

Změny vývoje mikroflóry během výroby a skladování masného výrobku

Bc. Iveta Kalousová

Diplomová práce
2016

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Iveta Kalousová**
Osobní číslo: **T14486**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Změny vývoje mikroflóry během výroby a skladování masného výrobku**

Zásady pro vypracování:

1. Provedte literární rešerši na téma výroba fermentovaných salámů, zaměřte se faktory působící na mikroflóru masných výrobků a dále na možnosti stanovení mikroorganismů v potravinách.
2. Na základě zjištěných informací provedte experiment s průmyslově vyrobenými fermentovanými masnými výrobky.
3. Získané výsledky vyhodnoťte, provedte diskusi a vyvodte z měření závěry.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] LEROY, F., VERLUYTEN, J., DE VUYST, L., 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 106, 270 – 285.

[2] FEDERICI, S., CIARROCCINI, F., CAMPANA, R., CIADRINI, E., BLASI, G., BAFFONE, W., 2014. Identification and functional traits of lactic acid bacteria isolated from Ciauscolo salami produced in Central Italy. *Meat Science* 98, 575 – 584.

[3] TARTÉ R., editor. 2009. *Ingredients in meat products: properties, functionality and applications*. New York (NY): Springer Science + Business Media. 419 p.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

2. února 2016

Termín odevzdání diplomové práce:

20. dubna 2016

Ve Zlíně dne 2. února 2016



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.

děkan



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.

ředitel ústavu

Příjmení a jméno: Kaloupeková Kateřina

Obor: Tech. potravin

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 11.4.2016

Kaloupeková

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

V této práci byla zkoumána mikroflóra fermentovaného masného výrobku (Paprikáš) vyrobeného dvěma odlišnými technologiemi – klasickou a Quick-Dry-Slice (QDS) technologií. Cílem bylo zhodnotit druhové zastoupení a růst technologicky významných mikroorganismů v průběhu výroby a skladování salámů. K tomu bylo využito kultivačních metod i techniky PCR-DGGE. Součástí práce byla optimalizace izolace bakteriální DNA z potravin. Také byly nalezeny dva úseky genu pro 16S rRNA a k nim vhodné gradienty denaturačních činidel poskytující dobré výsledky. V salámech byla prokázána výrazná dominance bakterií mléčného kvašení v průběhu celého období zrání i skladování. QDS proces a balení salámů v modifikované atmosféře (70 % CO₂ + 30 % O₂) prodloužilo životaschopnost mikroorganismů. U všech vzorků byly nejčastěji identifikovanými bakteriemi *Lactobacillus curvatus* a *Lactobacillus sakei*. Jiné bakteriální rody, kromě laktobacilů, se nepodařilo stanovit. Další výzkumná činnost by se proto měla zaměřit na hledání dalších vhodných úseků genu pro 16S rRNA.

Klíčová slova: fermentované masné výrobky, mikroflóra, Quick-Dry-Slice, PCR-DGGE

ABSTRACT

In this work, the microflora of fermented meat products (Paprikáš) produced by two different techniques (classical and Quick-Dry-Slice) was investigated. The aim was to evaluate species diversity and growth of technologically important microorganism during production and storage of fermented meat products. The cultivation methods and PCR-DGGE technique was used. One part of this work was targeted to optimize isolation of bacterial DNA from foods. Two sections of the 16S rRNA gene and thereto appropriate gradients of denaturing agents were also found. These parameters gave the best results. The lactic acid bacteria were dominante in sausages during the whole period of maturation and storage. The QDS process and packaging sausages in modified atmosphere (70 % CO₂ + 30 % O₂) extended viability of microorganisms. The *Lactobacillus curvatus* and *Lactobacillus sakei* were most frequently identified bacteria in all samples. Other bacterial genera weren't determined in sausages, only lactobacilli. Next research should therefore focus to finding another appropriate sections of the 16S rRNA gene.

Keywords: fermented meat products, microflora, Quick-Dry-Slice, PCR-DGGE

Na tomto místě bych ráda vyjádřila velké poděkování své školitelce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za možnost pracovat na zajímavém tématu, který rozšířil mé znalosti nejen z oblasti molekulární biologie. Také bych jí chtěla poděkovat za cenné rady a postřehy, dále za její trpělivost a ochotu, kterou mi věnovala. Významný dík patří paní laborantce Bc. Veronice Kučbové z Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí za poskytnutí pomocné ruky a odborný dohled při realizaci praktické části této diplomové práce. Dále nesmím zapomenout na Ing. Lenku Janošovou, která mi svými nápady vypomohla s řešením problémů v rámci optimalizace metodiky, a proto i jí patří můj dík. Mimořádně velký vděk cítím vůči své rodině, která mi byla během celého studia nesmírnou oporou.

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

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1 MASNÉ VÝROBKY A JEJICH ZÁKLADNÍ ROZDĚLENÍ	11
2 TECHNOLOGIE VÝROBY FERMENTOVANÉHO MASNÉHO VÝROBKU.....	12
2.1 SUROVINY PRO VÝROBU FERMENTOVANÉHO MASNÉHO VÝROBKU.....	12
2.2 PROCES VÝROBY FERMENTOVANÉHO MASNÉHO VÝROBKU	21
2.2.1 Výběr a příprava suroviny.....	22
2.2.2 Mělnění a míchání.....	22
2.2.3 Narážení díla a uzavírání střev	23
2.2.4 Fermentace a zrání	24
2.2.5 Sušení	25
2.2.6 Balení a skladování	26
2.2.7 Quick-Dry-Slice proces.....	27
3 MIKROFLÓRA FERMENTOVANÉHO MASNÉHO VÝROBKU V PRŮBĚHU ZRÁNÍ A SKLADOVÁNÍ.....	28
3.1 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ RŮST MIKROORGANISMŮ V PRŮBĚHU ZRÁNÍ A SKLADOVÁNÍ FERMENTOVANÉHO MASNÉHO VÝROBKU	31
3.2 MIKROBIÁLNÍ PROCESY VE FERMENTOVANÉM MASNÉM VÝROBKU	36
4 METODY IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ VE FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBCÍCH.....	39
4.1 DENATURAČNÍ GRADIENTOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA	39
II PRAKTICKÁ ČÁST	41
5 CÍL PRÁCE	42
6 MATERIÁL A METODY	43
6.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE, POMŮCKY, CHEMICKÉ LÁTKY A PŘÍPRAVKY	43
6.1.1 Kultivační stanovení a uchovávání vzorků	43
6.1.2 Identifikace mikroorganismů metodou PCR-DGGE	44
6.1.2.1 Izolace DNA	44
6.1.2.2 Polymerázová řetězová reakce.....	44
6.1.2.3 Denaturační gradientová gelová elektroforéza	46
6.1.2.4 Purifikace DNA	47
6.2 VÝROBA FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ A POSTUP ODBĚRU VZORKŮ.....	48
6.3 MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR	49
6.3.1 Složení a příprava živných půd	50
6.3.2 Vyjádření výsledků pro kvantitativní stanovení	51
6.4 IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ METODOU PCR-DGGE	52
6.4.1 Optimalizace přípravy vzorků pro izolaci DNA	52
6.4.2 Izolace chromozomální DNA z bakteriálních buněk s využitím komerčního kitu	53
6.4.3 Kontrola koncentrace a čistoty DNA	56
6.4.4 Amplifikace úseku genu pro 16S rRNA	57

6.4.4.1	1. krok amplifikace – Touch Down polymerázová řetězová reakce.....	57
6.4.4.2	2. krok amplifikace	59
6.4.4.3	Elektroforetická detekce fragmentů DNA	60
6.4.5	Denaturační gradientová gelová elektroforéza.....	61
6.4.5.1	Sestavení aparatury pro výrobu gelu	61
6.4.5.2	Příprava gelu	63
6.4.5.3	Příprava a průběh elektroforézy.....	65
6.4.5.4	Barvení gelu a vizualizace	66
6.4.6	Optimalizace techniky PCR-DGGE.....	66
6.4.7	Re-amplifikace, purifikace, sekvenace DNA a identifikace mikroorganismů	67
7	VÝSLEDKY A DISKUZE	69
7.1	MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR FERMENTOVANÉHO MASNÉHO VÝROBKU	69
7.2	IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ METODOU PCR-DGGE	74
7.2.1	Optimalizace izolace DNA	74
7.2.2	Úspěšnost a kvalita amplifikace genu	75
7.2.3	Optimalizace techniky PCR-DGGE.....	79
7.2.4	Stanovení mikroflóry fermentovaného masného výrobku metodou DGGE.....	84
	ZÁVĚR	92
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	93
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	106
	SEZNAM OBRÁZKŮ	108
	SEZNAM TABULEK.....	110
	SEZNAM PŘÍLOH.....	111

ÚVOD

Fermentované masné výrobky (FMV) jsou významnou součástí masného průmyslu. Jenom v České republice se jich vyrobí asi 20 tun ročně. Z tuzemských výrobků jsou nejznámější salámy Poličan, Herkules nebo Lovecký salám, z klobás je to například Dunajská či Gombasecká klobása. Výroba FMV je však celosvětovou záležitostí. Díky tomu existuje nepřehledné množství výrobků lišících se surovinovou skladbou, obsahem přísad, velikostí, typem obalového střevo a podmínkami zrání.

Výroba FMV je považována za jednu z nejnáročnějších. Velká pozornost musí být věnována výběru surovin. Celou výrobu znatelně prodražuje několika týdenní zrání a sušení výrobků v komorách s řízenými podmínkami. Výrobci proto hledají způsoby, jak minimalizovat náklady na výrobu FMV při současném zachování jejich smyslové charakteristiky. V posledním desetiletí pomáhá k řešení této otázky moderní technologie Quick-Dry-Slice, která umožňuje zkrátit dobu sušení na pouhé desítky minut a která si našla své příznivce i mezi českými zpracovateli masa a uzenin.

Důvodem vysoké obliby FMV jsou bezpochyby jejich sensorické vlastnosti. Ty se utváří v průběhu fermentace a zrání díky rozsáhlým mikrobiálním procesům. Je známo, že existuje silná vazba mezi chutí a vůní FMV a druhovým složením mikroflóry. Je však také nutné porozumět vlivu podmínek výroby na růst mikroorganismů významných pro FMV a na jejich aktivitu v různých fázích zrání. Je potřeba identifikovat faktory ovlivňující dynamiku změn v druhovém zastoupení mikroorganismů a rovněž popsat vzájemné interakce jednotlivých mikrobiálních druhů. Tyto poznatky poté mohou nalézt uplatnění při návrhu technologických postupů, které povedou k získání produktu s požadovanými sensorickými vlastnostmi. Právě toto je jeden z důvodů, proč vznikla tato práce.

Kultivační metody tradičně využívané ke studiu mikroflóry potravin jsou doprovázeny řadou úskalí, jako je obtížná a často také nepřesná identifikace mikroorganismů na úrovni druhu. Další omezení se týká nekultivovatelných druhů. Tyto problémy pomohlo vyřešit zavedení molekulárně biologických metod, které umožňují získat ucelenější informace o mikroflóře fermentovaných potravin. Tato práce využívá k identifikaci mikroorganismů ve FMV polymerázovou řetězovou reakci (PCR) ve spojení s denaturační gradientovou gelovou elektroforézou (DGGE). Vlastnímu stanovení předchází optimalizace podmínek DGGE včetně optimalizace izolace bakteriální DNA. Díky tomu může tato práce posloužit jako východisko pro další výzkumnou činnost v oblasti mikroflóry FMV.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MASNÉ VÝROBKY A JEJICH ZÁKLADNÍ ROZDĚLENÍ

Na začátek je vhodné definovat pojem „masný výrobek“. Nejpřesnější definici můžeme nalézt v Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, podle kterého jsou masnými výrobky zpracované výrobky získané zpracováním masa nebo dalším zpracováním takto zpracovaných výrobků, takže z řezné plochy je zřejmé, že produkt pozbyl znaků charakteristických pro čerstvé maso [1]. Skutečnost, že sortiment masných výrobků je velmi rozsáhlý, si vyžádala rozdělení této komodity do několika skupin, jejichž přehled spolu s definicemi je uveden ve Vyhlášce ministerstva zemědělství č. 69/2016 Sb. ve znění pozdějších předpisů. Konkrétně se jedná o tyto skupiny masných výrobků:

- tepelně opracovaný masný výrobek
- tepelně neopracovaný masný výrobek
- tepelně neopracovaný masný výrobek pro tepelnou úpravu
- trvanlivý tepelně opracovaný masný výrobek
- trvanlivý fermentovaný masný výrobek
- konzerva
- polokonzerva [2].

Jelikož předmětem studia této práce je pouze trvanlivý fermentovaný masný výrobek, je vhodné blíže specifikovat právě tuto skupinu masných výrobků. Jedná se tedy o výrobek tepelně neopracovaný určený k přímé spotřebě, u kterého v průběhu fermentace, zrání, sušení, popřípadě uzení za definovaných podmínek došlo ke snížení aktivity vody na hodnotu $a_{w(\max.)} = 0,93$, s minimální dobou trvanlivosti 21 dní při teplotě plus 20 °C a za případně dalších skladovacích podmínek [2].

2 TECHNOLOGIE VÝROBY FERMENTOVANÉHO MASNÉHO VÝROBKU

Výroba fermentovaného masného výrobku (FMV) je v mnoha krocích jedinečná. Hlavním charakteristickým znakem výrobního procesu je fáze zrání, která zahrnuje fermentaci a sušení. Předpokladem pro zrání FMV je vhodná surovinová skladba, která je rovněž pro tuto skupinu výrobků charakteristická [3].

2.1 Suroviny pro výrobu fermentovaného masného výrobku

Maso

Základní surovinou pro produkci FMV je maso. Zpravidla se jedná o maso jatečných zvířat. V západní a střední Evropě je upřednostňováno maso vepřové a hovězí. Jinde ve světě využívají hojně i maso koňské, skopové, krutí a další, u nás již méně známé druhy [4].

V klasické receptuře je masová složka rozdělena na jeden díl libového vepřového masa a jeden díl libového hovězího a je doplněna jedním dílem kvalitního vepřového sádla. Rostoucí cena hovězího masa však přiměla výrobce FMV nahrazovat větší či menší část tohoto druhu masa masem vepřovým, které je cenově výhodnější. Použití masa strojně odděleného, drůbežího masa strojně odděleného, rostlinných a jiných živočišných bílkovin a vlákniny do tradičních FMV je zakázáno [2, 4].

Je v celku zřejmé, že kvalita suroviny přímo ovlivňuje vlastnosti konečného produktu. Výrobci nejčastěji volí maso dobře vyzrálé, neboli maso „normální“. Z finančních důvodů je však možné použít také maso s vadami, tzv. maso PSE (bledé, měkké, vodnaté), nebo DFD (tmavé, tuhé, suché), které je levnější. Pro výrobu FMV je v tomto případě vhodnější maso PSE, které snadno uvolňuje vodu, která se tak může rychleji odpařovat během zrání masného výrobku. I přes tyto výhody je možnost využití PSE masa omezená, což potvrdil už před třiceti lety ve své studii Hechelmann [7], který doporučuje maximálně 25% podíl PSE masa v masové složce, a tak je stále převažující surovinou pro výrobu FMV maso normální. Toto maso by v ideálním případě mělo pocházet ze starších zvířat, protože je tmavší a obsahuje méně vody [4, 5, 6, 7].

Fermentované masné výrobky neprochází během výrobního procesu žádnou tepelnou úpravou a tak je dalším důležitým kritériem při výběru surovin pro jejich výrobu mikrobiologická kvalita masa [6]. Feiner [8] uvádí jako optimální počet kolonie tvořících jednotek (CFU) 10^2 až 10^3 na 1 gram masa. Za horní hranici se považují počty 10^5 CFU/g masa.

Podle Kameníka [9] je možno pokládat za velmi dobrý stav kontaminaci povrchu celosvalových mas (kýty, plece) v rádech $10^3 - 10^4$ CFU/cm². U vysoce kontaminované suroviny existuje vyšší riziko, že některé z přítomných mikroorganismů překonají bariéry, které jim jsou v průběhu výrobního procesu kladeny do cesty, a finální produkt poté bude vykazovat senzorké odchylky a v horším případě bude ohrožena jeho zdravotní nezávadnost. Nejčastějšími patogenní mikroorganismy spojovanými s fermentovaným masem jsou *Staphylococcus* spp., *Clostridium botulinum*, *Salmonella* spp., *Vibrio* spp. a *Escherichia coli* [6, 10].

Tuková tkáň

Obsah tuku se u většiny FMV pohybuje v rozmezí 25 až 45 % v závislosti na preferencích spotřebitelů v různých zemích. V České republice mívají standardní výrobky, jako jsou Poličan, Herkules či Lovecký salám většinou obsah tuku do 50 %. V zemích se silnou tradicí kvalitních trvanlivých fermentovaných salámů (Německo, Francie, Itálie) bývá obsah tuku v těchto produktech nižší. Například Di Cagno et al. [11] zjistili obsah tuku v tradičních italských salámech Varzi a Brianza do 20 %. Na začátku výroby je obsah tuku vždy daleko nižší a poté se zvyšuje v průběhu sušení až na konečnou hodnotu [5, 6, 11].

Tuková složka FMV je zpravidla tvořena vepřovým sádlem, a sice hřbetním. Toto sádlo je dostatečně jadrné a tuhé, což umožňuje vytvoření jasné kontrastní mozaiky, která je viditelná na řezu hotového výrobku. Obdobné vlastnosti má rovněž sádlo z krční části, tzv. hřivka. Měkké sádlo je zcela nevhodné pro výrobu FMV. Řídký tuk obsažený v tomto druhu sádla je složen z většího podílu nenasycených mastných kyselin a díky tomu snadněji podléhá žluknutí. Při přípravě díla se tento tuk snadno uvolňuje z tukových buněk a dílo se tzv. maže. Další problémy pak nastávají během narážení díla do obalových střeň. Mazlavý tuk se zachytává na vnitřní straně střeva a vytváří tak vrstvu nepropustnou pro vlhkost. Vysychání takového výrobku je pak pomalé, což nepříznivě ovlivní konzistenci výrobku (měkká) a rovněž jeho trvanlivost [6, 12, 13].

V dnešní době je snahou vyrábět potraviny s příznivějším zastoupením mastných kyselin. Tento trend se nevyhnul ani masnému průmyslu. Možností jak dosáhnout příznivějšího poměru n-6 a n-3 nenasycených mastných kyselin v masných výrobcích je přidavek olejů s vysokým zastoupením n-3 mastných kyselin do díla (např. lněný, řepkový nebo rybí olej) [14]. Právě touto problematikou se zabývali Pelsler et al. [15] ve své studii a shodli se s Valencia et al. [16], že suché fermentované salámy vyrobené s přídavkem olejů boha-

tých na n-3 mastné kyseliny jsou více náchylné k oxidaci lipidů. Josquin et al. [14] však zjistili, že technologicky je možné vyrobit fermentované klobásy obohacené o n-3 mastné kyseliny z rybího oleje, a sice s použitím rybího oleje v zapouzdřené formě.

Sůl a solící směsi

Sůl používaná v masném průmyslu má nejčastěji podobu chloridu sodného. V případě výroby masných výrobků se sníženým obsahem sodíku lze jako alternativu zvolit chlorid draselný. Je však nutno mít na paměti, že draslík vyvolává vjem hořké chuti. Kromě chuti má sůl vliv i na jiné vlastnosti masa a masných výrobků. Ovlivňuje interakce mezi svalovými bílkovinami, takzvaně je rozpouští a dochází k jejich aktivaci, čímž je následně ovlivněna také textura masného výrobku. Sůl dále snižuje hodnotu vodní aktivity a současně zvýhodňuje růst grampozitivních bakterií. Obě tyto skutečnosti přispívají k omezení růstu gramnegativních bakterií a mají tak podstatný vliv na údržnost FMV [8, 17].

Přídavek soli do masných výrobků se pohybuje v intervalu od 1,5 do 2,5 % hmotnosti konečného produktu [18]. V případě FMV je tento přídavek vyšší. Názory na konečný obsah soli v produktu jsou však rozdílné. Podle Feinera [8] se dílo solí na koncentraci 2,4 – 3,0 %, což v hotovém výrobku představuje 3,2 – 4,5 % soli v důsledku ztráty vody během sušení. Honikel [19] však udává 2 – 4% obsah chloridu sodného ve FMV.

Sůl se u většiny masných výrobků přidává ve formě dusitanové solící směsi. Jedná se o směs chloridu sodného s dusitanem sodným nebo draselným, přičemž obsah dusitanu ve směsi se pohybuje v rozmezí 0,3 až 0,6 %. Prvotním účelem přidávání dusitanu do masných výrobků bylo zajištění jejich růžové barvy i po tepelném opracování. Ze stejného důvodu se již od 14. století maso nakládalo do solného láku za přídavku dusičnanů (tzv. peklování odvozené z německého Pökeln = nakládání). Teprve až v devadesátých letech 19. století se podařilo prokázat, že použití dusitanů je technologicky výhodnější, protože již není nutná redukce dusičnanů na dusitany působením redukujících enzymů laktické mikroflóry. Vlastní příčinou zachování růžové barvy masa je reakce oxidu dusnatého vznikajícího z dusitanů se svalovým barvivem myoglobinem. Výsledný komplex je odolný vůči oxidaci a tím je zabráněno zešednutí masných výrobků. Mechanismus těchto reakcí je znám od začátku 20. století [6, 18].

Důvodů používání dusitanů v masném průmyslu je dnes však mnohem více. Dusitany přispívají k vytvoření typické chuti a aromatu uzenin a brání oxidaci dalších složek masa. Dusitanové složky solících směsí jsou rovněž schopné efektivně omezovat růst patogen-

ních mikroorganismů a tím značnou měrou přispívají k zajištění zdravotní nezávadnosti masných výrobků. Právě díky této schopnosti je dusitan využíván v technologii výroby FMV jako první překážka proti nežádoucím bakteriím. Zvláště významný je také účinek dusitanů v ochraně masných výrobků před výskytem klobásového jedu botulotoxinu, který byl v dávných dobách příčinou smrtelných otrav z uzenin [6, 18].

V celé Evropské unii je přídavek dusitanu sodného nebo draselného řízen evropskou legislativou, konkrétně nařízením Komise (EU) č. 1129/2011, které upravuje přílohu II nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1333/2008 a které stanovuje podmínky použití přídatných látek při výrobě potravin. Povolným množstvím je podle tohoto předpisu 150 mg dusitanu na kilogram FMV, respektive 180 mg/kg pro vybrané trvanlivé masné výrobky jako je Vysočina, Selský salám, Turistický trvanlivý salám, Poličan, Herkules, Lovecký salám a další, za podmínek, jedná-li se o fermentovaný výrobek, podrobení třístupňovému procesu fermentování s následným uzením po dobu 14 až 30 dnů. V případě tepelně opracovaných trvanlivých masných výrobků je požadováno vaření při teplotě 70 °C s následným sušením a uzením po dobu 8 až 12 dnů [20].

Voda

Voda, jakožto obvyklá recepturní složka většiny vařených masných výrobků, umožňuje vytvoření bílkovinného gelu a zvyšuje výtěžnost výroby. Výroba FMV je však naopak založena na odstraňování vody v procesu sušení a tak má přidávání vody v této oblasti masné výroby zcela jiný význam, a to usnadnění promíchání složek díla a rozpuštění některých přísad. V případě výroby celosvalových fermentovaných výrobků lze vodu využít k vytvoření roztoku soli, koření a dalších přísad, ve kterém se výrobek ponechá několik dní naložený. To, že lze pro tyto účely použít pouze vodu pitnou, je samozřejmostí [21].

Koření a byliny

Termíny koření a byliny se zpravidla používají pro popis aromatických částí rostlin, kterými mohou být kůra (skořice), pupeny (hřebíček), květy (šafrán), listy (bobkový list, šalvěj), plody (nové koření, papriky), cibule (česnek, cibule), kořeny (zázvor), nebo semena (kmín, hořčice). Obecně platí, že koření je vysoce aromatické v důsledku vysokého obsahu silic, zatímco byliny jsou na obsah esenciálních olejů chudší a obvykle se používají pro vytvoření mírně nebo jemně aromatické chuti. Koření a byliny se kromě chuti používají rovněž pro jejich antioxidační a antimikrobiální vlastnosti a schopnost stimulovat růst bakterií

mléčného kvašení, což je zvláště významné u FMV. Červená paprika našla uplatnění také jako přírodní barvivo [6, 22, 23, 24].

K ochucení FMV se nejčastěji využívá pepř. V ČR je při výrobě tradičních FMV hodně používán také kmín, hřebíček a česnek. Například v tradičním Loveckém salámu bychom měli nalézt kombinaci mletého černého pepře, mletého hřebíčku a česneku, který se zpravidla dodává ve formě koncentrátu. Poličan by navíc měl obsahovat sladkou a pálivou papriku. Kořenící směr pro Herkules je zase složena z černého pepře, mletého kmínu, koriantru a česneku (česnekového koncentrátu). Směs sladké papriky, speciální paprikové emulze a kmínu je typická pro Paprikáš [6].

Používání koření v masném průmyslu je doprovázeno řadou problémů. Základním nedostatkem koření je jeho nestálost v kvalitě, která se různí podle zeměpisného původu, klimatických podmínek i způsobu zpracování. Rovněž mezi jednotlivými sklizněmi lze nalézt významné kvalitativní rozdíly. Velkým problémem spojeným s kořením je jeho poměrně vysoké mikrobiologické znečištění. Většina těchto produktů je totiž vyráběna v rozvojových zemích s nedostatečnou hygienou prostředí [22, 25]. Witkowská et al. [26] zjistili, že 6 druhů z celkových 30 komerčně vyrobených druhů koření nevyhovělo na obsah mezofilních aerobních bakterií. Konkrétně se jednalo o kmín, zázvor, nové koření, kurkumu, petržel a vůbec nejvyšší mikrobiální zatížení bylo zjištěno u fenyklu. Naopak růst mikroorganismů nebyl zaznamenán u hořčice, bílého pepře a papriky, která však byla tepelně ošetřena. Vysoký byl rovněž obsah sporulujících bakterií (u 80 % vzorků) [26]. V souvislosti s kořením by se neměla opomíjet ani přítomnost patogenních mikroorganismů. Zvláště nebezpečné jsou plísně produkující toxické sekundární metabolity (mykotoxiny). Mezi plísně, které byly nalezeny v koření, patří například *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium*, *Penicillium* nebo *Eurotium* [27].

Alternativou v oblasti ochucování potravinářských produktů, masných výrobků nevyjímaje, je použití koření emulzí či extraktů koření ve formě silic a oleorezinů. Tyto výrobky se vyznačují značnou mikrobiální a senzorickou stabilitou a chuťovou vyrovnaností. Výhodou je také snadnost rozptýlení do celého objemu díla [25].

Sacharidy

Cukry jsou běžnými přísadami do fermentovaných uzenin. Často používaná je dextróza (glukóza), sacharóza, laktóza a stejně tak kukuřičný sirup. Hlavní úlohou těchto cukrů ve FMV je působit jako substrát pro bakterie mléčného kvašení (LAB), které tyto cukry

přeměňují na kyselinu mléčnou, přičemž typ cukru ovlivňující rychlost poklesu pH. Fermentované salámy vyrobené za použití glukózy případně fruktózy vykazují rychlejší acidifikaci, než ty, ve kterých je použit disacharid laktóza nebo sacharóza, což souvisí s potřebou tyto disacharidy nejprve hydrolyzovat na monosacharidy [21, 28].

Rozhodující pro podporu kvašení je dextróza. Tento sacharid se v případě krátce zrajících FMV obvykle přidává v množství 0,5 – 0,75 % hmotnostních v závislosti na požadovaném poklesu pH. Pokud se volí místo jednoduchých cukrů sacharóza, bývá její přídavek obdobný jako u dextrózy. Laktóza se dodává v množství asi 1 % z důvodů vyšší zbytkové koncentrace sacharidu v díle. U déle zrajících FMV je dávka cukrů nižší. Konkrétně je to asi 0,3 % hmotnostních glukózy nebo sacharózy, nebo 0,5 % laktózy. Obecně množství 0,1 % glukózy přidané do díla snižuje hodnotu pH fermentovaného výrobku o 0,1. Aplikace 8 – 10 g glukózy může tedy vést ke snížení pH z hodnoty kolem 5,7 na 4,6 – 4,8 [6, 21, 29].

Startovací kultury

V dnešní době je převážná část FMV vyráběna za použití startovacích kultur. Tyto kultury patří zejména do skupiny LAB, z nichž nejčastěji využívaný je *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* a *Pediococcus acidilactici*. Výjimkou však není ani aplikace koaguláza negativních stafylokoků (CNS), jako je *Staphylococcus xylosus* a *Staphylococcus carnosus*. Vlastnosti některých výrobků mohou být dány také přítomností kvasinkové kultury *Candida* nebo *Debaryomyces hansenii*. K povrchovému ošetření neuzených fermentovaných salámů se pak používají plísňové startovací kultury obvykle patřící do druhu *Penicillium nalgiovense* [6, 30].

Bakteriální kultury se přidávají do díla především pro svou schopnost fermentace cukrů, jejímž výsledkem je okyselení uzeniny. Tento proces má hlavní úlohu při zajišťování mikrobiální stability produktu a zároveň je příznivě ovlivněna jeho chuť, barva a textura. Dávkování kultury je řízeno tak, aby bylo dosaženo počtu bakteriálních buněk minimálně 10^7 v 1 gramu díla [8, 31].

Kvasinkové kultury přidávané do díla přispívají k rozvoji charakteristického vybarvení produktů a díky schopnosti neutralizovat kyselinu mléčnou zjemňují jejich chuť. U řady kvasinek izolovaných z FMV byla také zjištěna lipolytická a proteolytická aktivita, která je obzvláště významná pro tvorbu aroma. Význam plísní využívaných v masném průmyslu spočívá v rychlé tvorbě bílého nebo šedobílého mycelia na povrchu salámů, které zabraňu-

je nadměrnému vysoušení. Dehydratace produktu tak může probíhat více homogenně. Mycelium také chrání tuk před oxidací, a to díky rozkladu peroxidů a spotřebě kyslíku. Snižování koncentrace kyslíku v okolí produktu má rovněž vliv na barvu masové složky. Rozkladem tuků, bílkovin a kyseliny mléčné přispívá přítomnost mycelia ke zlepšení chuti konečného produktu. Bezsporný je také význam plísňového povlaku v ochraně produktu před porůstáním kontaminujícími plísněmi [6, 32, 33].

Z důvodů významnosti startovacích kultur a obecně mikroorganismů pro vlastnosti FMV je tato problematika více probrána v samostatné kapitole (viz kapitola 3).

Především z finančních důvodů lze namísto bakteriální fermentace aplikovat chemické sloučeniny, kterými se rovněž dosáhne poklesu pH díla. Chemické okyselení výrazně zkrátí dobu potřebnou pro fermentaci, tím se sníží výrobní náklady a získá se tak levnější produkt. Nejběžněji používanou sloučeninou je glukono- δ -lakton (δ -lakton D-glukonové kyseliny, GDL). GDL po přidavku do díla v přítomnosti vody snadno podléhá hydrolyze na kyselinu glukonovou, která způsobí rychlý pokles pH. Bohužel výsledná kvalita produktu již není tak dobrá jako v případě klasické výroby. Rychlý pokles pH má rychlý účinek na aktivitu endogenních a bakteriálních enzymů, které jsou zodpovědné za tvorbu chuti fermentované uzeniny. Činnost těchto enzymů je tedy brzy zastavena a výsledný produkt je chuťově nevýrazný [8, 34].

Antioxidanty

Fermentované masné výrobky jsou bohaté na lipidy, které poměrně snadno podléhají hydrolyze lipázami. Tyto enzymy jsou převážně endogenního původu a přednostně uvolňují z triacylglycerolů a fosfolipidů kyselinu linolovou a olejovou a tím významně přispívají ke zvyšování obsahu volných nenasycených mastných kyselin v uzeninách v průběhu zrání. Tyto volné mastné kyseliny jsou mnohem více náchylné k oxidaci než jejich v lipidech vázané protějšky. Oxidace nenasycených mastných kyselin během zrání masného výrobku může být do jisté míry užitečným jevem, při kterém se vytvářejí sloučeniny s pozitivním vlivem na aroma a chuť výrobku. Nepřiměřeně rozsáhlá oxidace lipidů by však mohla dosáhnout úrovně žluknutí tuků a tvorby toxických sloučenin s možným rizikem pro lidské zdraví. Taková potravina by již nemohla být považována za přijatelnou pro lidskou spotřebu. Z těchto důvodů je potřeba oxidační procesy ve zrajícím masném výrobku regulovat. Toto bývá často řešeno přidavkem přírodních nebo syntetických antioxidantů do masového díla [35, 36].

Nejčastěji používanými antioxidanty jsou kyselina askorbová neboli vitamin C, askorbát sodný a erythorbát sodný. Tyto sloučeniny však nedisponují pouze ochranou lipidů před oxidačními reakcemi. Urychlují také proces vybarvení masných výrobků redukcí dusitanu na oxid dusnatý a jeho následnou vazbu na myoglobin a rovněž tak stabilizují již vytvořenou barvu ve finálních výrobcích. Často používanými antioxidanty v masné výrobě jsou také tokoferoly známé pod označením vitamin E [6, 24].

