylalkohol (Lachema, Brno, Česká republika)
- Kyselina boritá (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Kyselina etylendiamintetraoctová (EDTA), (Penta, Chrudim, Česká republika)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Brno, Česká republika)
- LD Green (Elisabeth Pharmacon, spol. s.r.o., Brno, Česká republika)
- Lysozym (Serva, Heidelberg, SRN)
- Octan sodný (Lachema, Brno, Česká republika)
- Proteináza K (Serva, Heidelberg, SRN)
- PS Green (Elisabeth Pharmacon, spol. s.r.o., Brno, Česká republika)
- Tris-báze (Serva, Heidelberg, SRN)

4.3.2 Přístroje a pomůcky

- Centrifuga mini Spin (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Běžné laboratorní sklo a jiné umělohmotné pomůcky
- Detekční systém pro vizualizaci gelu (Azure biosystems C200, Dublin, Irsko)
- Eppendorfovy zkumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Exsikátor typu N 86 KN.18 (KNF Neuberger Labport, Freiburg, SRN)

- Laboratorní váhy OHAUS SCOUT SKX622 (USA)
- Laminární box AURA MINI (EUROCLONE, Itálie)
- LightCycler Nano System (Roche, Basel, Švýcarsko)
- Mikropipety Discovery HTL (PZ HTL, Varšava, Polsko)
- Mikrovlnná trouba PROLINE SM117
- Mini kolonky (Bacterial DNA Kit, OMNI International, USA)
- Minicentrifuga SPECTRAFUGE MINI)
- NanoDrop 2000c UV-VIS spektrofotometr (Thermo Scientific, USA)
- Termocyklér Rotor-Gene 6000 (Quigen, Austrálie)
- Thermo-Shaker (TS-100C BioSan, Riga, Lotyšsko)
- Zařízení pro elektroforézu Owl EasyCast, model B1 (Thermo Scientific, USA)
- Zdroj napětí pro elektroforézu Enduro 300 V (Labnet International, Woodbridge, USA)

4.4 Příprava roztoků

4.4.1 Roztoky pro přípravu hrubých lyzátů bakteriálních buněk

- **0,5 M EDTA (pH 8,0)**

186,1 g EDTA bylo za stálého míchání na magnetické míchačce rozpuštěno v 800 ml destilované vody. Postupným přidáváním NaOH bylo upravováno pH na hodnotu 8,0. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na 1 litr a sterilován při 121 °C po dobu 20 minut.

- **1 M Tris-HCL (pH 7,8)**

121,1 g Tris-báze bylo rozpuštěno v 800 ml destilované vody. Pomocí koncentrované HCl bylo pH roztoku upravováno na hodnotu 7,8. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na 1 litr a sterilován při 121 °C po dobu 20 minut.

- **Roztok 20% dodecylsulfátu sodného**

20 g tuhého SDS bylo za stálého míchání rozpuštěno v 80 ml destilované vody. Roztok byl okamžitě zahřát na 68 °C a jeho pH bylo koncentrovanou HCL upraveno na hodnotu 7,0. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na 100 ml a po promísání byl rozdělen do alikvotních podílů a ponechán při laboratorní teplotě.

- **Lyzační roztok A**

Roztok byl připraven smísením 10 ml 0,1 M Tris-HCl (pH 7,8) a 1 ml 0,5 M EDTA. Následně byl doplněn destilovanou vodou na objem 100 ml.

- **Lyzační roztok B**

K lyzačnímu roztoku A byl přidán lysozym na výslednou koncentraci 3,0 mg/ml.

- **Proteináza K (10 mg/ml)**

10 mg proteinázy bylo rozpuštěno v 1 ml sterilní destilované vody. Roztok byl následně zředěn na koncentraci 100 µl/ml, rozdělen do alikvotních podílů. Proteináza K byla uchovávána při teplotě -20 °C.

4.4.2 Roztoky pro izolaci bakteriální DNA

- **Fenol**

Nasycený roztok fenolu upravený na pH 7,8 v TE pufru. Fenol byl rozdělen do alikvotních podílů a uchováván při teplotě -20 °C.

- **Octan sodný**

40,81 g trihydrátu octanu sodného bylo rozpuštěno v 80 ml destilované vody. Pomocí ledové kyseliny octové bylo pH upraveno na hodnotu 5,2. Roztok byl doplněn destilovanou vodou na 100 ml a sterilován při 121 °C po dobu 20 minut, následně byl rozdělen do alikvotních podílů a uchováván při teplotě 4 °C.

- **TE pufr**

1 ml 1 M Tris-HCL (pH 7,8) byl smíchán s 0,2 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0). Roztok byl doplněn sterilní destilovanou vodou na objem 100 ml a následně rozdělen do alikvotních podílů.

4.4.3 Roztoky pro agarózovou elektroforézu

- **0,5 x TBE pufr**

54 g Tris-báze a 27,5 g kyseliny borité bylo rozpuštěno v 600 ml destilované vody. Následně bylo přidáno 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) a roztok byl doplněn na 1 litr. Před použitím byl roztok 0,5 M EDTA 10x zředěn destilovanou vodou.

- **Agarózový gel pro elektroforézu**

Navážka 0,8 g agarózy byla rozpuštěna ve 100 ml 0,5 x TBE pufru.

4.4.4 Komponenty PCR

- Primery specifické pro druh *Lacticaseibacillus casei*
- Primery specifické pro druh *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*
- Primery specifické pro druh *Lactobacillus helveticus*
- Primery specifické pro druh *Lactococcus lactis subsp. cremoris*
- Primery specifické pro druh *Lactococcus lactis subsp. lactis*
- Primery specifické pro druh *Propionibacterium freudenreichii*
- Primery specifické pro druh *Streptococcus thermophilus*
- qPCR 2x SYTO-9 Master Mix (Top-Bio s.r.o., Praha, Česká republika)
- Voda pro PCR (Top-Bio s.r.o., Praha, Česká republika)

4.5 Metody

4.5.1 Příprava hrubých lyzátů

- 20 g sýru bylo rozetřeno ve třecí misce s 30 ml sterilní vody.
- Směs byla přefiltrována přes sterilní gázu.
- 0,5 ml této směsi bylo napipetováno do 1,5 ml Eppendorfových zkumavek.
- Vzorek byl centrifugován po dobu 5 minut při 10 000 ot/min.
- Supernatant byl slit a sediment se nechal okapat.
- Sediment byl resuspendován 1 ml lyzačního roztoku A.
- Suspenze byla centrifugována po dobu 5 minut při 10 000 ot/min.
- Supernatant byl slit a sediment se nechal okapat.
- K sedimentu bylo přidáno 500 μ l lyzačního roztoku B. Směs byla promíchána.
- Vzorek byl ponechán k inkubaci při laboratorní teplotě po dobu 30 minut.
- K suspenzi bylo přidáno 25 μ l 25% SDS a 5 μ l proteinázy K (100 μ l/ml). Směs byla promíchána.
- Vzorek byl ponechán k inkubaci při 55 °C po dobu 90 minut.

4.5.2 Fenolová extrakce bakteriální DNA

- K 600 μ l hrubého lyzátu bylo přidáno stejné množství fenolu.
- Směs byla kývavým pohybem 4 minuty promíchávána a vzorek byl centrifugován po dobu 5 minut při 10 000 ot/min.
- Do čisté Eppendorfovy zkumavky byla pomocí pipety odebrána vodná fáze obsahující DNA.
- K vodné fázi bylo přidáno 700 μ l směsi CIS.
- Směs byla kývavým pohybem 4 minuty promíchávána a vzorek byl centrifugován po dobu 5 minut při 10 000 ot/min.
- Do čisté Eppendorfovy zkumavky byla pomocí pipety odebrána vodná fáze obsahující DNA.

4.5.3 Srážení DNA ethanolem

- Ke 400 μ l směsi bylo přidáno 1/20 objemu (20 μ l) 3 M octanu sodného.
- Následně byl ke směsi přidán 1 ml 96% ethanolu vychlazeného na -20 °C a směs byla promíchána.
- Zkumavka se vzorkem byla vložena na 30 minut do mrazáku při -20 °C, kde se DNA nechala vysrážet.
- Směs byla centrifugována 15 minut při 10 000 ot/min.
- Supernatant byl opatrně najednou slit a byl ponechán na 30 minut v exsikátoru k dokonalému vysušení.
- DNA byla rozpuštěna ve 100 μ l TE pufru a uchovávána při teplotě 4 °C.

4.5.4 Izolace DNA pomocí sady Omni Bacterial DNA Purification Kit

- 10 g sýru bylo rozetřeno ve třecí misce s 15 ml sterilní vody.
- Směs byla přefiltrována přes sterilní gázu.
- 0,5 ml této směsi bylo napipetováno do 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky.
- Vzorek byl centrifugován po dobu 5 minut při 10 000 ot/min.
- Supernatant byl slit a k suspenzi bylo přidáno 200 µl lyzačního roztoku B. Směs byla promíchána.
- Vzorek byl ponechán k inkubaci při 37 °C po dobu 10 minut.
- Bylo přidáno 25 µl proteinázy K.
- Poté bylo přidáno 100 µl DLB pufru a vše bylo promícháno.
- Vzorek byl ponechán k inkubaci při 55 °C po dobu 60 minut.
- Následně byl obsah zkumavek centrifugován po dobu 2 minut při 10 000 ot/min.
- Supernatant byl odpipetován do nové 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky a k suspenzi bylo přidáno 220 µl BB pufru.
- Vzorek byl ponechán k inkubaci při 65 °C po dobu 10 minut.
- Po inkubaci bylo ke směsi přidáno 220 µl 100% ethanolu a vše bylo řádně promícháno.
- Omni DNA Mini kolonka byla vložena do 2 ml sběrné zkumavky.
- Následně byl roztok přepipetován z 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky na kolonku.
- Vzorek byl centrifugován po dobu 1 minuty při 10 000 ot/min.
- Supernatant byl vyhozen a kolonka byla vložena do čisté sběrné zkumavky.
- Do kolonky bylo přidáno 500 µl CBH pufru.
- Směs byla centrifugována po dobu 1 minuty při 10 000 ot/min.
- Supernatant byl vyhozen a kolonka byla vložena do čisté sběrné zkumavky.
- Do kolonky bylo přidáno 700 µl DW pufru.
- Vzorek byl centrifugován po dobu 1 minuty při 10 000 ot/min.
- Supernatant byl odstraněn a kolonky byla vložena do čisté sběrné zkumavky.
- Na kolonku nebylo nic pipetováno a byla opět provedena centrifugace po dobu 2 minut při 10 000 ot/min.
- Omni DNA Mini kolonka byla vložena do nové 1,5 ml Eppendorfovy zkumavky.
- Na kolonku bylo napipetováno 100 µl EB pufru předehřátého na 65 °C.
- Vzorek byl ponechán k inkubaci při 65 °C po dobu 3 minut.
- Poté byla provedena centrifugace po dobu 1 minuty při 10 000 ot/min.
- Nakonec byla odebrána Omni DNA Mini kolonka a 1,5 ml Eppendorfova zkumavka byla uzavřena a uschována.

4.5.5 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA

- Koncentrace a čistota DNA izolované z probiotických bakterií byla měřena na přístroji NanoDrop 2000c.
- U metody fenolové extrakce DNA byla nukleová kyselina ředěna TE pufrem. Měření bylo prováděno oproti čistému TE pufru.
- U metody izolace DNA pomocí sady Omni Bacterial DNA Purification Kit byla nukleová kyselina ředěna EB pufrem. Měření bylo prováděno oproti čistému EB pufru.

- 2 µl roztoku obsahující DNA byly pipetovány na spektrofotometrickou kyvetou. Po uzavření kyvety byla změřena absorbance v rozsahu vlnových délek 220–330 nm.
- Z hodnoty A_{260} byla určena koncentrace DNA ve vzorku a z poměru hodnot A_{260}/A_{280} byla stanovena čistota izolované DNA.

4.5.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

- Komponenty PCR reakce byly před použitím rozmrazeny a centrifugovány.
- PCR směs byla namíchána v laminárním boxu, který byl vysterilován UV zářením.
- Pořadí a složení jednotlivých komponentů je uvedené níže (viz. Tabulka 2)

Tabulka 2 Objemy jednotlivých komponentů potřebné k přípravě PCR směsi

Pořadí	Komponenty	Objem [µl]
1.	Voda pro PCR	9,5
2.	qPCR 2x SYTO-9 Master Mix	12,5
3.	Primer 1 (10 pmol/µl)	1,0
4.	Primer 1 (10 pmol/µl)	1,0
5.	Matrice DNA	1,0
Celkem		25,0

- PCR směs byla připravena do Eppendorfovy zkumavky určené pro PCR.
- Do zkumavky bylo pipetováno 24 µl PCR směsi a 1 µl DNA matrice. Zároveň byla připravena negativní a pozitivní kontrola.
- Negativní kontrola byla připravena z 24 µl PCR směsi a 1 µl vody pro PCR.
- Pozitivní kontrola byla připravena z 24 µl PCR směsi a 1 µl příslušného druhu bakterie.
- Amplifikace DNA byla provedena v zařízeních LightCycler Nano System a Termocyklér Rotor-Gene 6000, ve kterých byl nastaven teplotní program podle užitých primerů (viz. Tabulka 3, Tabulka 4, Tabulka 5 a Tabulka 6).

Tabulka 3 Seznam použitých primerů

Specifita	Primer	Sekvence primeru 5' až 3'	Zdroj
<i>Lacticaseibacillus casei</i>	F_case R_case	CTATAAGTAAGCTTTGATCCGGAGATTT CTTCCTGCGGGTACGAGATGT	[71]
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	Bulgaricus_F Bulgaricus_R	ACGCAAGTCTGATGGAGCAA ACGCATTACACCGCTACACA	[72]
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Helveticus_F Helveticus_R	CTACTTCGCAGGCGTAACT GTTACTTGATGCTCGCATAACC	[73]
<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	LcCr_F LcL_R	TGCTTGCACCAATTTGAAGAG GTTGAGCCACTGCCTTTTAC	[74]
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	LcL_F LcL_R	GTTGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTA GTTGAGCCACTGCCTTTTAC	[74]

Specifita	Primer	Sekvence primeru 5' až 3'	Zdroj
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	Adk_F3	GCGATCTCAACCGGAGAC	[75]
	Adk_R3	GACTTGTAGGCGTCGAGCAG	
<i>Streptococcus thermophilus</i>	ThI	ACGGAATGTACTTGAGTTTC	[76]
	ThII	TGGCCTTTCGACCTAAC	

Tabulka 4 Teplotní program pro *Lacticaseibacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* a *Propionibacterium freudenreichii*

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	300	-
Denaturace	95	30	30
Hybridizace	55	30	30
Elongace	72	30	30
Dosyntetizování	72	420	-

Tabulka 5 Teplotní program pro *Streptococcus thermophilus*

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	300	-
Denaturace	95	60	30
Hybridizace	58	60	30
Elongace	72	60	30
Dosyntetizování	72	300	-

Tabulka 6 Teplotní program pro *Lactococcus lactis subsp. cremoris* a *Lactococcus lactis subsp. lactis*

Krok	Teplota [°C]	Čas [s]	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	180	-
Denaturace	95	20	30
Hybridizace	66	20	30
Elongace	72	30	30
Dosyntetizování	72	300	-

4.5.7 Gelová elektroforéza genomové DNA

- Nejdříve byl připraven 0,8% agarózový gel smícháním 0,8 g agarózy a 100 ml 0,5 x TBE pufru.
- Směs byla v mikrovlnné troubě zahřívána a přiváděna k opakovanému varu, aby došlo k dokonalému rozpuštění.

- Po vychladnutí na přibližně 50–60 °C byly do suspenze přidány 3 µl interkalačního barviva PS Green.
- Po promíchání byla suspenze nalita do připravené vaničky s hřebínkem.
- Po zatuhnutí gelu, které probíhalo za laboratorní teploty po dobu přibližně 30 minut, byl vyjmut hřebínek.
- K 15 µl DNA vzorku bylo přidáno 5 µl nanášecího pufru LD Green.
- Následně bylo do vzniklých jamek pipetováno 5 µl DNA standardu (100 bp), po 20 µl směsi DNA vzorku a nanášecího pufru, 20 µl směsi negativní kontroly a nanášecího a nakonec směsi 20 µl pozitivní kontroly a nanášecího pufru.
- Gel byl umístěn do elektroforetické vaničky a poté byl přelit roztokem 0,5 x TBE pufrem do výšky přibližně 1 cm nad okraj gelu.
- Po připojení ke zdroji bylo nastaveno konstantní napětí na 70 V a doba elektroforézy na 1,5 h.
- Po skončení elektroforézy byl gel opatrně vyjmut a vložen do detekčního zařízení Azure biosystems C200, kde byl gel zkoumán pod UV zářením. Výsledky byly zdokumentovány.

