

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

CHARAKTERIZACE VYBRANÝCH KMENŮ KVASINEK Z POTRAVIN

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

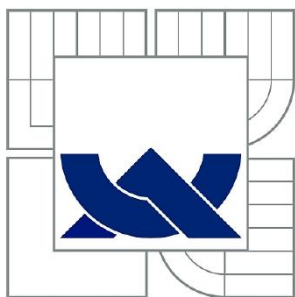
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

KATARÍNA OSTRIHOŇOVÁ

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

## CHARAKTERIZACE VYBRANÝCH KMENŮ KVASINEK Z POTRAVIN

CHARACTERIZATION OF SELECTED YEAST STRAINS FROM FOOD

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

KATARÍNA OSTRIHOŇOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Mgr. DANA VRÁNOVÁ, Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	<b>FCH-BAK0890/2014</b>	Akademický rok: <b>2014/2015</b>
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	<b>Katarína Ostrihoňová</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie (2901R021)	
Vedoucí práce	<b>Mgr. Dana Vránová, Ph.D.</b>	
Konzultanti:		

### Název bakalářské práce:

Charakterizace vybraných kmenů kvasinek z potravin

### Zadání bakalářské práce:

1. Vypracování literární rešerše na zadané téma
2. Popis vhodných a použitých metod k identifikaci a charakterizaci kvasinek z potravin
3. Zpracování získaných výsledků a jejich zhodnocení v diskusi

### Termín odevzdání bakalářské práce: 22.5.2015

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

-----  
Katarína Ostrihoňová  
Student(ka)

-----  
Mgr. Dana Vránová, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

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

## **ABSTRAKT**

Táto bakalárska práca sa zaoberá identifikáciou kvasiniek zo syrov metódou PCR-RFLP a overením lipolytickej aktivity kvasiniek. V teoretickej časti sú spracované základné informácie o kvasinkách, ich možné pozitívne a negatívne vplyvy na kvalitu syrov, technológia výroby syrov, proteolýza a lipolýza v syre a priebeh PCR-RFLP (polymerázová reťazová reakcia s následnou analýzou polymorfizmu dĺžky reštrikčných fragmentov).

V experimentálnej časti je uvedený postup izolácie DNA, identifikácia DNA metódou PCR uskutočnená amplifikáciou 5,8S-ITS úsekov DNA pomocou primérov ITS1 a ITS4. Amplifikovaná DNA bola prečistená etanolom a potom podrobená reštrikčnej analýze enzýmami *HaeIII*, *HinfI*, *HhaI*, *TaqI*<sup>α</sup>. Následne je uvedená detekcia PCR produktu a reštrikčných fragmentov pomocou gélovej elektroforézy. Dĺžky fragmentov získané po elektroforéze poslúžia na identifikáciu kvasinkových druhov izolovaných zo syrov. V druhej časti bakalárskej práce sme sa v experimentálnej časti zaoberali dôkazom lipolytickej aktivity kvasiniek pomocou testu na Spirit blue agar.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ:** Syr, kvasinky, polymerázová reťazová reakcia, izolácia

## **ABSTRACT**

This bachelor's thesis is focused on identification of yeasts of the cheeses by PCR-RFLP method and verifying the lipolytic activity of the yeast. In the theoretical part are processed basic information about yeast, their possible positive and negative effects on the quality of cheeses, the technology of production of cheeses, lipolysis and proteolysis in the cheese and of course of PCR-RFLP (The polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism).

Experimental section shows the isolation of DNA, identification of DNA by PCR made by amplification 5,8S-ITS sections of DNA using primers ITS1 and ITS4. The amplified DNA was purified by ethanol and then was subjected to restriction analysis with the enzymes *HaeIII*, *HinfI*, *HhaI*, *TaqI*<sup>α</sup>. Then there is listed detection of the PCR product and the restriction fragments by gel electrophoresis. Lengths of the fragments obtained after electrophoresis will be used to identify yeast species isolated from cheeses. In the second part of the thesis in the experimental part we have dealt with evidence of lipolytic activity of the yeast by test on Spirit blue agar.

**KEY WORDS:** cheese, yeasts, polymerase chain reaction, isolation

OSTRIHOŇOVÁ, K. *Charakterizace vybraných kmenů kvasinek z potravin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. 56 s. Vedoucí bakalářské práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D.

## **PREHLÁŠANIE**

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citovala. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....  
podpis študenta

## **POĎAKOVANIE**

Chcela by som poďakovať vedúcej bakalárskej práce Mgr. Daně Vránové, Ph.D. za účinnú metodickú, pedagogickú a odbornú pomoc a ďalšie cenné rady pri spracovaní mojej bakalárskej práce. Ďalej by som chcela poďakovať Ing. Renatě Vadkertiovej, PhD. z chemického ústavu SAV v Bratislave za spoluprácu. V neposlednej rade by som rada poďakovala Bc. Kristýne Dlapalovej za praktické rady a pomoc pri práci v laboratóriu.

## OBSAH

Úvod.....	10
<b>1 Teoretická časť.....</b>	<b>11</b>
1.1 Charakteristika syra .....	11
1.2 Výroba syrov.....	11
1.2.1 Mlieko ako surovina na výrobu syrov .....	12
1.2.1.1 Enzýmy nachádzajúce sa v mlieku .....	12
1.2.2 Úprava a spracovanie mlieka .....	13
1.2.3 Zrážanie syroviny .....	13
1.2.4 Spracovanie zrazeniny (syroviny) .....	14
1.2.5 Dohrievanie a dosušanie syroviny.....	14
1.2.6 Formovanie syroviny.....	14
1.2.7 Lisovanie syrov .....	15
1.2.8 Solenie syrov .....	15
1.2.9 Zrenie syrov.....	15
1.2.10 Proteolýza a lipolýza v syre .....	17
1.2.11 Proteolytická aktivita.....	17
1.2.12 Lypolitická aktivita .....	18
1.2.13 Proteolytická a lipolytická aktivita u plesnivých syrov .....	18
1.2.14 Aróma syrov .....	18
1.2.15 Aróma plesnivých zrejúcich syrov .....	19
1.3 Rozdelenie syrov.....	19
1.3.1 Plesňové syry.....	21
1.3.1.1 Syr s plesňou na povrchu - Camembert .....	22
1.3.1.2 Syry s plesňou vo vnútri .....	22
1.3.2 Syry zrejúce pod mazom - Olomoucké tvarôžky .....	23
1.4 Vplyv kvasiniek na syr.....	23
1.5 Charakteristika kvasiniek .....	24
1.6 Cytológia kvasiniek .....	24
1.6.1 Bunková stena .....	25
1.6.2 Cytoplazmatická membrána .....	25
1.6.3 Cytoplazma.....	25
1.6.4 Endoplazmatické retikulum.....	26

1.6.5	Golgiho aparát .....	26
1.6.6	Mitochondrie .....	26
1.6.7	Vakuola .....	26
1.6.8	Cytoskelet.....	26
1.6.9	Jadro .....	27
1.7	Vegetatívne a pohlavné rozmnožovanie kvasiniek.....	27
1.7.1	Vegetatívne rozmnožovanie .....	27
1.7.2	Pohlavné rozmnožovanie .....	28
1.8	Najvýznamnejšie rody kvasiniek nachádzajúce sa v syre.....	28
1.8.1	Rod <i>Kluyveromyces</i> .....	28
1.8.1.1	Druh <i>Kluyveromyces marxianus</i> .....	29
1.8.2	Rod <i>Candida</i> .....	29
1.8.2.1	Druh <i>Candida parapsilosis</i> .....	29
1.8.2.2	Druh <i>Candida tropicalis</i> .....	29
1.8.3	Rod <i>Debaryomyces</i> .....	29
1.8.3.1	Druh <i>Debaryomyces hansenii</i> .....	30
1.8.4	Rod <i>Pichia</i> .....	30
1.8.4.1	Druh <i>Pichia membranaefaciens</i> .....	30
1.8.5	Rod <i>Geotrichum</i> .....	30
1.8.5.1	Druh <i>Geotrichum candidum</i> .....	30
1.9	Negatívne účinky kvasiniek na kvalitu potravín.....	31
1.9.1	Mikrobiologické chyby syrov spôsobené kvasinkami .....	31
1.10	Identifikácia kvasiniek metódou PCR-RFLP.....	32
1.10.1	Izolácia (extrakcia) a purifikácia nukleových kyselín.....	32
1.10.2	Polymerázová reťazová reakcia .....	32
1.10.3	Stanovenie polymorfizmu dĺžky reštrikčných fragmentov v produktoch PCR (PCR-RFLP).....	33
1.10.3.1	Enzýmy používané k stanoveniu a úpravám nukleových kyselín .....	34
1.10.4	Detekcia nukleových kyselín pomocou elektroforézy .....	34
1.10.4.1	Gélová elektroforéza.....	34
1.11	Test na stekúvanie želatíny (Dôkaz proteolytickej aktivity kvasiniek).....	35
1.11.1	Princíp testu na stekúvanie želatíny.....	35
1.11.2	Postup testu na stekúvanie želatíny .....	35

<b>2</b>	<b>Experimentálna časť</b>	<b>37</b>
2.1	Použitá prístroje, chemikálie a suroviny	37
2.1.1	Chemikálie	37
2.1.2	Prístroje a zariadenie	37
2.1.3	Suroviny	38
2.2	Príprava použitých roztokov	38
2.2.1	Príprava etídium bromidu	38
2.2.2	Príprava 10×TBE pufru	39
2.2.3	Príprava 1×TBE pufru s etídium bromidom	39
2.2.4	Príprava dĺžkových štandardov 100 bp a 20 bp	39
2.2.5	Príprava 2% agarozového gélu	39
2.2.6	Príprava 4% agarozového gélu	39
2.2.7	Príprava octanového pufru	39
2.2.8	Príprava 80% etanolu	39
2.2.9	Príprava PCR zmesi	39
2.3	Pracovné postupy	40
2.3.1	Izolácia čistých kultúr kvasiniek	40
2.3.2	Izolácia DNA	40
2.3.3	Amplifikácia izolovanej DNA metódou PCR	41
2.3.4	Prečistenie PCR produktu	41
2.3.5	Reštrikčná analýza	41
2.3.6	Elektroforetická detekcia PCR produktov a reštrikčných fragmentov	42
2.4	Screening lipolytickej aktivity	42
<b>3</b>	<b>Výsledky a diskusia</b>	<b>44</b>
3.1	Izolácia DNA	44
3.2	Amplifikácia izolovanej DNA metódou PCR	44
3.3	Reštrikčná analýza typových kvasiniek (RFLP-PCR)	45
3.3.1	Reštrikčná endonukleáza <i>HaeIII</i>	45
3.3.2	Reštrikčná endonukleáza <i>HinfI</i>	46
3.3.3	Reštrikčná endonukleáza <i>HhaI</i>	46
3.3.4	Restrikčná endonukleáza <i>TaqI</i> <sup>a</sup>	47
3.4	Screening lipolytickej aktivity vybraných mikroorganizmov	47
<b>4</b>	<b>Záver</b>	<b>49</b>

<b>5</b>	<b>Zoznam použitej literatúry .....</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>Zoznam Použitých skratiek a symbolov .....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>Prílohy.....</b>	<b>54</b>

## ÚVOD

Kvasinky sú mikroorganizmy dôležité pre potravinársky priemysel, a prispievajú pozitívnym spôsobom na spracovanie alebo zrenia vína, piva, chleba, niektorých syrov a kefírových nápojov. [1] Tento dokument sa zaoberá vlastnosťami kvasiniek izolovaných zo syrov. Kvasinky premieňajú mliečny cukor (laktózu) na CO<sub>2</sub> a alkohol. Táto premena sa deje napr. v čerstvom tvarohu, pri fermentácii kefiru a pri získavaní alkoholu zo srvátky. Ďalej kvasinky spotrebúvajú kyselinu mliečnu, čo má význam pri zrení syrov. Kvasinky sa zúčastňujú aromatizácie mliečnych výrobkov a pri ďalších žiaducich technologických zmenách. Z mliekarensky dôležitých rodov kvasiniek je rod *Kluyveromyces*, hlavne *Kluyveromyces lactis var. lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, rod *Pichia*, rod *Candida*, predovšetkým *Candida vini*, *C. krusei*, *C. lipolytica*, *C. holomii*, *C. lactis-condensi*, *C. globosa* a rod *Rhodotorula*. [2] Kvasinky pôsobia lipolyticky a proteolyticky a rôznymi metabolitmi prispievajú k tvorbe arómy syrov. Kvasinky preto nie sú iba sprievodnou mikroflórou v procese zrenia syrov, ale sú potrebné pri tvorbe arómy. [15] K overeniu lipolytickej aktivity vybraných typových kvasiniek bol použitý test na Spirit blue agar.

Kvasinky môžu svojou enzymatickou činnosťou i negatívne ovplyvňovať technologickú kvalitu surovín, kvasných substrátov, fyziologickú činnosť čistých kultúr kvasiniek, kvasný proces a výsledné produkty. Patogénne rody kvasiniek sú rod *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia* a *Trichosporon*. Najbežnejšími druhmi sú *Candida albicans* a *Cryptococcus neoformans*, ktorý môže vyvolať i smrteľné ochorenie centrálného nervového systému. Ďalej *Geotrichum candidum*, *Saccharomyces cerevisiae*, rod *Hansenula*, *Rhodotrula*, *Kloeckera*. [3, 4]

PCR sa využíva ako metóda pre rýchlu a citlivú detekciu kvasiniek v oblasti potravín napríklad pri sledovaní prítomnosti špecifických kvasiniek, ktoré spôsobujú kazenie potravín. Je najmodernejšou metódou pre zisťovanie a charakterizáciu sekvencie nukleových kyseliny pochádzajúcej z rôznych organizmov. PCR ešte predchádza metóda izolácie DNA. [1] Výsledkom PCR sú amplikony (úseky DNA o rovnakej dĺžke, ktoré sú následne štiepené reštrikčnými endonukleázami na fragmenty, ktoré sú oddelené elektroforézou. Pre vytvorenie reštrikčných fragmentov u typových kvasiniek bola použitá metóda PCR-RFLP (polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov PCR produktu).

# 1 TEORETICKÁ ČASŤ

## 1.1 Charakteristika syra

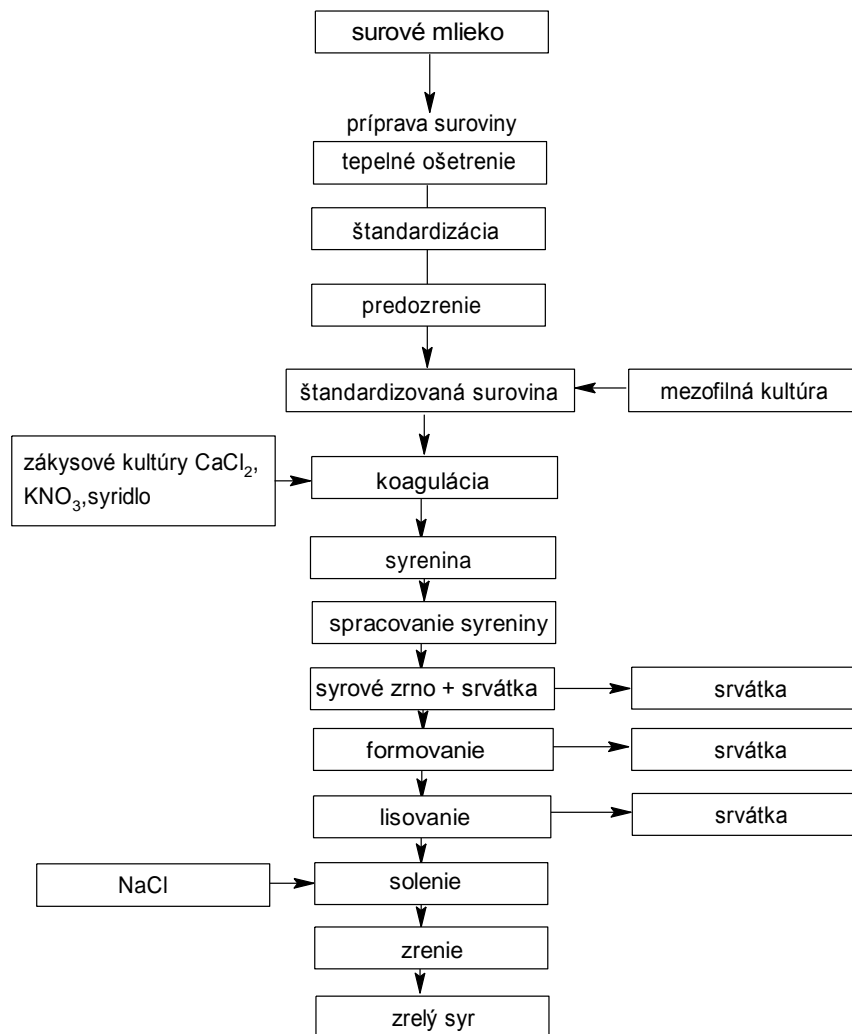
Syr je bielkovinový koncentrát z mlieka. Vyrába sa okyslením alebo enzýmovým zrážaním mlieka za vzájomného pôsobenia mikroorganizmov. Syr vzniká odstránením vody zo zrazeniny a podlieha chemickým a fyzikálnym zmenám účinkom prítomnej mikroflóry, ktoré pôsobia na chuťové zmeny a na predĺženie trvanlivosti v porovnaní s čerstvým mliekom. [6]

Základnými zložkami syrov sú bielkoviny, tuk, voda a v menšej miere zvyškové minerálne látky, ale aj produkty mikrobiálne a enzymaticky rozložených alebo syntetizovaných látok. Rozložené alebo novovzniknuté látky vytvárajú charakteristickú chuť, vôňu, konzistenciu a štruktúru príslušného syra. Mliečnu bielkovinu kazeín získame zrážaním mlieka, resp. smotany, a to buď syridlom (sladké syry) alebo kyselinou mliečnou, vznikajúcou fermentačnou činnosťou mikroorganizmov (kyslé syry). Podstatnú časť technológie výroby syrov tvorí využívanie čistých mliekarenských kultúr. Hlavnou úlohou čistých mliekarenských kultúr, okrem vyvráždania kazeínu kyselinou mliečnou pri kyslých syroch, je aj zaistenie správneho priebehu fermentácie mlieka, syrenia a zrenia sladkých syrov. Preto sa pri výrobe sladkých syrov pridávajú čisté mliekarenské kultúry po pasterizácii a pred syrením mlieka. Tým sa upravuje kyslosť mlieka na 8 až 8,6 °SH a v ďalšej fáze výroby sa zabezpečujú typické biochemické zmeny a organoleptické vlastnosti príslušného druhu syra. Pred zasyrením sa podáva čistá kultúra – smotanový zákvas, ktorý sa používa pri výrobe všetkých druhov syra a podľa druhu vyrábaného syra sa môže pridávať ešte špeciálna kultúra. Napr. pri výrobe syra typu Roquefort kultúra *Penicillium roquefortii*. [2, 7]

## 1.2 Výroba syrov

Výroba syrov je zložitý technologický proces, ktorý zahŕňa nasledujúce kroky: úpravu mlieka, zrážanie, spracovanie, dozrievanie, dosušanie a formovanie syroviny, lisovanie, solenie a zrenie syrov. Základnou surovinou pre výrobu syrov je u nás kravské mlieko. [8]

Pre lepšiu názornosť jednotlivých operácií technologického procesu výroby syrov je uvedené schéma, vid' Obr. 1.