Jak už bylo o několik řádků výše naznačeno, některé druhy koření a bylin mohou svými antioxidantními účinky přispět k údržnosti FMV [24]. Na tuto problematiku již bylo zaměřeno několik vědeckých studií. Krishnan et al. [37] prokázali antioxidantní vlastnosti extraktů z hřebíčku (*Syzygium aromaticum*), skořice (*Cinnamomum cassia*), oregana (*Origanum vulgare*) a semen brukve černé (*Brassica nigra*) při hledání způsobů prodloužení údržnosti syrového kuřecího masa. Kurcubića et al. [38] našli velký potenciál v extraktu z *Kitaibelia vitifolia* při ochraně FMV před nežádoucími oxidačními procesy i mikroorganizmy.

Proteiny

Přídavek proteinů do masných výrobků může mít hned několik důvodů. Jednak stabilizují emulze, neboť disponují hydrofilními i lipofilními skupinami, díky nimž působí jako emulgátory. Také zvyšují celkový obsah proteinů ve výrobcích, ovlivňují chuť produktů a jejich konzistenci díky schopnosti vázat vodu. Z rostlinných bílkovin můžeme v masných výrobcích nejčastěji nalézt bílkovinu sójovou nebo pšeničnou. V Evropě je hodně populární také bílkovina hrachová, protože je v současné době vyráběna z geneticky nemodifikovaného hrachu. Zmiňované rostlinné bílkoviny se do trvanlivých salámů přidávají buď ve formě prášku, texturovaného proteinu, v podobě gelu či v mraženém stavu [6, 39].

V tradičních českých FMV bychom však rostlinné bílkoviny nalézt neměli. Jejich použití není podle vyhlášky 69/2016 Sb. ve znění pozdějších předpisů v těchto případech povoleno. Omezení se konkrétně týká salámu Poličan a Herkules, Dunajské klobásy, Loveckého salámu a Paprikáše [2].

Přídavek živočišných bílkovin do masového díla fermentovaných salámů se může realizovat ve formě kůžové emulze z vepřových kůží, které jsou levným zdrojem kvalitních kolagenových bílkovin. Tyto emulze se získávají máčením vepřových kůží v roztoku organických

kých kyselin. Pro trvanlivé masné výrobky se doporučuje kůžovou emulzi před použitím zmrazit [6].

Obalová střeva

Součástí technologie výroby FMV je plnění díla do obalových střeve. Tato střeva mohou být přírodního původu nebo umělá. Přírodní střeva jsou upravená zvířecí střeva získaná při porážce. Umělá střeva jsou vyrobena z celulózy, kolagenu nebo syntetických materiálů. Střeva určují tvar masných výrobků, zajišťují soudržnost masového díla v průběhu následného zpracování, distribuce a přípravy ke konzumaci a podílí se na ochraně produktu během skladování [40, 41].

Obalová střeva pro masné výrobky obecně musí splňovat především tyto parametry:

1. jednoduchá manipulace při plnění,
2. pevnost a stabilita při plnění,
3. vysoká spolehlivost s ohledem na produkci a hygienu.

Při výrobě trvanlivých masných produktů je navíc kladen požadavek na propustnost střeve pro vodní páru, plyny a případně složky kouře. Při zrání je pak důležitá schopnost obalu se smršťovat spolu se změnami objemu salámu. Tyto podmínky splňují střeva přírodní, celulózová a kolagenní [6, 40].

Přírodní střeva pocházejí zejména z tenkého a tlustého střeve, močového měchýře, žaludku a rekta ovcí, koz, prasat, skotu a koní. Využití těchto materiálů se značně liší stát od státu a v závislosti na typu výrobku. U nás se převážně zpracovávají tenká vepřová střeva, a to pro produkci trvanlivých klobás. Tyto výrobky se před konzumací nemusí loupat, protože střívka jsou jedlá a to je jejich nesporná výhoda. Naopak velkým problémem přírodních střeve bývá jejich značné mikrobiální zatížení, které v závislosti na stavu výchozí suroviny a podmínek zpracování může dosahovat hodnot 10^4 až 10^7 CFU/g. Mikrobiální populaci přírodních střeve z prasat, skotu a ovcí tvoří převážně zástupci rodu *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Vagococcus* a *Clostridium* [6, 40, 41, 42].

Celulózové obaly na bázi zpevněné vlákniny (tzv. fibrousová střeva) jsou velmi vhodným umělým střevem pro výrobu trvanlivých produktů. Jsou mechanicky odolná, rozšiřují se ponořením do vody, během vysychání se zase smršťují a propouští plyny, kouř a vodní páry. Další výhodou tohoto typu střeve je kalibrovaný průměr, potiskovatelnost, široká ba-

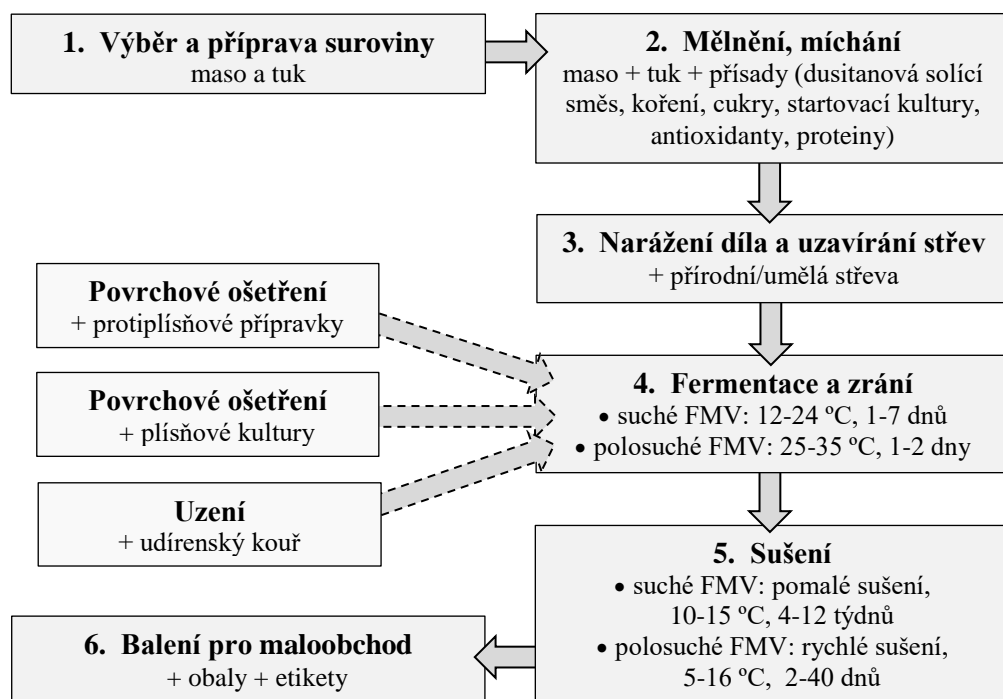
revná škála a mikrobiální stabilita. Všechna obalová střeva na bázi celulózy je však nutné před spotřebou z produktu odstranit [6, 40, 41].

Výchozí surovinou pro výrobu kolagenních neboli klihovkových střev je štípenková klihovka, tj. spodní vrstva kůže, která zůstává jako vedlejší produkt po štípání v koželužnách. Tato střeva vynikají propustností pro vodní páru a složky kouře a dokonalou přilnavostí k povrchu díla. Výrobku tak propůjčují přirozený vzhled. Pozitivní je také zanedbatelná mikrobiální kontaminace, kalibrovaný průměr a stravitelnost střev. Drobným negativem klihovkových střev je menší pevnost oproti obalům ze zpevněné celulózy. Tato nevýhoda je však kompenzována mnohem přijatelnější cenou [6, 40, 41].

2.2 Proces výroby fermentovaného masného výrobku

Výroba trvanlivých fermentovaných uzenin není vůbec jednoduchou záležitostí. Vlastně se v technologii zpracování masa jedná o jednu z nejnáročnějších výrob. K tomu, aby zpracovatel získal opravdu kvalitní produkt, musí disponovat nejen dobrým strojním vybavením, ale musí rovněž dbát na výběr jakostní suroviny a k tomu navíc potřebuje dostatek znalostí a zkušeností [3].

Celý technologický postup klasické výroby FMV je schematicky znázorněn na Obrázku 1. Jednotlivé technologické kroky na sebe plynule navazují bez zbytečných prodlev [3].



Obrázek 1: Proces výroby trvanlivých fermentovaných masných výrobků [3, 43]

2.2.1 Výběr a příprava suroviny

Maso pro výrobu FMV musí pocházet ze zdravých dobře krmených zvířat. Hovězí maso je výborné pro výrobu polosuchých trvanlivých masných výrobků, vepřové se hodí více pro suché trvanlivé salámy. Nejvhodnější je použití masa s nízkým pH. Hovězí maso by mělo mít pH na hodnotách 5,4 – 5,5, vepřové kolem 5,7 – 5,8. Maso se před zpracováním musí vykostit a zbavit šlach a měkké intramuskulární tukové tkáně. Hřbetní vepřové sádlo se u většiny produktů používá čerstvé [40, 43].

Maso i tuk se před použitím chladí nebo mrazí v závislosti na zvolené technologii přípravy masového díla (viz kap. 2.2.2. Mělnění a míchání) [43].

2.2.2 Mělnění a míchání

V zásadě existují dva způsoby přípravy díla FMV. V prvním případě probíhá mělnění a míchání surovin v kutru, druhý způsob využívá k rozmělnění masa na požadovanou velikost zrna řezačku a vlastní míchání surovin pak probíhá v míchačce [6].

Kutr je zařízení skládající se z pomalu otáčející se mísy a na hřídeli připevněné sady rychle rotující nožů, které rozsekávají maso a tuk a současně vznikající dílo promíchávají. Relativní rychlost otáčení mísy a nožů určuje velikost částic masa a tuku. Většina produktů střední a severní Evropy je mělněna na velikost zrna 0,8 – 3 mm [6, 43].

Největším problémem kutrů je zahřívání díla v průběhu jeho přípravy. Teplota směsi by se měla udržovat na -4 až -1 °C. Toho se dosahuje dávkováním sádla nebo masa s vysokým podílem tuku (např. boky) ve mraženém stavu o maximální teplotě -10 °C. Maso libové se pak používá vychlazené přibližně na 1 °C. Udržování uvedené teploty díla je významné pro prevenci mazání tuku z částic sádla. Při teplotách vyšších než 0 °C by uvolňující se tuk ucpával kapiláry vytvořené ve struktuře díla a mazal by se na stěnu obalových střev při narážení. Obě tyto skutečnosti by značně znesnadňovaly transport vody ze středu výrobku k povrchu a její odpar v průběhu sušení. Doba sušení by se tak prodlužovala a údržnost výrobku snižovala. Součástí prevence zahřívání díla je také pravidelné ostření nožů a nepřepřehování mísy kutru [6, 8, 40, 43].

Vlastní postup přípravy díla v kutru je možné rozdělit do několika kroků:

1. nasekání velkých kusů libového masa,
2. dávkování startovací kultury a krátké promíchání,

3. přídavek zmraženého tuku spolu s kořením a cukry a pokračování v sekání při střední rychlosti, dokud se nedosáhne požadované velikosti částic tuku,
4. nakonec přídavek dusitanové solící směsi a míchání díla při nízké rychlosti po dobu šesti až osmi otáček za minutu [40].

Při výrobě salámů s větší velikostí zrna (4 – 13 mm a více) je vhodnější zvolit technologii s mělněním suroviny na řezačkách a mícháním díla v míchačkách. Libové maso musí být důkladně vychlazené (1 °C) nebo dokonce mírně zmražené. Sádlo by mělo být taktéž zmražené, aby se dosáhlo stejnoměrných částic tuku v díle. Nejprve je zmražená a vytemperovaná surovina mleta přes desky o průměru 13 – 20 mm, poté je dopravníkem přiveдена do míchačky, kde je smíchána se všemi přísadami. Po krátkém promíchání je dílo přesunuto do druhé řezačky, kde je redukována velikost zrna na finální podobu. Dopravníkem je dílo transportováno k závěrečnému promíchání do další míchačky [6, 40].

2.2.3 Narážení díla a uzavírání střev

Připravené masové dílo je naráženo do přírodních nebo umělých střev pomocí speciálního plnicího stroje, tzv. narážečky. I při tomto procesu je kladen důraz na správnou teplotu díla. Ta závisí na složení a struktuře díla, dále na použitém obalovém střevě a způsobu plnění. Běžně postačuje teplota díla kolem -1 až -2 °C. Teploty pod -4 °C se již nedoporučují, neboť při nich začíná směs v plničce tuhnout a dopravení díla do obalu se tak stává problematické [6, 43].

Narážení díla je potřeba provést tak, aby se minimalizoval výskyt vzduchových kapes ve výrobku. Toho se dosahuje používáním vakuových narážeček a plněním střev jak jen to je možné. Nepřítomnost kyslíku v naraženém díle je důležitá z hlediska správného vybarvení masného výrobku a zajištění jeho kompaktnosti a dlouhodobé trvanlivosti [6, 40].

Naplněná střívka jsou nejčastěji na sponovacích automatech uzavírána plastovými nebo hliníkovými klipsy. Některá zařízení jsou schopna také připevnit smyčky pro zavěšení výrobků přes udírenské tyče. Tradičnějším a nejjednodušším způsobem oddělování jednotlivých výrobků je přetočení střívka nebo vytvoření uzlu. Přetáčení se používá při uzavírání drobných výrobků, jako jsou párky, klobásy a výjimečně jitrnice a je aplikovatelné pouze na skopová, vepřová a kolagenní střeva. Ručním uzlem lze uzavřít každé střevo, ale je to nevhodné a nevhodné a proto se tento způsob používá pouze pro koncové uzavírání párek či klobás. Další možností uzavírání střev je vázání provázkem, dříve po-

měrně namáhavá a zdlouhavá práce, ale dnes díky efektivním vázacím strojům velmi perspektivní způsob [6, 44, 45].

Před vlastním narážením je nutné věnovat také dostatečnou pozornost přípravě obalových střev. Přírodní střívka se uchovávají v solném nálevu nebo nasolená nasucho, případně ve zmraženém stavu. Solená střeva je před plněním nutno zbavit ulpělé soli omytím studenou vodou. Nasucho solená střívka musí být máčena ve vodě po dobu několika hodin, aby získala potřebnou pružnost [40, 41].

2.2.4 Fermentace a zrání

Bezprostředním cílem tohoto úseku výroby FMV je zahájení fermentačních procesů zajištěním optimálních podmínek pro růst fermentujících bakterií a umožnění odparu vlhkosti z masného výrobku. Čerstvě naplněné salámy jsou na udírenských vozících umístěny do zrací komory s kontrolovanou teplotou, relativní vlhkostí vzduchu (RVV) a rychlostí proudění vzduchu. Zde budou podrobeny fermentaci a zrání a v případě moderních kombinovaných komor i sušení [6, 40, 43].

Jelikož se teplota právě naražených salámů pohybuje pod bodem mrazu, je některými odborníky doporučována před jejich transportem do zrací komory asi tří hodinová temperace při mírné teplotě místnosti. Temperaci je však možno provést přímo ve zrací komoře před započítáním vlastní fermentace. Během této tzv. vyrovnávací fáze je teplota v komoře nastavena na 16 – 22 °C, RVV na 60 – 70 % a rychlost proudění vzduchu na přibližně 0,8 m/s. Nízká RVV v komoře brání nadměrné kondenzaci vody na povrchu salámů v důsledku rozdílných teplot prostředí a výrobků. Regulace kondenzace vody je důležitá z důvodů ekonomických (přebytečná vlhkost zvyšuje nároky na sušení) i kvalitativní (voda vyplavuje z povrchových vrstev výrobku barvivo myoglobin, tyto části jsou v důsledku toho nedostatečně vybarveny). Vyrovnávací období zpravidla trvá 1 – 6 hodin v přímé závislosti na průměru salámů a stupni naplnění komory [6, 8, 40].

V druhé fázi se musí RVV v komoře zvýšit na 92 – 95 % a teplota upravit na 18 – 26 °C, rychlost proudění vzduchu se zachová na 0,8 m/s. Tím se vytvoří ideální podmínky pro průběh fermentace. Při nastavování jednotlivých parametrů se zohledňuje typ použité startovací kultury a požadovaná rychlost poklesu pH. Obecně platí, že čím vyšší teplota fermentace, tím rychlejší produkce kyseliny mléčné a tudíž i pokles pH [6, 43, 46].

Fermentace a zrání v prvních dnech může probíhat ve speciálních zakuřovacích komorách, které umožňují uzení zrajících salámů. Zde pobývají výrobky v našich podmínkách přibližně jeden týden. Po celou tuto dobu je nutné zajistit řízení RVV, tak aby vlhkost vzduchu byla asi o 5 % nižší než vlhkost výrobků. Při nižší RVV již hrozí přesušení povrchu salámů a vznik tzv. kroužku. Vyuzené výrobky jsou poté přemístěny do konečných zracích komor, kde v průběhu následujících 1 – 3 týdnů dozrávají a vysychají [6, 46].

Uzení FMV je typické hlavně pro výrobky střední a severní Evropy. Kouř těmto výrobkům dodává specifické aroma a zbarvení povrchu a přispívá k jejich údržnosti svým antimikrobiálním a antioxidačním účinkem. Preventivně působí především proti plísním na povrchu obalového střeva [8, 43].

K uzení je využíván studený kouř o teplotě 20 – 25 °C, který je vhaněn do komory většinou až po 36 – 48 hodinách od naražení díla do střev, kdy už v masném výrobku proběhly všechny důležité barevné reakce. Aplikace udírenského kouře je rozdělena do intervalů trvajících 1 – 3 hodiny. Počet těchto intervalů je určen požadovanou povrchovou barvou masného výrobku. Celková doba uzení pak může být v řádech několika hodin až dní a ve specifických případech může trvat několik týdnů. Vše závisí na průměru a typu výrobku [8, 40].

Specifickou skupinou FMV jsou výrobky, které nejsou podrobeny uzení. Tyto výrobky se vyznačují delší dobou zrání (4 – 6 týdnů), během které povrch salámů porůstá plísní. Ta se na výrobky aplikuje ve formě suspenze spor, a sice ponořením nebo postřikem. V běžné praxi se toto provádí až po dvoudenní fermentaci masných výrobků. Pokud se tyto výrobky přeci jen udí, tak ještě před aplikací spor a velmi slabě [6, 8, 40].

Při výrobě FMV s plísní na povrchu nelze použít jakoukoli plíseň. Některé druhy jsou schopny produkovat toxické látky. Přesto existuje několik vybraných kultur plísní, které mohou posloužit jako startovací kultury pro FMV. Snad nejvíce používanou kulturou je pro tyto aplikace druh *Penicillium nalgiovense* [8, 40].

2.2.5 Sušení

Po fázi hlavní fermentace nastává období sušení, kdy se v salámech vytváří nejvýznamnější faktor zajišťující dlouhodobou údržnost FMV, a sice nízká hladina vodní aktivity (a_w). V průběhu sušení se ve výrobcích snižuje obsah vody, kterou mikroorganismy využívají

ke svému životu. S poklesem a_w klesá i aktivita mikroorganismů. Mimo toho se snižuje také hmotnost a objem výrobků a zpevňuje se jejich struktura [6, 47].

Sušení ve vzdušných komorách probíhá při postupně se snižující teplotě vzduchu na 10 – 15 °C a RVV na 72 – 75 %. Postupné snižování vlhkosti je klíčovým procesem k umožnění migrace vody z vnitřních částí salámů k povrchu. Rychlost proudění vzduchu se rovněž zpomaluje, nikdy by však neměl jeho pohyb zcela ustát v rámci předcházení růstu plísní na povrchu výrobků. Doba sušení se pohybuje v rozmezí 4 – 12 týdnů a závisí hlavně na průměru výrobků, typu použité startovací kultury, stupni rozmělnění díla a obsahu tuku. U výrobků s vyšším obsahem tuku je možné dosáhnout konečné hodnoty a_w rychleji. Maso totiž obsahuje asi 75 % vody, ale v tukové tkáni je vody pouze 10 až 15 %. Masné výrobky s nižším obsahem masa tudíž obsahují i méně vody, kterou je potřeba z výrobku v průběhu sušení odstranit. Na druhou stranu tuk snižuje intenzitu sušení a chrání povrch před nadměrným vysušením. FMV s plísní na povrchu vyžadují speciální program sušení. Plísně potřebují ke svému růstu vyšší vlhkost prostředí, čímž se doba sušení prodlužuje [6, 40, 43, 46, 47].

2.2.6 Balení a skladování

Prvotním účelem balení je ochrana masných výrobků před mikrobiálními a fyzikálně-chemickými změnami s nežádoucími dopady na kvalitu. Obal zajišťuje během zpracování, skladování a distribuce ochranu potravin před kontaminací nečistotami, mikroorganismy, parazity, hmyzem a toxickými látkami. Některé obaly mohou bránit přístupu kyslíku a světla k balené potravine a tím ji chránit před změnami barvy, vůně a chuti. Obal rovněž omezuje změny vlhkosti potravin absorpcí nebo odpařováním [40].

Nejvíce rozšířeným způsobem balení FMV je vakuové balení a balení v ochranné atmosféře. Nicméně tyto způsoby balení nejsou vhodné pro všechny typy FMV, a to zejména pro masné výrobky zrající pod plísní. V posledních letech se zavádí a intenzivně vyvíjí také aktivní balení, jakožto reakce na požadavky spotřebitelů a trhu [48, 49].

Ačkoliv je v průběhu výroby FMV vytvořena řada bariér bránících růstu mikroorganismů vyvolávajících alimentární onemocnění, je doporučováno uchovávat polosuché FMV při teplotách nižších než 15 °C a suché FMV a výrobky s plísní na povrchu při teplotách nepřekračujících 25 °C. Někteří odborníci dokonce upřednostňují chladírenské skladování těchto masných výrobků. Hlavním důvodem je pomalejší průběh chemických reakcí (oxi-

dace lipidů a změny barvy), nižší produkce biogenních aminů a nižší přenos kyslíku přes obalový materiál za těchto podmínek [48, 50, 51].

2.2.7 Quick-Dry-Slice proces

Tradiční postup výroby FMV je poměrně časově náročný. Limitujícím faktorem, pokud jde právě o čas, je proces sušení. Snahou výrobců je tedy dobu sušení zkracovat a tím snižovat náklady na potřebné sušící vybavení, kapitál a práci. Součástí tohoto úsilí je také snižování určité obavy týkající se bezpečnosti FMV, hlavně co se týče plísní a oxidace lipidů [52].

Již před více než deseti lety navrhli Comaposada et al. [53] novou technologii pro sušení krájených masných výrobků s názvem Quick-Dry-Slice (QDS), kterou si nechali v roce 2005 patentovat. Celý QDS proces začíná na konci období fermentace. Masný výrobek je nejprve zmrazen pro usnadnění následného krájení. Tloušťka získaných plátek se pohybuje v rozmezí 1,5 – 2 mm. Plátky jsou částečně sušeny při teplotě kolem 20 °C a tlaku nižším než je atmosférický tlak (5 – 10 mbar). Doba sušení nezbytná k dosažení mikrobiologické stability produktu odpovídá době potřebné ke snížení hmotnosti plátku o přibližně 30 % (vztaženo na hmotnost před sušením) [53]. V praxi by to pak mohlo znamenat zkrácení doby sušení na pouhých 30 minut. Po částečném vysušení jsou plátky FMV vakuově baleny a dále udržovány při teplotě 4 °C po dobu 7 dnů. Během této doby by se měla vyvinout charakteristická chuť a vůně masného výrobku. Při sensorických testech však byly fermentované salámy sušené procesem QDS prokazatelně méně kyselé než výrobky vyrobené tradiční technologií. Menší rozdíly byly zaznamenány také ve vůni, ale během skladování se vůně salámů vyrobených zrychlenou metodou vyvíjela k lepšímu. Na závěr je vhodné poznamenat, že technologii sušení QDS lze aplikovat nejen na syrové masné výrobky, ale také na tepelně opracované masné produkty, sýry nebo ryby [52, 53].

3 MIKROFLÓRA FERMENTOVANÉHO MASNÉHO VÝROBKU V PRŮBĚHU ZRÁNÍ A SKLADOVÁNÍ

Nejdůležitějším úsekem výroby FMV je fáze fermentace a zrání. Procesy probíhající v tomto období mají rozhodující vliv na organoleptické vlastnosti výrobku a jeho údržnost. Za technologicky nejvýznamnější mikroorganismy, zodpovědné za tyto procesy, jsou považovány dvě hlavní skupiny bakterií, a sice bakterie mléčného kvašení (LAB) a koagula-negativní stafylokoky (CNS) [54]. V řadě studií, včetně té nedávné od Greppi et al. [55], přitom byla prokázána výrazná dominance LAB v průběhu celé doby zrání. V tradičních italských suchých fermentovaných uzeninách, jejichž výroba je založena na přirozené mikroflóře surovin a prostředí a které si pro svou studii vybrali právě Greppi et al. [55], se koncentrace CNS během čtyřiceti pětidenního zrání postupně zvyšovala z počáteční 3 log CFU/g na konečnou 7 log CFU/g, ovšem počty LAB se již od třetího dne zrání pohybovaly nad hranicí 8 log CFU/g. Obdobně rychlý růst LAB byl pozorován už dříve, kdy se již během prvních tří dnů fermentace masného výrobku s přidavkem startovací kultury zvýšil počet LAB z 5 log CFU/g na více než 9 log CFU/g [56]. Vysoké zastoupení LAB zaznamenali v hovězích a vepřových fermentovaných klobásách vyrobených na severu Srbska bez použití startovacích kultur také Ducic et al. [57]. V podmínkách střední Evropy však může být situace mírně odlišná. Konkrétně v jedné studii provedené na Slovensku se počty LAB ve FMV bez použití startovací kultury s těžší vyšplhaly k hranici 7 log CFU/g a ke konci zrání (30. den) se množství životaschopných buněk dokonce snižovalo. Naopak v klobásách, při jejichž výrobě byla použita startovací kultura (*Staphylococcus xylosum*, *Pediococcus pentosaceus* a *Lactobacillus plantarum*) se koncentrace LAB držela po celou dobu zrání v rozmezí 8 – 9 log CFU/g [58].

Populace LAB v tradičních italských fermentovaných klobásách je podle Greppi et al. [55] tvořena převážně druhem *Lactobacillus sakei*, který je doprovázen méně početnými druhy laktobacilů, konkrétně *Lb. algidus*, *Lb. pentosus* a *Lb. curvatus*, a dále druhy *Lactococcus piscium*, *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc carnosum*, *Enterococcus gilvus*, případně *Carnobacterium divergens*. K podobnému zjištění o něco dříve dospěli také Połka et al. [59], kteří dokázali v jiných italských FMV získaných od šesti různých producentů identifikovat 33 druhů laktobacilů. I v těchto salámech byl, až na jednu výjimku, dominantním laktobacilem *Lb. sakei*, a to především v pokročilejším stádiu zrání. Vzorky salámů dodané jedním producentem vykazovaly převažující zastou-

pení *Lb. coryniformis* a *Lb. plantarum*. Laktobacily však nejsou jedinými LAB vyskytujícími se ve FMV. Svůj životní prostor si zde hájí také zástupci čeledi *Streptococcaceae* a *Leuconostocaceae* [59]. Nicméně výskyt streptokoků a dalších mléčných bakterií včetně rodu *Pediococcus* nebývá nikterak vysoký [60].

Nejčastěji izolovanými koaguláza-negativními stafylokoky z FMV jsou *Staphylococcus xylosus*, *S. succinus*, *S. equorum* a *S. saprophyticus* [55, 59]. Ve skutečnosti může být populace CNS ve FMV daleko širší, jak dokazuje studie od Pořka et al. [59], v níž se podařilo určit celkem 32 druhů stafylokoků.

Ekosystém FMV však bývá mnohem rozmanitější, což dokazují již několikrát citované vědecké studie. Greppi et al. [55] hlásí výskyt *Pseudomonas fragi*, *Photobacterium* sp. a *Brochothrix thermosphacta* v čerstvém masovém díle a sporadicky na nízkých úrovních také ve zrajících FMV. Tyto bakterie jsou známé tím, že přispívají ke kažení masa [55]. Někdy lze ve FMV nalézt bakterie čeledi *Brevibacteriaceae*, jejichž zdrojem mohou být vepřová střívka. Zástupci čeledi *Bifidobacteriaceae* a *Oxalobacteraceae* přítomni v masovém díle pocházejí pravděpodobně z masa, avšak v hotovém výrobku je jejich přítomnost spíše ojedinělá [59].

Další významnou skupinou mikroorganismů ve FMV jsou kvasinky a plísně. Běžně bývají přítomny v masovém díle v množstvích od 2 do 4,5 log CFU/g a v průběhu zrání většinou nepřekročí hranici 5 log CFU/g [61, 62]. Toto pravidlo však nemusí platit vždy. Příkladem jsou slovenské fermentované klobásky vyrobené bez přídavku kultury, ve kterých od 10. dne zrání dosahovaly počty kvasinek hodnoty mezi 6 a 7 log CFU/g [58].

Kvasinka *Debaryomyces hansenii* byla identifikována jako nejhojněji zastoupený druh ve spontánně kvašených masných výrobcích a často se také využívá jako startovací kultura [63]. Převahu kvasinek *Debaryomyces* ve vybraných salámech tradiční řemeslné i průmyslové výroby potvrzuje i další studie provedená brazilskými odborníky [64]. Poměrně bohatě zastoupeným rodem může být také rod *Candida*, což dokazují výsledky studia biodiverzity kvasinkové mikroflóry tradičního tureckého fermentovaného salámu Sucuk. Právě v tomto případě kvasinky *D. hansenii* figurovaly, co se počtu týče, až na druhém místě hned za kvasinkami *Candida zeylanoides* [65]. Dalšími méně početnými rody kvasinek, které mohou být součástí mikroflóry FMV, jsou *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Yarrowia*, *Pichia*, *Williopsis*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* a řada dalších. U tradičních FMV je pak možno očekávat větší druhovou rozmanitost [63, 64].

Z plísní se v masných výrobcích bez přídavku plísňových kultur nejčastěji vyskytují rody *Penicillium*, *Aspergillus* a *Eurotium* s výraznou převahou rodu *Penicillium* [66]. Cocolin et al. [63] hlásí výskyt *Penicillium farinosum*, *Penicillium viridicatum* a také *Mucor racemosus* ve FMV vyráběných tradiční technologií. Castellari et al. [66] se podařilo identifikovat celkem 16 druhů vláknitých hub izolovaných z povrchu suchých FMV, přičemž 10 druhů se řadilo právě do rodu *Penicillium*. Zbývající druhy spadaly do rodu *Aspergillus*, *Eurotium*, *Mucor*, *Rhizopus* či *Cladosporium*. Mezi těmito plísněmi byly nalezeny také druhy, které se považují za potenciální producenty mykotoxinů. Konkrétně se jednalo o *P. nordicum*, *P. commune*, *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. viridicatum*, *A. ochraceus* a *A. parasiticus*.

Často sledovanou skupinou mikroorganismů ve FMV jsou patogenní bakterie, přestože jsou tyto výrobky považovány za mikrobiologicky relativně bezpečné. Nicméně, v případě vysoké počáteční kontaminace surovin patogenními bakteriemi anebo nedostatečné kontroly antimikrobiálních faktorů, může být bezpečnost těchto produktů ohrožena [67]. Možný výskyt patogenů ve FMV byl dokázán již v několika studiích. Mnohé z nich se shodují na přítomnosti aerobních sporulující bakterií, *Listeria* spp. včetně *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp. a enterobakterií včetně shigatoxinogenní *Escherichia coli* O157 ve výchozích surovinách a spontánně kvašených masných výrobcích v počátečních fázích fermentace a zrání. Avšak v konečných produktech jsou počty těchto bakterií zpravidla pod limitem detekce, což je spojováno s poklesem pH výrobku v průběhu fermentace [57, 59, 68]. Výsledky studie provedené na švýcarských spontánně fermentovaných masných výrobcích však ukazují něco zcela odlišného. Přesněji řečeno 9 ze 14 konečných produktů bylo označeno za rizikové pro spotřebitele vzhledem k vysokému výskytu patogenních či potenciálně patogenních bakterií *Staphylococcus saprophyticus* nebo *S. epidermidis*, jejichž počty v některých případech dosahovaly hodnot 7,4 CFU/g, respektive 4,9 log CFU/g. Tato skutečnost byla navíc podpořena detekcí *S. aureus* a enterobakterií v těchto masných výrobcích [60]. To však není jediný případ výskytu *S. aureus* ve FMV po ukončení procesu zrání [59].

Doposud se veškeré zde uvedené informace o mikroflóře FMV týkaly produktů sušených klasickou technologií (Obrázek 1). Vyvinutí technologie QDS (viz 2.2.7) si však vyžaduje také prozkoumání mikroflóry masných výrobků ošetřených touto pokrokovou metodou. V současné době je k dispozici jen několik studií zabývajících se touto problematikou. Ty ale vesměs hovoří o jednom a tomtéž, a sice že mikroflóra FMV (především pak počty

patogenních bakterií) vyrobených klasickým způsobem a QDS technologií se v zásadě neliší. Dokonce i provokační testy se záměrným naočkováním kultury *L. monocytogenes*, *S. aureus* a salmonel (100 CFU/g) do masového díla vykazovaly podobné chování těchto patogenů v obou systémech [52, 69, 70].