5 VÝSLEDKY

5.1 Příprava hrubých lyzátů a izolace bakteriální DNA

V práci bylo využito čtyř druhů sýrů: eidam, gouda, ementál a čedar. Ze všech vzorků byly podle kapitoly 4.5.1 připraveny hrubé lyzáty, ze kterých byla pomocí fenolové extrakce a sady Omni Bacterial DNA Purification Kit izolována bakteriální DNA (viz. kapitoly 4.5.2, 4.5.3 a 4.5.4).

5.2 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Absorbance izolované DNA z analyzovaných vzorků byla změřena spektrofotometricky na přístroji NanoDrop 2000c. Měření bylo provedeno v rozmezí vlnových délek 230–280 nm.

Tabulka 7 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z eidamu

Číslo vzorku	Způsob izolace	c [ng·μl ⁻¹]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1.	Fenolová extrakce	40,4	1,48	0,76
2.	Fenolová extrakce	31,7	1,60	1,39
3.	Fenolová extrakce	45,4	1,48	1,19
4.	Fenolová extrakce	47,9	1,26	0,81
5.	Fenolová extrakce	30,8	1,57	0,49
6.	Fenolová extrakce	35,2	1,41	0,58
7.	Komerční kit	16,1	2,10	1,64
8.	Komerční kit	29,5	1,95	1,75
9.	Komerční kit	18,1	2,01	1,54

Tabulka 8 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z goudy

Číslo vzorku	Způsob izolace	c [ng·μl ⁻¹]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1.	Fenolová extrakce	51,3	1,67	1,29
2.	Fenolová extrakce	53,2	1,80	1,77
3.	Fenolová extrakce	52,4	1,54	1,64
4.	Fenolová extrakce	48,9	1,85	1,83
5.	Fenolová extrakce	44,5	1,52	1,24
6.	Fenolová extrakce	48,7	1,47	1,61
7.	Komerční kit	11,3	2,11	1,32
8.	Komerční kit	7,8	2,05	1,28
9.	Komerční kit	9,9	1,97	1,41

Tabulka 9 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z ementálu

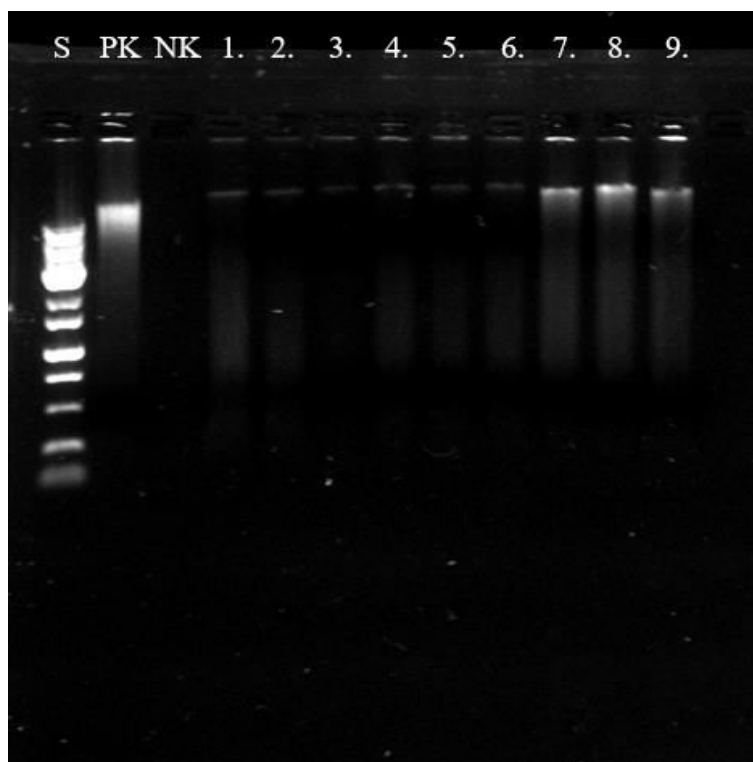
Číslo vzorku	Způsob izolace	c [ng·μl ⁻¹]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1.	Fenolová extrakce	100,9	1,87	1,09
2.	Fenolová extrakce	91,4	1,71	1,64
3.	Fenolová extrakce	71,8	1,86	1,19
4.	Fenolová extrakce	61,4	1,85	1,66
5.	Fenolová extrakce	101,2	1,85	1,75
6.	Fenolová extrakce	73,1	1,80	1,00
7.	Komerční kit	26,4	2,15	1,19
8.	Komerční kit	33,6	2,13	1,02
9.	Komerční kit	28,7	2,06	1,07

Tabulka 10 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty DNA izolované z čedaru

Číslo vzorku	Způsob izolace	c [ng·μl ⁻¹]	A ₂₆₀ /A ₂₈₀	A ₂₆₀ /A ₂₃₀
1.	Fenolová extrakce	427,0	2,09	1,88
2.	Fenolová extrakce	489,4	1,98	1,96
3.	Fenolová extrakce	466,5	2,03	1,75
4.	Fenolová extrakce	469,9	1,98	1,82
5.	Fenolová extrakce	263,5	2,03	1,69
6.	Fenolová extrakce	268,3	1,98	1,71
7.	Komerční kit	25,4	1,91	1,16
8.	Komerční kit	19,2	1,88	1,21
9.	Komerční kit	22,6	2,03	1,08

5.3 Gelová elektroforéza genomové DNA

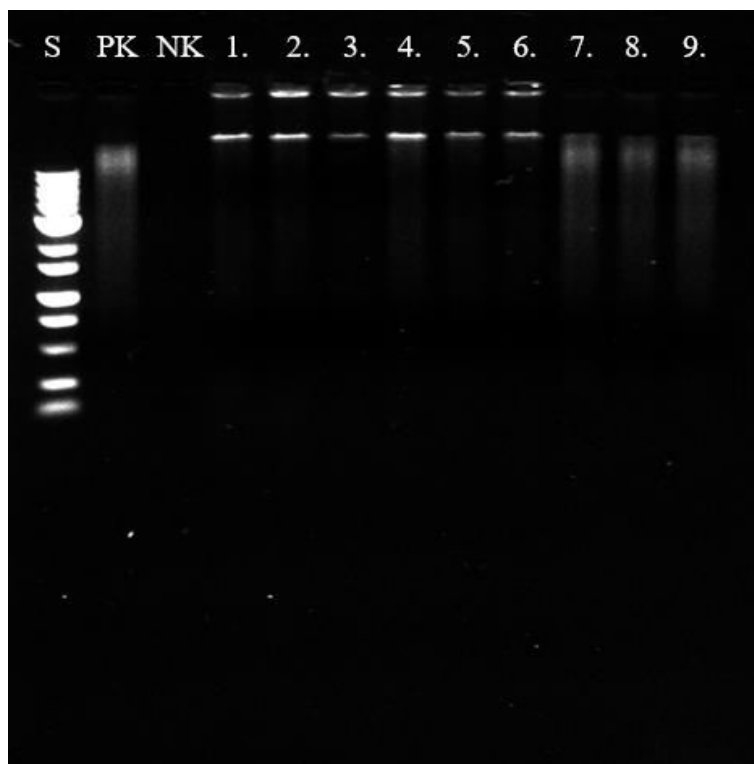
Přítomnost genomové DNA v jednotlivých vzorcích sýrů byla ověřena pomocí gelové elektroforézy. Pozitivní kontrola byla tvořena bakteriálním druhem *Lacticaseibacillus casei*. Negativní kontrola byla připravena z destilované vody. Na následujících obrázcích jsou znázorněny detekované produkty.



Obrázek 10 Gelová elektroforéza izolované DNA z eidamu

Tabulka 11 Výsledky gelové elektroforézy izolované DNA z eidamu

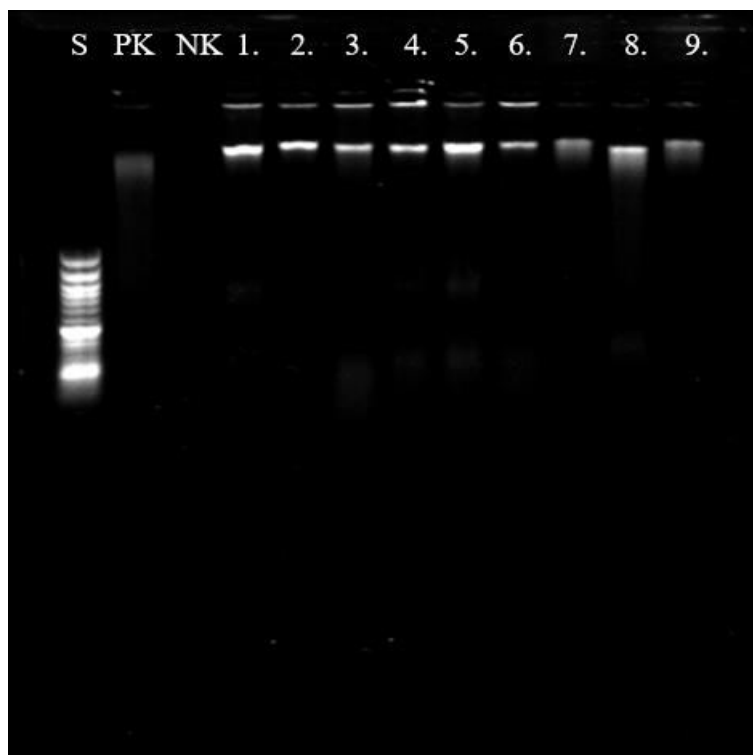
Značka/číslo vzorku	Název/způsob izolace	Detekce produktu
S	DNA standard	
PK	Pozitivní kontrola	+
NK	Negativní kontrola	-
1.	Fenolová extrakce	+
2.	Fenolová extrakce	+
3.	Fenolová extrakce	+
4.	Fenolová extrakce	+
5.	Fenolová extrakce	+
6.	Fenolová extrakce	+
7.	Komerční kit	+
8.	Komerční kit	+
9.	Komerční kit	+



Obrázek 11 Gelová elektroforéza izolované DNA z goudy

Tabulka 12 Výsledky gelové elektroforézy izolované DNA z goudy

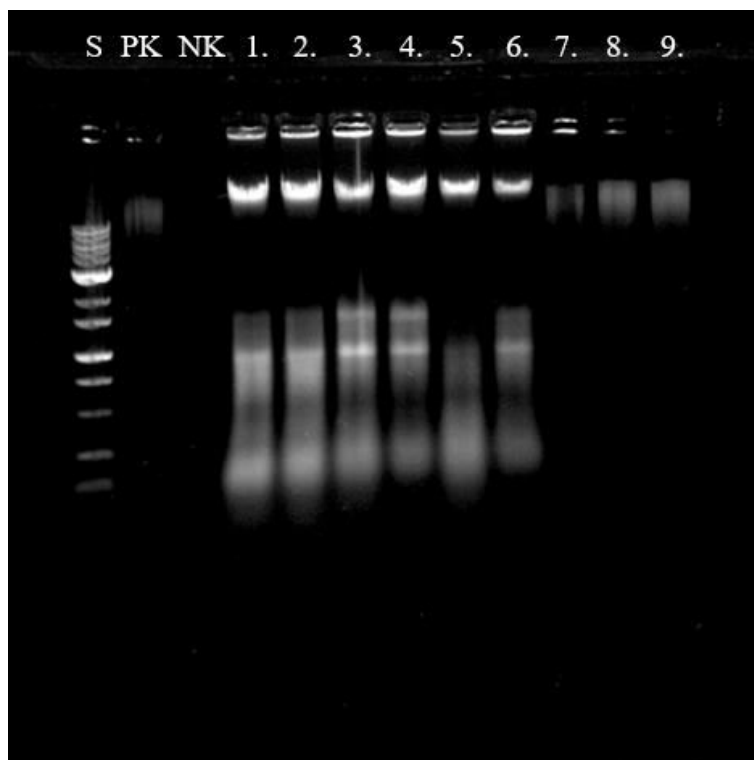
Značka/číslo vzorku	Název/způsob izolace	Detekce produktu
S	DNA standard	
PK	Pozitivní kontrola	+
NK	Negativní kontrola	-
1.	Fenolová extrakce	+
2.	Fenolová extrakce	+
3.	Fenolová extrakce	+
4.	Fenolová extrakce	+
5.	Fenolová extrakce	+
6.	Fenolová extrakce	+
7.	Komerční kit	+
8.	Komerční kit	+
9.	Komerční kit	+



Obrázek 12 Gelová elektroforéza izolované DNA z ementálu

Tabulka 13 Výsledky gelové elektroforézy izolované DNA z ementálu

Značka/číslo vzorku	Název/způsob izolace	Detekce produktu
S	DNA standard	
PK	Pozitivní kontrola	+
NK	Negativní kontrola	-
1.	Fenolová extrakce	+
2.	Fenolová extrakce	+
3.	Fenolová extrakce	+
4.	Fenolová extrakce	+
5.	Fenolová extrakce	+
6.	Fenolová extrakce	+
7.	Komerční kit	+
8.	Komerční kit	+
9.	Komerční kit	+



Obrázek 13 Gelová elektroforéza izolované DNA z čedaru

Tabulka 14 Výsledky gelové elektroforézy izolované DNA z čedaru

Značka/číslo vzorku	Název/způsob izolace	Detekce produktu
S	DNA standard	
PK	Pozitivní kontrola	+
NK	Negativní kontrola	-
1.	Fenolová extrakce	+
2.	Fenolová extrakce	+
3.	Fenolová extrakce	+
4.	Fenolová extrakce	+
5.	Fenolová extrakce	+
6.	Fenolová extrakce	+
7.	Komerční kit	+
8.	Komerční kit	+
9.	Komerční kit	+

5.4 Výběr vzorků pro práci s real-time PCR a HRM

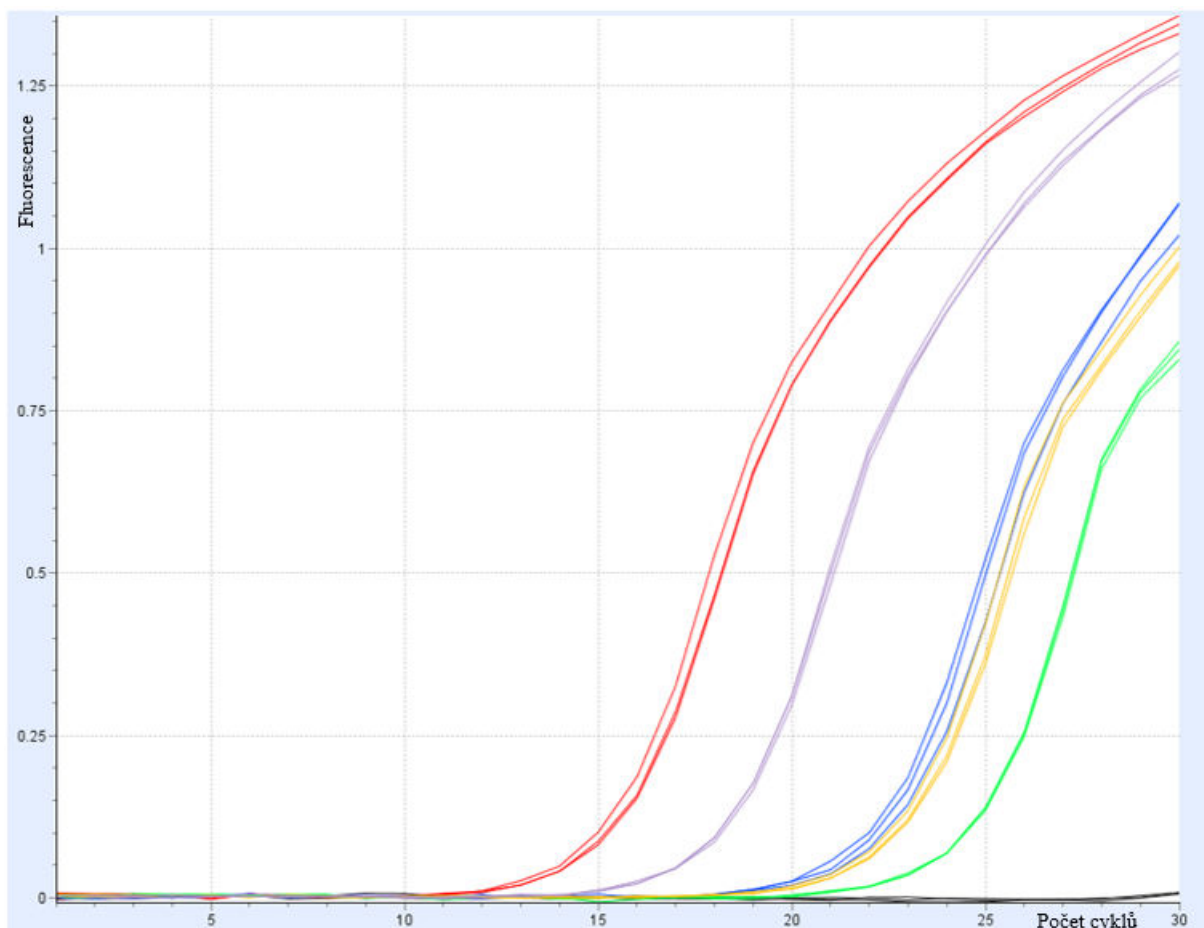
Ze všech vzorků izolované DNA byl u každého druhu sýru vybrán jeden vzorek, který nejlépe splňoval kritéria vysoké koncentrace a vysoké čistoty. Vybrané vzorky byly podrobeny real-time PCR a HRM.