Obr. 1: Schéma výroby syrov [12]

### 1.2.1 Mlieko ako surovina na výrobu syrov

Mlieko sa považuje za takmer ideálnu potravinu, pretože obsahuje nielen všetky základné živiny, ale aj väčšinu minerálnych látok a vitamínov. Kravské mlieko obsahuje v priemere 4 % tuku, 3,2 % bielkovín (2,6 % kazeínu a 0,6 % sérových bielkovín), 4,6 % laktózy a 0,7 % popolovín. Mlieko je zdroj vápniku, zinku, jódu a ďalších minerálnych látok, ale má nízky obsah železa. Mliečny tuk je prítomný vo forme emulzie v mliečnej plazme. Bielkoviny v mlieku slúžia ako nosič vápnika a fosforu. Mlieko predstavuje polydisperzný systém. Hlavná mliečna bielkovina, kazeín, je prítomná vo forme koloidnej disperzie v mliečnom séru, ktoré obsahuje koloidný roztok sérových bielkovín a pravý roztok laktózy, minerálnych látok a ďalších zložiek. Základným zdrojom dostupnej energie v mlieku je disacharid laktóza. Pre jej využitie je nutný enzým  $\beta$  – galaktozidáza a jej nízka aktivita vedie k laktózovej intolerancii.  $\beta$  – galaktozidáza je kľúčový enzým pri premene laktózy na kyselinu mliečnu. Preto je tento enzým dôležitý pre metabolizmus laktózy v syre počas zrenia. [8, 9, 11, 12]

#### 1.2.1.1 Enzýmy nachádzajúce sa v mlieku

Mlieko obsahuje veľký rozsah tzv. natívnych enzýmov, pochádzajúcich z mliečnej žľazy. Väčšina z nich sa podieľa na prirodzenom antibakteriálnom systéme mlieka a niektoré

katalyzujú tiež biochemické reakcie, vedúce k vzniku sensorických porúch mliečnych výrobkov, prípadne i k zmene technologických vlastností.

Veľkým rizikom sú bakteriálne enzýmy, predovšetkým termorezistentné proteázy a lipázy psychrotrofných mikroorganizmov, ktoré spôsobujú chuťové poruchy mlieka a môžu viesť až k jeho vyzrážaniu. Psychrotrofné mikroorganizmy sa dajú ľahko zničiť pasterizáciou mlieka, ale produkujú enzýmy lipázy a proteázy, ktoré štiepia zložky mlieka a zachovávajú si svoju aktivitu aj po pasterizácii. [8]

### 1.2.2 Úprava a spracovanie mlieka

Základné technologické operácie pri spracovaní mlieka sú termizácia, pasterizácia, homogenizácia, baktofugácia, mikrofiltrácia, prídavok dusičnanu draselného, lyzozýmu a iných antibakteriálnych látok, ktoré ovplyvňujú mikroflóru a enzýmy prítomné v surovom mlieku.

**Termizácia** - redukuje nežiaduce zmeny mlieka pri skladovaní za chladu

**Pasterizácia** - zaisťuje zdravotnú nezávadnosť syrov. Zdravotná nezávadnosť konzumného mlieka je zaistená tepelným ošetrením. Čerstvé mlieko je ošetrené šetrnou pasterizáciou (min. 71,5 °C, 15 s) alebo vysokou pasterizáciou (min. 85 °C po dobu niekoľkých sekúnd). Bežná pasterizácia môže byť doplnená i iným postupom na odstránenie mikroorganizmov, napr. mikrofiltráciou, výrobok ale nie je sterilný a musí byť uchovávaný pri teplote 4 – 8 °C, trvanlivosť je bežne 10 – 21 dní, môže dosiahnuť až 40 dní.

**Baktofugácia** - redukcia spor *Clostridium tyrobutyricum* o 95 – 97 %. Obecne je to odstránenie sporotvorných mikroorganizmov odstredivou silou.

**Homogenizácia mlieka** - je zmenšenie veľkosti tukových guľčiek pod 1 µm. Vplyvom homogenizácie mlieka sa syrí o 25 až 50 % rýchlejšie a súčasne sa niekoľko krát znižuje tukovosť srvátky. [9, 12]

Pri výrobe syrov s vysokodohrievanou syrovinou (ementálsky, moravský bochník) sa do mlieka pridávajú termofilné bakteriálne kultúry napr. *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* a *L. lactis* a propiónové baktérie, ktoré zabezpečujú tvorbu ôk v ceste. U výroby syra čedar sú jediným činiteľom zrenia mezofilné streptokoky mliečného kysnutia. *Brevibacterium linens* je faktorom proteolýzy prebehajúcej v aeróbných podmienkach v syroch, ktoré zrejú pod mazom. U rôznych druhov mäkkých syrov majú základný význam plesne, napr. *Penicillium camemberti*, *P. roqueforti*, *P. candidum* ale aj kvasinky. Pri výrobe syrov holandského typu napr. eidam sa používa farbenie mlieka syrárskou farbou (extrakt Bixa orellana). Aby sa zabránilo včasnému nadúvaniu syrov, pridáva sa do mlieka  $KNO_3$  a na zlepšenie syriteľnosti pasterizovaného mlieka a tým aj zníženie kyslosti mlieka, sa pridáva  $CaCl_2$ . [6]

### 1.2.3 Zrážanie syroviny

Mlieko sa zráža syridlovým enzýmom – chymozínom (tvrdé syry) nazývané ako sladké zrážanie, mliečnou fermentáciou (kyslé zrážanie), vplyvom kyseliny mliečnej vytvorenej z laktózy (kyslé a čerstvé syry), alebo pôsobením obidvoch faktorov v rôznych vzájomných pomeroch (ostatné syry). Syridlo je extrakt, ktorý sa získava extrakciou teľacích žalúdkov. Vzhľadom k obmedzeným zdrojom tejto suroviny sa používajú ešte enzýmové preparáty

živočíšneho, rastlinného alebo mikrobiálneho pôvodu. Zo živočíšnych syridiel je to pepsínové syridlo a príkladom mikrobiálneho sú preparáty izolované z plesní *Cyphonecteria parasitica* a *Rhizomucor miehei*. Zrážanie mlieka syridlom je fyzikálno - chemický jav, ktorého princípom je premena rozpustného kazeinátu vápenatého na nerozpustný parakazeinát vápenatý. Mlieko sa zráža v syrárskych vaniach a kotloch s duplikátorovými stenami, ktoré sa môžu vyhrievať, prípadne ochladzovať vodou. Kultúra mliečnych baktérií sa do syrárskeho mlieka nepridáva priamo, ale ako tzv. prevádzkový zákys. Počas okyselenia zákysovou kultúrou sa mlieko mieša pri teplote 20 až 25 °C. Po nasledujúcom zohriatí na 30 až 40°C sa nechá stáť. Podľa použitej teploty vytvorenej kyseliny mliečnej a pridaného množstva syridla trvá zrážanie ½ až 2 hodiny. [6, 12]

#### **1.2.4 Spracovanie zrazeniny (syroviny)**

Pri spracovaní zrazeniny dochádza k vytvoreniu zrn a k oddeleniu potrebného množstva srvátky zo štruktúry gélu kyslo zrazeného mlieka. Mlieko zrazené na tuhú hmotu sa pokrája na kocky a postupne drobí na zrno, teda častice o veľkosti 3 – 15 nm. Od veľkosti zrna závisí, koľko srvátky sa uvoľní a aké vlastnosti bude mať hotový syr. Platí, čím drobnejšie zrno je, tým tvrdší syr získame a čím viac srvátky sa odstráni, tým tvrdší syr vzniká. Zrno sa ďalej mieša v uvoľnenej srvátke, pričom v tejto fáze je zrno príliš krehké a hrozí jeho rozbitie na jemné častice, syrový prach, ktorý nie je zadržaný v syre a zvyšujú sa tak straty do srvátky. U polotvrdých a tvrdých syrov nastáva ešte proces dohrievania a dosušania. [6, 8]

#### **1.2.5 Dohrievanie a dosušanie syroviny**

Pri dohrievaní syrového zrna sa podporí ďalšie uvoľňovanie srvátky. Rozlišujeme dva typy dohrievania: s nízкодohrievanou syrovinou na 36 až 40°C a s vysokodohrievanou syrovinou na 50 až 55°C. Pri vysokých teplotách dohrievania sa uplatňujú termofilné mikroorganizmy, ktoré sú odolné voči týmto teplotám. Niektoré typy syrov, sa zohrievajú viacnásobným premývaním v teplej vode, z dôvodu dokonalého odstránenia srvátky. Počas dohrievania sa syrové zrno mieša, aby sa urýchlilo zmršťovanie a uvoľňovanie srvátky a zabránilo sa zlepovaniu zrn. Najmä v rozmedzí teplôt 40 až 45 °C, sa veľmi zvyšuje lepkavosť syroviny. Syrové zrno sa mieša (dosúša) pri uvedenej teplote ešte ďalších 15 až 45 minút, čím sa dosiahne správne vylúčenie srvátky, ako aj správna lepivosť. Táto posledná etapa spracovania syroviny a prípravy syrového zrna sa nazýva dosušanie. [6]

#### **1.2.6 Formovanie syroviny**

Pre formovanie všetkých druhov syrov sa používajú kovové formy z nehrdzavejúcej ocele, alebo plastov. Syrová hmotu pri formovaní nadobúda vyžadovaný tvar, a dochádza k spájaniu zrn do hĺbky bez toho, aby sa narušil potrebný rozvoj mikroflóry, od ktorého závisí správny stupeň zrenia. Pri výrobe lisovaných syrov (napr. ementál, eidam, gouda, čedar) sa syrovina po odčerpaní, takmer všetkej srvátky plní do foriem. Pri nelisovaných syroch sa postupuje obdobne, s tým rozdielom, že pred plnením do foriem sú formy vyhrievané a postavené do radov na šikmej ploche. Spájanie syrového zrna pri formovaní závisí od spôsobu dosušania zrna. Počas formovania syrov nastáva intenzívny rozvoj baktérií mliečneho kysnutia (predovšetkým streptokokov), v dôsledku čoho sa laktóza rozkladá na kyselinu mliečnu. [6]

### 1.2.7 Lisovanie syrov

Tento proces sa uplatňuje hlavne pri tvrdých syroch, ktoré zrejú vo veľkých formách, kde nie je samovoľné vytekanie srvátky dostatočné. V tomto prípade sa syrové zrno mechanicky natláča napevno do foriem lisovaním. Lisovanie slúži na rýchle spájanie zrna a na vytváranie hladkého povrchu. Využívajú sa hydraulické alebo pneumatické lisy, kde je lisovací tlak 50 až 400 kPa napr. pri eidame, niekedy aj viac napr. 500 kPa pri čedare a trvá 1 až 20 h podľa typu lisovacieho zariadenia, druhu a tvaru syra. Syrárske lisy sú zostavené tak, aby sa tlak automaticky doreguloval a postupne zvyšoval, čím sa štruktúra na povrchu veľmi nespevní. Zachovanie priepustného povrchu je pre látkovú premenu pri zrení značne dôležité. [6]

### 1.2.8 Solenie syrov

Rozoznávame dva druhy solenia. Suché solenie, kedy sa natierajú vyformované kusy syra soľou. Solenie v soľnom kúpeli, vtedy sa syry ponárajú do 15 až 20 % roztoku kuchynskej soli. Na solenie syrov sa používa chlorid sodný, ktorý sa a v snahe znížiť obsah  $\text{Na}^+$  kombinuje s KCl. Obsah NaCl sa pohybuje medzi 0,8 až 2,5 %, ale závisí to od typu syra. Syry s plesňou vo vnútri alebo na povrchu majú obsah soli vyšší od 3 do 7 %. Čerstvé syry sa buď nesolia, alebo iba slabo 0,5 % NaCl. Tvrdé a polotvrde syry sa solia pri nižšej teplote soľného kúpeľa 12 až 14 °C, mäkké syry pri teplote 14 – 20 °C. Zo stúpajúcou teplotou soľného kúpeľa sa osmóza urýchľuje. Čas solenia s klesajúcou veľkosťou syrov klesá. [6, 15]

Počas procesu solenia sa kuchynská soľ koncentruje vo vonkajšej vrstve, potom pozvoľna preniká do vnútra syra. Vyrovnanie obsahu soli v celej syrovej hmote sa dosahuje v rozdielnych časoch podľa typu syra. U Camembertu je proces ukončený po štyroch až šiestich dňoch, u väčšiny syrov to trvá niekoľko týždňov i mesiacov. [13]

Solenie má vplyv nielen na výslednú chuť a konzistenciu syra, ale ovplyvňuje i aktivitu kultúr a enzýmov pri zraní syrov. Solením sa ďalej spevní povrch syra. Výmena vápenatých za sodíkové ióny v parakazeínu zjemňuje konzistenciu syra. Soľ preniká do syra difúziou, osmotické javy sa uplatňujú na povrchu syrových zrn. Zvýšenie osmotického tlaku v priestore medzi zrnami a pôsobením na bielkoviny sa zvyšuje množstvo uvoľnenej srvátky. Difúziu spomaľuje napr. vyššia viskozita, protitok ostatných zložiek a tukové guľôčky, ktoré blokujú kanáliky medzi zrnami. [8]

Syry sa solia v nádržkách z antikorozívnej ocele alebo v obdĺžnikových, nie veľmi hlbokých betónových nádobách. Nasolené syry sa nechávajú 1 až 2 dni na policiach oschnúť a následne sa prenášajú do zrecích pivníc. [6]

### 1.2.9 Zrenie syrov

Zrenie predstavuje komplexný súhrn zmien spôsobených syridlovými a natívnymi enzýmami, prípadne činnosťou nezákysových kultúr, pri ktorých syr získava typický vzhľad, konzistenciu, chuť, vôňu a zloženie. Za texturálne zmeny a vznik aromatických zložiek sú zodpovedné glykolyza, proteolýza a lipolýza. Technologické operácie pri výrobe syrov rôznych typov sú zamerané na reguláciu aktivity kultúr, na ktorej závisí rozsah a rýchlosť fermentácie laktózy. Je nutné dosiahnuť požadovanú hranicu kyslosti, u tvrdých syrov pH 5,2 a u mäkkých syrov pH 4,8 – 5,0. Kyselina mliečna je neutralizovaná pufrujúcimi zložkami mlieka a je potom ako mliečnan zachytená v zrazenine. Mliečnan u niektorých syrov slúži ako



Mazová kultúra je zložená z proteolytických, halofilných baktérií *B. linens* a kvasiniek *Debaryomyces hansenii* alebo *G. candidum*. Teplota počas zrenia syra sa udržiava na nízkej úrovni 8 až 10 °C, aby sa potrebné mikroorganizmy vrátane kvasných baktérií, plynule a pomaly množili. Vlhkosť sa naopak udržiava na vysokom stupni okolo 80 % pri tvrdých syroch a 95 % pri mäkkých. Zabraňuje sa tým vyschnutiu povrchu syra. [6, 14, 15]

### 1.2.10 Proteolýza a lipolýza v syre

Proteolýza a lipolýza sú hlavnými zdrojmi chuti a zápachu syra. Tieto enzymatické procesy musia prebiehať koordinovane, aby každý syr bol jedinečný svojimi senzoričnými vlastnosťami. Vo väčšine typov syrov, nedochádza vo veľkej miere k lipolýze mliečneho tuku, preto sú proteolýza a katabolizmus voľných masných kyselín považované za hlavné procesy v priebehu zrenia syrov. [17]

Enzýmy, proteínázy a peptidázy hrajú hlavnú úlohu v tvorbe malých peptidov a aminokyselín, ktoré slúžia ako prekursori chuťových látok v syre. Vplyv peptidov na chuť syrov môže byť pozitívny i negatívny. Polypeptidy spôsobujú nežiaducu horkú chuť syrov. Tvorbou horkých peptidov sa vyznačujú niektoré proteolytické enzýmy bunkových stien určitých kmeňov rodu *Lactococcus*. K chuti syrov prispievajú aj aminokyseliny, napríklad prolín, ktorý je významnou zložkou chuti syrov ementálskeho typu. Z bielkovín uvoľňujú prolín baktérie z rodu *Propionibacterium*. [15, 16]

### 1.2.11 Proteolytická aktivita

Proteolýza v syre je definovaná ako zmena v kazeínoch a peptidoch, ktoré môžu byť detegované pomocou elektroforetických metód. Je ďalším významným procesom s vysokým dopadom na príchuť syra počas zrenia. Hydrolýza mliečnych bielkovín v priebehu zrenia syrov sa vyskytuje v rôznych stupňoch. Proteolýza začína, keď mliečne proteíny (najmä kazeín) sú hydrolyzované chymozínom a pepsínom prídavkom syridla, uvoľnením vysokomolekulárnych peptidov, ktoré sú degradované na menšie peptidy bakteriálnymi extracelulárnymi peptidázami. Tieto peptidy sú vybrané baktériami a ďalej hydrolyzované na aminokyseliny mikrobiálnymi exopeptidázami, amino- a karboxypeptidázami, dipeptidázami alebo tripeptidázami, v priebehu zrenia syra vid' Obr. 2. Primárna hydrolýza bielkovín syra je predovšetkým výsledkom pôsobenia pôvodných proteínáz a zvyškového koagulantu. Na degradáciu syrových proteínov majú vplyv proteínázy od štartovacej kultúry baktérií mliečného kvasenia ako aj neštartovacie mikroorganizmy. [15, 16, 17]

Kvasinky vykazujú veľkú rozmanitosť proteolytickej aktivity. Majú kazeinolytickú, aminopeptidázovú a karboxypeptidázovú aktivitu. *Yarrowia lipolytica*, *S. cerevisiae* a *K. marxianus subsp. marxianus* sa líšia vysokou proteolytickou aktivitou oproti *D. hansenii*. *P. camemberti* a *P. roqueforti* sú charakteristické aktivitou endopeptidáz a exopeptidáz, ktorá významne prispieva k proteolýze v syroch. V dôsledku toho, proces zrenia začína na povrchu zrejúceho syra. Proteolytické enzýmy hrajú úlohu v produkcii typickej farby povrchu syra. [10]

Arylamidasy (aminopeptidázy) katalyzujú hydrolýzu N - koncovej aminokyseliny z peptidu, amidu alebo arylamidu. Tieto enzýmy sú dôležité nástroje v rozvoji žiaducich príchuť syra a sú klasifikované ako kyslé alebo alkalické fosfatázy v závislosti na ich pH optima. Kyslé fosfatázy prítomné v syre sú aktívnejšie než alkalické fosfatázy, vzhľadom

na ich relatívne nízke optimálne pH. Kyslá fosfatáza má priamy vplyv na proteolýzu a môže prispievať k tvorbe arómy v syre. [11]

### 1.2.12 Lypolitická aktivita

Lipolýza je obvykle chápaná ako zoskupovanie voľných mastných kyselín počas zrenia. Kvasinky prispievajú k lipolýze v syroch, *Y. lipolytica* má najvyššiu lipázovú aktivitu zo všetkých kvasiniek nachádzajúcich sa v syroch. Lipolýza je oveľa rozsiahlejšia v zrejúcich syroch s modrou plesňou oproti iným druhom syru. napr. v syre Roquefort, lipázy produkované plesňou *P. roqueforti* sú nevyhnutné pre vývoj charakteristickej chuti tohto typu syra. [17]

Metyl – ketóny a ich zodpovedajúce sekundárne alkoholy sú vyrábané  $\beta$  – oxidáciou voľných mastných kyseliny, produkovaných lipolýzou. Tieto zlúčeniny prispievajú k typickej chuti zrelého syra. V dôsledku toho, lipolytická aktivita *P. camemberti* a *P. roqueforti* je dôležitým kritériom pri ich výbere. Lipolytické enzýmy v syre sú enzýmy prirodzene vyskytujúce sa v mlieku (mliečna lipáza). Príspevok lipázy na syr závisí na ohreve mlieka, pretože pasterizácia znižuje aktivitu lipázy. Esterázy a lipázy katalyzujú hydrolýzu väzieb esteru na lipidy. Tieto enzýmy prispievajú k zvýšeniu koncentrácie voľných mastných kyselín v syre. [10, 11, 16]

### 1.2.13 Proteolytická a lipolytická aktivita u plesnivých syrov

U plesnivých syrov sa proteolýza uplatňuje až po glykolýze, teda po anaeróbnej fermentácii laktózy na kyselinu mliečnu a jej premene na mliečnan vápenatý prípadne po rozklade mliečnanov oxidačnými kvasinkami až na  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$ . Tým sa zvýši hodnota pH syroviny a uplatnia sa proteolytické vplyvy plazmínov. U syrov s plesňou na povrchu sa viac uplatňuje ich proteolytická aktivita než lipolytická aktivita. Počas zrenia plesnivých syrov dochádza k rozkladu mliečného tuku vplyvom mikroorganizmov, ktoré štiepia tento tuk. Zmeny tuku spôsobené lipolytickou aktivitou kultúrnych plesní sú významnejšie u syrov s plesňou v ceste. Lipázy katalyzujú syntézu tuku i hydrolytický rozklad pričom vzniká glycerol a mastné kyseliny. Ďalšími reakciami vznikajú aldehydy a ketóny. Optimum lipáz je pri hodnotách pH 5,0 až 5,5 a najväčšiu aktivitu majú pri teplotách 30 až 35 °C. Chlorid vápenatý stimuluje ich účinok. Lipázy surového mlieka sú termolabilné, preto sa pri pasterizácii mlieka inaktivujú. [15]

*P. camemberti* a *P. roqueforti* majú niekoľko extracelulárnych proteolytických enzýmov, metaloproteináz a asparágových proteináz, vrátane činnosti extracelulárnej karboxypeptidázy. Tieto enzýmy prispievajú ku zreniu syra uvoľnením aminokyselín. *P. camemberti* má extracelulárne lipázy, s alkalickým pH optimom, ktoré vznikajú spoločne s rastom mycélia po niekoľkých dňoch zrenia. *P. roqueforti* má dve lipázy, jednu s kyslým a jednu s alkalickým pH optimom, pričom alkalické lipázy sú aktívnejšie na mliečny tuk. Rozdiel v aróme *P. roqueforti* a *P. camemberti* je spôsobený prítomnosťou dvoch lipáz v *P. roqueforti*. [19]

### 1.2.14 Aróma syrov

Kvasinky produkujú aromatické zlúčeniny, etanol, aldehydy, estery a degradujú aminokyseliny na amoniak a zodpovedajúce ketokyseliny. Ďalej metabolizmus poskytuje mnoho zlúčenín, ako sú alkoholy, estery, ketóny metylestery a karbonylové zlúčeniny.

