

Optimalizace metody izolace DNA z fermentovaných masných výrobků

Lukáš Bednář

Bakalářská práce
2017



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin
akademický rok: 2016/2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Lukáš Bednář
Osobní číslo: T130086
Studijní program: B2901 Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Chemie a technologie potravin
Forma studia: prezenční

Téma práce: Optimalizace metody pro izolaci DNA z fermentovaných masných výrobků

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakterizace fermentovaných masných výrobků.
2. Technologie fermentovaných masných výrobků.
3. Mikrobiální diverzita fermentovaných masných výrobků.
4. Stanovení mikrobiální diverzity non-kultivačními metodami.

II. Praktická část

1. Vývoj a optimalizace metody pro izolaci nukleových kyselin z fermentovaných masných výrobků
2. Ověření čistoty a kvality izolované DNA.
3. Formulace závěrů na základě získaných výsledků.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 188 s. ISBN 80-210-3841-1.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

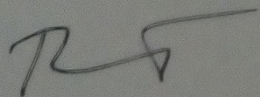
Datum zadání bakalářské práce:

3. února 2017

Termín odevzdání bakalářské práce:

5. května 2017

Ve Zlíně dne 3. února 2017



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



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: LUCIA BEDNÁŘ

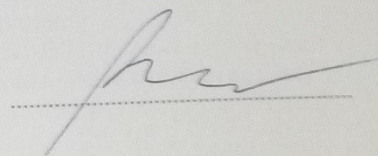
Obor: CIPT

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 2.5.2014



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na izolaci mikrobiální DNA z fermentovaných masných výrobků. Teoretická část se zabývá charakteristikou fermentovaných masných výrobků, technologií výroby, mikrobiální diverzitou a non-kultivačními metodami.

V praktické části této práce byla největší pozornost věnována optimalizaci izolace mikrobiální DNA za použití 3 metod modifikace – bez aplikace látek usnadňujících izolaci DNA, s přídavkem chloroformu, s přídavkem SDS. Dále byla provedena amplifikace izolované DNA pomocí metody PCR a následná kontrola pomocí elektroforetické soustavy. Pro stanovení mikrobiální diverzity bylo využito metody DGGE s použitím dvou gradientů denaturačních činidel (40/60 % a 30/70 %). Pozitivních výsledků bylo dosaženo při použití gradientu denaturačních činidel 30/70 %, pomocí kterého bylo stanovena větší diverzita mikroorganismů vyskytujících se ve fermentovaném masném výrobku Paprikáš.

Klíčová slova: fermentované masné výrobky, izolace DNA, PCR, DGGE

ABSTRACT

This bachelor thesis is focused on isolation of the microbial DNA from sausages. The theoretical part deals with the characteristic of sausages, manufacturing technology, microbial diversity and molecular biology methods.

The biggest part of the practical part of this thesis has been paid to the optimisation of DNA isolation. For this purpose three modification methods were developed – without addition of compounds facilitating DNA isolation, with addition of chloroform, with addition of SDS. Next step was amplification of isolated DNA by PCR and examination of PCR products by gel electrophoresis. DGGE method was used for the purpose of determination microbial diversity. Gradients of denaturants used in this work were 40/60% and 30/70%. Positive results were achieved by use 30/70 % gradient of denaturants.

Keywords: sausages, DNA isolation, PCR, DGGE

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucí mé bakalářské práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení, rady, připomínky a velkou trpělivost. A dále bych chtěl poděkovat Bc. Veronice Kučabové za pomoc při praktické části bakalářské práce.