Tabulka 15 Vybrané vzorky, se kterými bylo pracováno v další části práce.

Druh sýru	Číslo vzorku
Eidam	8.
Gouda	4.
Ementál	5.
Čedar	2.

5.5 Real-time PCR a HRM analýza křivek tání pro druh *Lacticaseibacillus casei*

U vybraných vzorků byla provedena real-time PCR s následnou analýzou křivek tání s primery specifickými pro druh *Lacticaseibacillus casei* (F_{case} a R_{case}). Pro analýzu byla použita DNA izolována ze sýrů eidam, gouda, ementál a čedar. Jako pozitivní kontrola byl použit bakteriální druh *Lacticaseibacillus casei* CCM 7088 . Výsledné amplifikační křivky a křivky tání vzorků znázorňuje Obrázek 14 a Obrázek 15.

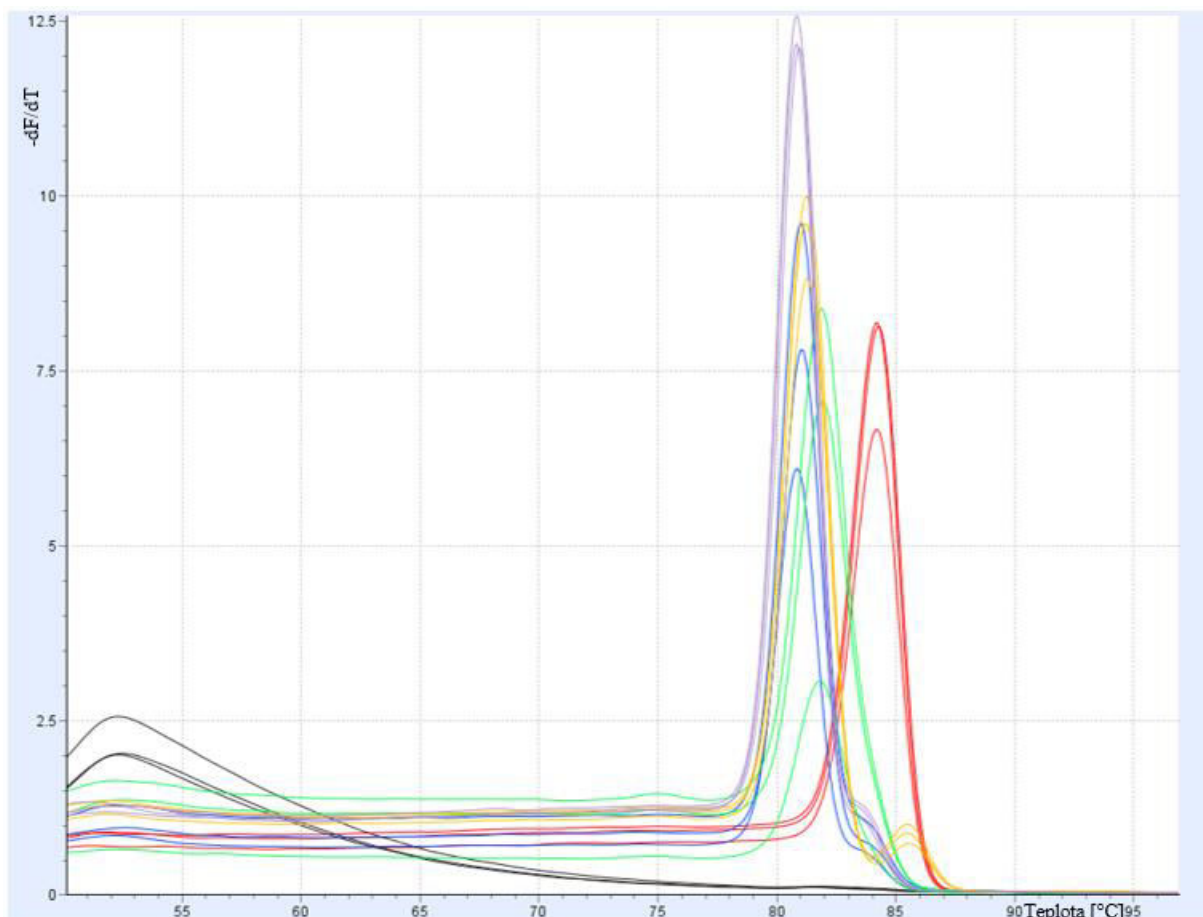


Značení křivek: červená – PK (*Lacticaseibacillus casei*), černá – NK, fialová – eidam, modrá – gouda, oranžová – ementál, zelená – čedar

Obrázek 14 Amplifikační křivka real-time PCR s primery specifickými pro druh *Lacticaseibacillus casei*

Tabulka 16 Zaznamenané hodnoty prahových cyklů

Typ vzorku	C _t	C _t	C _t	ΔC _t
PK	14,2	14,5	14,5	14,40
NK	-	-	-	-
Eidam	21,7	22,0	21,9	21,89
Gouda	21,2	21,4	21,6	21,40
Ementál	17,3	17,4	17,3	17,33
Čedar	23,7	23,7	23,7	23,70



Značení křivek: červená – PK (*Lacticaseibacillus casei*), černá – NK, fialová – eidam, modrá – gouda, oranžová – ementál, zelená – čedar

Obrázek 15 HRM analýza produktů real-time PCR s primery specifickými pro druh *Lacticaseibacillus casei*

Pomocí real-time PCR byly u všech vzorků kromě negativní kontroly zjištěny hodnoty prahových cyklů (c_t). Údaje shrnuje Tabulka 16. Využitím HRM produktů PCR byly opět u všech produktů kromě negativní kontroly detekovány peaky určující teplotu tání (T_m). Údaje shrnuje Tabulka 17.

Tabulka 17 Zaznamenané hodnoty teplot tání

Typ vzorku	T_m [°C]
PK	84,0
NK	-
Eidam	81,0
Gouda	81,0
Ementál	81,5
Čedar	81,5

5.6 Real-time PCR a HRM analýza křivek tání pro druh *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

U vybraných vzorků byla provedena real-time PCR s následnou analýzou křivek tání s primery specifickými pro druh *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* (Bulgaricus_F a Bulgaricus_R). Pro analýzu byla použita DNA izolována ze sýrů eidam, gouda, ementál a čedar. Jako pozitivní kontrola byl použit bakteriální druh *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CCM 7190. Výsledné amplifikační křivky a křivky tání vzorků znázorňuje Obrázek 16 a Obrázek 17.

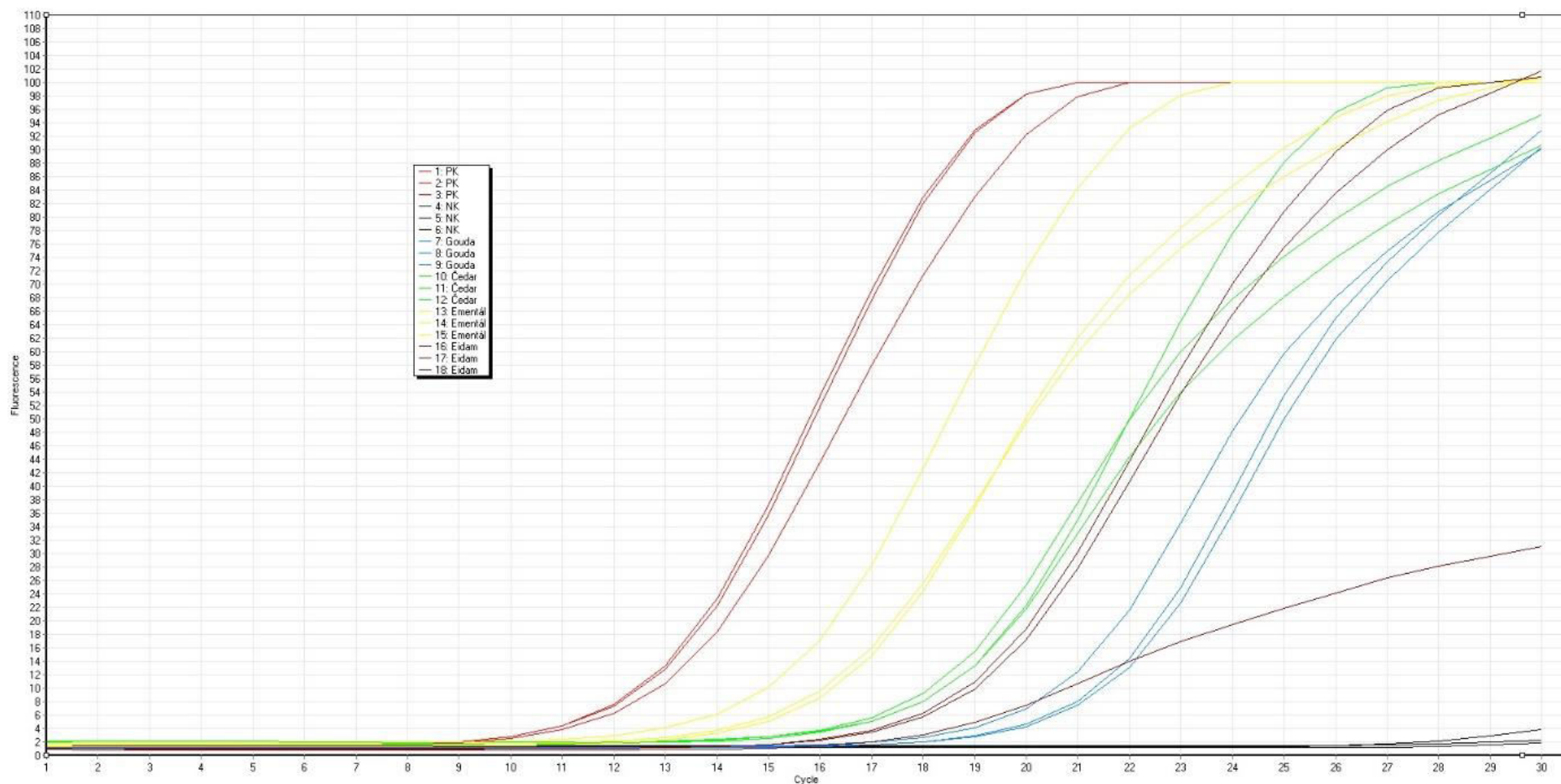
Tabulka 18 Zaznamenané hodnoty prahových cyklů

Typ vzorku	C _t	C _t	C _t	ΔC _t
PK	11,2	11,2	11,4	11,27
NK	-	-	-	-
Eidam	17,2	17,3	18,2	17,57
Gouda	19,1	19,8	19,7	19,53
Ementál	13,1	14,0	14,0	13,70
Čedar	16,3	16,2	16,3	16,27

Pomocí real-time PCR byly u všech vzorků kromě negativní kontroly zjištěny hodnoty prahových cyklů (c_t). Údaje shrnuje Tabulka 18 Tabulka 16. Využitím HRM produktů PCR byly opět u všech produktů kromě negativní kontroly detekovány peaky určující teplotu tání (T_m). Údaje shrnuje Tabulka 19.

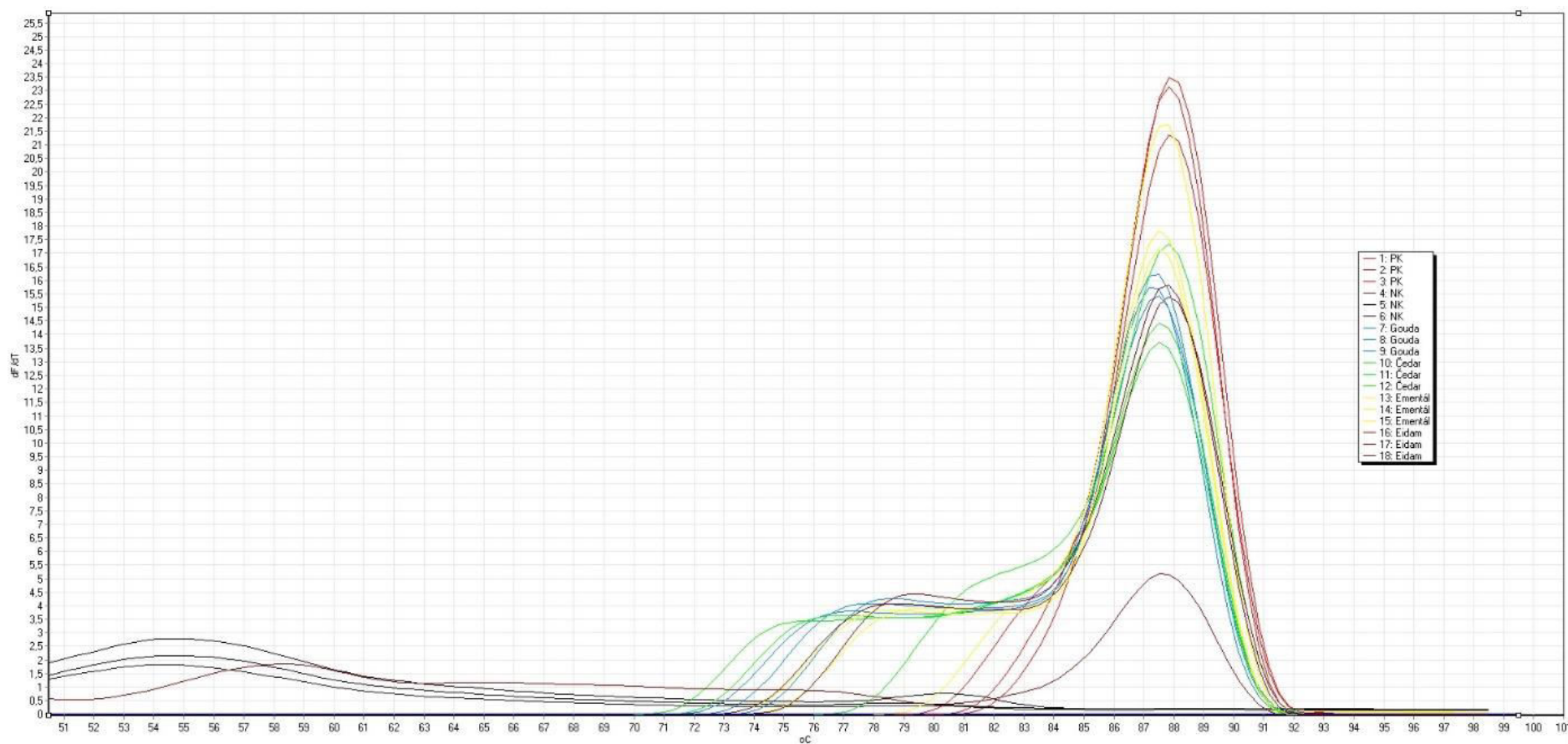
Tabulka 19 Zaznamenané hodnoty teplot tání

Typ vzorku	T _m [°C]
PK	88,0
NK	-
Eidam	87,5
Gouda	87,5
Ementál	87,5
Čedar	87,5



Značení křivek: červená – PK (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*), černá – NK, hnědá – eidam, modrá – gouda, žlutá – ementál, zelená – čedar

Obrázek 16 Amplifikační křivka real-time PCR s primery specifickými pro druh *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

