

Využití moderních metod při sledování diverzity mikroflóry u fermentovaného masného výrobku

Bc. Veronika Kučabová

Diplomová práce
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Kučabová**
Osobní číslo: **T16557**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Využití moderních metod při sledování diverzity mikroflóry u fermentovaného masného výrobku**

Zásady pro vypracování:

- 1. Fermentované masné výrobky a faktory ovlivňující jejich mikroflóru.**
- 2. Moderní metody využívané pro sledování diverzity mikroflóry v potravinách.**
- 3. Optimalizace metody DGGE pro stanovení mikroorganismů v potravinách.**
- 4. Identifikace mikroorganismů izolovaných z fermentovaných masných výrobků.**
- 5. Zpracování výsledků a formulace závěru.**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] TOLDRÁ, Fidel. **Handbook of Meat Processing**. 1st ed. USA: Blackwell Publishing, 2010.

[2] 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.

[3] 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.

[4] **Vědecké zdroje zahrnuté v databázích Web of Science, ScienceDirect, SciFinder Scholar, Medline aj.**

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

21. února 2019

Termín odevzdání diplomové práce:

3. května 2019

Ve Zlíně dne 21. února 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Jiří Miček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno:

Obor:

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

.....

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

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

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

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 vzdělávacímu 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 užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výtěžku 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 výtěžku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na sledování diverzity mikroflóry fermentovaných masných výrobků (salámů Paprikáš) vyrobených klasickou a Quick-Dry-Slice technologií. Sledované vzorky fermentovaných salámů byly odebírány během celé doby zrání a skladování a kultivačními metodami byly stanoveny celkové počty technologicky významných i nežádoucích rizikových mikroorganismů. Vzorky fermentovaných salámů vyrobených Quick-Dry-Slice technologií vykazovaly na konci sledované doby vysoké hodnoty počtů životaschopných bakterií v porovnání se vzorky salámů vyrobených klasickou cestou. Po celou dobu zrání a skladování byly u všech výrobků dominantní bakterie mléčného kvašení. U finálních produktů nebyly detekovány žádné nežádoucí rizikové mikroorganismy. Pomocí molekulárně biologické metody denaturační gradientové gelové elektroforézy byl vytvořen mikrobiologický profil všech vzorků. DNA izolovaná z nejvíce zastoupených mikroorganismů byla sekvenována a bakterie identifikovány jako druhy *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus carnosus* a *Staphylococcus condimentii*.

Klíčová slova: Fermentovaný masný výrobek, Quick-Dry-Slice, Denaturační gradientová gelová elektroforéza

ABSTRACT

This thesis focuses on monitoring of the diversity of fermented meat products microflora (Paprikas sausage) produced by conventional and Quick-Dry-Slice technology. The samples of fermented sausages were sampled during the entire aging and storage period. The total number of technologically significant and undesirable microorganisms was determined by cultivation methods. Fermented sausages samples produced by Quick-Dry-Slice technologies showed high viable counts at the end of the study period compared to sausage samples produced by conventional technology. Lactic acid bacteria were dominant during maturation and storage. No undesirable hazardous microorganisms were detected in the final products. Molecular biological method denaturing gradient gel electrophoresis was used to create microbiological profile of the samples. DNA isolated from microorganisms, which were the most abundant, was sequenced and bacteria were identified as *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactococcus lactis*, *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus condimentii*.

Keywords: Fermented meat products, Quick-Dry-Slice, Denaturing gradient gel electrophoresis

Ráda bych touto cestou poděkovala své školitelce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a náměty, ochotu a vstřícnost při vypracování mé diplomové práce. Dále děkuji svým kolegům a rodině za pomoc, podporu a trpělivost během celé doby mého studia.

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

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| ÚVOD | 10 |
| I TEORETICKÁ ČÁST | 11 |
| 1 MASNÝ VÝROBEK | 12 |
| 2 TRVANLIVÝ FERMENTOVANÝ MASNÝ VÝROBEK | 13 |
| 2.1 TECHNOLOGIE VÝROBY TRVANLIVÉHO FERMENTOVANÉHO MASNÉHO VÝROBKU | 13 |
| 2.1.1 Vstupní suroviny | 13 |
| 2.1.2 Příprava díla | 17 |
| 2.1.3 Plnění díla do obalových střevek | 17 |
| 2.1.4 Fermentace a zrání | 17 |
| 2.1.5 Sušení | 18 |
| 2.1.6 Technologie Quick-Dry-Slice | 19 |
| 3 MIKROBIÁLNÍ DIVERZITA U FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ | 21 |
| 3.1 SPONTÁNNĚ FERMENTOVANÉ MASNÉ VÝROBKY | 21 |
| 3.2 NEŽÁDOUCÍ MIKROFLÓRA | 22 |
| 3.3 STARTOVACÍ KULTURY | 23 |
| 4 METODY VYUŽÍVANÉ PŘI SLEDOVÁNÍ MIKROBIOLOGICKÉ DIVERZITY V POTRAVINÁCH | 24 |
| 4.1 KULTIVAČNÍ METODY | 24 |
| 4.2 MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÉ METODY..... | 25 |
| 4.2.1 Náhodná amplifikace polymorfní DNA (RAPD) | 26 |
| 4.2.2 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)..... | 26 |
| 4.2.3 Gelová elektroforéza v teplotním/denaturačním gradientu (TGGE/DGGE) | 27 |
| 4.2.4 Sekvenování | 29 |
| II PRAKTICKÁ ČÁST | 31 |
| 5 CÍLE PRÁCE | 32 |
| 6 MATERIÁL A METODY | 33 |
| 6.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE, POMŮCKY A CHEMICKÉ LÁTKY | 33 |
| 6.1.1 Kultivační stanovení..... | 33 |
| 6.1.2 Izolace DNA..... | 34 |
| 6.1.3 PCR | 35 |
| 6.1.4 DGGE..... | 36 |
| 6.1.5 Purifikace PCR..... | 37 |
| 6.2 CHARAKTERISTIKA VZORKŮ..... | 38 |
| 6.3 MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA..... | 39 |
| 6.3.1 Příprava kultivačních pŮd | 39 |
| 6.3.2 Kultivační stanovení mikroorganismů | 40 |
| 6.3.3 Vyjádření výsledků | 41 |
| 6.4 MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÁ ANALÝZA | 42 |
| 6.4.1 Izolace DNA..... | 42 |
| 6.4.2 Optimalizace polymerázové řetězové reakce (PCR)..... | 45 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 6.4.3 | Elektroforetická separace PCR produktů | 48 |
| 6.4.4 | Optimalizace DGGE | 49 |
| 6.4.5 | Reamplifikace produktů DGGE | 51 |
| 6.4.6 | Purifikace PCR produktů z agarózového gelu | 52 |
| 6.4.7 | Sekvenace a identifikace mikroorganismů..... | 52 |
| 7 | VÝSLEDKY A DISKUSE | 54 |
| 7.1 | MIKROBIOLOGICKÁ ANALÝZA..... | 54 |
| 7.2 | MOLEKULÁRNĚ BIOLOGICKÁ ANALÝZA | 62 |
| 7.2.1 | PCR | 62 |
| 7.2.2 | DGGE..... | 63 |
| | ZÁVĚR | 68 |
| | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 70 |
| | SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK..... | 76 |
| | SEZNAM OBRÁZKŮ | 78 |
| | SEZNAM TABULEK..... | 79 |
| | SEZNAM PŘÍLOH..... | 80 |

ÚVOD

Konzumace masa a masných výrobků má v životě člověka zásadní význam. V současné době existuje na trhu velké množství různě upravených masných výrobků. Mezi nejoblíbenější a zároveň nejkvalitnější patří fermentované masné výrobky tepelně neopracované. Jsou vyráběny z kvalitních vstupních surovin a díky náročnému technologickému procesu si zachovávají vysokou výživovou hodnotu. Velkou výhodou je jejich poměrně dlouhá doba minimální trvanlivosti zajištěná pouze přirozenými vlastnostmi. Hlavním důvodem vysoké obliby těchto výrobků jsou jedinečné sensorické vlastnosti, které se utvářejí během fermentace a dlouhé doby zrání. Tyto dva biochemické procesy jsou klíčové pro výrobu fermentovaných masných výrobků a jsou způsobeny aktivitou přirozeně se vyskytujících nebo dodávaných mikroorganismů. Znalost přítomné mikroflóry a probíhajících mikrobiologických procesů je důležitá pro zajištění požadovaných vlastností a zdravotní nezávadnosti výrobku. Studium mikrobiální diverzity a faktorů ovlivňujících růst technologicky významných bakterií může přispět také k vývoji nových technologických postupů.

Výroba fermentovaných masných produktů je velmi časově a finančně náročná. Provozovatelé potravinářských podniků proto hledají způsoby jak celý proces co nejlépe zefektivnit při zachování kvality a sensorických vlastností výrobků. Nová moderní technologie Quick-Dry-Slice (QDS) podstatně urychluje celý výrobní proces. Otázkou je, zda nový způsob výroby příliš neovlivňuje důležité mikrobiologické procesy a tím i vlastnosti výsledného produktu.

Sledování mikroorganismů v potravinách je nejčastěji prováděno klasickými kultivačními metodami. V současné době velmi preferovaná aplikace moderních molekulárně biologických metod umožňuje hlubší poznání bakteriálních společenstev, jejich přesnou identifikaci a také studium enzymatických procesů, které utvářejí konečné vlastnosti potravinových výrobků.

Tato diplomová práce se zabývá mikrobiální diverzitou fermentovaných salámů Paprikáš vyrobených jak klasickou, tak QDS technologií. Mikrobiologický profil produktů je sledován v průběhu celé doby zrání a skladování kultivačními metodami v kombinaci s molekulárně biologickou metodou denaturační gradientovou gelovou elektroforézou (DGGE).

TEORETICKÁ ČÁST

1 MASNÝ VÝROBEK

Masný výrobek můžeme kvalifikovat jako technologicky opracovaný výrobek, jehož převážující surovinou je maso. Dle Nařízení Evropského Parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 jsou masnými výrobky zpracované výrobky získané zpracováním masa nebo dalším zpracováním tak, že z řezné plochy je zřejmé, že produkt pozbyl znaků charakteristických pro čerstvé maso [1]. Za maso se při výrobě masných výrobků považují požitelné části jatečných zvířat včetně drobů (např. játra a srdce) a krve. Tyto suroviny musí být úředně prohlášeny za vhodné k lidské spotřebě. V případě masa se jedná o surovinu získanou při bourání velkých celků, jako jsou vepřové půlky nebo hovězí čtvrtě. Za maso je považováno i sádlo nebo lůj, které je v takto vybourané surovině přirozeně obsaženo. Výrobní surovina se následně rozděluje do několika tříd v závislosti na obsahu tuku. Drůbeží maso pro výrobu některých masných výrobků je zpravidla získáváno tzv. strojním oddělením ze skeletů drůbeže po odstranění hlavy, stehen, křídel a prsní svaloviny. K masu nebo strojně oddělenému masu se při výrobě masných výrobků přimíchává řada dalších přísad a pomocných látek v závislosti od skupiny výrobků. Jedná se zejména o pitnou vodu, koření, solící směsi, mouku, škrob a bílkovinné přísady [2, 3, 4].

Na celý proces výroby a distribuci masa a masných výrobků dohlíží v České republice kontrolní orgány Státní veterinární správa (SVS) a Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI). Dle vyhlášky ministerstva zemědělství 69/2016 Sb. ve znění pozdějších předpisů, rozlišujeme několik skupin masných výrobků (tabulka č. 1).

Tabulka č. 1 : Členění masných výrobků [3]

| Druh | Skupina |
|---------------|--|
| masný výrobek | tepelně opracovaný |
| | tepelně neopracovaný |
| | tepelně neopracovaný pro tepelnou úpravu |
| | trvanlivý tepelně opracovaný |
| | trvanlivý fermentovaný |
| | konzerva |
| | polokonzerva |

2 TRVANLIVÝ FERMENTOVANÝ MASNÝ VÝROBEK

Mezi nejkvalitnější masné výrobky lze zcela určitě zařadit velmi žádané trvanlivé fermentované masné výrobky (FMV)[5]. Jde o tepelně neopracované výrobky určené k přímé spotřebě, u kterých v průběhu fermentace, zrání, sušení, popřípadě uzení došlo k jejich vysušení tak, aby byla prodloužena minimální trvanlivost na 21 dní při teplotě skladování 20 °C [2, 3]. Hlavním důvodem vysoké obliby těchto výrobků jsou jedinečné sensorické vlastnosti, které se utvářejí během dlouhé doby zrání a fermentace.

2.1 Technologie výroby trvanlivého fermentovaného masného výrobku

Výroba trvanlivých FMV je považována za jednu z nejnáročnějších. Výrobce musí disponovat nejen dobrým strojním vybavením a používat jakostní surovinu, ale potřebuje rovněž dostatek znalostí a zkušeností. Celý technologický postup přípravy trvanlivých FMV lze znázornit jako proces skládající se z několika operací, které na sebe plynule navazují. Klíčové pro kvalitu finálních výrobků je dodržování všech operačních postupů a hygienických pravidel. Opomenutí nebo podcenění může mít za následek nejen nekvalitní produkt, ale také může ohrozit zdravotní nezávadnost výrobku z hlediska mikrobiální kontaminace [4, 5].

2.1.1 Vstupní suroviny

Základní surovinou je maso jatečných zvířat. V západní a střední Evropě se používá hlavně vepřové a hovězí maso, ve světě pak také maso koňské, skopové a krutí. Klasická receptura obsahuje jeden díl libového vepřového masa, jeden díl libového hovězího a jeden díl vepřového sádla. Vzhledem k vyšší ceně hovězího masa používá řada výrobců pouze maso vepřové. [5]. Maso pro výrobu masných produktů má být obecně řádně vyzrálé. Doba zrání je rozdílná pro maso různých druhů a stáří zvířat. Pro hovězí maso se doporučuje minimálně 2 týdny, má-li mít maso požadovanou křehkost. K zajištění optimálního průběhu zrání masa je nastavení teploty pro uchování + 3 až + 5 °C. Po ukončení procesu zrání masa se může skladovací teplota snížit na 0 až + 1 °C. Zráním masa se také optimalizuje jeho chuť. Vznikající látky však podléhají dalším reakcím. Poklesem teplot na 0 až + 1 °C se tyto chemické reakce zpomalují, ale ne zcela zastavují. Z tohoto důvodu by se maso nemělo skladovat po ukončení zrání delší dobu jak 8 dní, u hovězího maximálně 14 dní. Maso pro výrobu FMV by mělo pocházet ze starších zvířat. Je tmavší a obsahuje méně vody. Při opracování masa je potřeba odstranit pojivovou tkáň. Její přítomnost je patrná na řezu výrobků a působí

rušivě při skusu. Pro výrobu trvanlivých FMV výrobci upřednostňují maso libové s vysokým obsahem čistých svalových bílkovin. Podle legislativních předpisů musí do vybraných trvanlivých salámů (Poličan, Herkules, Paprikáš, Lovecký salám, Dunajská klobása) použít výrobce pouze vepřové a hovězí maso. Použití vlákniny, drůbežního masa strojně odděleného, rostlinných a jiných živočišných bílkovin se nepřipouští [3].

Technologie výroby FMV klade vysoké nároky na mikrobiální stav surovin, zejména masa jatečných zvířat. Trvanlivé FMV nejsou v průběhu výroby tepelně opracované. Mikrobiologické bariéry (pH, aktivita vody) proti nežádoucím mikrobům se vytvářejí postupně a jejich působení není rozhodně tak účinné jako vliv vysoké teploty při tepelném ošetření. Z toho vyplývá nutnost používat suroviny pouze s minimální mikrobiální kontaminací [5].

Další neméně důležitou surovinou pro výrobu trvanlivých FMV je vepřové sádlo. To má rozhodující roli při vytváření struktury výrobku ve fázi mělnění a míchání a také při sušení. Vepřové sádlo pro FMV má být jadrné, tuhé a proto se využívá pouze hřbetní sádlo. Z celkového obsahu mastných kyselin ve vepřovém sádle má být polyenových mastných kyselin do 12 % [5, 6]. V průběhu přípravy díla a při jeho plnění do obalových střev vzniká teplo. Aby se zabránilo uvolňování tuku v těchto fázích technologického procesu výroby, je nutné vepřové sádlo před jeho dalším zpracováním zamrazit na teplotu $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ [5, 7]. V ČR mívají na trhu rozšířené výrobky (Poličan, Herkules, Lovecký salám) většinou obsah tuku do 50 % [5].

Jednou z hlavních přísad používaných při výrobě FMV je chlorid sodný. Kuchyňská sůl, NaCl způsobuje po přidání do masa navázání iontů Na^+ a Cl^- na postranní řetězce bílkovin a působí mezi nimi jako odpudivá síla. Slanou chuť masných výrobků, resp. masa po přidavku NaCl způsobují převážně záporně nabitě ionty Cl^- a v menším rozsahu pozitivně nabitě ionty sodíku Na^+ . Sůl snižuje hodnotu vodní aktivity (a_w) a zvýhodňuje růst grampozitivních bakterií namísto gramnegativních mikroorganismů (žádoucích bakterií mléčného kvašení namísto nežádoucích patogenních mikroorganismů). Tím dochází k prodloužení údržnosti [4, 5].

K solení díla pro výrobu FMV se používá dusitanová solící směs (DSS), a to v množství 2,4 – 3,0 % (v hotovém výrobku v důsledku ztráty vody při sušení je obsah soli 3,2 – 4,5 %). Přídavek soli do díla snižuje a_w o 0,02 – 0,03 a také snižuje jeho teplotu o přibližně 1 – 2 $^{\circ}\text{C}$. Aktivita vody je z technologického hlediska definována jako poměr tlaku vodních par potraviny k tlaku par destilované vody při určité teplotě. Je tedy závislá na teplotě a vyjadřuje

míru volné vody, schopné účastnit se chemických reakcí. Přídavkem soli dochází ke ztrátám volné vody a ke zvýšení osmotického tlaku. Bílkoviny masa zvyšují svou rozpustnost a schopnost masa vázat vodu [5, 8]. Dusitan obsažený v DSS se podílí na vybarvení, na tvorbě aroma, má konzervační a antioxidační efekt. Pro dosažení charakteristické barvy masných výrobků je nutný přídavek dusitanu 30 – 50 mg/kg díla. Aroma ovlivní 20 – 40 mg/kg. Konzervační efekt (inhibice mikroorganismů rodu *Clostridium*, *Salmonella*) zajistí přídavek 80–150 mg/kg díla a antioxidačně působí 20 – 50 mg/kg. Antioxidační účinek dusitanu je založen jednak na principu spotřeby kyslíku k oxidaci na dusičnan, jednak na tvorbě stabilního komplexu mezi železem vázaným v hemové složce a dusitanem, čímž se zabrání uvolňování iontů železa [5].

K přípravě trvanlivých FMV se používá různých druhů koření. Často se používá pouze pepř (2 – 4 g/kg díla). Aroma lze obohatit také přídavkem papriky, kardamomu, muškátového květu, muškátového oříšku, zázvoru a jalovce. Tato koření postačují v dávce kolem 0,5 g/kg díla. V ČR se do tradičních FMV používá česnek, kmín nebo hřebíček. Koření vykazuje částečně antioxidační účinek (např. muškátový květ, tymián, šalvěj či rozmarýn), antimikrobiální účinek (nové koření, skořice, hřebíček, česnek, zázvor, koriandr, kmín, paprika, pepř, rozmarýn) a podporuje sekreci trávicích šťáv [5].

Úlohu substrátu (potravy) zejména pro bakterie mléčného kvašení plní sacharidy, které jsou fermentovány na kyselinu mléčnou a jiné neméně důležité organické látky. Při fermentaci dochází ke snížení pH, zvýšení údržnosti a ke vzniku jedinečných sensorických vlastností výrobku. Přídavek sacharidů do díla ovlivňuje intenzitu procesu fermentace. Běžně se používají monosacharidy (glukóza, příp. fruktóza), disacharidy (sacharóza, laktóza), příp. oligosacharidy (škrobový sirup). Obecně množství 1 g (nebo 0,1 %) glukózy přidané k 1 kg díla snižuje hodnotu pH o 0,1. Aplikace 8 – 10 g glukózy (dextrózy) snižuje pH z hodnoty kolem 5,7 na 4,6 – 4,8 [5, 8].