*G. candidum* produkuje oveľa aromatickejšie zlúčeniny z metionínu oproti kvasinkám *D. hansenii* a *K. lactis*. Okrem metylketónov a sekundárnych alkoholov, ešte aj estery, aldehydy, prchavé amíny a amoniak prispievajú k aróme plesnivých zrejúcich syrov. [11]

### 1.2.15 Aróma plesnivých zrejúcich syrov

V dôsledku lipolýzy počas zrenia vznikajú v plesňových syroch voľné mastné kyseliny, ktoré sa oxidatívnou dekarboxyláciou menia na metylketóny a tie sú významným prejavom typickej vône a chuti. Príkladmi metylketónov sú (pentan-2-on až undekan-2-on) ale účinnými sú aj 2 - heptanon a 2 - nonanon. K celkovej aróme syrov s plesňou prispievajú ešte sekundárne alkoholy a alkoholy ako (3 - methylbutanol, 2 - methylbutanol, 3 - oktanol), metyl- a etyl- estery mastných kyselín, čo sú produkty vniknuté proteolýzou mliečnej bielkoviny. V plesnivých syroch sa rozvíjajú i kvasinky, pričom sa udáva prítomnosť *D. hansenii*, *K. lactis* a *Candida* spp.. [15]

Kvasinky v syre Camembert prispievajú k vôni po ružiach (2 - fenylethanol) na začiatku zrenia tohto syra. Amíny nie sú konečné produkty, ale sú podrobené oxidačnej deaminácií za vzniku aldehydov. Aldehydy v syre sú prechodné zlúčeniny, pretože sú rýchlo transformované na alkoholy alebo zodpovedajúce kyseliny. Je možné urýchliť dozrievanie syrov s modrou plesňou o 15 dní s prídavkom extracelulárnych enzýmov k *P. roqueforti*, čím podnietime tvorbu rozpustných dusíkatých zlúčenín, voľných aminokyselín, prchavých mastných kyselín a karbonylovej zlúčeniny. [19]

## 1.3 Rozdelenie syrov

Syry sa podľa spracovania delia na prírodné a tavené. Prírodné syry sa delia podľa viacerých kritérií, vid' Tab. 1, Tab. 2, Tab. 3.

Tab. 1: Rozdelenie podľa obsahu vody v netučnej hmote [8]

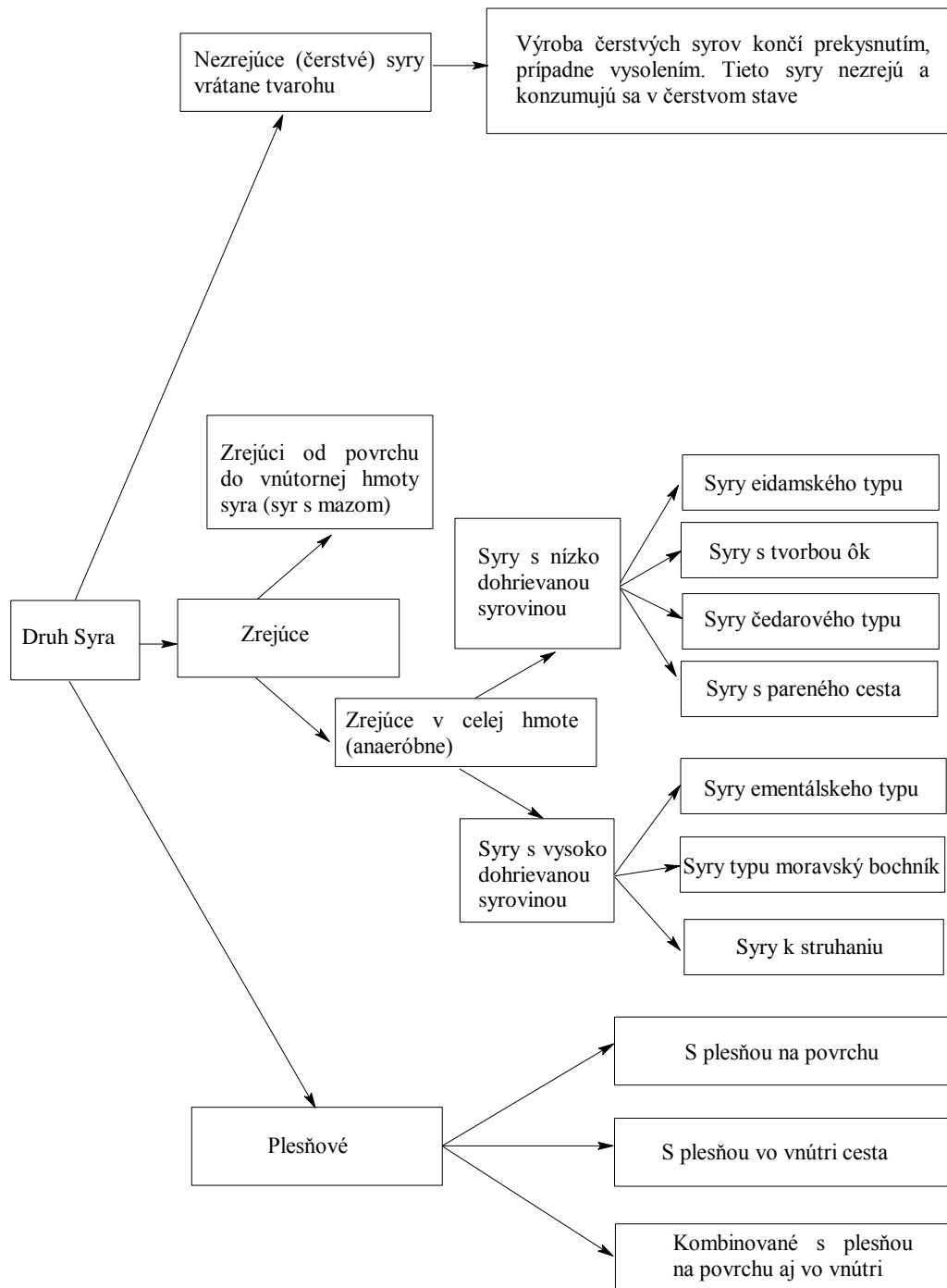
Druh syra	Voda v netučnej hmote [%]
Extra tvrdý	< 51,0
Tvrdý	49,0 – 56,0
Polotvrdý	54,0 – 69,0
Mäkký	Minimálne 67,0

Tab. 2: Rozdelenie podľa obsahu tuku v sušine [8, 18]

Druh syra	Tuk v sušine [hm. %]
Vysoko tučný	≥ 60
Plnotučný	45 – 60
Polotučný	25 – 45
Nízkotučný	10 – 25
Odtučnený	< 10

Tab. 3: Rozdelenie syrov podľa chuti [6, 18]

<b>Druh syra</b>	<b>Charakteristika</b>
Sladké	Vyrábajú sa enzýmovým zrážaním kazeínu syridlom
Kyslé	Získavajú sa zrážaním mlieka okysleného baktériami mliečneho kysnutia, alebo aj pridaním kyselín. Takto sa vyrábajú tvarohy.



Obr. 3: Schéma rozdelenia syrov podľa spôsobu zrenia [8]

### 1.3.1 Plesňové syry

Plesňové syry rozdeľujeme do troch skupín uvedených na Obr. 3 a to s plesňou v ceste plesňou na povrchu a ojedinele sa môžu nájsť aj syry s plesňou v ceste i na povrchu. Prvé dva typy plesňových syrov sa vyrábajú z mlieka skvaseného kultúrou *Lactococcus lactis subsp. lactis* a *L. lactis subsp. cremoris*. V nasledujúcom štádiu sa syry naočkujú, buď z vnútra, kultúrou *P. roqueforti*, kde mycélium huby vytvára zelené sfarbenie vnútornej časti syra, alebo na povrchu kultúrou *P. camemberti* a *P. caseicolum* v syre camembert, kde je biele vatovité mycélium na povrchu syra. Pri oboch druhoch syra vytvára estery kvasinka *K. lactis*

*var. lactis*, ktoré sa zúčastňujú na tvorbe arómy syrov. Ketóny a ďalšie štiepne produkty bielkovín sa podieľajú na charakteristickej vôni a chuti. [2]

#### **1.3.1.1 Syr s plesňou na povrchu - Camembert**

Camembert je francúzsky mäkký syr z Normandie. Je vyrobený zo surového mlieka a má rovnomernú bielu pleseň na povrchu. Camembert sa vyrába dosť kyslý a bochníky zrejú najmenej 21 dní. Pružné cesto počas zrenia zmäkne, ale nerozteká sa. Aróma aj chuť sú ovocné až zreteľne výrazné. Pre výrobu syru Camembert sú predpísané parametre: Priemer musí byť 10,5-11 cm, musí obsahovať najmenej 40 % t. v. s. (stupne obsahu tuku) a v bochníku musí mať najmenej 110 g sušiny. [13]

Tento syr má charakteristickú plesňovú kôru so svetlohnedým mriežkovaním. Cesto slamovožltej farby býva rovnomerne zrelé, bez kriedovitosti v strede. Má čistú bylinkovú arómu s príjemným nádychom húb. Chuť je krémová. Mäkké syry ako Camembert sú charakteristické tradičným výrobným postupom. Mlieko sa nechá mierne ohriať, a potom sa doň vloží syridlo. Približne o hodinu až hodinu a pol sa mlieko zrazí. Hneď potom je tvaroh dostatočne pevný, aby sa plnil do foriem. Syry odtečú, postriekajú sa plesňou *P. camemberti* a slabo solia 3,5 % NaCl. Nakoniec zrejú v pivniciach pri teplote 12 °C a relatívnej vlhkosti 90 % 10 dní. [12, 14]

Pri výrobe syru Camembert sa uplatňujú dve fázy zrenia anaeróbna a aeróbna. Anaeróbne zrenie, nakysnutie mlieka a kysnutie syroviny počas výroby prebieha za pomoci mezofilného zákysu obsahujúceho kultúrne baktérie *L. lactis* ssp. *lactis* a *L. lactis* ssp. *cremoris* v množstve 0,5 až 1,0 %. Počas zrenia rastú na povrchu syrov aj niektoré kvasinky, ktoré aj spolu s hydrolýzou bielkovín na povrchu syrov spôsobujú zmeny v kyslosti syrov. Ich hodnota pH najskôr klesá, teda syr ešte kysne a neskôr pH stúpa, čo znamená, že začala druhá aeróbna fáza zrenia. Táto pleseň je veľmi náročná na prístup kyslíka, preto rastie iba na povrchu syrov. Pri hrúbke 2,5 cm spôsobujú ich aeróbne zrenie enzýmy difundujúce z povrchu do vnútra syrov. [15]

#### **1.3.1.2 Syry s plesňou vo vnútri**

Kultúra *P. roqueforti* sa používa pri výrobe syrov s plesňou v ceste. Táto pleseň je menej náročná na prístup kyslíka, ale jej obsah nesmie klesnúť pod 5 %. Jej rast sa vyznačuje tvorbou modrozelených žiliiek rastu plesne v syre. *P. roqueforti* sa očkuje vo forme vodnej suspenzie jeho spór do mlieka pred jeho koaguláciou syridlom alebo sa jeho spóry rozprašujú na syrovinu. Formované a odkvapkané syry sú solené v soľnom kúpeli a aj prisoľované suchou soľou. Považujú sa za slané syry, pretože obsahujú v hmote až 4 % NaCl. Po solení sú syry prepichované dlhými ihlami tvoriacimi kanálky, ktorými preniká vzdušný kyslík do cesta, lebo pleseň je aeróbna. K aróme a chuti syrov s plesňou vo vnútri prispievajú metylketóny. Okrem toho ketóny inhybujú rast iných nekultúrnych plesní a prílišné prerastanie kultúrnej plesne vo vnútri syrov.

Zrejú počas 2 až 4 týždňov pri nízkej teplote 9 až 12 °C a relatívnej vlhkosti 90 až 95 %. Celková doba zrenia je 5 – 8 týždňov, po tejto dobe sa z povrchu syrov odstráni maz, prípadne pleseň a balia sa do hliníkových fólií a ďalej sa uskladňujú. [15]

### 1.3.2 Syry zrejúce pod mazom - Olomoucké tvarôžky

Olomoucké tvarôžky sa vyrábajú hlavne na Morave vo forme koláčikov s priemerom 45 mm a výškou 8 mm alebo tyčínok s priemerom 20 mm a dĺžkou 100 mm. Surovinou pre ich výrobu je kyslo zrážaný priemyslový tvaroch z odstredeného mlieka. Tvaroch sa po upravení pridaním 3 až 4,5 % kuchynskej soli a 1 až 2-týždňovom skladovaní pomelie valcovým mlynom a formuje automatickým formovacím strojom na tvarôžky vyžadovaného tvaru a hmotnosti. Potom sa ukladajú do sušiarň, kde sa sušia pri teplote 20 až 40 °C. Osušené tvarôžky sa nechajú v zrecích debnách pri teplote 14 až 16 °C a následne sa premývajú v otáčavých bubnových pračkách. Po premytí a odkvapnutí sa nechajú pri teplote 18 až 22 °C zrieť v debnách 4 až 8 dní. Keď sa na nich objaví zlatožltý maz, zabalia sa a nechajú dozrieť v chladnej miestnosti. [6, 12]

Činnosť mikroorganizmov v celom výrobnom procese môžeme rozdeliť do troch fáz. V prvej fáze sa uplatňujú mikroorganizmy smotanového alebo termofilného zákvasu, ktoré koagulujú bielkoviny mlieka. Druhou fázou je rozvoj povrchových mikroorganizmov, ktoré spôsobujú oxidačné procesy. Najdôležitejšími mikroorganizmami sú tu *Candida saitoana*, *C. vini*, *G. candidum*. Kyselina mliečna sa oxiduje za účasti prítomných dehydrogenáz na kyselinu pyrohroznovú, ktorá sa činnosťou ďalších oxidačných enzýmov rozkladá na CO<sub>2</sub> a vodu. Tretia fáza je rast aeróbnych mikroorganizmov. Tvorí ich *B. linens*, prípadne *Lactobacillus casei*, *L. delbrueckii subsp. lactis* a *L. helveticus*. Tieto mikroorganizmy zabezpečujú ďalšie zrenie, teda rozklad bielkovín na albumóny a peptóny a postupne ďalej na aminokyseliny a amoniak. Rozhodujúcim činiteľom charakteristickej vône olomouckých tvarôžkov sú prchavé sírne zlúčeniny, napr. methylmerkaptan. Okrem toho sa na vôni zúčastňujú prchavé voľné mastné kyseliny a iné prchavé látky. [2]

### 1.4 Vplyv kvasiniek na syr

V syroch sa nachádzajú dva typy kultúr: primárne a sekundárne. Primárne kultúry zahŕňajú všetky štartovacie baktérie produkujúce kyselinu mliečnu a sú zodpovedné za produkciu kyseliny pri výrobe syrov a zrenie syrov. Sekundárne a pomocné kultúry sú kvasinky, ktoré rastú predovšetkým na povrchu syra napr. rody *Candida*, *Debaryomyces*, kvasinková plesň *G. candidum*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Yarovia* a *Zygosaccharomyces*, plesne *P. camemberti*, *P. roqueforti* a baktérie, napr. *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Propionibacterium* a heterofermentatívne laktobacily. [10, 11]

Kvasinky sa často nachádzajú v mikroflóre mnohých druhov syrov. Výskyt kvasiniek v syre môže byť pripísaný ich schopnosti rásť pri nízkych teplotách a ich odolnosti proti vysokým koncentráciám solí. Ich úlohou je fermentácia laktózy, asimilácia organických kyselín, ako sú kyselina jantárová, kyselina mliečna a kyselina citrónová, tvoria alkalické metabolity (NH<sub>3</sub>), produkujú potrebné rastové faktory pre baktérie, pôsobia lipolyticky a proteolyticky a rôznymi metabolitmi prispievajú k tvorbe arómy syrov. Kvasinky preto nie sú iba sprievodnou mikroflórou v procese zrenia syrov, ale sú potrebné pri tvorbe arómy. Asimilácia laktátov, tvorba alkalických produktov odkyselňujúcich povrch a vnútro syrov a tvorba rastových faktorov kvasinkami podporuje rozmnožovanie vlastných aeróbnych proteolytických baktérií alebo plesní. [15]

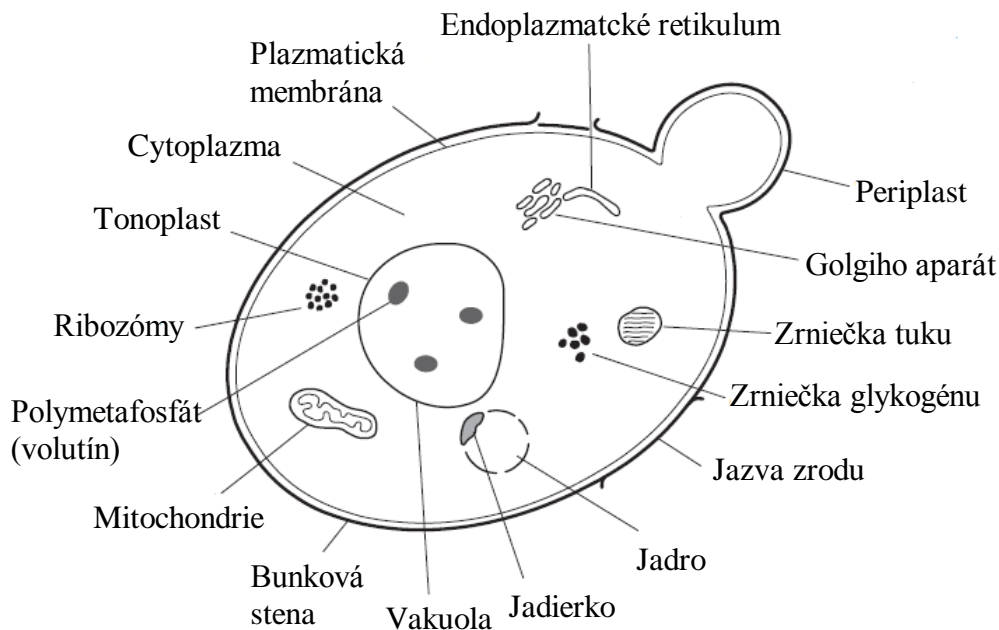
Zloženie kvasinkovej flóry sa mení v závislosti na type syra a technológii zrenia syra. Kvasinky kolonizujú povrchy syrov a používajú sa ako pomocné kultúry. Môžu rásť v raných fázach syrov, napríklad počas srvátkového odvodnenie po lisovaní a pred solením. V tradičných syroch je zdrojom kvasiniek surové mlieko, nádoby a prostredie syrárne. Kvasinky vyskytujúce sa na povrchu syra sú schopné metabolizovať cukry, laktát a citrát. *K. marxianus* a *D. hansenii* sú schopné kvasiť laktózu a sú používané ako pomocné látky. Degradácia laktátu vedie k odkyseleniu na povrchu syra a zvýšeniu pH, ako aj stimulácií rastu plesní, *Corynebacterium* a proteolýze syrov. Odkyselenie syrov degradáciou laktátu a alkalických metabolitov, ako je amoniak, spôsobí zmäknutie syru. Prchavé aromatické zlúčeniny síry pochádzajúce z metabolizmu metionínu a cysteínu sú veľmi nestále a majú veľmi silný nežiaduci vplyv na arómu syra (cesnak, kravín, fekálie, kapusta). [10, 11, 19]

### **1.5 Charakteristika kvasiniek**

Kvasinky sú heterotrofné eukaryotné mikroorganizmy, patriace medzi huby. Väčšina druhov je schopná skvasovať monosacharidy a niektoré disacharidy, prípadne trisacharidy na etanol a oxid uhličitý. Rozmnožujú sa vegetatívne pučaním alebo delením. Majú tvar elipsoidný, vajcovitý, guľatý, citronovitý, trojuholníkovitý a valcovitý. Šírka buniek väčšiny kvasiniek je v rozmedzí 3 - 6  $\mu\text{m}$ . Kvasinky sú mikroorganizmy dôležité pre potravinársky priemysel, a prispievajú pozitívnym spôsobom na spracovanie alebo zrenia vína, piva, chleba, niektorých syrov a kefirových nápojov. Kvasinky spotrebúvajú kyselinu mliečnu, čo má význam pri zrení syrov, pretože tým pripravujú podmienky pre rast mikromycét. Okrem toho sa využívajú na prípravu kvasinkových živných pôd rozmnožením v srvátke. Kvasinky sa zúčastňujú aromatizácie mliečnych výrobkov. [1, 2, 20]

### **1.6 Cytológia kvasiniek**

Vegetatívna kvasinková bunka sa skladá zo silnej bunkovej steny, jemnej cytoplazmatickej membrány, cytoplazmy, ktorá obsahuje membránové štruktúry a jadra, ktoré je od cytoplazmy oddelené dvojitou jadrovou membránou. [20] Schému prierezu bunkou kvasiniek udáva Obr. 4.



