

Typizace vybraných druhů grampozitivních bakterií izolovaných z fermentovaných masných výrobků

Bc. Taťána Horáková

Diplomová práce
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Taťána Horáková**
Osobní číslo: **T14759**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Typizace vybraných druhů grampozitivních bakterií izolovaných z fermentovaných masných výrobků**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Technologie výroby a charakteristika fermentovaných masných výrobků.
2. Popis průběhu fermentace masných výrobků.
3. Vlastnosti mikroorganismů účastnících se fermentace masných výrobků.
4. Popis metody RAPD PCR.
5. MALDI TOF.

II. Praktická část

1. Identifikace vybraných bakterií izolovaných z fermentovaných masných výrobků metodou MALDI TOF.
2. Molekulární typizace vybraných izolátů bakterií.
3. Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

[1] Bamforth, C.W., Ward, R.F. The Oxford Handbook of Food Fermentations. Oxford University Press, 2014.

[2] Alberts, B. et al. Základy buněčné biologie. Espero Publishing, 1998.

[3] Rantsiou, K., Cocolin, L. New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: A review. International Journal of Food Microbiology, 108, 255-267. 2006.

[4] Leroy, F. et al. Meat fermentation at the crossroads of innovation and tradition: A historical outlook. Trends in Food Science and Technology, 31, 130-137. 2013.

[5] Cocolin, L., Dolci, P., Rantsiou, K. Biodiversity and dynamics of meat fermentations: The contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem. Meat Science, 89, 296-302. 2011.

Vedoucí diplomové práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

20. ledna 2016

Termín odevzdání diplomové práce:

29. dubna 2016

Ve Zlíně dne 20. ledna 2016



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



Ing. Jiří Miček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: ...*HORÁKOVÁ TATJANA*.....

Obor: ...*TP*.....

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 *19.4.2016*

Horáková
.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Tato práce řeší charakteristiku vybraných grampozitivních bakterií izolovaných z fermentovaného masného výrobku Paprikáš. Fermentovaný masný výrobek byl vyroben dvěma odlišnými technologiemi, za použití stejné startovací kultury. Kmeny bakterií byly identifikovány metodou MALDI-TOF. Z analyzovaných salámů bylo izolováno celkem 10 druhů grampozitivních bakterií (*Staphylococcus carnosus*, *S. xylosus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. epidermidis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lb. sakei*, *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *Pediococcus pentosaceus*). Na porovnání, zda se fingerprinty bakterií během zrání a skladování u obou technologií změnily, byla použita metoda RAPD-PCR. Bakterie vykazují podobnost v závislosti na použité technologii.

Klíčová slova: fermentované masné výrobky, bakterie mléčného kvašení, koaguláza negativní koky, Quick Dry Slice (QDS), MALDI-TOF, RAPD-PCR

ABSTRACT

The aim of this thesis is characteristic of Gram-positive bacteria isolated from fermented sausage Paprikáš. Sausage was manufactured by two different technologies, using the same starter culture. Strains were identified by MALDI-TOF method. Ten Gram-positive species were isolated from sausage (*Staphylococcus carnosus*, *S. xylosus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. epidermidis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lb. sakei*, *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis*, *Pediococcus pentosaceus*). A comparison whether the fingerprints of bacteria during ripening and storage of both technologies have changed, was used RAPD-PCR. Bacteria illustrate similarities depending on the technology used.

Keywords: fermented meat products, lactic acid bacteria, coagulase-negative cocci, Quick Dry Slice (QDS), MALDI-TOF, RAPD-PCR

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí své diplomové práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a náměty, poskytnutou literaturu, ochotu a vstřícnost při vypracování diplomové práce. Dále pak Mgr. Andrejovi Stráskemu za konzultace a cenné rady při práci na praktické části diplomové práce. Poděkování patří také Mgr. Ivetě Hynštové za vysvětlení a asistenci při práci na MALDI-TOF. Dále děkuji svým kolegům, partnerovi a rodině za pomoc a podporu při vypracovávání diplomové práce.

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

Ve Zlíně

.....

Podpis studenta

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1 TECHNOLOGIE VÝROBY A CHARAKTERISTIKA FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ	11
1.1 MASO A MASNÉ VÝROBKY.....	11
1.1.1 Členění masných výrobků.....	12
1.2 TECHNOLOGIE VÝROBY FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ	12
1.2.1 Suroviny pro výrobu fermentovaných masných výrobků	13
1.2.1.1 Maso.....	13
1.2.1.2 Vepřové sádlo	14
1.2.1.3 Kuchyňská sůl, dusitanová solicí směs.....	15
1.2.1.4 Koření	16
1.2.1.5 Startovací kultura.....	16
1.2.2 Příprava díla fermentovaných masných výrobků.....	17
1.2.2.1 Příprava díla v kutru	17
1.2.2.2 Příprava díla na řezačce a míchačce	17
1.2.2.3 Plnění do obalových střev.....	17
1.2.3 Fermentace a zrání	18
1.3 SYSTÉM QDS (QUICK-DRY-SLICE).....	18
2 POPIS PRŮBĚHU FERMENTACE MASNÝCH VÝROBKŮ	20
2.1 ROLE MIKROORGANISMŮ	20
2.2 ZRÁNÍ.....	21
3 VLASTNOSTI MIKROORGANISMŮ ÚČASTNÍCÍCH SE FERMENTACE MASNÝCH VÝROBKŮ	22
3.1 ROD <i>LACTOBACILLUS</i>	22
3.1.1 <i>Lactobacillus curvatus</i>	22
3.1.2 <i>Lactobacillus sakei</i>	23
3.2 ROD <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	23
3.2.1 <i>Staphylococcus carnosus</i>	23
3.2.2 <i>Staphylococcus xylosus</i>	23
3.3 ROD <i>PEDIOCOCCUS</i>	24
4 POPIS METODY RAPD PCR.....	25
4.1 NÁHODNÁ PCR.....	25
5 MALDI TOF	27
5.1 PRINCIP METODY	27
II PRAKTICKÁ ČÁST	28
6 CÍLE PRÁCE	29
7 MATERIÁL A METODY	30
7.1 POPIS A PŘÍPRAVA VZORKŮ	30
7.2 IDENTIFIKACE VZORKŮ METODOU MALDI-TOF	33
7.3 CHARAKTERIZACE VZORKŮ METODOU RAPD-PCR	33
7.3.1 Izolace DNA.....	33

7.3.2	Amplifikace DNA	34
7.3.3	Gelová elektroforéza	35
7.3.4	Hodnocení gelů	35
8	VÝSLEDKY A DISKUZE	37
8.1	IDENTIFIKACE VZORKŮ METODOU MALDI-TOF	37
8.3	RAPD PROFIL VYBRANÝCH BAKTERIÍ IZOLOVANÝCH Z FERMENTOVANÉHO MASNÉHO VÝROBKU	41
8.3.1	RAPD typizace: primer R5, rod <i>Staphylococcus</i>	42
8.3.2	RAPD typizace: primer M13R2, rod <i>Staphylococcus</i>	46
8.3.3	RAPD typizace: primer CC1, rod <i>Staphylococcus</i>	49
8.3.4	RAPD typizace: primer R5, rod <i>Lactobacillus</i>	52
8.3.5	RAPD typizace: primer M13R2, rod <i>Lactobacillus</i>	55
8.3.6	RAPD typizace: primer GTG ₅ , rod <i>Lactobacillus</i>	58
8.3.7	RAPD typizace: primer CC1, rod <i>Lactobacillus</i>	61
8.4	DISKUZE	62
	ZÁVĚR	65
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	66
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	70
	SEZNAM OBRÁZKŮ	71
	SEZNAM TABULEK	72
	SEZNAM PŘÍLOH	73

ÚVOD

Fermentované masné výrobky jsou oblíbenou komoditou u nás i ve světě. Poptávka po těchto výrobcích tak neustále roste a vzhledem ke zdlouhavému procesu jejich tradiční výroby, byla vyvinuta nová, rychlejší a efektivnější technologie Quick-Dry-Slice (QDS). Obě technologie se příliš neliší v surovinovém zastoupení. V případě klasické i nové QDS technologie jsou požívané stejné startovací kultury. Ve startovací kultuře jsou obsaženy bakterie mléčného kvašení i koaguláza negativní koky.

K zjištění zastoupení bakterií je v poslední době hojně využívaná metoda MALDI-TOF. Touto metodou lze odhalit druhovou diverzitu mimo jiné i ve fermentovaných masných výrobcích. V izolovaných kmenech je pak dále pomocí metody RAPD-PCR možno sledovat posun jejich růstu během výroby jednotlivými technologiemi.

Teoretická část této diplomové práce je zaměřena na charakteristiku, suroviny a technologii výroby fermentovaných masných výrobků, popis mikroorganismů účastnících se fermentace a změny, které během fermentace nastávají. Dále jsou popsány metody MALDI-TOF a RAPD-PCR, které jsou používány v praktické části práce.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 TECHNOLOGIE VÝROBY A CHARAKTERISTIKA FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ

Maso je nedílnou součástí našeho jídelníčku. Z nutričního hlediska je velmi cenným zdrojem plnohodnotných bílkovin, vitaminů (zejména skupiny B), nenasycených mastných kyselin a minerálních látek (železo, vápník a zinek). Přiměřená konzumace masa je součástí zdravé a vyvážené stravy (Pipek, 1998).

1.1 Maso a masné výrobky

Jako maso jsou definovány všechny části těl živočichů, včetně ryb a bezobratlých, v čerstvém nebo upraveném stavu, které se hodí k lidské výživě. Tato definice bývá někdy omezována jen na teplokrevné živočichy. Podle ní totiž patří mezi maso i živočišné tuky, krev, droby, kůže a kosti (pokud se konzumují), ale také masné výrobky. V užším slova smyslu se masem rozumí jen kosterní svalovina, a to buď samotná svalová tkáň, nebo svalová tkáň včetně vmezeřeného tuku, cév, nervů, vazivových a jiných částí, které jsou ve svalovině obsaženy (Steinhauser, 2006; Pipek, 1998).

Masný výrobek je získán zpracováním masa nebo následným zpracováním již hotových masných výrobků. Za maso jsou při výrobě masných výrobků považovány požitelné části jatečných zvířat, suroviny však musí být úředně prohlášeny za vhodné k lidské spotřebě. Maso jako kosterní svalovina je dále děleno do několika tříd podle obsahu tuku. Drůbeží maso pro výrobu masných výrobků je zpravidla získáno tzv. strojním oddělením ze skeletů drůbeže po odstranění hlavy, stehen, křídel a prsní svaloviny. Obecně nesmí být při výrobě masných výrobků používány pohlavní a močové orgány, chrupavky hrtanu a průdušnice, oči a oční víčka, rohovina zvukovody a drůbeží hlava. Další omezení pro použití některých surovin se týkají již stanovených skupin masných výrobků (Katina, 2010).

K masu a strojně oddělenému masu jsou pak v průběhu výroby přidávány další přísady a pomocné látky a to v množství, které je charakteristické pro jednotlivé výrobní skupiny. Zejména se jedná o pitnou vodu, koření, solící směsi, škrob a bílkovinné přísady (Katina, 2010).

1.1.1 Členění masných výrobků

Masné výrobky dělíme dle vyhlášky 326/2001 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích, pro maso, masné výrobky, ryby, ostatní vodní živočichy a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich:

- tepelně opracované masné výrobky – bylo u nich dosaženo ve všech částech minimálně tepelného účinku odpovídajícího působení teploty $+70\text{ °C}$ po dobu 10 minut,
- tepelně neopracované masné výrobky – výrobky určené k další spotřebě bez další úpravy, u nichž neproběhlo tepelné opracování surovin ani výrobku,
- trvanlivé tepelně opracované masné výrobky – výrobky, u kterých bylo ve všech částech dosaženo minimálně tepelného účinku odpovídajícího působení teploty 70 °C po dobu 10 minut a navazujícím technologickým opracováním (zráním, uzením nebo sušením za definovaných podmínek) došlo k poklesu aktivity vody s hodnotou $a_{w(\max.)} = 0,93$ a k prodloužení minimální doby trvanlivosti na 21 dní při teplotě skladování $+20\text{ °C}$,
- fermentovanými trvanlivými masnými výrobky – výrobky tepelně neopracované určené k přímé spotřebě, u kterých v průběhu fermentace, zrání, sušení popřípadě uzení za definovaných podmínek došlo ke snížení aktivity vody s hodnotou $a_{w(\max.)} = 0,93$, s minimální dobou trvanlivosti 21 dní při teplotě $+20\text{ °C}$.

1.2 Technologie výroby fermentovaných masných výrobků

Fermentované masné výrobky nejsou, na rozdíl od ostatních masných výrobků, ani během celé výroby, ani před vlastní konzumací podrobeny tepelnému zákroku. Proto si zachovávají typickou chuť a patří k oblíbeným komoditám u řady spotřebitelů. Jejich typická chuť a aroma je důvodem, proč se tyto výrobky objevují na slavnostních tabulích a rautech. Senzorické vlastnosti těchto výrobků určují jejich hodnotu a jsou výrazem jejich kvality a umu výrobců (Pipek, 1998; Kameník, 2012).

V technologii zpracování masa je výroba fermentovaných masných salámů (dále jen TFS) pokládána za jednu z nejnáročnějších vůbec. K přípravě kvalitního produktu je zapotřebí kvalitních surovin, dobré strojové vybavení a v neposlední řadě také dobré znalosti a zkušenosti (Kameník, 2012).

1.2.1 Suroviny pro výrobu fermentovaných masných výrobků

1.2.1.1 Maso

Maso je základní surovinou pro výrobu TFS. V západní a střední Evropě, a tedy i u nás, má dominantní postavení vepřové a hovězí. Ve světě se využívá i maso koňské, skopové, krůtí, případně i jiné u nás už netradiční druhy. Podle klasické receptury patří do díla jeden díl libového vepřového masa, jeden díl libového hovězího a jeden díl vepřového sádla. Vzhledem k vysoké ceně hovězího bývá často i díl hovězího nahrazován dílem vepřového masa. Je žádoucí, aby bylo maso pro výrobu použito zásadně řádně vyzrálé. U vepřového by doba zrání neměla být kratší než dva dny, u hovězího pak nejméně 14 dní. Vyzrálé maso by mělo být dostatečně křehké, doba zrání masa je různá, mění se například stářím zvířete. Zrání masa se neuskutečňuje činností mikroorganismů, ale účinkem proteolytických enzymů přítomných ve svalových buňkách (Honikel, 2004). Během zrání musí být maso vychlazené na teplotu +3 až +7 °C, aby zůstaly zachovány enzymatické procesy a nedošlo k rozvoji nežádoucí mikroflóry (Kameník, 2012).

Maso na výrobu TFS by mělo pocházet ze starších zvířat (prasnice, krávy), je totiž tmavší a obsahuje méně vody. Před přidáním do díla by měly být odstraněny všechny zbytky pojivových tkání. Jejich přítomnost je viditelná na řezu výrobků, snižuje jejich hodnotu a působí rušivě při skusu (Ingr, 1996).

Finální výrobky musí vyhovovat požadavkům na obsah čistých svalových bílkovin a tuku. Jako surovina se používá vepřové maso druhu V2-V4, vepřové sádlo a hovězí maso druhu H2-H3. Použití masa s vyšším obsahem tuku je riskantní, z důvodu zhoršení sensorických vlastností finálních produktů (Ingr, 2003). Kategorie masa používaného pro TFS jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Kategorie výrobního masa používaného pro TFS, převzato od (Bořilová 2014)

Výrobní masa		
Vepřové	V-2	Libové maso z kýty, libové ořezy s 5 % viditelného tuku, tenké povázky přípustné.
Vepřové	V-3	Libové ořezy s větším podílem povázek a měkkých šlach s viditelným podílem tuku asi 5 %.
Vepřové	V-4	Libové ořezy s podílem šlach a měkkých pouzder, krvavé ořezy s podílem viditelného tuku, asi 25 %, bez kůže.
Hovězí	H-2	Maso zbavené tvrdých šlach s viditelným podílem tuku, asi 5 %, tenké povázky přípustné.
Hovězí	H-3	Maso zbavené tvrdých šlach s viditelným podílem tuku, asi 10 %, + hovězí maso z hlav.

Vzhledem k tomu, že se maso pro TFS již dále tepelně neošetřuje, bariéry proti mikrobiálním vlivům vznikají postupně. Jejich působení tedy není tak razantní, jako když vystavíme maso tepelnému účinku odpovídajícímu působení teploty 70 °C po dobu 10 minut. Nejvýznamnější bariérou je nízká aktivita vody, ta se ale uplatňuje až na samotném konci výrobního cyklu a proto musíme vybírat suroviny a tedy i maso s minimální mikrobiální kontaminací (Kameník, 2012).

1.2.1.2 Vepřové sádlo

Vepřové sádlo má zásadní vliv na vytváření struktury výrobku během mělnění a míchání. Pro TFS by mělo být použito sádlo jaderné a tuhé, nejlépe skupiny V8. To je důvodem proč se používá hřbetní sádlo, popřípadě krční z tzv. hřivky. Použití jaderného sádla zajistí jasnou kontrastní mozaiku výrobku (Kameník, 2012).

Měkké sádlo obsahuje řídký tuk, který poměrně snadno žlukne. Při mělnění se potom tento tuk uvolňuje z tukových buněk a obklopuje rozmělněné částice masa a znemožňuje jim tak spojení pomocí bílkovinného roztoku, vznikajícího přidávkem solí. Při plnění do obalových stěv se pak tento měkký tuk drží těsně pod obalem a nepropouští ven z výrobku vodu. Tímto jevem se výrazně prodlužuje doba sušení. Nežádoucí je též výsledná měkkost salámů a snížená trvanlivost (Ingr, 2003).

Vzhledem k celkovému obsahu mastných kyselin ve vepřovém sádle by měly 12 % tvořit polyenové kyseliny. V průběhu zpracování výrobku vzniká teplo, aby se zabránilo uvolňo-

vání tuku během zvýšení teploty, je nutné sádlo před jeho zpracováním zamrazit na teplotu -10 až -15 °C (Kameník, 2012). Pokud je sádlo jádrné, vznikají v průběhu technologického procesu ve výrobku kanálky, kterými může putovat vypařující se voda ze středu na povrch. V ČR v současné době definuje Vyhláška 326/2010 Sb. ve znění pozdějších předpisů limit 50 % obsahu tuku ve vybraných trvanlivých salámech (Vyhláška 326/2010 Sb.).

1.2.1.3 *Kuchyňská sůl, dusitanová solící směs*

Je obecně známo, že přidáním kuchyňské soli se prodlužuje údržnost masa. Její konzervační efekt je mimo jiné i snižování počáteční aktivity vody v díle na 0,97 – 0,96 (Ingr 2003). Slanou chuť masa po přidavku NaCl způsobují převážně záporně nabitě ionty Cl⁻, méně pak pozitivně nabitě ionty Na⁺. Mezi nenahraditelné účinky soli v masných výrobcích dále patří zlepšování chuti, rozpouštění bílkoviny masa, zlepšení textury masných výrobků a zvýhodnění růstu grampozitivních bakterií před gramnegativními bakteriemi (Feiner, 2008).

K solení díla pro TFS se v současnosti používá dusitanová solící směs (dusitan sodný s kuchyňskou solí, kdy obsah dusitanu sodného v solící směsi nesmí být vyšší než 0,6 %) (Honikel, 2007). Přidávané množství je zpravidla 2,4 – 3 %, v hotovém výrobku je pak obsah soli 3,2 – 4,5 % v důsledku ztráty vody při sušení (Feiner, 2008).

Dusitan přispívá na počátku zrání TFS k inhibici růstu gramnegativních mikroorganismů, zejména salmonel, může také pomoci snížit riziko množení *Staphylococcus aureus* a *Listeria monocytogenes*. Dusitan má také antioxidační účinek. Ten je založen na principu spotřeby kyslíku pro svoji oxidaci na dusičnan a také na tvorbě stabilního komplexu mezi železem vázaným v hemové složce a dusitanem, čímž se zabrání uvolňování iontů železa. Díky dusitanu je také vytvářena termostabilní barva masných výrobků, ta vzniká vazbou oxidu dusného na myoglobin, přičemž vzniká světle červenorůžová sloučenina nitroso-myoglobin (Freiner, 2008).