V dřívějších dobách zajišťovala fermentaci výrobku původní bakteriální flóra. Tato metoda však nebyla vždy úspěšná z důvodu množení nežádoucích bakterií a tvorby látek negativně ovlivňujících vlastnosti výrobku. V současnosti se využívá aplikace startovacích kultur. Ty zajišťují správný chod fermentačních procesů (okyselení, tvorba sensoricky významných látek), inhibici růstu nežádoucí mikroflóry (patogeny, sporuláty) a optimalizaci výroby (stálá kvalita výrobku, zkrácení výrobního času). Dávkování startovacích kultur do salámového díla musí zaručit minimální počet 10^7 bakteriálních buněk na 1 gram díla (CFU/g) [5, 8]. Startovací kultury jsou komerčně dostupné v mraženém, lyofilizovaném nebo tekutém stavu.

Do díla se mají startovací kultury aplikovat na počátku míchání v kутru. Nejčastěji se dnes používají startovací kultury, které obsahují mikrobiální rody *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Kocuria*, *Staphylococcus*. Z kvasinek je to potom *Candida* a *Debaryomyces*. *Debaryomyces hansenii* přidává se v množství kolem 10^6 CFU/g díla. Napomáhá rozvoji charakteristického vybarvení produktů, podílí se na utváření aroma a chuti. K povrchovému ošetření neuzených salámů se mohou použít plísňové startovací kultury. Aplikují se na povrch salámů formou postřiku nebo se salámy ponoří do roztoku s obsahem kolem 10^6 spor/ml. Na výrobku se vyvíjí bílé nebo šedě-bílé mycelium [5].

Tradičním obalovým stěvem pro masné výrobky jsou přírodní střeva. Při samotném plnění (narážení) střeva jsou důležité jeho mechanické vlastnosti. Jde především o pevnost a stabilitu při plnění. Obal musí vydržet silné zatížení, nesmí se vyboulit a musí naopak zachovat rovnoměrnost a stálost daného průměru (kalibru). Pro výrobu trvanlivých masných produktů se používají střeva propustná pro vodní páru, plyny a složky kouře. Tyto podmínky splňují přírodní střeva a některé typy syntetických obalových střev. V dnešní době se u nás používají především tenká vepřová střeva. Pro trvanlivé FMV se používají klišovková – kolagenní střeva a tzv. fibrousová střeva na bázi zpevněné celulózy. Základem tohoto druhu střev je speciální papír, který se získává z extrémně dlouhých rostlinných vláken určitých druhů rostlin. Vyznačuje se vysokou pevností a to zejména i ve vlhkém stavu. Při produkci fibrousových střev se na výše popsaný papír z dlouhých vláken, který je připraven s přesnou šířkou, nanáší celulóza – viskóza. Tyto dvě složky (papír a viskóza) společně vytvoří neoddělitelnou vazbu. Kombinace těchto obou přírodních materiálů umožňuje vznik jedinečnosti takto připravených obalových střev [5, 9].

Výchozí surovinou pro syntetická střeva kolagenní (klišovková) je štípenková klišovka, tj. spodní vrstva kůže, která zůstává jako vedlejší produkt po štípaní v koželužnách. Tato střeva jsou přirozenějším obalovým materiálem pro výrobu trvanlivých salámů než jiná syntetická střeva. Vynikají propustností pro vodní páru a složky kouře. Dokonale přilnou k povrchu díla a výrobku propůjčují přirozený vzhled. Oproti obalům ze zpevněné vlákniny nemají takovou pevnost, tzn. teplota díla při narážení je doporučována minimálně -2 °C (střeva ze zpevněné vlákniny snesou i -5 °C). Při teplotách nižších dochází k praskání střev při plnění. Kolagenní střeva nejsou na trhu k dispozici v takovém barevném provedení jako střeva celulózová, avšak jsou cenově výhodnější [5].

2.1.2 Příprava díla

K mělnění a míchání díla se běžně používají klasické kutry. Většina produktů má velikost zrna 0,8 – 3,0 mm. Kutr je zařízení, které se skládá z otočné mísy, ve které se na hřídeli otáčí nože, rozsekávají masitou surovinu a současně vznikající dílo promíchávají. Pro kvalitu finálních výrobků má význam nejen použitá surovina, ale také její zpracování při přípravě a plnění díla. Pro přípravu díla v kutru lze zvolit několik postupů, lišících se podle pořadí míchání jednotlivých druhů hlavní suroviny, tzn. masa a sádla. Obecně platí zásada zpracovávat v kutru sádlo v mraženém stavu (teplota -10 °C a nižší), stejně tak i maso s vysokým podílem sádla (např. boky), naopak libové maso se používá chlazené. Důležitá je výsledná teplota díla -4 až -1 °C. Při zahřívání může dojít k mazání tuku. Tuk uvolněný při míchání ucpává kapiláry vytvořené ve struktuře díla a dochází tak ke špatnému transportu vody ze středu výrobku k povrchu, což je velmi významné při sušení výrobku [5, 8].

2.1.3 Plnění díla do obalových střev

Při plnění (narážení) se dostává dílo do obalového střeva a získává tak předem určenou velikost i tvar a možnost zavěšení na udírenské hůlky. Dílo musí mít požadovanou strukturu a teplotu. Běžně se uvádí teplota kolem -1 až -4 °C. Nižší teploty už nejsou vhodné, protože při nich dochází k ztuhnutí díla a neschopnosti stroje dopravit dílo do obalu. Plnění díla by mělo nastat bezprostředně po vyjmutí z kutru. Obalová střeva by měla být před plněním ošetřena předepsaným způsobem za účelem zajištění jejich plné funkčnosti. Je nutné plnit obalová střeva na doporučený průměr, obal se musí v průběhu zrání smršťovat rovnoměrně s vysycháním produktu a přitom vykazovat přilnavost k povrchu díla. V současné době se používají moderní narážečky a jsou vesměs vakuové. Jsou vybaveny vývěvami k odsávání vzduchu z díla při procesu plnění. Absence kyslíku v díle umožňuje lepší vybarvení a snižuje hodnotu redoxního potenciálu. Dílo je po naplnění střeva kompaktní a finální výrobek není pórovitý. Pro uzavírání obalových střev se v dnešní době používají automatická nebo poloautomatická sponovací zařízení, která umožňují přesně aplikovat sponu okolo obalového střeva po jeho naplnění dílem [5, 8].

2.1.4 Fermentace a zrání

Po naplnění díla do obalových střev jsou výrobky navěšeny na udírenské vozy a převezeny do klimatizovaných komor, kde začíná proces fermentace a zrání. Salámy přitom ztrácejí

vodu – klesá hodnota a_w . Proces fermentace a sušení závisí na podmínkách v komorách (teplota vzduchu, relativní vlhkost vzduchu a rychlost proudění vzduchu). Nejprve musí proběhnout tzv. vyrovnávací fáze. Salámy jsou po navěšení na udírenské vozy studené (0 °C) a v klimatizovaných komorách je teplota vyšší. Na povrchu salámů kondenzuje vzdušná vlhkost. Vyrovnávací fáze tedy slouží k odebrání vody z povrchu. Teplota je nastavena na 16 – 22 °C, relativní vlhkost vzduchu 60 – 70 % a rychlost proudění vzduchu kolem 0,8 m/s. Vyrovnávací fáze trvá nezbytně nutnou dobu a to 1 – 6 hodin, kdy už nedochází k další kondenzaci vzdušné vlhkosti na povrchu výrobků. Musí skončit dříve, než by hrozilo přesušení povrchu salámů. Po vyrovnání teploty výrobků s teplotou okolního vzduchu je nutné zvýšit relativní vlhkost vzduchu v komoře na 92 – 93 %, teplota je nastavena na 22 – 26 °C a rychlost proudění vzduchu by měla být kolem 0,8 m/s. Teplota vzduchu zajistí rozvoj bakterií mléčného kvašení, které svými enzymy vyvolávají proces fermentace. Salámy jsou v prvních dnech fermentace a zrání uloženy zpravidla v tzv. zakuřovacích komorách, kde probíhá také uzení. Toto období trvá přibližně 1 týden. Poté jsou výrobky převezeny do zracích komor, kde pokračuje proces zrání a další sušení až do dosažení finálního stavu. Během sušení výrobků ve zracích komorách se postupně snižuje teplota vzduchu na 12 – 15 °C a relativní vlhkost vzduchu na 72 – 75 %. Rychlost proudění vzduchu se zredukuje na 0,1 m/s. Toto období trvá dle druhu výrobků zpravidla 1 – 3 týdny [5].

Fermentační procesy mají při výrobě trvanlivých FMV velmi důležitou úlohu. Ovlivňují pozitivně trvanlivost produktů, kladně působí na vytvoření textury, vybarvení produktu a na vývoj chuti a aroma. Pro potlačení nežádoucích bakterií je ale při výrobě zapotřebí kombinace více překážek [5, 6, 8].

2.1.5 Sušení

V průběhu zrání se začíná vytvářet nejvýznamnější a nejstabilnější bariéra pro potlačení růstu nežádoucích bakterií, a to nízká hladina a_w . Ta je ovlivněna přidavkem soli (dusitanová solící směs), fermentací, především ale procesem sušení. Rychlost procesu sušení je dána difúzí vody z produktu. Difúze je závislá na rozdílu obsahu vody mezi produktem a jeho okolím (relativní vlhkost vzduchu a aktivita vody), na druhu použitého střeva, kvalitě povrchu a složení produktů, rychlosti proudění vzduchu a teplotě. Základním předpokladem pro sušení výrobků je rozdíl ve vlhkosti mezi okolním vzduchem a výrobkem na jedné straně a jádrem výrobku a jeho okrajovou vrstvou na straně druhé. Při sušení je třeba dodržovat určité zásady, neboť cílem je získat kvalitního standardního produktu. Ekonomika provozu

žádá, aby se sušilo co nejrychleji a dosáhlo se tak co nejnižších provozních nákladů. Na druhé straně musí být proces sušení šetrný vzhledem k vlastnostem produktu. V případě FMV je zásadní pozvolný průběh sušení. Je třeba zajistit rovnoměrný odvod vody ze středu výrobku k jeho povrchu, kde nastává odpařování molekul vody do okolního vzduchu. Protože je v komoře relativní vlhkost vzduchu nižší než a_w salámů, probíhá odpařování vody z jejich povrchové vrstvy. Rychlost vypařování vody z povrchu produktů musí být přizpůsobena rychlosti difúze vody ze středu k vnější zóně. Jestliže je vlhkost z povrchu salámů odnímána rychleji, než stačí difúze uvnitř výrobku, výsledkem je vznik kroužku [5, 8].

2.1.6 Technologie Quick-Dry-Slice

Technologie Quick-dry-slice (QDS) je nová metoda pro přípravu krájených suchých výrobků z masa, kterou lze nazvat technologií 21. století. Tento způsob navrhl v roce 2004 tým Comaposada J. a spol. a celý proces si nechal o rok později patentovat [12]. Cílem je efektivně zkrátit dobu výroby, snížit náklady, zamezit růstu nežádoucí mikroflóry a oxidaci lipidů. U klasické výroby trvanlivých FMV trvá první krok fermentace obvykle 2 až 5 dnů. Následuje fáze zrání a sušení, která může trvat až několik týdnů. U QDS výroby jsou všechny počáteční operace (příprava díla, plnění do obalových střeň, fermentace) totožné s klasickou výrobou. Změna nastává až na konci fermentační fáze. Fermentace, zrání a sušení jsou upraveny tak aby výroba trvala namísto týdnů jen několik dnů. Hlavním rozdílem mezi klasickou výrobou a QDS výrobou je sušení jednotlivých plátků které probíhá rychleji. Pro usnadnění krájení je výrobek nejdříve zmrazen na $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tloušťka získaných plátků se pohybuje v rozmezí 1,5 – 2,0 mm. Sušení v kontinuálním systému, který kombinuje konvekční a vakuové sušení, probíhá za přesně definovaných podmínek 30 – 60 minut až do požadované hodnoty a_w . Odpařování vodní páry ochlazuje řezy a to umožňuje použití vyšší teploty, aniž by došlo ke zhoršení kvality výrobku. Po částečném vysušení jsou plátky vakuově baleny a skladovány při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu několika dnů až týdnů. Během této doby by mělo dojít k dozrání výrobku a rozvoji požadovaných sensorických vlastností [10, 11].

Produkty vyrobené QDS procesem byly testovány v několika studiích a srovnány s tradičně vyrobenými fermentovanými produkty. Testy byly provedeny po patnácti dnech skladování balených výrobků. Z hlediska bezpečnosti byly stanoveny počty bakterií rodů *Clostridium*, *Salmonella* a druhů *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*. Hodnoty CFU/g se u obou typů výrobků nelišily a splňovaly mikrobiologická kritéria dle nařízení komise EU [10, 11, 13]. Dále byly srovnány sensorické vlastnosti produktů. Plátky

sušené procesem QDS měly méně kyselou chuť než výrobky vyrobené tradičním způsobem. To mohlo být způsobeno těkavostí kyselin, které byly u plátků při sušení rovnoměrně odstraněny. Barva byla u výrobků QDS intenzivnější, některá citlivá barviva při krátkém procesu nevymizela. Chuť výrobků QDS se od tradičně vyrobených mírně lišila. Ke zlepšení došlo po delší době skladování po balení [10]. Mikrobiologické testy ukázaly, že celkový počet životaschopných bakterií včetně bakterií rodu *Lactobacillus* během experimentu klesal. U výrobků vyrobených pomocí QDS procesu byl zjištěn vyšší počet životaschopných bakterií, protože nedošlo k vyčerpání živin díky podstatně kratší době výroby [10, 11].

3 MIKROBIÁLNÍ DIVERZITA U FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ

V díle pro výrobu FMV se nacházejí mikroorganismy již od prvopočátku a to v množství řádově $10^5 - 10^6$ CFU/g. Zdrojem těchto mikroorganismů je vstupní surovina a to hlavně maso jatečných zvířat. Pro FMV jsou klíčové bakterie mléčného kvašení (BMK) a koaguláza negativní stafylokoky (CNS) podílející se na fermentaci [5].

3.1 Spontánně fermentované masné výrobky

U spontánní fermentace, bez použití startovací kultury, je počáteční množství BMK pouze $10^2 - 10^4$ CFU/g. Toto množství se rychle zvyšuje až na hodnoty $10^7 - 10^9$ CFU/g a BMK za nedlouho dominují fermentaci v důsledku anaerobního prostředí a přítomnosti soli, dusitanů a dusičnanů [14]. Dochází k degradaci sacharidů na kyselinu mléčnou, která nebývá jediným konečným produktem. Podle podílu kyseliny mléčné na celkovém množství produktů pak rozlišujeme mléčné kvašení homofermentativní a heterofermentativní. V případě heterofermentativních BMK 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 ovlivňuje rychlost sušení, konzistenci, barvu a mikrobiální stabilitu produktu. Nejběžnější BMK u spontánně fermentovaných masných výrobků jsou *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* a v menší míře *Lactobacillus plantarum*. Kromě laktobacilů mohou být přítomny také *Pediococcus pentosaceus*, *Pediococcus acidilactici*, bakterie rodu *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Wiessella* a *Enterococcus* [14, 16, 17].

U spontánně fermentovaných masných výrobků jsou přítomny také koaguláza negativní stafylokoky (CNS). Ty se na počátku zrání nacházejí v množství $10^2 - 10^4$ CFU/g a na konci $10^6 - 10^8$ CFU/g. CNS hrají roli v několika žádoucích reakcích. Aktivita dusičnanreduktázy a dalších enzymů podporuje žádoucí vývoj barvy a stabilizaci produktu. Nejčastějšími zástupci CNS jsou *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus saprophyticus* a *Staphylococcus equorum* [15, 17].

Kromě dominantních BMK a CNS mohou být u spontánně fermentovaných výrobků v menší míře přítomny kvasinky a plísně, které většinou během zrání nepřekročí hodnotu 10^5 CFU/g.

Penicillium rostoucí na povrchu přispívá ke stabilizaci barvy prostřednictvím katalázové aktivity. Kvasinky *Debaryomyces hansenii* či *Candida* mají proteolytické a lipolytické účinky a tím přispívají k rozvoji chuti výrobku [16].

3.2 Nežádoucí mikroflóra

I když jsou trvanlivé FMV považovány za nerizikové, možný výskyt nežádoucích mikroorganismů je diskutován v několika studiích. Trvanlivé FMV jsou tepelně neupravené, což při nedodržení technologického postupu a hygienických pravidel může vést k rozvoji nežádoucí mikroflóry. Občas se mohou na povrchu salámů vyskytnout nežádoucí plísně a kvasinky, jež mají různé nevzhledné barevné odstíny (zelené, hnědé nebo jejich vzájemné kombinace). Mezi plísněmi izolovanými z povrchu salámů prokázalo několik kmenů *Penicillium* spp. schopnost produkovat toxiny [18]. Kromě plísní byl u některých FMV prokázán výskyt původců alimentárních onemocnění. Přítomnost *Echerichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* byla zaznamenána v různých fázích výroby i u konečných produktů v maloobchodech [19]. Tento výskyt souvisí s kontaminovanou vstupní surovinou (maso), kde nežádoucí bakterie překonají nedokonalé mikrobiologické bariéry vzniklé v důsledku nedodržení technologického postupu. Dalším důvodem může být sekundární kontaminace finálních výrobků. Při testech ve výrobnách ukázaly výsledky vyšetření přítomnost bakterií *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*. Reziduální kontaminace může být způsobena zbytky masa nedostatečně odstraněnými při čištění a sanitaci strojů, stolů a nožů [14]. Dalšími zjištěnými nežádoucími bakteriemi mohou být *Brochothrix thermosphacta* a *Pseudomonas fragi* přispívající ke kažení masa [24]. Dále pak *Pseudomonas* spp., *Brevibacterium* spp. nebo *Corynebacterium* spp, které produkují proteolytické enzymy (proteázy, peptidázy, deaminázy) a tvoří svým růstem silný a lepkavý biofilm na povrchu výrobků. Přidružuje se amoniakální zápach, který může být hodně výrazný a připomíná aroma měkkých zrajících sýrů. Ke vzniku biofilmu přispívá vysoká relativní vlhkost v komoře na počátku fermentace [5].

Dalším rizikovým faktorem při výrobě trvanlivých FMV je, že fermentace vytváří vhodné podmínky pro mikroorganismy produkující biogenní aminy (BA). Tyto toxické organické sloučeniny vznikají dekarboxylací aminokyselin katalyzovanou bakteriálním enzymem dekarboxylázou. Při fermentaci je v prostředí zvýšená koncentrace aminokyselin a nízké pH což stimuluje obranný aparát mikroorganismů k tvorbě BA které pH prostředí zvyšují [20].

Dekarboxylázová aktivita u mikroorganismů je různá u různých bakteriálních kmenů. Z pohledu prevence tvorby BA při produkci FMV je třeba věnovat velkou pozornost hygieně masa (úroveň kontaminace) i přísad a také výběru startovacích kultur. Vysoké koncentrace kadaverinu, putrescinu a histaminu mohou být způsobeny špatným hygienickým stavem masa. Ke zvýšení hladiny kadaverinu přispívají zejména bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*. K redukci BA přispívá použití dekarboxyláza negativních kmenů *Lactobacillus sakei* jako startovacích kultur [5, 20].

3.3 Startovací kultury

Startovací kultury se používají ke zrychlení procesu fermentace, standardizaci produktů a snížení mikrobiologických rizik. Bývají jednokmenové nebo vícekmenové s určitou enzymatickou aktivitou (dusičnanreduktáza, kataláza, proteolytické a lipolytické enzymy) dle požadovaných vlastností výsledného potravinového produktu. Většina komerčně dodávaných startovacích kultur používaných při výrobě trvanlivých FMV obsahuje kombinaci bakterií rodu *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Staphylococcus* a *Kocuria*. Tyto kmeny jsou zodpovědné za žádoucí mikrobiologické reakce probíhající během fermentace. Kromě bakterií se jako startovací používají také plísňe *Penicillium nalgiovense* a *Penicillium gladioli* poskytující specifickou vůni, chuť a vzhled produktu. Z hlediska bezpečnosti potravinových výrobků je velmi důležitá produkce bakteriocinů a kyseliny mléčné bakteriemi obsaženými ve startovací kultuře. Za ochranné jsou považovány např. *Lactobacillus sakei* produkující bakteriocin sakacin a *Lactococcus lactis* produkující nisin. Oba bakteriociny inhibují růst mnoha patogenů [22, 23, 24].