Obr. 4: Schéma prierezu bunkou kvasiniek [21]

### 1.6.1 Bunková stena

Bunková stena je vonkajšia vrstva bunky s pevnou konštrukciou, ktorá dáva bunke tvar a chráni ju pred mechanickými vplyvmi a osmotickým šokom. Predstavuje približne 20 % celkovej sušiny bunky. Je tvorená veľkými pórmí, ktorými môžu voľne prechádzať všetky zlúčeniny okrem vysokomolekulárnych polysacharidov a bielkovín. Hlavnou zložkou bunkovej steny kvasiniek sú polysacharidy, ktoré predstavujú 80 % sušiny bunkovej steny, zvyšok tvoria bielkoviny ktoré predstavujú 6 až 10 % sušiny steny. Stenové polysacharidy kvasiniek sú tvorené z glukánov. V stene kvasiniek je aj malé množstvo lipidov a fosfolipidov, ktoré tvoria 3 až 10 % a fosforečnany, viazané esterovými väzbami na polysacharidy. Tieto fosfátové zvyšky spolu so skupinami  $-COOH$  bielkovín dávajú bunkám kvasiniek negatívny náboj. [20, 21]

### 1.6.2 Cytoplazmatická membrána

Cytoplazmatická membrána kvasiniek, nazývaná plazmaléma, je pomerne tenká, hrúbky 7,5 až 8 nm, zložená z lipidov a proteínov, vytvára početné vychlípeniny vybiehajúce do cytoplazmy. Je priepustná iba pre malé molekuly bez náboja, a tým tvorí osmotické rozhranie medzi bunkou a vonkajším prostredím. Je sídlom transportných mechanizmov, umožňujúcich príjem určitých látok bunkou a transport látok z bunky do prostredia. Neobsahuje dýchacie enzýmy ani systém oxidačnej fosforilácie v porovnaní s baktériami. [20]

### 1.6.3 Cytoplazma

Cytoplazma kvasiniek je prehľadná homogénna hmota, u starších buniek sa objavujú zrníčka a jemná alebo väčšia vakuolizácia. Sú tu prítomne bunecné organely ako endoplazmatické retikulum, Golgiho aparát, mitochondrie a vakuoly. Okrem bunkových organel sa v cytoplazme kvasiniek nachádzajú zrníčka rezervných látok ako volutín

a glykogén. Ďalej sa v cytoplazme nachádzajú ribozómy, ribonukleové kyseliny, enzýmy, nukleozidy, medziprodukty metabolizmu vrátane niektorých vitamínov, aminokyselín a anorganických iónov. Sú tu umiestnené i enzýmy niekoľkých hlavných metabolických dráh napríklad glykolýzy a syntézy mastných kyselín. [20, 21]

#### **1.6.4 Endoplazmatické retikulum**

Endoplazmatické retikulum je systém dvojitého membrán. Na vonkajšom povrchu oboch membrán sú zrníčka polyzómov, teda agregátov ribozómov, v ktorých sa syntetizujú bielkoviny. [20]

#### **1.6.5 Golgiho aparát**

Golgiho aparát má tvar plochého mechúriku alebo niekoľkých prepojených plochých mechúrikov teda cisterien uložených rovnobežne vedľa seba. Funkciou tohto aparátu je transportovať stavebné kamene bunkovej steny z cytoplazmy cez cytoplazmatickú membránu. [20]

#### **1.6.6 Mitochondrie**

Mitochondrie sú štrukturálne útvary veľmi rozmanitého tvaru, široké 0,3 až 1  $\mu\text{m}$  a dlhé až 3  $\mu\text{m}$ . Majú dve membrány oddelené medzibunkovým priestorom: vnútorná membrána tvorí hlboké vychlípeniny nazývané kristy, vonkajšia membrána má bradavičnatý povrch. Mitochondrie sú zložené hlavne z bielkovín, lipidov a fosfolipidov. Obsahujú RNA a malé množstvo DNA, ktorá je nositeľom mimo jadrovej dedičnosti kvasiniek. Sú miestom elektrónového transportného reťazca a oxidatívnej fosforylácie čo vedie k tvorbe ATP. Okrem toho, sú tu enzýmové systémy pre prenos metabolitov dnu i von z mitochondrií. [20, 21]

#### **1.6.7 Vakuola**

Vakuola je guľovitý útvar obklopený jednoduchou membránou, ktorá vysiela úzke výbežky do cytoplazmy. Veľkosť a počet vakuol v bunke závisí na fyziologickom stave bunky a fáze bunkového cyklu. U mladých alebo pučiach buniek sú prítomné malé vakuoly, často vo väčšom počte, na rozdiel od zreých starých buniek, ktoré obsahujú iba jednu veľkú vakuolu. Vo vnútri vakuol sú uložené hydrolytické enzýmy, proteínázy, ribonukleáza a esteráza. Vakuoly majú podobnú funkciu ako lyzozómy u vyšších organizmov, teda sú miestom rozpadu štruktúr bunky, ktoré sa neustále v bunke rozkladajú a obnovujú a majú krátky polčas rozpadu. Slúžia ako dočasné zásoby metabolitov a fungujú ako úložisko pre metabolity obsahujúce dusík. [20, 21]

#### **1.6.8 Cytoskelet**

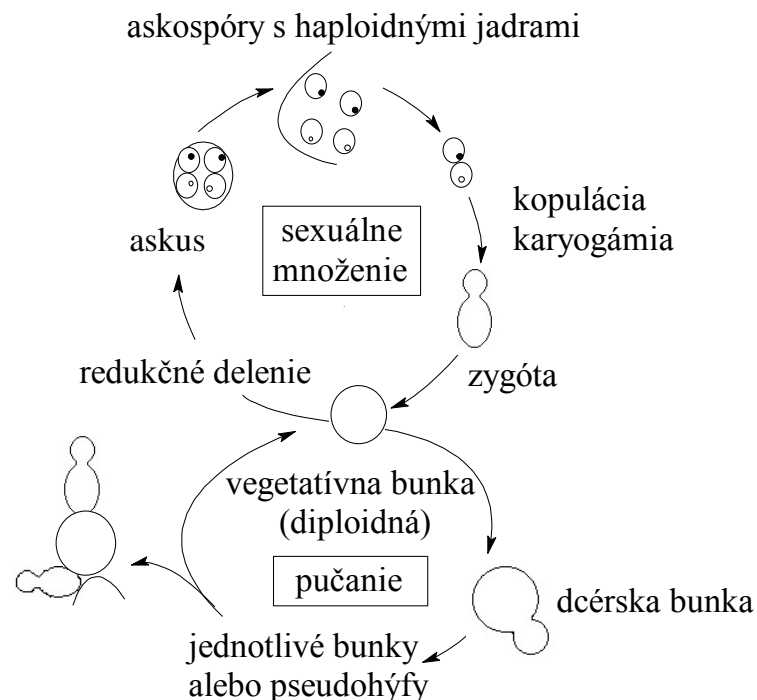
Cytoskelet je sieť proteínových vlákien, ktoré sa rozprestierajú v cytoplazme i v jadre a umožňujú vnútrobunecný pohyb organel z jedného miesta na druhé. V cytoskelete hrajú významnú úlohu mikrotubuly, čo sú pomerne málo ohybné trubice zložené z bielkoviny nazývanej tubulín. Každá molekula tubulínu obsahuje GTP, ktorý je zdrojom energie pre jej zapojenie do mikrotubulu. [20]

## 1.6.9 Jadro

Najdominantnejšou organelou v bunke kvasiniek je jadro, ktoré je od cytoplazmy oddelené dvojistou jadrovou membránou s veľkými pórmami a je umiestnené približne v centre bunky. Jadro kvasiniek (karyoplazma) býva najčastejšie okrúhle, s priemerom 1,7 až 1,8  $\mu\text{m}$ . Ako hlavné chemické zložky obsahuje nukleoproteíny, najmä kyselinu deoxyribonukleovú. U najlepšie preskúmanej kvasinky *S. cerevisiae*, bolo zistené 16 chromozómov v haploidnom jadre. Diploidné jadro má dvojnásobný počet chromozómov, pretože každý chromozóm sa v ňom vyskytuje dvakrát. Jadro obsahuje genetickú informáciu bunky, ktorá je zakódovaná v DNA. Určitý úsek DNA chromozómu, ktorý hrá dôležitú úlohu pri delení chromozómu a ich segregácii pri delení jadra sa nazýva centroméra. Kvasinkové chromozómy obsahujú chromatín, ktorý sa skladá z histónov. V jadre kvasiniek je jadierko, uložené tesne pod jadrovou membránou. Jadierko je miesto rRNA transkripcie a niektorej z počiatočných fázach spracovania mRNA. Ďalej je v jadre pólóvé teliesko vretienka, ktoré má tvar disku a vychádzajú z neho vlákna zvané mikrotubuly. Mikrotubuly sú zložené z bielkoviny tubulínu a spolu s telieskom hrajú dôležitú úlohu pri delení jadra počas rozmnožovania buniek. [3, 20, 21]

## 1.7 Vegetatívne a pohlavné rozmnožovanie kvasiniek

Vegetatívne a pohlavné rozmnožovanie kvasiniek udáva nasledujúce zjednodušené schéma vid' Obr. 5.



Obr. 5: Vegetatívne a pohlavné rozmnožovanie kvasiniek [15]

### 1.7.1 Vegetatívne rozmnožovanie

Vegetatívne rozmnožovanie pučaním sa vyskytuje u väčšiny rodov kvasiniek. Pri pučaní je vznikajúca dcérina bunka (púčik) spojená s materskou bunkou prostredníctvom kanálíku. Púčik dorastá takmer do veľkosti materskej bunky, potom sa odškrcuje a oddeľuje

od materskej bunky. Pred samotným pučaním dochádza k splynutiu membrán endoplazmatického retikula a k jeho deleniu ako i následne k opakovanému rozdeleniu vakuol a k zmene tvaru mitochondrií. Po vzniku púčiku do neho vstupujú drobné vakuoly a mitochondrie. Nasleduje mitotické delenie jadra a jeho migrácia k púčiku spolu s ďalšími zložkami cytoplazmy. Kanálik medzi materskou a dcérinou bunkou sa uzavrie cytoplazmatickou membránou a v púčiku sa syntetizuje a rozširuje endoplazmatické retikulum. Vo väčšine prípadov sa dorastená dcérina bunka od bunky materskej oddelí alebo zostanú spojené a po niekoľkých deleniach sa vytvoria bunečné zväzky. Celý cyklus bunečného delenia trvá u kvasiniek za optimálnych podmienok približne dve hodiny. [3, 20]

### 1.7.2 Pohlavné rozmnožovanie

Pri pohlavnom rozmnožovaní dochádza k spájaniu dvoch haploidných buniek teda konjugácii a karyogamii za vzniku diploidného jadra. Následne sa diploidné jadro delí meiózou na štyri haploidné jadrá, tie sú potom základom pohlavných spor, alebo sa delia ďalšou mitózou, po ktorej už vznikajú spory. Životný cyklus kvasiniek pravidelne strieda haploidná a diploidná fáza bunky. Výsledkom pohlavného rozmnožovania sú pohlavné spory. Ak sa jedná o askospory, čo sú endospory umiestnené v asku tieto kvasinky radíme medzi *Ascomycotina*. Tvar askospor môže byť guľovitý, elipsoidný, ľadvinovitý, kosákovitý, klobúkovitý, saturnovitý, vretenovitý až ihlovitý. Povrch askospor je zvrásnený až bradavičnatý. Niektoré rody kvasiniek tvoria bazídiospóry pohlavné exospory, umiestnené z vonkajšej strany spórotvorných buniek. Tieto rody radíme medzi *Basidiomycotina*.

U asporogénnych kvasiniek prebieha spájanie dvoch haploidných buniek naraz zo spájaním ich jadier (karyogamii), vznikne diploidná bunka zvaná zygota. Po vytvorení zygoty môže nastať vegetatívne rozmnožovanie v diploidnom stave. Potom dochádza k sporulácii diploidných buniek. Celá bunka sa premení vo vrečko teda askus.

Pri spájaní dvoch takmer rovnako veľkých buniek, hovoríme o izogamnom spájaní. O heterogamnom spájaní hovoríme keď ide o splnutie veľkej bunky s malou, napr. materskej bunky s bunkou dcérskou. Heterogamné spájanie je možné iba u homotalických kmeňov. [20]

## 1.8 Najvýznamnejšie rody kvasiniek nachádzajúce sa v syre

Z mliekarensky dôležitých rodov kvasiniek je rod *Kluyveromyces* (*K. lactis* var. *lactis*, *K. marxianus*), rod *Pichia*, rod *Candida* (*C. vini*, *C. krusei*, *C. lipolytica*, *C. holomii*, *C. lactis-condensi*, *C. globosa*) a rod *Rhodotorula*. Typická flóra zrejúcich syrov, sa skladá hlavne z *D. hansenii*, *G. candidum*, *K. marxianus* a *Y. lipolytica*. *D. hansenii* a *K. marxianus* sú predovšetkým v syroch s modrou plesňou a *K. marxianus* a *Candida zeylanoides* sú obvykle izolované z čerstvých syrov. [2, 11]

### 1.8.1 Rod *Kluyveromyces*

Rod *Kluyveromyces* v súčasnosti obsahuje šesť druhov. Najvýznamnejšie sú *K. lactis* a *K. marxianus*. Množí sa multilaterálnym pučaním a tvorí pseudomycélium. Askospóry sú guľovité a ľadvinovité. Spóry ľahko opúšťajú asky. Používa sa na fermentáciu mliečnej srvátky za účelom výroby kvasničnej hmoty. Sú schopné asimilovať a kvasiť laktózu,

vstrebať kyselinu mliečnu a hydrolyzovať kazeín. *Kluyveromyces* sú typicky osmotolerantné, ale nerastú v prítomnosti 10 % chloridu sodného. [15, 22]

#### **1.8.1.1 Druh *Kluyveromyces marxianus***

*K. marxianus* je často izolovaný z cukrovej trstiny, sušených fig, melasy, syru, jogurtu, kefiru, surového mlieka, šunky, piva, vína, nealkoholických nápojov, ovocnej šťavy, pekárskeho droždia, čerešní, sliviek, ríbezlí, cibule, smotany, a kakaa. *K. marxianus* je relatívne termotolerantný a je schopný rásť pri 48 °C v porovnaní s *K. lactis*, ktorý rastie pri 47 °C. *K. marxianus* dokáže rásť i pri nízkych teplotách ako sú 6 – 10 °C a pri pH 8,0, ale je inhibovaný pri pH 3,0 v anorganickom pufri a k rastu už nedochádza pri pH 2,5 v citrát - fosfátovom pufri. [15, 22]

#### **1.8.2 Rod *Candida***

Jedná sa o veľmi veľký heterogénny rod obsahujúci približne 200 druhov. Do tohto rodu sa zaradujú asporogénne kvasinky, rozmnožujúce sa multilaterálnym pučaním a vytvárajúce veľmi ľahko pseudomycélium, diferencované na reťazovité bunky a blastospóry. Endospóry nevytvárajú. Na kvapalných substrátoch zvyčajne vytvárajú bielu, vráskavú pokožku, povlak (z lat. candidus = biely). Tvorbu povlaku silne podporuje dostatok vzduchu. Bunky sú nepravidelné podlhovasté, klobásovité alebo fľaškovité. Ich tvar ovplyvňuje najmä množstvo vzdušného kyslíka. Plazma buniek obsahuje niekoľko tukových kvapôčok silne lámajúcich svetlo. Priamo skvasujú glukózu a fruktózu. Alkohol a kyseliny oxidujú až na CO<sub>2</sub>. Kvasinky tohto rodu sú v prírode veľmi rozšírené, najmä na všetkých druhoch ovocia a označujú sa aj ako *Toruly*, *Torulopsis* a *Monilia*. Najvýznamnejšími zástupcami tohto rodu sú *C. mycoderma*, *C. albicans*, *C. utilis*, *C. pulcherrima* a *C. krusei*. [3, 22]

##### **1.8.2.1 Druh *Candida parapsilosis***

Bol izolovaný z masla, syrov, šalátových dressingov, jogurtov, zo surového a spracovaného mäsa, rýb, ovocia, ovocných výrobkov, nakladanej zeleniny, nealkoholických nápojov, piva, vína, chleba, mrkvy a kukurice. Má lipolytické vlastnosti. [3, 22]

##### **1.8.2.2 Druh *Candida tropicalis***

Bunky ľahko tvoria pseudomycelium, rozmnožujú sa pučaním, sú oválne v rozmedzí 4 až 6 x 8 až 10 µm. Dobře skvasuje maltózu a sacharózu, neasimiluje dusičnan. Izoluje sa z mlieka a mliečnych produktov. [15]

#### **1.8.3 Rod *Debaryomyces***

Tento rod je charakteristický heterogamným spájením ale v menšej miere sa vyskytuje i izogamné spajanie. Spory sú oválne a majú bradavičnatý povrch. Kvasné schopnosti sú slabé a niektoré druhy ani cukry nezkrvasujú. Druhy rodu *Debaryomyces* dobre rastú v prítomnosti 50 % glukózy. [20]

### **1.8.3.1 Druh *Debaryomyces hansenii***

Druh *D. hansenii* má bunky guľaté až krátko oválne, netvorí pseodomycélium. Na tekutých produktoch často vytvára bielu kožu. Po splynutí materskej a dcérinej bunky vznikne v materskej bunke askus najčastejšie s jednou bradavkovitou spórou. Fermentuje iba slabo. Vyskytuje sa na mliečnych produktoch. [15]

### **1.8.4 Rod *Pichia***

Bunky sú oválne až podlhovasté, množia sa multilaterálnym pučaním. Tvorí pseudomycélium. Askospory môžu mať tvar kloboukovitý, guľovitý, saturnovitý alebo hranatý a rýchle opúšťajú askus. Tento rod má nízke kvasné schopnosti, pretože jeho druhy buď skvasujú glukózu alebo neskasujú žiadny cukor. Rod *Pichia* sa podieľa na kontaminácii piva, vína hlavne v zle uzavretých fľaškách. Vyskytuje sa v ovocných šťavách, majonéze a kyslej kapuste ako škodca. Najznámejšie druhy sú *P. membranaefaciens*, *P. methanolica*, *P. pastoris* a *P. stipitis*, ktorý dokáže skvasovať D-xylózu. [15, 20, 29]

#### **1.8.4.1 Druh *Pichia membranaefaciens***

Slabo fermentuje glukózu. Tvorí 1-4 askospóry v asku. Neasimiluje dusičnan. Spôsobuje kontamináciu fermentovaných nápojov ako je pivo a víno. [20]

### **1.8.5 Rod *Geotrichum***

Tento rod tvorí prechod medzi kvasinkami a plesňami. Jediným zástupcom tohto rodu je *G. candidum*. Má biele zamatové až vatovité kolónie a mycélium s artrosporami. Nemá kvasné schopnosti. Podieľa sa na kontaminácii mliečnych výrobkov, droždia, kyslej kapusty a masa, pretože obsahuje proteolytické a lipolytické enzýmy. [20]

#### **1.8.5.1 Druh *Geotrichum candidum***

Rozmnožuje sa rozpadom hýf na oidie, ktoré majú obdĺžnikový tvar. Najčastejšie majú rozmery 3 až 7 x 8 až 18 µm. Ich plazma je jemne zrnitá s vakuolami. *G. candidum* rozkladá sacharidy, tuky aj bielkoviny. Vyznačuje sa oxidačnou činnosťou, stravuje organické kyseliny, prípadne ich soli, etanol. Na mlieku a mliečnych výrobkoch tvorí chlpatý povlak, ktorý neskôr prechádza na slizovitý žltej farby. V mliekarskej mikrobiológii je veľmi rozšírená, preto má aj triviálny názov „mliečna pleseň“.