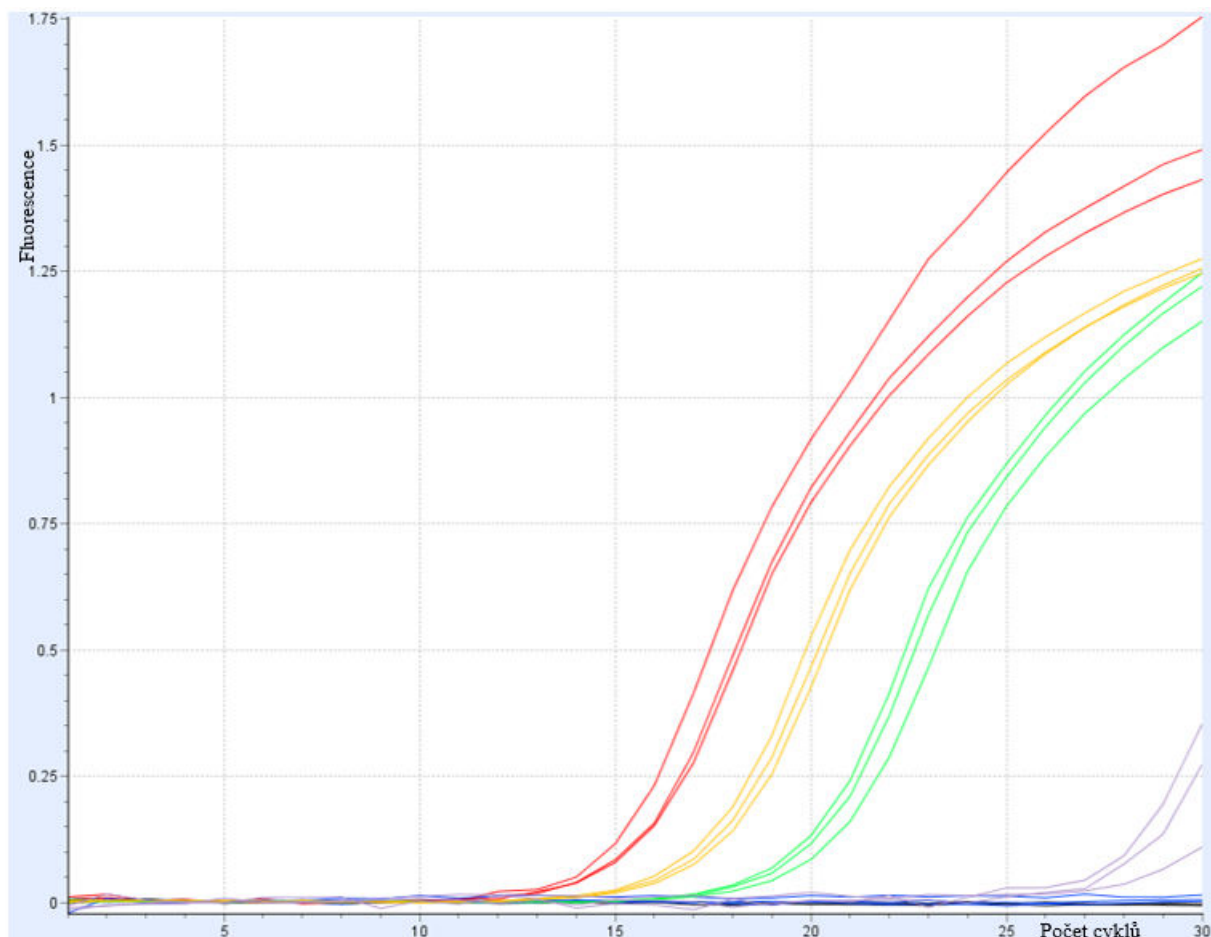


Značení křivek: červená – PK (*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*), černá – NK, hnědá – eidam, modrá – gouda, žlutá – ementál, zelená – čedar

Obrázek 17 HRM analýza produktů real-time PCR s primery specifickými pro druh *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

5.7 Real-time PCR a HRM analýza křivek tání pro druh *Lactobacillus helveticus*

U vybraných vzorků byla provedena real-time PCR s následnou analýzou křivek tání s primery specifickými pro druh *Lactobacillus helveticus* (Helveticus_F a Helveticus_R). Pro analýzu byla použita DNA izolována ze sýrů eidam, gouda, ementál a čedar. Jako pozitivní kontrola byl použit bakteriální druh *Lactobacillus helveticus* CCDM 1017. Výsledné amplifikační křivky a křivky tání vzorků znázorňuje Obrázek 18 a Obrázek 19.

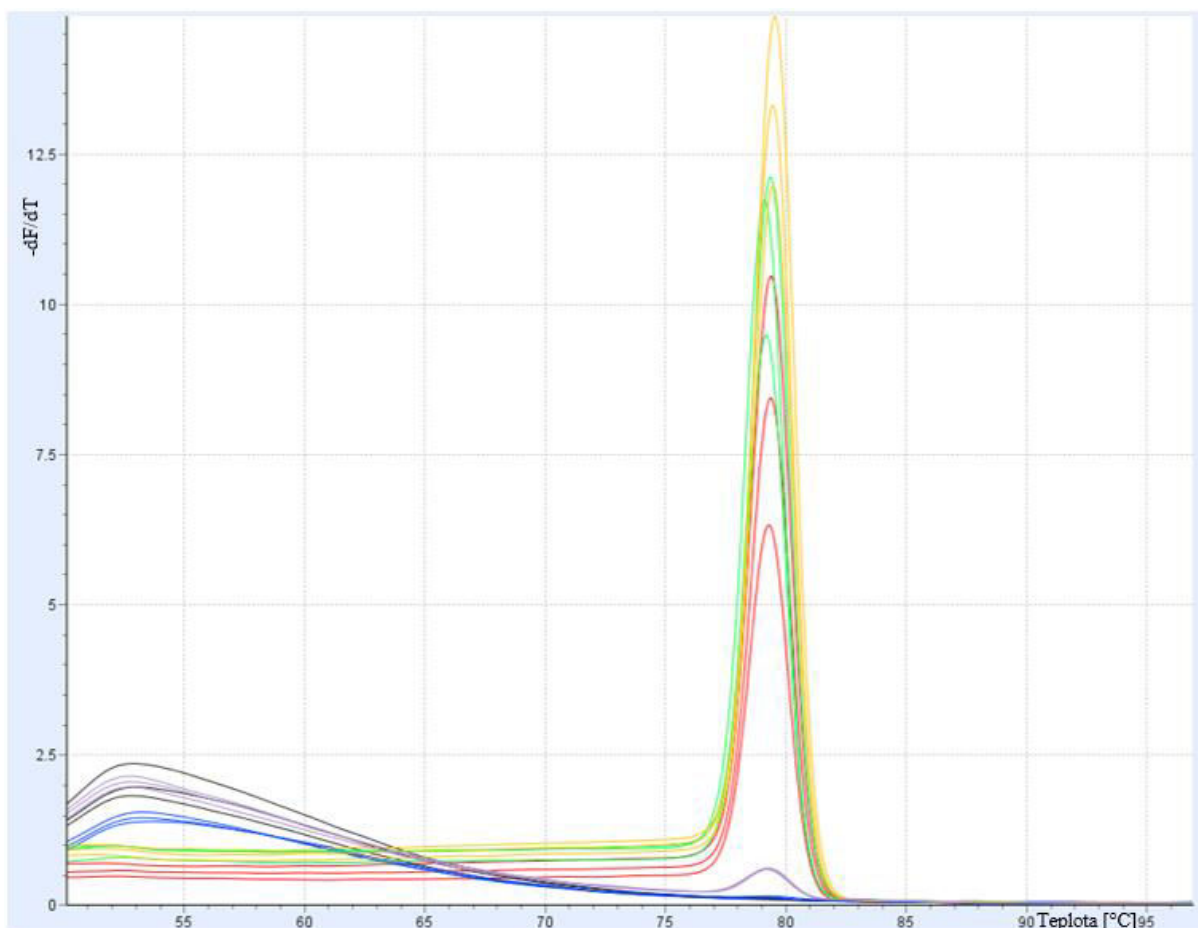


Značení křivek: červená – PK (*Lactobacillus helveticus* CCDM 1017), černá – NK, fialová – eidam, modrá – gouda, oranžová – ementál, zelená – čedar

Obrázek 18 Amplifikační křivka real-time PCR s primery specifickými pro druh *Lactobacillus helveticus*

Tabulka 20 Zaznamenané hodnoty prahových cyklů

Typ vzorku	C _t	C _t	C _t	ΔC _t
PK	13,9	14,4	14,5	14,27
NK	-	-	-	-
Eidam	-	27,7	27,2	27,45
Gouda	-	-	-	-
Ementál	16,7	16,2	16,5	16,47
Čedar	18,8	19,0	19,4	19,07



Značení křivek: červená – PK (*Lactobacillus helveticus* CCDM 1017), černá – NK, fialová – eidam, modrá – gouda, oranžová – ementál, zelená – čedar

Obrázek 19 HRM analýza produktů real-time PCR s primery specifickými pro druh *Lactobacillus helveticus*

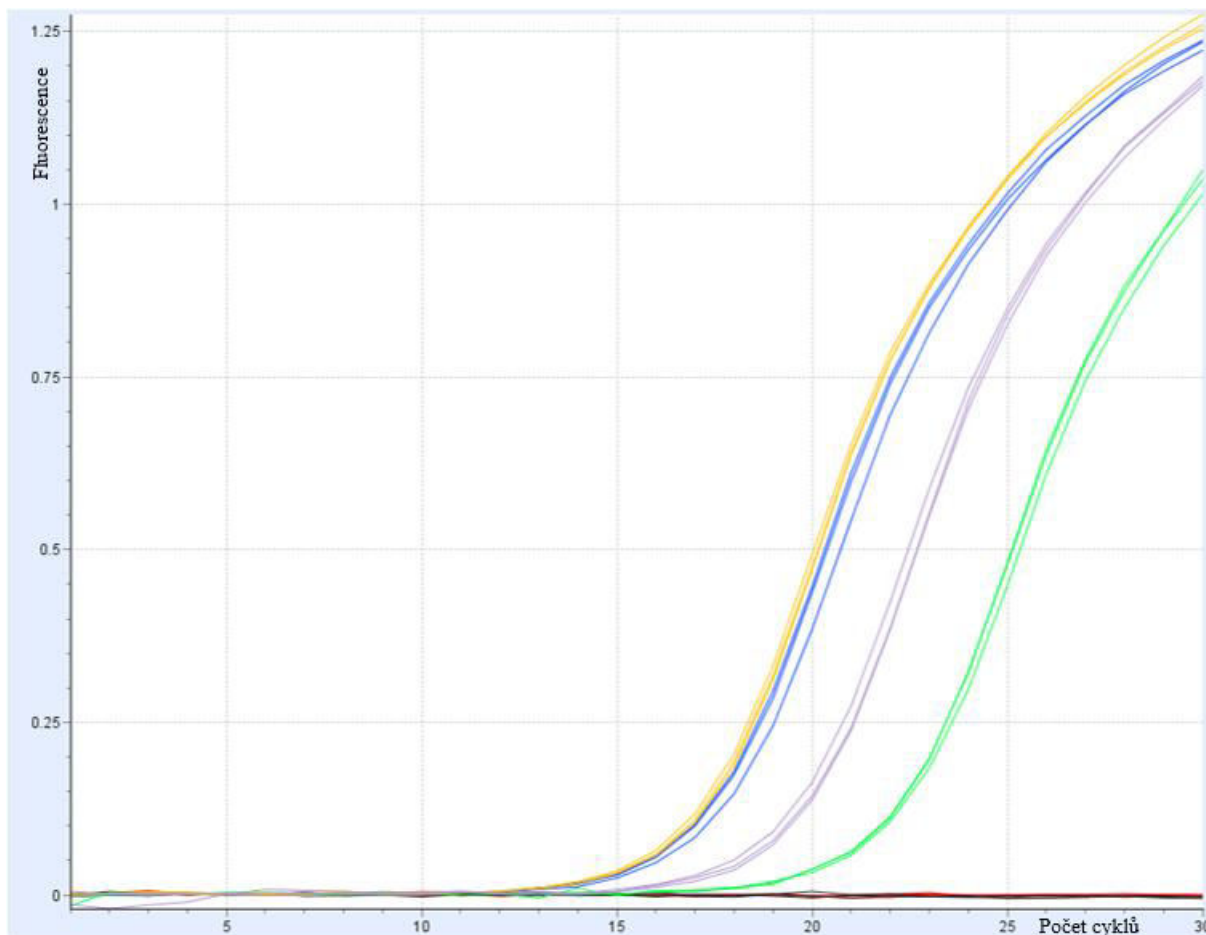
Pomocí real-time PCR byly u všech vzorků kromě negativní kontroly a goudy zjištěny hodnoty prahových cyklů (c_t). Údaje shrnuje Tabulka 20. Využitím HRM produktů PCR byly opět u všech vzorků kromě negativní kontroly a goudy detekovány peaky určující teplotu tání (T_m). Údaje shrnuje Tabulka 21.

Tabulka 21 Zaznamenané hodnoty teplot tání

Typ vzorku	T_m [°C]
PK	79,5
NK	-
Eidam	79,5
Gouda	-
Ementál	79,5
Čedar	79,0

5.8 Real-time PCR a HRM analýza křivek tání pro druh *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

U vybraných vzorků byla provedena real-time PCR s následnou analýzou křivek tání s primery specifickými pro druh *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (LcCr_F a LcL_R). Pro analýzu byla použita DNA izolována ze sýrů eidam, gouda, ementál a čedar. Jako pozitivní kontrola byl použit bakteriální druh *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004. Výsledné amplifikační křivky a křivky tání vzorků znázorňuje Obrázek 20 a Obrázek 21.

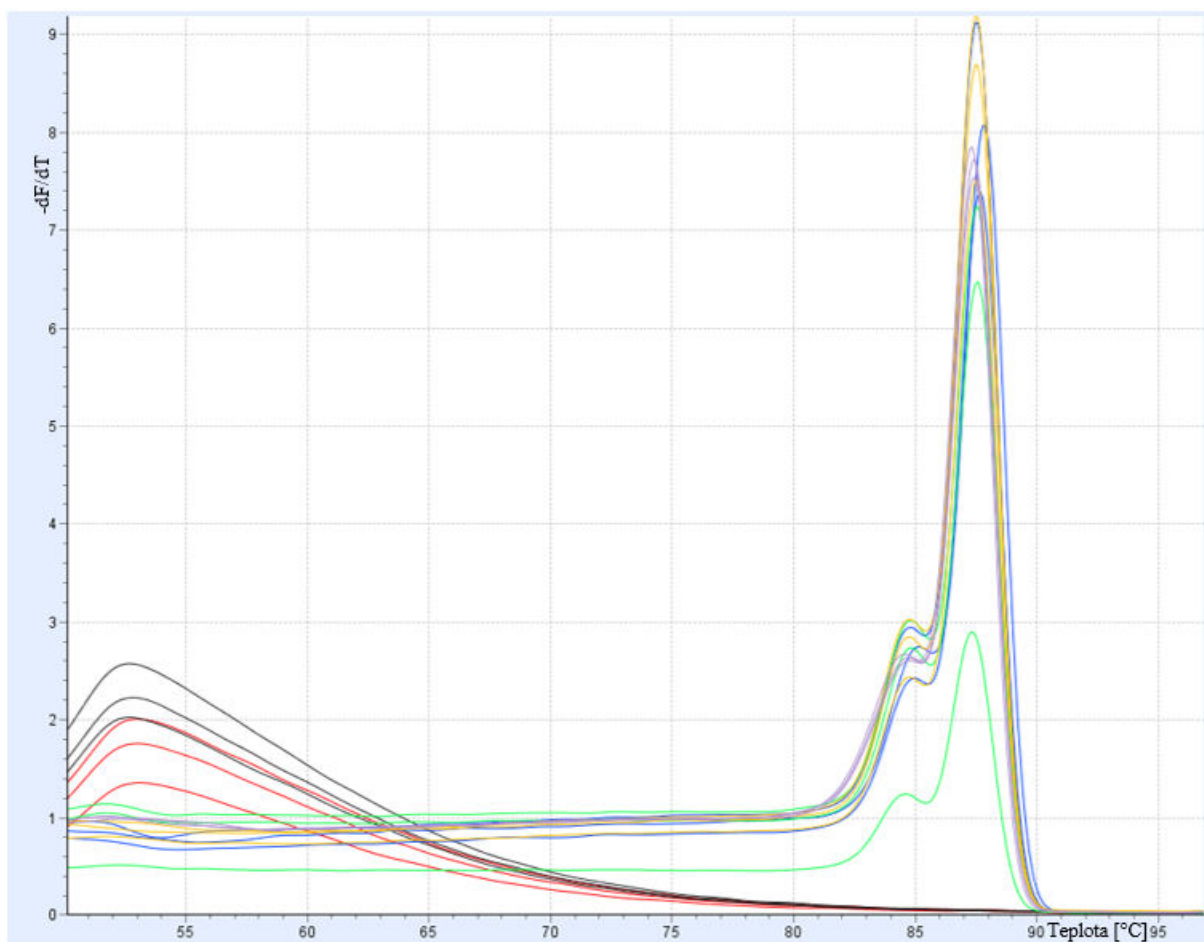


Značení křivek: červená – PK (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004), černá – NK, fialová – eidam, modrá – gouda, oranžová – ementál, zelená – čedar

Obrázek 20 Amplifikační křivka real-time PCR s primery specifickými pro druh *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

Tabulka 22 Zaznamenané hodnoty prahových cyklů

Typ vzorku	C _t	C _t	C _t	ΔC _t
PK	-	-	-	-
NK	-	-	-	-
Eidam	18,7	18,8	18,5	18,67
Gouda	16,7	16,3	16,4	16,47
Ementál	16,1	16,2	16,2	16,17
Čedar	21,2	21,3	21,1	21,20



Značení křivek: červená – PK (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* CCDM 1004), černá – NK, fialová – eidam, modrá – gouda, oranžová – ementál, zelená – čedar

Obrázek 21 HRM analýza produktů real-time PCR s primery specifickými pro druh *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