4 METODY VYUŽÍVANÉ PŘI SLEDOVÁNÍ MIKROBIOLOGICKÉ DIVERZITY V POTRAVINÁCH

4.1 Kultivační metody

Stanovení mikroorganismů v potravinách se nejčastěji provádí mikrobiologickými kultivačními metodami. Kultivace probíhá ve speciálních tekutých živných médiích nebo na pevných plotnách obsahujících živiny a ztužující agar. Pro uvedené typy kultivačních médií jsou předepsané metodiky stanovení. Požadavky na živiny mají jednotlivé mikroorganismy velmi rozdílné. Přirozená kultivační média obsahují pouze přirozené složky (pepton, bujón, masový extrakt, kvasničný extrakt) poskytující všechny potřebné komponenty kultivovaným mikroorganismům. Syntetická média jsou minerální či organická. Dle účelu kultivace rozlišujeme několik typů médií. Základní (obecná) se používají v případě, kdy je třeba kultivovat celou škálu mikroorganismů. Diagnostická média umožňují rozeznávat různé druhy mikroorganismů na základě přidavku specifických chemických látek, reagensů či indikátorů pH. Selektivní média obsahují jednu či více látek brzdících růst nežádoucí mikroflóry (žlučové soli, azid sodný). Konfirmační média (potvrzující) jsou specifická média sloužící pro potvrzení vytvořené kolonie bakterií na selektivním médiu [25].

Mikrobiologická kritéria pro potraviny se řídí legislativními předpisy [13, 26]. Kultivační metody stanovení konkrétních mikroorganismů jsou popsány v českých státních technických normách (ČSN). Sledované mikroorganismy v masě a masných výrobcích a příslušné ČSN k jednotlivým kultivačním metodám jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka č. 2 : Vybrané skupiny mikroorganismů vyskytující se v masě a příslušné normy pro jejich stanovení

| Sledovaná skupina MO | Výchozí norma |
|--------------------------------|-----------------|
| Celkové počty mikroorganismů | ČSN ISO 2293 |
| BMK | ČSN ISO 13721 |
| Kvasinky a plísně | ČSN ISO 13681 |
| Čeď <i>Enterobacteriaceae</i> | ČSN ISO 21528-2 |
| <i>Pseudomonas</i> spp. | ČSN ISO 13720 |
| <i>Brochotrix thomosphacta</i> | ČSN ISO 13722 |

4.2 Molekulárně biologické metody

Moderní metody umožňují rychlejší stanovení mikroorganismů ve srovnání s klasickými kultivačními metodami. K metodám sledování diverzity nejrůznějších ekosystémů patří bezesporu metody molekulární biologie založené na studiu genetické informace. Základem je získat nukleové kyseliny (DNA) z biologického materiálu o přijatelné čistotě a koncentraci. K tomu slouží metody izolace DNA [27].

Izolace DNA probíhá za použití kombinace chemických a fyzikálních procesů. Celý postup je přizpůsoben výchozí matici. V prvním kroku je důležité rozrušit buněčnou stěnu lyzí pomocí lyzačních roztoků a proteázy. V dalším kroku se DNA separuje od proteinů a ostatních nežádoucích látek. Následuje konečné promývání, zakoncentrování, kontrola celistvosti a měření koncentrace DNA [28, 29]. Na trhu je k dispozici velké množství komerčních kitů přizpůsobených k izolaci DNA z různých výchozích materiálů a pracujících na různých principech. Nejrozšířenější je izolace pomocí gravitačních silikátových kolonek. Jedná se o rychlou a účinnou metodu, která poskytuje DNA o dostatečné kvalitě a čistotě. V kolonce je přítomna matrix, na kterou se přidaná DNA naváže a centrifugací kolonky se roztok bez DNA odplaví pryč. Matrix s navázanou DNA se promyje promývacím roztokem. Následnou centrifugací se promývací roztok odstraní. Po promytí se DNA z matrix vyváže elučním pufrům a následnou centrifugací je odplavena do sběrné zkumavky [29, 30]. Celistvost získané DNA je kontrolována elektroforeticky v agarózovém gelu. Čistota a koncentrace je stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 260 nm a 280 nm. Absorbance při 260 nm udává koncentraci nukleových kyselin a při 280 nm obsah koizolovaných proteinů. Poměr hodnot obou absorbancí 260/280 nám poskytuje informaci o čistotě neboli přítomnosti proteinů v roztoku DNA. Čistá DNA obvykle vykazuje hodnotu tohoto poměru 1,8 – 2,0 [31]. Koncentrace nukleových kyselin může být stanovena také fluorometricky. Tato metoda je založená na fluorescenci a je mnohem citlivější než spektrofotometrické stanovení. Umožňuje tedy kvantifikovat s velkou přesností také vzorky málo koncentrované [32].

Molekulárně biologické metody jsou postaveny na principu polymerázové řetězové reakce (PCR) a znalosti charakteristické části genomu detekovaného mikroorganismu. Detekce takové sekvence ve zkoumaném materiálu indikuje přítomnost konkrétního mikroorganismu. PCR je založena na opakované replikaci vybraného úseku určitého genu. Tento úsek je ohraničen primery, což jsou krátké řetězce DNA. K syntéze PCR produktu se využívá termosta-

bilní DNA polymeráza a celý proces probíhá v přístroji termocykleru za přesně definovaných podmínek daných složením PCR směsi a teplotou tání (T_m) primerů. Níže popsané fáze se během procesu cyklicky opakují [29, 30].

Denaturace – dochází k rozrušení vodíkových můstků v molekule DNA a rozvolnění dvoušroubovice. Vznik jednovláknové DNA je důležitý k nasednutí primerů. Tento proces probíhá za vysokých teplot (nad 90 °C).

Nasednutí primerů (annealing) – dochází k nasednutí primerů na specifická místa vlákna DNA. Teplota se při tomto kroku snížila na T_m primerů (40 – 65 °C). Na místo nasednutí primeru se zároveň váže DNA polymeráza.

Elongace – tento krok zahrnuje syntézu DNA ve směru od 5' konce k 3' konci. Vzniká komplementární vlákno k původní molekule DNA [33].

PCR je využívána v řadě molekulárně biologických metod. Pro sledování diverzity mikrobioty se nejčastěji používají modifikace uvedené v následujících kapitolách.

4.2.1 Náhodná amplifikace polymorfní DNA (RAPD)

Metoda RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) využívá jednoho náhodného krátkého PCR primeru (kolem 10 bp), který za nepříliš přísných podmínek PCR dosedá na komplementární místa na izolované DNA. V případě, že tato místa nejsou daleko od sebe a jsou na protilehlých řetězcích DNA, dojde k vytvoření krátkého PCR produktu. Každému přítomnému genomu pak odpovídá několik takových amplikonů. V porovnání s ostatními metodami nedává RAPD příležitost k získání mnoha taxonomických informací o složení studovaného společenstva. Lze ji využít především ke konstatování změn ve složení společenstva. Jedná se o jednoduchou, rychlou a především levnou metodu bez zvláštních nároků na technické vybavení [35, 36].

4.2.2 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

Technika RFLP (restriction fragment length polymorphism) byla první, která dosáhla významného rozšíření. Analyzovaná DNA nebo PCR produkty jsou štěpeny specifickými restrikčními endonukleázami a vzniká směs několika různě dlouhých fragmentů. Ty jsou rozděleny pomocí elektroforézy v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Pomocí RFLP lze od sebe odlišit dvě i více příbuzných molekul DNA lišících se v jednom či více párech bází (bp). Tyto odlišnosti se nazývají bodové mutace, inserce, delece, inverze a translokace.

Metoda RFLP sehrála významnou roli v mapování genomů. Byla použita k vytváření prvních genetických fingerprintů a používá se do dnes [34].

4.2.3 Gelová elektroforéza v teplotním/denaturačním gradientu (TGGE/DGGE)

Jednou ze základních tzv. fingerprintových metod je DGGE nebo TGGE (denaturing gradient gel electrophoresis nebo temperature gradient gel electrophoresis), gelová elektroforéza v denaturačním gradientu nebo gelová elektroforéza v teplotním gradientu. Princip těchto metod je využíván nejen pro studium mikrobiologické diverzity ale také pro detekci bodových mutací DNA (metoda je v principu schopná odlišit od sebe dvě sekvence lišící se jedním párem nukleotidů) [37, 38].

V roce 1993 publikoval G. Muyzer aplikaci DGGE na bakteriální gen 16S rRNA spolu s přidáním tzv. GC svorek [37]. 16S rRNA je gen kódující ribozomální RNA v malé ribozomální podjednotce (16S bakterií nebo 18S mikroskopických hub). Díky velkému množství variabilních oblastí je tento gen označen za vynikající univerzální fylogenetický marker, který umožňuje identifikaci mikroorganismů na úrovni rodu až druhu [37, 38].

Princip obou metod (DGGE i TGGE) je shodný. PCR produkt migruje v polyakrylamidovém gelu s denaturačním gradientem, který je buď chemický (močovina a formamid) u DGGE, nebo teplotní v případě TGGE. Ve skutečnosti jde v obou případech o kombinaci obou přístupů. Denaturace je dosaženo kombinací zvýšené teploty a denaturačních chemikálií a rozdíl spočívá jen v tom, čím je tvořen vlastní gradient. U DGGE je to gradient chemický, gradient koncentrace močoviny a formamidu, kdy elektroforéza probíhá za konstantní zvýšené teploty (65 °C), nebo gradient teplotní u TGGE, kdy je v gelu jednotná koncentrace formamidu a močoviny. Zpočátku molekuly DNA migrují gelem rychle. Se zvyšujícím se denaturačním gradientem ale dochází k postupné denaturaci molekul DNA a oddělování řetězců DNA, což snižuje rychlost jejich postupu gelem. Průběh této denaturace je specifický dle sekvence analyzované DNA, protože vazby mezi guaninem a cytosinem (G a C) denaturují pomaleji než vazby mezi adeninem a thyminem (A a T). V konečném důsledku by došlo k úplnému oddělení dvoušroubovice DNA a vyplavení rychle migrující jednořetězcové DNA z gelu, čemuž je zabráněno přítomností tzv. GC svorky. To je úsek dlouhý zhruba 40 bp skládající se výhradně z G a C. Svorka je součástí jednoho z primerů, drží oba řetězce DNA u sebe a má za následek úplné zastavení postupu analyzované molekuly v gelu. Vý-

sledkem je řada proužků, tzv. fingerprint. Teoreticky každý mikrobiální druh má svou specifickou sekvenci a tomu odpovídá specifická poloha proužku na gelu. Tedy každý proužek reprezentuje jeden mikrobiální druh. Jde však jen o teoretický předpoklad, který ve většině případů platí. Nicméně bylo prokázáno, že dva organismy mohou dát vzniknout proužku se stejnou polohou na gelu a jeden organismus může (z důvodu přítomnosti více kopií zkoumaného genu) dát vzniknout více proužkům [38].

DGGE je metoda vhodná ke studiu bakteriálních konsorcií, jejich dynamiky a srovnání. Jednotlivé bandy, které reprezentují bakteriální druhy, mohou být vyřezány a sekvenovány, Tato metoda je tedy vhodná pro fylogenetickou analýzu a přímou identifikaci mikroorganismů [37, 38, 39].

DGGE má několik omezení. Nespecifické produkty PCR reakce mohou nadhodnotit bakteriální diverzitu. Naopak fragmenty DNA s podobným denaturačním chováním se v gelu zastavují velmi blízko u sebe a nelze je tak od sebe vizuálně oddělit, což může diverzitu podhodnotit. Pokud je ve vzorku velké množství bakteriálních druhů, mohou výsledné gely vypadat rozmazaně a jednotlivé bandy nejsou ostré. Méně zastoupené bakterie a k nim příslušné bandy nemusí být vůbec patrné. Délka sekvence, kterou lze pomocí DGGE separovat je max. 1000 bp. což snižuje přesnost taxonomického zařazení [39].

Nejčastější typy nespecifických produktů:

Chiméry a heteroduplexy

V průběhu PCR může dojít k terminaci u amplikonu ještě před tím než je kompletně dokončen. V dalším PCR cyklu se na nedokončené vlákno může navázat vlákno nové a vznikne tak sekvence, která se na gelu oddělí do bandu. Sekvence je tedy kombinací dvou různých organismů a nazývá se dle řecké mytologie chimérou. Heteroduplexy vznikají přímo rekombinací dvou ssDNA pocházejících z různých organismů či chromozomů [47, 48].

Dimery

Dimery vznikají z primerů, které se díky své komplementaritě bazí v průběhu PCR spojí a vytvoří tak samostatný fragment DNA o určité sekvenci. Vhodně navržené primery vznik dimerů eliminují [49].

Dvojité a multi bandy

Pro vznik dvojitých bandů neexistuje jednoznačné vysvětlení. Tyto dvojité bandy se na DGGE gelu vyskytují většinou blízko u sebe, ale mohou být od sebe také značně vzdálené.

I když reprezentují stejnou sekvenci, vykazují různé denaturační chování z důvodu různé strukturní konformace produktů. Dalším důvodem může být, že některé druhy organismů obsahují několik kopií zkoumaného genu [50].

Navzdory limitům této metody převažují výhody. Omezení spojená s DGGE lze velmi dobře regulovat a to optimalizací několika kroků v metodice.

4.2.4 Sekvenování

Sekvenováním se rozumí určení sekvence (pořadí) nukleotidů dané molekuly DNA. Získaná sekvence lze použít k identifikaci mikroorganismu přítomného ve studovaném konsorciu. Sekvence se porovná se sekvencemi DNA všech mikroorganismů, které jsou uloženy v komerčních nebo veřejně dostupných databázích [40, 41].

V zásadě lze rozdělit metody sekvenování DNA na metody klasické a metody sekvenování nové generace. Nejrozšířenější klasickou metodou je Sangerovo sekvenování, které se v současné době provádí v kapilárovém provedení na sekvenátorech. K jednořetězcové DNA přisedá 15 – 25 bp dlouhý primer, který je komplementární k začátku sekvenovaného místa. Od navázaného primeru probíhá syntéza DNA za přítomnosti fluorescenčně značených dideoxynukleotidů (ddNTP). Ke každému nukleotidu původního DNA templátu se přiřadí příslušný ddNTP (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) a protože nemají OH skupinu, syntéza se po navázání zastaví. Tak vzniká množství různě dlouhých fluorescenčně značených fragmentů, které jsou analyzovány kapilární elektroforézou v sekvenátoru. Výsledkem je sekvenogram, který znázorňuje pořadí jednotlivých nukleotidů v původní DNA [40, 41].

Sekvenování nové generace neboli Next Generation sekvenování (NGS) v porovnání s klasickými metodami umožňuje především rychlou produkci velkého množství osekvenovaných vzorků najednou. NGS využívá principu paralelizace procesu sekvenování, čímž dochází ke vzniku několika tisíců až milionů sekvencí současně. Pro NGS existuje řada různých technologií, přičemž každá může být vhodná jen k určitým aplikacím [42, 43].

Pro studium mikrobiální diverzity pomocí NGS se využívá metagenomická analýza. V prvním kroku je templátová DNA fragmentovaná na úseky několik set bp dlouhé. Konce získaných fragmentů jsou enzymatickou reakcí zatupeny a napojeny k oligonukleotidům určité sekvence. Fragменты jsou odděleně amplifikovány PCR reakcí a následně paralelně sekvenovány. Výsledkem jsou miliony sekvencí, které se musí utřídit a analyzovat [42, 43].

Metagenomické studium mikrobiální diverzity pomocí NGS je v současné době novým a velmi efektivním nástrojem pro identifikaci všech druhů organismů v testovaných vzorcích [42, 43, 54].

I. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem práce bylo využití moderních molekulárně biologických metod pro sledování mikrobiologické diverzity ve fermentovaných masných výrobcích vyrobených klasickou a QDS technologií. Metodou DGGE bylo sledováno zastoupení mikroorganismů v jednotlivých vzorcích odebíraných po celou dobu zrání a skladování výrobků. Byl vytvořen DNA fingerprint všech vzorků a zastoupené mikroorganismy byly sekvenovány a identifikovány.

Dílčí cíle:

1. Vypracování literární rešerše na téma technologie výroby FMV, mikrobiální diverzita FMV a metody využívané ke sledování diverzity mikroflóry.
2. Kultivační stanovení mikroorganismů.
3. Sledování zastoupení mikroorganismů metodou DGGE.
4. Optimalizace metody DGGE, Eliminace PCR artefaktů ovlivňujících následnou DGGE (nespecifické PCR produkty - heteroduplexy, chiméry, primer dimery).
5. Sekvence a identifikace mikroorganismů.
6. Srovnání obou technologií výroby z hlediska zastoupení technologicky významných případně nežádoucích mikroorganismů.

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Použité přístroje, pomůcky a chemické látky

6.1.1 Kultivační stanovení

Přístroje a pomůcky

- Sterilizátor H+P Varioklav 135S (H+P Labortechnik AG, Německo)
- Stomacher Lab Blender 400 (Seward, Velká Británie)
- Inkubátor mikrobiologický (Mettler, 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)
- NaCl (Penta, ČR)

6.1.2 Izolace DNA

Přístroje 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; skal-pel; 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)
- Tris-base (Sigma-Aldrich, USA)

6.1.3 PCR

Přístroje a pomůcky

- PCR box AURA PCRTM (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; ko-vová lžička

Chemické látky a přípravky

- Etanol 70% (Sigma-Aldrich, USA)
- Redestilovaná voda pro molekulární biologii
- 1x TAE pufr (20 mM Tris-base, 10 mM acetát sodný, 0,5 mM EDTA, pH 7,4, vše Sigma-Aldrich, USA)
- 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)

Tabulka č. 3: Použité primery

| Název | Sekvence | Publikace |
|-----------|---------------------------|----------------------------|
| FD1 | 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG | Weisburg et al., 1991 [51] |
| RD1 | 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC | Weisburg et al., 1991 [51] |
| 341F(GC)* | 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG | Muyzer et al., 1993 [37] |
| 907R | 5'-CCGTCAATTCMTTTGAGTTT | Muyzer et al., 1993 [37] |

*GC svorka – CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCAGGGGGG [37]

6.1.4 DGGE

Přístroje 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, 1M kyselina octová, 0,05M EDTA Na₂, vše Sigma-Aldrich, USA)
- 1x TAE pufr (40mM Tris-base, 20mM kyselina octová, 1mM EDTA Na₂, vše Sigma-Aldrich, USA)
- Fluorescenční barvivo GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium, USA)
- 100 bp DNA Ladder N3231L (Biolabs. Inc., New England)

6.1.5 Purifikace PCR

Přístroje 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

6.2 Charakteristika vzorků

Vzorky FMV, konkrétně salámy Paprikáš, byly vyrobeny českou firmou zabývající se výrobou masa a masných výrobků. Dodány byly dvě šarže salámů vyrobených jednak klasickou technologií a dvě šarže salámů vyrobených technologií QDS (Tabulka č. 4). Dále byly dodány vzorky díla všech šarží, vzorky koření a komerční startovací kultura v lyofilizované formě.

Dílo 1 pro výrobu salámů klasickou technologií se skládalo z masa, sádla, standardní dávky koření a specifické skladby sacharidů. Dílo 2 pro QDS technologii obsahovalo maso, sádlo, vyšší dávku koření a specifickou skladbu sacharidů.

Tabulka č. 4 : Technologie výroby analyzovaných FMV

| Klasická výroba | QDS výroba |
|--|--|
| Dílo 1 | Dílo 2 |
| Propustný obal, zrání 3,5 dne | Nepropustný obal, zrání 2,5 dne |
| Klasické sušení 21 – 24 dnů | Zamrazení |
| Tyče, plátky | Plátkování |
| Balení (70 % CO ₂ + 30 % O ₂) | QDS sušení |
| Skladování | Balení (70 % CO ₂ + 30 % O ₂) |
| | Skladování |

Salámy Paprikáš byly dodávány a vzorkovány ve stanovených intervalech postupně během celé doby zrání a skladování (Tabulka č. 5). Z každého výrobku byly odebrány dva vzorky. První, určený k mikrobiologické analýze, byl zpracován ihned. Druhý byl zmrazen a uchován při -70 °C pro následné molekulárně biologické analýzy. Všechny analýzy byly provedeny v laboratoři mikrobiologie a molekulární biologie Ústavu ochrany životního prostředí.