*G. candidum* sa technologicky využíva pri výrobe mäkkých syrov a kyslých syrov. Svojou oxidačnou činnosťou oxiduje kyselinu mliečnu na povrchu kyslej syreniny (za prístupu vzdušného kyslíka) na CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O, čím zvyšuje hodnotu pH a vytvára priaznivé podmienky pre rast mazovej kultúry (olomoucké tvarôžky, mäkké syry zrejúce pod mazom). Má dobrú proteolytickú a lipolytickú aktivitu. Na kultivačných médiách tvorí okrúhle biele kolónie. Nie je náročná na kyslík preto ju môžeme nájsť vo vnútri masla a jedlých emulgovaných tukov, kde vplyvom lipolýzy vyvoláva ich žltnutie. Uplatňuje sa vo fermentačnom priemysle pri výrobe kýmnych bielkovín a biosyntéze tukov. [15, 20]

## 1.9 Negatívne účinky kvasiniek na kvalitu potravín

Kvasinky majú v potravinárskej technológii dvojaký význam, ako technologicky využívané mikroorganizmy vo fermentačnom priemysle pri výrobe piva, vína, liehu, kvasníc pri výrobe pekárskeho produktu ale aj ako škodcovia mäsa, rýb, hydiny, výrobkov studenej kuchyne, mliečnych produktov, fermentovaných potravín, výrobkov s vysokým obsahom cukru. [15]

Kvasinky sa šíria a metabolizujú lepšie ako baktérie v extrémnych podmienkach životného prostredia, pokiaľ ide o pH, aktivity vody a nízke teploty, a v dôsledku toho sa často podieľajú na kazení potravín. Sú schopné rýchleho rastu a prežitia za stresových podmienok, kedy iné mikroorganizmy nie sú konkurenčné. Aj keď kvasinky spôsobujú kazenie potravín, nie je známe, že by spôsobovali otravu jedlom. Medzi typické účinky rastu kvasiniek v potravinách a nápojoch patrí produkcia kyseliny alebo plynu, čo vedie k zákalu, a zmene v chuti, farbe alebo k nepríjemnej vôni. Kvasinky zvyčajne kazia konzervované potraviny s vysokým obsahom kyselín, zníženou aktivitou vody ( $a_w$ ), nízkym pH, s vysokým obsahom cukru (> 10 %), s vysokým obsahom soli (> 5 %) alebo slabšej organickej kyseliny (citrónová, octová, benzoová kyselina). Mliečne výrobky sú obzvlášť citlivé na znehodnotenie kvasinkami. Nasledujúce vlastnosti kvasiniek podporujú ich rast a prevahu v mliečnych výrobkoch:

1. fermentácie a asimilácie laktózy v dôsledku výroby  $\beta$  - galaktozidázy
2. produkcia extracelulárnych proteolytických enzýmov
3. produkcia extracelulárnych lipolytických enzýmov
4. asimilácia kyseliny mliečnej
5. asimilácia kyseliny citrónovej
6. rast pri nízkych teplotách
7. tolerancia zvýšenej koncentrácie soli

Najbežnejším príkladom je jogurt, kde sú kvasinky hlavnou príčinou znehodnotenia konečného produktu. Čerstvo fermentované jogurty sú bez kvasiniek, pretože zložky sú tepelne ošetrené (vysoká pasterizácia) pred kvasením a kvasinky sú organizmy citlivé na teplo. Nevyzreté čerstvé syry vrátane tvarohu sú tiež náchylné na znehodnotenie spôsobené kvasinkami. Kvasinkové populácie, často vznikajú počas skladovania hotového produktu pri teplotách (5 - 10 °C). Kvasinky spôsobujúce kazenie mliečnych výrobkov sú napr. *K. marxianus*, *Zygosaccharomyces bailli*, *Candida spp.*, *Pichia spp.*, alebo *Rhodotorula spp.* Kvasinky sú kontaminanty tukov a predstavujú veľký problém v spracovateľskom priemysle ovocia vďaka svojej schopnosti rásť pri nízkom pH a vysokým obsahom cukru. Čerstvá a spracovaná zelenina sú podobne náchylné k znehodnoteniu kvasinkami. Kľúčové druhy podieľajúce sa na kazení potravín sú *C. parapsilosis*, *C. holmia*, *C. krusei* a *C. tropicalis*. *C. tropicalis* je aj ľudský patogén, a je príčinou kvasinkových infekcií, a to predovšetkým u imunokompromitovaných jedincov, ktorí majú poškodené prirodzené obranné mechanizmy. *C. parapsilosis* je tiež patogénny pre človeka. [1, 22, 26]

### 1.9.1 Mikrobiologické chyby syrov spôsobené kvasinkami

Určité druhy kvasiniek sú užitočnými mikroorganizmami pri zrení niektorých syrov, ale na iných sú zase nevítané. K zisteniu nežiaducich kvasiniek na povrchu zrejmých syrov

prispieva ich výrazná metabolická aktivita typická tvorbou CO<sub>2</sub> a alkoholu. Syry porastené kontaminujúcimi kvasinkami nadobúdajú kvasničnú chuť a arómu pripomínajúcu kysnuté chlebové cesto. Kvasinky pri hydrolýze tuku uvoľňujú mastné kyseliny a môžu spôsobiť žklú chuť a ich esterifikácia s alkoholmi má za následok vznik ovocnej chuti a vône. Prítomnosť kontaminujúcich kvasiniek na povrchu syrov býva sprevádzaná ich osliznutím. Dôvodom výskytu kontaminujúcich kvasiniek a iných mikroorganizmov na povrchu syrov je neprimeraná vlhkosť ich povrchu. Významným zdrojom kontaminujúcich kvasiniek sú soľné kúpele. Vlhké syry pochádzajúce zo soľných kúpeľov podporujú rast kontaminujúcich kvasiniek. Najčastejšie izolované sú kvasinky *Candida spp.*, *Y. lipolytica*, *K. marxianus*, *G. candidum*, *D. hansenii* a *Pichia spp.* [15]

### **1.10 Identifikácia kvasiniek metódou PCR-RFLP**

RFLP (polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov) u produktov PCR je určený k rozpoznávaniu mikroorganizmov. Výsledkom PCR sú amplikóny (úseky DNA o rovnakej dĺžke), ktoré sú následne štiepené reštrikčnými endonukleázami na fragmenty, ktoré sú oddelené elektroforézou. Získané dĺžky fragmentov typových organizmov slúžia potom k taxonomickému zaradeniu analyzovaných mikroorganizmov. [5]

Identifikácia kvasiniek metódou PCR-RFLP prebieha v niekoľkých krokoch

1. Izolácia DNA z kvasinkových kmeňov,
2. Amplifikácia zvoleného úseku DNA metódou PCR,
3. Reštrikčná analýza amplifikovaných fragmentov,
4. Detekcia pomocou elektroforézy na agaróze.

#### **1.10.1 Izolácia (extrakcia) a purifikácia nukleových kyselín**

Prvou fázou je extrakcia DNA alebo RNA z buniek a ich oddelenie od ostatných bunčných zložiek. Cieľom purifikačných metód je získať nukleovú kyselinu v natívnom stave, v dostatočnom množstve a čistote. Metódy izolácie nukleových kyselín využívajú rozdielnej rozpustnosti biologických makromolekúl, adsorpcie na pevný podklad alebo ultracentrifugáciu v gradientových roztokoch. Výber metódy závisí na následnej analýze. Napr. Polymerázová reťazová reakcia nevyžaduje veľké množstvo vstupného materiálu. Rozoznávame dva typy izolácie a purifikácie nukleových kyselín:

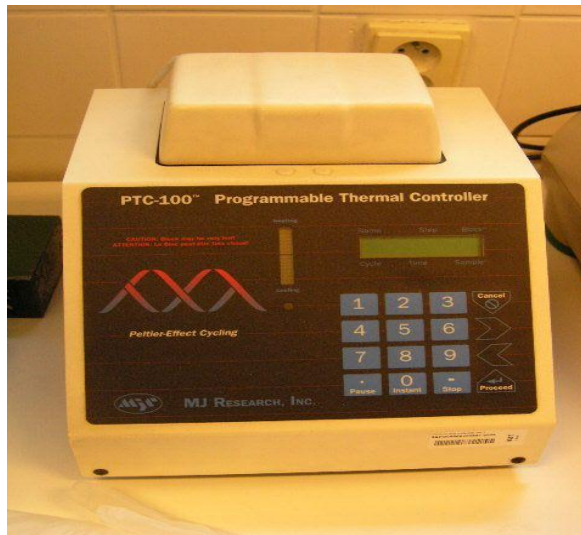
1. Fenolová extrakcia
2. Izolácia a purifikácia za použitia komerčných setov [23]

#### **1.10.2 Polymerázová reťazová reakcia**

PCR je založená na replikácii nukleových kyselín, ktorá je základným molekulárnym procesom všetkých živých organizmov. Princípom PCR je cyklicky sa opakujúca enzýmová syntéza nových reťazcov vybraných úsekov DNA v smere 5'→3' pomocou DNA polymerázy. Vybraný úsek nukleotidovej sekvencie je vymedzený pripojením 2 primérov, ktoré sa viažu na protilahlé reťazce DNA tak, že ich 3'-konce smerujú proti sebe. Prídavkom DNA polymerázy a nukleotidu, začne prebiehať syntéza nových vlákien na oboch matricových reťazcoch protismerne. Na syntézu DNA sa používajú termostabilné polymerázy izolované z termofilných mikroorganizmov, ktoré sú stále i pri teplote 95°C. Príkladom je

*Taq* DNA polymeráza, izolovaná z *Termus aquaticus*, ktorý odoláva teplote (94 °C), pri ktorej DNA denaturuje. V tejto fázi sa DNA rozdelí na dva komplementárne reťazce nazývané templáty. Sú pridané dva priméry, ktoré sú komplementárne ku koncovým sekvenciám oblasti, ktorá má byť amplifikovaná. V reakčnej zmesi sú teda prítomné všetky štyri deoxynukleotidy (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), DNA polymeráza a dva priméry, syntetické deoxynukleotidy (dĺžky 18 – 24 nukleotidov). Za zníženej teploty (30 – 65 °C) priméry nasadnú na komplementárne úseky DNA a od nich začne syntéza DNA prostredníctvom DNA polymerázy (65 – 75 °C). *Taq* DNA polymeráza pri tejto teplote syntetizuje DNA rýchlosťou približne 60 bázi/s. Po dobehnutí replikácie celej molekuly DNA sa opäť zvýši teplota, aby došlo k denurácii DNA a po opätovnom znížení teploty začne nový cyklus replikácie, pretože v reakčnej zmesi je nadbytok všetkých deoxynukleotidov i primerov. To umožňuje, aby syntéza DNA prebiehala opakovane formou cyklu. Reakcie sa uskutočňujú v termocykléri (viď Obr. 6) v ktorom sa teplota mení automaticky v naprogramovaných časových intervaloch. Zdroj DNA pre PCR sú rôzne biologické materiály ako napr. hrubé extrakty z krvi, telesné tekutiny, kultúry mikroorganizmov. Výsledkom PCR sú úseky DNA definovanej dĺžky o veľkosti desiatok až tisíc bp, analogické reštrikčným fragmentom. K identifikácii a separácii týchto fragmentov DNA slúži elektroforéza v agarózovom alebo polyakrylamidovom gélu. [20, 23, 24, 30]

Amplifikácie za použitia primerov produkovaných DNA, môžu byť použité pre identifikáciu a uľahčujú typizáciu kmeňov mnohých organizmov porovnaním veľkosti amplikónu s jeho štiepanými vzormi. [5]



Obr. 6: Termocyklér

### 1.10.3 Stanovenie polymorfizmu dĺžky reštrikčných fragmentov v produktoch PCR (PCR-RFLP)

PCR-RFLP je metóda, v ktorej je konkrétna sekvencia nukleovej kyseliny amplifikovaná pomocou PCR a amplikón následne rozštiepi štyri páry báz a rozpozná enzým endonuklázy pre vytvorenie zakázaného vzoru. PCR-RFLP je alternatíva štandardnej PCR používaná pre typizáciu cieľovej sekvencie génu, obsahujúceho sekvenčný polymorfizmus. Amplifikácia prebieha za prísnych podmienok pomocou primerov, ktoré sa pripájajú ku koncovým

konzervovaným oblastiam. Na voľbe primerov závisí uskutočnená analýza akéhokoľvek génu. Po amplifikácii získame produkty PCR o rovnakej dĺžke, ktoré sa identifikujú elektroforeticky. Tieto produkty sú ďalej štiepené reštrikčnou endonukleázou a potom opäť podrobené identifikácii elektroforézou v agarózovom gélu. Vzorky sú typizované reštrikčnými spektrami fragmentov amplifikovanej DNA. [1, 23]

#### ***1.10.3.1 Enzyмы používané k stanoveniu a úpravám nukleových kyselín***

Reštrikčné endonukleázy sú špecifické endonukleázy, produkované kmeňmi baktérií. Ich prirodzenou funkciou je degradácia cudzorodej DNA, tým že rozpoznáva sekvenciu DNA a štiepi molekuly DNA hydrolýzou fosfodiesterových väzieb oboch reťazcov v reštrikčnom mieste teda v mieste štiepenia, ktoré sa nachádza vo vnútri rozpoznávacieho miesta alebo blízko neho. Rozpoznávacie (cieľové) miesto reštrikčných enzýmov je tvorené krátkou 4 - 8 nukleotidovou sekvenciou dvojreťazcovej DNA. Výsledkom štiepenia sú úseky DNA o definovanej dĺžke nazývané ako reštrikčné fragmenty. Reštrikčné enzýmy môžu byť použité k mapovaniu DNA. Polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov zahŕňa rozdiely v reštrikčných mapách jedincov toho istého druhu podmienené rôznou dĺžkou a počtom reštrikčných fragmentov vytvorených štiepením genómovej DNA určitou reštrikčnou endonukleázou. Rozdiely vo veľkosti reštrikčných fragmentov u rôznych jedincov sa dajú jednoducho identifikovať gélovou elektroforézou. [23, 31]

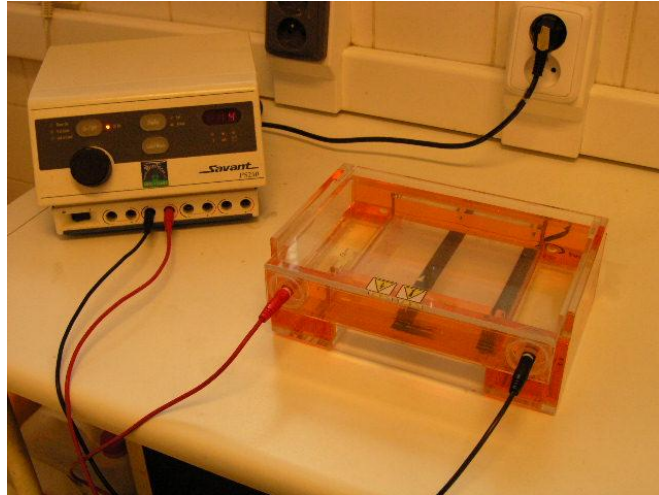
#### **1.10.4 Detekcia nukleových kyselín pomocou elektroforézy**

Elektroforéza patrí v molekulárnej biológii k najpoužívanejším separačným technikám pri izolácii a analýze nukleových kyselín. Zaradujeme ju medzi elektromigračné techniky, ktoré využívajú k separácii pohyb nabitých častíc v elektrickom poli, kde sa pohybujú konštantnou rýchlosťou úmernou veľkosti ich náboju, anionty k anóde a kationty ku katóde. Hlavným nositeľom náboja nukleových kyselín sú negatívne nabité fosfátové skupiny, a preto sa nukleové kyseliny v elektrickom poli pohybujú k opačne nabitej elektróde – anóde. Rýchlosť elektroforézy je daná súčinom elektroforetickej pohyblivosti (mobility) a intenzity elektrického pola. Mobilita je určená rovnovážnymi pomerom medzi silou pôsobiacou na ióny v elektrickom poli a silou vnútorného trenia. V priebehu elektroforézy teda dochádza k rovnováhe medzi týmito dvoma silami. [23, 30]

##### ***1.10.4.1 Gélová elektroforéza***

Vhodným nosičom pre gélovú elektroforézu je agarózový gél. Agarózové gély sú vhodné pre separáciu molekúl nukleových kyselín o veľkosti od 100 bp do 50 kb. Elektroforéza v agarózovom géle sa používa na identifikáciu, separáciu a purifikáciu fragmentov DNA získaných po PCR. Fragmenty DNA sú delené v elektrickom poli na základe ich veľkosti. Molekuly DNA sú spolu s farbivom nanášané do jamiek na gél a delenie prebehne na základe rozdelenia prúžkov farbív o známych molekulových hmotnostiach. Intenzita prúžkov je úmerná koncentrácií DNA. Pre fragmenty DNA o veľkosti 0,5 kb sa používa farbivo bromfenolová modř a xylen cyanol sa používa s fragmentami o veľkosti 5 kb. Pre detekciu molekúl DNA sa gél farbí vhodným farbivom. Najčastejšie využívané je fenantridinové farbivo etídium bromid, ktorý sa viaže medzi vlákna DNA. Komplex DNA s farbivom potom

môže byť detegovaný v červeno-oranžovej časti spektra pomocou fluorescencie po ožiarení UV žiarením o vlnovej dĺžke 260-360 nm v transluminátore. Pre zistenie veľkosti jednotlivých fragmentov o neznámej veľkosti (ako počtu bází) sa používajú komerčne dostupné zmesi fragmentov DNA o definovaných veľkostiach. [23, 30]