Směrnice Evropského parlamentu a rady 2006/52/ES ze dne 5. července 2006 (kterou se mění směrnice 95/2/ES o potravinářských přídatných látkách jiných než barviva a náhradní sladidla a směrnice 94/35/ES o náhradních sladidlech pro použití v potravinách), stanovila mimo jiné nejvyšší množství dusitanu sodného, které lze přidat v průběhu výroby (E 249 dusitan draselný, E 250 dusitan sodný) na 150 mg/kg jako NaNO₂. Pro vybrané trvanlivé masné výrobky (Vysočina, Selský salám, Turistický salám, Herkules, Poličan a podobné výrobky) povoluje 180 mg/kg. Pokud jsou dusitany určeny pro použití v potravinách, mo-

hou být prodávány pouze ve směsi se solí nebo s náhražkou soli (Vyhláška č. 4/2008 Sb.) (Kameník, 2012).

1.2.1.4 Koření

Pro přípravu TFS lze použít různých druhů koření, často se používá pouze pepř, ale aroma je možné obohatit i přidavkem kardamonu, papriky, muškátového květu, muškátového oříšku, jalovce a zázvoru. Do tradičních českých fermentovaných salámů se používají koření, definovaná dle spotřebních norem masných produktů, která jsou shrnuta v tabulce 2. Tato koření postačují v dávce kolem 0,5 g/kg připravovaného díla (Gerhardt, 1994).

Tabulka 2: Přehled koření do tradičních českých TFS (Kameník, 2012).

Produkt	Koření dle spotřebních norem MP/1989
Lovecký salám	pepř černý mletý, česnekový koncentrát, hřebíček mletý
Poličan	pepř černý mletý, česnekový koncentrát, hřebíček mletý, paprika sladká, paprika pálivá
Herkules	pepř černý mletý, česnekový koncentrát, kmín mletý, koriandr
Paprikáš	paprika sladká, speciální papriková emulze, kmín mletý

Koření vykazuje částečný antioxidační účinek, antimikrobiální účinek založený na přítomnosti fytoncidů a podporuje sekreci trávících šťáv (Freiner, 2008).

Dále mezi suroviny patří sacharidy, které slouží jako substrát pro bakterie mléčného kvašení. Jejich přidavkem lze ovlivňovat průběh fermentace. Nedílnou součástí receptury TFS jsou startovací kultury (Kameník, 2012).

1.2.1.5 Startovací kultura

Startovací kultury jsou vybrané kmeny bakterií, které se přidávají do díla pro svoji schopnost okyselení, navození mikrobiální stability a vývoj barvy, chuti a aroma. Dávkuje se takové množství, aby ve výsledném produktu bylo obsaženo 10^7 KTJ/g díla. Na 100 kg díla se aplikuje 10^{12} buněk, které váží přibližně jeden gram (Feiner, 2008). Startovací kultury jsou dostupné v mraženém, lyofilizovaném nebo tekutém stavu. Některé firmy je nabízejí i ve formě pelet. Do díla by se měly kultury vkládat na počátku míchání v kutru. Nejčastěji jsou ve startovacích kulturách v Evropě zastoupeny rody *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Pediococcus* a *Kocuria* (Kameník, 2012).

1.2.2 Příprava díla fermentovaných masných výrobků

Ze základních surovin se při procesu míchání a mělnění vytváří salámové dílo. Na kvalitu díla mají vliv především tyto faktory: vzájemný poměr libové a tučné svaloviny, kvalita vepřového sádla, teplota jednotlivých surovin, přísady (soli, solící směsi, koření), konstrukce kutru a kutrových nožů a také jejich ostrost (Kameník, 2012).

Cílem použití jednotlivých zařízení je nejen dosáhnout požadované velikosti, ale také žádoucích změn ve struktuře masa. Při mělnění se uvolňuje do směsi obsah svalových buněk. Do myofibril prostupuje chlorid sodný, obsažený v dusitanové solící směsi. Vzniká roztok bohatý na bílkoviny, který spojuje povrch zachovalých částí masa a tuku. Rozpuštěné bílkoviny vytvářejí důsledkem denaturace a úbytku volné vody trojrozměrnou gelovou síť. Tato síť spojuje vzájemně částice svaloviny a tuku a přispívá ke zpevnění díla. Pokračující denurací bílkovin nastává smršťování a další ztráta vody. Výsledkem tohoto procesu je vznik konzistenčně pevného salámu (Ingr, 1996).

1.2.2.1 Příprava díla v kutru

Kutr je zařízení, které se skládá z otočné mísy, ve které se na hřídeli otáčí nože, které suroviny rozsekávají a zároveň promíchávají (Budig, Klíma, 1995). Velikost zrna po zpracování na kutru je 0,8 – 3 mm. Obecně platí zásada, že do kutru se přidává sádlo zmražené na teplotu -10 °C a nižší. Libové maso je přidáváno zchlazené (Steinhauser, 1995).

1.2.2.2 Příprava díla na řezačce a míchačce

Tato zařízení se používají na salámy o velikosti zrna 4 – 13 mm. Mohou být plně automatizované, kde se mražená a vytemperovaná surovina nejprve předřeže přes desky, potom se dopraví do míchačky, kde se přidají další ingredience a opět se dopraví do řezačky, kde se dílo pomele do finální velikosti (Feiner, 2008).

1.2.2.3 Plnění do obalových střevek

Pro výrobu TFS se používají převážně přírodní střeva, splňují totiž požadavky, jako je propustnost pro vodní páry, plyny a složky udícího kouře. Je s nimi poměrně jednoduchá manipulace při narážení a jsou vysoce spolehlivé s ohledem na produkci a hygienu. Používají se především tenká vepřová střeva, která jsou jedlá, a tudíž se nemusí z výrobků loupat. Jejich nevýhodou je křehkost a nestejněměrnost (Ingr, 2003).

Během plnění se dostává dílo do obalových střevo a nabývá tím předem určené velikosti a tvaru. Při narážení musí mít dílo požadovanou strukturu a teplotu, ta by se měla pohybovat okolo $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Plnění díla by mělo nastat bezprostředně po vyjmutí z kutru (Ingr, 2003).

1.2.3 Fermentace a zrání

Výrobky jsou po naplnění převezeny do klimatizovaných komor. Začíná zde proces fermentace a zrání a salámy současně ztrácejí vodu. Procesy probíhající v komorách jsou ovlivňovány těmito podmínkami: teplotou vzduchu, relativní vlhkostí a rychlostí proudění vzduchu. Po naskladnění do komor je nejprve nezbytná vyrovnávací fáze, při které se předchází kondenzaci vody z prostředí na vychlazených salámech. Poté je teplota nastavena na $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ a po jednom týdnu se snižuje na $18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzhledem k typu výrobku, může být teplota dále snížena na $15\text{ }^{\circ}\text{C}$. Relativní vlhkost vzduchu klesá z počátečních 95 % až na konečných 75 %. Salámy zrají od 2 týdnů (Lovecký) po 4 týdny (Poličan, Paprikáš). Zrání zahrnuje komplex procesů odbourávání a přeměny jednotlivých složek díla, které rozhodují o textuře, chuti, vůni a barvě hotových výrobků (Ingr, 2003). Obecně je pojmem zrání označovaná fermentace i sušení. Jednotlivé hodnoty teplot, relativní vlhkosti a časových období se mohou lišit. Volba těchto parametrů je čistě na výrobcích (Pipek, 1998).

1.3 Systém QDS (Quick-Dry-Slice)

Systém QDS je nová moderní metoda pro výrobu TFS. Byla vyvinuta ve Španělsku a poprvé byla představena v roce 2007.

Dílo je, na rozdíl od klasické metody, naráženo do obalů, které nejsou propustné. V těchto obalech je ponecháno přibližně dva dny fermentovat a poté se zamrazí na teplotu $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nízká teplota umožňuje nakrájení na tenké plátky, ze kterých se během sušení rychleji odpařuje voda. Tyto se nakladou na plastová síta a transportují do sušící sekce. Zde se v proudu vzduchu s definovanými vlastnostmi (rychlost proudění vzduchu, teplota, RVV) realizuje vlastní sušení. Zhruba po 30 minutách je salám vysušen a může následovat balení (Arnau, 2007; Andrés, 2007).

Metoda QDS má pozitivní ekonomické i kvalitativní přínosy. Nejdůležitější je rychlost celého procesu. Tradiční výrobky pro krájení se suší 18 a více dnů, QDS to zvládne prakticky za 2 dny. Pomocí tohoto moderního technologického postupu se tedy sníží náklady na výrobu a výrobci mohou rychle zareagovat na poptávku po TFS. Dalším důležitým fak-

torem je úspora prostoru. Co se týče kvality, nesmíme opomenout standardizaci produkce. Jednotlivé plátky salámů jsou ošetřeny identickým postupem za standardních podmínek. Neměly by se tedy od sebe lišit ani výrobky v rámci jedné šarže, ani mezi šaržemi. Řízení procesu je standardizováno délkou sušení a vlastnostmi přiváděného sušícího vzduchu (Arnau, 2007; Andrés, 2007).

2 POPIS PRŮBĚHU FERMENTACE MASNÝCH VÝROBKŮ

Čerstvé maso je bohaté na živiny a je to v podstatě jedno z nejlepších médií pro růst mikroorganismů. Například kosterní svalovina hovězího masa obsahuje téměř 20 % plnohodnotných bílkovin, 2 % až 3 % lipidů, malé množství sacharidů a 75 % vody. Vodní aktivita je tedy téměř 0,99. Hodnota pH čerstvé tkáně je 6,8 až 7 a klesne během *rigor mortis* a vlivem endogenních enzymů na hodnotu 5,6 až 5,8. Jelikož v procesu výroby TFS chybí tepelné opracování, je fermentace hlavní krok konzervace a vytváření bariéry proti vstupu patogenů (Semelis, 1998).

2.1 Role mikroorganismů

Převládajícími mikroorganismy při fermentaci masa jsou bakterie mléčného kvašení (BMK). Ty jsou přidávány jako startovací kultura. Jsou schopny růstu v podmínkách prostředí fermentace (solí, dusičnany, nízká teplota a anaerobní prostředí). Jejich úkolem je metabolizovat glukózu za vzniku kyseliny mléčné a tím snižovat pH prostředí. V syrovém mase mohou být přítomny i patogenní nebo potenciálně patogenní bakterie. Pokud jsou tyto kmeny v naraženém díle přítomny, zpravidla nezpracovávají cukry a jsou tak inhibovány vznikající kyselinou mléčnou nebo jsou citlivé na přítomnou sůl i dusitan a následně hynou. Bakterie startovací kultury snižují redoxní potenciál (kmeny *Staphylococcus* a *Micrococcus* produkují nitrátreduktázu, která mění dusičnany a dusitany na oxid dusný, čímž se snižuje redoxní potenciál) v prostředí, a tím je potlačen růst aerobních mikroorganismů. Po naplnění do obalu enzymy spotřebovávají kyslík pro vznik okysličeného myoglobinu, který se následně přeměňuje na nahnědlý metmyoglobin. Následně je glukóza spotřebovávána mikroorganismy a začíná přibývat kyseliny mléčné, která snižuje pH prostředí. Při nižším pH se dusičnan redukuje na dusitan, který pak reaguje s metmyoglobinem za vzniku růžového zbarvení. Snižováním redoxního potenciálu díky dusitanům je také podpořena oxidační stabilita mastných kyselin. U několika druhů bakterií startovací kultury bylo prokázáno, že produkují bakteriociny, tyto látky jsou schopny potlačit růst *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* sp. a jiné grampozitivní bakterie způsobující kažení. Na konci fermentace jsou inhibovány bakterie nejvíce citlivé na pH. Hodnota pH klesla na hodnotu 5,3 a níže (Kročko, 2013).

Proteolýza a lipolýza

BMK produkují mnoho enzymů, které jsou schopny hydrolyzovat bílkoviny na peptidy a aminokyseliny. Proteolýza je ovlivněna několika faktory, mezi něž patří receptura, podmínky výroby a startovací kultura. Důležitá je přítomnost endogenních i bakteriálních enzymů. Endogenní enzymy, které jsou zodpovědné za počáteční štěpení bílkovin na peptidy, se nazývají calpain a katepsin. Po nich se uplatňují mikrobiální peptidázy, které se účastní sekundární proteolýzy, a uvolňují aminokyseliny. Prvním krokem při katabolických reakcích je transaminace, při níž musí být přítomné α -ketokyseliny, které fungují jako příjemci aminoskupiny. Tato reakce je katalyzována skupinou enzymů, které jsou souhrnně pojmenovány jako aminotransferázy. Výsledné produkty těchto reakcí jsou např. 3-methylbutanal a 2-methylbutanal, které se podílí na aroma TFS. Zároveň probíhají autooxidační reakce a transformace vzniklých reakčních produktů. Hydrolýzou myofibrilárních bílkovin se uvolňují především aminokyseliny valin, leucin, fenylalanin a lyzin (Di Cagno, 2008).

Lipolýza probíhá současně s proteolýzou a je také velmi důležitá při vývoji chuti a aroma TFS. Nejdříve dojde k uvolnění mastných kyselin činností endogenních enzymů. Je to první krok, za kterým následuje řada oxidativních a degradačních procesů mastných kyselin, které se mění na alkany, alkeny, aldehydy, ketony a alkoholy. Na lipolytických procesech se podílejí svými enzymy hlavně stafylokoky. Správným výběrem kmenů lze docílit produkce výrobků se zlepšenými sensorickými vlastnostmi (Bamforth, Ward, 2014).

2.2 Zrání

Zároveň s fermentací probíhá také zrání výrobku. Většina fermentovaných výrobků zraje při teplotě 15 °C několik týdnů v řízených podmínkách. Teplota, rychlost proudění a relativní vlhkost jsou nastaveny tak, aby bylo zajištěno pomalé odstranění vlhkosti a zabránění růstu plísní na povrchu, případně nežádoucím změnám ve vzhledu a struktuře. Během zrání dochází k vývoji chuti a aroma (Ingr, 2003).

3 VLASTNOSTI MIKROORGANISMŮ ÚČASTNÍCÍCH SE FERMENTACE MASNÝCH VÝROBKŮ

V surovinách, ze kterých se připravují TFS, se již od počátku nachází řádově $10^5 - 10^7$ KTJ/g mikroorganismů (Talon et al. 2007). Pro fermentované salámy mají klíčovou úlohu dvě hlavní skupiny, a to bakterie mléčného kvašení a koaguláza negativní koky. Tyto dvě skupiny bakterií se také v naraženém díle začínají velmi rychle množit. Počet BMK se v prvních dnech dostane řádově na $10^7 - 10^9$ KTJ/g a většinou zůstává konstantní během celého procesu. V díle jsou přítomné i jiné skupiny, např. rod *Pseudomonas*, čeleď *Enterobacteriaceae* (Rodel et al., 2003).

3.1 Rod *Lactobacillus*

Taxonomicky se řadí do domény *Bacteria*, kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales* a čeledi *Lactobacillaceae*. Jsou to grampozitivní nesporeující kataláza negativní bakterie, které spojuje tyčinkovitý tvar (Sedláček, 2007). Laktobacily jsou velmi početný rod a jeho zástupci mohou být aerotolerantní, mikroaerofilní nebo anaerobní. Rostou na kultivačních médiích bohatých na uhlovodíky, aminokyseliny, peptidy a vitaminy a optimální teplota růstu je 30 °C až 40 °C, ale mohou růst při teplotách 5 – 53 °C. Optimální pH je 4,5 – 6,2. Vyskytují se na lidských sliznicích, v půdě, na zvířatech, na rostlinách i v potravinách. Některé laktobacily řadíme mezi probiotické kultury. V roce 2005 bylo u rodu *Lactobacillus* 103 validně popsanych druhů (Švec et al., 2005).

Laktobacily se dělí do skupin podle toho, zda jsou obligátně homofermentativní, fakultativně heterofermentativní nebo obligátně heterofermentativní (Robinson et al 2006.) Mezi homofermentativní řadíme *L. delbrueckii*, *L. leichmannii*, a *L. acidophilus*. K heterofermentativním patří *L. fermentum*, *L. brevis* a *L. casei*. I když všechny produkují kyselinu mléčnou jako hlavní konečný produkt, liší se v izomerní konformaci. Některé druhy produkují L(+) kyselinu, jiné D(-) kyselinu a některé jejich izomerní směsi. Jedním z dalších kritérií pro rozlišení laktobacilů je produkce plynů ze zdrojů uhlíku a rozmanitost ve schopnosti zkvašovat pentózové cukry včetně ribózy a xylózy (Robinson et al., 2000).

3.1.1 *Lactobacillus curvatus*

L. curvatus je fakultativně heterofermentativní bakterie mléčného kvašení, která se nejčastěji vyskytuje v masných výrobcích. Tvoří bakteriocin curvacin A, curvacin 13 a curvacin FS47 (Xyraphy et al., 2006; Hebert et al., 2011).

3.1.2 *Lactobacillus sakei*

L. sakei je fakultativně heterofermentativní bakterie mléčného kvašení. Běžně se vyskytuje v čerstvém mase a rybách. Poprvé byl izolován z nápoje saké, podle kterého získal svůj název. Z cukrů je schopný využít pouze glukózu a ribózu. Produkuje bakteriocin sarcin P, kterým lze dosáhnout inhibice bakterie *Listeria monocytogenes* (Katla et al., 2002).

3.2 Rod *Staphylococcus*

Bakterie rodu *Staphylococcus* jsou grampozitivní koky, které se formují do dvojic, trojic i větších nepravidelných útvarů. Většina jejich zástupců je fakultativně anaerobní, cukry štěpí oxidativně i fermentativně a tvoří karotenoidní pigmenty. Jsou kataláza pozitivní, a jelikož nemají bičíky, tak nejsou pohyblivé. Optimální teplota růstu je 30 – 37 °C, ale rostou i při teplotách 18 – 40 °C. Jsou schopné růst i při 10% koncentraci NaCl a rezistentní vůči působení lysozymu. Zástupci tohoto rodu se vyskytují na lidských sliznicích, v půdě i potravinách (Sedláček, 2007).

Z biochemických vlastností je pozorována schopnost aerobního štěpení cukrů a tvorba proteolytických enzymů. Zástupce stafylokoků rozdělujeme na koaguláza pozitivní a koaguláza negativní koky. Volná koaguláza je enzym, který vyvolává polymerizaci fibrinogenu na fibrin. Koaguláza pozitivní stafylokoky se považují za patogeny lidí i zvířat, proto je výsledek testu klíčový pro identifikaci druhů (Sedláček, 1999).

3.2.1 *Staphylococcus carnosus*

Tento grampozitivní koaguláza negativní kok je známý od roku 1950. Má významnou roli při fermentaci suchých salámů. Jako nepatogenní bakterie je používán pro umožnění kvašení a zrání fermentovaných masných výrobků za kontrolovaných podmínek. U výrobků se podílí na vývoji barvy a charakteristickém aroma. Patří mezi startovací kultury (Kameník, 2012).

3.2.2 *Staphylococcus xylosus*

S. xylosus je grampozitivní koaguláza negativní kok. Užívá galaktózu, manózu, manitol, maltózu a laktózu. Poskytuje významné množství enzymů pro sekundární proteolýzu (Whitmann et al., 2012).

3.3 Rod *Pediococcus*

Bakterie rodu *Pediococcus* patří mezi homofermentativní bakterie mléčného kvašení. Vyskytují se v rostlinném materiálu, jídle i nápojích. Hlavním metabolitem, který vzniká při jejich činnosti, je racemická (DL) a pravotočivá L(+) směs kyseliny mléčné. Jejich kokovité buňky se shlukují do dvojic, tetrad nebo shluků. Jsou grampozitivní, nepohyblivé a netvoří spory, fakultativně anaerobní a kataláza negativní (Görner, 2004).

Pediokoky netvoří enzymy, kterými by bylo možné redukovat dusičnany na dusitany. Rostou na médiích bohatých na aminokyseliny a vitaminy. Jejich růst je podmíněn přítomností fermentovaného polysacharidu. Optimální teplota růstu je 25 – 40°C.

P. pentosaceus je grampozitivní kok, který je klasifikován jako bakterie mléčného kvašení. Je schopný produkovat bakteriocin pediocin P (Papagianni a Anastasiadou, 2009).