Tabulka č. 5 : Časový harmonogram odběru vzorků

| Den odběru | 0 | 2 | 3 | 16 | 23 | 30 | 37 | 42 | 49 | 58 | 63 |
|------------------------|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Klasická výroba | | | | | | | | | | | |
| T11PK* | 0 | | 3 | | 23 | 30 | | 42 | 49 | | 63 |
| T12PK | 0 | | 3 | | 23 | 30 | | 42 | 49 | | 63 |
| B11PK | | | | | 0 | 7 | | 21 | 28 | | 42 |
| B12PK | | | | | 0 | 7 | | 21 | 28 | | 42 |
| QDS výroba | | | | | | | | | | | |
| T21NQ | 0 | 2 | | 16 | | | | | | | |
| T22NQ | 0 | 2 | | 16 | | | | | | | |
| B21NQ | | | | 0 | 7 | | 21 | 28 | | 42 | |
| B22NQ | | | | 0 | 7 | | 21 | 28 | | 42 | |

*Značení vzorků: Typ_Dílo_Šarže_Obal_Výroba
 Typ: T – tyče, B – plátky
 Dílo: 1 nebo 2
 Šarže: 1 nebo 2
 Obal: P – propustný, N – nepropustný
 Výroba: K – klasická, Q – QDS

6.3 Mikrobiologická analýza

6.3.1 Příprava kultivačních pŮd

K přípravě médií byly použity komerčně vyrobené již namíchané práškové směsi.

PCA – Plate count agar (HiMedia)

M17 – M17 agar base (HiMedia)

MRS – Lactobacillus MRS agar (HiMedia)

MSA – Manitol Salt Agar (HiMedia)

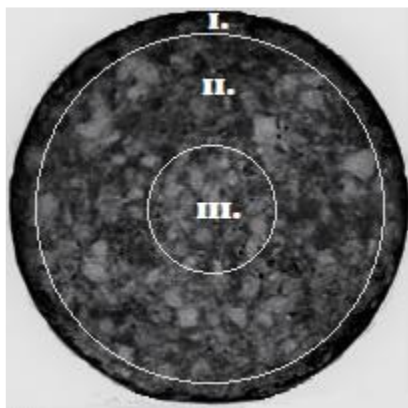
ENDO – Endo Agar Base (HiMedia)

CHYGA – Chloramphenicol Yeast Glucose Agar (HiMedia)

Práškové směsi byly rozpuštěny v destilované vodě podle návodu výrobce HiMedia Laboratories. Rozpuštěné půdy byly sterilizovány v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut a následně rozlity za aseptických podmínek do sterilních Petriho misek.

6.3.2 Kultivační stanovení mikroorganismů

Pro kultivační stanovení mikroorganismů bylo odebíráno 10 g vzorku díla, koření či salámu do sterilního plastového sáčku. Z tyčí salámů byly odebrány vzorky ze tří vrstev dle obrázku 1. Navážka byla 10 x zředěna sterilním fyziologickým roztokem (9 g/l NaCl, Penta). Poté byl obsah sáčku homogenizován za použití Stomacheru po dobu 2 minut.



Obrázek 1: Odběr vzorků u tyčí salámu

Z homogenizované základní suspenze byla připravena desítková ředící řada. Petriho misky s příslušnými půdami byly inokulovány 100 µl suspenze. Inokulace byla provedena roztěrem sterilními hokejkami. Pro každou sledovanou skupinu mikroorganismů byly použity vždy tři po sobě jdoucí ředění každého vzorku, od každého ředění byly inokulovány dvě plotny. Přehled sledovaných mikroorganismů, příslušných půd a podmínky kultivace jsou popsány v tabulce č. 6.

Tabulka č. 6: Kultivační stanovení mikroorganismů

| | Půda | Podmínky kultivace |
|-------------------------------------|-------|--------------------------|
| Celkové počty CPM | PCA | 30 °C, 72 hod. |
| Laktobacily LAB | MRS | 30 °C, 72 hod. anaerobně |
| Koaguláza negativní stafylokoky CNS | MSA | 30 °C, 24 hod. |
| Mléčné koky | M17 | 30 °C, 72 hod. |
| Enterobakterie | ENDO | 37 °C, 24 hod. |
| Kvasinky a plísňe | CHYGA | 3 – 5 dnů, lab. teplota |

6.3.3 Vyjádření výsledků

Byl spočítán počet kolonií všech vykultivovaných mikroorganismů na jednotlivých půdách.

Poté byla spočítána hodnota CFU/g (colony forming units/g) dle následujícího vzorce:

$$N = \frac{\Sigma C}{Vd(n1 + 0,1n2)}$$

Pro půdy, u kterých bylo k dispozici pouze jedno ředění MO, byl použit následující vzorec:

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

ΣC - součet kolonií spočítaných po identifikaci na všech vybraných plotnách

$n1$ - počet ploten použitých pro výpočet z prvního ředění

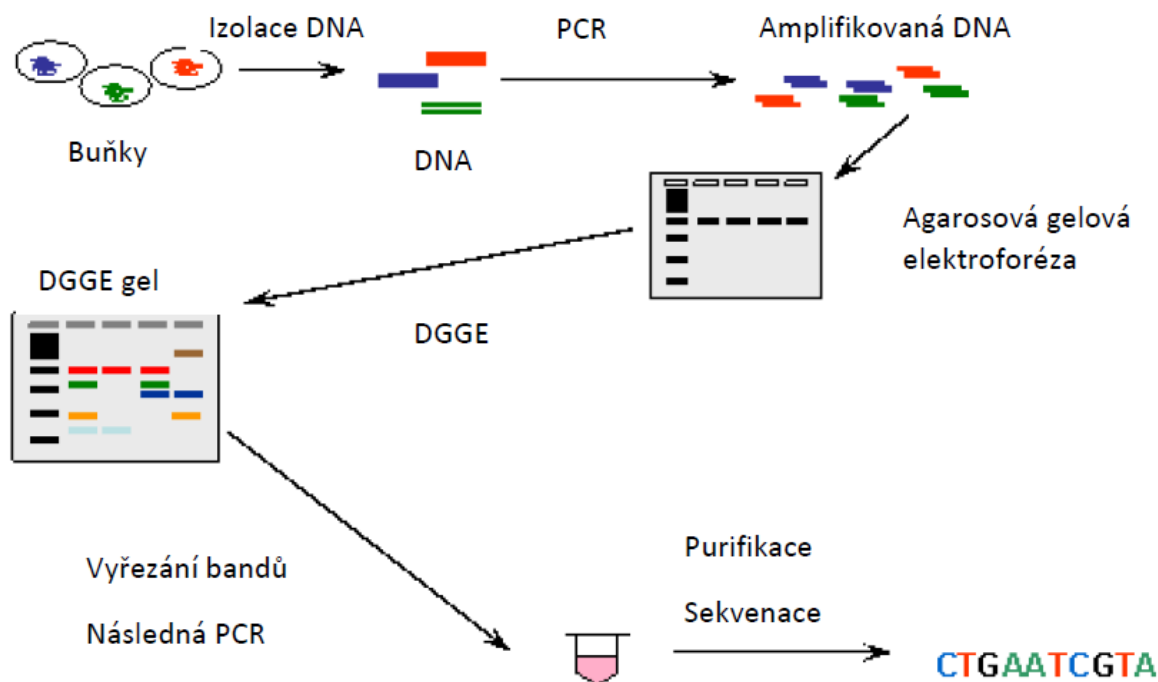
$n2$ - počet ploten použitých pro výpočet z druhého ředění

d - první pro výpočet použité ředění

V - objem očkovaného vzorku

6.4 Molekulárně biologická analýza

Ke studiu diverzity mikroorganismů ve FMV byla použita metoda DGGE. Její zdárné provedení, vizualizace a interpretace výsledků závisí na všech souvisejících krocích od izolace DNA až po identifikaci mikroorganismů (obrázek 2).



Obrázek 2: Schéma všech kroků metody DGGE [46]

6.4.1 Izolace DNA

Izolace DNA z potravinových vzorků

Salámy jsou z hlediska izolace DNA složitou maticí. Mají vysoký obsah tuku, proteinů a sacharidů, což při nedostatečné separaci DNA může způsobit inhibice následných metod. Proto bylo nutné celý postup izolace DNA optimalizovat. Metody optimalizace izolace DNA nejsou předmětem této práce. Zabývali se jimi ve svých pracích Ing. Iveta Kalousová a Bc. Lukáš Bednář [44, 45].

Pro izolaci DNA bylo vždy použito 10 g salámu, díla či koření a smícháno se sterilní destilovanou vodou v poměru 1:2. Z každé tyče byly odebírány dva vzorky, jeden z I. vrstvy (okrajová vrstva) a druhý z III. vrstvy (střed) dle obrázku 1. Z plátků salámů byly odebírány vždy 3 plátky a z nich pak odváženo 10 g. Všechny takto připravené vzorky byly přeneseny do sterilního plastového sáčku. Obsah sáčku byl homogenizován za použití Stomacheru po

dobu 2 minut a následně přefiltrován přes sterilní gázu. Získaný filtrát byl použit pro izolaci DNA.

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

1. Do 2ml zkumavky bylo přidáno 1,8 ml filtrátu. Obsah zkumavky byl centrifugován při 13 000 x g po dobu 1 minuty při pokojové teplotě. Supernatant byl odpipetován tak, aby na dně zkumavky zůstala jen peleta - mikrobiální biomasa.
2. Buněčná peleta byla resuspendována ve 450 µl lyzačního pufru PF1, který byl před použitím zahříván na 55 °C.
3. Resuspendované buňky byly přemístěny do zkumavky obsahující rozbíjecí kuličky a následně vortexovány v horizontální poloze na vortexu Genie 2 po dobu 10 minut při maximální rychlosti. V tomto kroku došlo nejen k chemické lyzi, ale i k mechanickému narušení buněčných stěn a k vyplavení DNA do roztoku.
4. Vzorky byly centrifugovány 1 minutu při 13 000 x g. Supernatant obsahující DNA byl přenesen do čisté 2ml zkumavky.
5. K supernatantu bylo přidáno 100 µl roztoku PF2, který umožnil vysrážení nežádoucích zbytků buněk. Směs byla krátce promíchána na vortexu a následně inkubována 5 minut při 4 °C.
6. Směs byla centrifugována 1 minutu při 13 000 x g a pokojové teplotě. Supernatant obsahující DNA byl přenesen do čisté 2ml zkumavky.
7. Do zkumavky bylo přidáno 900 µl roztoku PF3 který díky vysokému obsahu soli způsobil vysrážení DNA.
8. 650 µl směsi bylo přeneseno do kolonky obsahující křemičitou membránu a centrifugováno 1 minutu při 13 000 x g a při pokojové teplotě. Přefiltrovaná tekutina byla vylita. Do kolonky byl přenesen zbytek směsi, centrifugace byla opakována a filtrát byl opět vylit. V tomto kroku došlo k navázání DNA na membránu kolonky. Všechny kontaminující složky přešly do filtrátu.
9. Kolonka se zachycenou DNA byla přemístěna do čisté 2ml zkumavky. Do kolonky bylo přidáno 650 µl promývacího roztoku PF4. Obsah byl centrifugován při 13 000 x g po dobu 1 minuty.
10. Přefiltrovaná tekutina byla ze zkumavky vylita. Do kolonky bylo přidáno 650 µl roztoku PF5. Obsah byl opět centrifugován při 13 000 g 1 minutu.

11. Přefiltrovaná tekutina byla ze zkumavky vylita. Kolonka byla centrifugována bez přidání roztoku při 13 000 g 2 minuty, aby došlo k odstranění veškerého promývacího roztoku PF5.
12. Kolonka byla přenesena do čisté 2ml zkumavky a převrstvena 50 µl roztoku PF6, který byl před použitím zahříván na 70 °C.
13. Zkumavka s kolonkou byla centrifugována při 13 000 x g po dobu 1 minuty. Tím došlo k uvolnění izolované DNA z membrány do pufu.

Izolace DNA ze startovací kultury

Lyofilizovaná startovací kultura byla pomocí sterilní bakteriologické kličky přenesena do sterilního masopeptonového bujónu (pepton 5,0 g/l, chlorid sodný 5,0 g/l, hovězí extrakt 1,5 g/l, kvasničný extrakt 1,5 g/l, pH 7,4 ± 0,2, vše HiMedia) a kultivována při laboratorní teplotě po dobu 72 hodin. Po namnožení mikroorganismů byla ze suspenze izolovaná DNA pomocí komerční soupravy High Pure PCR Template Preparation Kit (ROCHE). Izolace probíhala následovně:

1. Do mikrozkušavky bylo přidáno 1,5 ml suspenze bakteriálních buněk. Suspenze byla centrifugována po dobu 5 minut při 13 000 x g.
2. Supernatant byl odstraněn a ve 200 µl PBS byla peleta bakteriálních buněk resuspendována.
3. Do mikrozkušavky bylo přidáno 5 µl lyozymu (10 mg/ml v 10mM Tris-HCl, Sigma-Aldrich) a směs byla inkubována při teplotě 37 °C po dobu 15 minut.
4. Ke vzorku bylo přidáno 200 µl Binding Buffer a 40 µl proteinázy K. Směs byla promíchána a inkubována při teplotě 70 °C po dobu 10 minut.
5. Ke směsi bylo přidáno 100 µl izopropanolu. Obsah mikrozkušavky byl dobře promíchán.
6. Směs byla přenesena do kolonky a centrifugována 1 minutu při 8 000 x g. Došlo k navázání DNA na membránu kolonky.
7. Kolonka byla přenesena do nové zkumavky. Do kolonky bylo přidáno 500 µl Inhibitor Removal Buffer.
8. Vzorky byly centrifugovány 1 minutu při 8000 x g.
9. Kolonka byla opět přenesena do nové zkumavky. Do kolonky bylo přidáno 500 µl Wash Buffer.

10. Vzorčky byly centrifugovány 1 minutu při 8 000 x g. Tento postup byl ještě jednou opakován. Přefiltrovaná kapalina byla ze zkumavky vylita a celá filtrační sestava byla znovu centrifugována 10 sekund při maximální rychlosti.
11. Kolonka byla přenesena do čisté sterilní 1,5 ml mikrozkušavky a do kolonky bylo přidáno 30 µl Elution Buffer zahřátého na 70 °C.
12. Po 15 minutách inkubace při laboratorní teplotě byl vzorek centrifugován 1 minutu při 8 000 x g. Došlo k uvolnění DNA z membrány kolonky do pufru.

Koncentrace a čistota DNA vzorků salámů, díla, koření a kultury byla změřena na spektrofotometru. Poté byla DNA uchovávána při 4 °C a po ukončení všech molekulárně biologických analýz byla zmrazena na -20 °C.

Kontrola koncentrace a čistoty DNA

Koncentrace a čistota veškeré izolované DNA byla ověřena na spektrofotometru TECAN INFINITE 200 PRO při vlnové délce 260 a 280 nm.

1. Do dvanácti jamek destičky Nano Quant, která spadá do příslušenství ke spektrofotometru, bylo pipetováno po 2 µl blanku (PF6 nebo Elution Buffer).
2. Byla změřena absorbance
3. Destička byla pečlivě očištěna a na místo blanku byly pipetovány vzorky DNA.
4. Opět byla změřena absorbance a vygenerována hodnota koncentrace v ng/µl a čistoty DNA. Čistota je dána poměrem obsorbancí při 260 a 280 nm. DNA, která není znečištěná, má hodnotu poměru 1,8 – 2,0.

6.4.2 Optimalizace polymerázové řetězové reakce (PCR)

Před samotným provedením DGGE je nutné DNA namnožit pomocí PCR. Tato metoda však může vnést do výsledků několik chyb, které se při DGGE projeví falešnými signály nebo špatnou čitelností produktů DGGE. Jedná se především o vznik nespecifických produktů. Jejich výskyt lze výrazně omezit vhodnou úpravou metodiky (např. zvýšením teploty nasedání primerů, snížením počtu cyklů, snížením koncentrace templátové DNA) [49, 50].

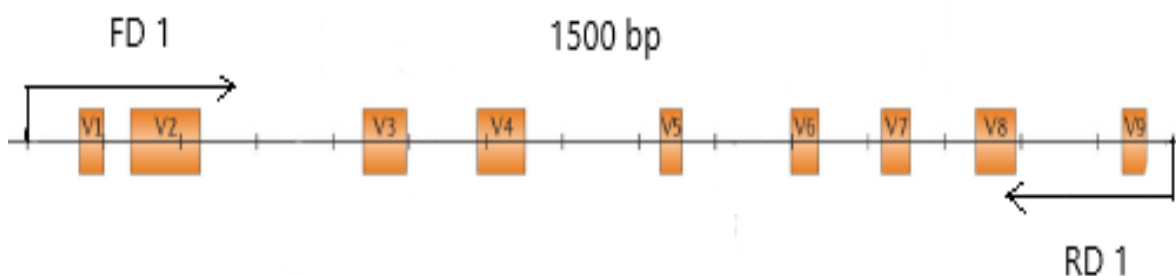
PCR byla provedena ve dvou krocích. Pro eliminaci PCR artefaktů byly oba kroky pozměněny (bod 1 – 4). Původní nezměněné postupy popsali ve svých pracích Bc. Lukáš Bednář a Ing. Iveta Kalousová [44, 45].

1. V prvním kroku PCR byla zvýšena teplota annealingu (nasedání primerů) na 62 °C. Ta se každý další cyklus snižovala o 0,5 °C až na teplotu 57 °C (Touch Down PCR).

2. Byla snížena koncentrace templátu. Do PCR reakční směsi byl přidán 1 μ l 10 x naředěné DNA.
3. V druhém PCR kroku (Nested PCR) byl snížen počet cyklů na 30.
4. V obou PCR krocích byl použit GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix (Promega), který obsahuje vysoce specifickou DNA polymerázu, která by měla eliminovat výskyt PCR artefaktů.

První krok PCR

Za cílové místo amplifikace byl zvolen bakteriální gen 16S rRNA který obsahuje velké množství variabilních oblastí (obrázek 3). PCR byla provedena pomocí primerů FD1 RD1 a získaný produkt byl dlouhý přibližně 1500 bp [51].



Obrázek 3: Úsek 16S rRNA genu amplifikovaný v prvním PCR kroku

PCR probíhala v reakční směsi o objemu 20 μ l, jejíž složení je uvedeno v tabulce 7. Použitý GoTaq® Hot Start Green MasterMix (Promega) obsahoval DNA polymerázu, deoxynukleotidy (dNTP), $MgCl_2$ a reakční pufr. PCR směs byla pipetována v PCR boxu. Všechny použité komponenty včetně PCR plastů byly sterilní.

Tabulka č. 7: Složení reakční směsi pro první krok PCR

| | Objem [μ l] | Koncentrace |
|-----------------------------------|------------------|-------------------|
| GoTaq® Hot Start Green Master Mix | 10 | 2 x koncentrovaný |
| Sterilní PCR voda | 7 | |
| FD1 primer | 1 | 20 μ M |
| FD2 primer | 1 | 20 μ M |
| DNA | 1 | 10 x zředěná |
| celkem | 20 | |

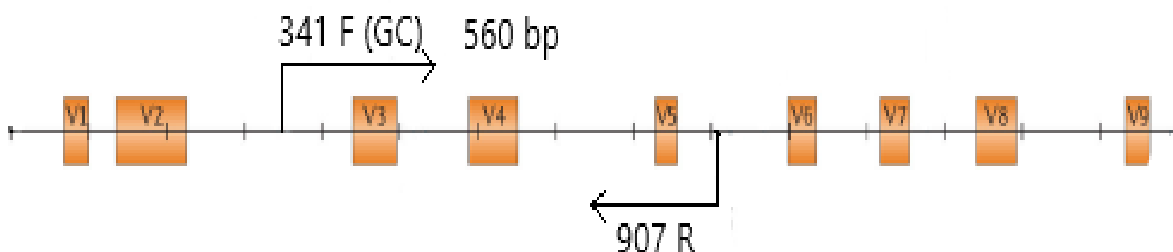
Samotná PCR probíhala v termocykleru za použití programu Touch Down (tabulka 8). Podstatou této metody je postupné snižování teploty annealingu. Počáteční vysoká teplota brání amplifikaci nespecifických sekvencí molekuly DNA. Zvyšuje se tedy pravděpodobnost amplifikace požadované sekvence.

Tabulka č. 8: Touch Down PCR program

| | Teplota [°C] | Čas [min] | Počet cyklů |
|----------------------|--------------|-----------|----------------|
| Počáteční denaturace | 95 | 3 | |
| Denaturace | 95 | 0,5 | 10 |
| Annealing | 62 | 0,5 | - 0,5 °C |
| Elongace | 72 | 1,5 | v každém cyklu |
| Denaturace | 95 | 0,5 | 25 |
| Annealing | 57 | 0,5 | |
| Elongace | 72 | 1,5 | |
| Závěrečná elongace | 72 | 10 | |
| | 4 | ∞ | |

Druhý krok PCR

Druhá PCR, tzv. nested PCR, byla provedena pomocí primerů 341F (GC) a 907R [37, 52]. Jedná se o následnou PCR, kde je použit produkt z první reakce jako templát. Výsledkem druhé amplifikace byl PCR produkt dlouhý 560 bp (obrázek 4).