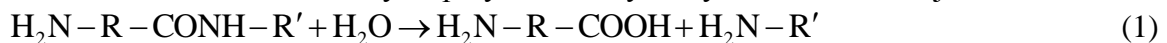


Obr. 7: Zariadenie pre gélovú elektroforézu

## 1.11 Test na stekúvanie želatíny (Dôkaz proteolytickej aktivity kvasiniek)

### 1.11.1 Princíp testu na stekúvanie želatíny

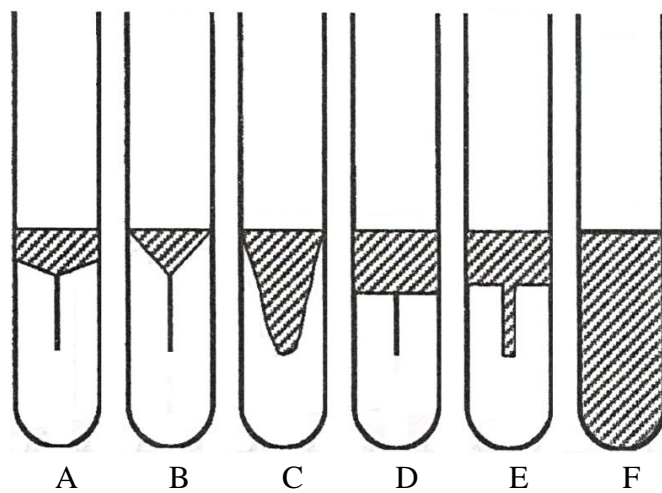
Mikroorganizmy môžu rozkladať bielkoviny pomocou extracelulárnych proteáz a peptidáz (hydrolázy). Hydrolázy sú enzýmy, ktoré katalyzujú hydrolýzu peptidových väzieb peptidov a bielkovín za uvoľnenia karboxyskupiny a aminokyseliny a kde činiteľom je voda:



Želatína je bielkovina, ktorá po rozpustení vo vode tvorí gél a slúži ako jediný zdroj uhlíka a energie pre kvasinky. Proteolytické kvasinky svojimi enzýmami tento gél rozpúšťajú, rozkladajú a želatína stekúje. Príkladom hydrolázy v prípade hydrolýzy želatíny je enzým želatináza, ktorý hydrolyzuje želatínu a rozkladá ju na polypeptidy, peptidy a aminokyseliny. V prípade že analyzovaný kmeň kvasiniek želatínu skvapalňuje znamená to že vlastní hydrolázy a tým má aj proteolytickú aktivitu. Kvalitatívny dôkaz proteáz zistujeme vpichom do mäsopeptonovej želatíny. [32, 33, 34]

### 1.11.2 Postup testu na stekúvanie želatíny

Kultúry kvasiniek očkujeme do mäsopeptonovej želatíny očkovacou ihlou. Vpich vedieme rovnakým smerom do vnútra i von a približne 0,5 cm na dno skúmavky. Skúmavku držíme vodorovne. Po naočkovaní inkubujeme 3 až 5 dní pri teplote 20 °C v termostate pri každodennej kontrole. V prípade pozitívnej reakcie na uplatnenie proteolytickej aktivity a prítomnosti proteáz daného mikroorganizmu želatína skvapalní a následne určíme tvar stekutenia želatíny podľa Obr. 8. [32, 33]



*Obr. 8: Stekuťovanie želatíny: A – miskovité, B – nálevkovité, C – vakovité, D – vodorovné, E – vrstevnaté, F – úplné [32]*

## 2 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 2.1 Použité prístroje, chemikálie a suroviny

#### 2.1.1 Chemikálie

- 10 × Taq pufer pre PCR mix (Kapa Biosystems, USA)
- Agar, kvasnicový extrakt (HiMedia Laboratories Limited Mumbai, Indie)
- Agaróza pre elektroforézu DNA (Serva Biotech, Nemecko)
- Dĺžkový štandard 20 bp (Takara Bio Inc., Japonsko)
- Dĺžkový štandard 100 bp (Elizabeth Pharmacon s. r. o., ČR)
- dNTP mix (Kapa Biosystems, USA)
- Etanol bezvodý pre UV spektrometriu – C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (Mach chemikálie s. r. o., ČR)
- Etídium bromid (Serva Biotech, Nemecko)
- Komerční sada Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit (Elizabeth Pharmacon)
- Kyselina propiónová (Raechim, Rusko)
- Mäsopeptonová želatína (12% želatína)
- Nanášací pufer Loading buffer (Fermentas, Litva)
- Parafínový olej
- Priméry ITS1, ITS4 (Kapa Biosystems, USA)
- Repkový olej
- Restričné endonukleázy – *Hae*III, *Hinf*I, *Hha*I, *Taq*I<sup>a</sup>
- Sladina (pivovar Starobrno s.r.o., ČR)
- Spirit blue agar
- Sterilní a deionizovaná voda
- *Taq* DNA polymeráza (Kapa Biosystems, USA)
- CH<sub>3</sub>COONa, EDTA, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, HCl, NaOH, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Tris

#### 2.1.2 Prístroje a zariadenie

- Analytické váhy (A&D, Instruments LTD, Japonsko)
- Autokláv
- Bakteriologické kľučky
- Buničitá vata
- Bunsenov kahan
- Centrifúga Eppendorf 5430 R (Eppendorf AG, Nemecko)
- Elektroforetická vaňa Owl separation systeme, model B1, B2, D3 (Biotech s.r.o., ČR)
- Erlenmayerove banky
- Exzikátor
- Laboratórne sklo
- Chladnička a mraznička k uchovávaní vzoriek DNA
- Mikropipety Biohit (Biotech s.r.o., ČR)
- Mikropipety pipet4u (AHN Biotechnologie GmbH, Nemecko)
- Mikrovlnná rúra ETA 1195 (ČR)
- Mikroskúmvky Eppendorf

- Minicentrifúga National LABNET C – 1200 (Biotech s.r.o., ČR)
- Očkovacia ihla
- Parafilm (American Nacional Cantm, USA)
- PCR box AURA MINI (Bioair instruments, Taliansko)
- Plastové Petriho misky
- Predvážky EK-600 H (A&D, Instruments LTD, Japonsko)
- Skúmavky
- Sterilný box pre mikrobiologickú prácu
- Stojan na skúmavky
- Sušiarňa (Binder, Nemecko)
- Termocyklér PTC-100TM, (MJ Research, Inc, USA)
- Termostat IP 100-U (LTE SCIENTIFIC, Veľká Británia)
- Transluminátor (Ultra Lum. Inc, USA)
- Vortex LABNET VX 100 (Biotech s.r.o., ČR)
- Vortex-Genie 2, MO Bio (Biotech s.r.o., ČR)

### 2.1.3 Suroviny

Boli testované zbierkové kvasinky, ktoré pochádzajú s CCY (Zbierka kultúr kvasiniek, Chemický ústav SAV, Bratislava). Vzorky kvasiniek boli dodané v skúmavkách na šikmých agaroch a z nich bola priamo prevedená izolácia. Jednotlivé druhy boli označené číslami 1 až 5 a sú uvedené v nasledujúcej Tab. 4.

Tab. 4: Zoznam analyzovaných druhov kvasiniek

Číslo vzorky <sup>1</sup> (Pracovné označenie)	Číslo kmeňa	Druh	Pôvod
1 (35)	29-56-1	<i>Candida boidinii</i> ( <i>C. olivarum</i> )	olivy, Taliansko
2 (36)	29-175-3	<i>Candida oleophila</i>	hruška
3 (38)	29-26-33	<i>Yarrowia lipolytica</i>	kukurica
4 (39)	29-26-5	<i>Yarrowia lipolytica</i>	olivy, Taliansko
5 (41)	29-12-8	<i>Candida intermedia</i>	kontaminovaný syr typu camembert

## 2.2 Príprava použitých roztokov

### 2.2.1 Príprava etídium bromidu

Pre prípravu zásobného roztoku EtBr bolo navážené 10 mg EtBr do mikroskúmavky Eppendorf a odvážené množstvo bolo rozpustené v 1 ml destilovanej vody. Takto pripravený roztok EtBr bol použitý pre vizualizácie fragmentov na gélu. [25]

<sup>1</sup> Označenie vzorku v internej databáze laboratória

### **2.2.2 Príprava 10×TBE pufu**

Pre prípravu zásobného roztoku TBE pufu bol najskôr nachystaný 0,5 M roztok EDTA nasledujúcim spôsobom: bolo navážené 9,36 g EDTA a prevedené do kadičky, bolo pridané 20 ml destilovanej vody a upravené pH na hodnotu 8 koncentrovaným roztokom NaOH. Táto zmes bola 30 minút rozmiešavaná na elektrickej miešačke do úplného rozpustenia EDTA. Tento roztok bol prevedený do odmernej banky o objeme 50 ml a bol doplnený destilovanou vodou po značku. Z premiešaného roztoku bolo odobrané 40 ml a naliate do 1000 ml odmernej banky. K roztoku bolo ďalej pridané 108 g Tris a 55 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>. všetko bolo rozpustené a doplnené destilovanou vodou po značku. [25]

### **2.2.3 Príprava 1×TBE pufu s etídiom bromidom**

Na prípravu 1×TBE pufu, ktorý bol použitý na prípravu gélov pre elektroforetickú detekciu DNA fragmentov, bolo zo zásobného roztoku odobrané 100 ml do odmernej banky o objeme 1000 ml a doplnené destilovanou vodou po značku. Pre prípravu vodivostného pufu pre elektroforézu bolo k 1000 ml 1 × TBE pufu pridané 100 µl roztoku EtBr. [25]

### **2.2.4 Príprava dĺžkových štandardov 100 bp a 20 bp**

Dĺžkový štandard 100 bp bol dodaný v pripravenej forme. Na gél bol nanášaný v objeme 3 µl. Dĺžkový štandard 20 bp bol pripravený podľa dodávaného návodu nasledujúcim spôsobom. Pre prípravu dĺžkového štandardu bolo zmiešané 2,5 µl 20 bp DNA, 2,5 µl sterilnej destilovanej vody a 1 µl nanášacieho pufra dodávaného spoločne s 20 bp DNA. Takto pripravený dĺžkový štandard bol aplikovaný na gél v celkovom objeme 6 µl.

### **2.2.5 Príprava 2% agarózového gélu**

Na elektroforetickú detekciu DNA fragmentov bol použitý 2% agarózový gél pripravený z 2 g agarózy zmiešanej so 100 ml 1×TBE pufu v Erlenmeyerovej banke. Zmes bola dokonalo rozpustená opakovaným varom v mikrovlnnej rúre.

### **2.2.6 Príprava 4% agarózového gélu**

Na elektroforetickú detekciu DNA fragmentov bol použitý 4% agarózový gél pripravený zo 4 g agarózy zmiešanej so 100 ml 1×TBE pufu v Erlenmeyerovej banke. Zmes bola dokonalo rozpustená opakovaným varom v mikrovlnnej rúre.

### **2.2.7 Príprava octanového pufu**

Bolo navážené 2,46 g CH<sub>3</sub>COONa a toto množstvo bolo rozpustené v 7 ml destilovanej vody. Prídavkom koncentrovanej HCl bolo upravené pH na hodnotu 5,5. Roztok bol kvantitatívne prevedený do 10 ml odmernej banky a doplnený destilovanou vodou po značku. Pripravený roztok bol uchovávaný pri teplote 4 °C. [25]

### **2.2.8 Príprava 80% etanolu**

1,25 ml 96 % etanolu bolo zmiešané z 0,25 ml destilovanej vody a roztok bol skladovaný pri teplote - 20 °C.

### **2.2.9 Príprava PCR zmesi**

PCR zmes pre jednu vzorku bola pripravená zmiešaním nasledujúcich PCR komponentov v množstve uvedenom v Tab. 5.

Tab. 5: PCR komponenty pre prípravu PCR zmesi

PCR komponenty	Objem [ $\mu$ l]
Sterilná voda	128,7
Pufer	15
dNTP mix	3
Primér ITS1	0,6
Primér ITS4	0,6

K celkovému množstvu 147,9  $\mu$ l pripravenej zmesi bolo pridané 1,5  $\mu$ l templátovej DNA a 0,6  $\mu$ l termostabilnej Taq polymerázy. Negatívna kontrola bola pripravená rovnakým spôsobom, ale miesto templátovej DNA bolo k reakčnej zmesi pridané 1,5  $\mu$ l sterilnej vody.

## 2.3 Pracovné postupy

### 2.3.1 Izolácia čistých kultúr kvasiniek

Pre izoláciu kvasiniek zo syrov je potrebné rozšíriť internú databázu laboratória o zbierkové kvasinky, čo bolo tiež predmetom bakalárskej práce. Kvasinky pre našu databázu pochádzajú z CCY (Zbierka kultúr kvasiniek, Chemický ústav SAV, Bratislava).

### 2.3.2 Izolácia DNA

Izolácia kvasinkovej DNA bola vykonaná použitím komerčného setu Ultra CleanTech Microbial DNA Isolation Kit podľa priloženého návodu na použitie. Do rozbíjacej mikroskúmavky bol pipetovaný rozbíjací pufer v objeme 300  $\mu$ l, v ktorom boli potom rozsuspendované dve očkovacie očká kvasinkovej kultúry. K tejto zmesi bolo napipetované 50  $\mu$ l roztoku MD1. Mikroskúmavky boli vložené v horizontálnej polohe do adaptéra vortexu a 10 minút vortexované pri maximálnej rýchlosti. Potom bola zmes v mikroskúmavkách centrifugovaná 1 minútu pri 10 000 otáčkach a teplote 4 °C (všetky ďalšie centrifugácie boli vykonávané za rovnakých podmienok). Približne 350  $\mu$ l supernatantu bolo prenesené do čistej mikroskúmavky a bolo k nemu pridané 100  $\mu$ l roztoku MD2. Táto zmes bola krátko premiešaná na vortexe a inkubovaná 5 minút pri teplote 4 °C. Potom bola zmes centrifugovaná a získaný supernatant (približne 450  $\mu$ l) bol opäť prenesený do čistej mikroskúmavky a k nemu bolo pridané 900  $\mu$ l roztoku MD3 a zmes bola krátko zvortexovaná. 700  $\mu$ l pripravenej zmesi bolo pipetované na kolónku a centrifugované. Prefiltrovaný roztok bol odstránený a na kolónku bol pipetovaný zvyšok zmesi a znovu to bolo scentrifugované. Prefiltrovaný roztok bol opäť odstránený a na tú istú kolónku bolo pridané 300  $\mu$ l roztoku MD4 a kolónka bola centrifugovaná. Prefiltrovaný roztok bol odstránený a kolónka ešte raz centrifugovaná. Kolónka bola potom opatrne prenesená do čistej skúmavky a do stredu bielej membrány kolónky bolo pipetované 50  $\mu$ l roztoku MD5 a scentrifugované. Kolónka bola odstránená a roztok DNA v mikroskúmavke bol pre ďalšie použitie uchovaný pri - 20 °C. [27]

### 2.3.3 Amplifikácia izolovanej DNA metódou PCR

Amplifikácia DNA bola uskutočnená pomocou metódy PCR. Z pripravenej PCR zmesi (mastermix) o celkovom objeme 150 µl bolo pipetované 147,9 µl do mikroskúmavky Eppendorf o objeme 0,5 ml a na toto množstvo bolo pridané 1,5 µl izolovanej DNA a 0,6 µl Taq polymerázy. Zmes bola mierne zvortexovaná a vložená do termocykléra. V termocykléri bola templátová DNA namnožená polymerázovou reťazovú reakciou podľa teplotného a časového profilu uvedeného v Tab. 6. K amplifikácii v oblasti 5,8S-ITS rDNA boli použité priméry ITS1 a ITS4. Sekvencie jednotlivých primérov sú uvedené v Tab. 7. Negatívna kontrola bola pripravená rovnakým spôsobom, ale namiesto templátovej DNA bolo k reakčnej zmesi pridané 1,5 µl sterilnej vody.

Tab. 6: Teplotný a časový profil PCR

Jednotlivé kroky	Počiatočná denaturácia	25 cyklov		polymerizácia	Elongácia
		denaturácia	Pripojenie primérov		
Teplota [°C]	94	94	48	72	72
Čas [min]	4	1	0,5	1	10

Tab. 7: Použité priméry a ich sekvencie

Primér	ITS1	ITS4
Sekvencia	5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3'	5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'

### 2.3.4 Prečistenie PCR produktu

PCR produkt je nutné pred reštrikčnou analýzou prečistiť aby sme odstránili všetky nežiaduce zložky, ktoré by mohli negatívne ovplyvniť aktivitu reštriktáz a získali tak čistú DNA. Bolo zmiešané 20 µl amplifikovanej DNA s 2 µl acetátového pufru. Zmes bola krátko zvortexovaná a k zmesi bolo pridané 60 µl 96 % etanolu, vychladeného na teplotu -20 °C. Táto zmes sa potom centrifugovala 30 minút pri 4 °C a 14 000 otáčkach. Supernatant bol dekantovaný a prebytočný roztok bol zliaty. K supernatantu bolo do mikroskúmavky pipetované 60 µl 80 % etanolu a obsah bol opäť centrifugovaný pri rovnakých podmienkach. Supernatant bol znovu dekantovaný a zvyšok etanolu v mikroskúmavkách bol vysušený v exsikátore po dobu 30 minút.

### 2.3.5 Reštrikčná analýza

K DNA po prečistení bolo pipetované 13,4 µl destilovanej vody, 1,5 µl pufru a 0,1 µl reštrikčného enzýmu. Pripravené vzorky boli inkubované pri teplote 37 °C po dobu 16 hodín a na záver bola teplota zvýšená na teplotu denaturácie enzýmu na 80 °C po dobu 20 minút, aby došlo k inaktivácii enzýmu. Zmesi vzniknutých reštrikčných fragmentov všetkých analyzovaných vzoriek boli uschované pri teplote -20 °C, poprípade boli ihneď identifikované elektroforézou v agarózovom géle. Vlastnosti použitej reštrikčnej endonukleázy, sú uvedené v Tab. 8.

Tab. 8: Použité reštrikčné endonukleázy

Názov enzýmu	Producent enzýmu	Rozpoznávacie miesto na sekvencii DNA 5' → 3' 3' ← 5'	Teplota inkubácie [°C] pri 16 hodinách	Teplota inkubácie [°C] pri 20 minútach
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegypticus</i>	GG ↓ CC CC ↑ GG	37	80
<i>HinfI</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	G ↓ ATC CTA ↑ G	37	80
<i>HhaI</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	GCG ↓ C C ↑ GCG	37	80
<i>TaqI</i> <sup>a</sup>	<i>Thermus aquaticus</i>	T ↓ CGA AGC ↑ T	37	80

### 2.3.6 Elektroforetická detekcia PCR produktov a reštrikčných fragmentov

PCR produkty aj reštrikčné fragmenty boli detegované pomocou horizontálnej elektroforézy na 2% alebo 4% agarózovom géle. Podľa počtu analyzovaných vzoriek boli použité rôzne veľkosti elektroforetických vaň. Gél na veľkú vaňu (50 jamiek) bol pripravený v objeme 100 ml, gél na strednú vaňu (20 jamiek) v objeme 60 ml a na malú vaňu (14 jamiek) v objeme 40 ml. Ku gélu bol pridaný etídium bromid v objeme 10 000 krát menšom, než bol objem gélu (4 µl, 6 µl, 10 µl). Vzorky boli na gél nanášané tak, že bol zmiešaný 1 µl nanášacieho pufru s 5 µl vzorky a 5 µl tejto zmesi bolo pipetované do jamky na gélu. Negatívna kontrola u PCR bola nanesená rovnakým spôsobom. Pozitívna kontrola k reštrikčnej analýze bola vykonaná tak, že bol nanesený PCR produkt zhodujúci sa s dĺžkou amplikónu, ktorý bol pre reštrikčnú analýzu použitý. Pre detekciu PCR produktu bol do okrajových jamiek na géle nanesený dĺžkový štandard 100 bp v objeme 3 µl. Pre porovnanie dĺžok reštrikčných fragmentov boli do jamiek na géle nanesené dĺžkové štandardy 100 bp v objeme 3 µl a 20 bp v objeme 6 µl. Delenie fragmentov prebiehalo vo veľkej elektroforetickej vani pri konštantnom napätí 60 V po dobu 3 hodín. V strednej vani prebiehala detekcia pri konštantnom napätí 55 V 3 hodiny a v malej vani pri konštantnom napätí 55 V po dobu 2,5 hodín. Po ukončení elektroforézy bol gél prenesený do transluminátoru a pod UV svetlom bol vyfotografovaný nainštalovanou kamerou a snímok bol uložený do počítača pre neskoršie spracovanie.