Mikroflóra FMV může být opravdu rozmanitá. Na směr jejího vývoje má zásadní vliv pH a a_w prostředí masného výrobku, dostupnost kyslíku, obsah metabolitů a přísad v masovém díle a celkové řízení fermentačních a zrácích procesů (teplota, relativní vlhkost, čas). Pro příklad udržování FMV při vyšších teplotách, pokles parciálního tlaku kyslíku a pokles pH v salámech podporuje rychlejší růst LAB. Výskyt patogenů se pak odvíjí od úrovně hygieny získávání a zpracování surovin a úrovně hygieny vlastní výroby FMV [34, 57, 62].

3.1 Faktory ovlivňující růst mikroorganismů v průběhu zrání a skladování fermentovaného masného výrobku

Růst mikroorganismů v průběhu zrání je silně ovlivněn složením masové směsi, konkrétně druhem masa, obsahem soli, přidavkem cukrů, dusičnanů/dusitanů, koření, případně dalších přísad [8]. Stálým předmětem velkého zájmu jsou dusičnany a dusitany v masných výrobcích a hledání jejich optimální koncentrace nebo vhodných alternativ, při nichž bude minimalizováno riziko vzniku zdraví škodlivých N-nitrosaminů a současně bude dosaženo potřebného technologického a antibakteriálního účinku. Bylo zjištěno, že koncentrace dusičnanů nebo dusitanů nemusí mít zásadní vliv na celkové počty mikroorganismů (CPM) ani počty LAB ve FMV. I v prostředí s nejvyšší možnou koncentrací těchto látek (0,015 % NaNO_3 a 0,015 % NaNO_2) může být růst LAB poměrně rychlý (z 6 log CFU/g na 9 log CFU/g za 3 dny). Tato skutečnost je pro fermentaci a zrání FMV velmi pozitivní [71, 72]. Při sledování vlivu dusitanu a dusičnanu na mikroorganismy mimo prostředí FMV může už být situace jiná. V aerobně balených vzorcích mletého vepřového masa uchovávaných při 10 °C po dobu 4 dnů dosahovaly CPM nejvyšších hodnot v kontrolních vzorcích bez obsahu NaNO_3 a NaNO_2 , což ve výsledku znamená asi o 1,5 log CFU/g vyšší koncentrace mikroorganismů oproti vzorkům s maximální povolenou koncentrací sledovaných látek. Inhibiči aerobních mikroorganismů je možné odůvodnit schopností dusitanu v přítomnosti kyslíku zpomalovat některé procesy v živých systémech (aktivní transport, spotřebu kyslíku a oxidativní fosforylaci) [72]. Zaznamenán byl také poměrně významný inhibiční účinek dusičnanu a dusitanu na gram-pozitivní kataláza-pozitivní koky (rod *Staphylococcus*) a bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* ve FMV [71, 72, 73]. Kontrolní salámy

(španělský salchichón z vepřového masa) vyrobené bez přídavku dusitanu nebo dusičnanu a salámy se 0,0075 % NaNO₃ a 0,0075 % NaNO₂ vykazovaly přibližně o 1 – 2 log CFU/g vyšší konečné počty stafylokoků ve srovnání se zkušebními výrobky s nejvyšší koncentrací pozorovaných přídatných látek [71]. Tyto výsledky jsou v souladu s hodnotami pozorovanými také u choriza a dalších španělských FMV vyrobených se stejnými koncentracemi dusitanu a dusičnanu [72, 73]. Přítomnost dusitanu a dusičnanu v masném výrobku má prokazatelně vliv na růst enterobakterií. Při použití obou látek v nejvyšší povolené koncentraci (0,015 % NaNO₃ a 0,015 % NaNO₂) je možné dosáhnout snížení počtu aktivních buněk pod hranici detekce do konce zračí fáze (cca 30 dní) [71], ale záměrně naočkovanou bakterií *Salmonella* Typhimurium se z počátečních 3 log CFU/g nepodařilo během čtyřtýdenního zrání zredukovat na přijatelnou hodnotu. K úplné eliminaci bakterie došlo až v průběhu následujících 30 dnů uskladnění při teplotě 4 °C v podobě vakuově balených výrobků [72]. Na přítomnost dusitanu a dusičnanu sníženou schopností růstu reaguje také *Listeria innocua* [71].

Rychlost růstu mikroorganismů ve FMV ovlivňuje přítomnost zkvasitelných cukrů v prostředí. Podle González-Fernándeze et al. [74] různé koncentrace (0,1 %, 0,5 % a 1,0 %) glukózy v díle nemají zásadní vliv na vývoj počtů LAB v průběhu zrání a ve všech případech může být růst LAB velmi rychlý. K podobnému závěru dospěla i další studie [75]. Nicméně ve fermentovaných výrobcích s přídavkem 0,4 % glukózy byl zaznamenán mírně vyšší růst LAB a stafylokoků než v prostředí bez přídavku tohoto sacharidu v průběhu celého zrání. Rozdíly se však pohybovaly v desetinách log CFU/g. Enterokoky se rychleji vyvíjí v salámech obohacených glukózou, ale do konce zrání se jejich počty mohou vyrovnat s počty ve FMV vyrobených bez přidaného cukru. Výrazné rozdíly v počtech mikroorganismů lze vyzorovat v případě enterobakterií. Při porovnání jejich růstu v masných výrobcích bez přídavku cukru a s přídavkem 0,4 % glukózy nebo 0,1 % glukózy a 2,0 % laktózy byly zjištěny nižší počty životaschopných buněk v salámech se sacharidy, a sice o 1,3 – 2,4 log CFU/g na konci zrání. Podobně tomu bylo i po 20-ti dnech dalšího skladování při 4 °C, respektive 19 °C. Toto zjištění se vysvětluje skutečností, že zkvasitelné cukry podporují konkurenceschopnost LAB proti dalším mikrobiálním skupinám přirozeně se vyskytujícím v salámové směsi. Přidávání sacharidů do díla lze na základě toho jenom doporučit [76]. V přítomnosti sacharózy je chování LAB podobné jako v případě glukózy. V testu s *Lb. sakei* v prostředí glukózy a sacharózy o různé koncentraci byly růstové křivky bakterie velmi podobné. Naopak laktóza množení laktobacilů příliš nepodpo-

rovala, z čehož vyplývá, že tento sacharid nemusí být vhodným substrátem pro LAB ve FMV [75].

Na složení a vývoj mikroflóry FMV může mít také vliv použité koření a bylinné přísady. To, že tyto suroviny jsou zdrojem určitých mikroorganismů a mohou tak rozšiřovat mikrobiální diverzitu salámového díla, bylo již řečeno (kapitola 2.1). V následujících řádcích bude tedy diskutován pouze účinek vybraných druhů koření a bylin na růst mikroorganismů bez ohledu na jejich původní mikrobiální zatížení. V souvislosti s touto tematikou je nejvíce zdůrazňovaný inhibiční účinek koření na patogenní mikroorganismy, což je jeden z faktorů přispívající k bezpečnosti masných výrobků. Na tomto místě je vhodné vyzdvihnout antibakteriální účinek skořice, hřebíčku, kmínu, oregana, rozmarýnu a šalvěje proti *Clostridium botulinum*, známému producentovi botulinového neurotoxinu. Mnoho druhů koření a bylin se také vyznačuje schopností omezovat růst *S. aureus* a *E. coli* [22, 77]. U česneku, který se často používá jako ochucující složka v masném průmyslu, byla zjištěna antibakteriální aktivita mimo jiné proti *L. monocytogenes* a *Salmonella* spp. ve FMV s výraznějším účinkem proti listériím [78].

García-Díeza et al. [79] se pokusili zhodnotit antibakteriální účinky éterických olejů různých druhů koření a bylin použitých při výrobě FMV a porovnat je s výsledky získanými v podmínkách *in vitro*. Ke studii *in vitro* byly vybrány bakteriální kultury *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. a *S. aureus* již dříve izolované z FMV a prostředí jejich výroby. To proto, aby se výsledky co nejvíce přibližovaly podmínkám v praxi. Éterické oleje ze skořice, česneku, oregana, rozmarýnu a tymiánu dokázaly v modelových podmínkách více či méně omezit růst všech tří potravinových patogenů. Zvláště silný účinek měl tymián a oregano. V jiné studii byl navíc potvrzen silný baktericidní účinek skořicového oleje proti *E. coli* [80]. Ale zpět ke studii od García-Díeza et al. [79], ve které velmi dobrou antibakteriální aktivitu proti *S. aureus* vykazoval také kmín, ovšem vůči salmonelle nebo listérii byl neúčinný. Při testu s reálnými FMV byl prokázán nezanedbatelný podíl éterických olejů na ochraně výrobků před patogeny. *S. aureus* se však jevil jako nejodolnější vůči 0,05% a 0,005% přidavku jednotlivých éterických olejů a na rozdíl od salmonel a *L. monocytogenes* byly jeho počty na detekovatelné úrovni i po 21 dnech sušení pro obě koncentrace oleje z bobkového listu, muškátového oříšku, rozmarýnu i oregana. Česnekový olej byl účinný pouze v koncentraci 0,05 %, ale toto množství oleje bylo vyhodnoceno jako sensoricky méně přijatelné. Jediný tymiánový olej měl na *S. aureus* 100% účinnost i při nižší koncentraci. Ze studie také vyplynulo, že antimikrobiální účinek různých druhů

koření pozorovaný v podmínkách *in vitro* nemusí korelovat s účinky v reálných výrobcích. Velmi dobrou zprávou je zjištění, že přítomnost esenciálních olejů ve FMV nemá vliv na růst LAB a obdobně přítomnost 1 % česnekové šťávy v médiu neovlivní růst *Lb. sakei* [78, 79].

Dynamika vývoje mikroflóry FMV však není ovlivněna pouze recepturou, neméně významný vliv mají také fermentační podmínky v prvních dnech zrání. Výrobky s krátkou dobou zrání mívají již od časného stádia fermentace vysoké zastoupení laktobacilů. Na konci zrání pak disponují kyselejší chutí s jemným aroma oproti výrobkům s delší dobou zrání, u kterých se na počátku fermentace intenzivně množí především CNS. Stafylokoky se vyznačují nízkou rychlostí acidifikace, nižší tolerancí k nízkému pH a produkcí proteáz a lipáz, čímž podporují tvorbu sensoricky aktivních látek. FMV s dlouhou dobou zrání jsou díky tomu aromatictější. Doba zrání FMV je podmíněna teplotou, relativní vlhkostí a rychlostí proudění vzduchu. Obecně platí, že čím vyšší teplota a relativní vlhkost ve zrací komoře, tím rychlejší okyselení díla a tedy možnost zkrácení doby zrání. Zvláště rychlý pokles pH může být zajištěn přidávkem startovací kultury pediokoků (*P. acidilactici*), které při teplotách 37 – 40 °C dokáží rychle metabolizovat sacharidy, nebo laktobacilů (*L. sakei*, *L. curvatus*) rostoucích při nižších teplotách (20 – 24 °C). Pokud je požadováno pomalejší zrání, vyšší konečné pH a bohaté aroma je vhodné použití kultury *S. carnosus*, *S. xylosus* nebo *Kocuria varians*, a to samostatně nebo v kombinaci s laktobacily [81, 82, 83, 84].

Technologie rychlé fermentace je velmi rozšířená především v severní Evropě. Hlavní fermentace probíhá při teplotách 22 – 26 °C méně než 30 hodin do dosažení pH kolem 5,3. Během následného 2 – 3 týdenního dozrávání a sušení pH klesá na konečných 4,5 – 4,9. Vodní aktivita FMV zpravidla neklesne pod hodnotu 0,9. Naopak při tradiční pomalé fermentaci využívající zracích teplot od 18 °C je nutné počáteční zrací fázi prodloužit na více než 40 hodin a ani po více než 3 týdnech dozrávání se zpravidla nedosáhne hodnoty pH nižší než 5,0. Poměrně vysoké pH je v těchto výrobcích pak kompenzováno nízkou vodní aktivitou ($a_w < 0,9$) [85].

Studiem vlivu teploty zrání na růst CNS a LAB v italských FMV a rychlost okyselení sálamového díla se zabývali Iacumin et al. [86] v případě CNS a Urso et al. [82] v případě LAB. Sledovali činnost uvedených skupin mikroorganismů při třech teplotních profilech. FMV s velmi dlouhou dobou zrání (120 dní) při teplotě nepřekračující 10 °C v prvních 60 dnech a teplotě 14 °C v dalších 60 dnech se na začátku fermentace vyznačovaly poma-

lým růstem LAB, který dokonce nebyl v prvních 3 dnech postřehnutelný. Naopak podmínky zrání v těchto dnech naprosto vyhovovaly stafylokokům, které díky tomu brzy získaly dominantní postavení. Na druhou stranu ve FMV zrajících podle běžnějšího schématu (2 dny při teplotě 22 °C s následným dozráváním při 12 °C nebo 14 °C) se stafylokokům v prvních třech dnech příliš nedařilo a jejich počty stagnovaly. Intenzivním růstem se projevily pouze LAB a jejich počty se díky tomu zvýšily až o 3 řády během tří dnů [82, 86]. Podobné rozdíly v reakci LAB na teplotu byly vyzorovány také u tradičních řeckých, maďarských a italských klobás vyrobených za různých zrajících podmínek [81]. Vysoká rychlost růstu LAB v počátečním období zrání je navíc zpravidla doprovázena rychlým poklesem pH výrobků. Tuto korelaci mezi růstem LAB, tedy teplotou fermentace, a poklesem pH potvrzuje několik studií [81, 82]. Všechny tyto skutečnosti jen upevňují tvrzení prezentované o dva odstavce výše. Je však nutno podotknout, že rozdíly mezi rychlostí okyselování díla v závislosti na teplotě fermentace mohou být do jisté míry ovlivněny surovinovou skladbou [82].

Rychlost fermentace, zvyšování kyselosti a nízké pH FMV jsou důležitými prvky v ochraně masných výrobků před kazící a patogenní mikroflórou. Nicméně pro zajištění dlouhodobé trvanlivosti samotné fermentační procesy nestačí. Mimo jiné také proto, že pH po dosažení minimální hodnoty zpětně narůstá v důsledku degradace proteinů a uvolňování peptidů, aminokyselin, amoniaku a aminů. Funkci nejvýznamnějšího faktoru, který zajišťuje potlačení nežádoucích mikroorganismů, tak plní nízká hodnota vodní aktivity, která se vytváří během sušení. Různé mikroorganismy se však vyznačují různou citlivostí k hodnotám a_w v potravinách. K nejméně odolným patogenům vůči nízké a_w se řadí například *Campylobacter* spp., *Clostridium botulinum* typ E, *Shigella* spp. a *Yersinia enterocolitica*, kteří zpravidla nerostou při a_w nižší než 0,97. *E. coli*, *Salmonella* spp. a *Clostridium botulinum* přestávají růst při poklesu a_w pod 0,94. Nejdolnějšími patogenními mikroorganismy jsou pak *Staphylococcus aureus* a *Listeria monocytogenes*. Pro *S. aureus* se udává hranice a_w pro růst 0,88, ale pro spolehlivou inhibici se doporučuje a_w alespoň 0,86 v kombinaci s nízkým pH (< 5,1) a bakteriociny. Růst listérií může být zaznamenán ještě při a_w 0,84, ale v přítomnosti bakteriocinů postačí i a_w nižší než 0,90. Při dobře řízeném sušení FMV není však žádným problémem dosáhnout aktivity vody i pod 0,81, čímž riziko růstu patogenů v konečném produktu klesá na minimum [6, 57, 87, 88, 89, 90].

3.2 Mikrobiální procesy ve fermentovaném masném výrobku

Vlastnosti FMV jsou výsledkem komplexu mikrobiálních procesů, který se sestává především z mléčného kvašení a řady dalších biochemických transformací závislých na délce zrání. Na jedné straně to jsou procesy určující organoleptické vlastnosti výrobků a zajišťující jejich ochranu před patogeny, na straně druhé jsou to procesy, které ohrožují bezpečnost FMV díky tvorbě a akumulaci toxických látek, jakými jsou například biogenní aminy [30].

Mléčné kvašení využívá lidstvo při zpracování potravin už po staletí. Odhaduje se, že první FMV byly vyráběny ve Středomoří už během doby římské (přibližně 0 - 400 n. l.), a to aniž by lidé znali podstatu těchto procesů. Dnes již víme, že se jedná o způsob, jakým některé mikroorganismy získávají v anaerobním prostředí energii. Zjednodušeně se také hovoří o degradaci sacharidů bakteriemi mléčného kvašení na kyselinu mléčnou. Ve skutečnosti však může být substrátem jakákoli organická sloučenina obsahující kyslík a vodík. Obdobně ani kyselina mléčná nebývá jediným konečným produktem. Podle podílu kyseliny mléčné na celkovém množství produktů pak rozlišujeme mléčné kvašení homofermentativní a heterofermentativní. V případě heterofermentativních LAB může být až polovina produktů fermentace tvořena acetátem, propionátem, etanolem, acetoinem, oxidem uhličitým a amoniakem. Všechny tyto sloučeniny, včetně kyseliny mléčné, jsou významné pro aroma konečného produktu. Organické kyseliny mají navíc vliv na snížení hodnoty pH díla, což se pozitivně odráží na rychlosti sušení, konzistenci, barvě a mikrobiální stabilitě FMV [6, 31, 91, 92, 93, 94].

Pro chuťovou charakteristiku FMV má zásadní význam metabolismus bílkovin masa zprostředkovaný vzájemným působením mikrobiálních a nativních enzymů. Do těchto procesů se zapojují jak LAB, tak také stafylokoky, kvasinky a plísně disponující komplexem proteolytických enzymů schopných hydrolyzovat bílkoviny na peptidy a volné aminokyseliny. V průběhu zrání jsou pak tyto rozkladné produkty dále mikroorganismy využívány a prostřednictvím transaminace, deaminace, dekarboxylace nebo odštěpování postranních řetězců přeměňovány na různé aromatické sloučeniny. Vůbec prvním krokem katabolických procesů aminokyselin je transaminace. Při této reakci je prostřednictvím enzymového komplexu přenášena aminoskupina z aminokyseliny na α -ketokyselinu za vzniku příslušné aminokyseliny. Ketokyselina vzniklá z původní aminokyseliny poté prochází dalšími reakcemi, jejichž produktem jsou rozvětvené aldehydy (např. 3-metylbutanal, 2-metylbutanal)

a od nich odvozené organické kyseliny, alkoholy a estery. Množství a zastoupení konkrétních sloučenin je pak velmi ovlivněno podmínkami výroby FMV, jako je teplota, pH, obsah glukózy, soli, dusitanů, dusičnanů a askorbátu [6, 31, 32, 33, 93].

V souvislosti s přeměnami proteinů během zrání FMV je nutné zmínit se také o procesech vedoucích k tvorbě biogenních aminů. Tyto organické sloučeniny vznikají v potravinách dekarboxylací aminokyselin katalyzovanou bakteriálními enzymy. Syntéza těchto enzymů je zpravidla vyvolaná určitými podmínkami okolního prostředí, jako je například mírně kyselé pH a dostupnost volných aminokyselin. FMV z tohoto pohledu vytváří velmi dobré podmínky pro dekarboxylaci aminokyselin. Předpokládá se, že jedním z důvodů proč mikroorganismy produkují biogenní aminy, je obrana proti nepříznivému kyselému prostředí. Biogenní aminy totiž zvyšují pH prostředí, čímž se vytváří lepší podmínky pro další mikrobiální činnost. K tvorbě výhodnějších podmínek pro růst mikroorganismů však mohou přispět také kvasinky, které rozkládají organické kyseliny (především kyselinu mléčnou a octovou) v rámci svého energetického metabolismu. Výsledkem je vyšší pH, které podpoří reakce, při nichž vznikají další aromatické sloučeniny, a současně se zmírní kyselá chuť výrobku [31, 32, 83, 92, 95].

Svou úlohu při rozvoji aroma a chuti FMV sehrává také lipolýza, při níž jsou z triacylglycerolů a fosfolipidů uvolňovány volné mastné kyseliny, které následně vstupují do dalších oxidačních reakcí za vzniku lineárních alkoholů, aldehydů, ketonů a esterů. Může se jednat o procesy autooxidace volných nenasycených mastných kyselin nebo procesy β -oxidace mastných kyselin zprostředkované endogenními či mikrobiálními enzymy. Z bakterií přítomných v salámovém díle vykazují efektivní metabolismus lipidů pouze CNS. Značnou měrou však k těmto procesům přispívají také kvasinky a plísně [6, 31, 32, 33, 93].

Jedním z důvodů přidávání startovacích kultur stafylokoků do díla je jejich schopnost produkovat nitrátoreduktázy. Tyto enzymy se uplatňují při vybarvovacích reakcích v masných výrobcích obsahujících dusitany. Při reakci s myoglobinem se část dusitanu oxiduje na dusičnan, který je právě bakteriální nitrátoreduktázou zpětně redukován na dusitan. Ten se poté může zúčastnit další reakce. CNS ve FMV dále disponují enzymem katalázou, který se rovněž může zapojit do vybarvovacích procesů v díle, respektive brání odbarvení nitroxymyoglobinu účinkem peroxidů, které mohou produkovat některé divoké laktobacily [6, 18, 31].

Na závěr je nutné podotknout, že průběh všech zmiňovaných procesů bude vždy záviset na mnoha faktorech, a to především na teplotě, hodnotě pH, cirkulaci vzduchu v okolí FMV, typu použité startovací kultury a vůbec na složení díla a kvalitě použitých surovin. Kombinací různých úrovní těchto faktorů tak lze vyrábět nepřeberné množství sensoricky odlišných produktů a uspokojit tak přání široké spotřebitelské veřejnosti [92, 93].

4 METODY IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ VE FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBCÍCH

Doba, kdy se identifikace mikroorganismů zakládala na izolaci mikrobiálních buněk z přírodních materiálů, jejich kultivaci v laboratorních podmínkách a následné biochemické nebo imunochemická charakterizaci, je již za námi. Důvodem k ustupování od těchto metod je jejich nedostatečná přesnost a neprůkaznost. Navíc odhaduje se, že více než 90 % mikroorganismů vyskytujících se na naší planetě není možné kultivovat. Tento problém byl vyřešen vyvinutím řady metod založených na charakterizaci mikrobiální DNA nebo RNA. Nejen že jsou tyto techniky spolehlivější co se identifikace a charakterizace mikroorganismů týče, ale jsou schopné poskytnout velmi dobrý genetický popis jednotlivých bakterií i celých mikrobiálních společenstev. Jednou takovou metodou využívanou pro analýzu mikrobiálních populací je denaturační gradientová gelová elektroforéza, neboli DGGE [96, 97].

4.1 Denaturační gradientová gelová elektroforéza

Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) byla světu poprvé představena v roce 1980 jako technika pro detekci mutací v mikrobiální DNA [98]. Teprve až v roce 1993 ji Muyzer et al. [99] poprvé použili ke studiu struktury mikrobiálních společenstev a ukázali tak přednosti DGGE v této oblasti. Od té doby si tato technika našla uplatnění v mnoha oblastech mikrobiologie včetně mikrobiologie klinické, půdní, mikrobiologie životního prostředí i potravin [59, 97, 98].

Principem DGGE je separace přibližně stejně velkých molekul DNA v polyakrylamidovém gelu na základě odlišné sekvence nukleotidů ve zvyšujícím se koncentračním gradientu denaturačního činidla – močoviny a formamidu. Uspořádáním se jedná o vertikální elektroforézu, při které se pracuje s tenkou vrstvou gelu umístěnou mezi dvěma skleněnými deskami. Gel vzniká polymerizací směsi akrylamidu a bis-akrylamidu za pokojové teploty a v přítomnosti pufru. Polymerizační reakce vyvolávají volné radikály uvolňující se z persulfátu amonného. TEMED (NNN'N'-tetraetylylendiamin) katalyzuje tvorbu volných radikálů a tím polymeraci urychluje [97, 100].

Nejčastěji analyzovanou sekvencí nukleotidů jsou vybrané fragmenty genu kódujícího ribozomální RNA v malé ribozomální podjednotce (16S bakterií nebo 18S mikroskopických hub). Právě tento gen byl díky velkému množství variabilních a konzervovaných

oblastí označen za vynikající univerzální fylogenetický marker, který umožňuje identifikaci mikroorganismů na úrovni rodu až druhu. Před zahájením vlastní elektroforézy je však nutno provést několik kroků, které zajistí správný průběh separace. Prvním krokem je izolace DNA z původní matrice. Pro tyto účely byla vyvinuta řada komerčních kitů, které mohou práci značně usnadnit a poskytují DNA o velmi dobré čistotě. Vyizolovaná DNA se poté podrobí amplifikaci polymerázovou řetězovou reakcí s použitím specifických primerů (krátkých úseků DNA), které se zaměřují jen na požadovaný gen a jeho úseky nesoucí cílovou sekvenci. Získané amplikony se nanosou do jamek polyakrylamidového gelu, kterým poté putují, dokud nevstoupí do části gelu s takovou koncentrací denaturačního činidla, která způsobí denaturaci DNA. Při denaturaci se obě vlákna DNA od sebe oddělují a tím se zastavuje migrace celé molekuly. To, jak rychle bude DNA denarovat a jak brzo se zastaví, závisí na počtu AT a GC párů. V místech bohatých na AT páry (dva vodíkové můstky mezi adeninem a thyminem) se řetězce od sebe oddělují mnohem snáze než na místech s převahou GC párů (tři vodíkové můstky mezi guaninem a cytosinem). Úplná denaturace DNA je však nežádoucí. Jednořetězcové molekuly by pokračovaly v migraci gelem a při vizualizaci by tvořily neostře proužky. Aby se tomu zabránilo, připojuje se k 5' konci jednoho primeru tzv. GC-svorka, což je sekvence 40 až 60 nukleotidů obsahujících guanin a cytosin, která se poté promítne také v sekvenci amplifikovaných úseků DNA. V místě GC-svorky řetězce denarují jen velmi obtížně a celá molekula vytvoří tvar písmene Y, který zajistí zadržení molekuly ve správném denaturačním bodě [97, 99, 101, 102].

DGGE probíhá při teplotě 60 °C a napětí 50 – 250 V po dobu 3 – 20 hodin v závislosti na zvoleném napětí a typu vzorků. Poté je gel barven v pufru s fluorescenčním barvivem (např. s etidiumbromidem nebo barvivem SYBR Green), následně vizualizován pomocí UV záření v transluminátoru a snímací technikou je obraz převeden do speciálního softwaru, kde je dále analyzován. Jednotlivé proužky neboli bandy, které představují určitou skupinu mikroorganismů, mohou být z gelu vyříznuty, re-amplifikovány a pomocí sekvence, tedy určování sekvence nukleotidů, mohou být tyto mikroorganismy identifikovány [97, 100, 101].

Obdobou DGGE je teplotní gradientová gelová elektroforéza (TGGE), kde denuraci fragmentů DNA způsobuje postupně zvyšující se teplota. Z důvodů nižší citlivosti TGGE oproti DGGE, je však tato technika využívána podstatně méně [97].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zhodnotit vývoj mikroflóry FMV v průběhu jeho výroby a skladování se zaměřením se na mikroorganismy přispívající k vlastnostem výrobku. Byla zkoumána mikroflóra FMV vyrobených dvěma odlišnými technologiemi s cílem zhodnotit vliv podmínek výroby na druhové zastoupení a růst technologicky významných mikroorganismů. K dosažení tohoto cíle vedlo několik dílčích cílů:

1. vypracování literární rešerše na téma výroby FMV, mikroflóry FMV a metod jejího stanovení s využitím dostupných odborných publikací a vědeckých prací,
2. provedení mikrobiologického rozboru FMV a surovin ve stanovených intervalech v průběhu celého období zrání a následného skladování,
3. optimalizace izolace mikrobiální DNA ze vzorků FMV a surovin s cílem získání DNA o vysoké koncentraci a čistotě,
4. optimalizace podmínek identifikace mikroorganismů ve FMV a surovinách technikou PCR-DGGE,
5. identifikace mikroorganismů ve FMV a surovinách technikou PCR-DGGE za podmínek stanovených podle bodu 4,
6. vyhodnocení výsledků, diskuze a formulace závěrů.

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Použité přístroje, pomůcky, chemické látky a přípravky

6.1.1 Kultivační stanovení a uchovávání vzorků

Zařízení a pomůcky

- Sterilizátor H+P Varioklav 135S (H+P Labortechnik AG, Německo)
- Stomacher Lab Blender 400 (Seward, Velká Británie)
- Inkubátor mikrobiologický (Memmert, Německo)
- CO₂ Water Jacketed Incubator (Shel-lab, USA)
- Váhy 440-47 N d=0,01 g (KERN, Německo)
- Hlubokomrazicí box (Bio-Vendor, ČR)
- Mikropipety (Biohit, Finsko)
- Laboratorní sklo – reagenční láhve, odměrný válec, Petriho misky (Simax, ČR)
- Ostatní – sterilní špičky, rukavice, plastové sáčky, nůž

Chemické látky a přípravky

- Sterilní destilovaná voda
- Sterilní fyziologický roztok
- Plate Count Agar (HiMedia Laboratories, Indie)
- MRS Agar (HiMedia Laboratories, Indie)
- M17 Agar Base (HiMedia Laboratories, Indie)
- Mannitol Salt Agar (HiMedia Laboratories, Indie)
- Endo Agar Base (HiMedia Laboratories, Indie)
- Violet Red Bile Agar (HiMedia Laboratories, Indie)
- MacConkey Agar (HiMedia Laboratories, Indie)
- Yeast Glucose Chloramphenicol Agar (HiMedia Laboratories, Indie)
- Agar Agar (HiMedia Laboratories, Indie)
- β -glycerofosfát disodný (Merck Millipore, Německo)

6.1.2 Identifikace mikroorganismů metodou PCR-DGGE

6.1.2.1 Izolace DNA

Zařízení a pomůcky

- Váhy KB d=0,01 g (KERN, Německo)
- Stomacher BA6021, Lab Blender 400
- Centrifuga minispin plus (Eppendorf, Německo)
- Vortex V-1 plus (Biosan, USA)
- Vortex-Genie® 2 Vortex vč. vortexového adaptéru (Mo Bio Laboratories, USA)
- Spektrofotometr Infinite 200 PRO (Tecan, Švýcarsko)
- Osobní počítač ESPRIMO (Fujitsu-Siemens, Japonsko, Německo)
- Mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO, Japonsko)
- PowerFood® Microbial DNA Isolation Kit (Mo Bio, USA)
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Švýcarsko)
- Laboratorní sklo – kádinky, 100 ml; pipety, 10 ml; reagenční láhve, 250 ml (Simax, ČR)
- Ostatní pomůcky: sterilní špičky; stojánek na zkumavky; nitrilové rukavice; skalpel; pinzeta; nůžky; sterilní gáza; plynový kahan; plastové sáčky; sterilní mikroz-kumavky pro PCR 1,5 ml, PP; balónek pipetovací; zápalky

Chemické látky a přípravky

- Etanol 70% (Sigma-Aldrich, USA)
- Sterilní destilovaná voda
- Dodecylsulfát sodný (SDS) v čistotě pro molekulární biologii (Sigma-Aldrich, USA)
- Chloroform v čistotě pro molekulární biologii (Sigma-Aldrich, USA)
- Sterilní fosfátový pufr (PBS) (Sigma-Aldrich, USA)
- Izopropanol (Sigma-Aldrich, USA)
- Lysozym (SERVA, Německo)
- Masopeptonový bujón – Nutrient Broth (HiMedia Laboratories, Indie)

6.1.2.2 Polymerázová řetězová reakce

Zařízení a pomůcky

- PCR box AURA PCR™ (BIOAIR, Itálie)
- Termostat blokový Bio TDB-100 (Biosan, USA)
- Vortex V-1 plus (Biosan, USA)
- Termocykler Aeris™ (ESCO, Singapur)
- Mikrovlnná trouba (Electrolux, Švédsko)
- Chladnička s mrazicím boxem CSA34020 (BEKO, Turecko)
- Váhy KB d=0,01 g (KERN, Německo)
- Elektroforetická vana vč. příslušenství MultiSUB Mini (Consort, Belgie)
- Elektroforetická vana vč. příslušenství HU10 Mini-Plus Horizontal (SCIE-PLAS, Anglie)
- Elektrický zdroj pro elektroforézu EV243 (Consort, Belgie)
- UV-Transiluminátor InGeniusLHR (SYNGENE, Velká Británie)
- Osobní počítač ESPRIMO (Fujitsu-Siemens, Japonsko, Německo)
- Mikropipety (Eppendorf, Německo)
- Laboratorní sklo – odměrné válce, Erlenmeyerova baňka, reagenční láhve (Simax, ČR)
- Ostatní pomůcky: sterilní špičky pro PCR s filtrem; sterilní mikrozkušavky pro PCR 0,5 ml, 1,5 ml, PP; sterilní mikrozkušavky pro PCR 0,2 ml 8 ks ve stripu, s individuálními plochými víčky, PP; stojánek na zkumavky; nitrilové rukavice; kovová lžička

Chemické látky a přípravky

- Etanol 70% (Sigma-Aldrich, USA)
- Redestilovaná voda pro molekulární biologii
- 1x TAE pufr (20 mM Tris-acetát, 10 mM acetát sodný, 0,5 mM EDTA, pH 7,4)
- Agaróza SeaKem (Lonza, Švýcarsko)
- Etidiumbromid 1:30 H₂O (Sigma-Aldrich, USA)
- 100 bp DNA Ladder N3231L (Biolabs. Inc., New England)
- GoTaq® Hot Start Green MasterMix (Promega, USA)
- DNA Gel Loading Dye (6x) (Thermo Scientific, USA)
- Primery (Eastport – Metabion, ČR) (viz. tabulka 1)