Obrázek 4: úsek 16S rRNA genu amplifikovaný ve druhém PCR kroku

Reakční směs byla smíchána v PCR boxu. Všechny použité komponenty byly sterilní. Složení směsi pro druhý krok PCR je uvedeno v tabulce 9.

Tabulka č. 9: Složení reakční směsi pro druhý krok PCR

| | Objem [μ l] | Koncentrace |
|-----------------------------------|------------------|-------------------|
| GoTaq® Hot Start Green Master Mix | 10 | 2 x koncentrovaný |
| Sterilní PCR voda | 7 | |
| 341 F (GC) primer | 1 | 20 μ M |
| 907 R primer | 1 | 20 μ M |
| PCR produkt první reakce | 1 | |
| celkem | 20 | |

PCR probíhala v termocykleru za použití upraveného programu Nested PCR. Počet cyklů byl snížen na 30 (tabulka č. 10).

Tabulka č. 10: Nested PCR program

| | Teplota [$^{\circ}$ C] | Čas [min] | Počet cyklů |
|----------------------|-------------------------|-----------|-------------|
| Počáteční denaturace | 95 | 3 | |
| Denaturace | 95 | 0,5 | 30 |
| Annealing | 57 | 0,5 | |
| Elongace | 72 | 1 | |
| Závěrečná elongace | 72 | 10 | |
| | 4 | ∞ | |

Úspěšnost provedené PCR, specifita a délka produktů byla zkontrolována elektroforeticky.

6.4.3 Elektroforetická separace PCR produktů

Elektroforetická kontrola produktů probíhala v 1 % agarózovém gelu.

1. Do Erlenmayerovy baňky bylo naváženo vypočítané množství agarózy (Lonza).

2. K agaróze byl přidán 1x koncentrovaný TAE pufr (50 x TAE: 2 M Tris, 0,05 M EDTA Na₂, 1 M kyselina octová, vše Sigma-Aldrich).
3. Směs byla v mikrovlnné troubě přivedena k varu a rozpuštěna.
4. Čirý agar se mírně ochladil a poté k němu byl přidán ethidium-bromid (toxické interkalační činidlo, které po navázání na DNA umožňuje její vizualizaci, Sigma-Aldrich).
5. Agar byl vylit do horizontální aparatury s hřebínkem.
6. Po zatuhnutí byl hřebínek odstraněn a agar vložen do elektroforetické vany s 1x koncentrovaným TAE pufrem.
7. Do jamek v gelu, které byly k dispozici po vyjmutí hřebínku, bylo nanášeno 5 µl PCR produktu a 5 µl srovnávacího markeru (100 bp DNA Ladder, Biolabs)
8. Elektroforetická vana byla zapojena do zdroje elektrického napětí, na kterém bylo nastaveno 90 V.
9. Elektroforetická separace trvala 20 minut.
10. Poté byl gel umístěn do transiluminátoru a pod UV světlem, pomocí fotodokumentárního systému GeneSnap, pozorován a zdokumentován.

6.4.4 Optimalizace DGGE

Pokud je ve studovaném vzorku přítomno velké množství bakteriálních druhů, výsledný DGGE gel může vypadat rozmazaně a jednotlivé bandy nejsou ostré nebo také nemusí být vidět vůbec. Na gelu je namísto separovaných bandů nečitelný shluk (smear). Proto je nutné některé kroky v metodice optimalizovat.

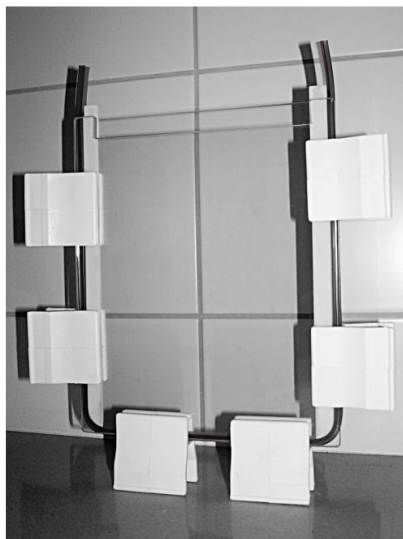
Pro dosažení co nejlepšího rozlišení, intenzity signálu a separace bandů, bylo vyzkoušeno několik možností.

1. Byly otestovány tři koncentrační gradienty denaturačních činidel 20 % a 80 %, 30 % a 70 %, 40 % a 60% v polyakrylamidovém gelu.
2. Pro zvýšení intenzity signálů byly vyzkoušeny tři objemy dávkování PCR produktů do gelu a to 5 µl, 8 µl a 12 µl.
3. Byla otestována různá kombinace napětí a času elektroforézy a to tak, že elektroforetická separace probíhala při 150 V 420 minut, 90 V 900 minut a 120 V 900 minut.

Sestavení aparatury, příprava gelu a elektroforéza

1. Před použitím byly všechny komponenty skleněné aparatury omyty etanolem.

2. Aparatura se skládala ze dvou k sobě přiléhajících skel, mezi kterými bylo umístěno gumové těsnění a dva spacers k zajištění mezery pro gel.
3. Skla byly k sobě připevněny ze všech stran několika sponami (obrázek 5).



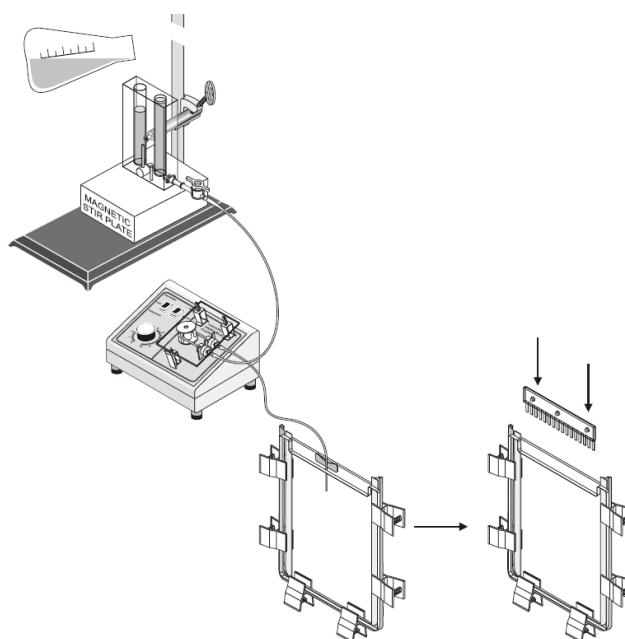
Obrázek 5: Aparatura pro gel

4. Gel byl připraven ze dvou zásobních denaturačních roztoků, které měly různou koncentraci denaturačních činidel. Po otestování tří kombinací byly použity roztoky poskytující gel s nejlepším rozlišením, a to o koncentraci 30% a 70 %. Složení roztoků je uvedeno v tabulce č. 11.

Tabulka č. 11: Složení denaturačních roztoků na 100 ml objemu [53]

| | 10% | 20% | 30% | 40% | 50% | 60% | 70% | 80% | 90% | 100% |
|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 40% Acrylamide/Bis (ml) | 18.8 | 18.8 | 18.8 | 18.8 | 18.8 | 18.8 | 18.8 | 18.8 | 18.8 | 18.8 |
| 50x TAE Buffer (ml) | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Formamide (ml) | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 | 24 | 28 | 32 | 36 | 40 |
| Urea (g) | 4.2 | 8.4 | 12.6 | 16.8 | 21 | 25.2 | 29.4 | 33.6 | 37.8 | 42 |

5. K denaturačním roztokům o objemu 15 ml byly přidány polymerační činidla amonium persulfát (10 %) 104,4 μ l a TEMED 6,5 μ l (Sigma-Aldrich).
6. Oba roztoky byly promíchány a nality do tzv. markeru gradientu, který je součástí plnicího systému a který zajišťuje koncentrační gradient denaturačních činidel v gelu.
7. Sestavení plnicího systému a propojení s aparaturou bylo provedeno dle obrázku 6.
8. Po zapnutí míchadla, mini peristaltické pumpy a po otevření ventilů byla aparatura naplněna polyakrylamidovým gelem který polymeroval jednu hodinu.



Obrázek 6: Plnicí systém gelu (marker gradient, mini peristaltická pumpa a gelová aparatura)[53]

9. Po ukončení polymerace byla aparatura s gelem vložena do DGGE přístroje, který byl naplněn 1 x koncentrovaným TAE pufrem (složení: kapitola 6.4.3).
10. Do gelu bylo nadávkováno 8 μ l PCR produktu a stejné množství srovnávacího markeru (100 bp DNA Ladder, Biolabs).
11. DGGE probíhala při napětí 90 V po dobu 900 minut.
12. Po ukončení elektroforézy byl gel opatrně vyndán z aparatury a přemístěn do barvicí lázně s interkalačním barvivem GelRed (Biotium). Barvicí lázeň obsahovala 350 ml 1x koncentrovaného TAE pufru (složení: kapitola 6.4.3) a 35 μ l barviva.
13. Barvení probíhalo za mírného třepání 400 rpm v třepačce jednu hodinu.
14. Po obarvení byl gel přemístěn do transiluminátoru. Byl vizualizován pod UV světlem a pomocí fotodokumentačního systému GeneSnap vyfotografován.

6.4.5 Reamplifikace produktů DGGE

Aby mohla být provedena sekvenace a identifikace bakteriálních druhů, musely být jednotlivé bandy z gelu vyříznuty, reamplifikovány a purifikovány.

1. Vybrané bandy byly z gelu vyříznuty skalpelem a přeneseny do sterilních 1,5 ml mikrozkušavek s 200 μ l sterilní vody pro PCR a sterilními skleněnými kuličkami.

2. Obsah zkumavek byl krátce promíchán na vortexu. Poté byly vzorky inkubovány při 4 °C do druhého dne pro umožnění difúze DNA z gelu do kapalné fáze.
3. Reamplifikace byla provedena za stejných podmínek jako druhý krok PCR (kapitola 6.4.2) s tím rozdílem že primer 341 F byl použit bez GC svorky a jako templát byl přidán 1 µl DNA z gelu.
4. Po skončení PCR programu byly vzorky elektroforeticky separovány na 2 % agarózovém gelu (kapitola 6.4.3) a vyříznuty.

6.4.6 Purifikace PCR produktů z agarózového gelu

Vzorky byly purifikovány od potencionálních inhibitorů sekvenační reakce. Pro purifikaci vyříznutých produktů z gelu byla použita komerční souprava High Pure PCR Product Purification Kit (ROCHE).

1. PCR produkt vyříznutý z gelu byl dán do 1,5 ml mikrozkušavky.
2. K produktu bylo přidáno 300 µl Binding Bufferu. Směs byla promíchána a inkubována při 56 °C dokud nedošlo k úplnému rozpuštění agarózy.
3. Ke vzorku bylo přidáno 150 µl isopropanolu a směs byla promíchána na vortexu.
4. Celý objem byl přepipetován do kolonky se silikátovou membránou a centrifugován 30 sekund při 13 000 x g. Došlo k navázání DNA na membránu a proteklý roztok byl odstraněn.
5. Do kolonky bylo přidáno 500 µl Wash Bufferu a vše bylo centrifugováno 1 minutu při 13 000 x g.
6. Proteklá frakce byla odstraněna a do kolonky bylo přidáno 200 µl Wash Bufferu. Vše bylo opět centrifugováno 1 minutu při 13 000 x g.
7. Kolonka byla dána do nové sterilní 1,5 ml zkumavky a membrána byla převrstvena 30 µl Elution Bufferu, který byl před použitím zahříván na 70 °C.
8. Vše bylo opět centrifugováno 1 minutu při 13 000 x g a následně došlo k uvolnění DNA z membrány do pufu.

6.4.7 Sekvence a identifikace mikroorganismů

Purifikované PCR produkty byly smíchány s příslušným primerem dle tabulky č. 12 a v PCR zkumavkách byly odeslány na sekvenaci do firmy SEQme s.r.o.

Tabulka č. 12: Příprava vzorků na sekvenaci

| | Objem [μ l] | Koncentrace |
|-----------------------|------------------|-------------|
| Primer 341 F (bez GC) | 1,25 | 20 μ M |
| PCR produkt | 7,75 | neředěný |
| Celkem | 10 | |

Zjištěné nukleotidové sekvence DGGE produktů byly porovnány se známými sekvencemi bakterií v databázi BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Tento program vyhledal v databázi nejvíce podobné sekvence DNA konkrétních bakterií k vložené neznámé sekvenci a zároveň určil spolehlivost identifikace (identifikační skóre).

7 VÝSLEDKY A DISKUSE

7.1 Mikrobiologická analýza

Vzorky salámů (tyčí a plátků vyrobených dvěma technologiemi), díla a koření byly mikrobiologicky otestovány. Výsledky byly zpracovány v programu MS Excel. Všechny hodnoty CFU/g byly zlogaritmovány pro lepší vizualizaci.

Primárním zdrojem mikroorganismů ve FMV jsou vstupní suroviny [54]. Proto bylo mikrobiologicky otestováno dílo a koření použité pro výrobu FMV. Dle tabulky 13 lze říci, že vstupní suroviny obsahovaly vysoké počty mikroorganismů rodu *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus* ale také nežádoucích bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*. Z důvodu množení nežádoucí mikroflóry a tvorby látek negativně ovlivňujících vlastnosti výrobku se při výrobě salámu použila startovací kultura.

Tabulka č. 13: Mikrobiologický rozbor vstupních surovin (log CFU/g)

| | CPM | LAB | Mléčné koky | CNS | Enterobakterie | Kvasinky a plísně |
|-----|------|-------------|-------------|------|----------------|-------------------|
| *11 | 6,08 | 4,30 | 6,11 | 4,83 | 4,31 | 4,72 |
| *12 | 5,32 | 4,18 | 5,48 | 4,79 | 3,36 | 3,81 |
| *21 | 6,48 | 5,66 | 5,75 | 6,24 | 3,40 | 4,13 |
| *22 | 5,81 | 4,49 | 5,75 | 5,10 | 4,51 | 4,46 |
| *K | 5,11 | nestanoveno | 5,67 | 4,96 | 3,30 | < 1 |
| *Q | 5,43 | nestanoveno | 5,57 | 4,96 | 2,44 | < 1 |

*11,12,21,22 dílo

*K - koření klasická výroba

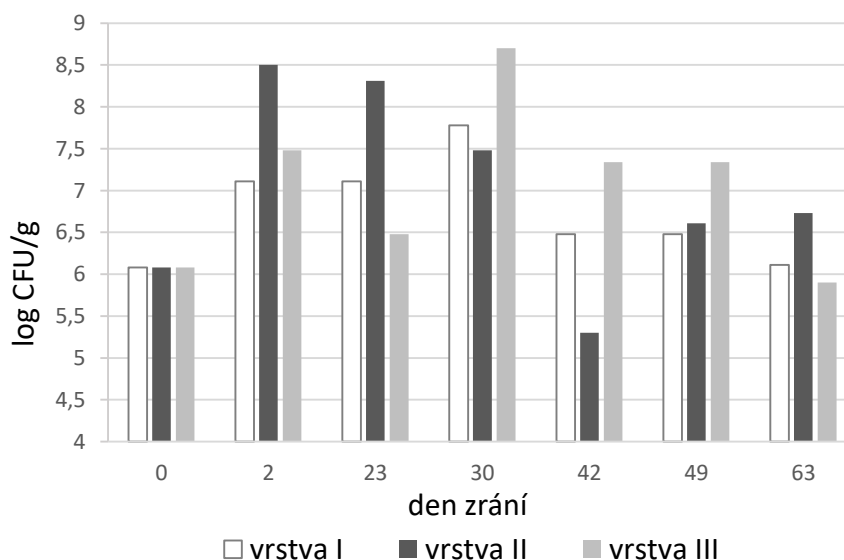
*Q - koření výroba QDS

Během fermentace, zrání a skladování byly enterobakterie postupně redukovány a nakonec usmrceny. Výsledky mikrobiologické analýzy ukázaly, že u vyrobených salámů došlo k úplnému usmrcení již do 23. dne zrání. U žádného výrobku na konci doby zrání a skladování nebyly životaschopné enterobakterie detekovány. To bylo způsobeno vysokou aktivitou přítomných bakterií mléčného kvašení (BMK) a rychlým okyselením prostředí.

Kvasinky a plísně detekované v díle byly usmrceny již první dny zrání. Nevyskytovaly se u žádného finálního produktu.

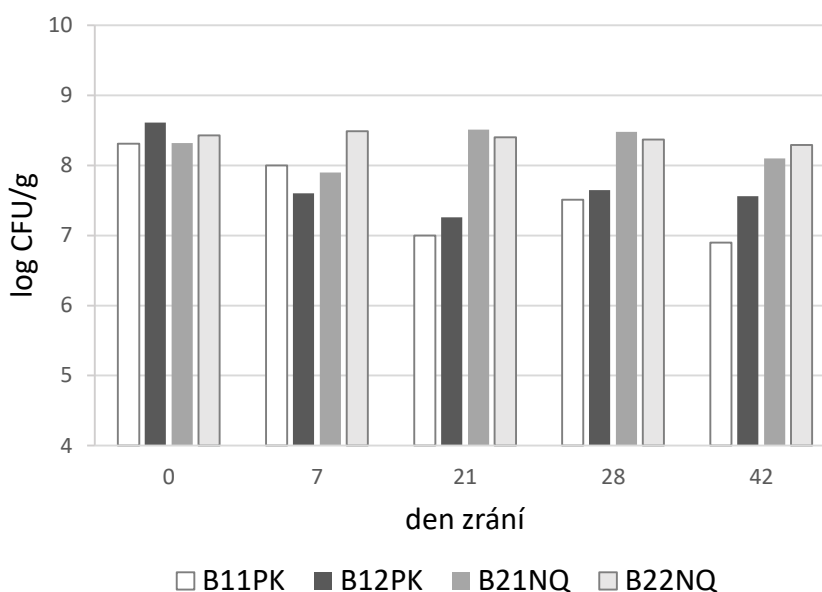
Pokud by došlo k výrobě bez přidání startovací kultury, bylo by zde riziko narušení zdravotní nezávadnosti výrobků z důvodu vysokého obsahu enterobakterií v díle. Vývoj BMK a tvorba nepříznivých podmínek pro enterobakterie by byly pomalejší [23].

Celkové počty mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních bakterií (CPM) se v průběhu zrání a skladování významně měnily. V konečném důsledku se počty CPM na začátku a na konci sledovaného období příliš nelišily. Byly zaznamenány rozdíly CPM mezi jednotlivými vrstvami u tyčí salámů (obrázek 7). K největším změnám docházelo u II. a III. vrstvy. U II. vrstvy došlo k prudkému nárůstu CPM už druhý den zrání a to až o tři řády. Poté CPM klesal. U III. vrstvy docházelo ke zvyšování CPM pozvolna. Největší nárůst byl zaznamenán 30. den zrání. Nejmenší rozdíly v aktivitě mikroorganismů probíhaly v I. vrstvě. To mohlo být způsobeno nízkou aktivitou vody a nejméně příznivými podmínkami pro množení mikroorganismů v povrchových vrstvách tyčí salámů [5, 8].



Obrázek 7: Vývoj CPM v různých vrstvách tyčí salámu vyrobeného klasickou technologií během zrání a skladování.

Rozdíly v CPM u plátků vyrobených klasickou výrobou a QDS výrobou jsou znázorněny na obrázku 8. U salámů vyrobených klasickou cestou se CPM od prvního dne zrání rychle snižovaly. U QDS tomu tak nebylo. CPM se během celé doby zrání výrazněji neměnily. Konečné hodnoty se u obou technologií výroby od sebe lišily téměř o dva řády, přitom počáteční hodnoty byly obdobné.