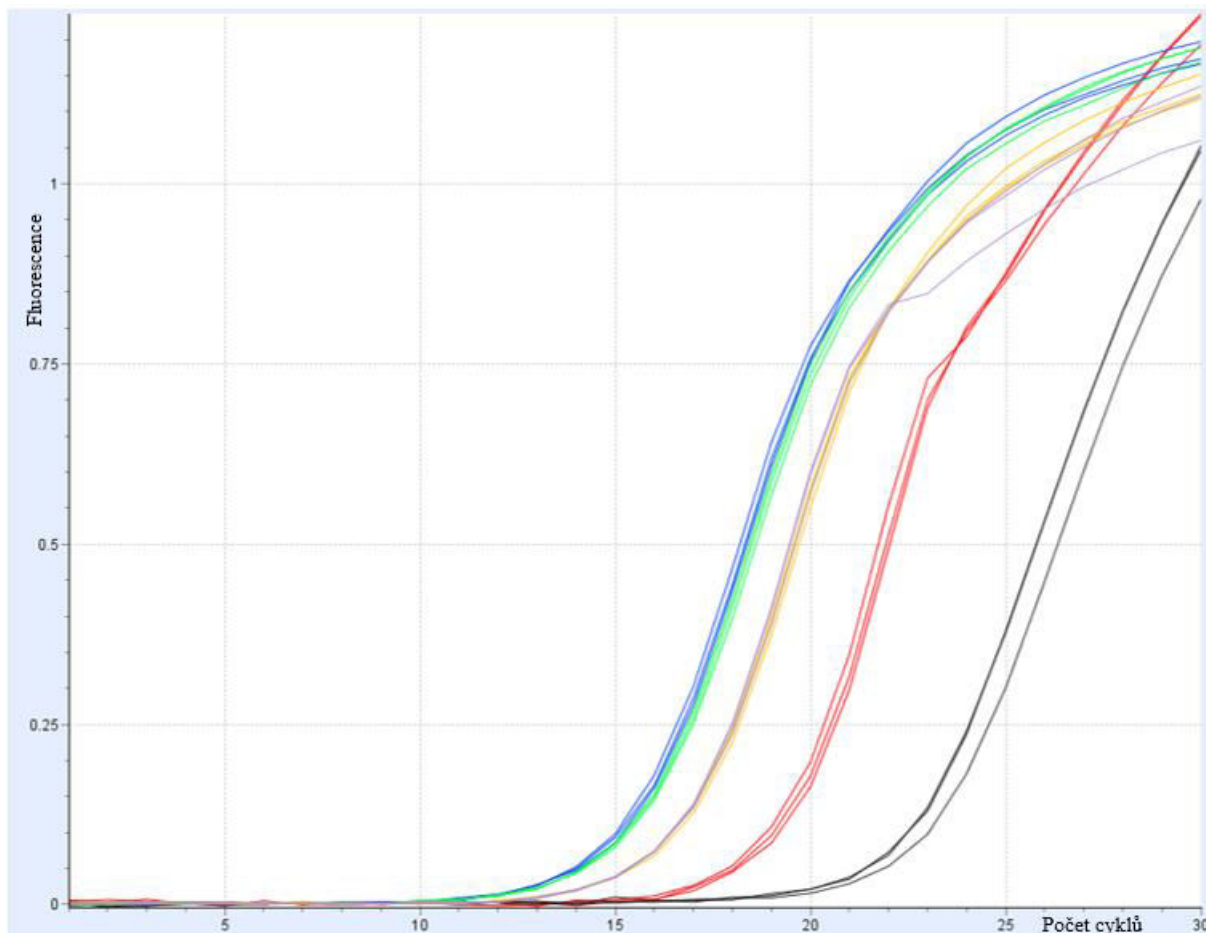
Pomocí real-time PCR byly u všech vzorků kromě negativní a pozitivní kontroly zjištěny hodnoty prahových cyklů (c). Údaje shrnuje Tabulka 22. Využitím HRM produktů PCR byly opět u všech vzorků kromě negativní a pozitivní kontroly detekovány peaky určující teplotu tání (T_m). Údaje shrnuje Tabulka 23.

Tabulka 23 Zaznamenané hodnoty teplot tání

Typ vzorku	T_m [°C]
PK	-
NK	-
Eidam	87,5
Gouda	87,5
Ementál	87,5
Čedar	87,5

5.9 Real-time PCR a HRM analýza křivek tání pro druh *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

U vybraných vzorků byla provedena real-time PCR s následnou analýzou křivek tání s primery specifickými pro druh *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (LeL_F a LeL_R). Pro analýzu byla použita DNA izolována ze sýrů eidam, gouda, ementál a čedar. Jako pozitivní kontrola byl použit bakteriální druh *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1007. Výsledné amplifikační křivky a křivky tání vzorků znázorňuje Obrázek 22 a Obrázek 23.

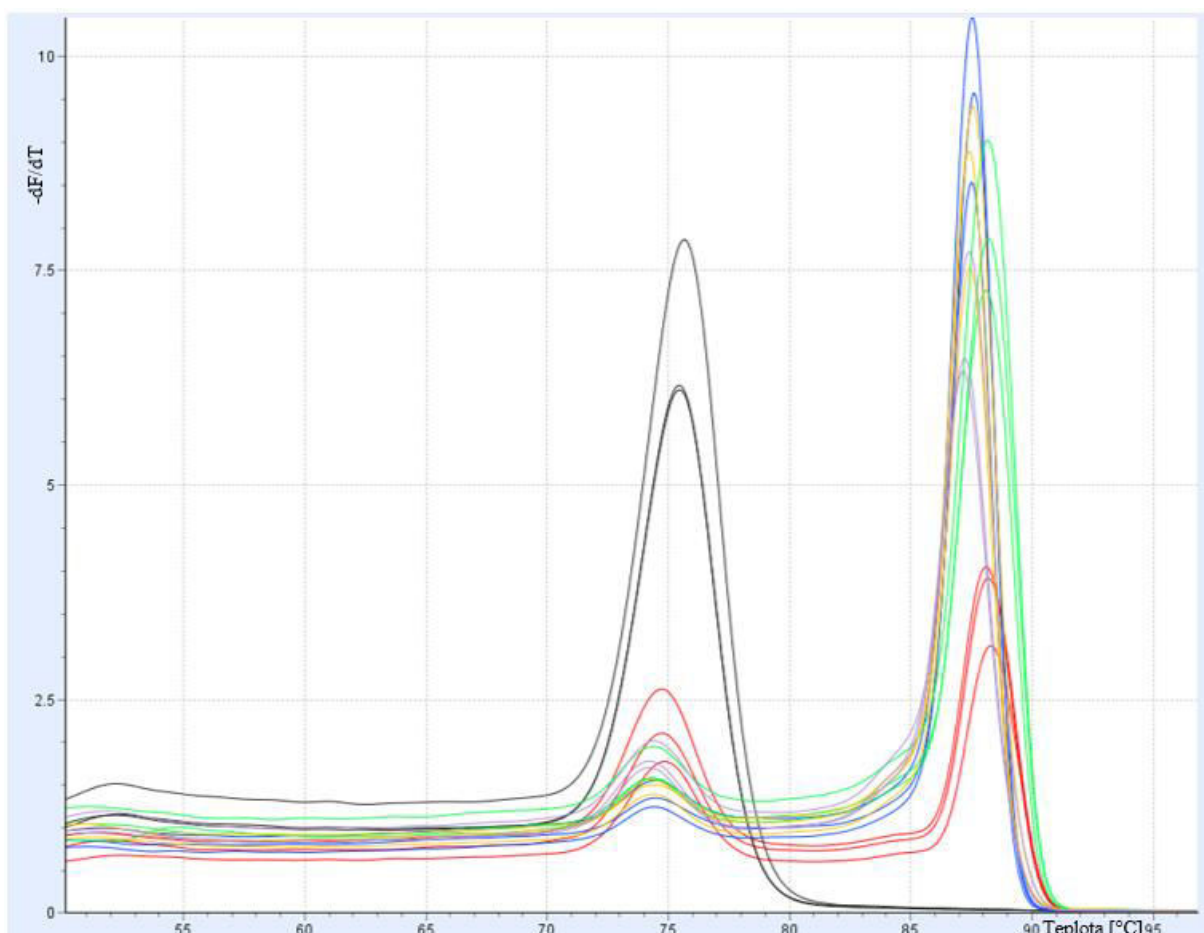


Značení křivek: červená – PK (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1007), černá – NK, fialová – eidam, modrá – gouda, oranžová – ementál, zelená – čedar

Obrázek 22 Amplifikační křivka real-time PCR s primery specifickými pro druh *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Tabulka 24 Zaznamenané hodnoty prahových cyklů

Typ vzorku	C_t	C_t	C_t	ΔC_t
PK	18,4	18,3	18,1	18,27
NK	21,8	22,3	21,8	21,97
Eidam	15,7	15,7	15,8	
Gouda	14,5	14,4	14,3	
Ementál	15,9	15,8	15,8	
Čedar	14,7	14,6	14,6	



Značení křivek: červená – PK (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCDM 1007), černá – NK, fialová – eidam, modrá – gouda, oranžová – ementál, zelená – čedar

Obrázek 23 HRM analýza produktů real-time PCR s primery specifickými pro druh *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

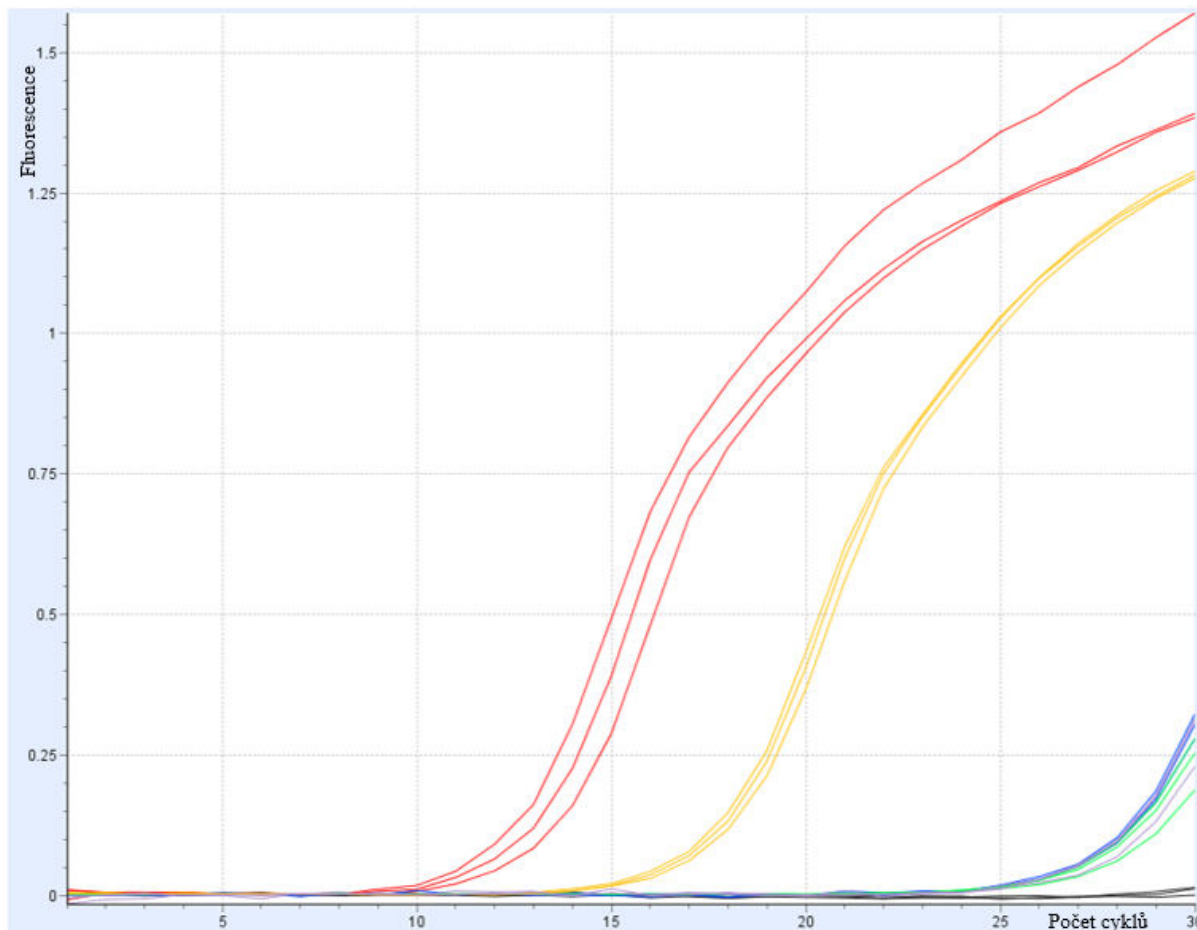
Pomocí real-time PCR byly u všech vzorků kromě negativní a pozitivní kontroly zjištěny hodnoty prahových cyklů (c_t). Údaje shrnuje Tabulka 24. Využitím HRM produktů PCR byly opět u všech vzorků kromě negativní a pozitivní kontroly detekovány peaky určující teplotu tání (T_m). Údaje shrnuje Tabulka 25.

Tabulka 25 Zaznamenané hodnoty teplot tání

Typ vzorku	T_m [°C]	T_m [°C]
PK	75,0	88,0
NK	75,5	-
Eidam	75,0	87,5
Gouda	75,0	87,5
Ementál	75,0	87,5
Čedar	75,0	88,0

5.10 Real-time PCR a HRM analýza křivek tání pro druh *Propionibacterium freudenreichii*

U vybraných vzorků byla provedena real-time PCR s následnou analýzou křivek tání s primery specifickými pro druh *Propionibacterium freudenreichii* (Adk_F3 a Adk_R3). Pro analýzu byla použita DNA izolována ze sýrů eidam, gouda, ementál a čedar. Jako pozitivní kontrola byl použit bakteriální druh *Propionibacterium freudenreichii* CCDM 1009. Výsledné amplifikační křivky a křivky tání vzorků znázorňuje Obrázek 24 a Obrázek 25.

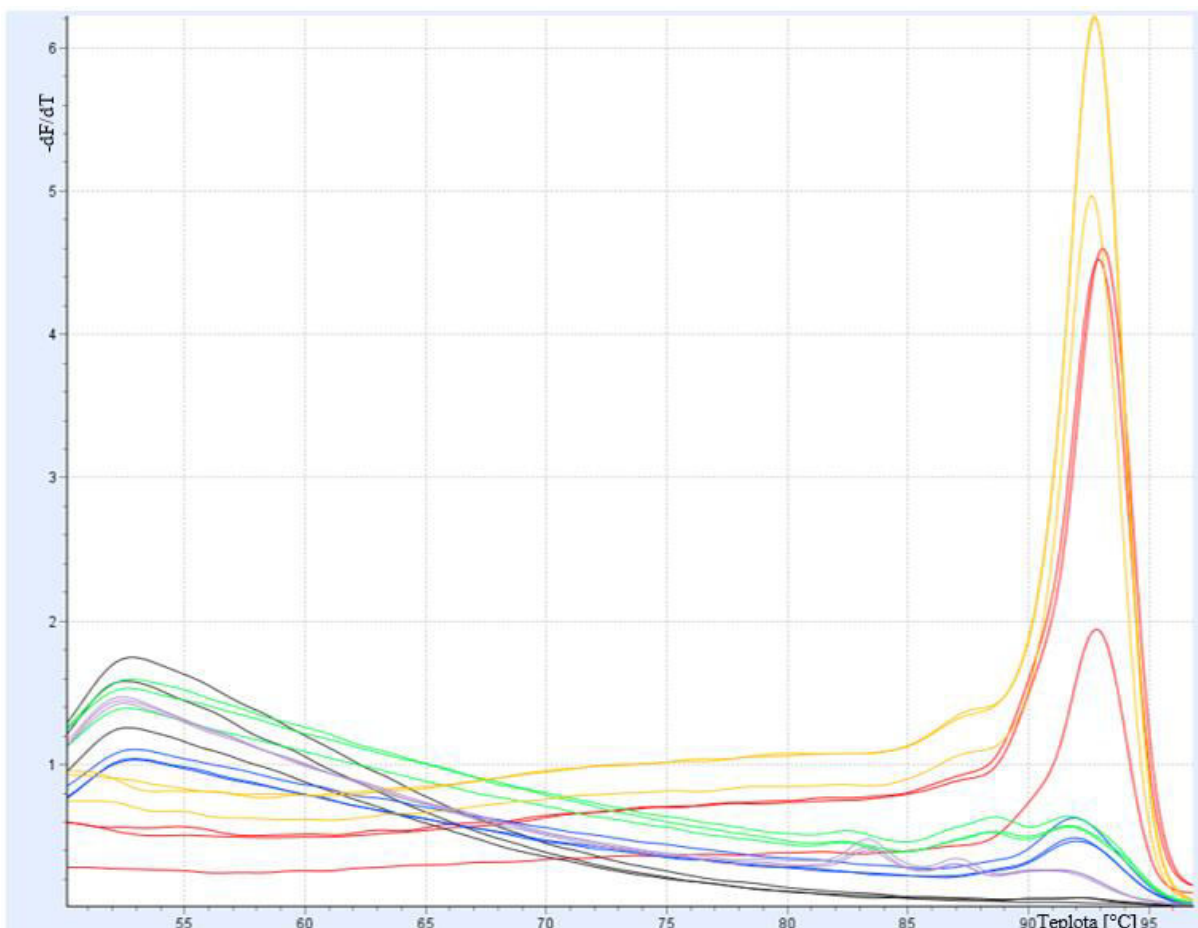


Značení křivek: červená – PK (*Propionibacterium freudenreichii* CCDM 1009), černá – NK, fialová – eidam, modrá – gouda, oranžová – ementál, zelená – čedar