Tabulka 1: Primery použité k identifikaci mikroorganismů metodou PCR-DGGE

primer	pořadí báží	reference
FD1	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Weisburg et al., 1991 [103]
RD1	5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC	Weisburg et al., 1991 [103]
341F	5'-CCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer et al., 1993 [99]
341F(GC)*	5'-(GC-svorka)CCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer et al., 1993 [99]
518r	5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG	Muyzer et al., 1993 [99]
907r	5'-CCGTC AATTCMTT T GAGTTT	Lane, 1991 [105]
P1	5'-GCGGCGTGCCTAATACATGC	Klijn et al., 2001 [104]
P1(GC)**	5'-(GC-svorka)GCGGCGTGCCTAATACATGC	Klijn et al., 2001 [104]
P2	5'-TTCCCCACGCGTTACTCACC	Klijn et al., 2001 [104]

*GC-svorka = CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGACGGGGG [99]

**GC-svorka = CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCCGCCG [104]

6.1.2.3 Denaturační gradientová gelová elektroforéza

Zařízení a pomůcky

- Analytické váhy ADVENTURER Pro d=0,0001 g (OHAUS, USA)
- Míchadlo s ohřevem MR Hei-Tec (Heidolph, Německo)
- Třepačka Titramax 100 (Heidolph, Německo)
- Vortex V-1 plus (Biosan, USA)
- Elektroforetický tank pro DGGE (C.B.S. Scientific Company, USA)
- Elektrický zdroj pro DGGE EPS-300x (C.B.S. Scientific Company, USA)
- Mini-peristaltická pumpa MPP-100-220 (C.B.S. Scientific Company, USA)
- Gradient maker, 2x 20 ml (C.B.S. Scientific Company, USA)
- Magnetické míchadlo včetně magnetů Hei-Mix S (Heidolph, Německo)
- DGGE set skleněných desek (C.B.S. Scientific Company, USA)
- Jednoduchá kazeta pro DGGE z plexiskla (C.B.S. Scientific Company, USA)
- Těsnění pro DGGE 1,0 mm (C.B.S. Scientific Company, USA)
- Svorky, spacers, vertikální hřebínky pro DGGE (C.B.S. Scientific Company, USA)
- Kanyla modrá s křídélky
- Mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO, Japonsko)
- 2 prostorné nádoby na barvicí lázeň
- Laboratorní sklo – odměrné válce; reagenční láhve, 100ml; odpadní kádinka (Simax, ČR)

- Ostatní pomůcky: sterilní špičky; sterilní špičky pro nanášení na elektroforetické gely; sterilní mikrozkušavky pro PCR, 1,5 ml, PP; plastové kónické zkumavky s víčkem, 50 ml; stojánek na zkumavky; nitrilové rukavice; injekční stříkačka s jehlou; kovová lžička; sterilní skleněné kuličky; skalpel; ochranný štít

Chemické látky a přípravky

- Etanol 70% (Sigma-Aldrich, USA)
- Sterilní destilovaná voda
- Formamid pro molekulární biologii (SERVA, Německo)
- Močovina (Sigma-Aldrich, USA)
- 40 % w/v akrylamid/bis-solution 37:5:1 (SERVA, Německo)
- Amonium persulfát (SERVA, Německo)
- NNN'N'- tetraetyletylendiamin (Sigma-Aldrich, USA)
- 50x TAE pufr (2M Tris-base ($C_4H_{11}NO_3$), 1M kyselina octová (CH_3COOH), 50mM EDTA)
- 1x TAE pufr (40mM Tris-base ($C_4H_{11}NO_3$), 20mM kyselina octová (CH_3COOH), 1mM EDTA)
- Fluorescenční barvivo GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, USA)
- 100 bp DNA Ladder N3231L (Biolabs. Inc., New England)

6.1.2.4 Purifikace DNA

Zařízení a pomůcky

- Centrifuga minispin plus (Eppendorf, Německo)
- High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Švýcarsko)
- Mikropipety Nichipet EX (NICHIRYO, Japonsko)
- Ostatní: sterilní špičky; sterilní mikrozkušavky pro PCR, 1,5 ml a 0,5 ml, PP; nitrilové rukavice; stojánek na zkumavky

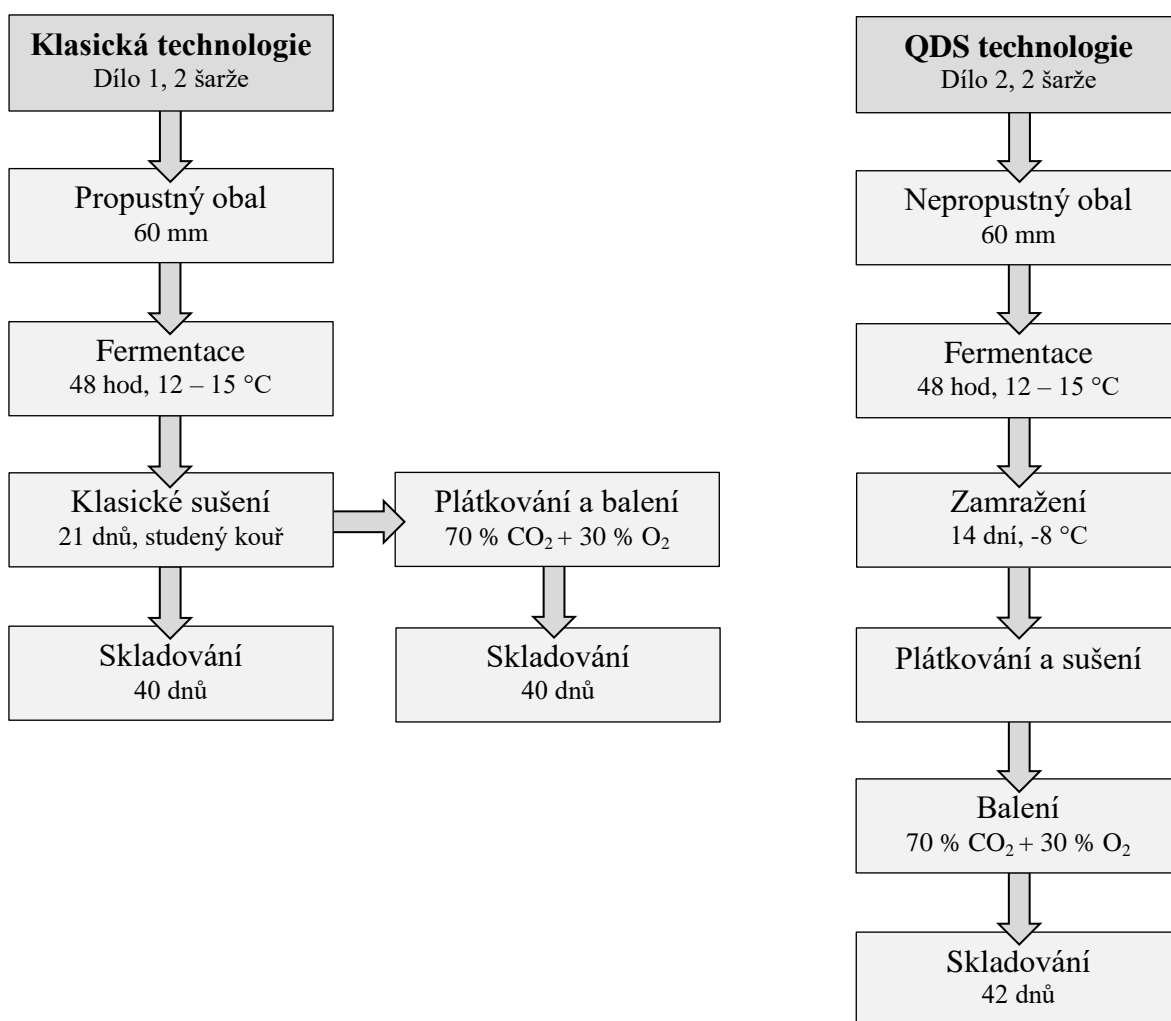
Chemické látky a přípravky

- Bezvodý etanol (Sigma-Aldrich, USA)
- Primer P1 (viz tab. 1)
- Primer 341F (viz tab. 1)

6.2 Výroba fermentovaných masných výrobků a postup odběru vzorků

K analýze byly použity FMV typu paprikáš dodané českou firmou zabývající se výrobou masa a masných výrobků v období února až dubna roku 2015. Dodávka všech vzorků byla prováděna pod kontrolou Ústavu technologie potravin Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně. Dodány byly dvě šarže salámů vyrobených klasickou technologií, dvě šarže výrobků zpracovaných technologií QDS, dále vzorky díla všech šarží, vzorky koření a startovací kultura v lyofilizované formě. Dílo pro výrobu salámů klasickou technologií (dílo 1) se skládalo z masa, sádla, standardní dávky koření a specifické skladby sacharidů. Dílo pro QDS technologii (dílo 2) obsahovalo maso, sádlo, vyšší dávku koření a specifickou skladbu sacharidů.

Výroba salámů paprikáš probíhala podle následujícího schématu:



Obrázek 2: Schéma výroby FMV klasickou a QDS technologií

Dodávka salámů byla zahájená druhým dnem zrání a pokračovala v průběhu celého období zrání a následného skladování výrobků v předem dohodnutých intervalech (tabulka 2).

Tabulka 2: Časový harmonogram mikrobiologických analýz vzorků salámů

den odběru	2.	3.	16.	23.	30.	37.	42.	44.	49.	58.	63.
klasická technologie											
tyče		X		X	X		X		X		X
plátky				X	X		X		X		X
QDS technologie											
tyče	X		X								
plátky			X	X		X		X		X	

Ihned po příjmu byly ze salámů a surovin odebrány vzorky pro kultivační stanovení mikroorganismů. Zbylý materiál byl uložen do mrazicího boxu a uchováván při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do doby dalších analýz. Všechny analýzy byly prováděny na Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně.

6.3 Mikrobiologický rozbor

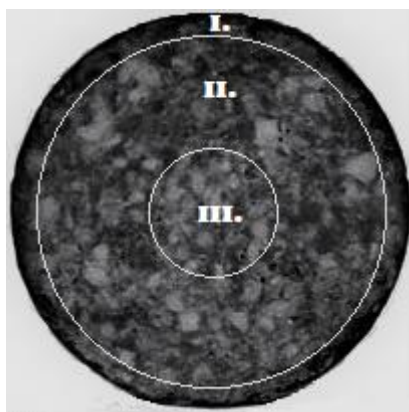
Pro kultivační stanovení mikroorganismů bylo za aseptických podmínek odebráno 10 g vzorku díla, koření či salámu do sterilního plastového sáčku. Z tyčí salámů byly vždy odebrány tři vzorky, každý z jedné vrstvy podle obrázku 3. Navážka byla 10-krát zředěna sterilním fyziologickým roztokem. Poté byl obsah sáčku homogenizován za použití Stomacheru po dobu 2 minut. Z této základní suspenze byla připravena řada desítkového ředění. Agarové plotny byly inokulovány roztěrem 100 μl suspenze za použití sterilních hokejek. Pro každou sledovanou skupinu mikroorganismů byly použity vždy tři po sobě jdoucí ředění každého vzorku, od každého ředění byly inokulovány dvě plotny. Plotny byly inkubovány za podmínek vhodných pro růst dané skupiny mikroorganismů. Přehled sledovaných skupin mikroorganismů, použitých živných půd a podmínky kultivace jsou uvedeny v následující tabulce.

Tabulka 3: Kultivační stanovení mikroorganismů

skupina mikroorganismů	živné** půdy	podmínky kultivace	výchozí norma
CPM*	PCA	30 °C, 72 hod	ČSN ISO 2293
mléčné koky	M17	30 °C, 72 hod	-
laktobacily	MRS	30 °C, 72 hod, anaerobně	ČSN ISO 15214
koaguláza negativní stafylokoky	MSA	30 °C, 24 – 48 hod	-
čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>	Endo	37 °C, 24 ± 2 hod	ČSN ISO 21528-2
kvasinky a plísňe	YGC	laboratorní teplota, 3 – 5 dnů	ČSN ISO 13681

* celkové počty mikroorganismů

** viz kapitola 6.3.1



Obrázek 3: Příčný průřez salámem – analyzované vrstvy

Po ukončení kultivace byly určeny počty kolonií sledovaných mikroorganismů na plotnách a přepočteny jako CFU/g výrobku. Plotny s nepočitatelným množstvím kolonií byly ze stanovení vyřazeny. Veškeré mikrobiologické rozbory byly prováděny ve dvou opakováních.

6.3.1 Složení a příprava živných půd

K přípravě kultivačních médií uvedených v tabulce 3 byly využity komerčně vyrobené práškové směsi, které byly rozpuštěny v destilované vodě podle návodu výrobce HiMedia Laboratories. Výsledné složení půd bylo následovné:

- **PCA (Plate Count Agar):** enzymatický hydrolyzát kaseinu 5,0 g/l, kvasničný extrakt 2,5 g/l, dextróza 1,0 g/l, agar 15,0 g/l, výsledné pH (při 25 °C) 7,0 ± 0,2,

- **M17 (M17 Agar Base):** sójový pepton 5,0 g/l, masový pepton 5,0 g/l, kvasničný extrakt 2,5 g/l, hovězí extrakt 5,0 g/l, kyselina askorbová 0,5 g/l, síran hořečnatý 0,25 g/l, laktóza 5,0 g/l, β-glycerofosfát disodný 19,0 g/l, agar 10,0 g/l, výsledné pH (25 °C) 7,1 ± 0,2,
- **MRS (Lactobacillus MRS Agar):** proteozo-pepton 10,0 g/l, hovězí extrakt 10,0 g/l, kvasničný extrakt 5,0 g/l, dextróza 20,0 g/l, polysorbát 80 1,0 g/l, citrát amonný 2,0 g/l, acetát sodný 5,0 g/l, síran hořečnatý 0,1 g/l, síran manganatý 0,05 g/l, hydrogenfosforečnan draselný 2,0 g/l, agar 12,0 g/l, výsledné pH (25 °C) 6,5 ± 0,2,
- **MSA (Mannitol Salt Agar):** proteozo-pepton 10,0 g/l, masový extrakt (ekvivalentní k hovězímu extraktu) 1,0 g/l, chlorid sodný 75,0 g/l, D-mannitol 10,0 g/l, pH indikátor fenolová červen 0,025 g/l, agar 15,0 g/l, výsledné pH (25 °C) 7,4 ± 0,2,
- **Endo (Endo Agar Base):** pepton 10,0 g/l, laktóza 10,0 g/l, fosforečnan draselný 3,5 g/l, siřičitan sodný 2,5 g/l, agar 12 g/l, výsledné pH (25 °C) 7,5 ± 0,2,
- **YGC (Yeast Glucose Chloramphenicol Agar):** kvasničný extrakt 5,0 g/l, glukóza 20,0 g/l, chloramfenikol 0,1 g/l, agar 15,0 g/l, výsledné pH (25 °C) 6,6 ± 0,2.

Rozpuštěné půdy byly sterilizovány v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut a za horka rozlity do sterilních Petriho misek.

6.3.2 Vyjádření výsledků pro kvantitativní stanovení

Počet mikroorganismů N v pevných vzorcích se vyjadřuje v jednotkách CFU/g (též KTJ/g; kolonie tvořící jednotky na gram). Tuto hodnotu lze získat dosazením do vzorce

$$N = \frac{\sum C}{Vd(n_1 + 0,1n_2)}$$

kde:

$\sum C$ je součet kolonií spočítaných po identifikaci na všech vybraných plotnách,

n_1 je počet ploten použitých pro výpočet z prvního ředění,

n_2 je počet ploten použitých pro výpočet z druhého ředění,

d je první pro výpočet použité ředění,

V je objem očkovaného vzorku.

Známe-li počty kolonií na plotnách pouze jednoho ředění, je možné pro výpočet hodnoty N použít vzorec

$$N = \frac{\sum C / n}{Vd}$$

kde:

$\sum C$ je součet kolonií spočítaných po identifikaci na všech vybraných plotnách,

n je počet ploten použitých pro výpočet z daného ředění,

d je ředění použité pro výpočet,

V je objem očkovaného vzorku.

6.4 Identifikace mikroorganismů metodou PCR-DGGE

6.4.1 Optimalizace přípravy vzorků pro izolaci DNA

Byly testovány tři různé metody přípravy vzorků salámů, díla a koření s cílem dosáhnout co nejvyšší možné koncentrace a čistoty DNA.

1. metoda: Vzorek salámu byl přenesen do sterilního plastového sáčku a smíchán s destilovanou vodou v poměru 1:2. Obsah sáčku byl homogenizován za použití Stomacheru po dobu 2 minut. Homogenizovaná směs byla přefiltrována přes sterilní gázu. Získaný filtrát byl použit pro izolaci DNA (viz následující kapitola).
2. metoda: Vzorek salámu byl přenesen do sterilního plastového sáčku a smíchán s destilovanou vodou v poměru 1:2. Obsah sáčku byl homogenizován za použití Stomacheru po dobu 2 minut. Homogenizovaná směs byla přefiltrována přes sterilní gázu. Získaný filtrát byl smíchán s chloroformem v poměru 1:1. Tato směs byla protřepávána 3 minuty. Takto upravený filtrát byl použit pro izolaci DNA (viz následující kapitola).
3. metoda: Vzorek salámu byl přenesen do sterilního plastového sáčku a smíchán s destilovanou vodou v poměru 1:2. Obsah sáčku byl homogenizován za použití Stomacheru po dobu 2 minut. Homogenizovaná směs byla přefiltrována přes sterilní gázu. Získaný filtrát byl smíchán s 20% SDS v poměru 3:0,075. Tato směs byla inkubována 1 hodinu při teplotě 55 °C. Takto upravený filtrát byl použit pro izolaci DNA (viz následující kapitola).

Všechny metody byly otestovány ve dvojnásobném opakování.

6.4.2 Izolace chromozomální DNA z bakteriálních buněk s využitím komerčního kitu

K izolaci DNA ze vzorků salámů, koření a díla byla použita komerční souprava určená pro aplikaci na potraviny (PowerFood® Microbial DNA Isolation Kit). Izolace DNA probíhala ve dvou fázích:

1. Izolace DNA v rámci optimalizace metody přípravy vzorků (viz kap. 6.4.1).
2. Izolace DNA ze vzorků připravených metodou, která poskytovala nejvyšší výtěžky nejčistší DNA. Tyto vzorky byly dále využity k optimalizaci dalších kroků PCR-DGGE analýzy a k vlastnímu stanovení mikroflóry FMV.

Pro druhou fázi izolace DNA bylo vždy použito 10 g salámu v tyči, díla či koření v rozmrazeném stavu a smícháno se sterilní destilovanou vodou v poměru 1:2. Z každé tyče byly odebírány dva vzorky, jeden z I. vrstvy a druhý ze III. vrstvy dle obrázku 3. Z rozmrazených plátků salámů byly odebírány vždy 3 plátky a smíchány s 20 ml sterilní destilované vody. Dále se postupovalo podle postupu vybrané metody.

Při izolaci se postupovalo podle následujícího protokolu, a sice bez ohledu na metodu přípravy vzorků (viz kap. 6.4.1):

1. Do 2ml zkumavky, která je součástí kitu, bylo přidáno 1,8 ml filtrátu (viz kap. 6.4.1). Obsah zkumavky byl centrifugován při 13 000 x g po dobu 1 minuty při pokojové teplotě. Supernatant byl odlit a obsah zkumavky byl znovu centrifugován za stejných podmínek. Supernatant byl odstraněn pipetováním. Ve zkumavce zůstaly koncentrované mikrobiální buňky.
2. Buněčná peleta byla resuspendována ve 450 µl roztoku PF1, který je silným lyzačním činidlem narušujícím buněčné stěny a zároveň napomáhajícím odstraňovat organické i anorganické sloučeniny kromě DNA. Je důležité, aby tento roztok byl před použitím zahřátý na 55 °C a použit dokud je horký, čímž se zabrání jeho vysrážení.
3. Resuspendované buňky byly přemístěny do rozbíjecí zkumavky, které byly následně umístěny do vortexového adaptéru do horizontální polohy. Vzorky byly vortexovány při nejvyšší rychlosti po dobu 10 minut.
4. Obsah rozbíjecích zkumavek byl centrifugován 1 minutu při 13 000 x g. Při tomto kroku se rozbité buňky shromažďují po stranách zkumavky, zatímco DNA zůstává v supernatantu. Supernatant byl přenesen do čisté 2ml zkumavky.

5. K supernatantu bylo přidáno 100 μ l roztoku PF2, který umožňuje odstranění organických a anorganických sloučenin a zbytků buněk. Směs byla krátce promíchána na vortexu a následně inkubována asi 5 minut při 4 °C, přičemž výrobce doporučuje použití vodní lázně s ledem.
6. Směs byla centrifugována 1 minutu při 13 000 x g a pokojové teplotě.
7. Veškerý supernatant obsahující DNA byl přenesen do čisté 2ml zkumavky. Do zkumavky bylo přidáno 900 μ l roztoku PF3. Směs byla krátce promíchána na vortexu. Roztok PF3 je vysoce koncentrovaným solným roztokem, který umožňuje stálou vazbu DNA na membránu kolonky v následujícím kroku. Díky vysoké koncentraci solí může v roztoku dojít k jejich vysrážení. Před použitím je tedy nutno roztok zkontrolovat a případně i zahřát na 55 °C, aby se sraženina rozpustila. Před použitím není nutné čekat, až roztok zchladne.
8. Přibližně 650 μ l směsi ve zkumavce bylo přeneseno do kolonky a centrifugováno 1 minutu při 13 000 x g a při pokojové teplotě. Přefiltrovaná tekutina byla vylita. Do kolonky bylo přeneseno dalších 650 μ l směsi. Centrifugace byla opakována. Filtrát byl opět vylit. Do kolonky byl přidán zbytek směsi, který byl rovněž centrifugován. Výrobce zde klade důraz na nutnost rozdělení každého vzorku na tři dávky. Tento krok je charakterizován selektivní vazbou DNA na křemičitou membránu kolonky. Naopak téměř všechny kontaminující složky přechází do filtrátu.
9. Kolonka se zachycenou DNA byla přemístěna do čisté 2ml zkumavky a naplněna 650 μ l promývacího roztoku PF4, který je nutno před použitím protřepat. Takto byly vzorky centrifugovány při 13 000 x g po dobu 1 minuty. Roztok s sebou unáší soli, huminové kyseliny a další příměsi, které se rovněž zachytily na membráně.
10. Přefiltrovaná tekutina byla ze zkumavky vylita. Do kolonky bylo přidáno 650 μ l roztoku PF5. Obsah byl opět centrifugován (1 minuta, 13 000 x g). Tímto způsobem byly z membrány odstraněny zbytky roztoku PF4.
11. Přefiltrovaná tekutina byla ze zkumavky vylita. Kolonka bylo podrobena další centrifugaci, tentokrát však po dobu 2 minut při 13 000 x g. Zde je důležité odstranit poslední zbytky promývacího roztoku PF5, aby se zabránilo interakcím etanolu obsaženému v tomto roztoku během dalších aplikací (PCR, restriční analýza, gelová elektroforéza).

12. Kolonka byla přenesena do čisté 2ml zkumavky a převrstvena 50 μ l roztoku PF6¹. Jedná se o sterilní eluční pufr, který je nutno nanášet doprostřed membrány tak, aby celá membrána byla vlhká. Tento pufr zajistí uvolnění DNA z membrány, protože neobsahuje žádné soli, které by podporovaly vazbu DNA na membránu. Výrobce také uvádí, že tento roztok lze nahradit sterilní DNA-Free PCR Grade vodou případně TE pufrem.
13. Zkumavka s kolonkou byla centrifugována při 13 000 x g po dobu 1 minuty. Při tom DNA přejde do pufru, který se shromažďuje na dně zkumavky. Kolonka byla ze zkumavky vyjmuta.

DNA je v tomto stavu připravená pro různé aplikace a již není potřeba dalších úprav. Pro případy pozdějšího použití, se doporučuje DNA skladovat při teplotách -20 až -80 °C.

Veškeré roztoky a další pomůcky (2ml zkumavky, rozbíjecí zkumavky, kolonky) použité při izolaci DNA jsou součástí komerční izolační soupravy.

Izolace DNA startovací kultury byla prováděna pomocí komerční soupravy High Pure PCR Template Preparation Kit. Při izolaci se postupovalo podle následujícího protokolu:

1. Lyofilizovaná kultura byla pomocí sterilní bakteriologické kličky přenesena do přibližně 4 ml sterilního masopeptonového bujónu (pepton 5,0 g/l, chlorid sodný 5,0 g/l, hovězí extrakt 1,5 g/l, kvasniční extrakt 1,5 g/l, pH 7,4 \pm 0,2) a kultivována při laboratorní teplotě po dobu 72 hodin.
2. Mikrozukavka o objemu 1,5 ml byla naplněna dobře promíchanou suspenzí bakteriálních buněk v bujónu a centrifugována po dobu 5 minut při 3 000 x g.
3. Supernatant byl odlit a peleta buněk byla resuspendována ve 200 μ l PBS.
4. Do mikrozukavky bylo přidáno 5 μ l lyozymu (10 mg/ml v 10mM Tris-HCl, pH 8,0). Směs byla inkubována při teplotě 37 °C po dobu 15 minut.
5. Ke vzorku bylo přidáno 200 μ l Binding Buffer a 40 μ l obnovené proteinázy K (obě činidla jsou součástí kitu). Směs byla ihned promíchána a inkubována při teplotě 70 °C po dobu 10 minut.
6. Ke směsi bylo přidáno 100 μ l izopropanolu. Obsah mikrozukavky byl dobře promíchán.

¹ V původním protokolu je uváděn objem 100 μ l. S cílem získat koncentrovanější DNA však bylo toto množství redukováno na polovinu.

7. Směs byla přenesena do kolonky umístěné ve zkumavce (součástí kitu) a centrifugována 1 minutu při 8 000 x g.
8. Kolonka byla přenesena do nové zkumavky. Do kolonky bylo přidáno 500 μ l Inhibitor Removal Buffer (součástí kitu). Vzorky byly centrifugovány 1 minutu při 8000 x g.
9. Kolonka byla opět přenesena do nové zkumavky. Do kolonky bylo přidáno 500 μ l Wash Buffer (součástí kitu). Vzorky byly centrifugovány 1 minutu při 8 000 x g. Tento postup byl ještě jednou opakován.
10. Přefiltrovaná kapalina byla ze zkumavky vylita a celá filtrační sestava byla znovu centrifugována 10 sekund při nejvyšší rychlosti.
11. Kolonka byla přenesena do čisté sterilní 1,5ml mikrozkušavky. Do kolonky bylo přidáno 30 μ l zahřátého (70 °C) elučního pufru (Elution Buffer), který je součástí kitu.
12. Po 15 minutách stání byl vzorek centrifugován po dobu 1 minuty při 8 000 x g. Tímto krokem byla DNA vymyta z membrány kolonky do mikrozkušavky.

Tento postup byl proveden minimálně ve čtyřech opakováních pro případ nedostatečného výtěžku.

DNA získaná tímto způsobem je vhodná pro okamžité použití. Lze ji také skladovat při teplotě +2 až +8 °C nebo při -15 až -25 °C pro případ pozdějších analýz.

6.4.3 Kontrola koncentrace a čistoty DNA

Koncentrace a čistota veškeré vyizolované DNA byla ověřena na spektrofotometru při vlnové délce 260 a 280 nm. Volba těchto vlnových délek elektromagnetického záření byla ovlivněna skutečností, že proteiny absorbují nejvíce záření o vlnové délce 280 nm a nukleové kyseliny jsou nejcitlivější k vlnovým délkám 260 nm.

Vlastní měření začíná nanesením 2 μ l rozpouštědla (roztok PF6, Elution Buffer) do speciálních jamek patentované NanoQuant desky, která je součástí spektrofotometru. V přístroji je změřena absorbance, která slouží k jeho kalibraci. V druhém kroku se provádí měření již s vyizolovanou DNA. Z absorbance změřené při 260 nm přístroj vypočítá koncentraci DNA. Čistota DNA je pak dána poměrem absorbancí při obou vlnových délkách (A_{260}/A_{280}). Tento poměr by se měl ideálně pohybovat mezi hodnotami 1,8 – 2,0.

6.4.4 Amplifikace úseku genu pro 16S rRNA

Amplifikace (zmnožení) prokaryotické DNA byla provedena ve dvou krocích (tzv. nested polymerázová řetězová reakce) pro dosažení vyššího výtěžku a citlivosti stanovení. Za cílové místo amplifikace byl zvolen gen pro 16S ribozomální RNA (16S rRNA) z důvodu své vysoké konzervovanosti pro různé druhy bakterií i archaea.

6.4.4.1 1. krok amplifikace – Touch Down polymerázová řetězová reakce

Touch Down polymerázová řetězová reakce (Touch Down PCR) využívá postupně se snižující se teploty nasedání primerů na polynukleotidový řetězec. V prvních cyklech je teplota nasedání vysoká, čímž se zabrání nespecifickému nasednutí primerů a je tedy vysoká pravděpodobnost, že bude amplifikována sekvence zájmu. Tyto fragmenty jsou pak dále zesíleny v dalších cyklech, ve kterých se teplota nasedání primerů postupně snižuje.

Pro ještě výraznější zvýšení přesnosti amplifikace genu byla Touch Down PCR použita v modifikaci Hot Start, která využívá speciální DNA polymerázu vyžadující pro svou aktivaci vysokou aktivační teplotu, tj. teplotu okolo 95 °C. Tím se zabraňuje syntéze DNA během náběhové teploty, kdy může docházet k nespecifickému nasedání primerů na templátovou DNA.

Vlastní PCR probíhala v reakční směsi o objemu 20 µl, jejíž složení je uvedeno v tabulce 4. MasterMix použitý jako jedna z komponent obsahoval GoTaq® Hot Start polymerázu, deoxynukleotidy (dNTP), MgCl₂ a reakční pufr.

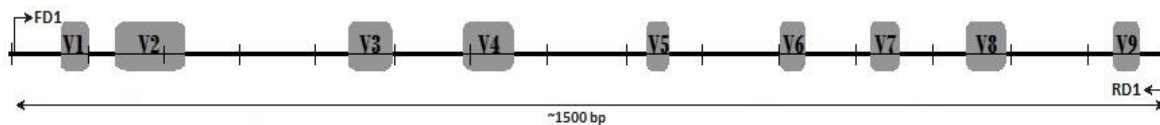
Příprava reakční směsi byla provedena v PCR boxu vysvíceném ultrafialovým zářením (min. 20 minut).

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro PCR – 1. amplifikační krok

komponenta	množství pro 1 reakci [µl]
GoTaq® Hot Start Green MasterMix	10
sterilní voda pro molekulární biologii	7
forward primer FD1	1
reverse primer RD1	1
DNA	1
CELKEM	20

Charakteristické sekvence bází primerů FD1 a RD1, které umožňují jejich specifické nasednutí na templátovou DNA, jsou uvedeny v tabulce 1. Použitím těchto dvou primerů

bylo dosaženo zmnožení úseku o velikosti přibližně 1 500 bp (obrázek 4). Primery byly dodány v lyofilizované formě. Před použitím byly rozpuštěny ve sterilní PCR vodě podle návodu výrobce a následně naředěny na pracovní koncentraci 20 pmol/μl.



Obrázek 4: Gen pro 16S rRNA – amplifikovaná sekvence v 1. amplifikačním kroku

Upraveno podle Kuczynski et al. [106].

Současně s přípravou reakčních směsí byla namíchána také negativní kontrola pro ověření, zdali nedošlo ke kontaminaci některé ze složek cizorodou DNA. DNA je v tomto vzorku nahrazena stejným objemem sterilní vody pro PCR.

Při přípravě reakční směsi se postupovalo následovně:

1. Do sterilní mikrokumavky pro PCR o objemu 1,5 ml byl napipetiván MasterMix, sterilní voda pro molekulární biologii a oba primery v množství vypočítaném pro daný počet vzorků. Do výpočtu byla zahrnuta také jedna kontrola a rezerva. Obsah mikrokumavky byl důkladně promíchán na vortexu.
2. Tato směs byla rozpipetována po 19 μl do sterilních mikrokumavek pro PCR o objemu 0,2 ml spojených do stripů. Negativní kontrola byla doplněna vodou do objemu 20 μl a uzavřena.
3. Jako poslední byla do reakční směsi přidána vyizolovaná DNA. Pipetou byla směs zároveň promíchána.

Stripy s reakční směsí byly vloženy do termocykleru. Vlastní PCR probíhala podle schématu, který je uveden v následující tabulce.