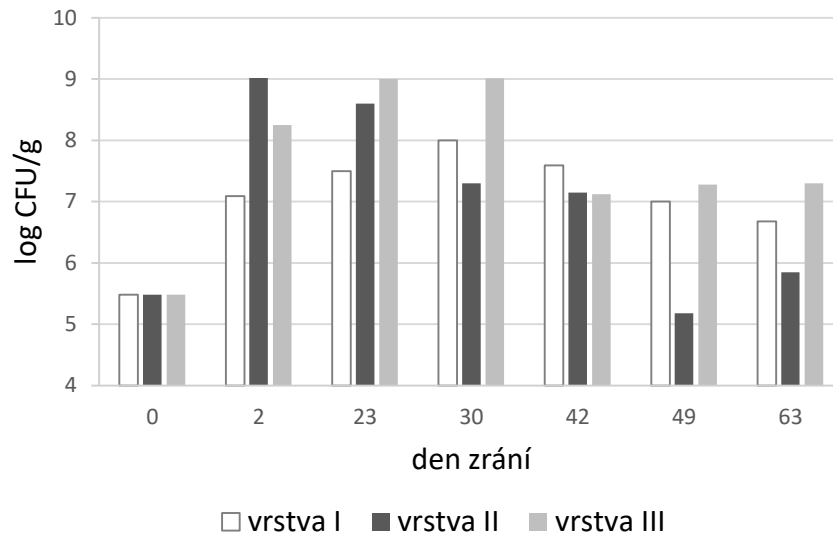


Obrázek 8: Vývoj CPM u plátků vyrobených klasickou a QDS metodou.

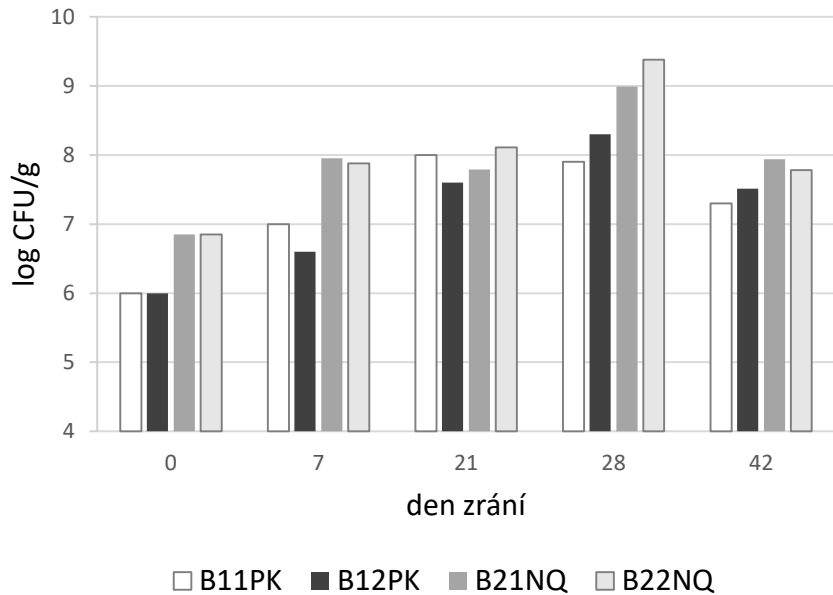
B11PK, B12PK – plátky klasická výroba

B21NQ, B22NQ – plátky QDS výroba

Vývoj mléčných koků v jednotlivých vrstvách u tyčí je znázorněn na obrázku 9. Počty mikroorganismů se v jednotlivých vrstvách lišily. Od počátku počet mléčných koků prudce rostl a to nejvíce ve druhé vrstvě. Hodnoty se zvýšily až o čtyři řády, poté začaly klesat. V první povrchové vrstvě docházelo k nárůstu velmi pozvolna. Třicátý den zrání hodnoty první vrstvy dosáhly maximum, které bylo o jeden řád nižší než u vrstev ostatních. Po ukončení zrání byly počty mléčných koků vyšší než na počátku zrání a skladování.



Obrázek 9: Vývoj mléčných koků v různých vrstvách tyčí salámů vyrobených klasickou technologií během doby zrání a skladování.

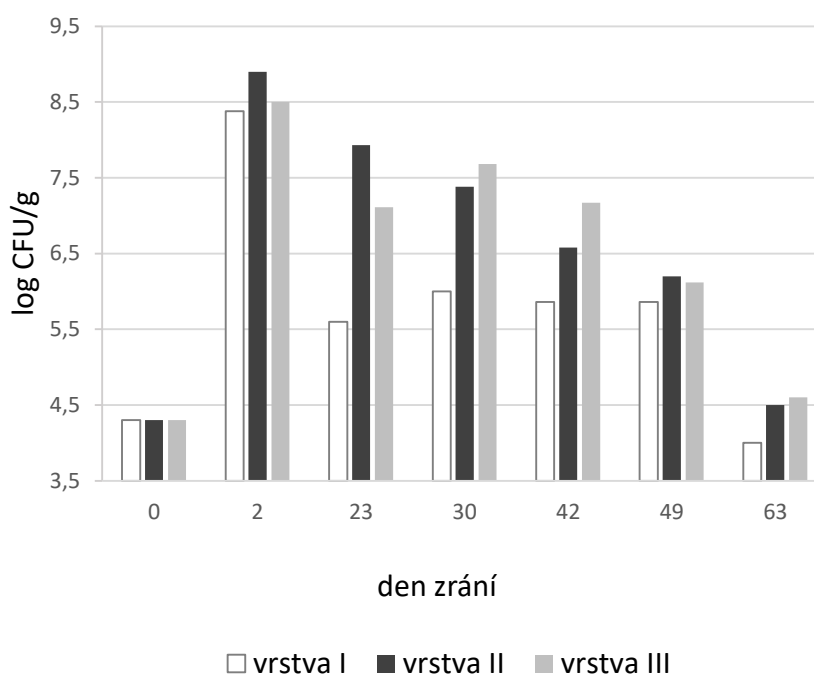


Obrázek 10: Vývoj mléčných koků u plátků vyrobených klasickou a QDS metodou.

B11PK, B12PK – plátky klasická výroba

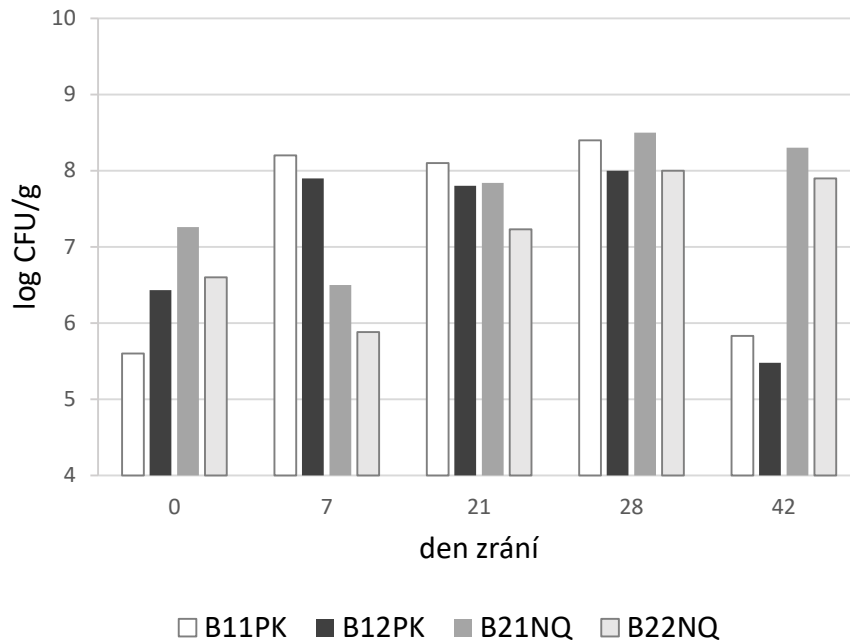
B21NQ, B22NQ – plátky QDS výroba

Rozdíly počtů mléčných koků u plátků vyrobených klasickou a QDS výrobou jsou znázorněny na obrázku 10. U všech výrobků docházelo k pozvolnému zvyšování počtů mléčných koků až do 28. dne zrání. Maximální hodnoty se od počátečních lišily o dva řády. Od dvacátého osmého dne počet mléčných koků klesal. U obou typů výroby byl na konci doby zrání počet životaschopných mléčných koků o zhruba jeden řád vyšší než na začátku. Vzhledem k počátečním a konečným hodnotám, nebyl zaznamenán mezi oběma technologiemi výrazný rozdíl.



Obrázek 11: Vývoj laktobacilů v různých vrstvách tyčí salámů vyrobených klasickou technologií během doby zrání a skladování.

Vývoj laktobacilů (LAB) v jednotlivých vrstvách u tyčí je znázorněn na obrázku 11. Jejich počty se mezi vrstvami po celou dobu příliš nelišily. Od začátku počet LAB prudce rostl a již druhý den dosáhl maximální hodnoty, která se zvýšila o čtyři řády. Od druhého dne počet LAB pozvolna klesal. V I. okrajové vrstvě byl pokles nejstrmější. Poslední den zrání byly hodnoty I. vrstvy o půl řádu nižší než na počátku. Ve II. a III. středové vrstvě byly počty o půl řádu vyšší.

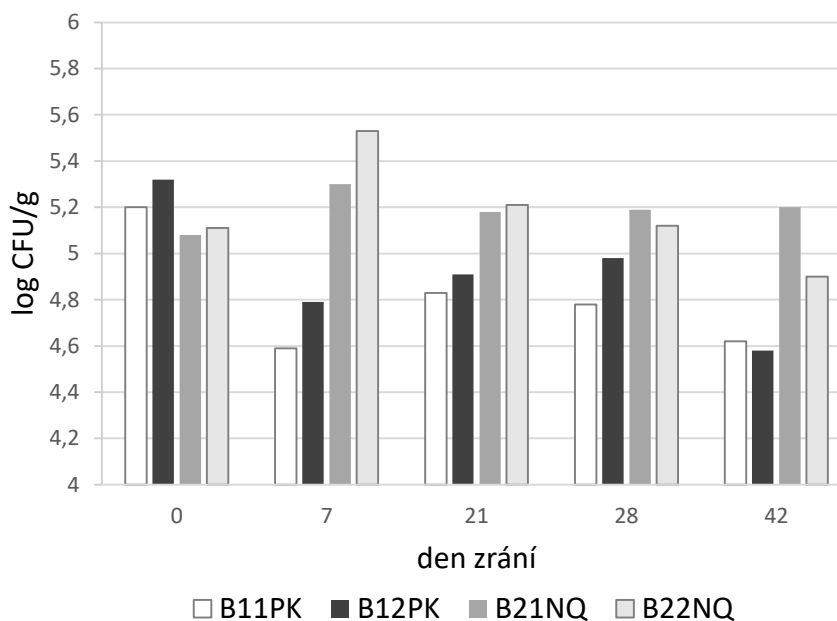


Obrázek 12: Vývoj laktobacilů u plátků vyrobených klasickou a QDS metodou.

B11PK, B12PK – plátky klasická výroba

B21NQ, B22NQ – plátky QDS výroba

Rozdíly v počtu LAB u plátků vyrobených klasickou a QDS výrobou jsou znázorněny na obrázku 12. U salámů vyrobených klasickou cestou se počet LAB od prvního dne zrání rychle zvyšoval a už sedmý den dosáhl svého maxima. Od třicátého dne počet LAB prudce klesal. U QDS tomu tak nebylo. Počet LAB do sedmého dne mírně poklesl, ale pak začal růst. Maximální počty byly u QDS plátků dosaženy kolem 30. dne a zůstaly vysoké až do konce doby zrání a skladování.



Obrázek 13: Vývoj CNS u plátek vyrobených klasickou a QDS metodou.

B11PK, B12PK – plátky klasická výroba

B21NQ, B22NQ – plátky QDS výroba

Vývoj koaguláza negativních stafylokoků (CNS) je znázorněn na obrázku 13. Po celou dobu zrání a skladování se hodnoty počtů CNS držely na více méně srovnatelné úrovni a to jak u tyčí tak i plátků. Hodnoty se pohybovaly v rozmezí 4,5 – 5,5 log CFU/g. U plátků vyrobených klasickou cestou se počty CNS celou dobu zrání mírně snižovaly. Hodnoty u plátků vyrobených QDS metodou se spíše neměnily (obrázek 13).

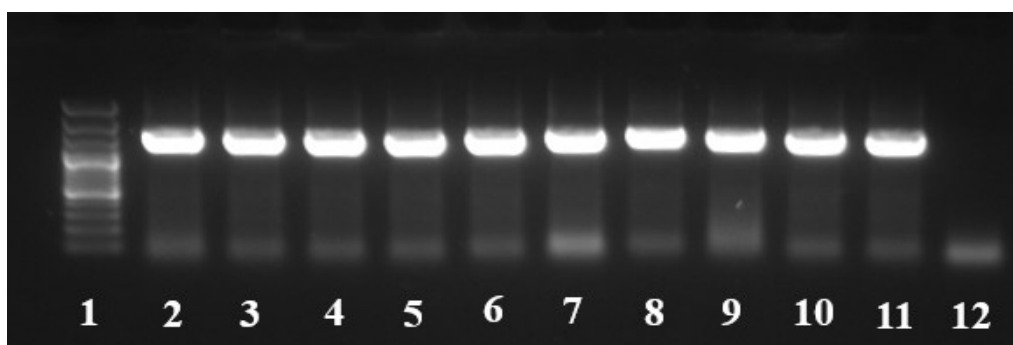
Během celé doby zrání a skladování byly LAB a mléčné koky dominantní skupinou mikroorganismů. U klasicky vyrobených salámů byly dosaženy maximální hodnoty již během prvních dnů zrání. LAB dosáhly počtu 8 – 9 log CFU/g a mléčné koky 8 – 9,5 log CFU/g. Tyto hodnoty jsou srovnatelné s publikovanými hodnotami jiných FMV [23, 24, 55]. Pokles životaschopnosti mléčných koků a LAB pozorovaný u salámů z klasické výroby je běžnou reakcí mikroorganismů na nepříznivé životní podmínky. Ty byly způsobeny především vyčerpáním živin během dlouhé doby zrání a skladování, nahromaděním metabolitů, poklesem pH, vodní aktivity a nárůstem koncentrace solí. Nejprudší pokles a nejnižší nárůst počtu laktobacilů a laktokoků byl zaznamenán u I. povrchové vrstvy u tyčí salámů. To bylo způsobeno především nízkou aktivitou vody v důsledku sušení a aerobním prostředím [5, 8].

Hodnoty počtů mikroorganismů konečných produktů vyrobených klasickou cestou se pohybovaly v rozmezí 3,5 – 4,5 log CFU/g u LAB a 4,5 – 7,0 log CFU/g u mléčných koků. Hodnoty mikroorganismů u FMV vyrobených QDS metodou se od dosaženého maxima do konce zrání příliš neměnily. U LAB se pohybovaly v rozmezí 7,9 – 8,3 log CFU/g, u mléčných koků 7,8 – 7,9 log CFU/g. Doba celého procesu výroby je u QDS technologie podstatně zkrácena. To značně ovlivňuje životaschopnost mikroorganismů a celkové počty na konci doby zrání a skladování [10, 11].

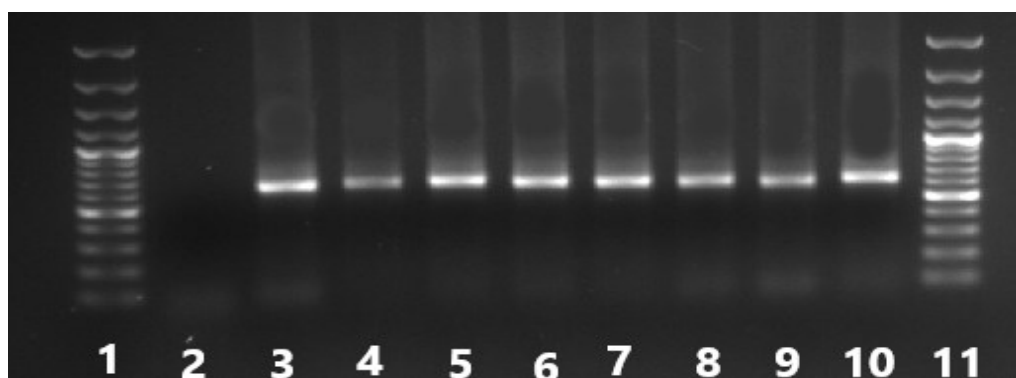
7.2 Molekulárně biologická analýza

7.2.1 PCR

Pro eliminaci PCR artefaktů, které by mohly ovlivnit následnou DGGE, byl pozměněn postup amplifikace úseků genu 16S rRNA (kapitola 6.4.2). V prvním kroku proběhla amplifikace PCR produktů pomocí primerů FD1 a RD1 (obrázek 14). V druhém kroku byly amplifikovány PCR produkty pomocí primerů 341FGC a 907R (obrázek 15).



Obrázek 14: První krok PCR amplifikace pomocí primerů FD1 a RD1
dráha 1 – marker, dráha 2 až 11 – vzorky B11PK a B21NQ v různých dnech odběru,
dráha 12 – negativní kontrola

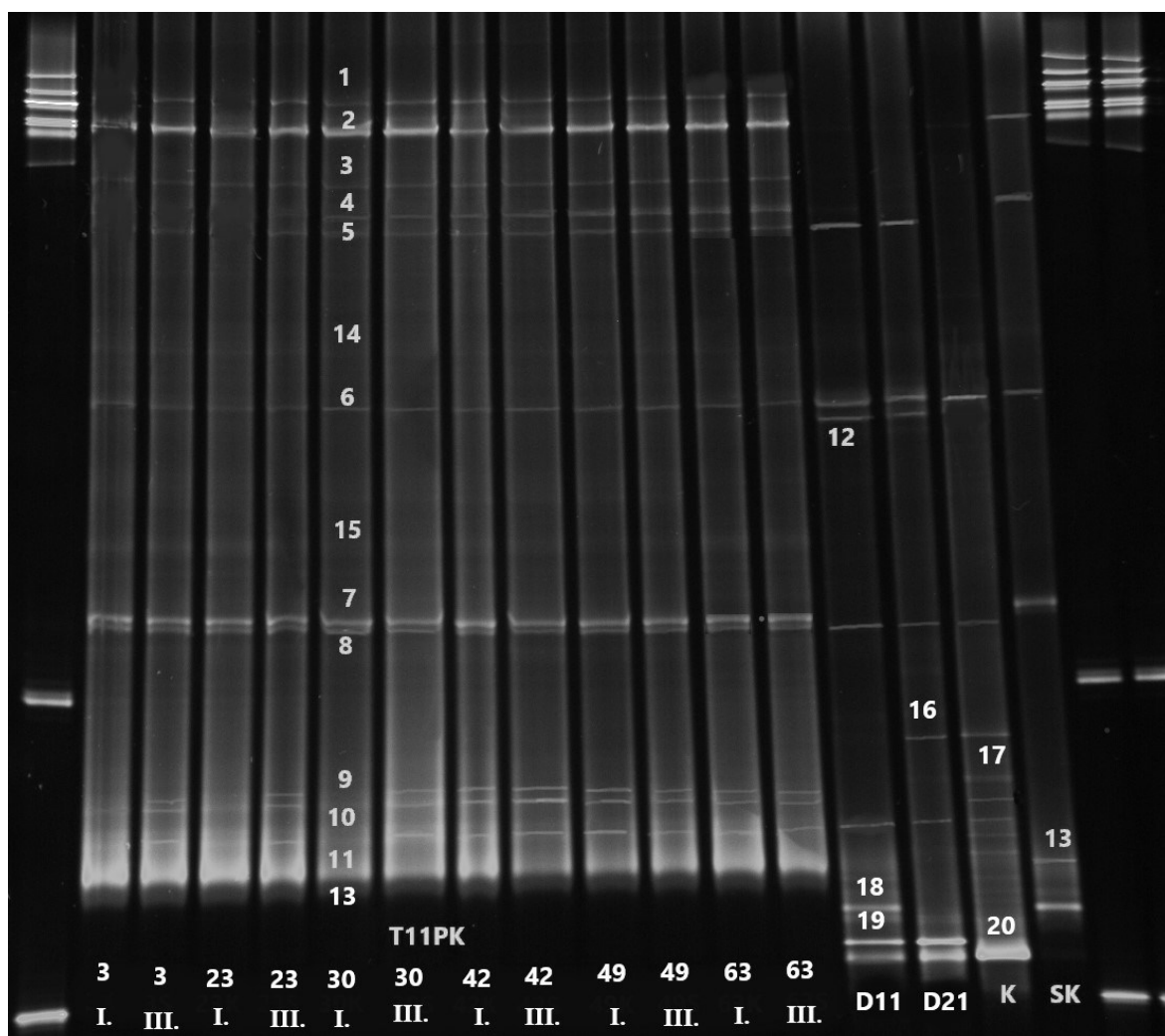


Obrázek 15: Druhý krok PCR amplifikace pomocí primerů 341FGC a 907 R
dráha 1 a 11 – marker, dráha 2 – negativní kontrola, dráha 3 – 10 vzorky B11PK a
B21NQ v různých dnech odběru

Všechny PCR produkty měly požadovanou délku, byly dostatečně intenzivní, bez jakýchkoliv viditelných nespecifických bandů.