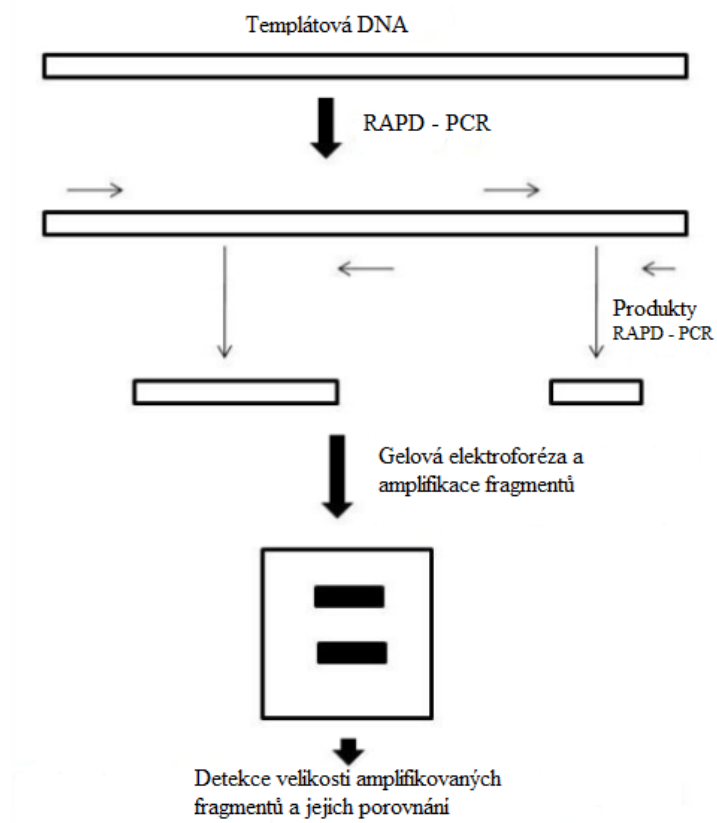
4 POPIS METODY RAPD PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je v dnešní době hojně používaná metoda molekulární biologie. Díky ní je možné *in vitro* rychle a vysoce selektivně namnožit jakoukoliv nukleotidovou sekvenci obsaženou v jakékoliv DNA. Princip PCR je založen na replikaci nukleových kyselin, která je základním molekulárním procesem všech živých organismů. Podstatou je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5'→3' prostřednictvím DNA-polymerázy. Úsek, který je žádoucí získat, je vymezen připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce tak, že jejich 3'- konce směřují proti sobě. Po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů pak probíhá syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích protisměrně. K syntéze DNA se používají termostabilní polymerázy izolované z termofilních mikroorganismů, což umožňuje, aby syntéza probíhala opakovaně formou cyklů. PCR je proces, při němž se v závislosti na teplotě reakční směsi střídají pravidelně tři kroky. Během těchto kroků probíhají tři odlišné děje s různými nároky na teplotu. Nejprve jde o denaturaci dvouřetězcových molekul DNA při teplotě 94 °C, potom následuje annealing neboli připojení primerů k odděleným řetězcům DNA při teplotě 30 – 60 °C a nakonec syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA-polymerázy při 65 až 75 °C. Teploty a koncentrace komponent se mění v závislosti na povaze vzorků. Výsledným produktem PCR jsou amplikony o velikosti desítek až tisíce bp (párů bazí) analogické restričními fragmentům. Jejich přítomnost se v reakční směsi prokazuje stanovením jejich velikosti elektroforézou v agarovém nebo polyakrylamidovém gelu (Šmarda, 2005; Alberts, 1998).

4.1 Náhodná PCR

Náhodná PCR neboli náhodná amplifikace polymorfní DNA (RAPD), je rychlá a jednoduchá technika pro fingerprinting DNA, která je vhodná pro rychlou srovnávací typizaci genomových DNA mikroorganismů (Berthier, Ehrlich, 1999). Při metodě je používán často jeden nebo více krátkých primerů o délce 8 – 12 nukleotidů libovolné sekvence s neznámou homologií k cílové sekvenci DNA a málo přísné podmínky pro nasednutí primeru. Za těchto mírných podmínek je pravděpodobné, že primer nasedne na DNA ve více místech. Tato místa dovolují připojení na protilehlých řetězcích 3'-konci směřujícími k sobě. Výsledkem je amplifikace mnoha fragmentů s různou délkou a rozdílným molárním množstvím (Šmarda 2005). RAPD-PCR bývá používána k odhadování biologické diverzity

v rámci bakterií mléčného kvašení (Coconcelli et al., 1995). Schématické znázornění RAPD - PCR je na obrázku č. 1.



Obrázek 1: Schématické znázornění RAPD – PCR, převzato z Arif (2010)

5 MALDI TOF

Metoda MALDI TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight mass spectrometry) byla původně vyvinuta na kvalitativní analýzu peptidů a bílkovin, nyní se však využívá i pro analýzy nukleových kyselin nebo nízkomolekulárních organických i anorganických látek. Mezi její výhody patří vysoká citlivost a rychlost měření, přesnost a aplikovatelnost pro široké spektrum mikroorganismů. Ty je možno pomocí MALDI-TOF rozlišit na rodové, druhové a často i kmenové úrovni (Havliš, 1999). MALDI-TOF je spolehlivá, rychlá a nepříliš nákladná metoda pro identifikaci bakterií mléčného kvašení které jsou spojeny s fermentovanými masnými výrobky (Doan, 2012).

5.1 Princip metody

Vzorek je ionizován tak, aby molekula rezonančně absorbovala při vlnové délce laseru a tedy, aby se energie fotonů laseru rovnala energii potřebné k vybuzení dané molekuly a tím k její ionizaci. Doba přenosu energie se děje v řádu jednotek až desítek nanosekund, aby nedocházelo k jeho tepelné destrukci. Pokud jsou měřené molekuly ozařované přímo, tak se štěpí nežádoucím způsobem. Proto byla do metodiky zavedena matrice. Matrice je látka, jejímž prostřednictvím se ionizační energie laseru přenáší na vzorek a tím brání jeho štěpení. Použití matrice umožňuje měření více látek v jednom vzorku a výsledek neovlivňuje ve významné míře pozadí biologických vzorků. Směs matrice a vzorku je na MALDI destičce zasažena pulzem laseru. Dojde k ionizaci vzorku předáním H^+ iontu z matrice, vznikne radikál odštěpením elektronu, případně cílené rozkouskování molekuly a opětovné spojení kousků. Ionty analyzované látky jsou urychleny silným elektrickým polem (25 – 30 kV) a přes uzemněnou mřížku vstupují do vakua v letovém detektoru. Tam se pohybují rychlostí danou jejich hmotností a nábojem m/z . Detektor zachytává dopadající ionty, ze kterých pak vypočítá jejich hmotnost. Většina detektorů je založena na převodu iontů na elektrický signál pomocí scintilační vrstvy, která při dopadu iontů vydává světelné záření. Toto záření je dále převedeno na elektrický proud a zesíleno. Detektory rozdělujeme na elektronový, fotonásobič a Faradayovu klec (Havliš, 1999).

Pro samotnou analýzu je důležitý výběr matrice. Vhodné jsou aromatické karboxylové kyseliny, většinou deriváty kyseliny benzoové rozpuštěné ve vodném roztoku acetonitrilu, metanolu nebo etanolu. Roztok se ještě často okyseluje kyselinou triflouroctovou (Huong, 2014; Havliš, 1999).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍLE PRÁCE

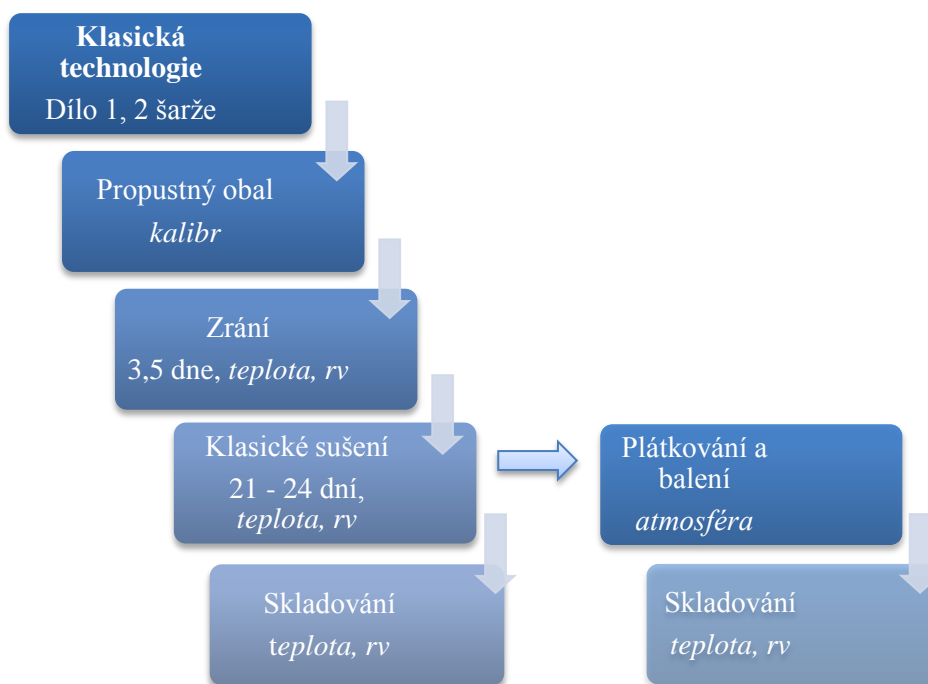
Hlavním cílem této diplomové práce bylo charakterizovat vybrané grampozitivní bakterie izolované z fermentovaného masného výrobku Paprikáš v procesu jejich výroby, zrání a skladování. Do této studie byly zařazeny fermentované masné výrobky vyrobené dvěma odlišnými technologiemi za použití stejné startovací kultury. K dosažení tohoto cíle bylo nutno splnit několik dílčích cílů:

- Vypracovat literární rešerši na téma výroby fermentovaných masných výrobků a jejich mikroflóry.
- Metodou MALDI-TOF identifikovat kmeny bakterií, které byly izolovány z fermentovaného salámu Paprikáš.
- Metodou RAPD-PCR porovnat, zda se fingerprinty izolovaných bakterií během zrání a skladování u obou technologií změnily.
- Vyhodnotit výsledky, diskutovat je a formulovat závěry.

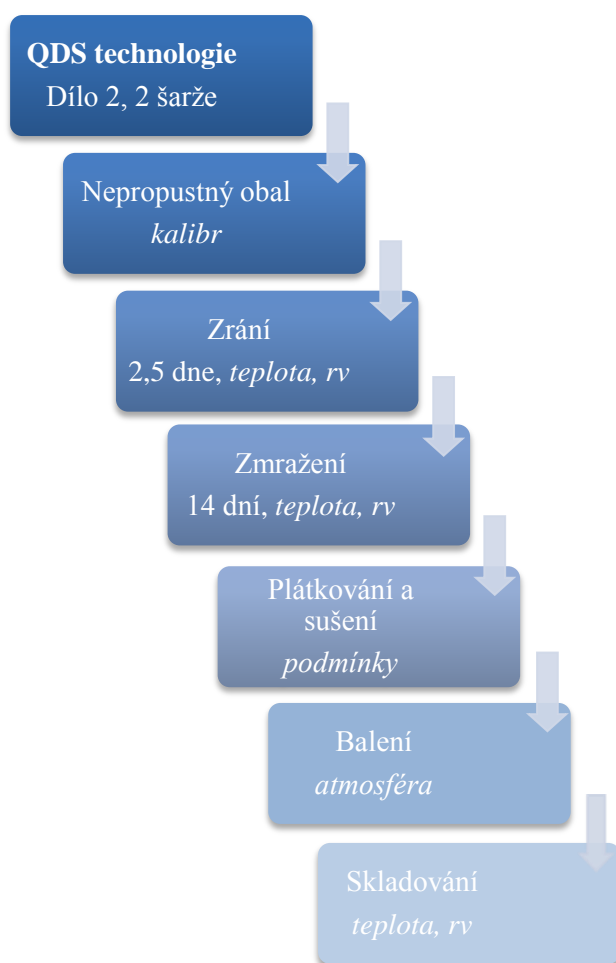
7 MATERIÁL A METODY

7.1 Popis a příprava vzorků

Analyzované vzorky byly vyrobeny a dodány českou komerční společností v období únor – duben 2015, konkrétně byly použity TFS Paprikáš. Dodány byly dvě šarže salámů vyrobených klasickou technologií a dvě šarže výrobků zpracované technologií QDS, dále vzorky díla všech šarží, vzorky koření a startovací kultura ve formě lyofilizátu. Obě díla byla složena z masa, sádla, koření a specifické skladby sacharidů, s tím rozdílem, že v díle vyrobeném technologií QDS byla větší dávka koření. Schéma výroby salámů Paprikáš jednotlivými technologiemi je uvedeno na obrázku č. 2 a č. 3.



Obrázek 2: Schéma výroby TFS klasickou technologií



Obrázek 3: Schéma výroby TFS QDS technologií

V tabulce č. 3 je uveden časový harmonogram mikrobiologických analýz vzorků salámů.

Tabulka 3: Časový harmonogram odběru vzorků salámů

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

Pro následnou analýzu mikroorganismů byly vzorky dále zpracovány. Vlastní mikrobiologický rozbor výrobků nebyl předmětem této diplomové práce (zabývala se jím ve své práci

Bc. Iveta Kalousová), nicméně z důvodu další práce s izoláty zde bude stručně popsán postup těchto analýz

Deset gramů vzorku salámu bylo odebráno do sterilního plastového sáčku. Z tyčí byly odebírány 3 vzorky, každý z jiné vrstvy vzhledem ke vzdálenosti od středu salámu. Navážka byla 10x zředěna sterilním fyziologickým roztokem a homogenizována (Stomacher BA6021, Lab Blender 400) po dobu dvou minut. Z této základní suspenze byla připravena řada desítkového ředění. Agarové plotny byly inokulovány roztěrem 100 μ l suspenze za použití sterilních hokejek. V tabulce č. 4 jsou uvedena média, podmínky růstu a ČSN ISO normy (ve kterých je zakotven standardní postup kultivace).

Tabulka 4: Kultivační stanovení testovaných mikroorganismů

Skupina mikroorganismů	Živná půda	Podmínky kultivace	Norma
CPM	PCA	30 °C, 72 h	ČSN ISO 2293
laktobacily	MRS	30 °C, 72 h anaerobně	ČSN ISO 15214
koaguláza negativní stafylokoky	MSA	30 °C, 24 - 48 h	-

Ze vzorků byly vykultivovány mikroorganismy:

Celkový počet mikroorganismů (CPM) na živné půdě Plate Count Agar (PCA).

Složení PCA: enzymatický hydrolyzát kaseinu 5,0 g/l, kvasničný extrakt 2,5 g/l, dextróza 1,0 g/l, agar 15,0 g/l, výsledné pH (při 25 °C) $7,0 \pm 0,2$,

Laktobacily byly kultivovány na médiu MRS (Lactobacillus MRS Agar).

Složení MRS: proteozo-pepton 10,0 g/l, hovězí extrakt 10,0 g/l, kvasničný extrakt 5,0 g/l, dextróza 20,0 g/l, polysorbát 80 1,0 g/l, citrát amonný 2,0 g/l, acetát sodný 5,0 g/l, síran hořečnatý 0,1 g/l, síran manganatý 0,05 g/l, hydrogenfosforečnan draselný 2,0 g/l, agar 12,0 g/l, výsledné pH (25 °C) $6,5 \pm 0,2$,

Stafylokoky byly kultivovány na médiu Mannitol Salt Agar (MSA).

Složení MSA: proteozo-pepton 10,0 g/l, masový extrakt (ekvivalentní k hovězímu extraktu) 1,0 g/l, chlorid sodný 75,0 g/l, D-mannitol 10,0 g/l, pH indikátor fenolová červeň 0,025 g/l, agar 15,0 g/l, výsledné pH (25 °C) $7,4 \pm 0,2$.

Po předběžné identifikaci byly k další analýze vybrány grampozitivní bakterie. Všechny doposud popsané pracovní potupy byly prováděny na Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně.

7.2 Identifikace vzorků metodou MALDI-TOF

Připravené vzorky byly nejprve identifikovány na úrovni druhů metodou MALDI-TOF. Izolované kolonie každého vzorku byla přenesena pomocí jednorázového aplikátoru na terčík identifikační destičky (Bruker, Německo). Kmeny byly identifikovány metodou semiextrakce – nejprve byly zakápnuty 1 µl 70% kyseliny mravenčí (Sigma Aldrich, USA) a po zaschnutí byly na vzorky zakápnuty vždy 1 µl 1% roztoku kyseliny skořicové (Bruker, Německo) v 50% roztoku acetonitrilu (Sigma Aldrich, USA), v ultračisté vodě (Sigma Aldrich, USA) a 2,5% kyselině trifluoroctové (Sigma Aldrich, USA).

Po zaschnutí byly vzorky analyzovány pomocí přístroje Maldi Biotyper (Bruker, Německo). Všechny vzorky byly stanoveny v triplikátu.

K vyhodnocení bylo použito srovnání naměřených spekter se standardní bakteriální knihovnou Bruker. Přístroj hodnotí spolehlivost identifikace na základě hodnoty tzv. skóre, které zohledňuje kvalitu připraveného vzorku a také velikost shody se spektrem dostupným v knihovně. Hodnoty skóre se pohybují v intervalu od 0 do 3. Hodnoty v rozmezí 0 – 1,5 značí, že daný mikroorganismus nebyl identifikován. Hodnoty v rozmezí 1,5 – 2,0 znamenají, že mikroorganismus byl identifikován s nižší spolehlivostí, zpravidla na úrovni rodu. Hodnota nad 2,0 značí velmi spolehlivou identifikaci na úrovni druhu. Jak již bylo zmíněno, všechny izoláty byly stanoveny v triplikátu, ve výsledcích jsou uvedeny hodnoty skóre nejvyšší shody.

7.3 Charakterizace vzorků metodou RAPD-PCR

7.3.1 Izolace DNA

Izolace DNA z bakteriálních vzorků byla provedena pomocí komerčního kitu DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Německo) v mikrobiologickém bezpečnostním boxu (Forlab MBB, Block, Česká republika). Kolonie jednotlivých vzorků byly z agarových misek se sbírány pomocí sterilní mikrobiologické kličky a resuspendovány vždy v 500 µl pufru PBS

(NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 1,42 g/l, KH₂PO₄ 0,24 g/l). Vzoroky byly promíchány na vortexu a poté centrifugovány (BOECO, Německo) při 8000 g po dobu 5 minut. Vzniklý pelet byl rozpuštěn v 360 µl lyzačního pufru (20 mM TRIS/HCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, lysozym 20 mg/ml, vše SERVA, Německo). Vzoroky byly následně inkubovány při 37 °C po dobu 60 minut (DryBath inkubator, Taiwan). Následně bylo přidáno 25 µl proteínázy K, která byla součástí komerčního kitu. Lyze byla dokončena 10 min při 56 °C. Izolace byla dokončena dle návodu komerčního kitu.

7.3.2 Amplifikace DNA

Pro amplifikaci byl použit komerční kit FastStart PCR Master (Roche, Německo) s použitím primerů uvedených v tabulce č. 5, kde jsou uvedeny i teploty annealingu (T_A). Složení reakční směsi pro jednotlivé RAPD primery je uvedeno v tabulce č. 6. Celkový objem každé reakce byl 25 µl (22 µl reakční směsi a 3 µl vyizolované DNA). Amplifikace byla provedena v termocycleru (Gene Pro cycler, Německo). Termální profily reakcí pro jednotlivé RAPD primery jsou uvedeny v tabulkách č. 7, 8, 9 a 10. Složení reakčních směsí s jednotlivými RAPD primery i vlastní reakce byly provedeny dle autorů publikací uvedených v tabulce č. 5.