Tabulka 5: Teplotní a časový profil 1. amplifikačního kroku

krok PCR	teplota [°C]	doba trvání [s]	počet cyklů
počáteční denaturace	94	120	1x
denaturace (denaturation)	94	30	10x – v každém cyklu se teplota sníží o 0,5 °C
nasedání primeru (annealing)	57	30	
elongace (extension)	72	90	
denaturace (denaturation)	94	30	25x
nasedání primeru (annealing)	52	30	
elongace (extension)	72	90	
závěrečná extenze (final extension)	72	600	1x
uchování (storage)	4	∞	1x

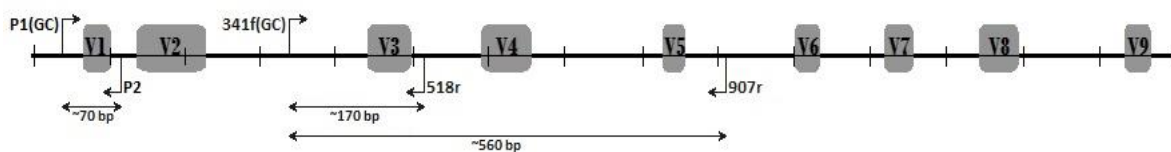
6.4.4.2 2. krok amplifikace

Rovněž při druhém amplifikačním kroku byla použita PCR v modifikaci Hot Start. Objem reakční směsi byl tentokrát 30 µl pro případ, že by bylo nutné stanovení opakovat. Příprava této směsi, vč. přípravy primerů, probíhala za stejných podmínek a podle stejného postupu jako v případě 1. amplifikačního kroku (viz kap. 5.4.3.1). Složení reakční směsi je uvedeno v tabulce 6.

Tabulka 6: Složení reakční směsi pro PCR – 2. amplifikační krok

komponenta	množství pro 1 reakci [µl]
GoTaq® Hot Start Green MasterMix	15,0
sterilní voda pro molekulární biologii	10,5
forward primer	1,5
reverse primer	1,5
DNA (PCR produkt z 1. kroku)	1,5
CELKEM	30,0

Ve druhém amplifikačním kroku byly použity celkem tři sady primerů, které umožnily zmnožení konkrétních úseků genu pro 16S rRNA. Pro amplifikaci úseku zahrnujícího variabilní oblasti V3 – V5 byly vybrány primery 341F(GC) a 907r, primery 341F(GC) a 518r umožnily zmnožení pouze variabilní oblasti V3 a konečně úsek obsahující oblast V1 byl zmnožen za použití primerů P1(GC) a P2. Sekvence bází všech použitých primerů jsou uvedeny v tabulce 1. Primery s označením (GC) obsahují GC-svorku. Na obrázku 5 jsou graficky znázorněny místa nasedání primerů na templátovou DNA a přibližné velikosti amplifikovaných fragmentů genu pro 16S rRNA.



Obrázek 5: Gen pro 16S rRNA – amplifikované sekvence ve 2. amplifikačním kroku

Upraveno podle Kuczynski et al. [106].

Amplifikace sekvencí nukleových kyselin probíhala v termocykleru podle schématu, který je uveden v následující tabulce.

Tabulka 7: Teplotní a časový profil 2. amplifikačního kroku

krok PCR	Teplota [°C]	doba trvání [s]	počet cyklů
počáteční denaturace	94	120	1x
denaturace (denaturation)	94	30	
nasedání primeru (annealing)	57	30	35x
elongace (extension)	72	60	
závěrečná extenze (final extension)	72	600	1x
uchování (storage)	4	∞	1x

6.4.4.3 Elektroforetická detekce fragmentů DNA

Úspěšnost a kvalita obou kroků PCR byla ověřena elektroforeticky v 1% agarózovém gelu.

Příprava gelu probíhala podle následujícího protokolu:

- Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo vypočítané množství práškové agarózy:
 - 0,5 g pro výsledný objem 50 ml,
 - 1,0 g pro výsledný objem 100 ml.
- K agaróze byl přidán 1x koncentrovaný TAE pufr v množství 50 ml, respektive 100 ml.
- Směs byla v mikrovlnné troubě přivedena k varu. Po krátkém probublání se ohřev zastavil a obsah baňky se pomalým a mírným krouživým pohybem promíchal. Tento postup byl ještě 2x zopakován.
- Rozpuštěná agaróza se nechala mírně zchladnout. Mezi tím byla připravena forma na gel s hřebínkem.²

² V případě potřeby zanalyzovat více vzorků současně, je možné umístit dva (dle možností i více) hřebínky za sebou.

5. Do roztoku agarózy byl přidán etidiumbromid (EtBr) v množství asi 30, resp. 60 μl . Směs byla krouživým pohybem promíchána. V tomto okamžiku je na místě zdůraznit nutnost práce v rukavicích z důvodu vysoké toxicity EtBr.
6. Roztok byl nalit do formy. Případné bubliny, které se během toho vytvořily, byly odstraněny za pomoci čisté špičky.
7. Minimálně 30 minut se nechal gel tuhnout ve vodorovné poloze.

Ze ztuhlého gelu byl vyjmut hřebínek. Gel i s formou (bez bočního těsnění) byl vložen do elektroforetické vany naplněné 1x koncertovaným TAE pufrem tak, aby jamky v gelu byly na straně záporné (černé) elektrody a aby byl gel zcela ponořen v pufru.

Do první jamky gelu bylo nanášeno 5 μl markeru (Marker-Quick-Load 100bp DNA Ladder³) jako standardu. Další jamky byly naplněny 5 μl vzorku včetně negativní kontroly⁴. Elektrody elektroforetické vany byly napojeny na zdroj elektrického napětí. Vlastní elektroforéza probíhala přibližně 20 minut při napětí 90 V.

Po ukončení elektroforézy byl gel přesunut do UV-transiluminátoru a pozorován pod UV světlem prostřednictvím kamery. Pomocí programu GeneSnap byla pořízena fotografie osvětleného gelu.

6.4.5 Denaturační gradientová gelová elektroforéza

6.4.5.1 Sestavení aparatury pro výrobu gelu

Pro sestavení jedné aparatury bylo zapotřebí úzké sklo se zaoblenými spodními rohy a silné sklo s výřezem o rozměrech 17,7 x 22,0 cm.

1. Obě skla byla před použitím omyta etanolem.
2. Po obvodu užšího skla bylo nataženo těsnění do tvaru písmene U (horní hrana zůstala bez těsnění). Toto sklo bylo poté položeno na laboratorní stůl trubkovitou částí těsnění nahoru.

³ Marker-Quick-Load 100bp DNA Ladder byl před použitím smíchán s DNA Gel Loading Dye (6x) a sterilní vodou pro molekulární biologii v poměru 1:1:3. DNA Loading Dye obsahuje barviva (bromfenolová modř a xylenkyanol FF) pro vizuální sledování migrace DNA v průběhu elektroforézy a glycerol pro lepší „sednutí“ markeru/vzorku na dno jamky.

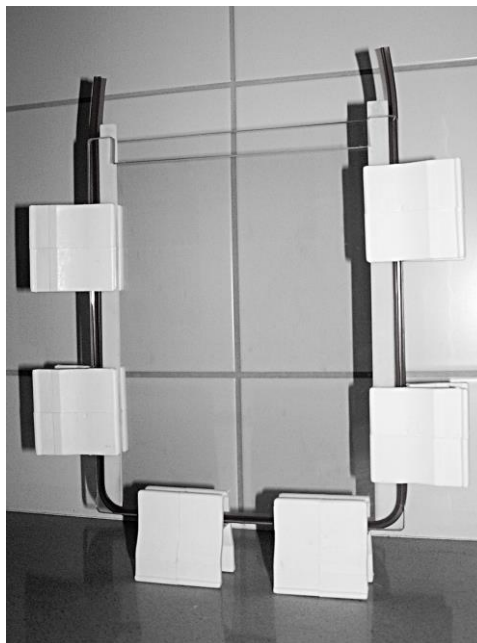
⁴ Ke vzorkům nebyl přidáván DNA Gel Loading Dye (6x), vše již obsahoval MasterMix.

3. Vedle vnitřních okrajů těsnění byly umístěny spacers (oddělovače), které zajišťovaly vytvoření prostoru mezi skleněnými deskami (obrázek 6).



Obrázek 6: Sestavování aparatury pro přípravu gelu

4. Na sklo s těsněním bylo položeno silnější sklo výřezem nahoru. Po obvodu byla skla k sobě zajištěna klipsy. Celá aparatura byla postavena do vertikální polohy (obrázek 7).



Obrázek 7: Aparatura pro přípravu gelu

6.4.5.2 Příprava gelu

Pro přípravu 7,5% gelu o rozměrech 150x200x1 mm bylo nejprve potřeba namíchat zásobní denaturační roztoky podle tabulky 8. Pro výrobu jednoho gelu je vždy potřeba dvou roztoků o různé koncentraci denaturačních činidel (40% (v/v) formamidu a močoviny), přičemž rozdíl koncentrací denaturačních roztoků by měl být alespoň 10 % [97]. V případě potřeby namíchat roztok o jiné koncentraci, než jaká je uvedena v tabulce 8, bylo množství denaturačních činidel přepočítáno pomocí trojčlenky.

Tabulka 8: Složení zásobních denaturačních roztoků

	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%
40% bis-akrylamid [ml]	18,8	18,8	18,8	18,8	18,8	18,8	18,8	18,8	18,8	18,8
50x TAE pufr [ml]	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
formamid [ml]	4,0	8,0	12,0	16,0	20,0	24,0	28,0	32,0	36,0	40,0
močovina [g]	4,2	8,4	12,6	16,8	21,0	25,2	29,4	33,6	37,8	42,0

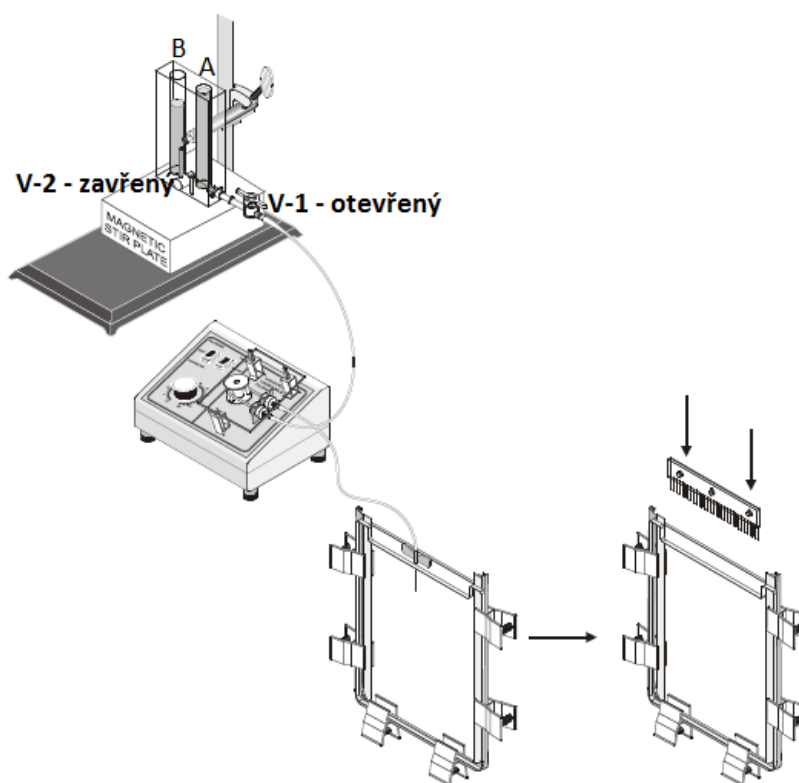
1. Při přípravě denaturačních roztoků se vždy začínalo navažováním močoviny, teprve až poté byly přidávány kapalné složky. Pomocí magnetického míchadla byla směs míchána při pokojové teplotě, dokud se močovina zcela nerozpustila. Nakonec byly jednotlivé roztoky doplněny destilovanou vodou do objemu 100 ml.⁵
2. Marker gradientu, jehla a spojovací hadička byla promyta destilovanou vodou. Po promytí byly uzavřeny oba ventily markeru gradientu a jehla s ním spojená prostřednictvím hadičky byla umístěna mezi skla aparatury pro přípravu gelu.
3. Dvě kónické zkumavky o objemu 50 ml byly označeny písmeny "A" a "B". Do zkumavky "A" bylo odměřeno:
 - 15 ml zásobního denaturačního roztoku o VYŠŠÍ koncentraci denaturačních činidel,
 - 104,4 µl 10% roztoku APS (amonium persulfát)⁶,
 - 6,5 µl TEMED.

Do zkumavky "B" bylo přidáno:

⁵ Předpřipravené zásobní denaturační roztoky byly skladovány při teplotě +4 °C.

⁶ Pro přípravu jednoho gelu bylo naváženo 0,025 g APS do 1,5ml mikrozkušavky a rozpuštěno ve 250 µl redestilované vody.

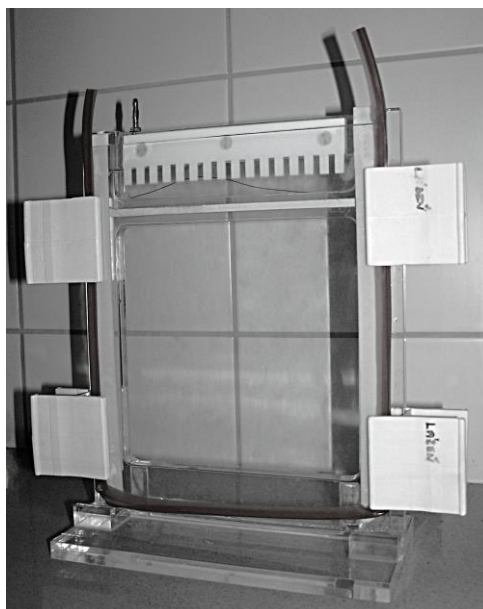
- 15 ml zásobního denaturačního roztoku o NIŽŠÍ koncentraci denaturačních činidel,
 - 104,4 μ l 10% roztoku APS,
 - 6,5 μ l TEMED.
4. Obsah obou zkumavek byl ihned důkladně promíchán. Byla také provedena kontrola, že jsou oba ventily markeru gradientu uzavřené. Další kroky už musely probíhat bez zbytečných prodlev, protože polymerace je velmi rychlá.
 5. Do pravé části markeru gradientu byl nalit roztok ze zkumavky "A" a do levé části roztok ze zkumavky "B", jak je znázorněno na obrázku 8.
 6. Bylo zapnuto magnetické míchání a rovněž mini-peristaltická pumpa.
 7. Nejprve byl otevřen ventil V-1 a vzápětí také ventil V-2 (viz obrázek 8).
 8. Jakmile byl celý prostor mezi skly zaplněn roztokem, byl do aparatury zasazen hřebínek s 16 nebo 22 zuby. Pokud objem roztoků nepostačoval pro vyplnění celého prostoru mezi skly, byl gel dokončen 0% roztokem (bez močoviny a formamidu).
 9. Marker gradientu, jehla a spojovací hadička byla znovu důkladně promyta destilovanou vodou.
 10. Gel tuhnul přibližně 1 hodinu.



Obrázek 8: Příprava gelu (upraveno) [107]

6.4.5.3 Příprava a průběh elektroforézy

1. Elektroforetický tank byl naplněn 1x TAE pufrem a vytemperován na teplotu 60 °C. Tento krok byl proveden již v průběhu tuhnutí gelu.
2. Po proběhnutí polymerace byly z aparatury pro přípravu gelu odstraněny svorky. Těsnění na spodní hraně desek bylo uvolněno (viz obrázek 9).
3. Skleněné desky s gelem (tzv. sendvič) byly přiloženy k jednoduché kazetě z plexiskla výřezem dovnitř a zajištěny svorkami speciálně vyhrazenými pro dlouhodobé máčení v lázni (viz obrázek 9).
4. Z gelu byl opatrně vyjmut hřebínek a jamky byly důkladně vymyty pufrem za pomoci injekční stříkačky a jehly. Tímto krokem byly z jamek odstraněny zbytky denaturačního roztoku, které nebyly zadrženy v gelu.
5. Kazeta se sendvičem byla vložena do tanku s pufrem a byla na ni nasazena hadička, kterou protéká pufr, čímž byl prostor jamek naplněn pufrem.
6. Do jamek bylo nanášeno 8 μ l vzorku. Do první a poslední jamky byl nanesen Marker-Quick-Load 100bp DNA Ladder ve stejném množství.
7. Ke kazetě byla připojena katoda. Elektroforéza probíhala při napětí 120 V po dobu 900 minut do druhého dne.



Obrázek 9: Sendvič připevněný ke kazetě

6.4.5.4 Barvení gelu a vizualizace

Při barvení gelu se postupovalo následovně:

1. Byla připravena barvicí lázeň skládající se ze 400 ml 1x koncentrovaného TAE pufru a 40 µl fluorescenčního barviva GelRed Nucleic Acid Gel Stain. Velkou předností toho barviva je jeho netoxicity oproti EtBr, který lze rovněž pro barvení použít.
2. Lázeň byla překryta alobalem z důvodu náchylnosti barviva ke světlu.
3. Kazeta se sendvičem byla vyjmuta z tanku a rozebrána. Ze sendviče bylo odstraněno těsnění a spacery a skla byla od sebe opatrně oddělena⁷. Celý proces byl prováděn tak, aby gel zůstal na silnějším skle s výřezem.
4. Skleněná deska s gelem byla vložena do barvicí lázně.
5. Barvení probíhalo 90 – 120 minut při současném protřepávání lázně na třepačce, tak aby se barvicí roztok dostal i pod gel.

Obarvený gel byl přenesen ze skla na UV-transluminátor a prosvícen UV zářením. Pomocí programu GeneSnap byla pořízena fotografie osvíceného gelu.

6.4.6 Optimalizace techniky PCR-DGGE

Byly optimalizovány podmínky PCR-DGGE analýzy s cílem dosáhnout vysokého stupně rozlišení fragmentů DNA. Optimalizace se zakládala na hledání vhodného úseku genu pro 16S rRNA, který dokáže poskytnout dostatečně široký obraz o druhovém zastoupení mikroorganismů ve FMV a na hledání optimálního denaturačního gradientu, který zajistí přehlednou separaci vybraných fragmentů v gelu.

Byly testovány celkem tři dvojice primerů při různých koncentračních gradientech denaturačních činidel. Zvolené kombinace primerů, amplifikované úseky a přibližné velikosti těchto úseků jsou uvedeny v kapitole 6.4.4.2 a na obrázku 5. Nejprve byla zkoušena rozlišovací schopnost fragmentu zahrnujícího variabilní oblasti V3 – V5, který se na Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí běžně využívá k stanovení mikrobiální diverzity vzorků ze životního prostředí (voda, půda), ve spojitosti s denaturačním gradientem 40 – 60 %, 30 – 60 %, 30 – 70 % a 20 – 80 %. Nicméně s přihlédnutím ke skutečnosti,

⁷ Velmi dobrou pomůckou při oddělování skel od sebe je malá kovová lžička, která se vsune mezi skla a mechanismem zvaným páka se nadzdvihne horní sklo.

že potraviny bývají často mnohem složitější matrice, než jakými jsou právě materiály ze životního prostředí, bylo rozhodnuto o zaměření se pouze na oblasti V1 a V3, které již v minulosti byly použity k popisu mikroflóry FMV [54, 55, 108, 109]. Pro V1 region byl přitom zvolen gradient denaturačních činidel 30 – 50 % podle Kesmen et al. [109], V3 region byl otestován při gradientu 30 – 50 % a 15 – 55 %, který rovněž použili Kesmen et al. [109].

6.4.7 Re-amplifikace, purifikace, sekvenace DNA a identifikace mikroorganismů

Vybrané bandy byly z gelu vyříznuty skalpelem a přeneseny do sterilních 1,5 ml mikroz-kumavek s 200 μ l sterilní vody pro PCR a sterilními skleněnými kuličkami (5 – 10 ks). Obsah zkumavek byl na vortexu krátce promíchán. Poté byly vzorky umístěny do chladničky a udržovány při 4 °C do druhého dne pro umožnění difúze DNA z gelu do kapalné fáze. Jeden mikrolitr eluované DNA byl použit pro re-amplifikaci. Ta probíhala v reakčním objemu 20 μ l (tab. 4) při současném použití primerů z 2. amplifikačního kroku (kap. 6.4.4.2) ale bez GC-svorky. Úspěšnost reamplifikace byla ověřena elektroforetický podle metodiky popsané v kapitole 6.4.4.3.

PCR produkty byly purifikovány s cílem odstranit primery, soli, volné nukleotidy a termostabilní DNA polymerázu, které by jinak mohly inhibovat nebo jinak narušovat sekvenaci. Purifikace byla prováděna s využitím speciálního kitu (High Pure PCR Product Purification Kit) podle následujícího protokolu:

1. Byl připraven pracovní roztok promývacího pufru přidáním 200 ml absolutního etanolu k Wash Buffer, který je součástí kitu.
2. K 15 μ l PCR produktu po re-amplifikaci bylo přidáno 75 μ l Binding Buffer. Obsah každé PCR zkumavky byl důkladně promíchán opakovaným nasáváním roztoku mikropipetou do špičky.
3. Obsah každé PCR zkumavky byl přenesen do kolonky umístěné ve zkumavce (Collection Tube). Vzorky byly centrifugovány při laboratorní teplotě po dobu 30 – 60 s při maximální rychlosti.
4. Přefiltrovaná kapalina byla vylita a do kolonky bylo přidáno 500 μ l Wash Buffer připraveného podle 1. bodu. Vzorky byly centrifugovány při pokojové teplotě po dobu 1 minuty při maximální rychlosti.

5. Přefiltrovaná kapalina byla vylita a do kolonky bylo přidáno 200 μ l Wash Buffer. Vzorky byly opět centrifugovány při pokojové teplotě po dobu 1 minuty při maximální rychlosti.
6. Přefiltrovaná kapalina byla vylita. Vzorky byly ještě jednou centrifugovány za stejných podmínek pro dosažení dokonalého odstranění promývacího pufru.
7. Kolonka byla přenesena do čisté 1,5ml mikrozkušky a bylo do ní přidáno 30 μ l elučního pufru (Elution Buffer). Poté byly vzorky ponechány cca 15 minut v klidu.
8. Vzorky byly centrifugovány při pokojové teplotě po dobu 1 minuty při maximální rychlosti. Eluční pufr zajistil vyplavení purifikované DNA z membrány kolonky do mikrozkušky.

Koncentrace a čistota purifikované DNA byla ověřena spektrofotometricky podle metodiky popsané v kapitole 6.4.3.

Přečištěná DNA byla krátkodobě skladována při teplotě +4 °C. Před odesláním na sekvenaci byla do 0,5ml sterilních mikrozkušek pro PCR připravena směs 8,75 μ l roztoku přečištěné DNA a 1,25 μ l forward primeru bez GC-svorky (P1 nebo 341F dle úseku genu).

Sekvence byla provedena společností SEQme s.r.o. Zjištěné nukleotidové sekvence byly porovnány se známými sekvencemi bakterií v databázi BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Tento program ve své databázi automaticky vyhledává k zadané hledané sekvenci DNA nejvíce podobné sekvence DNA konkrétních bakterií a zároveň určí spolehlivost identifikace.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Mikrobiologický rozbor fermentovaného masného výrobku

Vývoj mikroflóry v průběhu výroby a skladování FMV Paprikáš vyráběného klasickou a QDS technologií byl sledován pomocí dvou metod. Vzorky salámů, koření a díla byly nejprve podrobeny mikrobiologické analýze založené na kultivaci mikroorganismů na živých půdách. Zjištěná data poté byla vyhodnocena a graficky zpracována v programu MS Excel.

Primárním zdrojem mikroorganismů v masných výrobcích jsou vstupní suroviny a environmentální podmínky výroby [57, 59], což také potvrzuje tabulka 9, ve které jsou uvedeny výsledky mikrobiologického rozboru díla před zaočkováním startovací kulturou. Značná část této divoké mikroflóry přitom pravděpodobně pochází z koření (tab. 10). Ostatně to samé tvrdí i Kročko et al. [58]. Navíc byla nalezena korelace mezi velikostí dávky koření do díla o počty mikroorganismů v díle.

Tabulka 9: Mikroflóra díla pro výrobu FMV (log CFU/g ± směrodatná odchylka)

dílo/vzorek	CPM	ml. koky	laktobacily	CNS	<i>Enterobact.</i>
1/a	6,71 ± 0,37	7,15 ± 0,04	4,10 ± 0,07	4,85 ± 0,06	5,43 ± 0,03
1/b	6,31 ± 0,01	6,48 ± 0,00	4,06 ± 0,06	4,73 ± 0,04	4,58 ± 0,08
2/a	6,48 ± 0,01	7,65 ± 0,10	5,50 ± 0,04	6,22 ± 0,02	6,08 ± 0,22
2/b	6,77 ± 0,04	6,73 ± 0,02	4,46 ± 0,01	5,09 ± 0,01	5,26 ± 0,39

a – 1. šarže
b – 2. šarže

CPM – celkové počty mikroorganismů
CNS – koaguláza negativní stafylokoky

Tabulka 10: Mikroflóra koření (log CFU/g ± směrodatná odchylka)

vzorek	dávka	CPM	ml. koky	laktobacily	CNS	<i>Enterobact.</i>
1 (K)	standardní	5,11	5,67	x	4,96	3,30
2 (Q)	vyšší	5,43	5,57	x	4,96	2,44

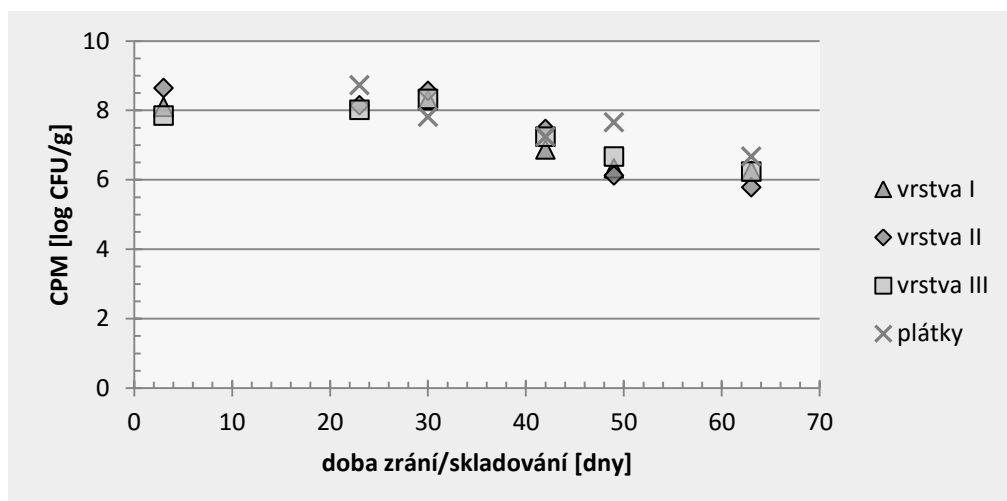
x – netestováno
K – klasická výroba
Q – QDS výroba

CPM – celkové počty mikroorganismů
CNS – koaguláza negativní stafylokoky

I když je tato práce zaměřena na masný výrobek vyráběný s použitím startovací kultury, je nutno poznamenat, že díky vysokým počtům divokých mléčných koků, laktobacilů a stafylokoků ve výchozích surovinách by bylo možné dílo použít rovněž pro výrobu spontánně fermentovaných salámů. Jediným problémem by v tomto případě mohla být vysoká kontaminace díla enterobakteriemi. U salámů s přidavkem startovací kultury je více

než pravděpodobné, že enterobakterie budou v průběhu zrání redukovány pod detekovatelnou úroveň (viz dále) díky vysoké aktivitě LAB a rychlému okyselení prostředí [58]. U spontánně kvašených masných výrobků však bývá vývoj laktobacilů a tudíž i nepříznivých podmínek pomalejší a na mnohem nižší úrovni [58, 110]. Pokud by například byla počáteční kontaminace díla enterobakteriemi v množství 2,38 log CFU/g (2 – 3x nižší než u díla pro výrobu Paprikáše) mohli bychom očekávat asi 10 životaschopných buněk v 1 gramu výrobku [58]. Tato skutečnost by pak mohla znamenat riziko výskytu salmonel a porušení zdravotní nezávadnosti produktu. Přítomnost salmonel v masných výrobcích určených ke spotřebě bez tepelné úpravy je totiž nepřijatelná [111].

Změny v celkových počtech životaschopných aerobních mezofilních mikroorganismů ve FMV v průběhu zrání a skladování jsou znázorněny na grafech 1 a 2. Nebyly zaznamenány významnější rozdíly v počtech mikroorganismů mezi jednotlivými vrstvami salámů v tyčích ani mezi salámy v tyčích a v plátkách. U salámů vyrobených klasickou technologií klesaly CPM od 30. dne zrání. Tento trend platil pro tyče i plátky. Celkově se počet mikroorganismů snížil přibližně o dva řády. U salámů vyrobených technologií QDS nedošlo v průběhu výroby ke snížení CPM.



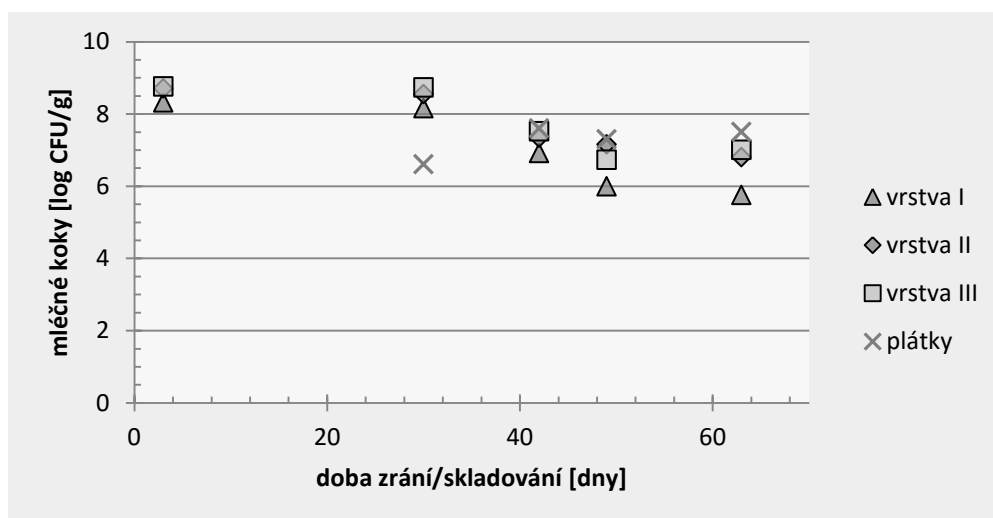
Obrázek 10: Vývoj CPM během výroby a skladování produktu vyrobeného klasickou technologií



Obrázek 11: Vývoj CPM během výroby a skladování produktu vyrobeného QDS technologií

Trend vývoje laktobacilů, mléčných koku i CNS více či méně odpovídal vývoji CPM. Dominantní skupinou bakterií po celou dobu zrání a skladování byly LAB v čele s mléčnými koky. Tato skutečnost se vztahovala na tyčové salámy i plátky bez ohledu na způsob výroby a jenom upevňuje tvrzení prezentovaná v teoretické části této práce (viz kap. 3).

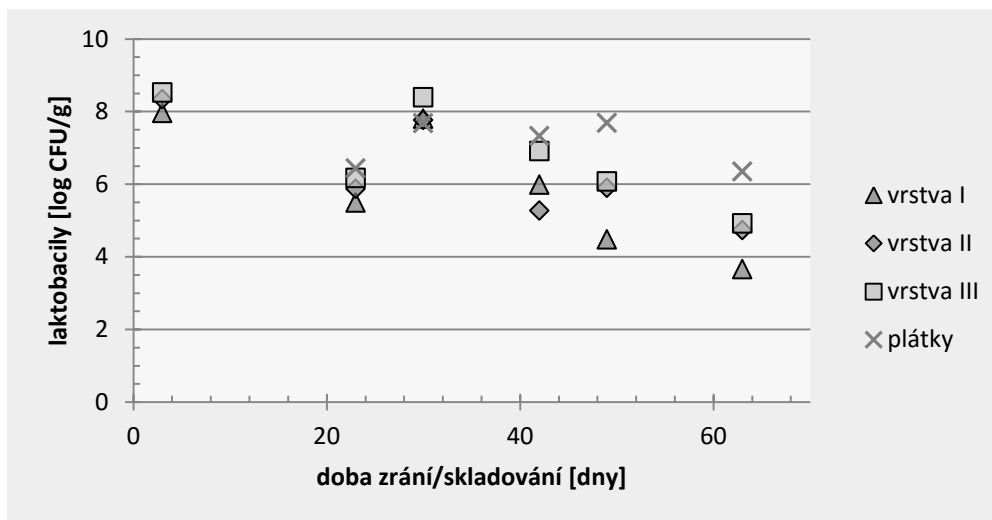
U vzorků salámů klasické výroby byl patrný rozdíl v počtech CFU sledovaných skupin bakterií mezi jednotlivými vrstvami tyčí salámů i mezi salámy v tyčích a plátcích balených v modifikované atmosféře. Tyto rozdíly se však vytvářely až v průběhu skladování masných výrobků, nikoli během fermentace a sušení (viz graf 3 – 5).



Obrázek 12: Vývoj mléčných koku během výroby a skladování produktu vyrobeného klasickou technologií

Počty mléčných koků se až do konce sušení salámů vyrobených klasickou technologií držely beze změn na úrovni 8 – 9 log CFU/g. V průběhu skladování pak tyto počty poklesly. Nejvyšší pokles CFU mléčných koků proběhnul v okrajové vrstvě salámů, a to o 2,5 řádu. Oproti tomu ve středové části salámů byl konečný počet mléčných koků nižší jenom o 1,2 řádu ve srovnání s počty bakterií na začátku zrání. Životaschopnost mléčných koků byla na konci skladování nejvyšší v balených plátkovaných salámech.