7.2.2 DGGE

Pro dosažení co nejlepšího rozlišení, intenzity signálu a separace bandů byly otestovány tři koncentrační gradienty denaturačních činidel, tři objemy dávkování vzorků a různé kombinace napětí a času elektroforézy (kapitola 6.4.4). Byly vybrány parametry poskytující nejlepší výsledky. Následující DGGE gely byly provedeny s koncentračním gradientem denaturačních činidel 30 % a 70 %. Do gelu bylo nadávkováno 8 μ l každého vzorku. Elektroforéza probíhala při 90 V 900 minut.



Obrázek 16: DGGE gel 1 – mikroflóra vzorků tyčových salámů T11PK
 dráha 3 až 63 – den odběru, I. – vrstva I, III. – vrstva III, D11 – dílo 11, D21 – dílo 21,
 K – koření klasická výroba, SK – startovací kultura, signál 1 až 20 – viz. tabulka 11

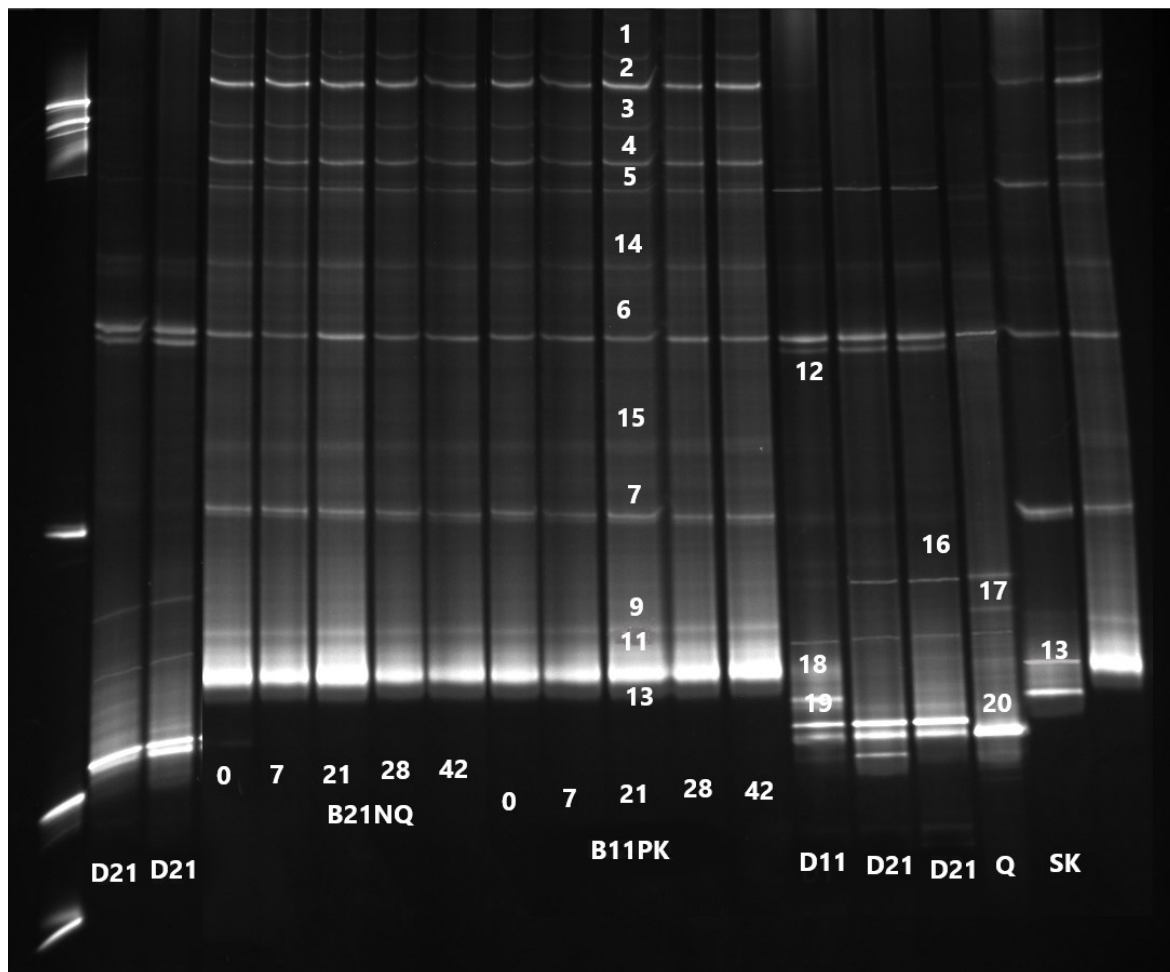
Na DGGE gelu 1 (obrázek 16) jsou vidět signály znázorňující mikroflóru vzorků tyčových salámů T11PK odebíraných v průběhu celé doby zrání a skladování (3. – 63. den). Mezi

jednotlivými odběry není velký rozdíl v intenzitě a počtu signálů. Pouze na začátku zrání jsou některé signály slabší a to hlavně u vzorků z I. vrstvy. To odpovídá výsledkům mikrobiologické analýzy, kde byly zaznamenány podstatné rozdíly v počtech mikroorganismů mezi vrstvami v důsledku různých podmínek pro jejich růst (kapitola 7.1).

U vzorků tyčí salámů vyrobených klasickou cestou se podařilo separovat pomocí DGGE a následně identifikovat čtrnáct signálů (Obrázek 16). Každý signál byl sekvenován a identifikován. Všem bylo přiřazeno číslo a název mikroorganismu (tabulka č. 14). Největší zastoupení měly laktobacily. Byly to hlavně druhy *Lactobacillus sakei* (signál 2, 3, 9) a *Lactobacillus curvatus* (signál 1, 4, 7, 11, 15) pocházející jak ze startovací kultury, tak z díla a koření (obrázek 16). Tyto bakterie se často využívají jako startovací kultura pro své acidifikační, proteolytické, antimikrobiální a probiotické vlastnosti [23]. Kromě již jmenovaných dominantních druhů se podařilo identifikovat také méně zastoupené druhy *Lactobacillus delbrueckii* (signál 10), *Lactobacillus fuchuensis* (signál 14) a *Lactobacillus graminis* (signál 8). Všechny zmíněné laktobacily se přirozeně vyskytují v mase. *Lactobacillus fuchuensis* byl popsán teprve v roce 2002. Byl izolován z vakuově baleného hovězího masa [57]. Co se týče mléčných koků, byl identifikován pouze jeden druh, a to *Lactococcus lactis* (signál 5). Dle pozice signálu na gelu pocházel pouze z díla (obrázek 16). Jako ostatní bakterie mléčného kvašení je *Lactococcus lactis* žádaný při výrobě FMV. Kromě jeho uplatnění při fermentaci, je využíván jako producent bakteriocinu nisinu [16, 23]. Další významnou identifikovanou skupinou byly bakterie rodu *Staphylococcus*. Nebyly však zdaleka tak dominantní jako laktobacily, což potvrdila intenzita a četnost identifikovaných signálů a také mikrobiologická analýza. Identifikovaný druh *Staphylococcus carnosus* (signál 6) se běžně používá jako startovací kultura u FMV díky aktivitě dusičnanreduktázy, lipázy a proteázy [16, 22, 23]. Další identifikovaný druh *Staphylococcus condimentii* (signál 13, 18) má také potenciál být využíván jako startovací kultura pro výrobu FMV. Nicméně, byl zmíněn v několika klinických studiích a byly vzneseny obavy s ohledem na bezpečnost tohoto druhu pro použití při výrobě potravin [56]. Dle DGGE gelu (obrázek 16) oba druhy identifikovaných stafylokoků pocházely ze startovací kultury, díla i koření.

Tabulka č. 14: Identifikace mikroorganismů přítomných ve studovaných FMV

| Signál na gelu | Název mikroorganismu | Identifikační skóre [%] |
|----------------|----------------------------------|-------------------------|
| 1 | <i>Lactobacillus curvatus</i> | 99 |
| 2 | <i>Lactobacillus sakei</i> | 98 |
| 3 | <i>Lactobacillus sakei</i> | 99 |
| 4 | <i>Lactobacillus curvatus</i> | 99 |
| 5 | <i>Lactococcus Lactis</i> | 98 |
| 6 | <i>Staphylococcus carnosus</i> | 99 |
| 7 | <i>Lactobacillus curvatus</i> | 99 |
| 8 | <i>Lactobacillus graminis</i> | 97 |
| 9 | <i>Lactobacillus sakei</i> | 98 |
| 10 | <i>Lactobacillus delbrueckii</i> | 97 |
| 11 | <i>Lactobacillus curvatus</i> | 98 |
| 12 | <i>Brochothrix thermosphacta</i> | 99 |
| 13 | <i>Staphylococcus condimenti</i> | 97 |
| 14 | <i>Lactobacillus Fuchuensis</i> | 98 |
| 15 | <i>Lactobacillus curvatus</i> | 96 |
| 16 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 98 |
| 17 | <i>Enterococcus faecium</i> | 96 |
| 18 | <i>Staphylococcus condimenti</i> | 98 |
| 19 | <i>Brochothrix thermosphacta</i> | 99 |
| 20 | Bacillus spp. | 98 |



Obrázek 17: DGGE gel 2 – mikroflóra vzorků plátkových salámů B21NQ a B11PK
dráha 0 až 42 – den odběru, D11 – dílo 11, D21 – dílo 21,
Q – koření QDS výroba, SK – startovací kultura, signál 1 až 20 – viz. tabulka 11

Na DGGE gelu 2 (obrázek 17) jsou vidět signály znázorňující mikroflóru vzorků plátkových salámů vyrobených jak klasickou, tak QDS metodou, odebíraných po celou dobu zrání a skladování (0. – 42. den). Mezi intenzitou a počtem signálů u jednotlivých vzorků nejsou bohužel viditelné rozdíly.

Metodou DGGE se podařilo separovat a následně sekvenovat a identifikovat dvanáct signálů u plátků vyrobených jak klasickou, tak QDS cestou (obrázek 17). Všem bylo přiřazeno číslo a název mikroorganismu (tabulka č. 14). Na rozdíl od tyčových salámů nebyly u plátků nalezeny a identifikovány druhy *Lactobacillus delbrueckii* (obrázek 16, signál 10) a *Lactobacillus graminis* (obrázek 16, signál 8). V případě těchto méně zastoupených druhů nemusí být signály viditelné (kapitola 4.2.3). Ostatní identifikované mikroorganismy se u tyčí i plátků shodovaly.

U vzorků díla (D11 a D21) se podařilo separovat pomocí DGGE a identifikovat celkem devět signálů (obrázek 16 a 17). Kromě dominantních laktobacilů a stafylokoků obsahovaly vzorky díla také nežádoucí mikroorganismy *Pseudomonas aeruginosa* (signál 16), *Bacillus* spp. (signál 20), *Brochothrix thermosphacta* (signál 12, 19). Tyto kontaminující bakterie se v syrovém mase běžně vyskytují a podílejí se na jeho kažení [21, 54, 58].

U vzorků koření (K a Q) se podařilo identifikovat šest signálů (obrázek 16 a 17). Kromě dominantních laktobacilů a stafylokoků to byl *Enterococcus faecium* (signál 17), který se vyskytoval pouze v koření, dále pak *Pseudomonas aeruginosa* (signál 16) a *Bacillus* spp. (signál 20), které byly nalezeny také v díle. *Enterococcus faecium* patří mezi bakterie mléčného kvašení a jeho přítomnost ve FMV je žádoucí [16, 21].

DGGE gely, sekvenace a identifikace mikroorganismů ostatních studovaných vzorků tyčí a plátků poskytly shodné výsledky s výše diskutovanými vzorky (příloha 1 a 2).

I když byly na základě mikrobiologické analýzy očekávány změny mezi jednotlivými vzorky v průběhu zrání a skladování, DGGE signály byly více méně obdobné. Při mikrobiologické analýze se stanovují počty pouze životaschopných mikroorganismů, zatímco DGGE metoda znázorňuje DNA živých i mrtvých buněk. To způsobilo podobnost signálů mezi jednotlivými vzorky na DGGE gelu. Pro ještě lepší vizualizaci diverzity mikroflóry u FMV byla v několika studiích použita metoda RT PCR DGGE, která využívá reversní transkripci a cDNA [17, 21, 36, 59].

V současné době je novým a velmi efektivním nástrojem pro sledování diverzity metoda Next Generation Sequencing (kapitola 4.2.4). Umožňuje nejen identifikaci všech druhů organismů v testovaných vzorcích s identifikačním skóre až 99,5 % ale poskytuje také kvantitativní data [54, 60].

ZÁVĚR

Rozmanitost bakterií, které se podílí na fermentaci potravin, je jedním z nejdůležitějších faktorů, formující konečné vlastnosti fermentovaných masných výrobků. Znalost této rozmanitosti může být značně zlepšena aplikací molekulárně biologických metod v kombinaci s běžně používanými kultivačními metodami.

Cílem této práce bylo sledování mikrobiologické diverzity v salámech Paprikáš vyrobených klasickou a QDS technologií. Pro stanovení počtů životaschopných technologicky významných mikroorganismů byla provedena mikrobiologická analýza. Pomocí molekulárně biologické metody DGGE byl vytvořen DNA fingerprint všech vzorků a zastoupené mikroorganismy byly sekvenovány a identifikovány.

Po celou dobu zrání a skladování byly u všech výrobků dominantní bakterie mléčného kvašení. U výrobků vyrobených klasickou cestou došlo asi v polovině doby skladování k podstatnému poklesu počtu životaschopných bakterií. To bylo způsobeno vyčerpáním živin, klesajícím pH, snižující se a_w a rostoucí koncentrací soli během dlouhé doby zrání a skladování. Další technologicky významnou skupinou mikroorganismů byly koaguláza negativní stafylokoky. Nebyly tolik dominantní jako bakterie mléčného kvašení, ale svou životaschopnost si zachovaly po celou dobu zrání a skladování. U klasicky vyrobených produktů došlo k mírnému poklesu počtů stafylokoků kolem třicátého dne skladování. U produktů vyrobených QDS technologií nedocházelo k odumírání sledovaných mikroorganismů v takové míře jako u produktů vyrobených klasickou cestou. QDS technologie tedy prodlužuje životaschopnost mikroorganismů.

Z hlediska bezpečnosti potravin byly během celé doby sledovány také počty enterobakterií, kvasinek a plísní. Ty byly stanoveny ve vstupních surovinách a na počátku doby zrání. Vysokou aktivitou dominantních bakterií mléčného kvašení došlo k rychlému okyselení prostředí a všechny nežádoucí mikroorganismy byly postupně redukovány a nakonec usmrceny. U žádného výrobku na konci doby zrání a skladování již nebyly detekovány.

Metoda DGGE umožnila sledovat zastoupení bakteriálních konsorcií v jednotlivých vzorcích a porovnat je mezi sebou. Dále bylo možné určit, zda bakterie přítomné ve vzorcích pochází z díla, startovací kultury nebo z koření. U všech vzorků byly identifikovány nejvíce intenzivní signály jako dominantní bakterie mléčného kvašení. U tyčových salámů vyrobených klasickou cestou se podařilo identifikovat pět druhů laktobacilů, dva druhy koaguláza negativních stafylokoků a jeden druh laktokoků. U plátků vyrobených jak klasicky tak QDS

technologí byly identifikovány tři druhy laktobacilů, dva druhy stafylokoků a jeden druh laktokoků. V surovinách pro výrobu FMV byly kromě bakterií mléčného kvašení a koagulaza negativních stafylokoků nalezeny a identifikovány také mikroorganismy způsobující kažení masa. V konečných výrobcích však žádná nežádoucí mikroflóra detekována nebyla. Molekulárně biologická analýza tedy potvrdila a doplnila výsledky mikrobiologického stanovení.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 853/2004 ze dne 29. dubna 2004, kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potraviny živočišného původu. Dostupné na: <https://eur-lex.europa.eu/>
- [2] KAMENÍK Josef, Ladislav STEINHAUSER. Masné výrobky: vymezení pojmu, základní skupiny a požadavky na kvalitu. *Maso: odborný časopis pro výrobce, zpracovatele a prodejce masa, masných výrobků a lahůdek*. Praha: České a slovenské odborné nakladatelství, 2013. 44-8. ISSN 1210-4086.
- [3] 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. Sbírnka zákonů ČR, 2016.
- [4] KAMENÍK, Josef, Bohumíra JANŠTOVÁ a Alena SALÁKOVÁ. *Technologie a hygiena potravin živočišného původu*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 9788073057220.
- [5] KAMENÍK, Josef. *Hygiena a technologie masa: trvanlivé masné výrobky*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2012. ISBN 978-80-7305-602-5.
- [6] STIEBING, A. Qualitätssicherung bei der Rohwurstherstellung – HACCP; 1. *Stuttgarter Rohwurstforum*. Stuttgart: Gewürmüller GmbH, 1994, 77 – 97.
- [7] KEIM, H., FRANKE, R. Fachwissen Fleischtechnologie. 13th ed. Auflage: *Deutscher Fachverlag*. 2007, 481.
- [8] FEINER, G. *Meat products handbook. Practical science and technology*. Woodhead USA: Publishing Limited and CRC Press LLC, 2008, 648.
- [9] WILFER, R. Worauf es bei Rohwursthüllen ankommt. *Fleischwirtschaft*. 2008, 88 (5), 66-70.
- [10] ARNAU, J., X. SERRA, J. COMAPOSADA, P. GOU a M. GARRIGA. Technologies to shorten the drying period of dry-cured meat products. *Meat Science*. 2007, 77(1), 81-89, ISSN 03091740.
- [11] KAMENÍK, Josef, Alena SALÁKOVÁ, Radka HULÁNKOVÁ, Marta DUŠKOVÁ, Gabriela BORILOVÁ, Ondrej ŠEDO a Ladislav STARUCH. Selected characteristics of dry fermented sausages prepared with quick-dry-slice (QDS

- process) technology and their comparison with traditional products. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2018, 42 (1), ISSN 01458892.
- [12] COMAPOSADA, J., ARNAU, J., GOU, P., MONFORT, J. M. (2004). Accelerated method for drying and maturing sliced food products. Patent WO/2005/092109.
- [13] NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. Dostupné na: <https://eur-lex.europa.eu/>
- [14] TALON, R., I. LEBERT, A. LEBERT, et al. Traditional dry fermented sausages produced in small-scale processing units in Mediterranean countries and Slovakia. 1: Microbial ecosystems of processing environments. *Meat Science*. 2007, 77(4), 570-579, ISSN 03091740.
- [15] TALON, R, D WALTER, S CHARTIER, C BARRIÈRE a M. C. MONTEL. Effect of nitrate and incubation conditions on the production of catalase and nitrate reductase by staphylococci. *International Journal of Food Microbiology*. 1999, 52(1-2), 47-56, ISSN 01681605.
- [16] RAVYTS, Frédéric, Luc De VUYST a Frédéric LEROY. Bacterial diversity and functionalities in food fermentations. *Engineering in Life Sciences*. 2012, 12(4), 356-367, ISSN 16180240.
- [17] COCOLIN, Luca, Paola DOLCI, Kalliopi RANTSIOU, Rosalinda URSO, Carlo CANTONI a Giuseppe COMI. Lactic acid bacteria ecology of three traditional fermented sausages produced in the North of Italy as determined by molecular methods. *Meat Science*. 2009, 82(1), 125-132, ISSN 03091740.
- [18] PAPAGIANNI, Maria, Ioannis AMBROSIADIS a G. FILIOUSIS. Mould growth on traditional greek sausages and penicillin production by *Penicillium* isolates. *Meat Science*. 2007, 76(4), 653-657, ISSN 03091740.
- [19] MATARAGAS, M., A. BELLIO, F. ROVETTO, S. ASTEGIANO, L. DECASTELLI a L. COCOLIN. Risk-based control of food-borne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in the Italian fermented sausages Cacciatore and Felino. *Meat Science*. 2015, 103, 39-45, ISSN 03091740.
- [20] GENÇCELEP, Hüseyin, Güzin KABAN a Mükerrerem KAYA. Effects of starter cultures and nitrite levels on formation of biogenic amines in sucuk. *Meat Science*. 2007, 77(3), 424-430, ISSN 03091740.