Tabulka 5: Charakteristika použitých RAPD primerů

Název	Sekvence (5' - 3')	T_A (°C)	Zdroj
R5	AAC GCG CAA C	29	Aymerich et al. (2006)
M13R2	GGA AAC AGC TAT GAC CAT GA	38	Aymerich et al. (2006)
GTG₅	GTG GTG GTG GTG GTG	40	Švec et al. (2005 a 2009)
CC1	AGC AGC GTG G	37	Coconcelli et al. (1995)

Tabulka 6: Složení reakčních směsí s jednotlivými primery

Primer	R5	M13R2	CC1	GTG ₅
PCR mix (Roche)	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl
objem primeru (20 µM)	1 µl	1 µl	0,25 µl	1,25 µl
MgCl	1 µl	0 µl	1 µl	0,5 µl
voda	7,5 µl	8,5 µl	8,25 µl	7,75 µl

Tabulka 7: Termální profil PCR s použitím primeru R5

Hot-start (1x)	Cyklus (40x)			Finální elongace
95 °C	95 °C	29 °C	72 °C	74 °C
7 min	40 s	90 s	120 s	5 min

Tabulka 8: Termální profil PCR s použitím primeru M13R2

Hot-start (1x)	Cyklus (35x)		
95 °C	95 °C	38 °C	72 °C
7 min	60 s	60 s	60 s

Tabulka 9: Termální profil PCR s použitím primeru GTG₅

Hot-start (1x)	Cyklus (30x)			Finální elongace
95 °C	95 °C	40 °C	65 °C	65 °C
7 min	60 s	60 s	8 min	16 min

Tabulka 10: Termální profil PCR s použitím primeru CC1

Hot-start (1x)	Cyklus (35x)			Finální elongace
95 °C	95 °C	37 °C	72 °C	72 °C
7 min	40 s	60 s	120 s	7 min

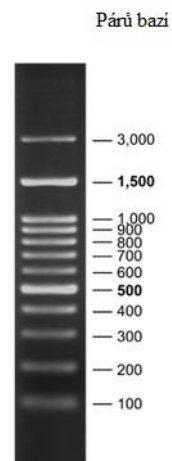
7.3.3 Gelová elektroforéza

Elektroforéza byla provedena v 1,2% agarózovém gelu (SeaKem, Lonza) připraveném v 0,5x TBE pufru (Tris 5,4 g/l, kyselina boritá 2,75 g/l, 2ml 0,5M EDTA, vše SERVA, Německo). K vizualizaci amplikonů byl do gelu přidán etidiumbromid o finální koncentraci 0,5 µg/ml (SERVA, Německo). Na gel byl rovněž nanesen hmotnostní standard 100 bp ladder (Nippon Genetics, Německo) o objemu 10 µl. Před nanesením na gel byl do vzorků DNA přidán nanášecí pufr (DNA Loading Dye 6x, Thermo Fisher Scientific) v poměru DNA:nanášecí pufr 5:1. Na gel bylo poté naneseno množství 15 µl. Elektroforéza byla provedena při konstantním napětí 120 V po dobu 150 minut.

7.3.4 Hodnocení gelů

Gely byly vizualizovány pomocí UV záření a zaznamenány dokumentačním systémem s fotoaparátem (Digimage Systém Major Science, USA).

Snímky gelů byly analyzovány pomocí programu GelQuest (Sequentix, Německo), metodou UPGMA (numerická shluková analýza) s použitím koeficientu Nei a Li (Dice) byly sestrojeny dendrogramy. Molekulové hmotnosti proteinových frakcí byly rovněž vypočteny programem GelQuest. Byl použit molekulový standard 100 bp ladder (Nippon Genetics, Německo) s DNA fragmenty o definovaných velikostech v rozmezí 100 – 3000 bp. Velikost a rozložení jednotlivých DNA fragmentů u použitého 100 bp standardu je na obrázku č. 4.



Obrázek 4: Velikost a rozložení jednotlivých DNA fragmentů u použitého 100 bp standardu

8 VÝSLEDKY A DISKUZE

8.1 Identifikace vzorků metodou MALDI-TOF

Celkové množství vyizolovaných a identifikovaných vzorků z produktů vyrobených klasickou technologií bylo 63. Z tohoto množství bylo na základě dosaženého skóre 60 vzorků metodou MALDI-TOF identifikováno velmi spolehlivě a tři vzorky s nižší spolehlivostí. Nejvíce byly zastoupeny bakteriální druhy *Staphylococcus carnosus* (33) a *Lactobacillus curvatus* (10). *Lactobacillus sakei* (3) a *Staphylococcus xylosus* (2) byly dalšími očekávanými druhy. Souhrn všech identifikovaných kmenů izolovaných ze vzorků vyrobených klasickou technologií jsou uvedeny v tabulce č. 11.

Vzorků pocházejících z díla vyrobeného metodou QDS nebylo stejné množství jako z klasické technologie výroby, protože z důvodu použité technologie nemohly být odebrány vzorky z tyčí. Celkové množství izolátů bylo tedy 28. Nejvíce zastoupené druhy byly *Staphylococcus carnosus* (13) a *Lactobacillus curvatus* (10). Všechny identifikované druhy vyizolované ze salámů vyrobených technologií QDS jsou uvedeny v tabulce č. 12:

Tabulka 11: Identifikace vybraných bakterií izolovaných z výrobků připravených klasickou technologií

Číslo vzorku	Nejlepší shoda	Skóre	Číslo vzorku	Nejlepší shoda	Skóre
19.10	<i>Lactobacillus curvatus</i>	2,237	205.2	<i>Staphylococcus warneri</i>	1,969
19.12	<i>Lactobacillus curvatus</i>	2,271	205.1	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,157
281.1	<i>Acinetobacter pittii</i>	2,207	134.6	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,103
18.6H	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,313	205.3	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,077
169.2	<i>Lactobacillus curvatus</i>	2,223	281.7	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,282
205.8	<i>Lactobacillus curvatus</i>	2,112	1.8	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,245
134.1	<i>Lactobacillus curvatus</i>	2,211	134.5	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,263
206.15	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2,232	169.8	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,297
206.6	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,181	17.1	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,289
206.6	<i>Lactobacillus sakei</i>	2,371	205.1	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,157
207.13	<i>Lactobacillus sakei</i>	2,441	281.7	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,307
19.4	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2,239	1.7	<i>Staphylococcus xylosus</i>	2,256
135.6	<i>Lactobacillus sakei</i>	2,415	291.3	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,322
171.1	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,077	170.1	<i>Staphylococcus hominis</i>	2,237
171.1H	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2,224	18.8H	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,323
210.11	<i>Lactobacillus curvatus</i>	2,237	17.2H	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,189
17.4	<i>Lactobacillus curvatus</i>	2,308	17.1K	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,139
170.10	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2,026	207.1	<i>Acinetobacter pittii</i>	1,811
171.5	<i>Lactobacillus curvatus</i>	2,278	206.7	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,289
147.8	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	2,237	280.1	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,022
207.14	<i>Bacillus licheniformis</i>	2,132	147.7	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,024
219.13	<i>Bacillus subtilis</i>	2,192	170.7	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,313
219.10	<i>Lactobacillus curvatus</i>	2,254	1.1	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,276
19.11	<i>Lactobacillus curvatus</i>	2,197	134.2	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,165
1.9H	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,236	206.13	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,134
17.3	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,156	205.4	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,289
18.5K	<i>Acinetobacter pittii</i>	1,959	207.6	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,046
171.8	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,326	19.8	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,103
171.4	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,235	280.4	<i>Acinetobacter pittii</i>	2,294
10.4	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,296	135.2	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,312
17.1H	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,222	18.7K	<i>Acinetobacter ursingii</i>	2,164
2.10H	<i>Staphylococcus xylosus</i>	2,321			

Tabulka 12: Identifikace vybraných bakterií izolovaných z výrobků připravených technologií QDS

Číslo vzorku	Nejlepší shoda	Skóre
77.15	<i>Lactobacillus curvatus</i>	2,258
79.14	<i>Lactobacillus curvatus</i>	2,215
46.14	<i>Lactobacillus curvatus</i>	2,307
79.11	<i>Lactobacillus curvatus</i>	2,269
79.13	<i>Lactobacillus curvatus</i>	2,322
44.9	<i>Lactobacillus curvatus</i>	2,129
259.14	<i>Lactobacillus sakei</i>	2,454
44.22	<i>Lactobacillus curvatus</i>	2,352
151.9	<i>Lactobacillus sakei</i>	2,407
223.8	<i>Lactobacillus curvatus</i>	2,355
44.18	<i>Lactobacillus curvatus</i>	2,213
259.14	<i>Lactobacillus sakei</i>	2,476
46.13	<i>Lactobacillus curvatus</i>	2,222
259.3	<i>Staphylococcus hominis</i>	1,972
115.7H	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,036
46.1	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,324
46.5H	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,291
46.3	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,068
223.2	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,273
44.1H	<i>Staphylococcus carnosus</i>	1,997
259.5H	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,143
45.4H	<i>Staphylococcus carnosus</i>	1,925
44.3H	<i>Staphylococcus carnosus</i>	1,971
259.1	<i>Staphylococcus hominis</i>	2,116
259.7H	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,275
44.4H	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,306
45.5H	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,376
46.4	<i>Staphylococcus carnosus</i>	2,298

Z celkového shrnutí identifikace vybraných bakterií izolovaných ze vzorků salámů Paprikáš vyrobených pomocí klasické a QDS technologie (tabulka č. 13, 14) je zřejmé, že u výrobků produkovaných pomocí klasické technologie je přítomno rozmanitější druhové zastoupení bakterií. U těchto výrobků bylo identifikováno celkem 12 různých bakteriálních druhů, mezi izoláty ze salámů vyrobených technologií QDS byly nalezeny pouze 4 různé druhy.

Tabulka 13: Zastoupení identifikovaných bakterií izolovaných ze salámů vyrobených klasickou technologií

Klasická technologie	
<i>Staphylococcus carnosus</i>	33
<i>Lactobacillus curvatus</i>	10
<i>Lactobacillus sakei</i>	3
<i>Staphylococcus xylosus</i>	2
<i>Acinetobacter pittii</i>	4
<i>Staphylococcus hominis</i>	1
<i>Acinetobacter ursingii</i>	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1
<i>Bacillus subtilis</i>	1
<i>Staphylococcus warneri</i>	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	4
CELKEM	63

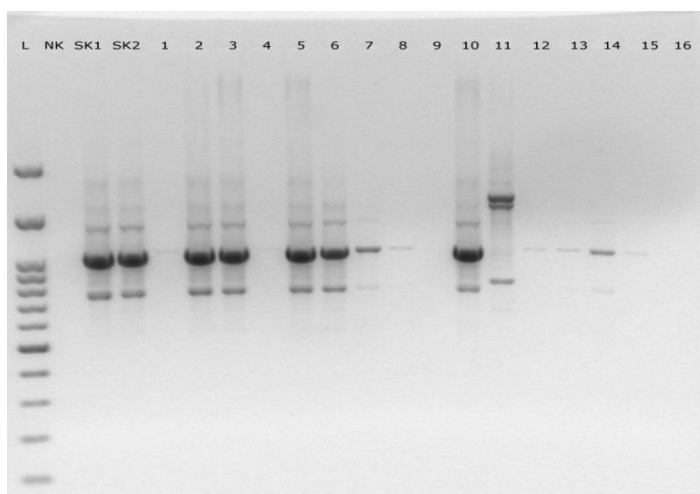
Tabulka 14: Zastoupení identifikovaných bakterií izolovaných ze salámů vyrobených QDS technologií

QDS technologie	
<i>Staphylococcus carnosus</i>	13
<i>Lactobacillus curvatus</i>	10
<i>Lactobacillus sakei</i>	3
<i>Staphylococcus hominis</i>	2
CELKEM	28

8.3 RAPD profil vybraných bakterií izolovaných z fermentovaného masného výrobku

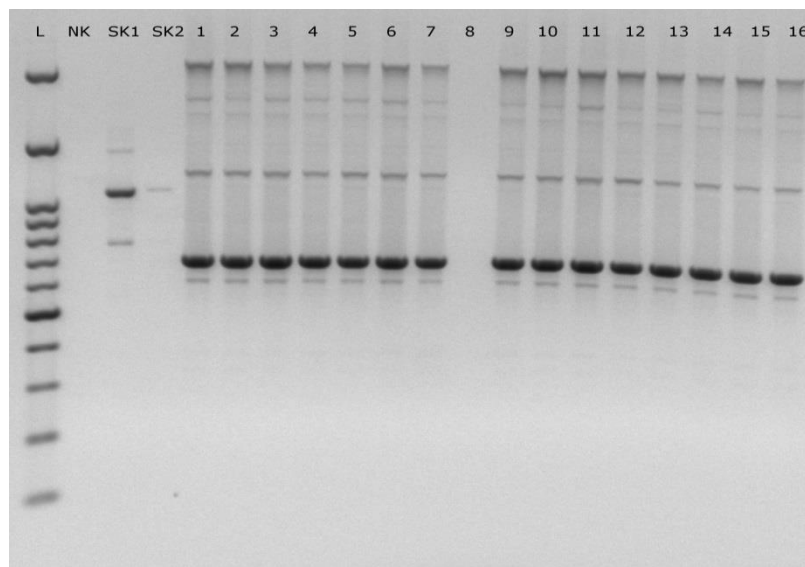
Kmeny, které byly metodou MALDI-TOF identifikovány jako zástupci rodů *Lactobacillus* nebo *Staphylococcus*, byly podrobeny další analýze, konkrétně byly pomocí metody RAPD-PCR s využitím čtyř různých primerů sestrojeny jejich fingerprintové profily.

Kmeny *Staphylococcus* byly seřazeny podle toho, jakým typem technologie byl vyroben produkt, ze kterého byly vyizolovány a následně amplifikovány pomocí primerů R5 (obrázek č. 5), M13R2 a CC1. Stejně tak byla amplifikována DNA stafylokoků izolovaných ze startovací kultury. Kmeny startovací kultury byly použity při každé amplifikaci a gelové elektroforéze jako pozitivní kontroly. Laktobacily byly amplifikovány se všemi 4 primery, tedy R5 (obrázek č. 6), M13R2 a CC1 a GTG₅. Primer GTG₅ se primárně používá k rozlišení bakterií mléčného kvašení (Švec et al., 2005), proto nebyl použit při charakterizaci izolovaných stafylokoků. Pokud je u následujících obrázků za názvem mikroorganismu uvedena zkratka K, znamená to, že se jedná o izolát pocházející z výrobků z klasické technologie.



Obrázek 5: RAPD profil vybraných kmenů stafylokoků získaný pomocí primeru Detekce *Staphylococcus* s využitím primerů R5

L. 100 bp ladder, **NK.** Negativní kontrola, **SK1.** Startovací kultura 1, **SK2** Startovací kultura 2, **1.** *S. curvatus*, **K, 3.** *S. curvatus* K, **4.** *S. curvatus* K, **5.** *S. curvatus* K, **6.** *S. curvatus* K, **7.** *S. curvatus* K, **8.** *S. curvatus* K, **9.** *S. curvatus* K, **10.** *S. curvatus* K, **11.** *S. curvatus* K, **12.** *S. curvatus* K, **13.** *S. curvatus* K, **14.** *S. curvatus* K, **15.** *S. curvatus* K, **16.** *S. curvatus* K



Obrázek 6: RAPD profil vybraných kmenů laktobacilů získaný pomocí primeru R5

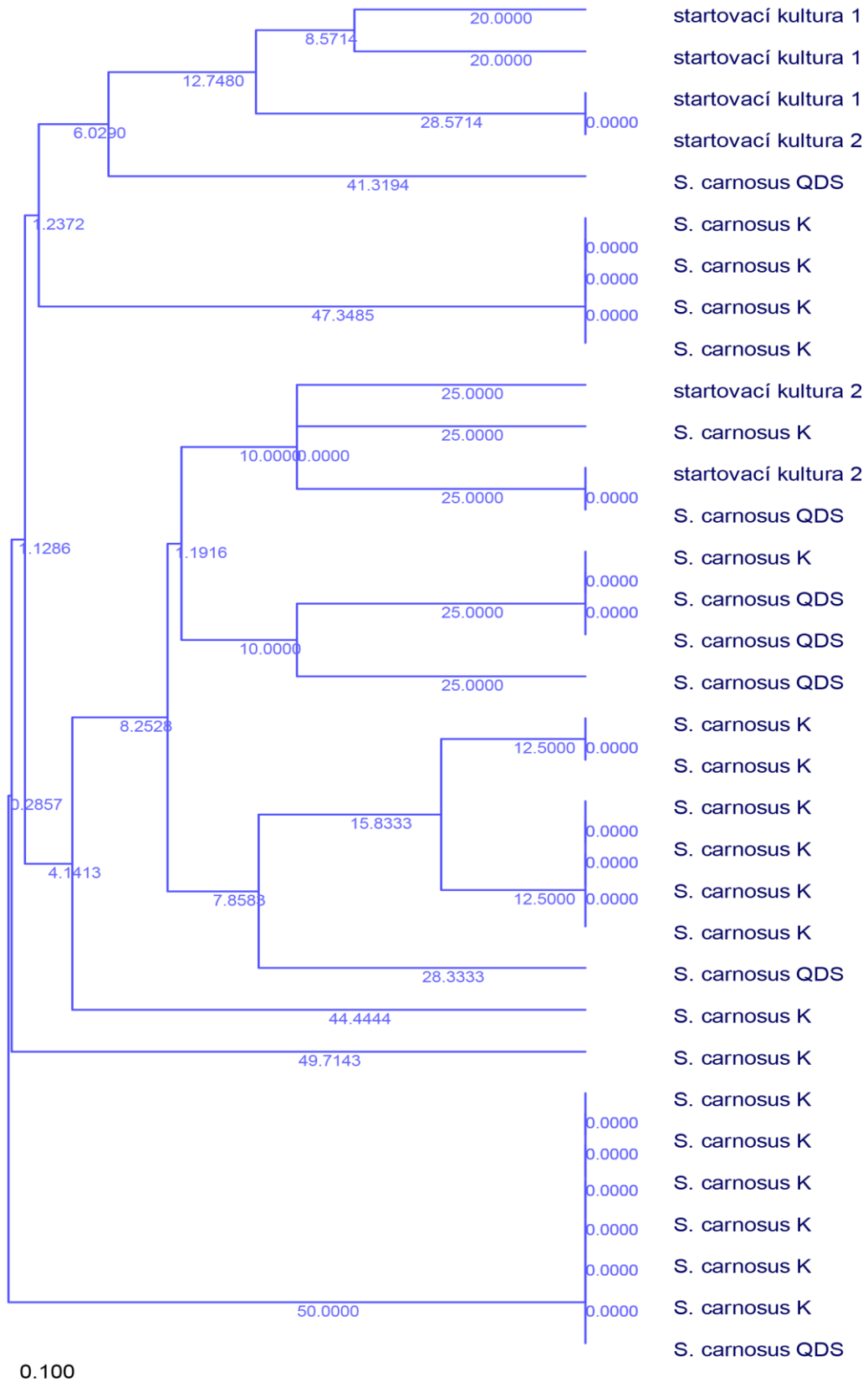
L. 100bp ladder, **NK.** Negativní kontrola, **SK1.** Startovací kultura 1., **SK2.** Startovací kultura 2, **1.** *L. curvatus* K., **2.** *L. curvatus* K, **3.** *L. curvatus* K, **4.** *L. curvatus* K, **5.** *L. curvatus* K., **6.** *L. curvatus* K. **7.** *L. curvatus* K., **8.** *L. curvatus* K, **9.** *L. curvatus* K., **10.** *L. curvatus* K., **11.** *L. curvatus* QDS, **12.** *L. curvatus* QDS, **13.** *L. curvatus* QDS, **14.** *L. curvatus* QDS, **15.** *L. curvatus* QDS, **16.** *L. curvatus* QDS

8.3.1 RAPD typizace: primer R5, rod *Staphylococcus*

Počet viditelných amplifikovaných DNA fragmentů v RAPD profilu vzniklého amplifikací DNA kmenů *S. carnosus* z klasické i QDS technologie s primerem R5 se pohybuje v rozmezí od jedné do šesti. Velikost viditelných DNA fragmentů je mezi 221 bp a 725 bp. RAPD profil startovací kultury, jako referenčního kmene, je tvořen čtyřmi fragmenty v případě první izolace a třemi fragmenty v případě druhé izolace. Velikost fragmentů startovací kultury je 263 – 484 bp. Velikosti všech fragmentů kmenů *S. carnosus* s primerem R5 jsou uvedeny v tabulce číslo 15.