### 2.4 Screening lipolytickej aktivity

K overeniu lipolytickej aktivity vybraných mikroorganizmov s CCY (Zbierka kultúr kvasiniek, Bratislava) uvedených v Tab. bol použitý test na Spirit blue agar. Živné médium bolo pripravené a sterilizované podľa návodu výrobcu, potom bolo rozliate na Petriho misky. Ako substrát bol použitý repkový olej v množstve 30 ml na 1000 ml média. Povrchová kultivácia prebiehala po dobu 24 hodín pri teplote 26 °C. Princípom je zmena farby tuhého média s obsahom farebného indikátora pri hydrolýze repkového oleja lipolytickými

enzýmami. Indikátor Spirit Dye tvorí s tukovou fázou komplex, ktorý je zodpovedný za matný vzhľad. Lipolytické enzýmy tuk rozkladajú, matný vzhľad teda mizne. Pozitívnu reakciou je vyjasnená zóna okolo kolónií prípadne zmena farby kolónií. [28]

### 3 VÝSLEDKY A DISKUSIE

Cieľom bakalárskej práce bolo rozšíriť internú databázu laboratória a otestovať vybrané fyziologické vlastnosti zbierkových kmeňov kvasiniek, ktoré pochádzajú z CCY (Zbierka kultúr kvasiniek, Bratislava). Boli použité vzorky piatich zbierkových kvasiniek, ktoré sú uvedené v Tab.. Na týchto typových kvasinkách bola prevedená PCR a reštrikčná analýza enzýmami *HaeIII*, *HinfI*, *HhaI*, *TaqI*<sup>o</sup> a na detekciu PCR produktov a reštrikčných fragmentov bola použitá gélová elektroforéza. Dĺžky fragmentov získané po elektroforéze poslúžia na identifikáciu kvasinkových druhov izolovaných zo syrov. V druhej časti práce sme určovali lipolytickú aktivitu vzoriek typových kvasiniek pochádzajúcich z CCY (Bratislava).

#### 3.1 Izolácia DNA

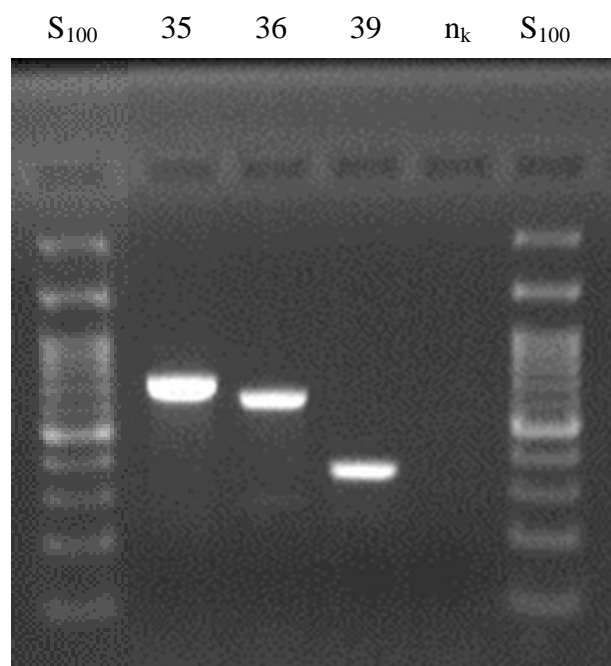
Zbierkové kvasinky uvedené v Tab. boli dodané vo forme šikmých agarov, zaliate sterilným parafinovým olejom a pre neskoršie použitie uložené v chladničke pri konštantnej teplote 2 °C. Z týchto šikmých agarov bola priamo izolovaná DNA pomocou komerčného setu CleanTech Microbial DNA Isolation Kit podľa priloženého návodu vid' 2.3.2. Po izolácii bola DNA pre ďalšie použitie uchovávaná v mrazničke pri teplote - 20 °C.

#### 3.2 Amplifikácia izolovanej DNA metódou PCR

Amplifikácia izolovanej DNA u vzoriek typových kvasiniek bola prevedená na úseku 5,8S-ITS rDNA označenom priméry ITS1 a ITS4. Pre elektroforézu bol zvolený 2 % agarózový gél a bola použitá veľká vaňa pri konštantnom napätí 60 V po dobu 3 hodín. ale aj malá/stredná vaňa pri konštantnom napätí 55 V po dobu 2,5 až 3 hodiny. Získané dĺžky fragmentov boli 380 bp, 450 bp, 680 bp a 700 bp. Fragmety dĺžky 380 bp mala vzorka č.3 a vzorka č.4, 450 bp patrí vzorke č. 5, 680 bp mala vzorka č.2 a veľkosť 700 bp mala vzorka č.6. Všetky analyzované vzorky sú uvedené aj spolu s dĺžkami fragmentov v Tab.. Ukážka delenia fragmentov PCR produktu je uvedená na Obr. 9. Dĺžky PCR produktu boli stanovené odčítaním z elektroforeogramu za použitia štandardu.

Tab. 9: Dĺžky fragmentov PCR produktov získaných amplifikáciou 5,8-ITS oblastí typových kvasiniek

Číslo vzorky (Pracovné označenie)	Číslo kmeňa	Druh	Dĺžky PCR produktu [bp]
1 (35)	29-56-1	<i>C. boidinii</i> ( <i>C. olivarum</i> )	700
2 (36)	29-175-3	<i>C. oleophila</i>	680
3 (38)	29-26-33	<i>Y. lipolytica</i>	380
4 (39)	29-26-5	<i>Y. lipolytica</i>	380
5 (41)	29-12-8	<i>C. intermedia</i>	450



Obr. 9: Ukážka gélu po PCR pre vzorky typových kvasiniek č.35,36 a 39, vzorky č.38 a č.41 nie sú zobrazené. Delenie prebehlo v 2% agarózovom gélu pri konštantnom napätí 55 V a doba delenia bola 120 minút.  $S_{100}$ -dĺžkový štandard 100 bp,  $S_{20}$ -dĺžkový štandard 20 bp,  $n_k$ -negatívna kontrola.

### 3.3 Reštrikčná analýza typových kvasiniek (RFLP-PCR)

DNA po PCR bola následne prečistená a podrobená reštrikčnej analýze. Štiepenie amplifikovanej DNA na špecifické fragmenty prebehlo pomocou nasledujúcich reštrikčných endonukleáz: *HaeIII*, *HinfI*, *HhaI*, *TaqI*<sup>o</sup>. Získané fragmenty DNA boli rozdelené a detegované pomocou elektroforézy v 4% agarózovom gélu. Pre každý enzým je uvedená tabuľka zo získanými dĺžkami reštrikčných fragmentov po štiepení amplifikovanej DNA typových kvasiniek uvedených v Tab. 4. Ukážky gélov reštrikčných fragmentov získaných po štiepení amplifikovanej DNA sú uvedené v prílohách.

#### 3.3.1 Reštrikčná endonukleáza *HaeIII*

Enzým *HaeIII* rozpoznáva a štiepi miesto 5' GG ↓ CC 3'DNA. U typových kvasiniek č. 1, 2, 3 a 4 neboli nájdené štiepne miesta, teda amplikóny neboli štiepené týmto enzýmom. Vzorka č. 5 mala PCR produkty rozštiepené na dva fragmenty. Získané veľkosti fragmentov vzoriek typových kvasiniek sú uvedené v Tab.. Ukážka gélu na ktorom sú výsledky reštrikčných fragmentov získaných štiepením produktu PCR zbierkových kvasiniek pomocou enzýmu *HaeIII* je uvedená v prílohe (viď Obr. 12).

Tab.10: Dĺžky reštrikčných fragmentov získané štiepením PCR produktu reštrikčnou endonukleázou *HaeIII*

Číslo vzorky (Pracovné označenie)	Číslo kmeňa	Druh	Dĺžky PCR produktu [bp]	Dĺžky reštrikčných fragmentov [bp]
1 (35)	29-56-1	<i>C. boidinii</i> ( <i>C. olivarum</i> )	700	neštiepi
2 (36)	29-175-3	<i>C. oleophila</i>	680	neštiepi
3 (38)	29-26-33	<i>Y. lipolytica</i>	380	neštiepi
4 (39)	29-26-5	<i>Y. lipolytica</i>	380	neštiepi
5 (41)	29-12-8	<i>C. intermedia</i>	450	420+30

### 3.3.2 Reštrikčná endonukleáza *HinfI*

Ďalšia použitá reštrikčná endonukleáza bol enzým *HinfI*. Tento enzým rozpoznáva a štiepi miesto 5' G ↓ ATC 3' DNA. Všetkých 5 vzoriek typových kvasiniek bolo štiepené týmto enzýmom na fragmenty. Vzorka č. 1 na tri fragmenty, vzorka č. 2, 3 a 4 na dva fragmenty. Vzorka č. 5 bola štiepená dokonca na štyri fragmenty. Dĺžky reštrikčných fragmentov vzoriek typových kvasiniek získané po elektroforéze sú uvedené v Tab.. Ukážka gélu na ktorom sú výsledky reštrikčných fragmentov získaných štiepením produktu PCR zbierkových kvasiniek pomocou enzýmu *HinfI* je uvedená v prílohe (viď Obr. 11).

Tab.11: Dĺžky reštrikčných fragmentov získané štiepením PCR produktu reštrikčnou endonukleázou *HinfI*

Číslo vzorky (Pracovné označenie)	Číslo kmeňa	Druh	Dĺžky PCR produktu [bp]	Dĺžky reštrikčných fragmentov [bp]
1 (35)	29-56-1	<i>C. boidinii</i> ( <i>C. olivarum</i> )	700	420+180+100
2 (36)	29-175-3	<i>C. oleophila</i>	680	340+340
3 (38)	29-26-33	<i>Y. lipolytica</i>	380	210+170
4 (39)	29-26-5	<i>Y. lipolytica</i>	380	210+170
5 (41)	29-12-8	<i>C. intermedia</i>	450	200+180+50+20

### 3.3.3 Reštrikčná endonukleáza *HhaI*

Ďalší enzým použitý na reštrikčnú analýzu bol *HhaI*. Tato reštrikčná endonukleáza štiepi DNA v mieste 5' GCG ↓ C 3'. Všetky vzorky analyzovaných typových kvasiniek boli štiepené týmto enzýmom na fragmenty o rôznych dĺžkach. Vzorka č. 1 bola štiepená na tri fragmenty, vzorky č. 2 - 5 na dva fragmenty. Po reštrikčnej analýze prebehla elektroforéza a výsledné dĺžky fragmentov sú zaznamenané v Tab. 12. Ukážka gélu na ktorom sú výsledky reštrikčných fragmentov získaných štiepením produktu PCR zbierkových kvasiniek pomocou enzýmu *HhaI* je uvedená v prílohe (viď Obr. 13).

Tab.12: Dĺžky reštrikčných fragmentov získané štiepením PCR produktu reštrikčnou endonukleázou HhaI

Číslo vzorky (Pracovné označenie)	Číslo kmeňa	Druh	Dĺžky PCR produktu [bp]	Dĺžky reštrikčných fragmentov [bp]
1 (35)	29-56-1	<i>C. boidinii</i> ( <i>C. olivarum</i> )	700	340+300+60
2 (36)	29-175-3	<i>C. oleophila</i>	680	340+320
3 (38)	29-26-33	<i>Y. lipolytica</i>	380	210+170
4 (39)	29-26-5	<i>Y.lipolytica</i>	380	210+170
5 (41)	29-12-8	<i>C. intermedia</i>	450	240+210

### 3.3.4 Restričná endonukleáza *TaqI*<sup>a</sup>

Reštrikčná endonukleáza *TaqI*<sup>a</sup> štiepi 5' T ↓ CGA 3' DNA. Enzým *TaqI*<sup>a</sup> rozštiepil všetky vzorky typových kvasiniek na fragmenty. Vzorky č. 2 a č. 5 boli štiepené týmto enzýmom na tri fragmenty o rôznych dĺžkach. Vzorky č. 2 a č. 3 boli štiepené enzýmom *TaqI*<sup>a</sup> na dva fragmenty. Po reštrikčnej analýze prebehla elektroforéza a výsledné dĺžky fragmentov sú zaznamenané v Tab. 13. Ukážka gélu na ktorom sú výsledky reštrikčných fragmentov získaných štiepením produktu PCR zbierkových kvasiniek pomocou enzýmu *TaqI*<sup>a</sup> je uvedená v prílohe (viď Obr. 14).

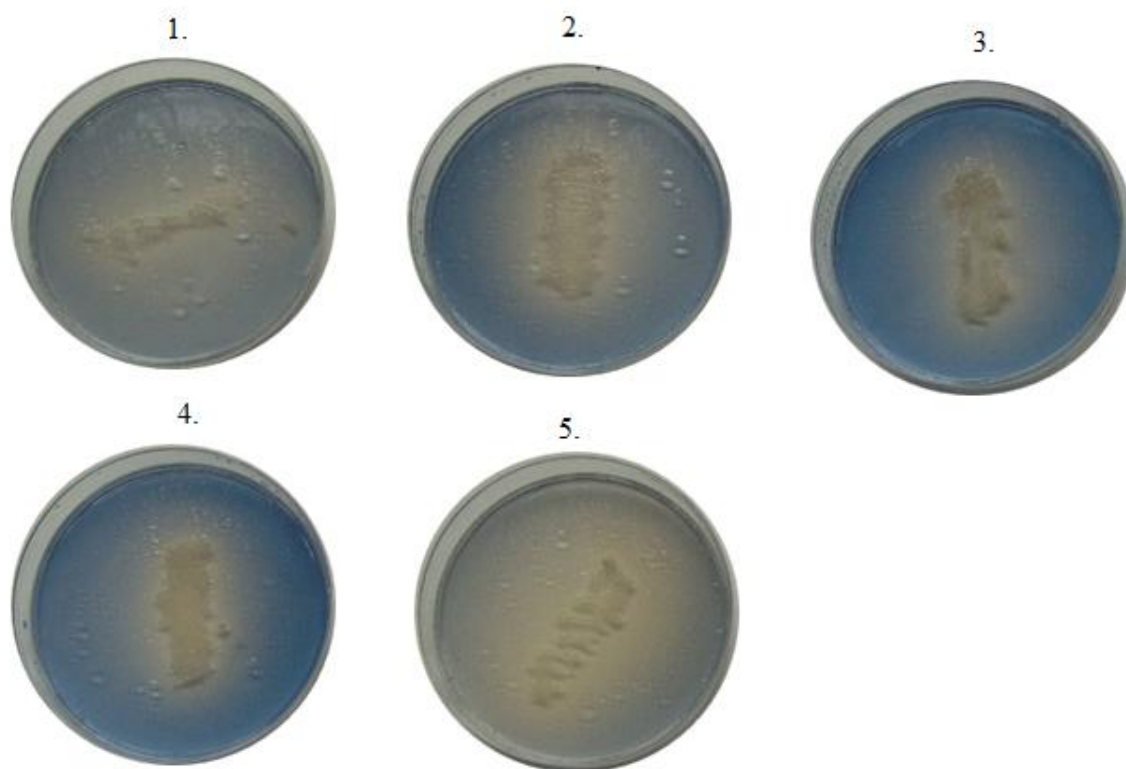
Tab. 13: Dĺžky reštrikčných fragmentov získané štiepením PCR produktu reštrikčnou endonukleázou *TaqI*<sup>a</sup>

Číslo vzorky (Pracovné označenie)	Číslo kmeňa	Druh	Dĺžky PCR produktu [bp]	Dĺžky reštrikčných fragmentov [bp]
1 (35)	29-56-1	<i>C. boidinii</i> ( <i>C. olivarum</i> )	700	nutno opakovať <sup>2</sup>
2 (36)	29-175-3	<i>C. oleophila</i>	680	340+280+60
3 (38)	29-26-33	<i>Y. lipolytica</i>	380	260+120
4 (39)	29-26-5	<i>Y.lipolytica</i>	380	260+120
5 (41)	29-12-8	<i>C. intermedia</i>	450	280+130+40

### 3.4 Screening lipolytickej aktivity vybraných mikroorganizmov

Test na Spirit blue agar na dôkaz lipolytickej aktivity bol prevedený s 5 analyzovanými druhmi kvasiniek, ktoré sú uvedené v Tab.. Hneď po prebehnutí povrchovej kultivácie teda po 24 hodinách bolo viditeľné, že všetkých 5 skúmaných vzoriek kvasiniek má lipolytickú aktivitu teda sú schopné produkcie lipáz. Skúmané mikroorganizmy metabolizovali olej prítomný v médiu, ktorý slúži ako zdroj uhlíku pre lipolytické mikroorganizmy a vytvorili okolo kolónii svetlé kruhy viď Obr. 10.

<sup>2</sup> Z dôvodu nepodarenej reštrikčnej analýzy bude nutné elektroforézu po reštrikčnej analýze enzýmom *TaqI*<sup>a</sup> pre vzorku č. 1 zopakovať



Obr. 10: Test na Spirit blue agar: 1 – *Candida boidinii*, 2 – *Candida oleophila*, 3 – *Yarrowia lipolytica*, 4 – *Yarrowia lipolytica*, 5 – *Candida intermedia*

## 4 ZÁVER

Podstatou bakalárskej práce bolo rozšíriť internú databázu laboratória a otestovať vybrané fyziologické vlastnosti analyzovaných kmeňov zbierkových kvasiniek pochádzajúcich z CCY (Zbierka kultúr kvasiniek, Bratislava).

V prvej časti literárnej rešerše je uvedená charakteristika syrov, technológia výroby syrov proteolýza a lipolýza v syroch, charakteristika kvasiniek ich pozitívne a negatívne účinky na kvalitu potravín a základné rody kvasiniek vyskytujúce sa v syroch. V druhej časti literárnej rešerše bola zobrazená metóda identifikácie kvasiniek pomocou PCR-RFLP a jej jednotlivé kroky ktoré boli prakticky uskutočnené v experimentálnej časti.

V experimentálnej časti bola na vzorkách piatich typových kvasiniek, ktoré sú uvedené v Tab. prevedená PCR a reštrikčná analýza enzýmami *HaeIII*, *HinfI*, *HhaI*, *TaqI*<sup>α</sup> a na detekciu PCR produktov a reštrikčných fragmentov bola použitá gélová elektroforéza. V druhej časti práce sme uskutočnili test na Spirit blue agar pre dôkaz lipolytickej aktivity kvasiniek na vzorkách typových kvasiniek pochádzajúcich z CCY (Bratislava).

Získané dĺžky reštrikčných fragmentov po elektroforéze budú založené do internej databáze laboratória a poslúžia na identifikáciu kvasinkových druhov izolovaných zo syrov. Test na Spirit blue agar vyšiel pozitívne pre všetkých päť analyzovaných vzoriek typových kvasiniek a tým potvrdil schopnosť lipolytickej aktivity kvasiniek. Prítomnosť lipáz bol teda dokázaný u rodu *Candida* (*C. boidinii* (*C. olivarum*), *C. oleophila*, *C. intermedia*) a rodu *Yarrowia* (*Y. lipolytica*).