Množství životaschopných laktobacilů se na začátku zrání i na konci sušení pohybovalo na hodnotách 7,8 – 8,5 log CFU/g, což je jen o něco méně než ve slovenském tepelně neopracovaném masném výrobku vyrobeném s použitím startovací kultury (*S. xylosum*, *P. pentosaceus*, *Lb. plantarum*) a přibližně stejně jako v salámu Sucuk obsahujícího kulturu *Lb. plantarum* a *S. xylosum* získanou z přirozeně fermentovaného Sucuku [58, 112]. Množství laktobacilů bylo v salámech Paprikáš po třech dnech zrání vyšší, případně na stejné úrovni jako ve spontánně fermentovaných masných výrobcích z dřívějších studií [58, 68, 82]. Během skladování počty laktobacilů v salámech klesaly až na konečných 3,6 log CFU/g v okrajové vrstvě a 4,9 log CFU/g v jádře. V plátkovaných salámech si zachovalo svou životaschopnost přibližně 6,3 CFU/g.

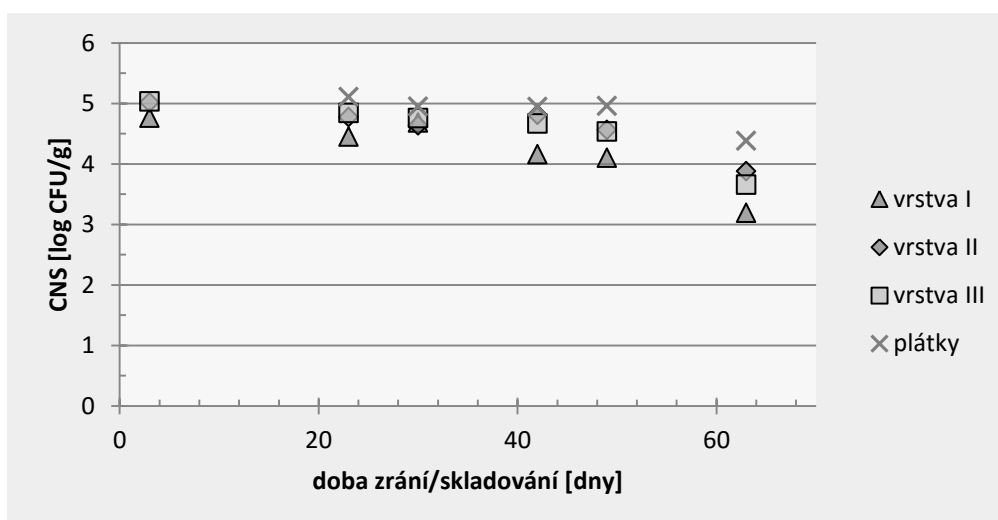


Obrázek 13: Vývoj laktobacilů během výroby a skladování produktu vyrobeného klasickou technologií

Snižování životaschopnosti laktobacilů v masných výrobcích obsahujících startovací kulturu v průběhu skladování zaznamenali také Kročko et al. [58] a Kameník et al. [113]. Nicméně pokles CFU nebyl v těchto dvou případech tak markantní jako u salámů Paprikáš studovaných v této práci. U první citované studie je však nutno zohlednit kratší dobu skladování (15 dnů). Na druhou stranu v italských FMV vyrobených s použitím startovací kul-

туру i bez ní k žádnému snižování počtu CFU laktobacilů v průběhu zrání (63 dnů) nedošlo [59].

Vývoj CNS v klasicky vyrobených salámech je znázorněn na grafu 5. U salámů v tyčích klesly v průběhu skladování počty stafylokoků z počátečních 4,8 – 5,0 log CFU/g na 3,2 log CFU/g v okrajové vrstvě a na 3,6 – 3,8 log CFU/g v jádře a mezivrstvě. Nejnižší pokles byl opět zaznamenán u plátek, a to z 5 log CFU/g na 4,4 log CFU/g během posledních 14 dnů skladování.



Obrázek 14: Vývoj CNS během výroby a skladování produktu vyrobeného klasickou technologií

Počty stafylokoků v Paprikáši byly v průběhu fermentace a sušení o 1 – 3 log CFU/g nižší než v italských průmyslově vyrobených FMV, které byly předmětem zkoumání dvou na sobě zcela nezávislých studií. Nicméně i u těchto výrobků byl na konci zrání pozorován mírný pokles počtu životaschopných CNS [59, 114]. U přirozeně kvašených masných výrobků může být situace jiná. V tradičním řeckém fermentovaném salámu klesaly počty stafylokoků už od 1., respektive 4. dne zrání v závislosti na původu výrobků [68].

Pokles životaschopnosti mléčných koků, laktobacilů i CNS pozorovaný u salámů z klasické výroby je běžnou reakcí mikroorganismů na nepříznivé životní podmínky, které byly způsobeny především vyčerpáním živin, nahromaděním metabolitů a samozřejmě také poklesem pH, vodní aktivity a nárůstem koncentrace solí během fermentační a sušící fáze [115].

Počty CFU mléčných koků, laktobacilů a CNS v tyčích pro QDS výrobu byly na stejných úrovních jako u klasické výroby. Grafické znázornění jejich vývoje během výroby a skla-

dování FMV je k vidění v příloze I. Mléčné koky si udržovaly svou životaschopnost na hodnotách 8 – 9 CFU/g i po naplátkování a během skladování. U laktobacilů byl zaznamenán v 1. týdnu po naplátkování mírný pokles z 8 CFU/g na 7,1 CFU/g. K dalšímu poklesu této hodnoty však již nedošlo. Vývoj CNS byl charakteristický mírným nárůstem počtu životaschopných jedinců z 5 CFU/g na 5,5 CFU/g v prvních 23 dnech výroby. V průběhu dalšího dozrávání a skladování však tato hodnota klesla zpět pod hranici 5 log CFU/g. Je však nutno dodat, že tyto změny nebyly příliš významné.

Z mikrobiologické analýzy Paprikáše vyplývá, že ošetření salámů v rámci QDS procesu prodlužuje životaschopnost LAB a CNS. Otázkou však zůstává, zdali tato skutečnost není dána nižší aktivitou bakterií a tudíž pomalejším vyčerpáním živin a hromaděním metabolitů. V takovém případě by se dalo spekulovat nad horší senzorkou charakteristikou výrobku, protože, jak již bylo předesíláno v kapitole 3.3, právě s aktivitou mikroorganismů souvisí řada vlastností FMV.

Po celou dobu zrání a skladování nebyla zjištěna v žádném z testovaných vzorků salámů přítomnost *S. aureus*. Také enterobakterie nebyly detekovány v žádném výrobku na konci skladování. U salámů vyrobených klasickou technologií byly enterobakterie zcela usmrceny do 23. dne zrání. Rovněž plátkované výrobky byly bez nálezu. V tyčích pro QDS výrobu byly enterobakterie zaznamenány ve druhém dnu fermentace, ale ne po 14 dnech uchovávání při -8 °C. Plátky získané z těchto polotovarů však vykazovaly přítomnost zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*, a sice v množství nižším než 3 log CFU/g. S vysokou pravděpodobností došlo během procesu plátkování k sekundární kontaminaci salámů ať už ze vzduchu nebo z vlastního plátkovacího zařízení. Nicméně během následného dozrávání v obalu byly i tyto bakterie usmrceny.

7.2 Identifikace mikroorganismů metodou PCR-DGGE

7.2.1 Optimalizace izolace DNA

Na reprezentativních vzorcích salámu byly otestovány tři metody izolace DNA. První metoda zahrnovala pouze rozmělnění materiálu a přefiltrování vniklé směsi přes gázu s následnou izolací DNA pomocí komerčního kitu. Ve druhé metodě byl k filtrátu navíc přidán chloroform. Tato látka dokáže efektivně denaturovat proteiny, zabraňuje zadržování vody v organické fázi a zlepšuje fázovou separaci zvýšením hustoty organické fáze [116]. Součástí třetí metody izolace DNA bylo vystavení filtrátu účinkům SDS (dodecylsulfát sodný),

který rozpouští buněčné membrány a rovněž denaturuje proteiny. S těmito rozvolněnými molekulami poté reaguje prostřednictvím hydrofobních interakcí za vzniku sraženiny, která je snadno oddělena od roztoku nukleových kyselin centrifugací [117].

Z těchto tří postupů izolace DNA byla pro další aplikace vybrána metoda poskytující nejvyšší výtěžky vysoce čisté DNA. Z naměřených hodnot koncentrace a čistoty DNA získané jednotlivými metodami vyplynulo, že použití chloroformu či SDS není pro zvolenou techniku izolace DNA pomocí kitu příliš vyhovující. Výtěžnost byla v obou případech nízká a rovněž čistota se při některých měřeních pohybovala pod nebo nad hranicí přijatelnosti (optimum 1,8 – 2,0). Naopak metoda popisovaná jako první v předešlém odstavci vykazovala velmi uspokojivé hodnoty obou sledovaných parametrů. Ostatně vše je shrnuto v následující tabulce.

Tabulka 11: Výsledky optimalizace izolace DNA

vzorek metoda	QDS výroba, 2. den		klasická výroba, 42. den	
	koncentrace [ng/μl]	čistota [-]	koncentrace [ng/μl]	čistota [-]
1	52,7	1,89	16,3	1,87
1	40,9	1,88	14,7	1,81
2	5,1	1,89	15,6	1,93
2	5,1	1,55	13,5	1,78
3	14,2	1,67	6,6	1,83
3	9,0	1,61	12,6	2,25

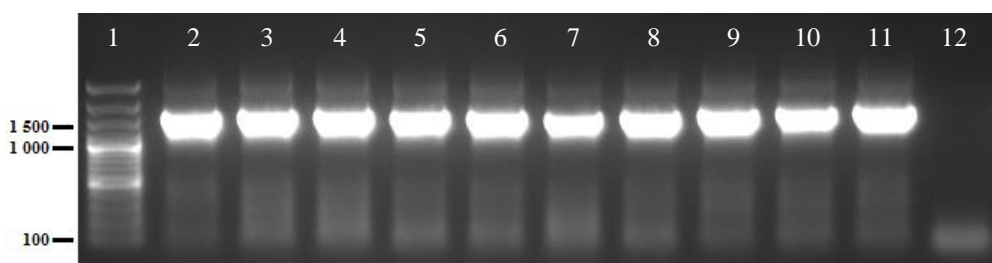
Na základě těchto výsledků byla právě první metoda označena jako optimální pro izolaci DNA ze vzorků salámů a stejně tak i z koření a díla. Hodnoty koncentrace a čistoty DNA vyzolované z těchto vzorků jsou uvedeny v příloze II.

7.2.2 Úspěšnost a kvalita amplifikace genu

Amplifikace DNA každého vzorku probíhala vždy ve dvou krocích (viz kap. 6.4.4.1 a 6.4.4.2) PCR produkty byly po každém kroku nanášeny na agarózový gel a elektroforeticky separovány podle metodiky popsané v kapitole 6.4.4.3. Pozorováním gelu pod UV světlem bylo možné odhadnout úspěšnost a kvalitu amplifikace. Úspěšností se v tomto případě myslí koncentrace amplifikované DNA, o které vypovídala intenzita bandů. Kvalita reakce byla posuzována podle přítomnosti či nepřítomnosti kontaminace v negativní kontrole.

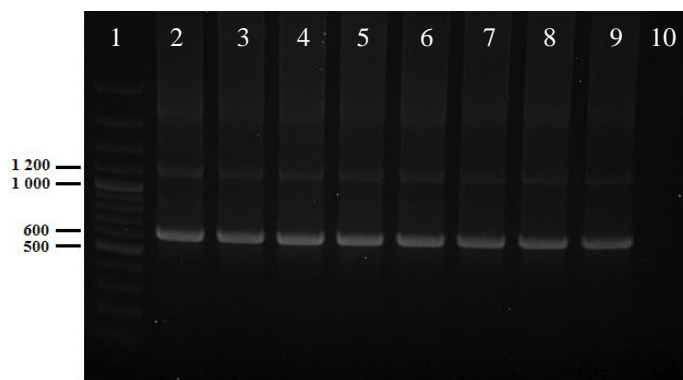
Z důvodů uniformity výsledků elektroforetické detekce fragmentů DNA budou dále popisovány pouze reprezentativní případy.

V prvním kroku PCR byly použity primery FD1 a RD1, které by měly být schopny zajistit amplifikaci úseku genu pro 16S rRNA o velikosti přibližně 1 500 bp. Na obrázku 10 je možné vidět, že amplifikované úseky tomuto předpokladu zcela odpovídaly. Na tomto obrázku je kromě sekvence zájmu viditelný také slabý proužek o velikosti menší než 100 bp. Zvláště dobře je vidět v pozici vzorku číslo 12, kterým je negativní kontrola. Tyto signály obvykle vytváří nespoteřované primery, respektive jejich dimery. Jelikož v negativním vzorku není přítomen substrát (DNA), na který by se primery navázaly, jsou tyto signály nejčastěji pozorovatelné právě v kontrolním vzorku [118].



Obrázek 15: PCR s primery FD1 a RD1 pro amplifikaci genu pro 16S rRNA, 1 500 bp
1 – marker; 2 – 3. den, I. vrstva; 3 – 3. den, III. vrstva; 4 – 23. den, I. vrstva; 5 – 23. den, III. vrstva; 6 – 30. den, I. vrstva; 7 – 30. den, III. vrstva; 8 – 42. den, I. vrstva; 9 – 42. den, III. vrstva; 10 – 49. den, I. vrstva; 11 – 49. den, III. vrstva; 12 – negativní kontrola

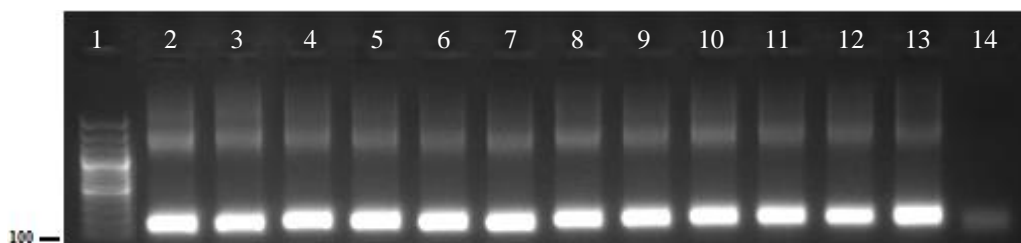
Druhý krok PCR zahrnoval amplifikaci tří vybraných úseků genu pro 16S rRNA. Úsek zahrnující variabilní oblasti V3 – V5 byl ohraničen primery 341f(GC) a 907r. Předpokládaná délka tohoto úseku byla 560 bp, při započítání velikosti primerů 635 bp. Elektroforetická detekce fragmentu prokázala shodu s tímto předpokladem. Na obrázku 11 je k vidění ještě jeden amplifikační produkt o velikosti přibližně 1 200 bp. Může se jednat o vedlejší produkt reakce způsobený přítomností vícero míst pro nasedání primerů v cílové molekule DNA [118]. Šlo by také spekulovat nad pozůstatkem z předešlé reakce. Nicméně produkt je ve vzorku přítomen v nízké koncentraci oproti sekvenci zájmu a nepředpokládá se jeho vliv na další analýzy.



Obrázek 16: Amplifikace úseku V3 – V5 genu pro 16S rRNA, 560 bp

1 – marker; 2 – QDS, 2. den, I. vrstva, 4x ředění; 3 – QDS, 2. den, III. vrstva, 4x ředění; 4 – klasická, 42. den, I. vrstva, 4x ředění; 5 – klasická, 42. den, III. vrstva, 4x ředění; 6 – QDS, 2. den, I. vrstva; 7 – QDS, 2. den, III. vrstva; 8 – klasická, 42. den, I. vrstva; 9 – klasická, 42. den, III. vrstva; 10 – negativní kontrola

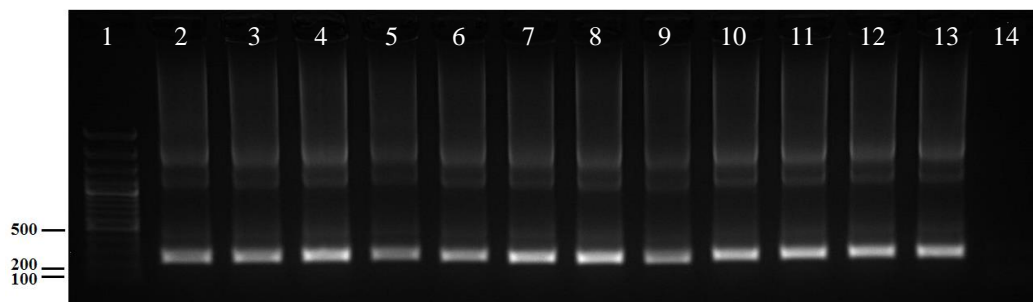
Variabilní oblast V1 byla zahrnuta do úseku o odhadované velikosti kolem 70 bp bez primerů. Tento úsek byl zmnožen za pomoci primerů P1(GC) a P2. Ověření amplifikace v agarózovém gelu předpoklady ohledně velikosti fragmentu potvrdilo (obr. 12). Také v tomto případě byl pozorován signál v negativní kontrole. Podle polohy bandu je však zřejmé, že produkt byl velmi malý, menší než amplifikovaný úsek genu. Lze tedy s jistotou říct, že se opět jednalo o nevyužité primery.



Obrázek 17: Amplifikace úseku V1 genu pro 16S rRNA, 70 bp, klasická výroba, tyče

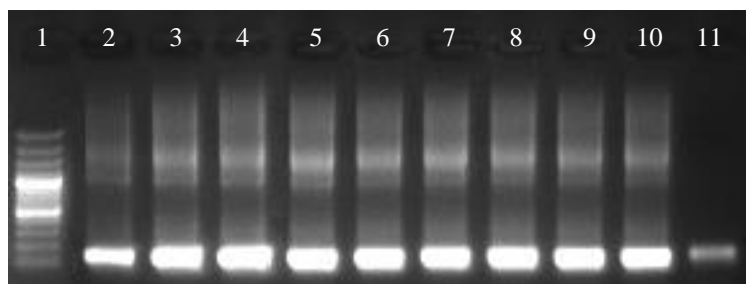
1 – marker; 2 – 3. den, I. vrstva; 3 – 3. den, III. vrstva; 4 – 23. den, I. vrstva; 5 – 23. den, III. vrstva; 6 – 30. den, I. vrstva; 7 – 30. den, III. vrstva; 8 – 42. den, I. vrstva; 9 – 42. den, III. vrstva; 10 – 49. den, I. vrstva; 11 – 49. den, III. vrstva; 12 – 63. den, I. vrstva; 13 – 63. den, III. vrstva; 14 – negativní kontrola

Úsek genu pro 16S rRNA, který obsahuje variabilní oblast V3 a jehož amplifikace byla zprostředkována primery 341f(GC) a 518r má teoretickou velikost přibližně 170 bp. Do této hodnoty nejsou zahrnuty primery. Z obrázku 13 je patrné, že velikost výsledného PCR produktu odpovídala teoretickým předpokladům.



Obrázek 18: Amplifikace úseku V3 genu pro 16S rRNA, 170 bp, klasická výroba, tyče
 1 – marker; 2 – 3. den, I. vrstva; 3 – 3. den, III. vrstva; 4 – 23. den, I. vrstva; 5 – 23. den, III. vrstva; 6 – 30. den, I. vrstva; 7 – 30. den, III. vrstva; 8 – 42. den, I. vrstva; 9 – 42. den, III. vrstva; 10 – 49. den, I. vrstva; 11 – 49. den, III. vrstva; 12 – 63. den, I. vrstva; 13 – 63. den, III. vrstva; 14 – negativní kontrola

Práce s DNA vyžaduje přijetí řady preventivních opatření zajišťujících přesné a spolehlivé výsledky a vylučujících neočekávané pásy, které mohou zpochybňovat data. Přítomnost těchto pásů může být důsledkem kontaminace jedné či vícero komponent reakční směsi pro PCR cizorodou DNA. Nejčastějšími zdroji těchto nežádoucích nukleových kyselin jsou jiné vzorky v laboratoři nebo samotní pracovníci manipulující se vzorky DNA [119]. Na obrázku 14 lze vidět, jak se taková kontaminace projeví při elektroforéze. V 11. jamce obsahující kontrolní vzorek je jasně viditelný proužek o velikosti mezi 100 a 200 bp. V tomto případě už nelze signál považovat za zbytkové primery.



Obrázek 19: Amplifikace úseku V3 genu pro 16S rRNA, 170 bp, QDS výroba - kontaminace

1 – marker; 2 – 2. den, I. vrstva; 3 – 2. den, III. vrstva; 4 – 16. den, I. vrstva; 5 – 16. den, III. vrstva; 6 – 16. den, plátky; 7 – 23. den, plátky; 8 – 37. den, plátky; 9 – 44. den, plátky; 10 – 58. den, plátky; 11 – negativní kontrola, kontaminace

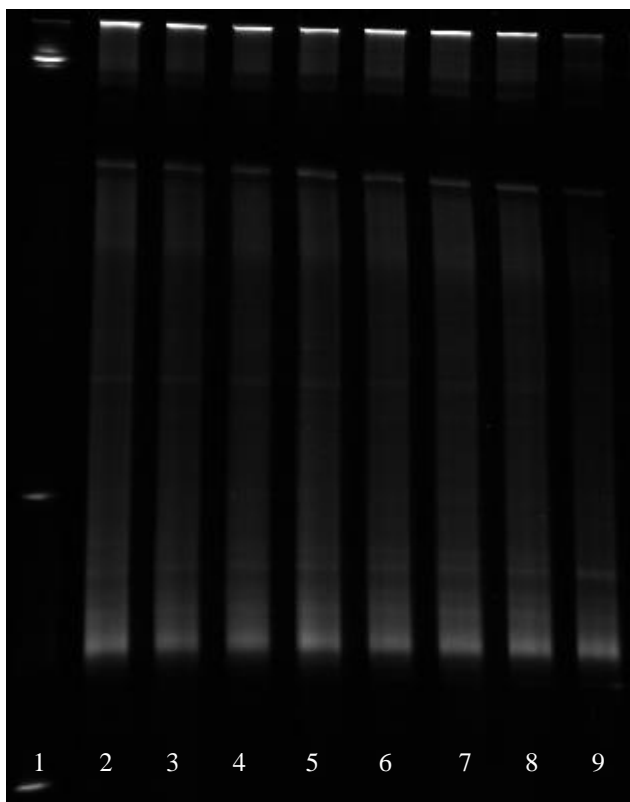
Jedním z nejúčinnějších ochranných opatření před kontaminací vzorků je prostorové oddělení předamplifikačních kroků (izolace DNA a příprava reakční směsi) od kroků postamplifikačních (gelová elektroforéza a dokumentace) [119]. Z důvodů prostorového řešení a pracovního vytížení laboratoře však nebylo možné tyto požadavky vždy dodržet, a proto alespoň příprava reakční směsi i jednotlivých komponent probíhala v ochranném boxu, který byl dekontaminován UV zářením.

Všechny amplifikační reakce poskytly PCR produkty o velmi uspokojivé koncentraci. Úspěšnost PCR byla tedy 100%. PCR produkty z 2. amplifikačního kroku vykazující dobrou kvalitu byly použity k optimalizaci DGGE a následně také k vlastnímu stanovení mikrobiální diverzity FMV.

7.2.3 Optimalizace techniky PCR-DGGE

Optimalizace podmínek DGGE byla zpočátku zaměřena pouze na hledání nejvýhodnějšího gradientu denaturačních činidel pro úsek DNA, který zahrnoval variabilní oblasti V3 – V5 genu pro 16 S rRNA. Jak již bylo avizováno v kapitole 6.4.6, tento úsek je v současnosti využíván na Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí ke sledování mikrobiální populace ve vzorcích z životního prostředí. Při těchto aplikacích se osvědčila kombinace zmiňovaného úseku s denaturačním gradientem 40/60 % a proto byly právě tyto podmínky zvoleny jako výchozí pro studium mikroflóry salámu Paprikáš. Na tomto místě je vhodné zdůraznit, že tato práce je vůbec první prací prováděnou na půdě Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která se zabývá studiem mikroflóry potravin metodou DGGE.

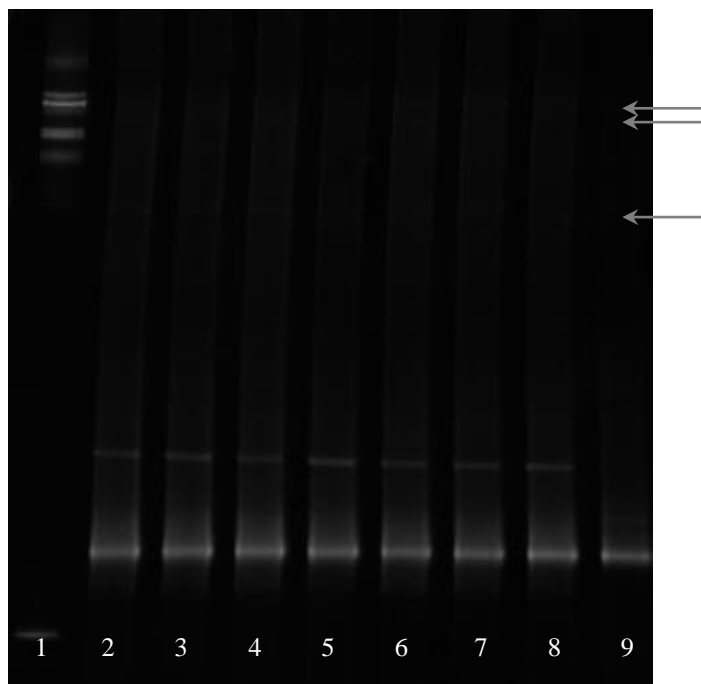
Otestování koncentračního gradientu denaturačních činidel 40/60 % pro úsek V3 – V5 ze vzorků salámů ukázalo, že tyto podmínky DGGE nebudou pro analýzu mikroflóry tak složité matrice, jakou jsou právě vzorky potravin, úplně ideální. Účinnost separace znázorňuje obrázek 15, na kterém je fotografie obarveného a prosvíceného gelu. Na fotografii lze vidět několik proužků, které reprezentují určité mikroorganismy. Celkově však byly bandy neostré, a to i když byly použity primery s GC svorkou, čerstvě připravené denaturační roztoky i 10% roztok APS a reakce probíhala v čerstvě připraveném pufru. Navíc je vysoce pravděpodobné, že neostrý signál znemožňoval vizualizaci dalších potenciálně přítomných bandů. Pro ověření byla tato zkouška provedena ještě jednou, avšak bez známek jakéhokoli zlepšení.



Obrázek 20: DGGE – úsek V3 – V5 genu pro 16S rRNA, gradient 40/60 %

1 – marker; 2 – QDS, 2. den, I. vrstva, 4x ředění; 3 – QDS, 2. den, III. vrstva, 4x ředění; 4 – klasická, 42. den, I. vrstva, 4x ředění; 5 – klasická, 42. den, III. vrstva, 4x ředění; 6 – QDS, 2. den, I. vrstva; 7 – QDS, 2. den, III. vrstva; 8 – klasická, 42. den, I. vrstva; 9 – klasická, 42. den, III. vrstva

S vidinou příznivějšího výsledku byl úsek V3 – V5 separován na gelu s denaturačním gradientem nejprve 30/70 % a následně 20/80 %. Výsledky z obou stanovení si byly velmi podobné, a proto je na následujícím obrázku znázorněna fotografie pouze gelu s denaturačním gradientem 30/70 %. Na této fotografii jsou dobře vidět dva silné signály ve spodní části gelu. V horní části gelu se v místě šipek ještě rýsují tři velmi slabé proužky. Ve výsledku by to znamenalo, že se v masném výrobku vyskytovalo pouze pět mikroorganismů.

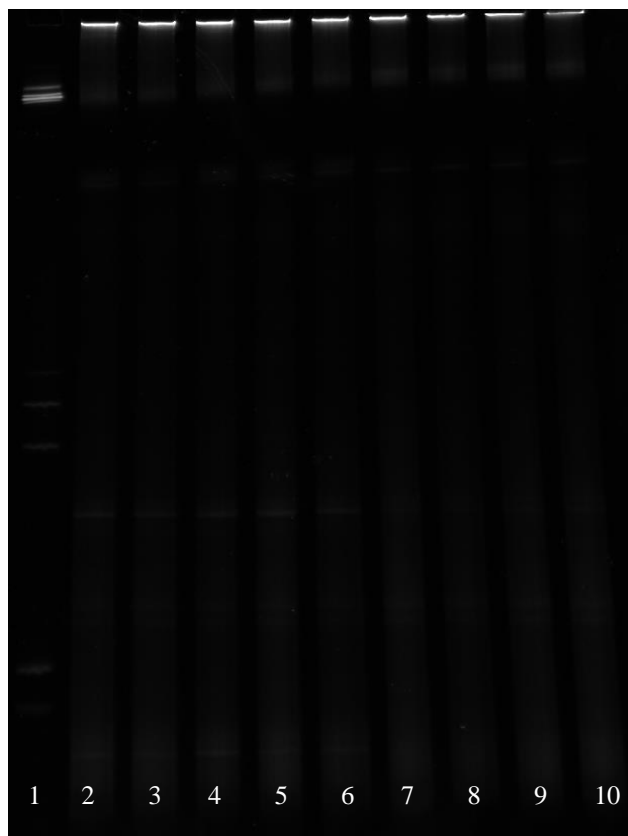


Obrázek 21: DGGE – úsek V3 – V5 genu pro 16S rRNA, gradient 30/70%

1 – marker; 2 – QDS, 2. den, I. vrstva, 4x ředěné; 3 – QDS, 2. den, III. vrstva, 4x ředěné; 4 – klasická, 42. den, I. vrstva, 4x ředěné; 5 – klasická, 42. den, III. vrstva, 4x ředěné; 6 – QDS, 2. den, I. vrstva; 7 – QDS, 2. den, III. vrstva; 8 – klasická, 42. den, I. vrstva; 9 – klasická, 42. den, III. vrstva

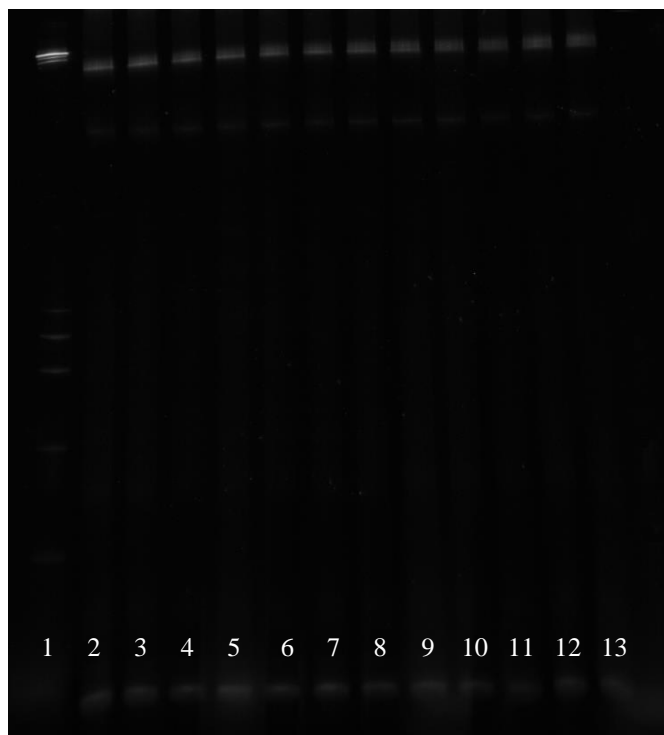
Gradient 20/80 % vykazoval zatím nejhorší separaci fragmentů DNA ze všech provedených měření. Na gelu byl pozorován jeden intenzivní proužek v nejspodnější části gelu, ve stejné poloze v jaké je poslední proužek na obrázku 16. Dále na tomto gelu byl viděn nepatrný náznak dalšího bandu, a sice v poloze předposledního proužku na gelu s gradientem 30/70 %. Dohromady tedy pouze dva signály.

Testování dalšího gradientu denaturačních činidel (30/60 %) probíhalo v době, kdy se uvažovalo nad zaměřením se na jiné úseky genu pro 16S rRNA. I když byla separace úseku V3 – V5 při gradientu 30/60 % doposud nejspokojivější (viz obr. 17), byly pro další optimalizaci DGGE vybrány dva zcela nové úseky genu. První úsek zahrnoval V1 variabilní oblast genu, druhý úsek V3 oblast. Volba těchto úseků vycházela ze studie od Kesmena et al. [109], kteří pomocí nich dokázali identifikovat na 13 druhů mikroorganismů v salámech Sucuk. Rovněž hodnoty koncentračního gradientu denaturačních činidel byly převzaty z této studie.



Obrázek 22: DGGE – úsek V3 – V5 genu pro 16S rRNA, gradient 30/60%
1 – marker; 2 – klasická, 23. den, plátky; 3 – klasická, 30. den, plátky; 4 – klasická, 42. den, plátky; 5 – klasická, 49. den, plátky; 6 – klasická, 63. den, plátky; 7 – QDS, 2. den, I. vrstva; 8 – QDS, 2. den, III. vrstva; 9 – klasická, 42. den, I. vrstva; 10 – klasická, 42. den, III. vrstva

Zkušební stanovení s úsekem V1 při denaturačním gradientu 30/50 % prokázalo vhodnost těchto podmínek pro další analýzu. Rozdělení úseku V3 bylo nejprve testováno při gradientu 15/55%, který použili Kesmen et al. [109]. Výsledek však nebyl uspokojivý. Jednotlivé signály vzájemně splývaly a nebylo možné určit přesnou polohu bandů. Stanovení tedy bylo provedeno opakovaně, a sice s gradientem 30/50 %. Tato cesta se však ukázala jako nesprávná, což dokazuje obrázek 18.