S použitím RAPD profilů všech analyzovaných kmenů byl vytvořen dendrogram (obrázek 7). Testované izoláty *S. carnosus* byly pomocí klastrové analýzy rozděleny do 3 skupin. První skupinu tvořily bakterie, které byly vyizolovány z lyofilizované startovací kultury a také jeden kmen vyizolovaný z produktů vyrobených technologií QDS a čtyřmi kmeny izolovanými z výrobků produkovaných klasickou technologií. Druhá, nejpočetnější skupina, je tvořena dvěma kmeny startovací kultury a dále izoláty ze salámů vyrobených jak klasickou technologií, tak i technologií QDS. Tato skupina je dále rozdělena do tří větví. V první z nich jsou izoláty lyofilizované kultury a jeden kmen pocházející ze salámu vyrobeného klasickou technologií. V druhé z větví převažují kmeny pocházející z produktů

vyrobených technologií QDS. Třetí větev je tvořena šesti kmeny pocházejícími pouze z výrobků vyprodukovaných klasickou technologií. Třetí skupina je tvořena sedmi kmeny *S. carnosus* vyizolovanými převážně z produktů vyrobených klasickou technologií (6 kmenů). Všechny kmeny této poslední skupiny vykazují stejný fingerprint.



Obrázek 7: Dendrogram vytvořený z RAPD profilu kmenů *S. carnosus* izolovaných ze salámů vyrobených klasickou i QDS technologií za použití primeru R5

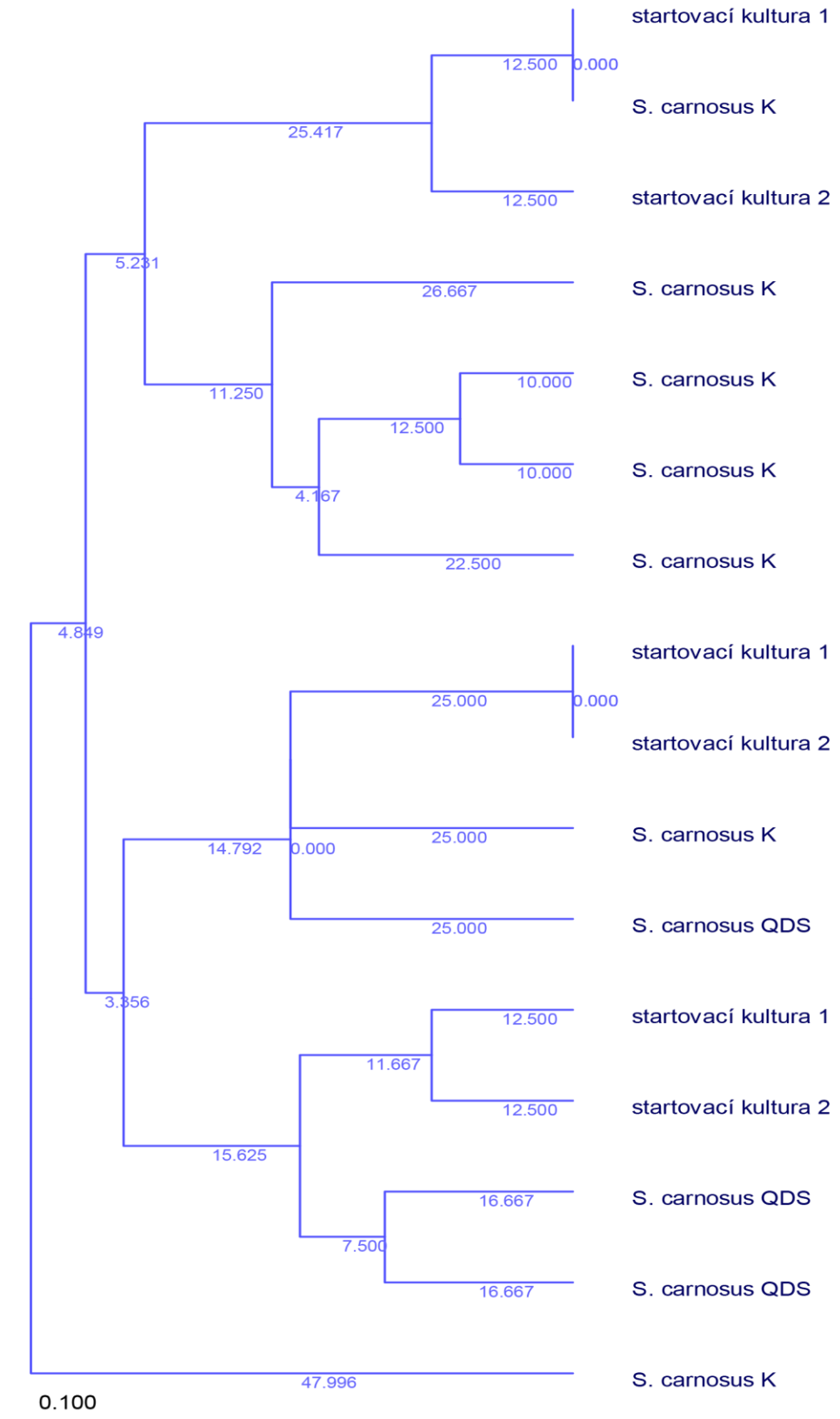
8.3.2 RAPD typizace: primer M13R2, rod *Staphylococcus*

Počet viditelných amplifikovaných DNA fragmentů v RAPD profilu vzniklého amplifikací DNA kmenů *S. carnosus* izolovaných ze salámů Paprikáš vyrobených klasickou i QDS technologií s primerem M13R2 se pohybuje v rozmezí od dvou do čtyř. Velikost viditelných DNA fragmentů je mezi 130 bp a 500 bp. RAPD profil startovací kultury, jako referenčního kmene, je tvořen třemi fragmenty v případě první izolace a čtyřmi fragmenty v případě druhé izolace. Velikost fragmentů startovací kultury je 130 – 336 bp. Všechny velikosti fragmentů kmenů *S. carnosus* s primerem M13R2 jsou uvedeny v tabulce číslo 16.

S použitím RAPD profilů všech analyzovaných kmenů byl vytvořen dendrogram (obrázek 8). Testované izoláty *S. carnosus* byly pomocí klastrové analýzy rozděleny do dvou velkých skupin, jeden kmen se nespároval s žádným z dalších izolátů a vystupuje v dendrogramu samostatně. První skupina se dále dělila do dvou větví. V první z nich se seškupily bakterie, které byly vyizolovány z lyofilizované startovací kultury a kmen pocházející z produktů vyrobených klasickou technologií. Druhá větev se skládala pouze z kmenů pocházející z výrobků produkovaných klasickou technologií (celkem 4 kmene). Druhá skupina se také dělila do dvou větví. První i druhá podskupina byla tvořena bakteriemi pocházejícími ze startovací kultury a dále kmene pocházejícími jak ze salámů vyrobenými klasickou, tak i QDS technologií. U kmene *S. carnosus* pocházejícího ze salámů vyrobených klasickou technologií nebyla v RAPD profilu shledána výraznější podobnost s ostatními izolovanými kmene stafylokoků, proto tento kmen vytvořil samostatnou větev.

Tabulka 16: Velikosti DNA produktů získaných metodou RAPD-PCR pomocí primeru M13R2 u izolátů rodu *Staphylococcus*

Velikost DNA produktů (bp)	Startovací kultura 1		<i>L. curvatus</i> K						Startovací kultura 2		<i>S. carnosus</i> QDS		Startovací kultura 1		Startovací kultura 2		<i>S. carnosus</i> QDS	
			I.	II.	III.	IV.	V.	VI.			<i>S. carnosus</i> 5							
			130.21	130.30	132.82	137.35	139.34	140.44			Startovací kultura 1	Startovací kultura 2	VII.	QDS	Startovací kultura 1	Startovací kultura 2	I.	II.
167.42	171.67	178.18												156.31	156.97			
			180.10	186.58	188.37	191.90								203.64	205.18	205.70	206.47	
										235.72	237.50	248.41	225.68					
							252.28			277.44	278.11	282.66	271.86					
329.08	327.08	334.01	328.69			331.01				345.99	346.30	349.64	345.66	345.90	346.04	346.47	346.25	
	336.93		341.45	342.93	342.34	368.09	368.09											
				428.26		426.36	426.36									421.99		
					499.02	499.02												
														677.69				



Obrázek 8: Dendrogram vytvořený z RAPD profilu kmenů *S. carnosus* izolovaných ze salámů vyrobených klasickou i QDS technologií za použití primeru M13R2

8.3.3 RAPD typizace: primer CC1, rod *Staphylococcus*

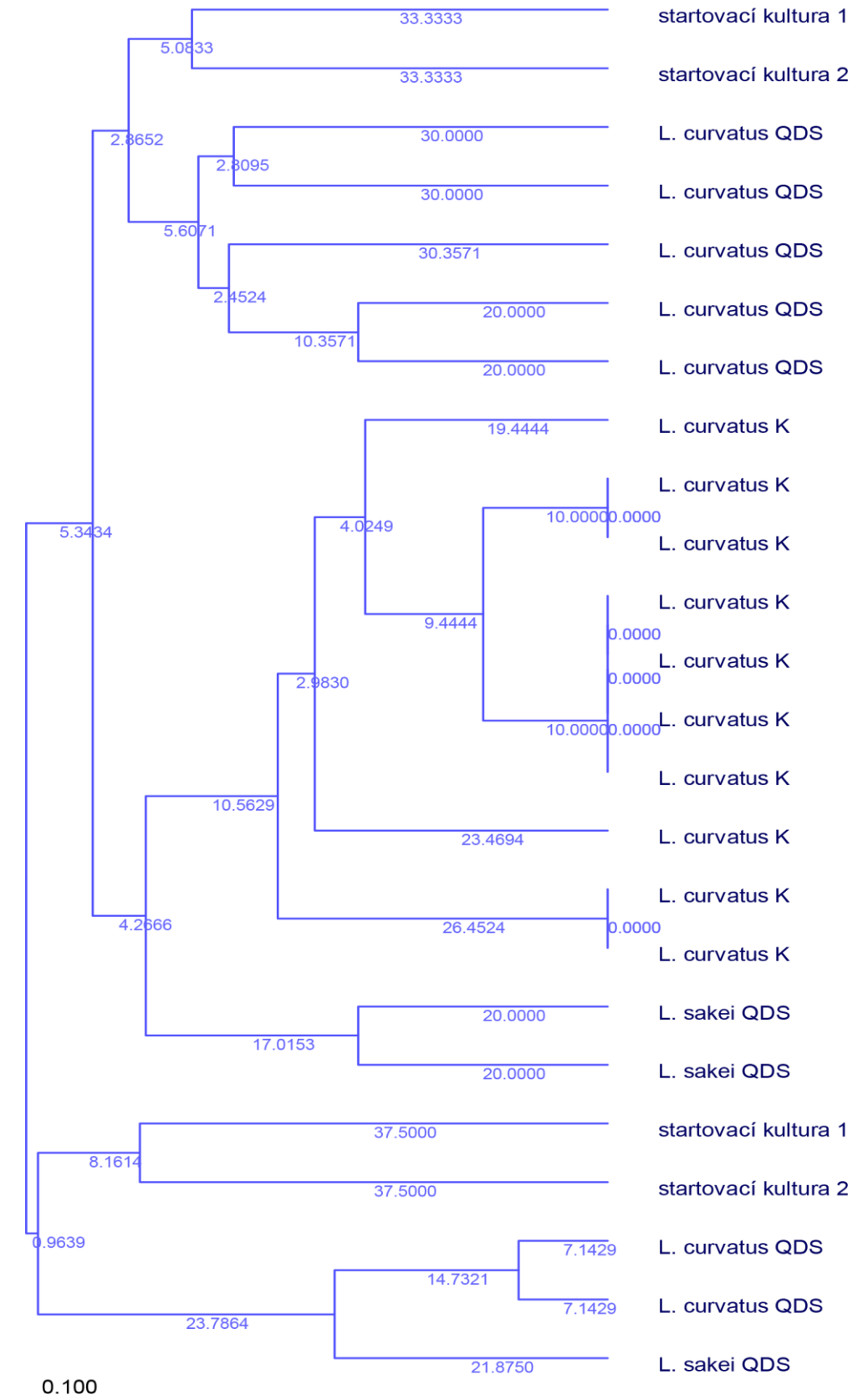
Počet viditelných amplifikovaných DNA fragmentů v RAPD profilu vzniklého amplifikací DNA kmenů *S. carnosus* izolovaných z produktů vyrobených klasickou i QDS technologií s primerem CC1 se pohybuje v rozmezí od jednoho do devíti. Velikost viditelných DNA fragmentů je mezi 57 bp a 656 bp. RAPD profil startovací kultury, jako referenčního kmeně, je tvořen třemi fragmenty v případě první izolace a čtyřmi fragmenty v případě druhé izolace. Velikost DNA amplikonů startovací kultury se pohybovala v rozmezí 130 – 336 bp. Všechny velikosti fragmentů DNA kmenů *S. carnosus* s primerem CC1 jsou uvedeny v tabulce číslo 17.

S použitím RAPD profilů všech analyzovaných kmenů byl vytvořen dendrogram (obrázek 9), ve kterém se testované kmeny *S. carnosus* rozdělily do tří skupin. První z nich je nejobsáhlejší a nejrozvětvenější. Dělí se na jednu dále větvenou, tu tvoří bakterie vyizolované z lyofilizátu startovací kultury, dále kmeny pocházející z výrobků vyrobených klasickou metodou (celkem 7 izolátů) a jeden zástupce vyizolovaný ze salámů vyrobených za pomoci technologie QDS. Druhou větev první skupiny tvoří dvě shodně posouzené bakterie pocházející z výrobků vyrobených klasickou metodou. Druhá skupina je tvořena zástupci bakterií startovací kultury (2 kmeny) i bakterií izolovaných z Paprikáše vyrobeného QDS technologií (2 kmeny). Samostatnou skupinu v tomto dendrogramu tvoří pět bakterií izolovaných z produktů technologie klasické. Jak je patrné z dendrogramu, tak těchto pět kmenů stafylokoků vykazovalo za použití primeru CC1 totožný RAPD profil.

8.3.4 RAPD typizace: primer R5, rod *Lactobacillus*

Počet viditelných amplifikovaných DNA fragmentů v RAPD profilu vzniklého amplifikací DNA kmenů *Lactobacillus* izolovaných ze salámů vyrobených klasickou i QDS technologií s primerem R5 se pohybuje v rozmezí od jednoho do sedmi. Velikost viditelných DNA fragmentů je mezi 42 bp a 470 bp (tabulka č. 17). RAPD profil startovací kultury, jako referenčního kmene, je tvořen dvěma fragmenty v případě první izolace a jedním fragmentem v případě druhé izolace. Velikost fragmentů startovací kultury se pohybovala v rozmezí 241 – 340 bp. Všechny velikosti DNA ampliconů kmenů *Lactobacillus* s primerem CC1 jsou uvedeny v tabulce číslo 18.

S použitím RAPD profilů všech analyzovaných kmenů byl vytvořen dendrogram (obrázek 10). V tomto dendrogramu jsou bakterie rozděleny do dvou početných skupin. První skupina je dále větvena na dvě větší podskupiny. První podskupina je tvořena zástupci startovací kultury (2 kmeny) a zástupci *L. curvatus* (celkem 5 kmenů) pocházejících ze salámů vyrobených metodou QDS. Druhý celek je tvořen 10 kmeny *L. curvatus* vyizolovanými z Paprikáše vyrobeného klasickou metodou a dvěma kmeny *L. sakei* pocházejícími z výrobků vyrobených metodou QDS. Z dendrogramu je rovněž patrné, že ve třech podskupinách RAPD amplicony kmenů *L. curvatus* vykazovaly shodný profil (0% rozdíl). Druhá skupina je poněkud menší a je tvořena větví složenou z izolátů pocházejících ze startovací kultury a větví tvořenou izoláty bakterií *L. curvatus* (2 kmeny) a *L. sakei* (1 kmeny) pocházejících z výrobků vyrobených technologií QDS.



Obrázek 10: Dendrogram vytvořený z RAPD profilu kmenů *Lactobacillus* izolovaných ze salámů vyrobených klasickou i QDS technologií za použití primeru R5

8.3.5 RAPD typizace: primer M13R2, rod *Lactobacillus*

Počet viditelných amplifikovaných DNA fragmentů v RAPD profilu vzniklého amplifikací DNA kmenů *Lactobacillus* izolovaných z produktů vyrobených za pomoci klasické i QDS technologie s primerem M13R2 se pohybuje v rozmezí od jednoho do čtyř. Velikost viditelných DNA fragmentů je mezi 335 bp a 455 bp. RAPD profil startovací kultury, jako referenčního kmene, je tvořen jedním fragmentem. Velikost fragmentu startovací kultury je 395 bp. Všechny velikosti fragmentů kmenů *Lactobacillus* s primerem CC1 jsou uvedeny v tabulce číslo 19.

S použitím RAPD profilů všech analyzovaných kmenů byl vytvořen dendrogram (obrázek 11). V tomto dendrogramu jsou bakterie rozděleny do dvou početných skupin. První skupina je dále větvena na dva větší celky. První celek je tvořen zástupci startovací kultury (2 kmeny) a zástupci *L. curvatus* (5 kmenů) pocházejících ze salámů vyrobených metodou QDS. Druhý celek je tvořen shodně posouzenými kmeny *L. curvatus* (10) pocházející z klasické metody (10) a kmenem *L. sakei* (2), pocházejících z výrobků vyrobených metodou QDS. Druhá skupina je poněkud menší a je tvořena větví složenou z izolátů pocházejících ze startovací kultury a větví tvořenou z izolátů bakterií pocházejících z výrobků vyrobených technologií QDS *L. curvatus* (3).