- [21] GREPPI, Anna, Ilario FERROCINO, Antonietta LA STORIA, Kalliopi RANTSIOU, Danilo ERCOLINI a Luca COCOLIN. Monitoring of the microbiota of fermented sausages by culture independent rRNA-based approaches. *International Journal of Food Microbiology*. 2015, 212, 67-75, ISSN 01681605.
- [22] EL ADAB, Sabine, Ines ESSID a Mnasser HASSOUNA. Microbiological, Biochemical and Textural Characteristics of a Tunisian Dry Fermented Poultry Meat Sausage Inoculated With Selected Starter Cultures. *Journal of Food Safety*. 2015, 35(1), 75-85, ISSN 01496085.
- [23] LARANJO, Marta, Miguel ELIAS a Maria João FRAQUEZA. The Use of Starter Cultures in Traditional Meat Products. *Journal of Food Quality*. 2017, 1-18, ISSN 0146-9428.
- [24] FONTANA, Cecilia, Pier SANDRO COCCONCELLI a Graciela VIGNOLO. Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 2005, 103(2), 131-142, ISSN 01681605.
- [25] BURSOVÁ, Šárka, Lenka NECIDOVÁ a Marta DUŠKOVÁ. *Mikrobiologie potravin a mikrobiologické laboratorní metody.: Obecná mikrobiologie*. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-742-8.
- [26] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 852/2004, ze dne 29. dubna 2004 o hygieně potravin. Dostupné na: <https://eur-lex.europa.eu/>
- [27] DEMNEROVÁ, Kateřina. Mikrobiologická bezpečnost potravin: Současné strategie pro efektivní kontrolu. *Chemické listy*. 2014, (106), 920-925.
- [28] ŠMEHILOVÁ, Mária. *Laboratorní cvičení z molekulární biologie*. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 978-80-244-4039-2.
- [29] BUTLER, John M. DNA Extraction Methods. *Advanced Topics in Forensic DNA Typing*. Elsevier, 2012, 29-47, ISBN 9780123745132.
- [30] ELKINS, Kelly M. DNA Extraction. *Forensic DNA Biology*. Elsevier, 2013, 39-52, ISBN 9780123945853.
- [31] BARBAS, Carlos F., Dennis R. BURTON, Jamie K. SCOTT a Gregg J. SILVERMAN. Quantitation of DNA and RNA. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010, (11), ISSN 1940-3402.

- [32] *Comparison of fluorescence-based quantitation with UV absorbance measurements* [online], 1–4 [cit. 2019-04-12]. Dostupné z: <http://tools.thermo-fisher.com/content/sfs/brochures/fluorescence-UV-quantitation-comparison-tech-note.pdf>
- [33] ATAWODI, SE, JC ATAWODI a AA DZIKWI. Polymerase chain reaction: Theory, practice and application. *Sahel Medical Journal*. 2011, 13(2), ISSN 1118-8561.
- [34] WILLIAMS, Robert C. Restriction fragment length polymorphism (RFLP). *American Journal of Physical Anthropology*. 1989, 32(10), 159-184, ISSN 0002-9483.
- [35] N.SENTHIL, Kumar. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Mipograss*. 2011, 11(3), 116-124, ISSN 2229-6026.
- [36] COCOLIN, Luca, Paola DOLCI a Kalliopi RANTSIOU. Biodiversity and dynamics of meat fermentations: The contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem. *Meat Science*. 2011, 89(3), 296-302, ISSN 03091740.
- [37] 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.
- [38] MUYZER, Gerard, K. SMALLA. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 1998. 73(1), 127-141, ISSN 1369-5274.
- [39] VALASKOVA, V. and P. BALDRIAN. Denaturing gradient gel electrophoresis as a fingerprinting method for the analysis of soil microbial communities. *Plant Soil and Environment*, 2009. 55(10), 413-423, ISSN 1214-1178.
- [40] SANGER, F., A. R. COULSON. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*. 1975, 94(3), 441-448, ISSN 00222836.

- [41] SMITH, Lloyd M., Jane Z. SANDERS, Robert J. KAISER, et al. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*. 1986, 321(6071), 674-679, ISSN 0028-0836.
- [42] FAURE, Denis a Dominique JOLY. Next-generation sequencing as a powerful motor for advances in the biological and environmental sciences. *Genetica*. 2015, 143(2), 129-132, ISSN 0016-6707.
- [43] ANSORGE, Wilhelm J. Next-generation DNA sequencing techniques. *New Biotechnology*. 2009, 25(4), 195-203, ISSN 18716784.
- [44] KALOUSOVÁ, Iveta. *Změny vývoje mikroflóry během výroby a skladování masného výrobku*. Zlín, 2016. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [45] BEDNÁŘ, Lukáš. *Optimalizace metody izolace DNA z fermentovaných masných výrobků*. Zlín, 2016. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně.
- [46] KAKSONEN, Anna, *Molecular approaches for microbial community analysis* [online]. [cit. 2019-04-15]. Dostupné z: http://wiki.biomine.skelleftea.se/biomine/molecular/index_32.htm
- [47] NEILSON, J. W., F. L. JORDAN, and R. M. MAIER, Analysis of artifacts suggests DGGE should not be used for quantitative diversity analysis. *Journal of Microbiological Methods*. 2013, 92(3), 256-263, ISSN 01677012.
- [48] THOMPSON, J. R., L. A. MARCELINO, and M. F. POLZ, Heteroduplexes in mixed-template amplifications: formation, consequence and elimination by 'reconditioning PCR'. *Nucleic Acids Research*. 2002, 30(9), 2083-2088.
- [49] BROWNIE, J., S. SHAWCROSS, J. THEAKER, D. WHITCOMBE, R. FERRIE, C. NEWTON, S. LITTLE, The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acids Research*. 1997, 25(16), 3235-3241.
- [50] JANSE, Ingmar, Jasper BOK a Gabriel ZWART. A simple remedy against artifactual double bands in denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*. 2004, 57(2), 279-281, ISSN 01677012.
- [51] WEISBURG, W G, S M BARNES, D A PELLETIER a D J LANE. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. 1991, 173(2), 697-703, ISSN 0021-9193.
- [52] LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. 1991, 125-175.

- [53] *Instruction Manual: Denaturing Gradient Gel Electroporesis System* [online], 1-31, [cit. 2019-04-16]. Dostupné z: https://us.vwr.com/assetsvc/asset/en_US/id/9144414/contents
- [54] POŁKA, Justyna, Annalisa REBECCHI, Vincenza PISACANE, Lorenzo MORELLI a Edoardo PUGLISI. 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, ISSN 07400020.
- [55] DROSINOS, E. H, M. MATARAGAS, N. XIRAPHI, G. MOSCHONAS, F. GAITIS a J. METAXOPOULOS. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Science*. 2005, 69(2), 307-317, ISSN 03091740.
- [56] DONG, Huihui, Jian CHEN, Andrew K. HASTINGS, Lihua GUO a Beiwen ZHENG. Complete Genome Sequence and Comparative Analysis of *Staphylococcus condimentum* DSM 11674, a Potential Starter Culture Isolated from Soy Sauce Mash. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2017, 5, ISSN 2296-4185.
- [57] SAKALA, R. *Lactobacillus fuchuensis* sp. nov., isolated from vacuum-packaged refrigerated beef. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002, 52(4), 1151-1154, ISSN 14665026.
- [58] DIAS, Francesca Silva, Cíntia Lacerda RAMOS a Rosane Freitas SCHWAN. Characterization of spoilage bacteria in pork sausage by PCR-DGGE analysis. *Food Science and Technology*. 2013, 33(3), 468-474, ISSN 1678-457X.
- [59] COCOLIN, Luca, Valentina ALESSANDRIA, Paola DOLCI, Roberta GORRA a Kalliopi RANTSIOU. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2013, 167(1), 29-43, ISSN 01681605.
- [60] FRANCIOSA, Irene, Valentina ALESSANDRIA, Paola DOLCI, Kalliopi RANTSIOU a Luca COCOLIN. Sausage fermentation and starter cultures in the era of molecular biology methods. *International Journal of Food Microbiology*. 2018, 279, 26-32, ISSN 01681605.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|----------|--|
| APS | amonium persulfát |
| A_w | aktivita vody |
| 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 |
| ČR | Česká republika |
| ČSN | česká technická norma |
| 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 |
| EtBr | etidumbromid |
| FMV | fermentovaný masný výrobek |
| CHYGA | chloramphenicol yeast glucose agar |
| LAB | lactic acid bacteria (bakterie mléčného kvašení) |
| M17 | M17 agar base |
| MRS | <i>Lactobacillus</i> deMan, Rogosa and Sharpe agar |
| MSA | mannitol salt agar |
| MS Excel | Microsoft Excel |
| PBS | phosphate buffered saline (fosfátový pufr) |
| PCA | plate count agar |
| PCR | polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce) |
| PP | polypropylen |
| QDS | Quick-Dry-Slice |
| RNA | ribonucleic acid (ribonukleová kyselina) |
| rRNA | ribosomal ribonucleic acid (ribozomální ribonukleová kyselina) |
| SDS | sodium dodecyl sulfate (dodecylsírán sodný) |
| TAE | tris-acetát-EDTA |

| | |
|-------|--|
| TEMED | N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine |
| TGGE | temperature gradient gel electrophoresis (gelová elektroforéza s teplotním gradientem) |
| USA | United States of America (Spojené státy americké) |
| UV | ultraviolet (ultrafialové) |

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Odběr vzorků u tyčí salámu

Obrázek 2: Schéma všech kroků metody DGGE

Obrázek 3: Úsek 16S rRNA genu amplifikovaný v prvním PCR kroku

Obrázek 4: úsek 16S rRNA genu amplifikovaný ve druhém PCR kroku

Obrázek 5: Aparatura pro gel

Obrázek 6: Plnicí systém gelu (marker gradient, mini peristaltická pumpa a gelová aparatura)

Obrázek 7: Vývoj CPM v různých vrstvách tyčí salámu vyrobeného klasickou technologií během zrání a skladování.

Obrázek 8: Vývoj CPM u plátků vyrobených klasickou a QDS metodou.

Obrázek 9: Vývoj mléčných koků v různých vrstvách tyčí salámů vyrobených klasickou technologií během doby zrání a skladování.

Obrázek 10: Vývoj mléčných koků u plátků vyrobených klasickou a QDS metodou.

Obrázek 11: Vývoj laktobacilů v různých vrstvách tyčí salámů vyrobených klasickou technologií během doby zrání a skladování.

Obrázek 12: Vývoj laktobacilů u plátků vyrobených klasickou a QDS metodou.

Obrázek 13: Vývoj CNS u plátků vyrobených klasickou a QDS metodou.

Obrázek 14: První krok PCR amplifikace pomocí primerů FD1 a RD1

Obrázek 15: Druhý krok PCR amplifikace pomocí primerů 341FGC a 907R

Obrázek 16: DGGE gel 1 – mikroflóra vzorků tyčových salámů T11PK

Obrázek 17: DGGE gel 2 – mikroflóra vzorků plátkových salámů B21NQ a B11PK

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1: Členění masných výrobků

Tabulka č. 2: Vybrané skupiny mikroorganismů vyskytující se v mase a příslušné normy pro jejich stanovení

Tabulka č. 3: Použité primery

Tabulka č. 4: Technologie výroby analyzovaných FMV

Tabulka č. 5: Časový harmonogram odběru vzorků

Tabulka č. 6: Kultivační stanovení mikroorganismů

Tabulka č. 7: Složení reakční směsi pro první krok PCR

Tabulka č. 8: Touch Down PCR program

Tabulka č. 9: Složení reakční směsi pro druhý krok PCR

Tabulka č. 10: Nested PCR program

Tabulka č. 11: Složení denaturačních roztoků na 100 ml objemu

Tabulka č. 12: Příprava vzorků na sekvenaci

Tabulka č. 13: Mikrobiologický rozbor vstupních surovin (log CFU/g)

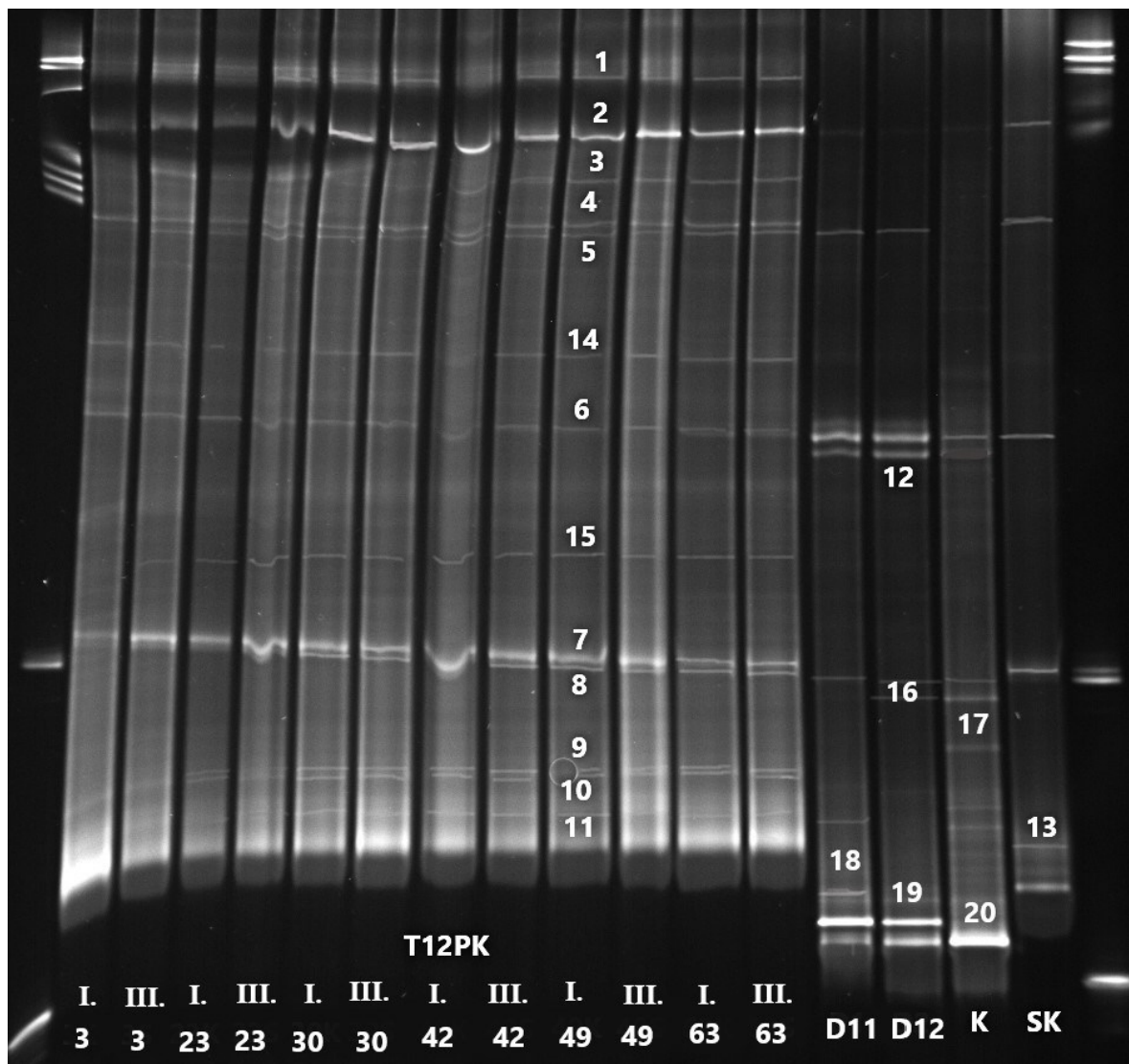
Tabulka č. 14: Identifikace mikroorganismů přítomných ve studovaných FMV

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: DGGE GE1 3 - Mikroflóra vzorků Tyčových salámů T12PK

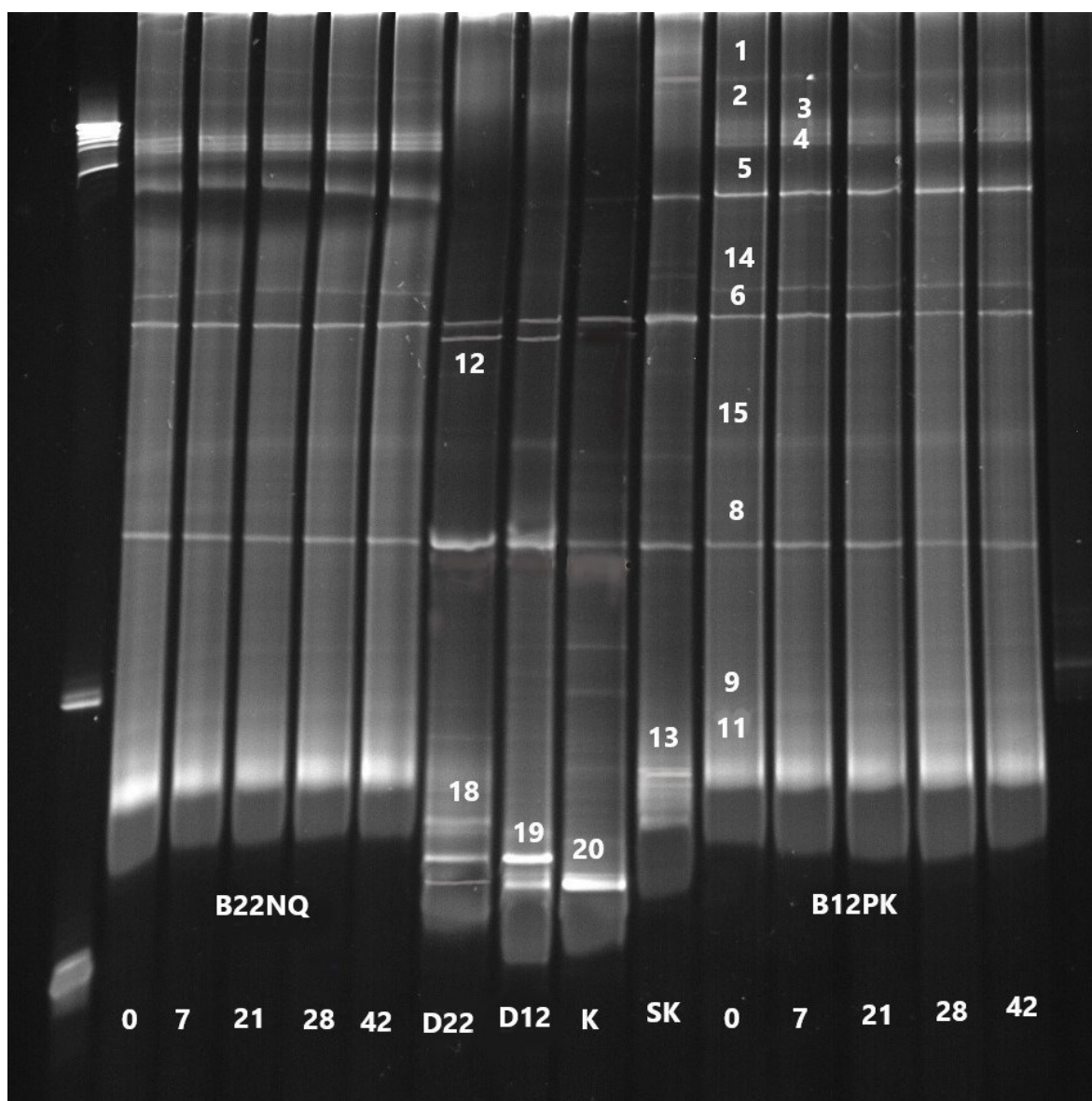
Příloha P II: DGGE Gel 4 - Mikroflóra vzorků plátkových salámů B22NQ B12PK

**PŘÍLOHA P I: DGGE GEL 3 - MIKROFLÓRA VZORKŮ
TYČOVÝCH SALÁMŮ T12PK**



dráha 3 až 63 – den odběru, I. – vrstva I, III. – vrstva III, D11 – dílo 11, D12 – dílo 12, K – koření klasická výroba, SK – startovací kultura, signál 1 až 20 – viz. tabulka 11, kapitola 7.2.2

**PŘÍLOHA P II: DGGE GEL 4 - MIKROFLÓRA VZORKŮ
PLÁTKOVÝCH SALÁMŮ B22NQ A B12PK**



*dráha 0 až 42 – den odběru, D22 – dílo 22, D12 – dílo 12,
K – koření klasická výroba, SK – startovací kultura, signál 1 až 20 – viz. tabulka 11,
Kapitola 7.2.2*