Obrázek 23: DGGE – úsek V3 genu pro 16S rRNA, gradient 30/50%
1 – marker; 2 – 13 – klasická výroba, tyče, v chronologickém pořadí od 3. do 63. dne, I. a III. vrst-
va

Nové stanovení s úsekem V3 při denaturačním gradientu 15/55 % poskytlo dobrý výsledek a na základě toho byla optimalizace podmínek DGGE ukončena. Účinnost vybraných podmínek při separaci fragmentů DNA je možno vidět na obrázcích v následující kapitole. Nejčastějším problémem, který doprovázel většinu stanovení, byla nízká světelná intenzita bandů na gelu. V některých případech musely být proužky na fotografiích dodatečně vyznačeny. Objem dávkovaného vzorku byl však podle Summera et al. [120] spíše nadstandardní. Podle nich je optimální objem vzorku, který zajistí ostrost proužků na gelu, 1 – 5 μ l. To by ale v našem případě mohlo znamenat ještě horší viditelnost bandů. Za vyzkoušení by také rozhodně stálo použití jiné techniky barvení gelu. Kromě barviva GelRed Nucleic Acid Gel Stain lze k barvení gelu použít také EtBr. Green [121] však toto barvivo nedoporučuje nejen z důvodu jeho vysoké toxicity, ale také pro jeho nižší citlivost. Naopak velmi kvalitních výsledků bylo dosaženo při barvení gelu stříbrem [122]. Jednou z výhod tohoto způsobu barvení je také vyšší odolnost signálů vůči degradaci účinkem UV záření. Na druhou stranu, ani barvení stříbrem není úplně bezproblémové. Existují jistá omezení týkající se extrakce DNA z gelu a její re-amplifikace [121].

Vysoce pravděpodobnou příčinou problémů s intenzitou signálu mohla být také retence DNA v jamkách gelu. Tento jev lze vidět například na obrázcích 15 a 17. Odborníci

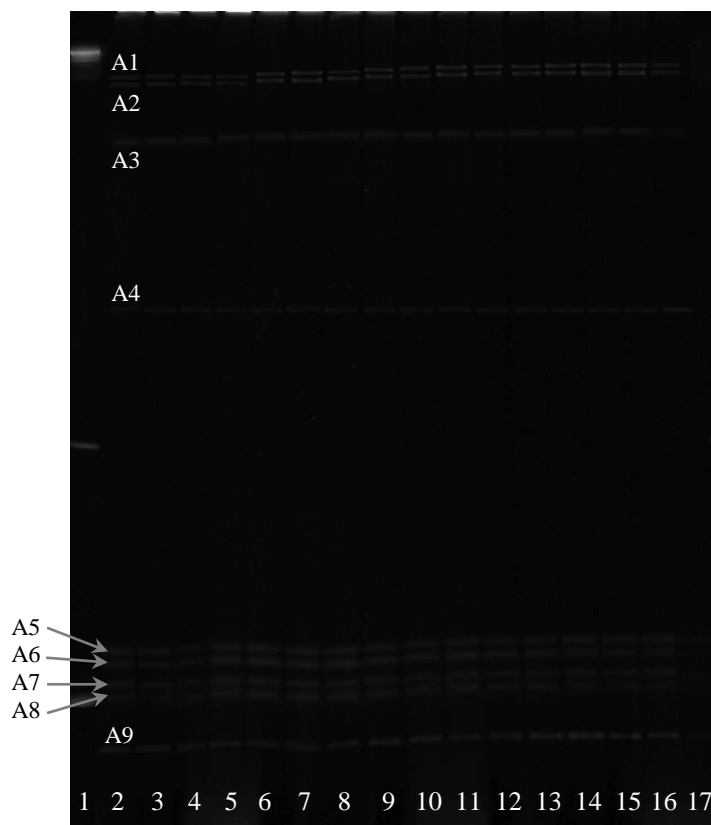
v těchto případech radí snížit koncentraci polyakrylamidového gelu. Amplikony mohou být totiž příliš velké a proto nezajíždějí do příliš koncentrovaného gelu [123, 124]. Původem zadržování DNA v jamkách může být také nedokonalé vyčištění jamek od nezpolymerizovaného roztoku [123]. Tento faktor lze však v našem případě zavrhnout, protože promývání jamek byla věnována mimořádná péče. Zamyslet by se také dalo nad velikostí elektrického napětí a době průběhu elektroforézy. Obecně platí, že delší doba průběhu DGGE při současném nízkém napětí poskytuje kvalitnější gely. Při volbě správného napětí je však nutné zohlednit i řadu dalších kritérií, jako je velikost PCR produktu, koncentrace a teplota pufru a koncentrace polyakrylamidového gelu [121]. Každopádně faktorů ovlivňujících průběh DGGE je celá řada a zcela přesahují rozsah této práce.

7.2.4 Stanovení mikroflóry fermentovaného masného výrobku metodou DGGE

Ke zhodnocení mikrobiální diverzity salámů Paprikáš metodou DGGE byly na základě výsledků optimalizace vybrány dva úseky genu pro 16S rRNA, a sice úsek zahrnující variabilní oblast V1 v kombinaci s gradientem denaturačních činidel 30/50 % a úsek zahrnující oblast V3 spolu s denaturačním gradientem 15/55%.

Mikrobiální diverzitu salámů znázorňují obrázky 19 až 22. Na těchto obrázcích jsou vždy označeny bandy, které byly z gelu vyříznuty a dále upravovány pro potřeby sekvenace. Pro snazší identifikaci výsledků byly jednotlivé gely označeny velkými písmeny v abecedním pořadí.

Gel A na obrázku 19 představuje rozdělení V1 regionu genu pro 16S rRNA ze vzorků salámů vyrobených klasickou technologií. Na gelu byly současně analyzovány salámy v tyčích (jamka 2 – 12) i v plátcích (jamka 13 – 17). U každého vzorku bylo zaznamenáno deset signálů. Poloha těchto signálů se u všech vzorků shodovala.

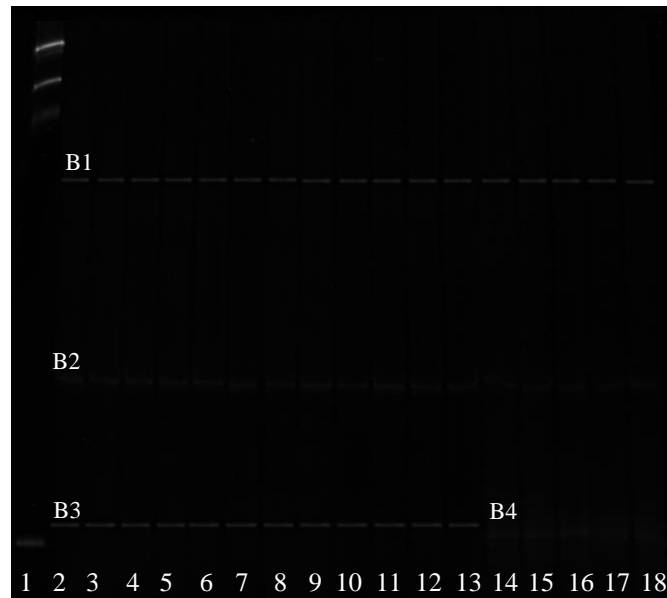


Obrázek 24: Gel A – úsek V1 genu pro 16S rRNA, gradient 30/50 %, klasická výroba
 1 – marker; 2 – 3. den, I. vrstva; 3 – 3. den, III. vrstva; 4 – 23. den, I. vrstva; 5 – 23. den, III. vrstva; 6 – 30. den, I. vrstva; 7 – 30. den, III. vrstva; 8 – 42. den, I. vrstva; 9 – 42. den, III. vrstva; 10 – 49. den, I. vrstva; 11 – 49. den, III. vrstva; 12 – 63. den, I. vrstva; 13 – 23. den, plátky; 14 – 30. den, plátky; 15 – 42. den, plátky; 16 – 49. den, plátky; 17 – 63. den, plátky

Sekvenací zjištěná pořadí bází byla v databázi BLAST přiřazena k *Lb. fuchuensis* (A6), *Lb. sakei* subsp. *sakei* (A7) a *Lb. sakei* (A8). Sekvence DNA izolované z bandů A2, A4 a A5 vykazovaly stejnou shodu s DNA dvou úzce příbuzných bakterií – *Lb. curvatus* a *Lb. sakei*. Také *Lb. fuchuensis* je fylogeneticky velice blízký *Lb. curvatus* a *Lb. sakei*. Tato bakterie byla popsána teprve v roce 2002, poté co byla izolována z vakuově baleného hovězího masa [125]. Vzorky A1, A3 a A9 se nepodařilo přiřadit k žádným známým bakteriálním druhům.

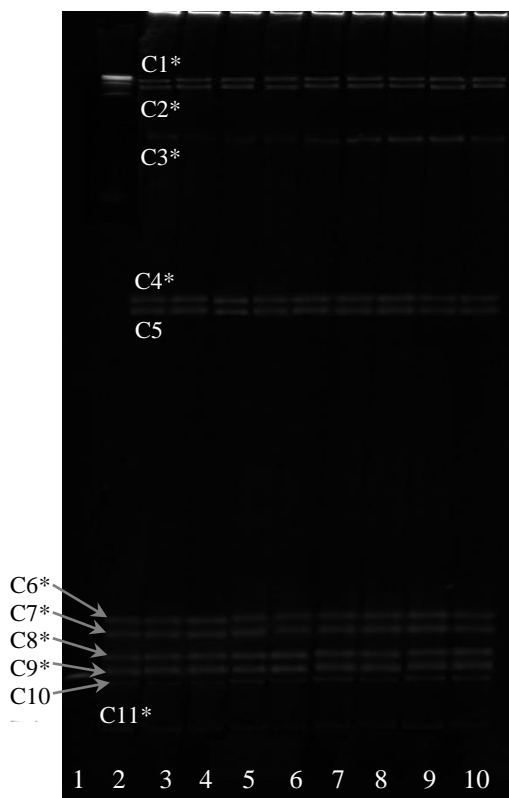
Rozdělením úseku V3 sledovaného genu na polyakrylamidovém gelu byly v salámech vyrobených klasickou technologií vizualizovány vždy tři proužky u každého vzorku. Poloha dvou signálů byla u salámů v tyčích i plátcích shodná. Konkrétně se jednalo o bandy B1 a B2. Vzorek B2 byl identifikován jako *Lb. sanfranciscensis*. U vzorku B1 nebylo možné jednoznačně určit, zda se jedná o *Lb. curvatus* nebo *Lb. sakei*. Lokalizace zbývajících signálů poukázala na drobné rozdíly v mikroflóře salámů v tyčích a v plátcích balených v modifikované atmosféře. V tyčových salámech byl detekován *Lb. delbrueckii* (B3).

V plátcích se však jeho přítomnost nepodařila prokázat. Zde byl naopak nalezen další zástupce *Lb. sakei* nebo *Lb. curvatus* (B4).



Obrázek 25: Gel B – úsek V3 genu pro 16S rRNA, gradient 15/55 %, klasická výroba
 1 – marker; 2 – 3. den, I. vrstva; 3 – 3. den, III. vrstva; 4 – 23. den, I. vrstva; 5 – 23. den, III. vrstva; 6 – 30. den, I. vrstva; 7 – 30. den, III. vrstva; 8 – 42. den, I. vrstva; 9 – 42. den, III. vrstva; 10 – 49. den, I. vrstva; 11 – 49. den, III. vrstva; 12 – 63. den, I. vrstva; 13 – 63. den, III. vrstva; 14 – 23. den, plátky; 15 – 30. den, plátky; 16 – 42. den, plátky; 17 – 49. den, plátky; 18 – 63. den, plátky

Mikrobiální diverzitu salámů podrobených QDS procesu znázorňují fotografie gelů C a D. Úsek V1 byl pomocí DGGE rozdělen na 11 samostatných proužků. Devět z nich se svou polohou shodovalo se signály zjištěnými u salámů vyrobených klasickou technologií, a proto byly na obrázku 21 označeny hvězdičkou (*).



Obrázek 26: Gel C - úsek V1 genu pro 16S rRNA, gradient 30/50 %, QDS výroba
 1 – marker; 2 – 2. den, I. vrstva; 3 – 2. den, III. vrstva; 4 – 16. den, I. vrstva; 5 – 16. den, III. vrstva; 6 – 16. den, plátky; 7 – 23. den, plátky; 8 – 37. den, plátky; 9 – 44. den, plátky; 10 – 58. den, plátky

Sekvenace DNA získané z gelu C prokázala přítomnost *Lb. fuchuensis* (C7*), *Lb. sakei* subsp. *sakei* (C8*) a *Lb. sakei* (C9*) ve výrobcích zpracovaných QDS technologií stejně jako v salámech klasické výroby. Vzorky C2*, C4* a C6* opět vykazovaly shodu s *Lb. curvatus* i *Lb. sakei*. Proces QDS navíc umožnil přežití dalšího kmene *Lb. sakei* subsp. *sakei* (C10). Proužek označený jako C5 rovněž patřil některému zástupci rodu *Lactobacillus*. Zbývající tři signály (C1*, C3* a C11*) se nepodařilo přiřadit k žádným známým mikroorganismům.

Na gelu D, který představuje rozdělení úseku V3 pro salámy QDS výroby, byly nalezeny tři proužky v každé jamce. Signál D1 byl ve stejné poloze jako proužek B1 na gelu B. Podle výsledků sekvenace by se v obou případech mohlo jednat o tutéž bakterii, a to o *Lb. sakei* nebo *Lb. curvatus*. Také proužek D2 byl ve stejné poloze jako proužek B2. I v tomto případě byla zjištěna shoda s *Lb. sanfranciscensis*. V salámech QDS výroby byla pomocí úseku V3 zaznamenána také přítomnost *Lb. sakei* subsp. *sakei* (D3).



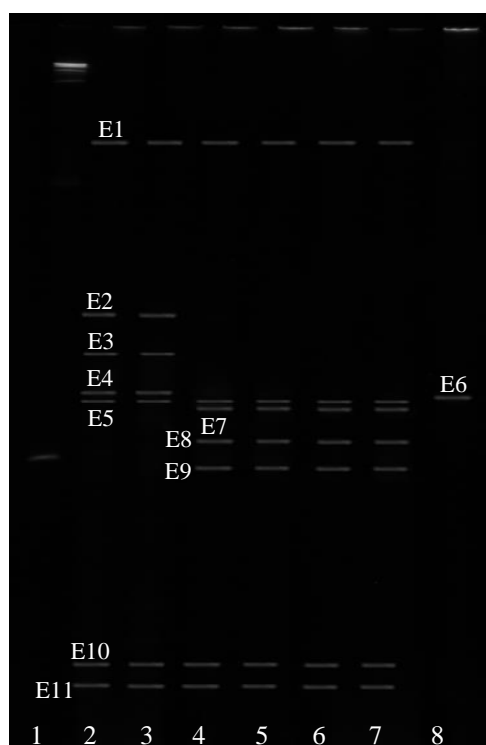
Obrázek 27: Gel D - úsek V3 genu pro 16S rRNA, gradient 15/55 %, QDS výroba
 1 – marker; 2 – 2. den, I. vrstva; 3 – 2. den, III. vrstva; 4 – 16. den, I. vrstva; 5 – 16. den, III. vrstva; 6 – 16. den, plátky; 7 – 23. den, plátky; 8 – 37. den, plátky; 9 – 44. den, plátky; 10 – 58. den, plátky

Z výsledků sekvenace je zřejmé, že mikroflóra fermentovaných salámů Paprikáš je tvořena především zástupci rodu *Lactobacillus*, přičemž nejčastěji identifikovanými druhy byly *Lb. sakei* a *Lb. curvatus* stejně jako tomu bylo u FMV v řadě předchozích studií [60, 81, 82, 108, 109]. Zajímavé je, že nebyli nalezeni žádní zástupci mléčných koků, a to i když byly podle kultivačního stanovení v početní převaze. Ke stejnému výsledku však dospěli také Kesmen et al. [109], kteří pracovali se stejnými úseky genu. To v jiných FMV vyrobených ve Španělsku se podařilo identifikovat hned několik druhů z této skupiny bakterií, a sice *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis* a *Pediococcus acidilactici*. Detekce těchto bakterií byla totiž založena na použití jiných dvojic primerů, než jaké byly použity v této práci [126]. Velmi překvapující je skutečnost, že se nepodařilo identifikovat žádné CNS v salámech Paprikáš. K prokázání jejich přítomnosti měl posloužit především V3 region [109].

Popis mikroflóry FMV nemůže být úplný bez znalosti původu mikroorganismů v nich přítomných. Z tohoto důvodu bylo sledováno druhové zastoupení mikroorganismů také v koření, díle a kultuře. I v tomto případě byly připraveny PCR produkty obsahující V1

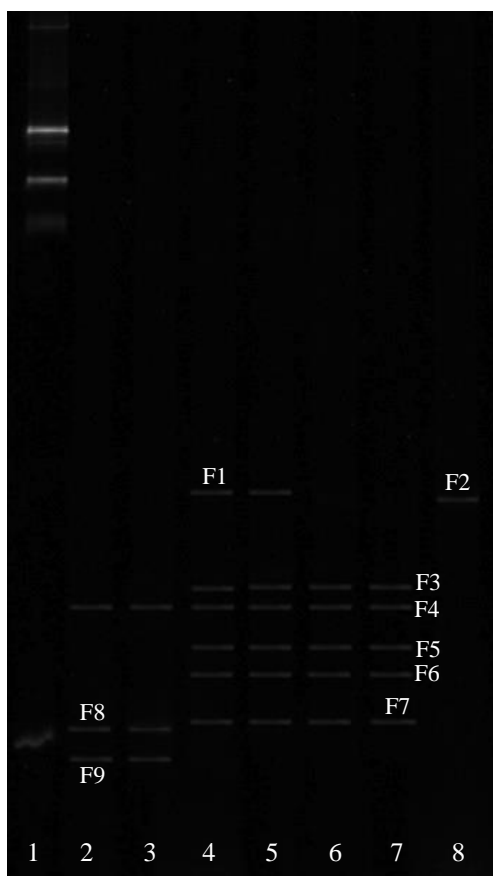
a V3 variabilní oblasti genu pro 16S rRNA, které byly podrobeny DGGE za stejných podmínek jako tomu bylo u vzorků salámů. Vyfocené gely byly označeny písmeny E a F.

Na gelu E (obrázek 23) představujícím rozdělení úseku V1 pro vzorky koření, díla a kultury je znázorněno celkem 11 různých signálů, které byly z gelu vyříznuty a sekvenovány. Identifikovat se však podařilo pouze dva z nich. Proužek E6 byl jediným signálem v jamce s kulturou (jamka 8). Na základě sekvenace byl tento signál přiřazen k *Lb. sakei* subsp. *sakei*, který byl přítomen také v hotových výrobcích. Druhým identifikovaným signálem byl proužek E5, který se vyskytoval u vzorků koření i díla a který patřil *Lb. curvatus* nebo *Lb. sakei*. Podle jeho polohy lze navíc usuzovat na souvislost s bandy C6* a A5.



Obrázek 28: Gel E – úsek V1 genu pro 16S rRNA, gradient 30/50%, koření, dílo, kultura
1 – marker; 2 – koření 1; 3 – koření 2; 4 – dílo 2/a; 5 – dílo 2/b; 6 – dílo 1/a; 7 – dílo 1/b; 8 – kultura

Sekvenace DNA extrahované z gelu F poskytla oproti předchozímu stanovení mnohem uspokojivější výsledky. V koření (jamka 2 a 3 na obrázku 24) byly nalezeny bakterie *Weissella confusa* (F8), *Enterococcus faecium* (E9) a *Pseudomonas* sp. (F4). Výskyt enterokoků a *Pseudomonas* sp. v koření je poměrně častý [26, 127]. *W. confusa* se může vyskytovat také ve fermentovaných potravinách a byla dokonce navržena jako probiotikum. Některé zdroje však uvádí, že se jedná o potenciálně patogenní bakterii způsobující sepsi a další infekční onemocnění u lidí a zvířat [128].



Obrázek 29: Gel F – úsek V3 genu pro 16S rRNA, gradient 15/55 %, koření, dílo, kultura
1 – marker; 2 – koření 1; 3 – koření 2; 4 – dílo 2/a; 5 – dílo 2/b; 6 – dílo 1/a; 7 – dílo 1/b; 8 – kul-
tura

Mikroflóra díla byla oproti koření mnohem pestřejší. Nejčastěji identifikovanými mikroorganismy byly pseudomonády. *Pseudomonas* sp. pocházela z koření (F4) i z další suroviny, která byla součástí díla (F5). *Ps. aeruginosa* (F3) pocházela pravděpodobně přímo z masové složky. Jedná se o jednu z nejčastěji izolovaných bakterií z masa podílející se na jeho kažení [129]. V díle se dále vyskytovaly *Pediococcus* sp. (F6) a *Brochothrix thermosphacta* (F7). Také *Brochothrix thermosphacta* je jednou z bakterií zodpovědnou za kažení masa a masných výrobků. Má velice blízko k rodům *Lactobacillus* a *Listeria*, je fakultativně anaerobní, halotolerantní a acidotolerantní [130]. Nejednou byla zaznamenána její přítomnost také ve FMV [108, 109]. V salámech Paprikáš však nalezena nebyla. Posledním izolátem z díla byl nekultivovatelný druh *Bacillus* sp. (F1). Jeho přítomnost byla zjištěna pouze u díla pro QDS výrobu. Kultura na gelu E poskytla pouze jeden proužek (F2). V databázi BLAST byla sekvence přiřazena ke *Corynebacterium kroppenstedtii* s pravděpodobností 92 %. Tato bakterie se vyskytuje mimo jiné v hnisajících ránách a není tedy představitelné, že by se používala jako startovací kultura do FMV [131]. Jednalo se tedy o chybnou identifikaci.

Celkově se podařilo stanovit 6 různých druhů a poddruhů laktobacilů v tyčových salámech klasické výroby a 5 v salámech v plátcích. Stejných pět druhů a poddruhů bylo zaznamenáno také u salámů vyrobených QDS technologií. *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* obsažený ve startovací kultuře se promítnul do mikroflóry všech salámů. Izolát identifikovaný jako *Lb. sakei* nebo *Lb. curvatus* vyskytující se v salámech obou výrob pravděpodobně pocházel z koření. Žádný další mikroorganismus nalezený ve výchozích surovinách nebyl v salámech stanoven. Původ v salámech přítomných *Lb. fuchuensis*, *Lb. sanfranciscensis* a *Lb. delbrueckii* se nepodařilo objasnit. Výskyt koaguláza negativních stafylokoků nebo mléčných koků se pomocí techniky PCR-DGGE nepodařila prokázat v žádném vzorku Paprikáše. Pro budoucí studie lze doporučit doplnit stanovení mikroflóry FMV o další úseky genu pro 16S rRNA.

ZÁVĚR

Výroba fermentovaných masných výrobků (FMV) je rozhodně jednou z nejzajímavějších a zároveň nejsložitějších technologií masného průmyslu. Úspěšnost výroby závisí především na kvalitě surovin a řízení zracích podmínek ovlivňujících vývoj mikroflóry FMV.

Klasické kultivační techniky v kombinaci s metodami molekulární biologie mohou poskytnout široký obraz o struktuře a vývoji mikroflóry FMV. Pěstováním mikroorganismů na živných půdách lze především odhadnout dynamiku jejich růstu a reakce na měnící se životní podmínky, čehož bylo využito i v této práci ke sledování vývoje počtu mikroorganismů v salámech Paprikáš. Bylo prokázáno, že bakterie mléčného kvašení jsou dominantními mikroorganismy v Paprikáši po celou dobu zrání. Jejich dominance přetrvává také během skladování. Růst mikroorganismů probíhá v salámech v období fermentace a zrání stejnoměrně. Během skladování salámů vyrobených klasickou technologií však dochází k odumírání bakterií v důsledku vyčerpání živin. Balení salámů v ochranné atmosféře může tyto procesy zpomalit. V salámech vyrobených speciální technologií Quick-Dry-Slice (ODS) reagovaly mikroorganismy na specifické podmínky této výroby nižší aktivitou, což mělo za následek prodloužení jejich životaschopnosti až do konce skladování.

Přesná identifikace mikroorganismů kultivačními metodami bývá poměrně obtížná a často nepřesná. Z tohoto důvodu bylo k popisu mikroflóry Paprikáše využito také techniky denaturační gradientové gelové elektroforézy. Úskalím této techniky je závislost účinnosti separace na mnoha faktorech a proto je nezbytné její parametry nastavit pro každou matici přesně na míru. V rámci této práce se podařilo optimalizovat metodiku izolace bakteriální DNA z FMV, která zajistila získání dostatečného množství DNA o vysoké čistotě. Dále byly nalezeny dva fragmenty genu pro 16S rRNA a k nim neoptimálnější gradienty denaturačních činidel, kterými bylo stanoveno na 6 druhů a poddruhů laktobacilů v salámech, z nichž 5 bylo společných pro výrobky klasické i ODS technologie. Mikroflóra surovin byla tvořena převážně mikroorganismy způsobujícími kažení masa a masných výrobků a potenciálně patogenními bakteriemi. V konečných produktech však byly všechny nežádoucí mikroorganismy pod úrovní detekce.

Veškeré poznatky uvedené v této práci mohou posloužit jako východisko při navrhování postupů dalších vědeckých prací zaměřených na sledování mikroflóry fermentovaných potravin.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] COUNCIL, E. U. Regulation (EC) No 853/2004 of the European parliament and of the council of 29 April 2004 laying down specific hygiene rules for food of animal origin. *Official Journal of the European Communities*, 2004.
- [2] Ministerstvo zemědělství České republiky. Vyhláška č. 69/2016 ze dne 17. února 2016 o požadavcích na maso, masné výrobky, produkty rybolovu a akvakultury a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich. *Sbírka zákonů ČR*, 2016.
- [3] KAMENÍK, Josef; JANŠTOVÁ, Bohumíra; SALÁKOVÁ, Alena. *Technologie a hygiena potravin živočišného původu*. 1st ed. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014, 199.
- [4] HONIKEL, Karl-Otto. Vom Fleisch zum Produkt; Reifen-Erhitzen-Zerkleinern-Salzen. *Mitteilungsblatt BAFF*, 2004, 43.163: 1-9.
- [5] YILMAZ, Ismail; VELIOGLU, Murat. Fermented meat products. In: YILMAZ, Ismail. *Quality of Meat and Meat Products*. Indie: Transworld Research Network, 2009, 1-16.
- [6] KAMENÍK, Josef. *Hygiena a technologie masa: trvanlivé masné výrobky*. 1st ed. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012, 117.
- [7] HECHELMANN, H. Mikrobiell verursachte Fehlfabrikate bei Rohwurst und Rohschinken. *Fleischwirtschaft*, 1986, 66: 515-528.
- [8] FEINER, G. *Meat products handbook. Practical science and technology*. Woodhead USA: Publishing Limited and CRC Press LLC, 2008, 648.
- [9] KAMENÍK, J. Řízení rizik při výrobě trvanlivých fermentovaných salámů. *Maso*, 2009, 20.5: 6 – 10.
- [10] ZAKPAA, H. D., et al. Microbial characterization of fermented meat products on some selected markets in the Kumasi metropolis, Ghana. *African Journal of Food Science*, 2009, 3.11: 340-346.
- [11] DI CAGNO, Raffaella, et al. Comparison of the compositional, microbiological, biochemical and volatile profile characteristics of three Italian PDO fermented sausages. *Meat Science*, 2008, 79.2: 224-235.
- [12] KEIM, Heinrich; FRANKE, Ralf. *Fachwissen Fleischtechnologie*. 13th ed. Auflage: *Deutscher Fachverlag*, 2007. 481.

- [13] STIEBING, A. *Qualitätssicherung bei der Rohwurstherstellung – HACCP*; 1. Stuttgarter Rohwurstforum. Stuttgart: Gewürmüller GmbH, 1994, 77 – 97.
- [14] JOSQUIN, Nicole M.; LINNSEN, Jozef PH; HOUBEN, Jacques H. Quality characteristics of Dutch-style fermented sausages manufactured with partial replacement of pork back-fat with pure, pre-emulsified or encapsulated fish oil. *Meat Science*, 2012, 90.1: 81-86.
- [15] PELSER, W. Meindert, et al. Lipid oxidation in n-3 fatty acid enriched Dutch style fermented sausages. *Meat Science*, 2007, 75.1: 1-11.
- [16] VALENCIA, Idoia; ANSORENA, Diana; ASTIASARAN, Iciar. Stability of linseed oil and antioxidants containing dry fermented sausages: A study of the lipid fraction during different storage conditions. *Meat Science*, 2006, 73.2: 269-277.
- [17] JIRA, W. Chemische Vorgänge beim Pökeln und Räuchern. *Fleischwirtschaft*, 2004, 84.6: 107-108.
- [18] KATINA, Jan. *Dusitany a masné výrobky*. In: Český svaz zpracovatelů masa [online]. ČSZM 2009, [cit. 28_1_2016]. Dostupné z: <http://www.cszm.cz/clanek.asp?typ=5&id=1136>
- [19] HONIKEL, Karl-Otto. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*, 2008, 78.1: 68-76.
- [20] EU COMMISSION, et al. Commission Regulation (EU) No 1129/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives. *Official Journal of the European Union L*, 2011, 295.4: 12.11.
- [21] RUIZ, Jorge. Ingredients. In: TOLDRÁ, Fidel; associate editors, HUI, Y. H.... [et al.]. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 1st ed. USA: Blackwell Publishing, 2007, 59-76.
- [22] CHI, Suey-Ping; WU, Yun-Chu. Spices and seasonings. In: TOLDRÁ, Fidel; associate editors, HUI, Y. H.... [et al.]. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 1st ed. USA: Blackwell Publishing, 2007, 87-100.
- [23] OCKERMAN, Herbert W.; BASU, Lopa. Production and consumption of fermented meat products. In: TOLDRÁ, Fidel; associate editors, HUI, Y. H.... [et al.]. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 1st ed. USA: Blackwell Publishing, 2007, 9-15.

- [24] RONCALÉS, Pedro. Additives. In: TOLDRÁ, Fidel; associate editors, HUI, Y. H.... [et al.]. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 1st ed. USA: Blackwell Publishing, 2007, 69-77.
- [25] BAČÁK, Martin. Koření a jeho průmyslové alternativy. *Potravinářská revue*, 2011, 3: 68-69.
- [26] WITKOWSKA, Anna M., et al. The microbiological quality of commercial herb and spice preparations used in the formulation of a chicken supreme ready meal and microbial survival following a simulated industrial heating process. *Food Control*, 2011, 22.3: 616-625.
- [27] KONG, Weijun, et al. Occurrence of toxigenic fungi and determination of mycotoxins by HPLC-FLD in functional foods and spices in China markets. *Food Chemistry*, 2014, 146: 320-326.
- [28] DEMEYER, Daniel. Meat Fermentation: Principles and Applications. In: HUI, Y. H; associate editors, CASTELL-REREZ, E.... [et al.]. *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering*. 3 vol. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2006, 149.
- [29] RUST, R. U.S. products. In: TOLDRÁ, Fidel; associate editors, HUI, Y. H.... [et al.]. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 1st ed. USA: Blackwell Publishing, 2007, 303-306.
- [30] TABANELLI, Giulia, et al. Effects of starter cultures and fermentation climate on the properties of two types of typical Italian dry fermented sausages produced under industrial conditions. *Food Control*, 2012, 26.2: 416-426.
- [31] COCCONCELLI, Pier Sandro. Starter Cultures: Bacteria. In: TOLDRÁ, Fidel; associate editors, HUI, Y. H.... [et al.]. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 1st ed. USA: Blackwell Publishing, 2007, 137-146.
- [32] SELGAS, M-Dolores; GARCIA, M-Luisa. Starter Cultures: Yeasts. In: TOLDRÁ, Fidel; associate editors, HUI, Y. H.... [et al.]. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 1st ed. USA: Blackwell Publishing, 2007, 159-170.
- [33] SPOTTI, Elisabetta; BERNI, Elettra. Starter Cultures: Molds. In: TOLDRÁ, Fidel; associate editors, HUI, Y. H.... [et al.]. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 1st ed. USA: Blackwell Publishing, 2007, 171-176.

- [34] TOLDRÁ, Fidel. *Dry-cured Meat Products*. Trumbull, Conn.: Food & Nutrition Press, 2002, 244.
- [35] ZANARDI, Emanuela, et al. Lipolysis and lipid oxidation in fermented sausages depending on different processing conditions and different antioxidants. *Meat Science*, 2004, 66.2: 415-423.
- [36] KUMAR, Yogesh, et al. Recent trends in the use of natural antioxidants for meat and meat products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2015, 14.6: 796-812.
- [37] BABUSKIN, S., et al. Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 171: 32-40.
- [38] KURĆUBIĆ, Vladimir S., et al. Antioxidant and antimicrobial activity of *Kitaibelia vitifolia* extract as alternative to the added nitrite in fermented dry sausage. *Meat Science*, 2014, 97.4: 459-467.
- [39] EGBERT, William Russell; PAYNE, C. Tony. Plant proteins. In: TARTÉ, Rodrigo. *Ingredients in Meat Products; Properties, Functionality and Applications*. New York: Springer, 2009, 111-129.
- [40] HEINZ, Gunter; HAUTZINGER, Peter. *Meat Processing Technology for Small to Medium Scale Producers*. FAO, 2009.
- [41] WU, Yun Chu; CHI, Suey Ping; CHRISTIEANS, Souad. Casings. In: TOLDRÁ, Fidel; associate editors, HUI, Y. H... [et al.]. *H Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 1st ed. USA: Blackwell Publishing, 2007, 89-96.
- [42] REBECCHI, Annalisa, et al. High-throughput assessment of bacterial ecology in hog, cow and ovine casings used in sausages production. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 212: 49-59.
- [43] VIGNOLO, Graciela; FONTANA, Cecilia; FADDA, Silvina. Semidry and dry fermented sausages. In: TOLDRÁ, Fidel. *Handbook of Meat Processing*. 1st ed. USA: Blackwell Publishing, 2010, 379-398.
- [44] OSBURN, W.N. Part three: processing systems. *Sausage Technology Journal: Sausage 101 – The National Provisioner*, 2008, STJ-4 – STJ-7.
- [45] HLAVÁČEK, P. Uzavírání masných výrobků do střeva. *Potravinářská revue*, 2015, 3: 20-21.