Tabulka 19: Velikosti DNA produktů získaných metodou RAPD-PCR pomocí primeru M13R2 u izolátů rodu *Lactobacillus*

Velikost DNA fragmentů (bp)	<i>L. curvatus</i> K									<i>L. curvatus</i> QDS					
	I.	II.	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	IX.	I.	II.	III.	IV.	V.	
Startovací kultura 1											339.32	337.97	336.97	335.63	335.30
	349.60	351.41	350.71	351.41	350.71	350.00	350.00	345.61	344.01						
395.94								400.58			395.70				
	439.57	439.96	439.96		439.77	439.96		439.17	439.17	437.99	436.23			434.27	
			454.87		455.18	454.87		454.27	454.57						

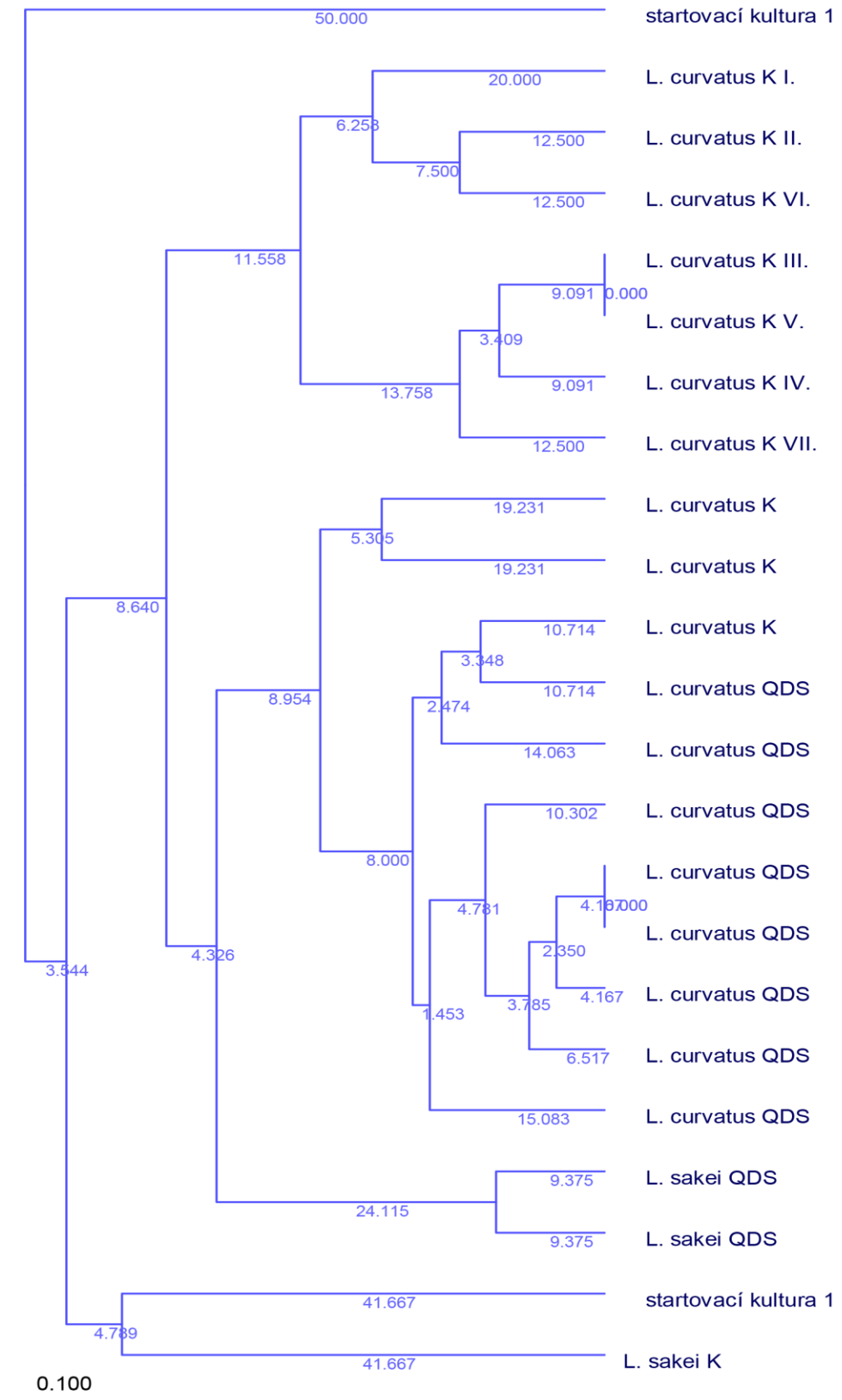


Obrázek 11: Dendrogram vytvořený z RAPD profilu kmenů *Lactobacillus* izolovaných ze salámů vyrobených klasickou i QDS technologií za použití primeru M13R2

8.3.6 RAPD typizace: primer GTG₅, rod *Lactobacillus*

Počet viditelných amplifikovaných DNA fragmentů v RAPD profilu vzniklého amplifikací DNA kmenů *Lactobacillus* izolovaných ze salámů Paprikáš vyrobených klasickou i QDS technologií s primerem GTG₅ se pohybuje v rozmezí od jednoho do dvanácti. Velikost viditelných DNA fragmentů je mezi 20 bp a 518 bp. RAPD profil startovací kultury, jako referenčního kmene, je tvořena pěti fragmenty. Velikost fragmentů startovací kultury se pohybuje v rozmezí 43-518 bp. Všechny velikosti DNA amplikonů kmenů *Lactobacillus* s primerem GTG₅ jsou uvedeny v tabulce číslo 20.

Dendrogram na obrázku č. 12 je rozdělen na dvě skupiny, první tvoří samostatně pouze izolát lyofilizované startovací kultury. Druhá skupina je větvena na jednu rozsáhlejší dále se dělící větev, která je tvořena 7 kmeny *L. curvatus* pocházejícími z výrobků vyrobených klasickou technologií a na větev tvořenou *L. curvatus* (3 kmeny) vyizolovanými ze salámů vyrobených klasickou technologií a 8 kmeny *L. curvatus* pocházejícími z produktů vyrobených technologií QDS. Další malou podskupinu tvoří druhy *L. sakei* původem z výrobků vyrobených QDS technologií. Samostatnou skupinu tvoří izolát ze startovací kultury společně s kmenem *L. sakei*, pocházejícím z výrobků vyrobených technologií QDS.



Obrázek 12: Dendrogram vytvořený z RAPD profilu kmenů *Lactobacillus* izolovaných ze salámů vyrobených klasickou i QDS technologií za použití primeru GTG₅

8.3.7 RAPD typizace: primer CC1, rod *Lactobacillus*

Počet viditelných amplifikovaných DNA fragmentů v RAPD profilu vzniklého amplifikací DNA kmenů *Lactobacillus* izolovaných z fermentovaných masných výrobků vyrobených pomocí klasické i QDS technologie s primerem CC1 je pouze jeden. Velikost DNA fragmentů se pohybuje mezi 163 bp a 354 bp. Velikost fragmentů startovací kultury je 334 a 164 bp. Všechny velikosti fragmentů kmenů *Lactobacillus* s primerem CC1 jsou uvedeny v tabulce číslo 21. Vzhledem k tomu, že s použitím tohoto primeru došlo k nasyntetizování vždy pouze jednoho amplikonu, lze usuzovat na to, že tento primer byl zřejmě příliš specifický a nasedal na malý počet míst v DNA testovaných laktobacilů. Z tohoto důvodu se pravděpodobně nevytvořil dostatečný fingerprint, na základě kterého by mohl být zkonstruován vypovídající dendrogram.

Tabulka 21: Velikosti DNA produktů získaných metodou RAPD-PCR pomocí primeru CC1 u izolátů rodu *Lactobacillus*

Velikost DNA fragmentů (bp)	Startovací kultura 1	<i>L. curvatus</i> K					Startovací kultura 1	<i>L. curvatus</i> QDS
		I.	II.	III.	IV.	V.		
					304.61	304.35	163.56	164.16
334.66								
			354.70					

8.4 Diskuze

Praktická část diplomové práce byla zaměřena na analýzu druhového zastoupení mikroorganismů, které byly izolovány z fermentovaného salámu Paprikáš, který byl vyrobený klasickou technologií a technologií QDS. Následně proběhla typizace izolátů metodou RAPD-PCR. Výstupem je porovnání výsledků vzhledem k typu výroby (klasická vs. QDS).

Bakterie mléčného kvašení spojené s fermentovanými potravinami jsou obvykle zástupci rodů *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* a *Weissella* (Logan a Katzman, 2005). Charakteristické aroma fermentovaných salámů je přiřazováno biochemické aktivitě a produkci senzoryicky aktivních látek bakteriemi mléčného kvašení a grampozitivními, kataláza pozitivními koky (Demeye et al., 1974). U salámů Paprikáš vyrobených pomocí klasické metody byly zastoupeny bakterie rodů *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Pediococcus*, *Acinetobacter* a *Bacillus*. U produktů vyrobených QDS technologií byla zjištěna menší mikrobiální diverzita, protože byly izolovány pouze grampozitivní bakterie rodů *Lactobacillus* a *Staphylococcus*, tedy rody, které byly obsaženy i ve startovací kultuře. Ve studii Comaposada et al. (2009) byla sledována mikrobiální kvalita fermentovaných salámů vyrobených metodou QDS i klasickou metodou, kdy byla sledována přítomnost *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* a *Escherichia coli*. V případě našich vzorků nebyla metodou MALDI-TOF prokázána přítomnost těchto patogenních nebo potenciálně patogenních mikroorganismů. Druhová diverzita byla však v případě klasické technologie rozmanitější. Byla prokázána přítomnost *Bacillus subtilis* a *Staphylococcus hominis*. Mnoho dalších druhů koaguláza negativních stafylokoků se nachází ve fermentovaných masných výrobcích, kromě *S. carnosus* a *S. xylosus* to mohou být také *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. cohnii* a *S. capitis* (Samelis et al., 1998). Ve výrobku produkovaném pomocí klasické technologie byla metodou MALDI-TOF zaznamenána přítomnost *S. carnosus*, který je součástí přidané startovací kultury, dále pak *S. xylosus*, *S. warneri*, *S. hominis* a *S. epidermidis*. Tyto mikroorganismy jsou pravděpodobně přítomny v prostředí výrobního závodu a mohou se tedy snadno dostat do vyráběného díla. Ve vzorcích vyizolovaných z výrobků připravených QDS technologií je druhová rozmanitost nižší, mimo bakterie startovací kultury se zde nacházel pouze *S. epidermidis*. Tato bakterie se vyskytuje na kůži lidí, zřejmě je tak větší riziko kontaminace při užití klasické technologie výroby (Votava, 2003).

Molekulární typizace izolátů na úrovni kmenů je užitečná při identifikaci DNA řetězců, které jsou si příbuzné. Některé fingerprintingové metody, jako například RAPD-PCR, jsou pro tyto druhy typizací vhodné (Rebecchi et al., 1998). Nízká kvalita templátové DNA může ovlivnit data získaná RAPD typizací díky vzniku nereprodukovatelných DNA profilů. To může být způsobeno degradací izolované DNA nebo přítomností endogenních či exogenních inhibitorů templátové DNA (Saunders a Hopkins, 1999). Z celkového počtu 45 vzorků DNA rodu *Staphylococcus* a 13 DNA vzorků rodu *Lactobacillus* se nepovedlo amplifikovat všechny. To je přisuzováno a následně potvrzeno zpětnou kontrolou koncentrace DNA spektrofotometricky. Na klastrovou analýzu byly tedy použity pouze vzorky DNA, které se amplifikovaly úspěšně a na gelech byly zjevné fragmenty.

Primer R5 má u rodu *Lactobacillus* vyšší rozlišovací schopnost než primer M13R2. Tento primer má naopak vyšší rozlišovací kapacitu u grampozitivních koků nenáležících do skupiny mléčných koků. Ideální je tedy použití kombinace obou primerů (Eymerich a Martín, 2005). Oba primery byly tedy použity RAPD metodou pro fingerprintové rozlišení izolátů rodu *Staphylococcus* i *Lactobacillus*. V případě primeru R5 a rodu *Staphylococcus* byly seřazeny kmeny podle příbuznosti, což téměř vždy korelovalo s typem použité technologie. V případě izolátů ze salámů vyrobených klasickou technologií bylo dosaženo v rámci dvou skupin 100% shody. Z dendrogramu (Obr. 7) lze usuzovat, že vzorky DNA z bakterií pocházejících z klasické technologie jsou více příbuzné startovací kultuře. V případě primeru R5 a rodu *Lactobacillus* došlo k jasnému dělení DNA vzorků dle použitých technologií. Skupiny jsou složeny ze zástupců bakterií izolovaných pouze ze salámů vyrobených jednou technologií. V tomto případě lze usuzovat na to, že DNA řetězce bakterií izolovaných z produktů vyrobených v rámci jedné technologie jsou si příbuzné. Pokud byl použit primer M13R2 u DNA získané z bakterií rodu *Staphylococcus*, bylo dosaženo nižšího počtu amplifikovaných DNA fragmentů. Z dendrogramu (Obr. 8) je ale také možné usuzovat, že bakterie pocházející z fermentovaných masných výrobků vyrobených klasickou technologií jsou více příbuzné bakteriím startovací kultury a v příbuznosti se liší od bakterií pocházejících z Paprikáše vyrobeného QDS technologií. Zástupci rodu *Lactobacillus* byli rozdělení pomocí PCR amplifikace s tímto primerem do několika skupin, v každé se shlukují zástupci izolátů ze salámů vyrobených stejnou technologií.

Primer CC1 byl použit autory Cocconcelli et al. (1995) k typizaci bakterií mléčného kvašení včetně enterokoků. V našem případě jsme tento primer použili i k typizaci bakterií rodu *Staphylococcus* izolovaných z fermentovaného masného výrobku. Při jeho použití na

amplifikaci chromozomální DNA izolované ze stafylokoků došlo k rozdělení do skupin, kde se opět do jedné skupiny shlukovali zástupci těchto koků izolovaní z výrobků produkováných klasickou technologií. Na stejné úrovni příbuznosti s nimi byla v téže skupině i startovací kultura. Z toho lze usuzovat na to, že se jednalo o DNA izolovanou z bakterií startovací kultury, které se během výroby a fermentace těchto výrobků pomnožily.

Gerves et al. (2001) testovali opakovatelnost RAPD primeru GTG₅ na DNA izolovanou z různých kmenů rodu *Lactobacillus*. Zjistili, že jsou vykazovány kvalitativní rozdíly ve fragmentech pocházejících z různých kmenů rodu *Lactobacillus*. Švec et al. (2005) popsali, že primer GTG₅ je spolehlivý a vhodný nástroj pro identifikaci enterokoků i laktobacilů. Tímto primerem byla zjišťována příbuznost izolátů rodu *Lactobacillus*. Na výsledném dendrogramu (Obr. 12) byla samostatně oddělena startovací kultura. Důvodem mohla být drobná změna v sekvenci analyzované DNA, která mohla zapříčinit nasednutí uvedeného primeru na jiná místa templátové DNA, což se projevilo odlišným fingerprintem a při zpracování výsledků samostatným klastrem v dendrogramu. Samostatnou skupinu tvořily *L. curvatus* izolované ze salámů vyrobených klasickou technologií, druhá skupina byla složena ze tří zástupců kmenů, které byly izolovány z produktů vyrobených klasickou a osmi zástupců ze salámů vyrobených technologií QDS. Tento jev jednak potvrzuje, že složení startovací kultury bylo stejné pro výrobky produkované klasickou i QDS technologií (v dendrogramu v jedné skupině izoláty bakterií z obou technologií), a také na to, že během výroby, fermentace a skladování výrobků došlo k pomnožení bakterií startovací kultury. Z poslední popsané skupiny se vyčlenily fingerprinty *L. sakei*, které pocházely ze salámů vyrobených technologií QDS. Vyčlenění bakterií odlišného druhu do samostatného klastru ukazuje na to, že tento primer je vhodný k typizaci bakterií mléčného kvašení a dokáže spolehlivě odlišit i příbuzné bakteriální druhy.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo charakterizovat vybrané grampozitivní bakterie izolované z fermentovaného masného výrobku Paprikáš. Do této studie byly zařazeny fermentované masné výrobky vyrobené dvěma odlišnými technologiemi za použití stejné startovací kultury.

- Metodou MALDI-TOF byly identifikovány kmeny bakterií, které byly vyizolovány ze salámu Paprikáš a dále byla porovnána druhová diverzita bakterií pocházejících ze salámů vyrobených klasickou technologií a technologií QDS.
- Identifikovány byly druhy (*Staphylococcus carnosus*, *S. xylosum*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. epidermidis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lb. sakei*, *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis* a *Pediococcus pentosaceus*).
- U vybraných druhů grampozitivních bakterií (*Staphylococcus carnosus*, *Lactobacillus curvatus*, *Lb. sakei*) byly metodou RAPD-PCR získány fingerprintingové profily a porovnány. Na jejich základě byly vytvořeny dendrogramy, ze kterých bylo možno určit, zda jsou vyizolované DNA kmenů pocházejících z jednotlivých technologií (klasická, vs. QDS) příbuzné. V některých případech byly fingerprintingové otisky rodu *Staphylococcus* shodné se startovací kulturou a jindy došlo k posunu. Bakterie startovací kultury byly ve většině případů více příbuzné s bakteriemi pocházejících z klasické technologie.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Alberts, B., et al. *Základy buněčné biologie*, Vyd.2., Espero Publishing, Ústí nad Labem 1998, ISBN 80-90-2906-2-0
- Arif I., Bakir M., Khan H., Al Farhan A., Al Homaidan A., Bahkali A., Sadoon M., Shobrak M., A brief review of molecular techniques to assess plant diversity, *Int J Mol Sci*, 11(5), 2079-2096. 2010
- Arnau, J. Serra, X., Comaposada, J., Gou, P., Carriga, M., Technologies to shorten the drying period of dry-cured met products. *Meat Science* 77,1, 81-89. 2007
- Bamforth, C.W., Ward, R.F. *The Oxford Handbook of Food Fermentations*. Oxford University press, 2014 ISBN: 9780199742707
- Bethier, F., and Ehlich, S.D., Genetics diverzity within *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* and design of PCR primers for its detection using randomly amplified polymorphic DNA. *International Journal of systematic Bacteriology* 49, 997-1007, 1999
- Bořilová, G., *Technologie a hygiena masa a masných výrobků*, Vyd. 1., Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-719-0
- Cocconcelli, P., Porro, D., Galandini, S., Senini, L. Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria end enterococci. *Letters in Applied Microbiology* 21, 376-379, 1995
- Cocolin, L., Dolci, P., Rantsiou, K. Biodiversit and dynamics of meat fermentations: The contribution o molecular methods for a better comprehension of a komplex ecosystem. *Meat Science*, 89, 2296-302. 2011
- Comaposada, J., Arnau, J., Carriga, M., Ferrini, G., Xargayó, M., Bernardo, J., Corominas, J., Gou, P., Freixanet, L., Lagares, J., Monfort, J., Fast drying of dry-cured meat products: Quick-dry-slice (QDS) proces technology. *Technologija mesa* 50, 54-59. 2009
- Doan, N. T. L., Van Hoorde, K., Cnockaert, M., De Brandt, E., Aerts M., Le Thanh, B., Vandamme, P., Validation of MATDI-TOF MS for rapid classification oänd identification of lactic acid bacteria, with a focus on isolates from traditional fermented foods in Northern Vietnam. *Letters in Applied Microbiology* 55, 265-273. 2012

- Eymerich, T., Martín, B., Garriga, M., Vidal-Carou, M. C., Bover-Cid, S., Hugas, M., Safety properties and molecular strain typik of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology* 100, 40-49. 2005
- Feiner G., *Meat products handbook Practical science and technology*, Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, USA 2008 ISBN-13: 978-1-84569-172-1 (e-book)
- Gerves, D., Huys, G., Swings, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *Federation of European Microbiological Societies Microbiological Letters* 205, 31-36. 2001
- Gorner, F., Valík, L., *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*, Bratislava: Malé centrum, 2004. 528 s. první vydání, ISBN 80-967064-9-7
- Havliš, Jan., *Hmotnostní spektrometrie MALDI TOF*, *Vesmír* 78. 1999
- Honikel, K.O., *Vom Fleisch zum Produkt; Reifen-Erhitzen-Zerkleinern-Salzen*, *Fleischwirtschaft*, 84; č. 5; s. 228-234. 2004
- Huong T., H., Komínková M., Guráň R., Ruttkay-Nedecký B., Kopel P., Trnková L., Zítka O., Adam V., Kozek R. Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI TOF-MS. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* 1, 64-66. 2014
- Ingr, I., *Produkce a zpracování masa*, Vyd.1. Mendlova zemědělská a lesnická univerzita Brně, Brno. 2003
- Ingr, I., *Technologie masa*, Brno: Mendlova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 1996. ISBN 80-7157-193-8.
- Kameník, J., *Hygiena a technologie masa Trvanlivé masné výrobky*, Vyd.1. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Brno 2012 ISBN 978-80-7305-608-7
- Katina, J., *Označování masných výrobků*, Vyd.1. Sdružení českých spotřebitelů, o.s., Praha 2010. ISBN 978-80-904633-0-1
- Katla, T., Moretro, T., Sveen, I.; Aasen, I. M., Axelsson, L., Rorvik, L. M., Naterstad, K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in chicken cold cuts by addition of sakacin P and sakacin P-producing *Lactobacillus sakei*". *Journal of Applied Microbiology* 93 (2): 191–196. 2002
- Kročko, M., Čaniganová, M., Vančíková, E., Flimelová, E., Bobková, A., Vplyv štartovacej kultury na mikrobiologickú kvalitu trvanlivého tepelne neopracovaného mäsového výrobku. *Potravinárstvo*, 7, Special Issue: 91-96. 2013

- Leroy, F. et al. Meat fermentation at the crossroads of innovation and tradition: A historical outlook. *Trends in Food Science and Technology*, 31, 130-137. 2013
- Logan, A. C., Katzman M., Major depressive disorder: probiotics may be an adjuvant therapy. *Medical Hypotheses*, 64, 533-538. 2005
- Papaganianni, M., Anastasiadou, S. Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications, *Microb Cell Fact* 8.3. 2009, dostupné z <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-8-3>
- Rantsiou, K., Cocolin, L. New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 255-267. 2006
- Rossetti, L., Giraffa G. Rapid identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprint databases. *Journal of Microbiological Methods*, 63, 135-144. 2005
- Samelis, J., Metaxopoulos, J., Vlassi, M., Pappa, A., Stability and safety of traditional Greek fermented salami: a microbiological ecology study. *International Journal of Food Microbiology*, 75, 99-109. 1998
- Saunders, G., S. and Hopkins, D., Random amplified polymorphic DNA (RAPD) Analysis *In*: Analytical Molecular Biology Quality and Validation. ED: Saunders, G., P. H. Morse, Laboratory of the Government Chemist by The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. 1999
- Sedláček, I. Taxonomie prokaryot. Masarykova univerzita Brno, 2007. ISBN 80-210-4207-9.
- Sedláček, I. Remedia – Taxonomie stafylokoků, *Remedia Klinická mikrobiologie* 3, 43-46. 1999
- Steinhauser, L., *Hygiena a technologie masa*, LAST 1995, Brno ISBN 80-900260-4-4
- Steinhauser, L. *Maso stře(d)tem zájmu*, Vydavatelství potravinářské literatury Brno a Středoevropské vydavatelství a nakladatelství, Brno. 2006

Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J., Metody molekulární biologie. 1. vydání Brno: Masarykova univerzita, 2005 ISBN 80-210-3841-1

Švec P., Vancanneyt M., Seman M., Snauweart S., Lefebvre K., Sedláek I., Swings J., Evaluation of (GTG)₅-PCR for identification of Enterococcus spp. FEMS Microbiology Letters 274,59-63, 2005

Votava, M., *Lékařská mikrobiologie speciální*, Neptun 2003, ISBN 80-902896-6-5

Vyhláška ministerstva zemědělství 326/2001 Sb. Ve znění pozdějších předpisů

Vyhláška ministerstva zemědělství 4/2008 Sb. Ve znění pozdějších předpisů

Whitman, W., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse H, Trujillo, M., Ludwig, W., Suzukib, K. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Springer Science & Business Media ISBN 0387-6823-33, 2012

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

TFS	Trvanlivé fermentované salámy
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RAPD-PCR	Náhodná amplifikace polymorfni DNA-Polymerázová řetězová reakce
MALDI-TOF	Laserová desorpce ionizace za přítomnosti matrice s detektorem doby
Bp	Párů bází
QDS	Rychle sušené plátky
PCR	Polymerázová řetězová reakce

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schématické znázornění RAPD – PCR.....	26
Obrázek 2: Schéma výroby TFS klasickou technologií.....	30
Obrázek 3: Schéma výroby TFS QDS technologií.....	31
Obrázek 4: Velikost a rozložení jednotlivých DNA fragmentů u použitého 100 bp standardu	36
Obrázek 5: RAPD profil vybraných kmenů stafylokoků získaný pomocí primeru Detekce <i>Staphylococcus</i> s využitím primerů R5.....	41
Obrázek 6: RAPD profil vybraných kmenů laktobacilů získaný pomocí primeru R5	42
Obrázek 7: Dendrogram vytvořený z RAPD profilu kmenů <i>S. carnosus</i> izolovaných ze salámů vyrobených klasickou i QDS technologií za použití primeru R5.....	45
Obrázek 8: Dendrogram vytvořený z RAPD profilu kmenů <i>S. carnosus</i> izolovaných ze salámů vyrobených klasickou i QDS technologií za použití primeru M13R2	48
Obrázek 9: Dendrogram vytvořený z RAPD profilu kmenů <i>S. carnosus</i> izolovaných ze salámů vyrobených klasickou i QDS technologií za použití primeru CC1	51
Obrázek 10: Dendrogram vytvořený z RAPD profilu kmenů <i>Lactobacillus</i> izolovaných ze salámů vyrobených klasickou i QDS technologií za použití primeru R5.....	54
Obrázek 11: Dendrogram vytvořený z RAPD profilu kmenů <i>Lactobacillus</i> izolovaných ze salámů vyrobených klasickou i QDS technologií za použití primeru M13R2.....	57
Obrázek 12: Dendrogram vytvořený z RAPD profilu kmenů <i>Lactobacillus</i> izolovaných ze salámů vyrobených klasickou i QDS technologií za použití primeru GTG ₅	60

SEZNAM TABULEK

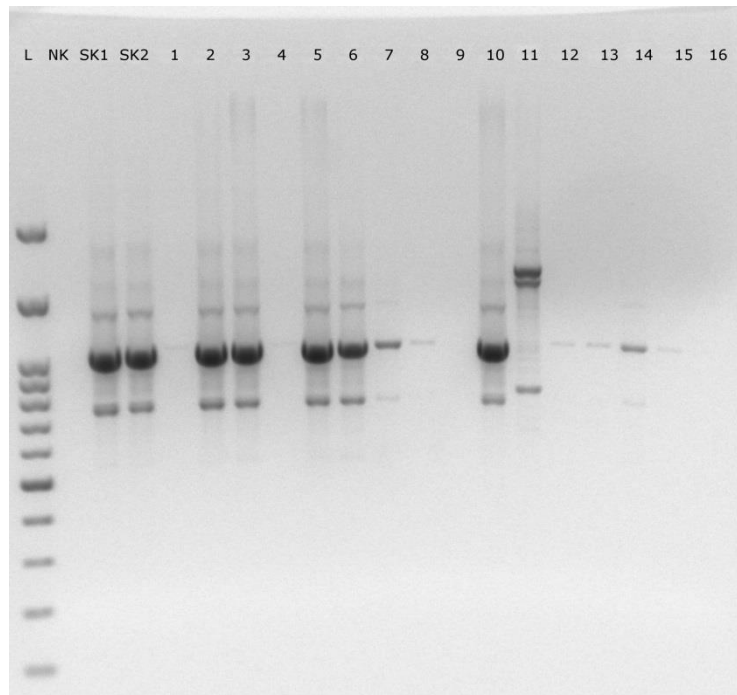
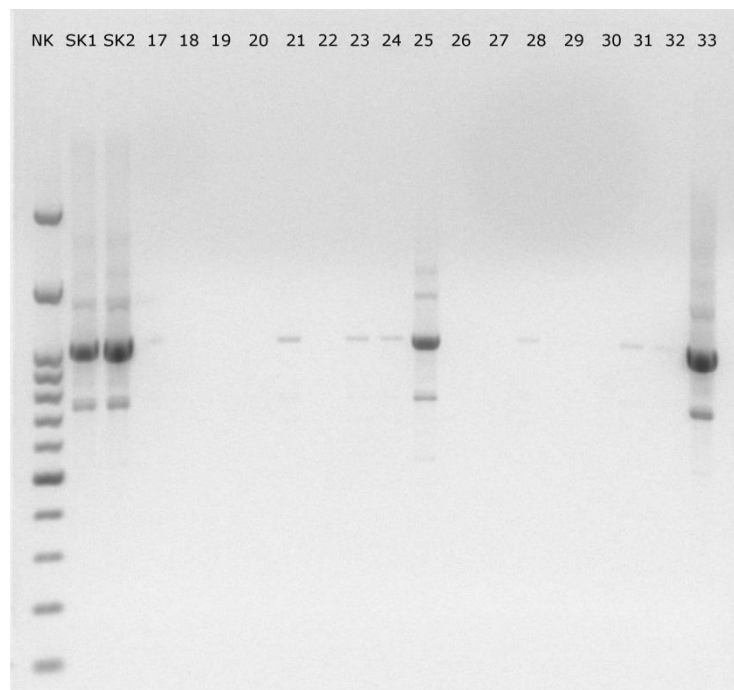
Tabulka 1: Kategorie výrobního masa používaného pro TFS	14
Tabulka 2: Přehled koření do tradičních českých TFS.	16
Tabulka 3: Časový harmonogram odběru vzorků salámů	31
Tabulka 4: Kultivační stanovení testovaných mikroorganismů	32
Tabulka 5: Charakteristika použitých RAPD primerů.....	34
Tabulka 6: Složení reakčních směsí s jednotlivými primery	34
Tabulka 7: Termální profil PCR s použitím primeru R5	35
Tabulka 8: Termální profil PCR s použitím primeru M13R2	35
Tabulka 9: Termální profil PCR s použitím primeru GTG ₅	35
Tabulka 10: Termální profil PCR s použitím primeru CC1	35
Tabulka 11: Identifikace vybraných bakterií izolovaných z výrobků připravených klasickou technologií.....	38
Tabulka 12: Identifikace vybraných bakterií izolovaných z výrobků připravených technologií QDS	39
Tabulka 13: Zastoupení identifikovaných bakterií izolovaných ze salámů vyrobených klasickou technologií.....	40
Tabulka 14: Zastoupení identifikovaných bakterií izolovaných ze salámů vyrobených QDS technologií	40
Tabulka 15: Velikosti DNA produktů získaných metodou RAPD-PCR pomocí primeru R5 u izolátů rodu <i>Staphylococcus</i>	44
Tabulka 16: Velikosti DNA produktů získaných metodou RAPD-PCR pomocí primeru M13R2 u izolátů rodu <i>Staphylococcus</i>	47
Tabulka 17: Velikosti DNA produktů získaných metodou RAPD-PCR pomocí primeru CC1 u izolátů rodu <i>Staphylococcus</i>	50
Tabulka 18: Velikosti DNA produktů získaných metodou RAPD-PCR pomocí primeru R5 u izolátů rodu <i>Lactobacillus</i>	53
Tabulka 19: Velikosti DNA produktů získaných metodou RAPD-PCR pomocí primeru M13R2 u izolátů rodu <i>Lactobacillus</i>	56
Tabulka 20: Velikosti DNA produktů získaných metodou RAPD-PCR pomocí primeru GTG ₅ u izolátů rodu <i>Lactobacillus</i>	59
Tabulka 21: Velikosti DNA produktů získaných metodou RAPD-PCR pomocí primeru CC1 u izolátů rodu <i>Lactobacillus</i>	61

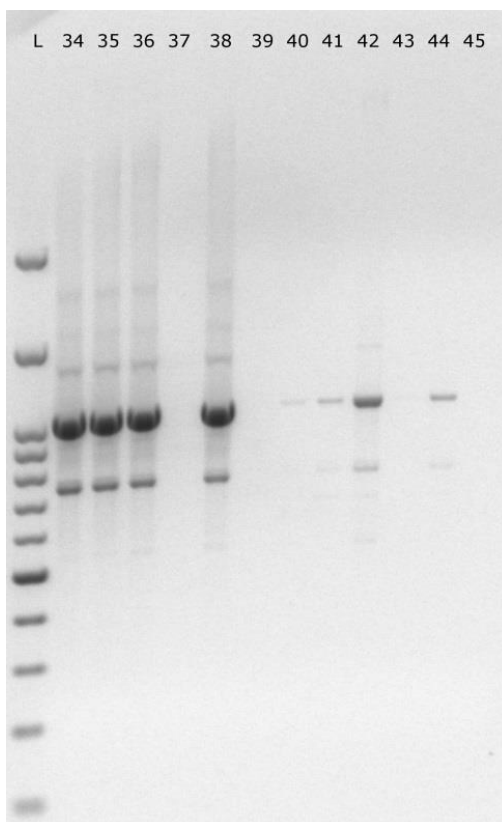
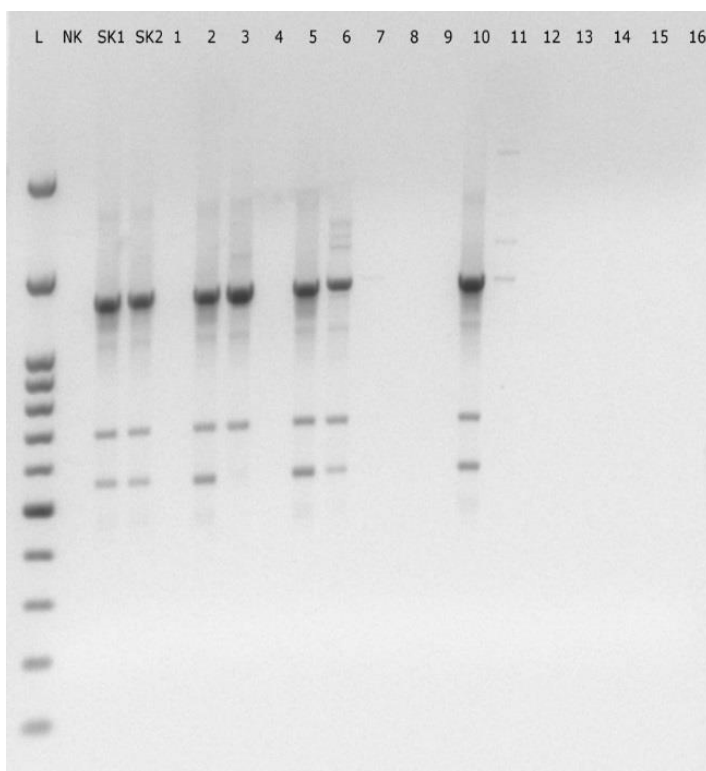
SEZNAM PŘÍLOH

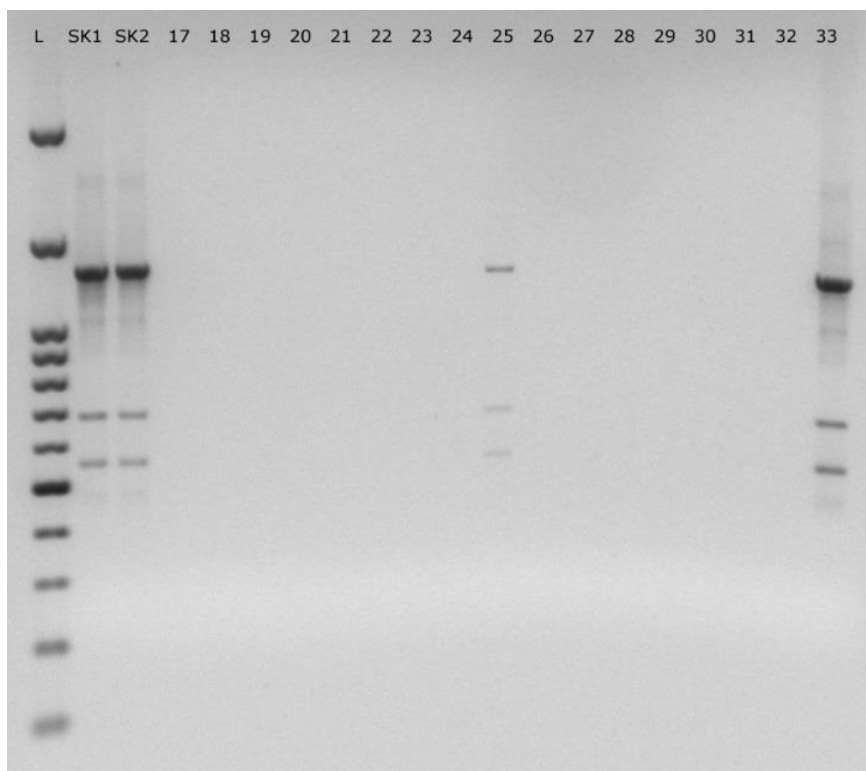
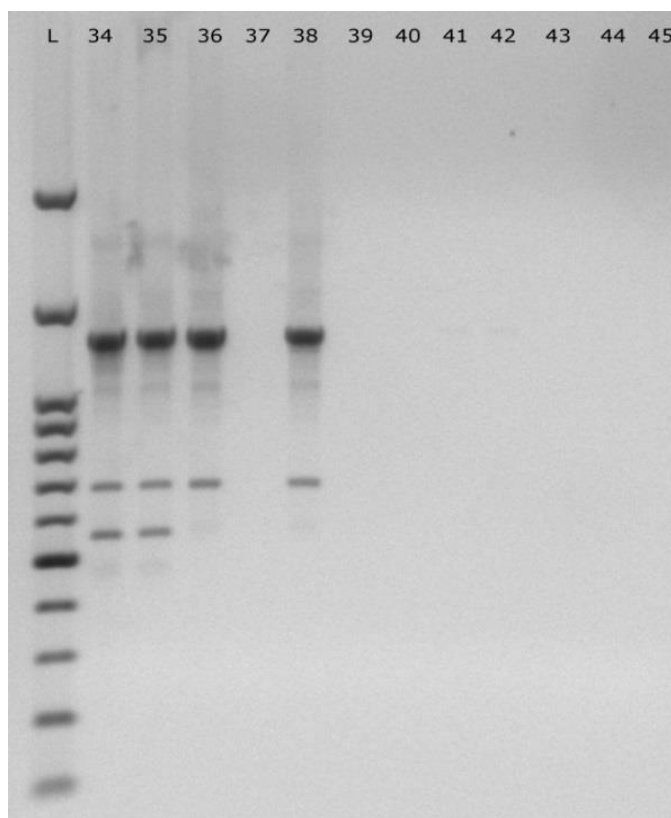
PŘÍLOHA PI: Přiřazení mikroorganismů ke vzorkům naneseným na gel.....	74
PŘÍLOHA P II: Detekce <i>Staphylococcus</i> s využitím primerů R5 (vz. 1 – 16).....	75
PŘÍLOHA P III: Detekce <i>Staphylococcus</i> s využitím primerů R5 (vz. 17 – 33)	75
PŘÍLOHA P IV: Detekce <i>Staphylococcus</i> s využitím primerů R5 (vz. 34 – 45).....	76
PŘÍLOHA P V: Detekce <i>Staphylococcus</i> s využitím primerů M13R2 (vz. 1 – 16).....	76
PŘÍLOHA P VI: Detekce <i>Staphylococcus</i> s využitím primerů M13R2 (vz. 17 – 33)	77
PŘÍLOHA P VII: Detekce <i>Staphylococcus</i> s využitím primerů M13R2 (vz. 34 – 45)	77
PŘÍLOHA P VIII: Detekce <i>Staphylococcus</i> s využitím primerů CC1 (vz. 1 – 16).....	78
PŘÍLOHA P IX: Detekce <i>Staphylococcus</i> s využitím primerů CC1 (vz. 17 – 33)	78
PŘÍLOHA P X: Detekce <i>Staphylococcus</i> s využitím primerů CC1(vz. 34 – 45).....	79
PŘÍLOHA P XI: Přiřazení mikroorganismů ke vzorkům naneseným na gel.....	80
PŘÍLOHA P XII: Detekce <i>Lactobacillus</i> s využitím primerů R5 (vz. 1 – 16).....	81
PŘÍLOHA P XIII: Detekce <i>Lactobacillus</i> s využitím primerů R5 (vz. 17 – 23)	81
PŘÍLOHA P XIV: Detekce <i>Lactobacillus</i> s využitím primerů M13R2 (vz 1 – 16).....	82
PŘÍLOHA P XV: Detekce <i>Lactobacillus</i> s využitím primerů M13R2 (vz 17 – 23)	82
PŘÍLOHA P XVI: Detekce <i>Lactobacillus</i> s využitím primerů GTG ₅ (vz. 1 – 8).....	83
PŘÍLOHA P XVII: Detekce <i>Lactobacillus</i> s využitím primerů GTG ₅ (vz. 9 – 23)	83
PŘÍLOHA P XVIII: Detekce <i>Lactobacillus</i> s využitím primerů CC1 (vz. 1 – 16).....	84
PŘÍLOHA P XIX: Detekce <i>Lactobacillus</i> s využitím primerů CC1 (vz. 17 – 23).....	84