Obrázek 24 Amplifikační křivka real-time PCR s primery specifickými pro druh *Propionibacterium freudenreichii*

Tabulka 26 Zaznamenané hodnoty prahových cyklů

Typ vzorku	C _t	C _t	C _t	ΔC _t
PK	12,4	11,9	11,4	11,90
NK	-	-	-	-
Eidam	27,3	27,9	27,3	27,50
Gouda	27,4	27,3	27,5	27,40
Ementál	17,0	16,6	16,8	16,80
Čedar	28,2	27,7	27,5	27,80



Značení křivek: červená – PK (*Propionibacterium freudenreichii* CCDM 1009), černá – NK, fialová – eidam, modrá – gouda, oranžová – ementál, zelená – čedar

Obrázek 25 HRM analýza produktů real-time PCR s primery specifickými pro druh *Propionibacterium freudenreichii*

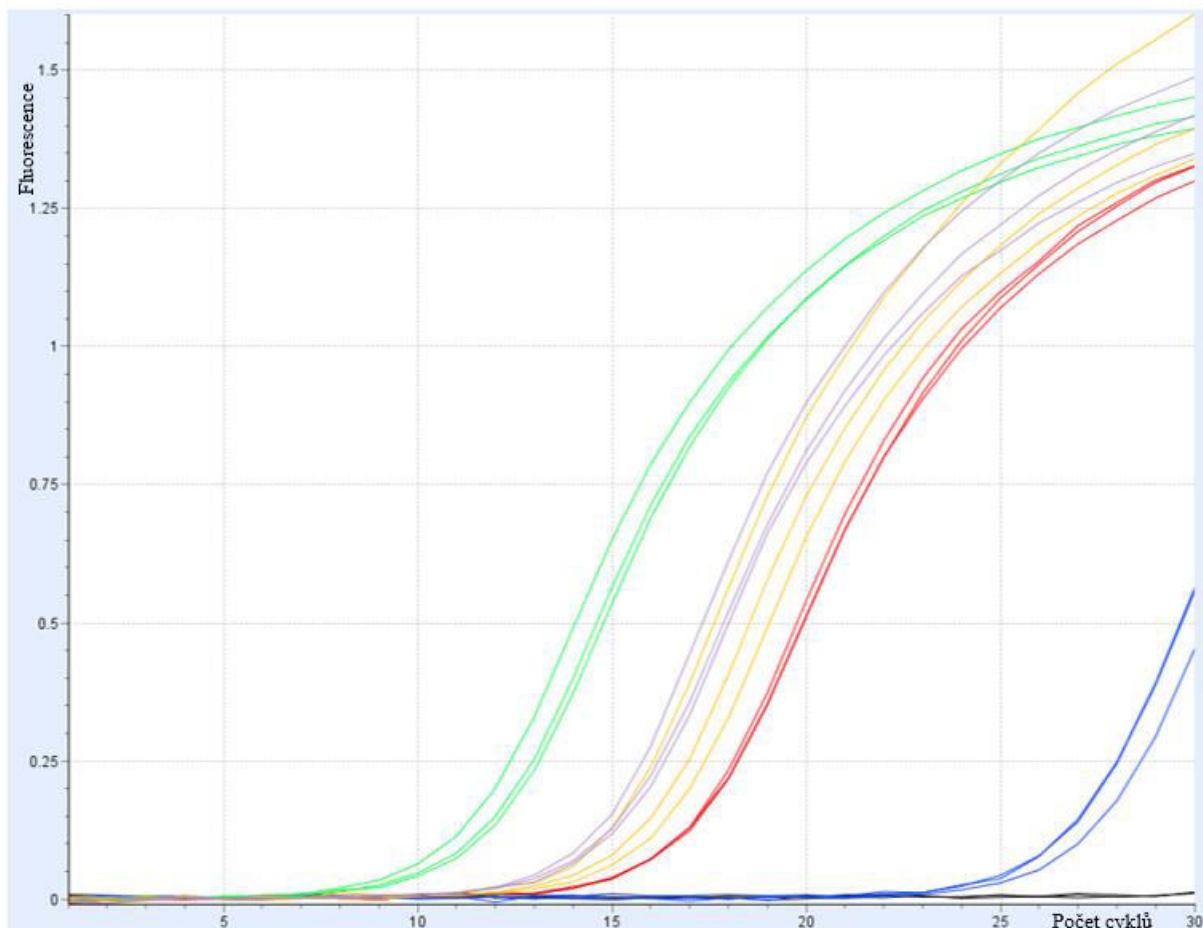
Pomocí real-time PCR byly u všech vzorků kromě negativní kontroly zjištěny hodnoty prahových cyklů (c_t). Údaje shrnuje Tabulka 26. Využitím HRM produktů PCR byly pouze u pozitivní kontroly a ementálu detekovány peaky určující teplotu tání (T_m). Údaje shrnuje Tabulka 27.

Tabulka 27 Zaznamenané hodnoty teplot tání

Typ vzorku	T_m [°C]
PK	93,0
NK	-
Eidam	-
Gouda	-
Ementál	93,0
Čedar	-

5.11 Real-time PCR a HRM analýza křivek tání pro druh *Streptococcus thermophilus*

U vybraných vzorků byla provedena real-time PCR s následnou analýzou křivek tání s primery specifickými pro druh *Streptococcus thermophilus* (ThI a ThII). Pro analýzu byla použita DNA izolovaná ze sýrů eidam, gouda, ementál a čedar. Jako pozitivní kontrola byl použit bakteriální druh *Streptococcus thermophilus* CCDM 1008. Výsledné amplifikační křivky a křivky tání vzorků znázorňuje Obrázek 26 a Obrázek 27.

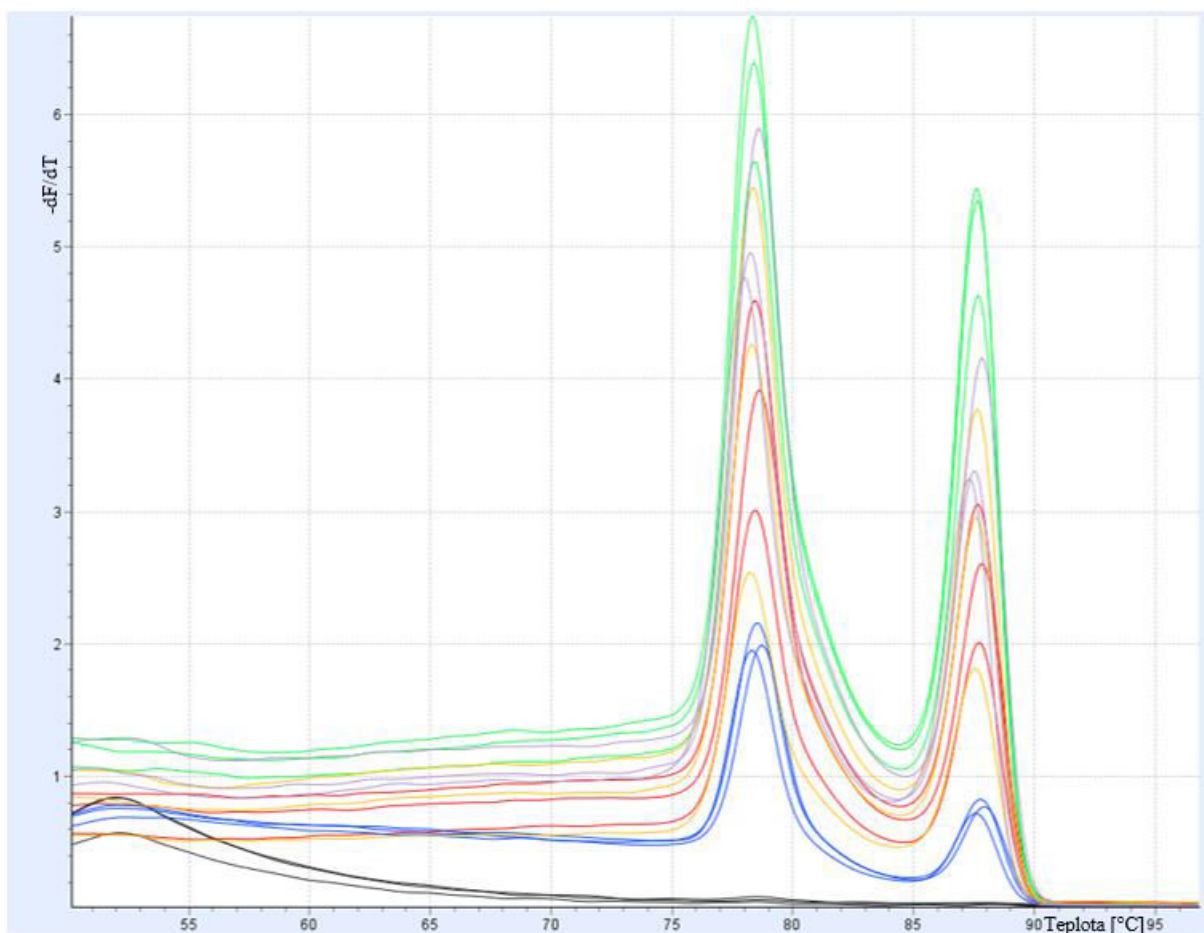


Značení křivek: červená – PK (*Streptococcus thermophilus* CCDM 1008), černá – NK, fialová – eidam, modrá – gouda, oranžová – ementál, zelená – čedar

Obrázek 26 Amplifikační křivka real-time PCR s primery specifickými pro druh *Streptococcus thermophilus*

Tabulka 28 Zaznamenané hodnoty prahových cyklů

Typ vzorku	C_t	C_t	C_t	ΔC_t
PK	12,4	11,9	11,4	11,90
NK	-	-	-	-
Eidam	27,3	27,9	27,3	27,50
Gouda	27,4	27,3	27,5	27,40
Ementál	17,0	16,6	16,8	16,80
Čedar	28,2	27,7	27,5	27,80



Značení křivek: červená – PK (*Streptococcus thermophilus* CCDM 1008), černá – NK, fialová – eidam, modrá – gouda, oranžová – ementál, zelená – čedar

Obrázek 27 HRM analýza produktů real-time PCR s primery specifickými pro druh *Streptococcus thermophilus*

Pomocí real-time PCR byly u všech vzorků kromě negativní kontroly zjištěny hodnoty prahových cyklů (c_t). Údaje shrnuje Tabulka 28. Využitím HRM produktů PCR byly opět u všech produktů kromě negativní kontroly detekovány peaky určující teplotu tání (T_m). Údaje shrnuje Tabulka 29.

Tabulka 29 Zaznamenané hodnoty teplot tání

Typ vzorku	T_m [°C]	T_m [°C]
PK	78,5	87,5
NK	-	-
Eidam	78,5	87,5
Gouda	78,5	87,5
Ementál	78,5	87,5
Čedar	78,5	87,5

5.12 Seznam analyzovaných bakteriálních druhů v jednotlivých druzích sýrů

Tabulka 30 Seznam analyzovaných bakteriálních druhů v jednotlivých druzích sýrů

Bakteriální druh	Eidam	Gouda	Ementál	Čedar
<i>Lacticaseibacillus casei</i>	+	+	+	+
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	+	+	+	+
<i>Lactobacillus helveticus</i>	+	-	+	+
<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	+*	+*	+*	+*
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	+	+	+	+
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	-	-	+	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	+	+	+	+

* Není možné potvrdit z důvodu nedostatečné amplifikace pozitivní kontroly.

6 DISKUZE

6.1 Koncentrace a čistota DNA izolované ze sýrů

Z komerčně dostupných sýrů (eidam, gouda, ementál a čedar) byla provedena izolace DNA fenolovou extrakcí a také využitím sady Omni Bacterial DNA Purification Kit.

Ze sýrů byly připraveny hrubé lyzáty a následnou fenolovou extrakcí byla izolována bakteriální DNA. Výhodou této metody je schopnost poskytnout velké množství DNA o vysoké čistotě. Její nevýhoda však spočívá v časové náročnosti a použití toxických chemikálií [63]. Po fenolové extrakci byla DNA vysrážena ethanolem a rozpuštěna ve 100 μl TE pufru.

Sada Omni Bacterial DNA Purification Kit je komerčně dostupná sada pro izolaci DNA z bakteriálních vzorků. Tato metoda je rychlejší a jednodušší než fenolová extrakce, což usnadňuje proces izolace DNA. Nevýhodou může být nižší výtěžnost DNA [64]. Bakteriální DNA izolována touto metodou byla rozpuštěna ve 100 μl EB pufru.

Pomocí přístroje NanoDrop 2000c byla měřena absorbance DNA izolované ze sýrů v rozmezí vlnových délek 230–330 nm. Z absorbance při vlnové délce 260 nm byla přístrojem určena koncentrace DNA.

Z výsledků, které shrnují Tabulka 7 je patrné, že použití různých metod izolace DNA může mít vliv na koncentraci izolované DNA. U všech druhů sýrů bylo zjištěno, že izolací pomocí fenolové extrakce se získá DNA o vyšší koncentraci než v případě využití sady Omni Bacterial DNA Purification Kit. DNA o nejvyšších koncentracích, které se pohybovaly v rozmezí 263,5–489,4 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$, byla izolována z čedaru pomocí fenolové extrakce. Naopak nejnižší koncentrace byly naměřeny u vzorků z goudy izolovaných pomocí komerčního kitu, kde se koncentrace pohybovaly v rozmezí 7,8–11,3 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Rozdíly mezi fenolovou extrakcí a komerčním kitem byly nejvýraznější u vzorků z čedaru a goudy.

Pokud porovnáme výsledky izolace DNA u jednotlivých sýrů, lze konstatovat, že nejvyšší koncentrace DNA byla získána z čedaru, kdy bylo dosaženo hodnot přes 260 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Nejnižší koncentrace DNA byla zjištěna u eidamu, kde se hodnoty pohybovaly okolo 31–48 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Tyto výsledky mohou být ovlivněny množstvím buněk a DNA v jednotlivých sýrech.

Na základě poměrů hodnot absorbancí A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} byla vyhodnocena míra čistoty izolované DNA. Tyto ukazatele slouží jako míra přítomnosti kontaminantů v izolované DNA. Pokud je poměr hodnot absorbancí A_{260}/A_{280} větší než hodnota 1,8, předpokládá se, že vzorek neobsahuje výrazné množství proteinů. Pokud je poměr hodnot absorbancí A_{260}/A_{230} nižší než hodnota 1,8, jsou vzorky kontaminovány fenolem [77]. Výsledky ukazují, že většina vzorků izolovaných fenolovou extrakcí vykazovala nižší poměr A_{260}/A_{280} než vzorky izolované komerčním kitem (1,26–2,09 ku 1,88–2,15). Mohlo by se zdát, že metoda izolace DNA pomocí sady Omni Bacterial DNA Purification Kit vede k čistějším vzorkům, nicméně hodnoty A_{260}/A_{230} byly u vzorků izolovaných komerčním kitem v porovnání s fenolovou extrakcí často nižší. U vzorků izolovaných komerčním kitem z goudy, ementálu a čedaru dosahoval poměr absorbancí A_{260}/A_{230} hodnot v rozmezí 1,02–1,41, což naznačuje silnou kontaminaci fenolem nebo dalšími látkami, které absorbují při vlnové délce 230 nm [77]. Pouze vzorky izolované z eidamu vykazovaly hodnoty blízké se požadovanému poměru absorbancí $A_{260}/A_{230} > 1,8$ (1,54–1,75).

Z toho vyplývá, že metoda izolace DNA pomocí Omni Bacterial DNA Purification Kit vede k čistším vzorkům DNA co se týče kontaminace proteiny, avšak je náchylnější na kontaminaci

fenolem a polysacharidy, které absorbují světlo při 230 nm. Toto je jeden z důvodů proč byly pro další práci vybrány u třech ze čtyř druhů sýrů vzorky izolované fenolovou extrakcí. Vzorek č. 4 izolovaný z goudy měl jako jediný poměr hodnot absorbancí A_{260}/A_{280} a A_{260}/A_{230} vyšší než 1,8. Vzorek č. 5 izolovaný z ementálu je jediný, u kterého je možné konstatovat, že obsahuje pouze malé znečištění fenolem. Vzorky izolované z čedaru ve většině případech splňovaly podmínky čistoty, proto byl vzorek č. 2 vybrán na základě vysoké koncentrace. Pouze u vzorku izolovaného ze sýru eidam, byl vybrán vzorek č. 8, který byl izolován komerčním kitem. Všechny vzorky izolované fenolovou extrakcí vykazovaly velmi silnou kontaminaci fenolem.