- [46] MARIANSKI, Stanley; MARIANSKI, Adam. *The Art of Making Fermented Sausages*. 2nd ed. Bookmagic LLC, 2009, 276.
- [47] ZUKÁL, Endre; INCZE, Kálmán. Drying. In: TOLDRÁ, Fidel. *Handbook of Meat Processing*. 1st ed. USA: Blackwell Publishing, 2010, 219-230.
- [48] AHN, Dong U.; MIN, Byungrok. Packaging and storage. In: TOLDRÁ, Fidel; associate editors, HUI, Y. H.... [et al.]. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 1st ed. USA: Blackwell Publishing, 2007, 289-300.
- [49] INCZE, Kálmán. Mold-ripened sausages. In: HUI, Y. H....[et al.]. *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*. CRC Press, Taylor & Francis Group, 2004, 445–458.
- [50] KOMPRDA, T., et al. Effect of starter culture, spice mix and storage time and temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. *Meat Science*, 2004, 67.4: 607-616.
- [51] ROMANS, John R., et al. *The Meat We Eat*, 14th ed. The Interstate Printers and Publishers, Inc., 2001.
- [52] ARNAU, J.; SERRA, X.; COMAPOSADA, J.; GOU, P.; GARRIGA, M. Technologies to shorten the drying period of dry-cured meat products. *Meat Science*, 2007, 77.1: 81-89.
- [53] INSTITUT DE RECERCA, TECNOLOGIA AGROALIMENTARIES. Accelerated method for drying and maturing sliced food products [online]. Inventor: COMAPOSADA, J., ARNAU, J., GOU, P., MONFORT, J. M. World Intellectual Property Organization. WO 2005092109 A1. 6.10.2005.
- [54] RANTSIOU, Kalliopi; COCOLIN, Luca. New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 108.2: 255-267.
- [55] GREPPI, Anna, et al. Monitoring of the microbiota of fermented sausages by culture independent rRNA-based approaches. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 212: 67-75.
- [56] RÖDEL, W.; KLETTNER, P.G.; SCHEUER, R. Verhalten von *E. coli* (VTEC) und *L. monocytogenes*: Einfluss von gefriergetrocknetem Fleisch in grosskalibriger magerer Schweinefleischsalami. *Fleischwirtschaft*, 2003, 83.11: 156-158.

- [57] DUCIC, Miroslav, et al. General patterns of background microbiota and selected bacterial pathogens during production of fermented sausages in Serbia. *Food Control*, 2014, 43: 231-237.
- [58] KROČKO, Miroslav; ČANIGOVÁ, Margita; VANČÍKOVÁ, Eva; FLIMELOVÁ, Erika; BOBKOVÁ, Alica. Vplyv štartovacej kultury na mikrobiologickú kvalitu trvanlivého tepelne neopracovaného mäsového výrobku. *Potravinárstvo*, 2013, 7, Special Issue: 91-96.
- [59] POŁKA, Justyna, et al. Bacterial diversity in typical Italian salami at different ripening stages as revealed by high-throughput sequencing of 16S rRNA amplicons. *Food microbiology*, 2015, 46: 342-356.
- [60] MARTY, Esther, et al. Identification of staphylococci and dominant lactic acid bacteria in spontaneously fermented Swiss meat products using PCR-RFLP. *Food Microbiology*, 2012, 29.2: 157-166.
- [61] LEROY, Sabine; LEBERT, Isabelle; TALON, Régine. Microorganisms in Traditional Fermented Meats. In: TOLDRÁ, Fidel; associate editors, HUI, Y. H.... [et al.]. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 1st ed. USA: Blackwell Publishing, 2007, 97-105.
- [62] TALON, Régine; LEROY, Sabine; LEBERT, Isabelle. Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: the importance of indigenous starters. *Meat Science*, 2007, 77.1: 55-62.
- [63] COCOLIN, Luca, et al. Dynamics and characterization of yeasts during natural fermentation of Italian sausages. *FEMS Yeast Research*, 2006, 6.5: 692-701.
- [64] MENDONÇA, Regina CS, et al. Dynamics of the yeast flora in artisanal country style and industrial dry cured sausage (yeast in fermented sausage). *Food Control*, 2013, 29.1: 143-148.
- [65] OZTURK, Ismet; SAGDIC, Osman. Biodiversity of Yeast Mycobiota in “Sucuk,” a Traditional Turkish Fermented Dry Sausage: Phenotypic and Genotypic Identification, Functional and Technological Properties. *Journal of Food Science*, 2014, 79.11: M2315-M2322.
- [66] CASTELLARI, Claudia; QUADRELLI, Ana María; LAICH, Federico. Surface mycobiota on Argentinean dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, 142.1: 149-155.

- [67] DUCIC, Miroslav, et al. The fate and pasteurization-based inactivation of *Escherichia coli* O157, *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* in dry, fermented sausages. *Food Control*, 2016, 59: 400-406.
- [68] DROSINOS, E. H., et al. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Science*, 2005, 69.2: 307-317.
- [69] COMAPOSADA, Josep, et al. Fast drying of dry-cured meat products: Quick-dry-slice (QDS) process technology. *Tehnologija mesa*. Institute of Meat Hygiene and Technology, 2009, 54-59.
- [70] STOLLEWERK, Katharina, et al. Ensuring food safety by an innovative fermented sausage manufacturing system. *Food Control*, 2011, 22.12: 1984-1991.
- [71] HOSPITAL, Xavier F.; HIERRO, Eva; FERNÁNDEZ, Manuela. Survival of *Listeria innocua* in dry fermented sausages and changes in the typical microbiota and volatile profile as affected by the concentration of nitrate and nitrite. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 153.3: 395-401.
- [72] HOSPITAL, Xavier F.; HIERRO, Eva; FERNANDEZ, Manuela. Effect of reducing nitrate and nitrite added to dry fermented sausages on the survival of *Salmonella Typhimurium*. *Food Research International*, 2014, 62: 410-415.
- [73] HOSPITAL, Xavier F., et al. Technological implications of reducing nitrate and nitrite levels in dry-fermented sausages: Typical microbiota, residual nitrate and nitrite and volatile profile. *Food Control*, 2015, 57: 275-281.
- [74] GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, Consuelo, et al. The effect of sugar concentration and starter culture on instrumental and sensory textural properties of chorizo-Spanish dry-cured sausage. *Meat Science*, 2006, 74.3: 467-475.
- [75] URSO, Rosalinda, et al. Technological characterization of a bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* and its use in fermented sausages production. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 110.3: 232-239.
- [76] BOVER-CID, Sara; IZQUIERDO-PULIDO, Maria; VIDAL-CAROU, M. Carmen. Changes in biogenic amine and polyamine contents in slightly fermented sausages manufactured with and without sugar. *Meat Science*, 2001, 57.2: 215-221.

- [77] AUSTIN, J.W. Clostridium: Occurrence and Detection of *Clostridium botulinum* and Botulinum Neurotoxin. *Reference Module in Food Science - Encyclopedia of Food and Health*, 2016, 155–159.
- [78] LINARES, María Belén, et al. Efficacies of Garlic and *L. sakei* in Wine-Based Marinades for Controlling *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Chouriço de Vinho, a Dry Sausage Made from Wine-Marinated Pork. *Journal of Food Science*, 2013, 78.5: M719-M724.
- [79] GARCÍA-DÍEZ, J., et al. Behaviour of food-borne pathogens on dry cured sausage manufactured with herbs and spices essential oils and their sensorial acceptability. *Food Control*, 2016, 59: 262-270.
- [80] ZHANG, Yunbin, et al. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 2016, 59: 282-289.
- [81] RANTSIOU, Kalliopi, et al. Molecular characterization of *Lactobacillus* species isolated from naturally fermented sausages produced in Greece, Hungary and Italy. *Food Microbiology*, 2005, 22.1: 19-28.
- [82] URSO, Rosalinda; COMI, Giuseppe; COCOLIN, Luca. Ecology of lactic acid bacteria in Italian fermented sausages: isolation, identification and molecular characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 2006, 29.8: 671-680.
- [83] LATORRE-MORATALLA, M. L.; BOVER-CID, S.; VIDAL-CAROU, M. C. Technological conditions influence aminogenesis during spontaneous sausage fermentation. *Meat Science*, 2010, 85.3: 537-541.
- [84] INCZE, Kálmán. European products. In: TOLDRÁ, Fidel; associate editors, HUI, Y. H.... [et al.]. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 1st ed. USA: Blackwell Publishing, 2007, 1: 307-318.
- [85] SCHWING, Jürgen; NEIDHARDT, Ralf. North European products. In: TOLDRÁ, Fidel; associate editors, HUI, Y. H.... [et al.]. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 1st ed. USA: Blackwell Publishing, 2007, 349-358.
- [86] IACUMIN, Lucilla; COMI, Giuseppe; CANTONI, Carlo; COCOLIN, Luca. Ecology and dynamics of coagulase-negative cocci isolated from naturally fermented Italian sausages. *Systematic and Applied Microbiology*, 2006, 29.6: 480-486.

- [87] ANDRÉS, Ana, et al. Principles of drying and smoking. In: TOLDRÁ, Fidel; associate editors, HUI, Y. H.... [et al.]. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 1st ed. USA: Blackwell Publishing, 2007, 1: 37-50.
- [88] VIGNOLO, Graciela; FADDA, Silvina. Starter cultures: Bioprotective cultures. In: TOLDRÁ, Fidel; associate editors, HUI, Y. H.... [et al.]. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 1st ed. USA: Blackwell Publishing, 2007, 147-157.
- [89] IKONIĆ, Predrag M., et al. Drying characteristics of traditional fermented sausage Petrovská klobása: The effect of different ripening conditions and use of starter culture. *Food and Feed Research*, 2014, 41.1: 71-79.
- [90] SILINS, Indulis, et al. The effects of pH, a_w , and lactic acid bacteria on *Listeria monocytogenes* in fermented sausages. In: "9th Baltic Conference on Food Science and Technology" Food for Consumer Well-Being" FOODBALT 2014, Jelgava, Latvia, 8-9 May, 2014. Latvia University of Agriculture, Faculty of Food Technology, 2014, 55-60.
- [91] SINGH, V.P., SACHAN, N. Role of biotechnology in preservation of meat and meat products. *Processed Food Industry*, 2010, 13: 20-23.
- [92] PETÄJÄ-KANNINEN, Esko; PUOLANNE, Eero. Principles of meat fermentation. In: TOLDRÁ, Fidel; associate editors, HUI, Y. H.... [et al.]. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 1st ed. USA: Blackwell Publishing, 2007, 31-35.
- [93] SINGH, V. P.; PATHAK, V.; VERMA, Akhilesh K. Fermented meat products: organoleptic qualities and biogenic amines – a review. *American Journal of Food Technology*, 2012, 7.5: 278-288.
- [94] KÖNIG, Helmut; FRÖHLICH, Jürgen. Lactic acid bacteria. In: KÖNIG, Helmut et al. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer Berlin Heidelberg, 2009, 3-29.
- [95] VIDAL-CAROU, M. Carmen, et al. Biogenic amines: risks and control. In: TOLDRÁ, Fidel; associate editors, HUI, Y. H.... [et al.]. *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. 1st ed. USA: Blackwell Publishing, 2007, 455-468.
- [96] ŠTURSA, P., et al. Approaches for diversity analysis of cultivable and non-cultivable bacteria in real soil. *Plant, Soil and Environment*, 2009, 55.9: 389-396.

- [97] BURIÁNKOVÁ, I., BRABLCOVÁ, L., RULÍK, M. Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) a její využití ve výzkumu metanogenních archeí. *Mikrobiologie vody a prostředí 2011*, 2011, 12-15.
- [98] DENG, Bo, et al. PCR-DGGE analysis on microbial communities in pit mud of cellars used for different periods of time. *Journal of the Institute of Brewing*, 2012, 118.1: 120-126.
- [99] MUYZER, Gerard; DE WAAL, Ellen C.; UITTERLINDEN, Andre G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59.3: 695-700.
- [100] VAN ELSAS, J. D., et al. Soil microbial community fingerprinting based on total community DNA or RNA. *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*, 2005, 187-203.
- [101] DUARTE, Sofia; PASCOAL, Claudia; CASSIO, Fernanda. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology-insights from freshwaters. *INTECH Open Access Publisher*, 2012.
- [102] NISIOTOU, Aspasia, et al. Old Targets, New Weapons: Food Microbial Communities Revealed With Molecular Tools. *Novel Food Preservation and Microbial Assessment Techniques*, 2014, 277.
- [103] WEISBURG, William G., et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173.2: 697-703.
- [104] KLIJN, NICOLETTE; WEERKAMP, ANTON H.; DE VOS, WILLEM M. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57.11: 3390-3393.
- [105] LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, 1991, 125-175.
- [106] KUCZYNSKI, Justin, et al. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nature Reviews Genetics*, 2012, 13.1: 47-58.
- [107] C.B.S. Scientific. *Instruction manual - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Systems* [online]. 2012, [cit. 28_3_2016]. Dostupné z: <http://www.cbsscientific.com/pdf/dgge-dggekinstructionmanual2012.pdf>

- [108] FONTANA, Cecilia; VIGNOLO, Graciela; COCCONCELLI, Pier Sandro. PCR–DGGE analysis for the identification of microbial populations from Argentinean dry fermented sausages. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 63.3: 254-263.
- [109] KESMEN, Z., et al. Combination of culture-dependent and culture-independent molecular methods for the determination of lactic microbiota in sucuk. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 153.3: 428-435.
- [110] GAO, Yurong; LI, Dapeng; LIU, Xiaoyan. Bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* C2 as starter culture in fermented sausages. *Food Control*, 2014, 35.1: 1-6.
- [111] REGULATION, Commission. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 2005, 338: 1-29.
- [112] KABAN, G.; KAYA, M. Effects of *Lactobacillus plantarum* and *Staphylococcus xylosus* on the quality characteristics of dry fermented sausage “Sucuk”. *Journal of Food Science*, 2009, 74.1: S58-S63.
- [113] KAMENÍK, Josef, et al. Effect of Storage Temperature on the Quality of Dry Fermented Sausage Poličan. *Czech Journal of Food Science*, 2012, 30.4.
- [114] IACUMIN, Lucilla; MANZANO, Marisa; COMI, Giuseppe. Catalase-positive cocci in fermented sausage: Variability due to different pork breeds, breeding systems and sausage production technology. *Food Microbiology*, 2012, 29.2: 178-186.
- [115] SUMBALI, Geeta; MEHROTRA, R. S. *Principles of Microbiology*. Tata McGraw-Hill, 2009. 924.
- [116] GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. *Molecular cloning: a laboratory manual*, vol 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2012.
- [117] OSWALD, Nick. The Basics: How Alkaline Lysis Works. In: *Bitesize Bio* [online]. Science Squared LTD Solutions, Inc., 2014. [cit. 2_4_2016]. Dostupné z: <http://bitesizebio.com/180/the-basics-how-alkaline-lysis-works/>
- [118] ANONYM. Gel Electrophoresis of PCR Products. In: *National Diagnostics* [online]. National Diagnostics Inc., 2011. [cit. 2_4_2016]. Dostupné z: <https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/gel-electrophoresis-pcr-products>

- [119] SUNDQUIST, Terri; BESSETTI, Joseph. Identifying and preventing DNA contamination in a DNA-Typing Laboratory. Profiles in DNA. *September*, 2005, 11-13.
- [120] SUMMER, Heike; GRÄMER, René; DRÖGE, Peter. Denaturing urea polyacrylamide gel electrophoresis (Urea PAGE). *Journal of Visualized Experiments*, 2009, 32: e1485-e1485.
- [121] GREEN, Stefan, J. Don't panic: a guide to denaturing gradient gel electrophoresis. 2005. 32.
- [122] RADOJKOVIC, Dragica; KUŠIC, Jelena. Silver staining of denaturing gradient gel electrophoresis gels. *Clinical chemistry*, 2000, 46.6: 883-884.
- [123] MORE, Sachin A. Re: DGGE - Why DNA remains in wells? [příspěvek v diskuzním fóru]. In: *Research Gate* [online]. 4.3.2016, [cit. 5_4_2016]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/post/DGGE-Why_DNA_remains_in_wells
- [124] ARUAN, Maroloan. Re: DGGE - Why DNA remains in wells? [příspěvek v diskuzním fóru]. In: *Research Gate* [online]. 4.3.2016, [cit. 5_4_2016]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/post/DGGE-Why_DNA_remains_in_wells
- [125] SAKALA, Rita M., et al. *Lactobacillus fuchuensis* sp. nov., isolated from vacuum-packaged refrigerated beef. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52.4: 1151-1154.
- [126] AYMERICH, T., et al. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic Staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71.3: 1674.
- [127] KOLUMAN, Ahmet; AKAN, Lale Sariye; ÇAKIROĞLU, Funda Pınar. Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci in retail foods. *Food Control*, 2009, 20.3: 281-283.
- [128] FAIRFAX, Marilyn R.; LEPHART, Paul R.; SALIMNIA, Hossein. *Weissella confusa*: problems with identification of an opportunistic pathogen that has been found in fermented foods and proposed as a probiotic. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5.
- [129] OLAJUYIGBE, O. O.; OLUREMI, B. B.; UMARU, D. G. Bacterial spoilage of fresh meat in some selected Lagos markets. *Ife Journal of Science*, 2007, 8.2: 193-198.

- [130] GRIBBLE, Amanda; BRIGHTWELL, Gale. Spoilage characteristics of *Brochothrix thermosphacta* and *campestris* in chilled vacuum packaged lamb, and their detection and identification by real time PCR. *Meat Science*, 2013, 94.3: 361-368.
- [131] PAVIOUR, Sue, et al. *Corynebacterium* species isolated from patients with mastitis. *Clinical Infectious Diseases*, 2002, 35.11: 1434-1440.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

APS	amonium persulfát
BLAST	basic local alignment search tool
bp	base pairs (páry bází)
CFU	colony-forming unit (kolonie tvořících jednotek)
CNS	koaguláza negativní stafylokoky
CPM	celkový počet mikroorganismů
ČSN	česká technická norma
ČR	Česká republika
DFD	dark, firm, dry (tmavé, tuhé, suché)
DGGE	denaturing gradient gel electrophoresis (denaturační gradientová gelová elektroforéza)
DNA	deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
dNTP	deoxyribonukleotid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (etylendiamintetraoctová kyselina)
Endo	Endo agar base
ES	Evropské společenství
EtBr	etidumbromid
FMV	fermentovaný masný výrobek
GDL	glukono- δ -lakton
g/l	gram na litr
ISO	International organization for standardization (Mezinárodní organizace pro normalizaci)
LAB	lactic acid bacteria (bakterie mléčného kvašení)
M17	M17 agar base
mg/ml	miligram na mililitr
ml	mililitr
mM	milimol
MRS	<i>Lactobacillus</i> deMan, Rogosa and Sharpe agar
MSA	mannitol salt agar

MS Excel	Microsoft Excel
nm	nanometr
PBS	phosphate buffered saline (fosfátový pufr)
PCA	plate count agar
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
pmol/μl	pikomol na mikrolitr
PP	polypropylen
PSE	pale, soft, exudative (světlé, měkké, vodnaté)
QDS	Quick-Dry-Slice
RNA	ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)
rRNA	ribosomal ribonucleic acid (ribozomální ribonukleová kyselina)
s	sekunda
SDS	sodium dodecyl sulfate (dodecylsírán sodný)
TAE	tris-acetát-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (N,N,N',N'-tetrametyletylendiamin)
TGGE	temperature gradient gel electrophoresis (gelová elektroforéza s teplotním gradientem)
USA	United States of America (Spojené státy americké)
UV	ultraviolet (ultrafialové)
V	volt
YGC	yeast glucose chloramphenicol agar
μl	mikrolitr

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Proces výroby trvanlivých fermentovaných masných výrobků	21
Obrázek 2: Schéma výroby FMV klasickou a QDS technologií	48
Obrázek 3: Příčný průřez salámem – analyzované vrstvy	50
Obrázek 4: Gen pro 16S rRNA – amplifikovaná sekvence v 1. amplifikačním kroku	58
Obrázek 5: Gen pro 16S rRNA – amplifikované sekvence ve 2. amplifikačním kroku.....	60
Obrázek 6: Sestavování aparatury pro přípravu gelu.....	62
Obrázek 7: Aparatura pro přípravu gelu	62
Obrázek 8: Příprava gelu	64
Obrázek 9: Sendvič připevněný ke kazetě	65
Obrázek 10: Vývoj CPM během výroby a skladování produktu vyrobeného klasickou technologií.....	70
Obrázek 11: Vývoj CPM během výroby a skladování produktu vyrobeného QDS technologií.....	71
Obrázek 12: Vývoj mléčných koků během výroby a skladování produktu vyrobeného klasickou technologií.....	71
Obrázek 13: Vývoj laktobacilů během výroby a skladování produktu vyrobeného klasickou technologií.....	72
Obrázek 14: Vývoj CNS během výroby a skladování produktu vyrobeného klasickou technologií	73
Obrázek 15: PCR s primery FD1 a RD1 pro amplifikaci genu pro 16S rRNA, 1 500 bp	76
Obrázek 16: Amplifikace úseku V3 – V5 genu pro 16S rRNA, 560 bp.....	77
Obrázek 17: Amplifikace úseku V1 genu pro 16S rRNA, 70 bp, klasická výroba, tyče.....	77
Obrázek 18: Amplifikace úseku V3 genu pro 16S rRNA, 170 bp, klasická výroba, tyče	78
Obrázek 19: Amplifikace úseku V3 genu pro 16S rRNA, 170 bp, QDS výroba - kontaminace.....	78
Obrázek 20: DGGE – úsek V3 – V5 genu pro 16S rRNA, gradient 40/60 %	80
Obrázek 21: DGGE – úsek V3 – V5 genu pro 16S rRNA, gradient 30/70%	81
Obrázek 22: DGGE – úsek V3 – V5 genu pro 16S rRNA, gradient 30/60%	82
Obrázek 23: DGGE – úsek V3 genu pro 16S rRNA, gradient 30/50%.....	83

Obrázek 24: Gel A – úsek V1 genu pro 16S rRNA, gradient 30/50 %, klasická výroba.....	85
Obrázek 25: Gel B – úsek V3 genu pro 16S rRNA, gradient 15/55 %, klasická výroba.....	86
Obrázek 26: Gel C - úsek V1 genu pro 16S rRNA, gradient 30/50 %, QDS výroba.....	87
Obrázek 27: Gel D - úsek V3 genu pro 16S rRNA, gradient 15/55 %, QDS výroba.....	88
Obrázek 28: Gel E – úsek V1 genu pro 16S rRNA, gradient 30/50%, koření, dílo, kultura.....	89
Obrázek 29: Gel F – úsek V3 genu pro 16S rRNA, gradient 15/55 %, koření, dílo, kultura.....	90

SEZNAM TABULEK

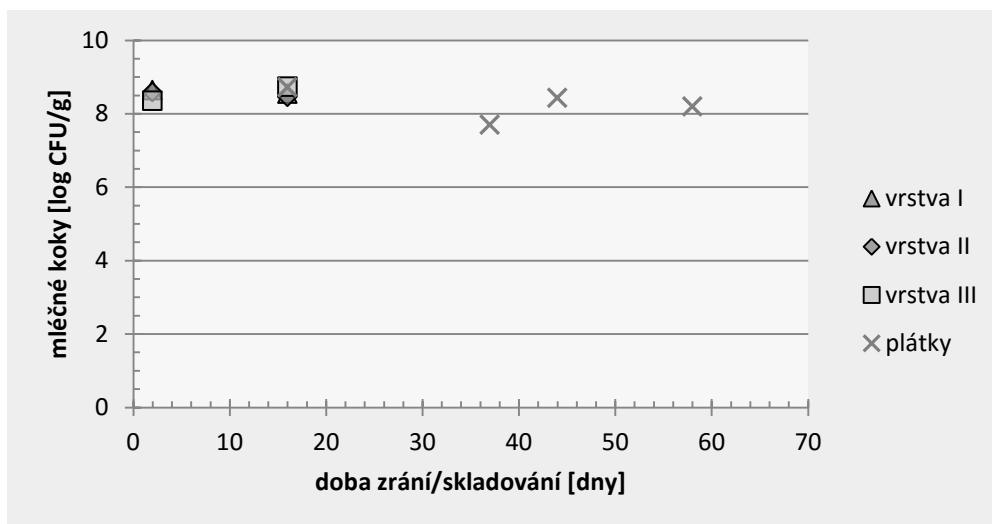
Tabulka 1: Primery použité k identifikaci mikroorganismů metodou PCR-DGGE.....	46
Tabulka 2: Časový harmonogram mikrobiologických analýz vzorků salámů	49
Tabulka 3: Kultivační stanovení mikroorganismů	50
Tabulka 4: Složení reakční směsi pro PCR – 1. amplifikační krok.....	57
Tabulka 5: Teplotní a časový profil 1. amplifikačního kroku	59
Tabulka 6: Složení reakční směsi pro PCR – 2. amplifikační krok.....	59
Tabulka 7: Teplotní a časový profil 2. amplifikačního kroku	60
Tabulka 8: Složení zásobních denaturačních roztoků.....	63
Tabulka 9: Mikroflóra díla pro výrobu FMV (log CFU/g ± směrodatná odchylka)	69
Tabulka 10: Mikroflóra koření (log CFU/g ± směrodatná odchylka).....	69
Tabulka 11: Výsledky optimalizace izolace DNA	75

SEZNAM PŘÍLOH

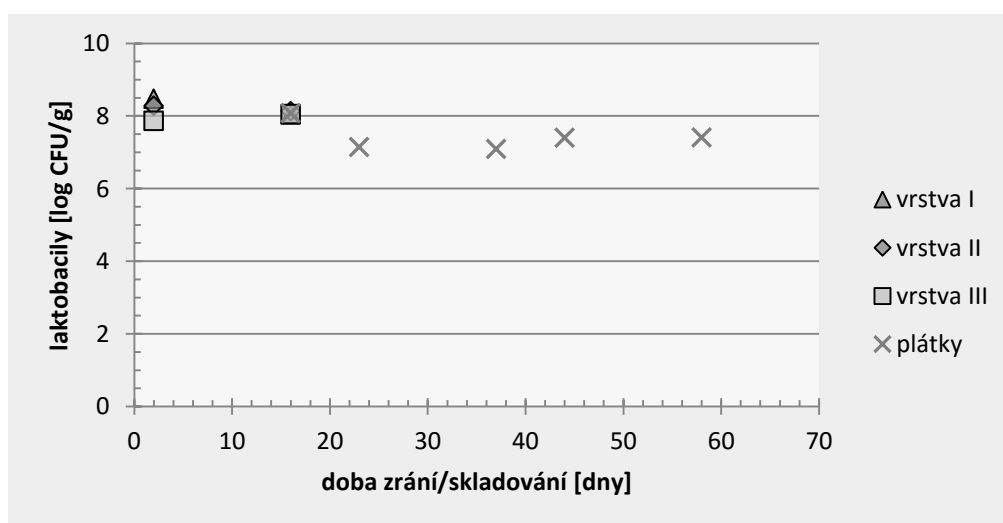
**PŘÍLOHA I: VÝVOJ MIKROFLÓRY FERMENTOVANÉHO MASNÉHO
VÝROBKU**

PŘÍLOHA II: KONCENTRACE A ČISTOTA IZOLOVANÉ DNA

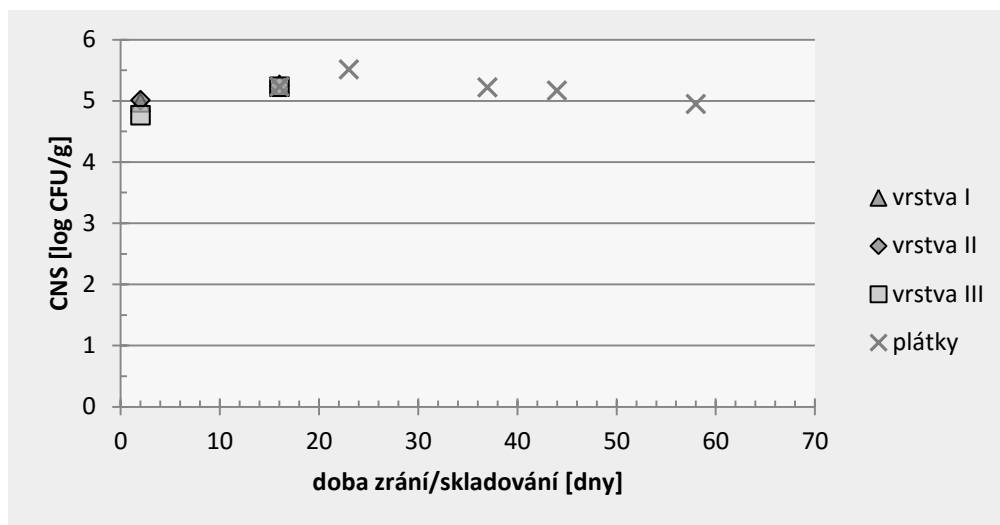
PŘÍLOHA I: VÝVOJ MIKROFLÓRY FERMENTOVANÉHO MASNÉHO VÝROBKU



Obrázek I: Vývoj mléčných koků během výroby a skladování produktu vyrobeného QDS technologií



Obrázek II: Vývoj laktobacilů během výroby a skladování produktu vyrobeného QDS technologií



Obrázek III: Vývoj CNS během výroby a skladování produktu vyrobeného QDS technologií

PŘÍLOHA II: KONCENTRACE A ČISTOTA IZOLOVANÉ DNA

Tabulka I: Koncentrace a čistota DNA ze salámů klasické výroby - tyče

den/vrstva	1. šarže		2. šarže	
	koncentrace [ng/μl]	čistota [-]	koncentrace [ng/μl]	čistota [-]
3./I.	31,5	1,94	30,6	1,95
3./III.	31,6	1,87	32,1	1,85
23./I.	22,9	2,01	25,0	1,97
23./III.	32,6	1,84	31,9	2,01
30./I.	38,2	1,83	37,6	1,84
30./III.	37,8	1,97	38,2	1,83
42./I.	33,9	1,73	34,1	1,85
42./III.	34,3	1,92	34,2	1,99
49./I.	30,7	1,80	29,6	1,97
49./III.	14,5	1,96	16,3	2,02
63./I.	19,5	1,86	21,3	1,81
63./III.	22,5	2,01	22,4	1,98

Tabulka II: Koncentrace a čistota DNA ze salámů klasické výroby - plátky

den	1. šarže		2. šarže	
	koncentrace [ng/μl]	čistota [-]	koncentrace [ng/μl]	čistota [-]
23.	21,0	1,94	22,5	1,92
30.	26,5	1,99	27,9	1,88
42.	45,6	2,03	42,9	1,97
49.	21,3	1,95	22,5	1,89
63.	48,3	1,99	47,1	1,95

Tabulka III: Koncentrace a čistota DNA ze salámů QDS výroby - tyče

den/vrstva	1. šarže		2. šarže	
	koncentrace [ng/μl]	čistota [-]	koncentrace [ng/μl]	čistota [-]
2./I.	35,5	1,85	37,4	2,17
2./III.	50,6	1,87	57,6	1,82
16./I.	38,9	1,90	30,4	1,90
16./III.	30,0	1,82	35,9	2,05

Tabulka IV: Koncentrace a čistota DNA ze salámů QDS výroby - plátky

den	1. šarže		2. šarže	
	koncentrace [ng/μl]	čistota [-]	koncentrace [ng/μl]	čistota [-]
16.	24,9	1,84	39,3	1,86
23.	29,2	1,93	30,1	2,03
37.	40,5	1,78	48,3	1,88
44.	36,1	1,89	36,3	1,86
58.	40,4	1,87	41,5	1,76

Tabulka V: Koncentrace a čistota DNA z díla

surovina	1. šarže		2. šarže	
	koncentrace [ng/μl]	čistota [-]	koncentrace [ng/μl]	čistota [-]
dílo 1	22,2	1,88	12,3	2,01
dílo 2	35,3	1,97	15,2	1,92

Tabulka V: Koncentrace a čistota DNA z koření

koření		
výroba	koncentrace [ng/μl]	čistota [-]
klasická	10,1	1,94
QDS	16,0	1,89

Tabulka VI: Koncentrace a čistota DNA kultury

kultura		
číslo vzorku	koncentrace [ng/μl]	čistota [-]
1	81,3	1,90
2	75,7	1,80
3	106,8	1,87
4	86,0	1,89