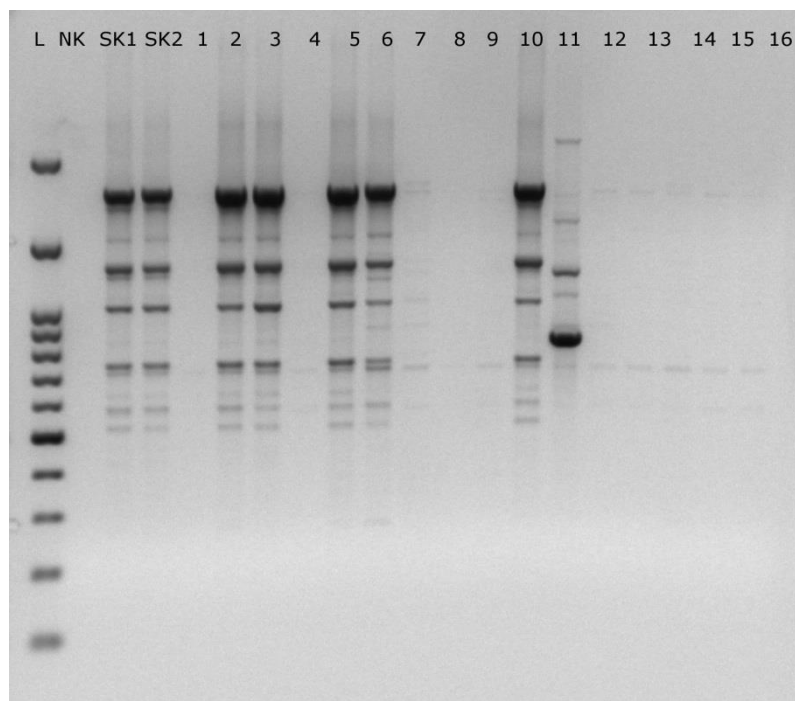
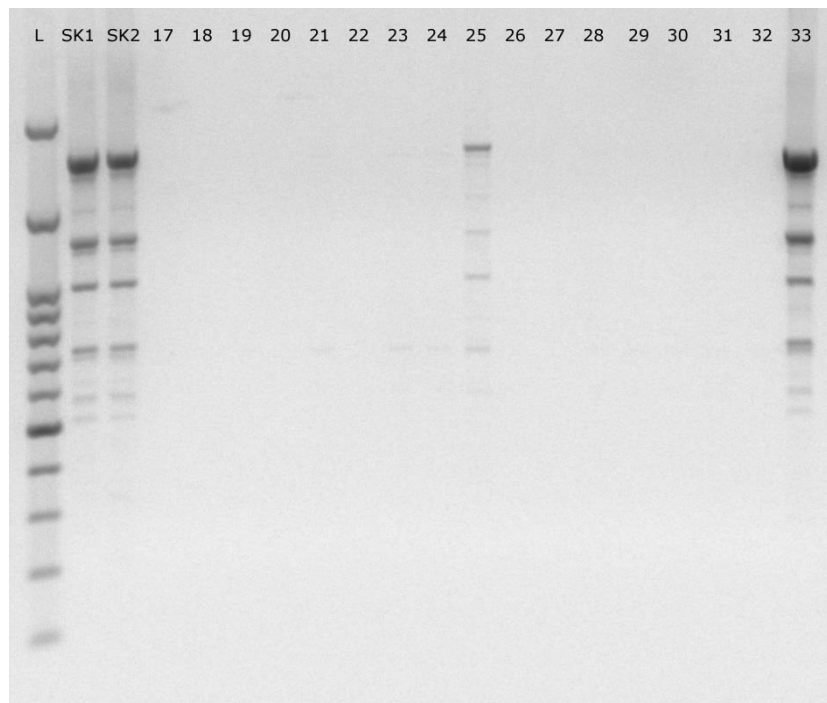
PŘÍLOHA PI: Přiřazení mikroorganismů ke vzorkům naneseným na gel

Označení vzorku	Číslo vzorku	Název mikroorganismů	Technologie
1	205.4	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
2	282.5	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
3	19.8	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
4	170.7	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
5	19.7	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
6	135.2	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
7	1.9	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
8	205.1	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
9	250.1	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
10	18.6	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
11	206.6	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
12	171.4	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
13	171.8	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
14	10.4	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
15	134.6	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
16	205.3	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
17	147.7	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
18	1.1	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
19	135.1	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
20	134.2	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
21	169.8	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
22	17.1	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
23	281.7	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
24	1.8	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
25	134.5	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
26	18.8	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
27	17.2	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
28	17.1	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
29	206.7	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
30	280.1	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
31	281.7	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
32	291.3	<i>Staphylococcus carnosus</i>	klasická
33	259.7	<i>Staphylococcus carnosus</i>	QDS
34	44.4	<i>Staphylococcus carnosus</i>	QDS
35	45.5	<i>Staphylococcus carnosus</i>	QDS
36	45.4	<i>Staphylococcus carnosus</i>	QDS
37	259.5	<i>Staphylococcus carnosus</i>	QDS
38	44.3	<i>Staphylococcus carnosus</i>	QDS
39	223.2	<i>Staphylococcus carnosus</i>	QDS
40	46.1	<i>Staphylococcus carnosus</i>	QDS
41	115.7	<i>Staphylococcus carnosus</i>	QDS
42	44.1	<i>Staphylococcus carnosus</i>	QDS
43	46.5	<i>Staphylococcus carnosus</i>	QDS
44	46.6	<i>Staphylococcus carnosus</i>	QDS
45	46.3	<i>Staphylococcus carnosus</i>	QDS

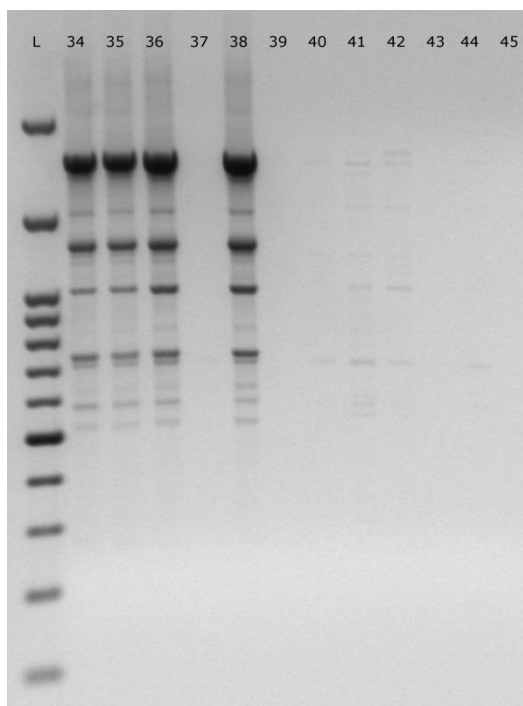
PŘÍLOHA P II: Detekce *Staphylococcus* s využitím primerů R5 (vz. 1 – 16)PŘÍLOHA P III: Detekce *Staphylococcus* s využitím primerů R5 (vz. 17 – 33)

PŘÍLOHA P IV: Detekce *Staphylococcus* s využitím primerů R5 (vz. 34 – 45)PŘÍLOHA P V: Detekce *Staphylococcus* s využitím primerů M13R2 (vz. 1 – 16)

PŘÍLOHA P VI: Detekce *Staphylococcus* s využitím primerů M13R2 (vz. 17 – 33)PŘÍLOHA P VII: Detekce *Staphylococcus* s využitím primerů M13R2 (vz. 34 – 45)

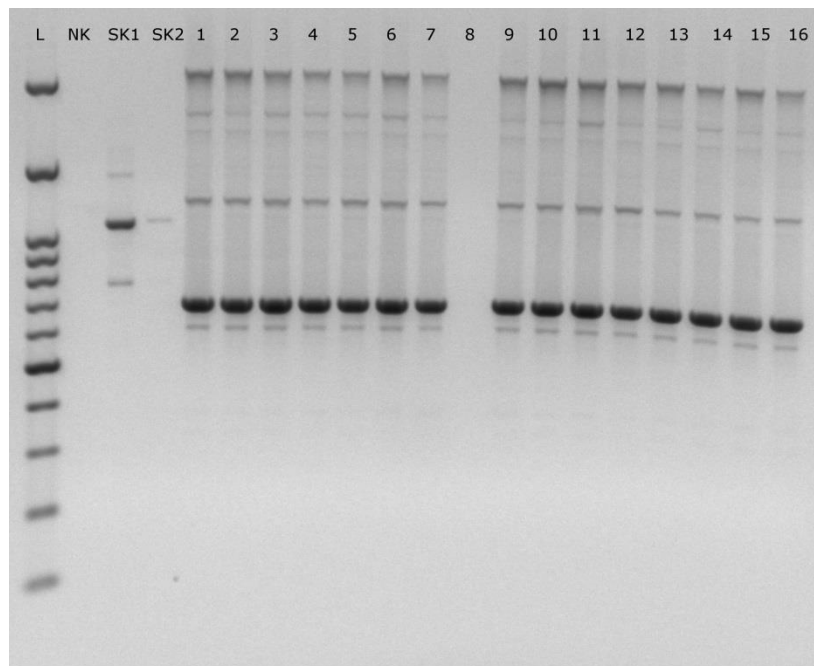
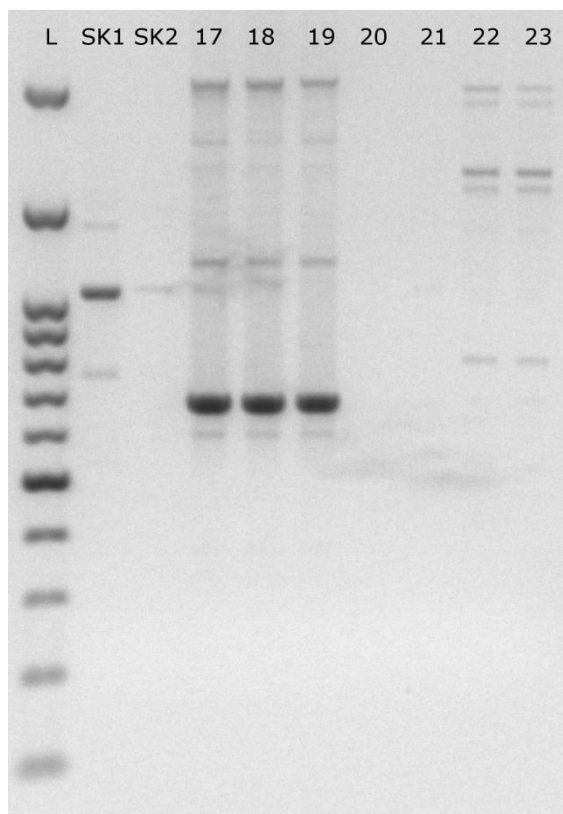
PŘÍLOHA P VIII: Detekce *Staphylococcus* s využitím primerů CC1 (vz. 1 – 16)PŘÍLOHA P IX: Detekce *Staphylococcus* s využitím primerů CC1 (vz. 17 – 33)

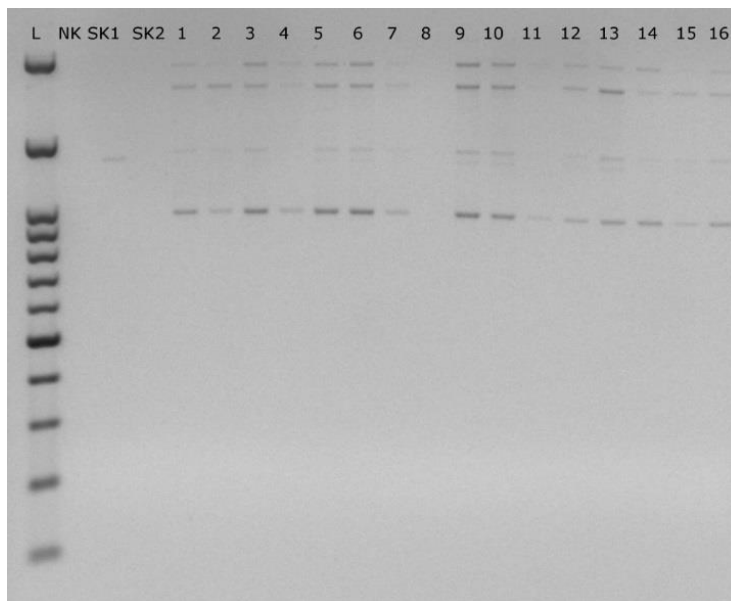
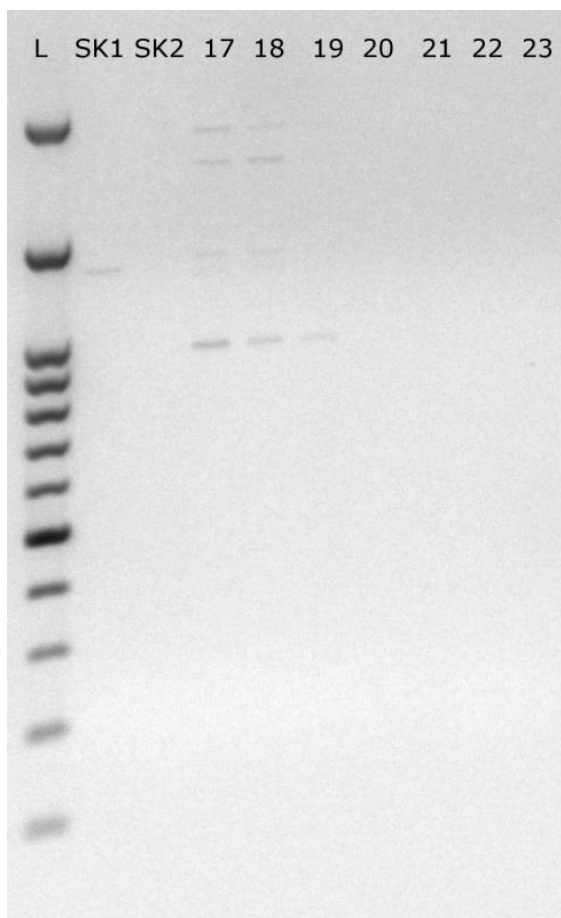
PŘÍLOHA P X: Detekce *Staphylococcus* s využitím primerů CC1(vz. 34 – 45)

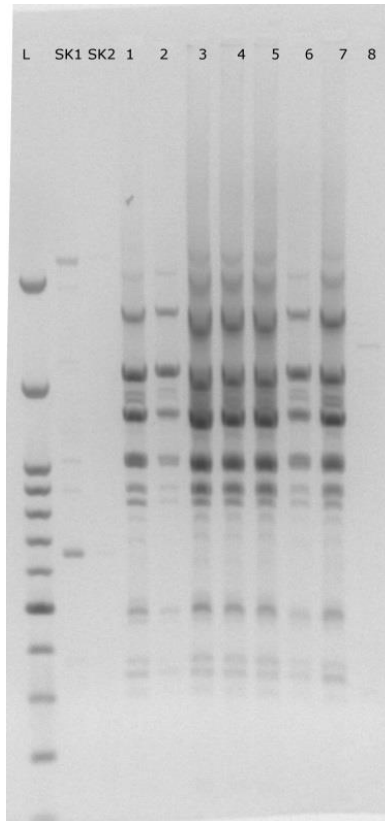
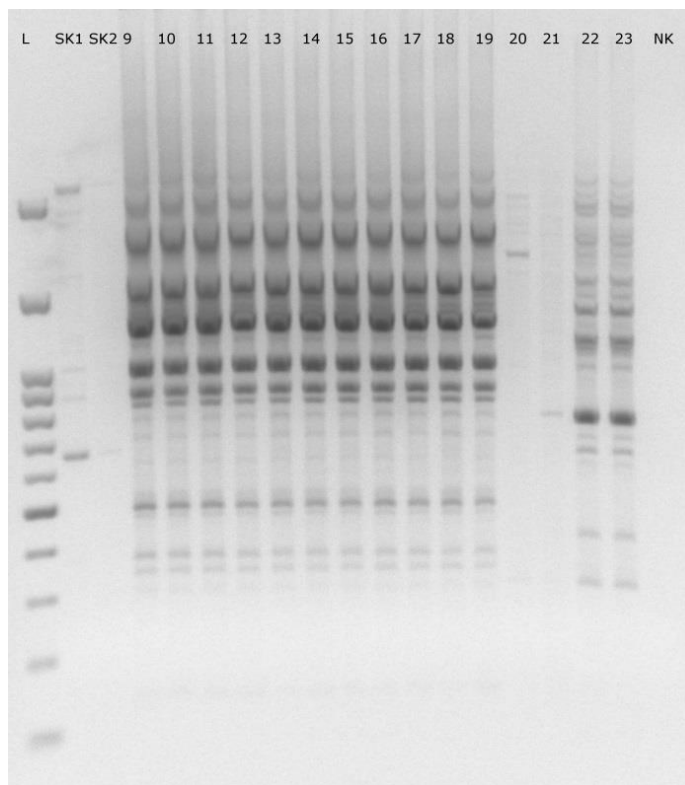


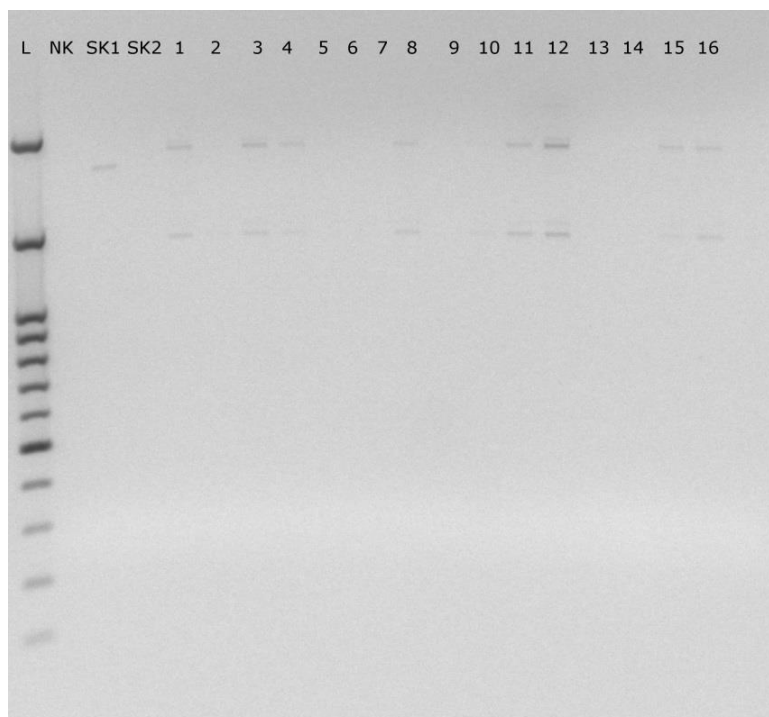
PŘÍLOHA P XI: Přiřazení mikroorganismů ke vzorkům naneseným na gel

Označení vzorku	Číslo vzorku	Název mikroorganismů	Technologie
1	19.10	<i>Lactobacillus curvatus</i>	klasická
2	19.12	<i>Lactobacillus curvatus</i>	klasická
3	171.5	<i>Lactobacillus curvatus</i>	klasická
4	169.2	<i>Lactobacillus curvatus</i>	klasická
5	134.1	<i>Lactobacillus curvatus</i>	klasická
6	205.8	<i>Lactobacillus curvatus</i>	klasická
7	19.11	<i>Lactobacillus curvatus</i>	klasická
8	135.6	<i>Lactobacillus sakei</i>	klasická
9	210.11	<i>Lactobacillus curvatus</i>	klasická
10	19.3	<i>Lactobacillus curvatus</i>	klasická
11	17.4	<i>Lactobacillus curvatus</i>	klasická
12	77.15	<i>Lactobacillus curvatus</i>	QDS
13	46.14	<i>Lactobacillus curvatus</i>	QDS
14	223.8	<i>Lactobacillus curvatus</i>	QDS
15	79.14	<i>Lactobacillus curvatus</i>	QDS
16	46.13	<i>Lactobacillus curvatus</i>	QDS
17	79.13	<i>Lactobacillus curvatus</i>	QDS
18	44.9	<i>Lactobacillus curvatus</i>	QDS
19	44.22	<i>Lactobacillus curvatus</i>	QDS
20	147.6	<i>Lactobacillus sakei</i>	klasická
21	207.13	<i>Lactobacillus sakei</i>	klasická
22	259.14	<i>Lactobacillus sakei</i>	QDS
23	251.9	<i>Lactobacillus sakei</i>	QDS

PŘÍLOHA P XII: Detekce *Lactobacillus* s využitím primerů R5 (vz. 1 – 16)PŘÍLOHA P XIII: Detekce *Lactobacillus* s využitím primerů R5 (vz. 17 – 23)

PŘÍLOHA P XIV: Detekce *Lactobacillus* s využitím primerů M13R2 (vz 1 – 16)PŘÍLOHA P XV: Detekce *Lactobacillus* s využitím primerů M13R2 (vz 17 – 23)

PŘÍLOHA P XVI: Detekce *Lactobacillus* s využitím primerů GTG₅ (vz. 1 – 8)PŘÍLOHA P XVII: Detekce *Lactobacillus* s využitím primerů GTG₅ (vz. 9 – 23)

PŘÍLOHA P XVIII: Detekce *Lactobacillus* s využitím primerů CC1 (vz. 1 – 16)PŘÍLOHA P XIX: Detekce *Lactobacillus* s využitím primerů CC1 (vz. 17 – 23)