6.2 Real-time PCR

Za účelem ověření přítomnosti bakteriální DNA ve vzorcích sýrů byla provedena real-time PCR s využitím primerů pro druhovou identifikaci. Konkrétně se jedná o druhy *Lacticaseibacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Propionibacterium freudenreichii* a *Streptococcus thermophilus*. DNA tří vzorků byla izolována fenolovou extrakcí a jeden vzorek byl izolován pomocí sady Omni Bacterial DNA Purification Kit. Specifické produkty PCR byly ověřeny pomocí vysokorozlišovací křivky tání.

6.2.1 Real-time PCR a HRM analýza specifická pro druh *Lacticaseibacillus casei*

Přítomnost DNA druhu *Lacticaseibacillus casei* byla ve vzorcích sýrů detekována pomocí real-time PCR. Díky grafu amplifikačních křivek byl u všech vzorků zjištěn cyklus, ve kterém je množství fluorescence daného vzorku detekovatelné. Jedná se o tzv. cyklus prahu (c_t). U pozitivní kontroly se c_t nacházel ve 14. cyklu a u jednotlivých vzorků sýrů mezi 17. až 23. cyklem. Přitom nejnižší hodnoty dosahoval u vzorku eidamu a nejvyšší naopak u vzorku z čedaru. Nejvyšší koncentrace *Lacticaseibacillus casei* byla tedy určena u eidamu.

HRM analýza potvrdila přítomnost druhu *Lacticaseibacillus casei* ve všech vzorcích sýrů. Vrchol křivky tání pozitivní kontroly se nacházel při $T_m = 84$ °C a teploty tání vzorků byly určeny při teplotách 81 °C a 81,5 °C. Rozdílné teploty tání mohou být způsobeny různou variabilitou v genetické informaci bakterie v sýrech a bakterie použité u pozitivní kontroly. Obdobně byla prokázána přítomnost DNA druhu *Lacticaseibacillus casei* i jinými autory [78].

6.2.2 Real-time PCR a HRM analýza specifická pro druh *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*

Pomocí real-time PCR byl ve vzorcích sýrů detekován bakteriální druh *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Cyklus prahu pozitivní kontroly byl překročen v 11. cyklu a u vzorků sýrů mezi 13. až 19. cyklem. Na základě hodnot c_t lze konstatovat, že nejvyšší koncentrace bakterie byla stanovena u ementálu a nejnižší u goudy.

Jako pozitivní kontrola byla použita bakterie *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* CCM 7190. Teplota tání pozitivní kontroly byla při 88 °C a všech vzorků sýrů při 87,5 °C. Negativní kontrola nebyla detekována. Na základě těchto informací byla ve všech analyzovaných sýrech potvrzena přítomnost bakterie *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. Podobným způsobem byla přítomnost DNA této bakterie potvrzena i v jiných studiích [78].

6.2.3 Real-time PCR a HRM analýza specifická pro druh *Lactobacillus helveticus*

Izolovaná DNA ze vzorků sýrů byla podrobena real-time PCR. U pozitivní kontroly byl cyklus prahu stanoven ve 14. cyklu, u vzorku ementálu v 16. cyklu, u vzorku čedaru v 19. cyklu a u vzorku eidamu ve 27. cyklu. Cyklus prahu nebyl detekován u vzorku z goudy a u negativní kontroly.

Teplota tání pozitivní kontroly byla stanovena při 79,5 °C. Stejná teplota byla stanovena také u vzorku ementálu a eidamu. U vzorku čedaru byla teplota tání určena při 79 °C. Negativní kontrola a ani vzorek goudy nebyly detekovány. Dosaženými výsledky byla potvrzena přítomnost bakterie *Lactobacillus helveticus* pouze u sýrů ementál, čedar a eidam. Podobně jako v jiných publikacích [79].

6.2.4 Real-time PCR a HRM analýza specifická pro druh *Lactococcus lactis subsp. cremoris*

Přítomnost DNA druhu *Lactococcus lactis subsp. cremoris* byla ve vzorcích detekována pomocí real-time PCR. Cyklus prahu vzorků sýrů byl stanoven v 16. až 21. cyklu. Avšak u pozitivní a negativní kontroly nebyl žádný prahový cyklus určen.

Využitím HRM analýzy byly teploty tání detekovány pouze u všech vzorků sýrů, konkrétně při 87,5 °C. U pozitivní a negativní kontroly nedošlo tvorbě peaku a tím pádem nebylo možné určitě teplotu tání. Z výsledků se zdá, že problém s nedostatečnou amplifikací pozitivní kontroly může být způsoben špatnou kvalitou šablony pozitivní kontroly. Dalším možným faktorem může být nesprávné uskladnění pozitivní kontroly, které by vedlo k jejímu poškození.

I když byl u všech analyzovaných vzorků sýrů určen cyklus prahu a teplota tání, není možné ve vzorcích z důvodu nedostatečné amplifikace pozitivní kontroly potvrdit přítomnost bakterie *Lactococcus lactis subsp. cremoris*.

6.2.5 Real-time PCR a HRM analýza specifická pro druh *Lactococcus lactis subsp. lactis*

K detekci přítomnosti bakterie *Lactococcus lactis subsp. lactis* ve vzorcích sýrů bylo použito real-time PCR. Výsledky ukazují, že u všech vzorků, včetně pozitivní i negativní kontroly byl detekován cyklus prahu. U dvou vzorků sýrů byl stanoven ve 14. cyklu a zbylých dvou v 15. cyklu. Cyklus prahu pozitivní a negativní kontroly se nacházel v 18. respektive 21. cyklu.

Následnou HRM analýzou byly určeny teploty tání. Všechny vzorky včetně pozitivní kontroly vykazovaly dva peaky a to při teplotách 87,5–88,0 °C a při 75 °C. Negativní kontrola tvořila peak pouze při 75,5 °C. Podrobnější analýzou nebylo potvrzeno, že by u negativní kontroly došlo k tvorbě produktů PCR. Naopak byla potvrzena tvorba nespecifických produktů primer-dimer. Podobně jako v jiných publikacích lze na základě získaných dat potvrdit přítomnost bakteriálního druhu *Lactococcus lactis subsp. lactis* ve všech analyzovaných vzorcích sýrů [79].

6.2.6 Real-time PCR a HRM analýza specifická pro druh *Propionibacterium freudenreichii*

Real-time PCR byla použita k detekci přítomnosti bakterie *Propionibacterium freudenreichii* ve čtyřech druzích sýrů. PCR byla provedena s použitím primerů specifických pro danou bakterii. Výsledky ukázaly, že c_t hodnota ementálu, kde se tato bakterie očekává, byla 16,8, zatímco u pozitivní kontroly byla 11,9. U goudy, čedaru a eidamu byl cyklus prahu stanoven ve 27. cyklu. Negativní kontrola nebyla detekována. Využitím HRM analýzy byly teploty tání detekovány pouze u pozitivní kontroly a ementálu. Gouda, čedar, eidam a negativní kontrola nevykazovaly žádný peak. Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že bakterie *Propionibacterium freudenreichii* byla detekována pouze v ementálu a v ostatních sýrech nebyla nalezena. Použitelnost těchto primerů byla potvrzena i v publikaci [75].

6.2.7 Real-time PCR a HRM analýza specifická pro druh *Streptococcus thermophilus*

Pomocí real-time PCR byl ve všech vzorcích sýrů zjištěn bakteriální druh *Streptococcus thermophilus*. Cyklus prahu byl u pozitivní kontroly detekován při 15. cyklu. U čedaru již při 10. cyklu a eidamu respektive ementálu při 13. a 14. cyklu. Vzorek goudy byl detekován při 25. cyklu, proto je možné tvrdit, že bakterie *Streptococcus thermophilus* byla nejméně koncentrována u vzorku goudy.

HRM analýza potvrdila přítomnost tohoto druhu ve všech vzorcích sýrů. Teploty tání byly identické u všech vzorků i pozitivní kontroly (87,5 °C). U všech vzorků byly detekovány další peaky při teplotě 78,5 °C. Negativní kontrola nevykazovala žádné peaky, proto je možné soudit, že nižší teplota je způsobena vznikem nespecifických produktů primer-dimer a vyšší teplota dokazuje přítomnost analyzované bakterie.

7 ZÁVĚR

Teoretická část práce se věnuje popsání pozitivních účinků probiotických bakterií na lidský organismus. Zároveň byla charakterizována výroba sýru se zaměřením na používané sýrové kultury. Dále byly uvedeny nejčastější metody izolace nukleových kyselin a metody stanovení její koncentrace a čistoty.

V experimentální části práce byla získána DNA ze čtyř druhů sýrů, goudy, čedaru, ementálu a eidamu. Izolace DNA byla provedena pomocí fenolové extrakce a sady Omni Bacterial DNA Purification Kit. Po spektrofotometrickém stanovení koncentrace a čistoty DNA byl u každého sýru vybrán jeden vzorek o nejvyšší kvalitě, který byl následně používán pro real-time PCR a HRM analýzu. Největších výtěžků DNA bylo dosaženo izolací fenolovou extrakcí. Z hlediska čistoty DNA bylo pro izolaci nejvhodnější použití fenolové extrakce. Pouze u jednoho ze čtyř vzorků sýrů nevykazovala izolace komerčním kitem vysoké znečištění fenolem.

Pro ověření izolované DNA byla použita real-time PCR s primery specifickými pro druhy *Lacticaseibacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Propionibacterium freudenreichii* a *Streptococcus thermophilus*. Bohužel v žádném z testovaných druhů sýrů se nepodařilo z důvodu nedostatečné amplifikace pozitivní kontroly potvrdit přítomnost bakterie *Lactococcus lactis subsp. cremoris*. Proto bylo možné stanovit u všech sýrů maximálně šest bakterií. Sýr ementál byl jediný, u kterého byla potvrzena přítomnost všech zkoumaných bakterií. U sýrů čedar a eidam bylo shodně analyzováno pět z šesti zkoumaných bakterií. Bakterie *Propionibacterium freudenreichii* nebyla kromě čedaru a eidamu prokázána také u goudy, u které také nebyla potvrzena přítomnost bakterie *Lactobacillus helveticus*.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] IANNITTI, Tommaso a B. PALMIERI. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clinical Nutrition*. 2010, **2010**(29), 701-725. Dostupné z: doi:10.1016/j.clnu.2010.05.004
- [2] KLABAN, Vladimír. Ilustrovaný mikrobiologický slovník. 1. vyd. Praha: Galén, 2005, 654 s. ISBN 80-726-2341-9.
- [3] MOGHADDAM, Omid Moradi. Probiotics in Critically Ill Patients. *Anesth Pain Med*. 2011, **2011**(1), 58-60. Dostupné z: doi:10.5812/kowsar.22287523.2291
- [4] CUNNINGHAM, Marla, AZCARATE-PERIL, M. Andrea, BARNARD, Alan, BENOIT, Valerie, GRIMALDI, Roberta, GUYONNET, Denis, HOLSCHER, Hannah D., HUNTER, Kirsty, MANURUNG, Sarmauli, OBIS, David, PETROVA, Mariya I., STEINERT, Robert E., SWANSON, Kelly S., VAN SINDEREN, Douwe, VULEVIC, Jelena a GIBSON, Glenn R., 2021. Shaping the Future of Probiotics and Prebiotics. *Trends in Microbiology*. srpen 2021. Vol. 29, no. 8, pp. 667–685. DOI 10.1016/j.tim.2021.01.003.
- [5] LYON, Louisa, 2018. ‘All disease begins in the gut’: was Hippocrates right? *Brain*. 1 března 2018. Vol. 141, no. 3, pp. e20. DOI 10.1093/brain/awy017.
- [6] GÖRNER, Fridrich a Ľubomír VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. 1. Bratislava: Malé centrum, 2004. ISBN 80-967064-9-7.
- [7] MUELLER, Noel T., DOMINGUEZ-BELLO, Maria Gloria, APPEL, Lawrence J. a HOURIGAN, Suchitra K., 2020. „Vaginal seeding” after a caesarean section provides benefits to newborn children: FOR: Does exposing caesarean-delivered newborns to the vaginal microbiome affect their chronic disease risk? The critical need for trials of „vaginal seeding” during caesarean section. *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology*. leden 2020. Vol. 127, no. 2, pp. 301. DOI 10.1111/1471-0528.15979.
- [8] SANDALL, Jane, TRIBE, Rachel M., AVERY, Lisa, MOLA, Glen, VISSER, Gerard Ha, HOMER, Caroline Se, GIBBONS, Deena, KELLY, Niamh M., KENNEDY, Holly Powell, KIDANTO, Hussein, TAYLOR, Paul a TEMMERMAN, Marleen, 2018. Short-term and long-term effects of caesarean section on the health of women and children. *Lancet (London, England)*. 13 říjen 2018. Vol. 392, no. 10155, pp. 1349–1357. DOI 10.1016/S0140-6736(18)31930-5.
- [9] MONTEAGUDO-MERA, Andrea, RASTALL, Robert A., GIBSON, Glenn R., CHARALAMPOPOULOS, Dimitris a CHATZIFRAGKOU, Afroditi, 2019. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1 srpen 2019. Vol. 103, no. 16, pp. 6463–6472. DOI 10.1007/s00253-019-09978-7.
- [10] PENDHARKAR, Sonal, BRANDSBORG, Erik, HAMMARSTRÖM, Lennart, MARCOTTE, Harold a LARSSON, Per-Göran, 2015. Vaginal colonisation by probiotic lactobacilli and clinical outcome in women conventionally treated for bacterial vaginosis

- and yeast infection. *BMC Infectious Diseases*. prosinec 2015. Vol. 15, no. 1, pp. 255. DOI 10.1186/s12879-015-0971-3.
- [11] MEZZASALMA, Valerio, MANFRINI, Enrico, FERRI, Emanuele, BOCCARUSSO, Marco, DI GENNARO, Patrizia, SCHIANO, Irene, MICHELOTTI, Angela a LABRA, Massimo, 2017. Orally administered multispecies probiotic formulations to prevent urogenital infections: a randomized placebo-controlled pilot study. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. leden 2017. Vol. 295, no. 1, pp. 163–172. DOI 10.1007/s00404-016-4235-2.
- [12] REDAKCE ZDRAVIAMY. Probiotika mají příznivý vliv na naši imunitu. *Zdraviamy* [online]. 2020. Dostupné z: <https://www.zdraviamy.cz/probiotika-maji-priznivy-vliv-na-nasi-imunitu/>
- [13] RUTAYISIRE, Erigene, HUANG, Kun, LIU, Yehao a TAO, Fangbiao, 2016. The mode of delivery affects the diversity and colonization pattern of the gut microbiota during the first year of infants' life: a systematic review. *BMC gastroenterology*. 30 červenec 2016. Vol. 16, no. 1, pp. 86. DOI 10.1186/s12876-016-0498-0.
- [14] MARTÍN, Rocío, LANGA, Susana, REVIRIEGO, Carlota, JIMÉNEZ, Esther, MARÍN, María L., XAUS, Jordi, FERNÁNDEZ, Leonides a RODRÍGUEZ, Juan M., 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of Pediatrics*. prosinec 2003. Vol. 143, no. 6, pp. 754–758. DOI 10.1016/j.jpeds.2003.09.028.
- [15] PATANGIA, Dharti V., ANTHONY RYAN, Cornelius, DEMPSEY, Eugene, PAUL ROSS, Reynolds a STANTON, Catherine, 2022. Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health. *MicrobiologyOpen*. 13 leden 2022. Vol. 11, no. 1, pp. e1260. DOI 10.1002/mbo3.1260.
- [16] LANKELMA, Jacqueline M., CRANENDONK, Duncan R., BELZER, Clara, VOS, Alex F. de, VOS, Willem M. de, POLL, Tom van der a WIERSINGA, W. Joost, 2017. Antibiotic-induced gut microbiota disruption during human endotoxemia: a randomised controlled study. *Gut*. 1 září 2017. Vol. 66, no. 9, pp. 1623–1630. DOI 10.1136/gutjnl-2016-312132.
- [17] MARTÍNEZ LEO, Edwin E. a SEGURA CAMPOS, Maira R., 2020. Effect of ultra-processed diet on gut microbiota and thus its role in neurodegenerative diseases. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*. březen 2020. Vol. 71, pp. 110609. DOI 10.1016/j.nut.2019.110609.
- [18] ZHANG, Ping, 2022. Influence of Foods and Nutrition on the Gut Microbiome and Implications for Intestinal Health. *International Journal of Molecular Sciences*. leden 2022. Vol. 23, no. 17, pp. 9588. DOI 10.3390/ijms23179588.
- [19] HURTADO-BARROSO, Sara, TRESSERRA-RIMBAU, Anna, VALLVERDÚ-QUERALT, Anna a LAMUELA-RAVENTÓS, Rosa María, 2019. Organic food and the