## 5 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] BOEKHOUT, T. a V. ROBERT. *Yeasts in Food - Beneficial and Detrimental Aspects* [online]. Cambridge: Woodhead Publishing, 2003 [cit. 2014-08-28]. ISBN 978-184-5698-485. Dostupné z: <<https://app.knovel.com/>>.
- [2] TANČINOVÁ, D., J. MAKOVÁ, S. FELŠÖCIOVÁ, V. KMEŤ a M. KAČÁNIOVÁ. *Mikrobiológia potravín*. 1. vyd. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2005. ISBN 80-8069-568-7.
- [3] TVRDOŇ, Milan a Barbara BÁLEŠOVÁ. *Kvasná mikrobiológia*. Bratislava: ALFA, 1990. ISBN 80-05-00672-1.
- [4] ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulárnej biologie: Díl čtvrtý. Rostlinné viry, priony, molekulární evoluce, vznik života, základní metody molekulární biologie, genové inženýrství, genová terapie*. 3. vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 2000, s. 904-1200. ISBN 80-902-5624-4.
- [5] GARCIA, Lynne Shore a Henry D. ISENBERG. *Clinical microbiology procedures handbook*. 3rd ed. Washington DC: American Society for Microbiology, 2010. ISBN 15-558-1527-8.
- [6] DRDÁK, Milan. *Základy potravinárskych technológií: spracovanie rastlinných a živočíšnych surovín, cereálne a fermentačné technológie, uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 1996, 511 s. ISBN 80-967-0641-1.
- [7] SELECKÝ, Ján. *Slovenské syry*. Bratislava: Eko - konzult, 2013. ISBN 978-808-0791-681.
- [8] KADLEC, Pavel. *Technologie potravín II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002, 236 s. ISBN 978-80-7080-510-7.
- [9] DOSTÁLOVÁ, Jana a Pavel KADLEC. *Potravinárske zbožiznalství: technologie potravín*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2014, 425 s. ISBN 978-80-7418-208-2.
- [10] FOX, Patrick F., Paul L.H. MCSWEENEY, Timothy M. COGAN a Timothy P. GUINEE. *Cheese - Chemistry, Physics and Microbiology*. 3rd Edition. Amsterdam: Elsevier, 2004. ISBN 978-0-12-263651-6.
- [11] *Mljekarstvo: Identification and enzymatic characterization of the yeasts isolated from Erzincan tulum cheese*. Zagreb: Croatian Dairy Union, 2012, roč. 62, č. 1. ISSN 0026-704X. Dostupné z: <<http://hrcak.srce.hr/>>.
- [12] KADLEC, Pavel, Karel MELZUCH a Michal VOLDŘICH. *Co byste měli vědět o výrobě potravín?: technologie potravín*. Vyd. 1. Ostrava: Key Publishing, 2009, 536 s. ISBN 978-80-7418-051-4.

- [13] TEUBNER, Christian, Heinrich MAIR-WLDBURG a Fridrich WILHELM LERT. *Sýry: Velká encyklopedie*. Bratislava: TRIO Publishing, 2003. ISBN 80-968705-2-1.
- [14] RIDGWAYOVÁ, Judy a Branislav ČECH. *Sýry*. Bratislava: Fortuna Print, 2004. ISBN 80-88980-29-1.
- [15] GÖRNER, Fridrich a Lubomír VALÍK. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967-0649-7.
- [16] OZCAN, TULAY a EKREM KURDAL. The effects of using a starter culture, lipase, and protease enzymes on ripening of Mihalic cheese. *International Journal of Dairy Technology*. 2012, vol. 65, issue 4, s. 585-593. DOI: 10.1111/j.1471-0307.2012.00868.x. Dostupné z: <<http://doi.wiley.com/>>.
- [17] HERNÁNDEZ, Igor, Luis Javier R. BARRÓN, Mailo VIRTO, Francisco J. PÉREZ-ELORTONDO, Cristian FLANAGAN, Urko ROZAS, Ana Isabel NÁJERA, Marta ALBISU, M. Soledad VICENTE a Mertxe DE RENOBALLES. Lipolysis, proteolysis and sensory properties of ewe's raw milk cheese (Idiazabal) made with lipase addition. *Food Chemistry*. 2009, vol. 116, issue 1, s. 158-166. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.02.026. Dostupné z: <<http://www.sciencedirect.com/>>.
- [18] ŠKÁRKA, Bohumil a Vojtech SZEMES. *Mikrobiológia 2: pre stredné odborné školy potravinárske*. Bratislava: PROMP, 2012. ISBN 978-80-971088-3-0.
- [19] WEIMER, Bart C. *Improving the flavour of cheese* [online]. Cambridge: Woodhead, 2007 [cit. 2015-04-16]. ISBN 978-184-5693-053. Dostupné z: <<https://app.knovel.com/>>.
- [20] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 3. oprav. a dopl. vyd. Praha: ACADEMIA, 2002, 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [21] BRIGGS, Denis E., Chris A. BOULTON, Peter A. BROOKES a Roger STEVENS. *Brewing, Science and Practice Science and practice* [online]. 1. publ. Cambridge: Woodhead Publishing, 2004 [cit. 2015-04-16]. ISBN 978-185-5739-062. Dostupné z: <<https://app.knovel.com/>>.
- [22] WAREING, Peter, Felicity STUART a Rhea FERNANDES. *Micro-Facts: The Working Companion for Food Microbiologists* [online]. 7th ed. Leatherhead, UK: Leatherhead Publishing, 2010 [cit. 2015-04-16]. ISBN 978-162-1981-756. Dostupné z: <<http://app.knovel.com/>>.

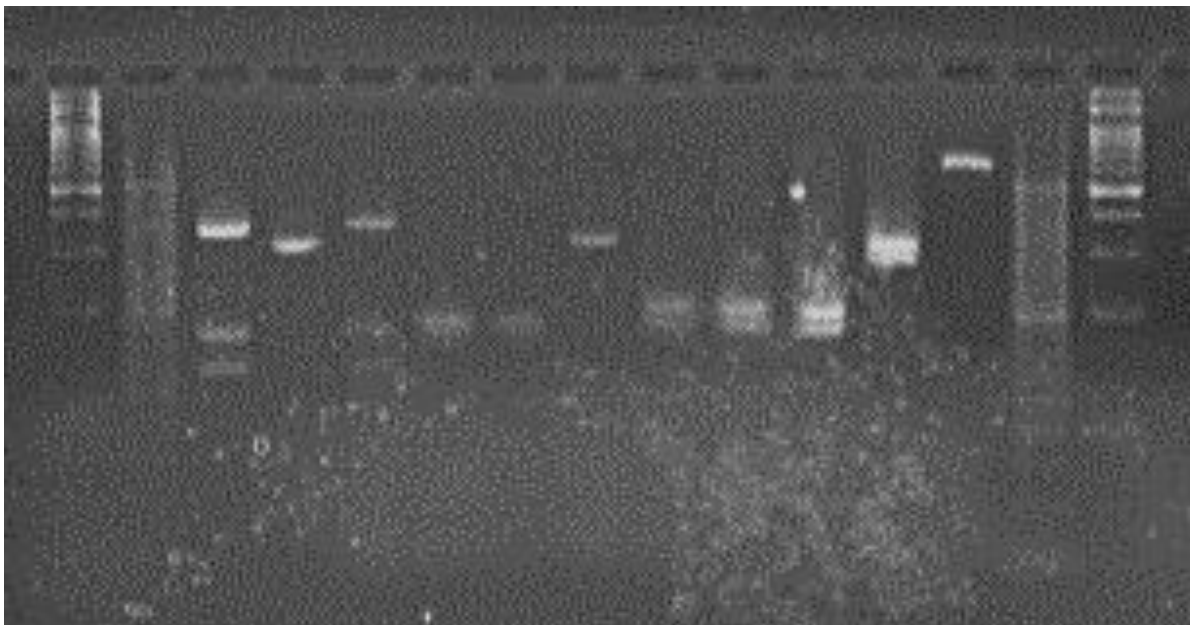
- [23] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd., 2. dotisk. Brno: Masarykova univerzita, 2010, 188 s. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [24] CUPÁKOVÁ, Šárka, Marta DUŠKOVÁ a Renáta KARPÍŠKOVÁ. *Mikrobiologie potravin - praktická cvičení I.: obecná mikrobiologie*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2008, 55 s. ISBN 978-80-7305-043-6.
- [25] ŠURANSKÁ, H. *Identifikace vinných kvasinek metodou PCR-RFLP*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 100 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Dana Vránová, Ph.D.
- [26] LACROIX, Christophe. *Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation* [online]. Oxford: Woodhead Publishing, 2011 [cit. 2015-04-16]. ISBN 978-085-7090-522. Dostupné z: <<https://app.knovel.com/>>.
- [27] MO BIO LABORATORIES, Inc. *UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit: Instruction Manual* [online]. 2014 [cit. 2015-04-03]. Dostupné z: <<http://www.mobio.com/>>.
- [28] WEHR, H. Michael a Joseph F. FRANK. *Standard methods for the examination of dairy products*. 17. ed. Washington DC: American Public Health Association, 2004. ISBN 978-087-5530-024.
- [29] JANDEROVÁ, Blanka a Olga BENDOVIÁ. *Úvod do biologie kvasinek*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1999, 108 s. ISBN 80-718-4990-1.
- [30] KRÁLOVÁ, Blanka, Ladislav FUKAL, Pavel RAUCH a Tomáš RUML. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 254 s. ISBN 80-708-0449-1.
- [31] HARDIN, Charles C. a James A. KNOPP. *Biochemistry: Essential Concepts* [online]. Oxford University Press, 2013 [cit. 2015-04-16]. ISBN 978-162-8701-760. Dostupné z: <<https://app.knovel.com/>>.
- [32] VESELÁ, Mária. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. 2. přeprac. vyd. Brno: VUT, 1999, 88 s. ISBN 80-214-1305-0.
- [33] KOČKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A., G. BASAŘOVÁ, Olga BENDOVIÁ a Karel BERAN. *Kvasinky ve výzkumu a praxi*. Praha, Československá akademie věd: Akademie Praha, 1986.
- [34] DELA CRUZ, Thomas Edison E. a Jeremy Martin O. TORRES. Gelatin Hydrolysis Test Protocol. MicrobeLibrary In: *ASM MicrobeLibrary* [online]. American Society for Microbiology, 2012-11-01 [cit. 2015-04-17]. Dostupné z: <<http://www.microbelibrary.org/>>.

## 6 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV

ATP	adenozíntrifosfát
$a_w$	aktivita vody
bp	počet párov bází
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamin tetraoctová kyselina
EtBr	etídium bromid
GTP	guanosíntrifosfát
ITS	vnútorná prepisová oblasť (z angl. internal transcribed spacer)
kb	počet párov kilobází
kPa	jednotka tlaku kilopascal
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
PCR	polymerázová reťazová reakcia
rDNA	ribozomálna deoxyribonukleová kyselina
RFLP	polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribozomálna ribonukleová kyselina
°SH	jednotky titračnej kyslosti dle Soxhleta Henkela používané v strednej Európe, titračná kyslosť udáva spotrebu 0,25 M NaOH na neutralizáciu 100 ml mlieka (alebo 100 g výrobku).
Taq	termostabilná DNA polymeráza
Tris	tris-(hydroxymethyl)amino-metán
UV	ultrafialové žiarenie
V	jednotka napätia

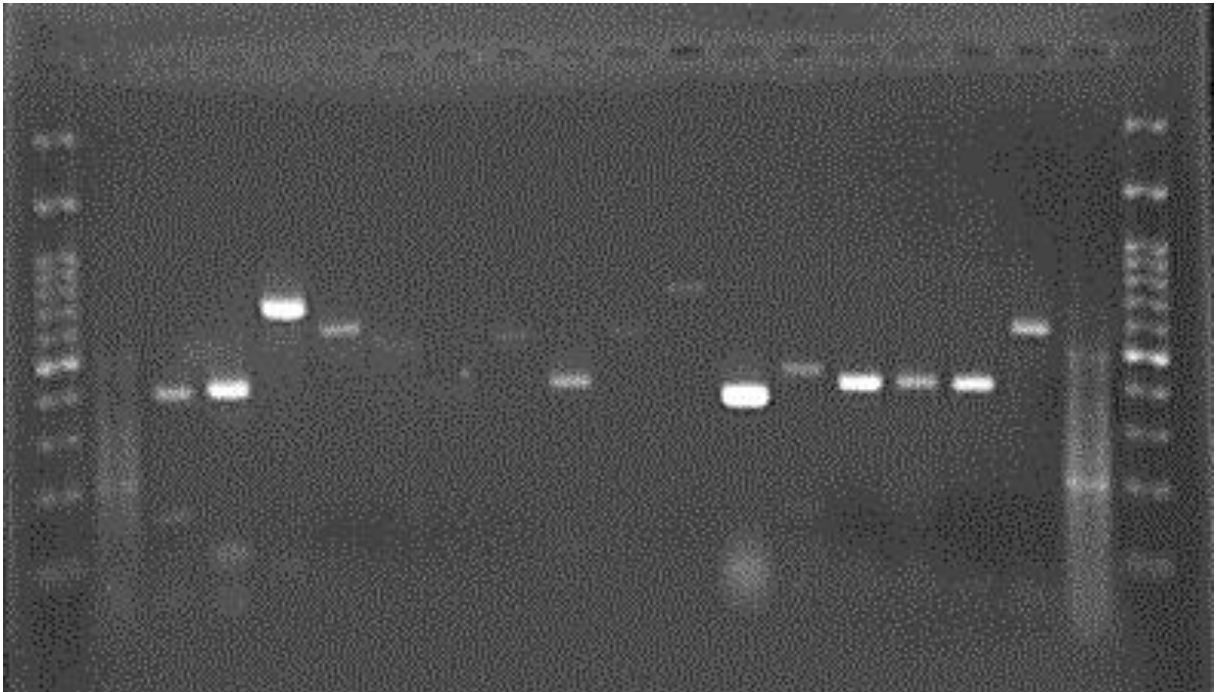
## 7 PRÍLOHY

S<sub>100</sub> S<sub>20</sub> 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 36 S<sub>20</sub> S<sub>100</sub>



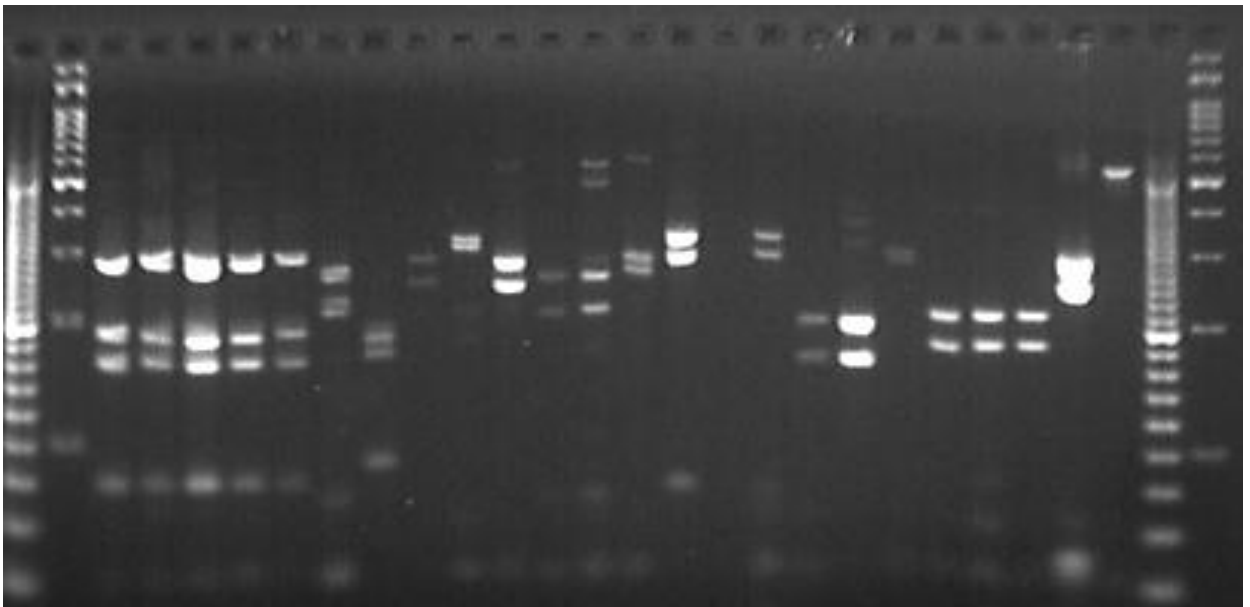
Obr. 11: Ukážka gélu na ktorom sú výsledky reštrikčných fragmentov získaných štiepením produktu PCR zbierkových kvasiniek pomocou enzýmu *Hinf*I. Medzi uvedenými vzorkami sú č. 35, 36, 38, 39 a 41, ktoré boli spracované v rámci tejto bakalárky, S<sub>100</sub>-dĺžkový štandard 100 bp, S<sub>20</sub>-dĺžkový štandard 20 bp

S<sub>100</sub> S<sub>20</sub> 6 18 26 27 28 29 30 31 32 37 38 40 41 42 43 6 S<sub>20</sub> S<sub>100</sub>



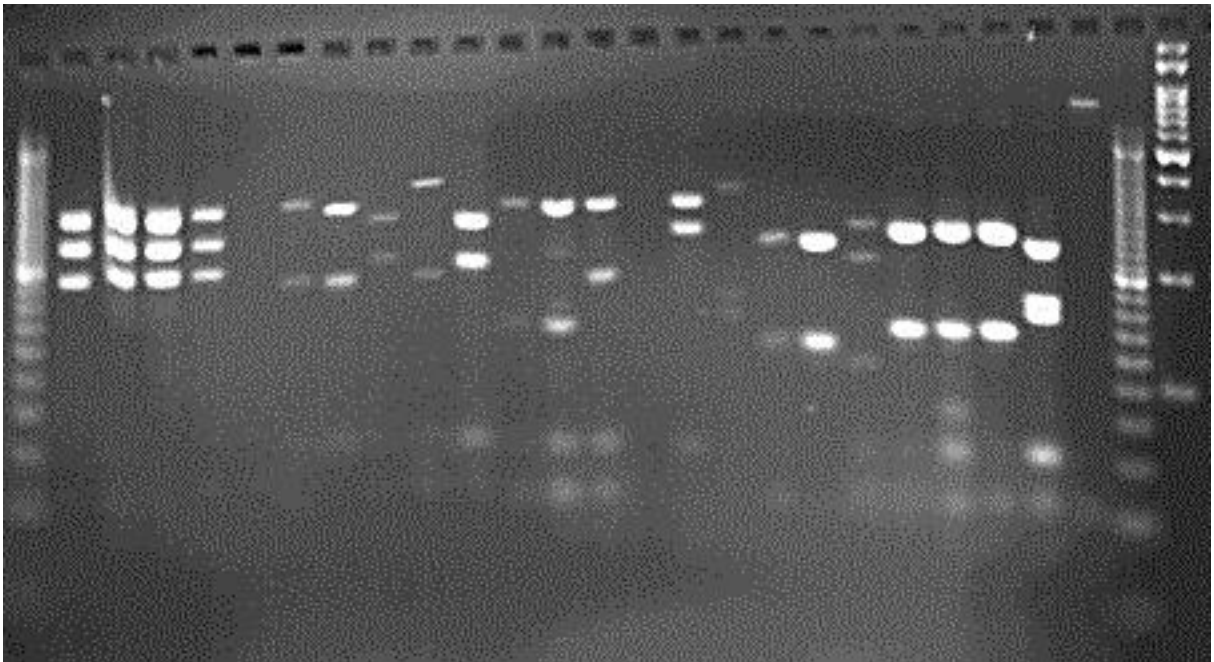
Obr. 12: Ukážka gélu na ktorom sú výsledky reštrikčných fragmentov získaných štiepením produktu PCR zbierkových kvasiniek pomocou enzýmu HaeIII. Medzi uvedenými vzorkami sú č. 38 a č. 41, ktoré boli spracované v rámci tejto bakalárky, S<sub>100</sub>-dĺžkový štandard 100 bp, S<sub>20</sub>-dĺžkový štandard 20 bp

S<sub>20</sub> S<sub>100</sub> 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 33 35 S<sub>100</sub>



Obr. 13: Ukážka gélu na ktorom sú výsledky reštrikčných fragmentov získaných štiepením produktu PCR zbierkových kvasiniek pomocou enzýmu HhaI. Medzi uvedenými vzorkami sú č. 35, 36, 38, 39 a 41, ktoré boli spracované v rámci tejto bakalárky, S<sub>100</sub>-dĺžkový štandard 100 bp, S<sub>20</sub>-dĺžkový štandard 20 bp

S<sub>20</sub> 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 33 S<sub>20</sub> S<sub>100</sub>



*Obr. 14: Ukážka gélu na ktorom sú výsledky reštrikčných fragmentov získaných štiepením produktu PCR zbierkových kvasiniek pomocou enzýmu TaqI<sup>®</sup>. Medzi uvedenými vzorkami sú č. 35, 36, 38, 39 a 41, ktoré boli spracované v rámci tejto bakalárky, S<sub>100</sub>-dĺžkový štandard 100 bp, S<sub>20</sub>-dĺžkový štandard 20 bp*