- impact on human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2019. Vol. 59, no. 4, pp. 704–714. DOI 10.1080/10408398.2017.1394815.
- [20] MARTIN, R., NAUTA, A. J., BEN AMOR, K., KNIPPELS, L. M. J., KNOL, J. a GARSSSEN, J., 2010. Early life: gut microbiota and immune development in infancy. *Beneficial Microbes*. listopad 2010. Vol. 1, no. 4, pp. 367–382. DOI 10.3920/BM2010.0027.
- [21] ŠPELINA, Vladimír a WINKLEROVÁ, Daniela, 2009. Principy hodnocení účinnosti a bezpečnosti probiotik a charakteristika registrovaných doplňků stravy s obsahem probiotik a prebiotik. *Pediatric pro praxi*. 1 říjen 2009. Vol. 10, no. 4, pp. 247–250.
- [22] TOMA, Malda Maija a Juris POKROTNIKS. Probiotics as functional food: microbiological and medical aspects. *Acta Universitatis Latviensis*. 2006, **2006**(710), 117-129.
- [23] LAHTINEN, Sampo J., 2012. Probiotic viability – does it matter? *Microbial Ecology in Health and Disease*. 1 prosinec 2012. Vol. 23, no. 1, pp. 18567. DOI 10.3402/mehd.v23i0.18567.
- [24] SANDERS, Mary Ellen, LENOIR-WIJNKOOP, Irene, SALMINEN, Seppo, MERENSTEIN, Daniel J., GIBSON, Glenn R., PETSCHOW, Bryon W., NIEUWDORP, Max, TANCREDI, Daniel J., CIFELLI, Christopher J., JACQUES, Paul a POT, Bruno, 2014. Probiotics and prebiotics: prospects for public health and nutritional recommendations. *Annals of the New York Academy of Sciences*. únor 2014. Vol. 1309, pp. 19–29. DOI 10.1111/nyas.12377.
- [25] SAAD, N., DELATTRE, C., URDACI, M., SCHMITTER, J. M. a BRESSOLLIER, P., 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology*. 1 leden 2013. Vol. 50, no. 1, pp. 1–16. DOI 10.1016/j.lwt.2012.05.014.
- [26] HOŘÁČKOVÁ, Šárka. NOVÉ TRENDY V PROBIOTIKÁCH. *Mlékařské listy* [online]. 2010, **2010**(120), 19-22. Dostupné z: http://www.mlekarskelisty.cz/upload/soubory/pdf/2010/120_s._19-22.pdf
- [27] ZHENG, Jinshui, WITTOUCK, Stijn, SALVETTI, Elisa, FRANZ, Charles M.A.P., HARRIS, Hugh M.B., MATTARELLI, Paola, O'TOOLE, Paul W., POT, Bruno, VANDAMME, Peter, WALTER, Jens, WATANABE, Koichi, WUYTS, Sander, FELIS, Giovanna E., GÄNZLE, Michael G. a LEBEER, Sarah, 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2020. Vol. 70, no. 4, pp. 2782–2858. DOI 10.1099/ijsem.0.004107.
- [28] PRASANNA, P. H. P., GRANDISON, A. S. a CHARALAMPOPOULOS, D., 2014. Bifidobacteria in milk products: An overview of physiological and biochemical properties,

- exopolysaccharide production, selection criteria of milk products and health benefits. *Food Research International*. 1 leden 2014. Vol. 55, pp. 247–262. DOI 10.1016/j.foodres.2013.11.013.
- [29] DE OLIVEIRA LEITE, Analy Machado, MIGUEL, Marco Antonio Lemos, PEIXOTO, Raquel Silva, ROSADO, Alexandre Soares, SILVA, Joab Trajano a PASCHOALIN, Vania Margaret Flosi, 2013. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*. 2013. Vol. 44, no. 2, pp. 341–349. DOI 10.1590/S1517-83822013000200001.
- [30] GANESAN, B., WEIMER, B. C., PINZON, J., DAO KONG, N., ROMPATO, G., BROTHERSEN, C. a MCMAHON, D. J., 2014. Probiotic bacteria survive in Cheddar cheese and modify populations of other lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. červen 2014. Vol. 116, no. 6, pp. 1642–1656. DOI 10.1111/jam.12482.
- [31] ORTAKCI, F., BROADBENT, J. R., MCMANUS, W. R. a MCMAHON, D. J., 2012. Survival of microencapsulated probiotic *Lactobacillus paracasei* LBC-1e during manufacture of Mozzarella cheese and simulated gastric digestion. *Journal of Dairy Science*. listopad 2012. Vol. 95, no. 11, pp. 6274–6281. DOI 10.3168/jds.2012-5476.
- [32] VIJAYA KUMAR, Bathal, VIJAYENDRA, Sistla Venkata Naga a REDDY, Obulam Vijaya Sarathi, 2015. Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. *Journal of Food Science and Technology*. říjen 2015. Vol. 52, no. 10, pp. 6112–6124. DOI 10.1007/s13197-015-1795-2.
- [33] PÁLSDÓTTIR, Hrefna. 11 Probiotic Foods That Are Super Healthy. *Healthline* [online]. 2023. Dostupné z: https://www.healthline.com/nutrition/11-super-healthy-probiotic-foods#TOC_TITLE_HDR_13
- [34] *National Center for Biotechnology Information* [online]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1357&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
- [35] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 80-210-4207-9.
- [36] LIBRARY, KATERYNA KON/SCIENCE PHOTO, nedatováno. Lactococcus bacteria, illustration - Stock Image - F034/3198. *Science Photo Library*. online. Získáno z: <https://www.sciencephoto.com/media/1219314/view/lactococcus-bacteria-illustration>
- [37] *National Center for Biotechnology Information* [online]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1743>
- [38] Miniatlás mikroorganismů, nedatováno. online. Získáno z: <http://old.vscht.cz/obsah/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/pro.htm>

- [39] Propionibacterium freudenreichii: benefits of a propionic bacteria, 2021. *Laboratoire Optim.* online. Získáno z: <https://laboratoire-optim.com/en/blogs/en/propionibacterium-freudenreichii-benefits-of-a-propionic-bacteria>
- [40] *National Center for Biotechnology Information* [online]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1578&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
- [41] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnoology*. 3. opravené vydání. Praha: Academica, 2002. ISBN 80-200-1024-6.
- [42] COUDEYRAS, Sophie, MARCHANDIN, Hélène, FAJON, Céline a FORESTIER, Christiane, 2008. Taxonomic and Strain-Specific Identification of the Probiotic Strain *Lactobacillus rhamnosus* 35 within the *Lactobacillus casei* Group. *Applied and Environmental Microbiology*. květen 2008. Vol. 74, no. 9, pp. 2679–2689. DOI 10.1128/AEM.02286-07
- [43] DE ANGELIS, M a M GOBBETTI. *Lactobacillus* SPP.: General Characteristics. *Reference Module in Food Science*. 2015, , 1-2. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.00851-9
- [44] KOREŇOVÁ, Janka, 2011. Viability of the probiotic bacteria *L. acidophilus* in dairy products. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*. 30 listopad 2011. Vol. 5, no. 4, pp. 34–37. DOI 10.5219/147.
- [45] LIBRARY, STEVE GSCHMEISSNER/SCIENCE PHOTO, nedatováno. *Lactobacillus* bacteria, SEM - Stock Image - C020/7283. *Science Photo Library*. online. Získáno z: <https://www.sciencephoto.com/media/589998/view/lactobacillus-bacteria-sem>
- [46] INFO@AION.CZ, AION CS-, nedatováno. 397/2016 Sb. Vyhláška o požadavcích na mléko a mléčné výrobky, mražené krémy a jedlé tuky a oleje. *Zákony pro lidi*. online. Získáno z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2016-397>
- [47] Členění mléka a mléčných výrobků na druhy, skupiny a podskupiny (eAGRI), nedatováno. online. Získáno z: <https://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/102132851.html>
- [48] GAJDŮŠEK, Stanislav. *Mlékařství II*. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1998. ISBN 80-715-7342-6.
- [49] SALIH, Hanaa, ABDALLA, Mohamed a HERNANDEZ, Juan, 2020. Effect of Starter Addition on the Physicochemical, Microbiological and Sensory Characteristics of Pasteurized Milk White Cheese (Gibna bayda). *Asian Food Science Journal*. 3 červen 2020. DOI 10.9734/AFSJ/2020/v15i430159.

- [50] PAPADEMAS, Photis a BINTSIS, Thomas (ed.), 2017. *Global Cheesemaking Technology: Cheese Quality and Characteristics*. online. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. ISBN 978-1-119-04616-5.
- [51] MICHALSKI, Marie-Caroline, 2007. On the supposed influence of milk homogenization on the risk of CVD, diabetes and allergy. *British Journal of Nutrition*. duben 2007. Vol. 97, no. 4, pp. 598–610. DOI 10.1017/S0007114507657900.
- [52] KADLEC, Pavel. *Technologie potravin II*. 1. Praha: VŠCHT, 2002. ISBN 978-80-7080-510-7.
- [53] LEROY, Frédéric a DE VUYST, Luc, 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*. 1 únor 2004. Vol. 15, no. 2, pp. 67–78. DOI 10.1016/j.tifs.2003.09.004.
- [54] FOX, P. F. a P. L. H. MCSWEENEY. Cheese: An Overview. In: FOX, P. F., P. L. H. MCSWEENEY, T. M. COGAN, T. P. GUINEE. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1. Cambridge: Academic Press, 2004, pp. 5–21. ISBN 978-0-12-263652-3. DOI: 10.1016/B978-0-12-417012-4.00001-6.
- [55] MCSWEENEY, P. L. H. *Cheese problems solved*. 1. y Woodhead Publishing Limited: Cambridge England, 2007. ISBN 978-1-84569-353-4.
- [56] DÜSTERHÖFT, Eva-Maria, ENGELS, Wim a HUPPERTZ, Thom, 2017. Dutch-Type Cheeses. In: PAPADEMAS, Photis a BINTSIS, Thomas (ed.), *Global Cheesemaking Technology*. online. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. pp. 326–335. ISBN 978-1-119-04616-5.
- [57] MATĚJČKOVÁ, Radmila. Technologie mléka. *Portál inovace vyššího odborného vzdělávání* [online]. 2019. Dostupné z: <https://www.vovcr.cz/odz/tech/315/page20.html>
- [58] FORMAN, Ladislav. *Mlékárenská technologie II*. 2. vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1996. ISBN 978-80-7080-250-2.
- [59] JANŠTOVÁ, Bohumíra, Lenka VORLOVÁ, Pavlína NAVRÁTILOVÁ, Michaela KRÁLOVÁ, Lenka NECIDOVÁ a Eva MAŘICOVÁ. *Technologie mléka a mléčných výrobků*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012. ISBN 978-80-7305-637-7.
- [60] GUPTA, Nalini, 2019. DNA extraction and polymerase chain reaction. *Journal of Cytology*. 4 leden 2019. Vol. 36, no. 2, pp. 116. DOI 10.4103/JOC.JOC_110_18. Company: Medknow Publications and Media Pvt. Ltd. Distributor: Medknow Publications and Media Pvt. Ltd. Institution: Medknow Publications and Media Pvt. Ltd. Label: Medknow Publications and Media Pvt. Ltd. publisher: Medknow Publications PMID: 30992648

- [61] DNA Purification. *Promega Corporation* [online]. Dostupné z: <https://worldwide.promega.com/resources/guides/nucleic-acid-analysis/dna-purification/>
- [62] ŠMARDA, Jan, Jiří DOŠKAŘ, Roman PANTŮČEK, Vladislava RŮŽIČKOVÁ a Jana KOPTÍKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita Brno, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [63] ŠPANOVÁ, Alena a Bohuslav RITTICH. *Analýza vybraných druhů bakterií mléčného kvašení pomocí metod molekulární biologie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, 2010. ISBN 978-80-214-4004-3.
- [64] 4WORKS, nedatováno. Izolace DNA pomocí gravitačních kolonek. *LabGuide.cz*. online. Získáno z: <https://labguide.cz/metody/izolace-nukleovych-kyselin-z-tkani/izolace-genomove-dna/izolace-dna-pomoci-gravitacnich-kolonek/>
- [65] GRIFFITHS, Lyn a CHACON-CORTES, Diego, 2014. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*. květen 2014. pp. 1. DOI 10.2147/BSAM.S46573.
- [66] SHEN, Chang-Hui, 2019. Detection and Analysis of Nucleic Acids. In: *Diagnostic Molecular Biology*. online. Elsevier. pp. 167–185. ISBN 978-0-12-802823-0. DOI 10.1016/B978-0-12-802823-0.00007-9
- [67] Detection technologies used for RNA/DNA quantification. *Thermo Fisher Scientific Inc.* [online]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/dna-rna-purification-analysis/nucleic-acid-quantitation.html>
- [68] NAVARRO, E., SERRANO-HERAS, G., CASTAÑO, M. J. a SOLERA, J., 2015. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*. 15 leden 2015. Vol. 439, pp. 231–250. DOI 10.1016/j.cca.2014.10.017.
- [69] 4WORKS, nedatováno. Real-time PCR. *LabGuide.cz*. online. Získáno z: <https://labguide.cz/metody/real-time-pcr/>
- [70] DRUML, Barbara a CICHNA-MARKL, Margit, 2014. High resolution melting (HRM) analysis of DNA – Its role and potential in food analysis. *Food Chemistry*. září 2014. Vol. 158, pp. 245–254. DOI 10.1016/j.foodchem.2014.02.111.
- [71] ALKHAYYAT, Daniah Hassan a ALSHAMMERY, Deema Ali, 2021. Real time polymerase chain reaction analysis in the patients treated with fixed appliances after the orthodontic treatment: A follow-up study. *Saudi Journal of Biological Sciences*. listopad 2021. Vol. 28, no. 11, pp. 6266–6271. DOI 10.1016/j.sjbs.2021.06.087.
- [72] NIKOLAOU, Anastasios, SAXAMI, Georgia, KOURKOUTAS, Yiannis a GALANIS, Alex, 2011. A new methodology for rapid detection of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* based on multiplex PCR. *Journal of Microbiological Methods*. únor 2011. Vol. 84, no. 2, pp. 362–364. DOI 10.1016/j.mimet.2010.12.010.

- [73] MOSER, Aline, BERTHOUD, H el ene, EUGSTER, Elisabeth, MEILE, Leo a IRMLER, Stefan, 2017. Detection and enumeration of *Lactobacillus helveticus* in dairy products. *International Dairy Journal*. 1 kv eten 2017. Vol. 68, pp. 52–59. DOI 10.1016/j.idairyj.2016.12.007.
- [74] ODAMAKI, T., YONEZAWA, S., KITAHARA, M., SUGAHARA, Y., XIAO, J.-Z., YAESHIMA, T., IWATSUKI, K. a OHKUMA, M., 2011. Novel multiplex polymerase chain reaction primer set for identification of *Lactococcus* species: Identification of *Lactococcus*. *Letters in Applied Microbiology*. kv eten 2011. Vol. 52, no. 5, pp. 491–496. DOI 10.1111/j.1472-765X.2011.03028.x.
- [75] DALMASSO, Marion, NICOLAS, Pierre, FALENTIN, H el ene, VALENCE, Florence, TANSKANEN, Jarna, JATILA, Hanna, SALUSJ ARVI, Tuomas a THIERRY, Anne, 2011. Multilocus sequence typing of *Propionibacterium freudenreichii*. *International Journal of Food Microbiology*. 31 leden 2011. Vol. 145, no. 1, pp. 113–120. DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.037.
- [76] VANATKOVA, Z., OKENKOVA, E., BUNKOVA, L., DRAB, V. a HRABE, J., 2009. Molecular Diagnostic of *Streptococcus thermophilus*. *Ecological Chemistry and Engineering. A*. 2009. Vol. 16, no. 12, pp. 1627–1635.
- [77] KOETSIER, Giron a Eric CANTOR. A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers [online]. 2019, , 1-8. Dostupn e z: https://www.neb.com/-/media/nebus/files/application-notes/technote_mvs_analysis_of_nucleic_acid_concentration_and_purity.pdf?rev=c24cea043416420d84fb6bf7b554dbbb
- [78] HAARMAN, Monique a Jan KNOL. Quantitative Real-Time PCR Analysis of Fecal *Lactobacillus* Species in Infants Receiving a Prebiotic Infant Formula. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. The Netherlands: American Society for Microbiology, 2006, **72**(4), 2359–2365. Dostupn e z: doi:10.1128/AEM.72.4.2359–2365.2006
- [79] PORCELLATO, D., ØSTLIE, H.M., LILAND, K.H., RUDI, K., ISAKSSON, T. a SKEIE, S.B., 2012. Strain-level characterization of nonstarter lactic acid bacteria in Norwegian cheese by high-resolution melt analysis. *Journal of Dairy Science*. z ar ı 2012. Vol. 95, no. 9, pp. 4804–4812. DOI 10.3168/jds.2012-5386.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

C _t	práh cyklu
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina etylendiamintetraoctová
HRM	vysokorozlišovací křivka tání
NK	nukleová kyselina
PCR	polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsulfát sodný
T _m	teplota tání
TVS	tuku v sušině