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

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| ÚVOD | 9 |
| I TEORETICKÁ ČÁST | 10 |
| 1 CHARAKTERIZACE FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ | 11 |
| 1.1 ROZDĚLENÍ FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ | 11 |
| 1.1.1 Fermentované masné výrobky s vysokou konečnou hodnotou pH..... | 11 |
| 1.1.2 Fermentované masné výrobky s nízkou konečnou hodnotou pH | 12 |
| 1.1.3 Syrové salámy | 12 |
| 1.1.4 Roztíratelné fermentované masné výrobky..... | 12 |
| 2 TECHNOLOGIE FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ | 14 |
| 2.1 MĚLNĚNÍ A MÍCHÁNÍ | 14 |
| 2.1.1 Mělnění | 14 |
| 2.1.2 Míchání | 14 |
| 2.2 NARÁŽENÍ A TVAROVÁNÍ | 15 |
| 2.3 UZENÍ..... | 16 |
| 2.4 SUŠENÍ | 16 |
| 2.5 FERMENTACE A ZRÁNÍ..... | 17 |
| 3 MIKROBIÁLNÍ DIVERZITA FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ | 19 |
| 3.1 STARTOVACÍ KULTURY | 19 |
| 3.1.1 Bakterie mléčného kvašení | 19 |
| 3.1.2 Kataláza pozitivní koky..... | 20 |
| 3.1.3 Kvasinky a plísně | 21 |
| 3.2 VZTAH MEZI MIKROORGANISMY A MASNÝMI VÝROBKY | 21 |
| 4 STANOVENÍ MIKROBIÁLNÍ DIVERZITY NON-KULTIVAČNÍMI METODAMI | 22 |
| 4.1 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE | 22 |
| 4.1.1 Reakční směs..... | 23 |
| 4.1.1.1 Templátová DNA..... | 23 |
| 4.1.1.2 Primery..... | 23 |
| 4.1.1.3 DNA-polymeráza..... | 24 |
| 4.1.1.4 Základní reakční roztok | 24 |
| 4.2 GELOVÁ ELEKTROFORÉZA..... | 24 |
| 4.3 DGGE..... | 25 |
| II PRAKTICKÁ ČÁST | 26 |
| 5 CÍL PRÁCE | 27 |
| 6 MATERIÁL A METODIKA | 28 |
| 6.1 POUŽITÉ PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A CHEMIKÁLIE | 28 |
| 6.1.1 Příprava roztoků | 30 |
| 6.2 CHARAKTERISTIKA VZORKŮ..... | 30 |
| 6.3 STANOVENÍ MIKROBIÁLNÍ DIVERZITY NON-KULTIVAČNÍMI METODAMI..... | 31 |
| 6.3.1 Optimalizace přípravy vzorků pro izolaci DNA | 31 |
| 6.3.2 Izolace DNA..... | 31 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 6.3.3 | Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA | 33 |
| 6.3.4 | Polymerázová řetězová reakce (PCR)..... | 33 |
| 6.3.4.1 | Pracovní postup přípravy reakční směsi: | 34 |
| 6.3.4.2 | 1. stupeň amplifikace: | 34 |
| 6.3.4.3 | 2. stupeň amplifikace: | 36 |
| 6.3.5 | Gelová elektroforéza | 38 |
| 6.3.6 | DGGE..... | 39 |
| 7 | VÝSLEDKY A DISKUZE | 44 |
| 7.1 | OPTIMALIZACE METODY IZOLACE DNA..... | 44 |
| 7.2 | PCR | 46 |
| 7.3 | DGGE..... | 48 |
| | ZÁVĚR | 53 |
| | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 54 |
| | SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK..... | 58 |
| | SEZNAM OBRÁZKŮ | 59 |
| | SEZNAM TABULEK..... | 60 |

ÚVOD

Fermentované masné výrobky představují velmi oblíbenou položku masné výroby a to jak ve světě, tak i v České republice. Během technologického procesu výroby nedochází k tepelnému ošetření, čímž jsou zajištěny specifické a unikátní organoleptické vlastnosti oproti ostatním masným výrobkům. Ovšem absence tepelného ošetření představuje určité riziko mikrobiální kontaminace, a tím i zvýšené požadavky na dodržování hygienických opatření během technologického procesu výroby.

Jelikož fermentované masné výrobky představují komplexní matici, proto izolace DNA z nich představuje obtížný úkol. Za účelem získání dostatečného množství izolované DNA o dostatečné čistotě byly v rámci praktické části vyvinuty 3 typy modifikací. Jednotlivé modifikace přinesly odlišné výsledky. Pro jednotlivé metody modifikace byla provedena amplifikace pomocí metody PCR a následná kontrola elektroforetickou soustavou na agarózovém gelu. Pro stanovení mikrobiální diverzity fermentovaného masného výrobku Paprikáš byla použita metoda DGGE, kde hlavním úkolem bylo nalezení vhodného gradientu denaturačních činidel pro stanovení mikrobiální diverzity.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERIZACE FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ

Fermentované masné výrobky (FMV) lze zařadit mezi skupinu nejkvalitnějších a technologicky nejnáročnějších masných výrobků. Podle české legislativy je FMV výrobek tepelně neopracovaný určený k přímé spotřebě, u kterého během technologického procesu (zrání, sušení, fermentace a popřípadě uzení) za definovaných podmínek došlo ke snížení hodnoty vodní aktivity $a_{w(\max)} = 0,93$, s minimální dobou trvanlivosti 21 dní při 20 °C. [1] [2]

FMV lze rozdělit do několika skupin, a to podle hodnoty pH výrobku, stupně mělnění masného díla, typu fermentace a povrchu výrobku. V současné době se FMV rozdělují do 4 hlavních skupin, fermentované salámy s vysokou konečnou hodnotou pH, fermentované salámy s nízkou konečnou hodnotou pH, syrové šunky a roztíratelné fermentované salámy. Mezi nejčastěji se vyskytující FMV se zařazují první dvě skupiny. [3] [4]

1.1 Rozdělení fermentovaných masných výrobků

1.1.1 Fermentované masné výrobky s vysokou konečnou hodnotou pH

FMV s vysokou konečnou hodnotou pH se vyznačují nízkou hodnotou vodní aktivity a dlouhou výrobní dobou. Obecně se uvádí pokles vodní aktivity na hodnoty 0,88 a nižší. Podle literatury je uváděn i širší rozsah 0,90-0,65. Doba výroby se různí dle technologického procesu jednotlivých výrobků. Minimální doba potřebná ke snížení vodní aktivity na požadovanou úroveň by měla být nejméně 3 týdny, ovšem zpravidla je mnohem delší. Například v Itálii tento proces trvá až 6 měsíců. Pro uherské salámy je typická doba výroby mezi 90-100 dny, kdy dochází k poklesu a_w na hodnotu pod 0,88. Z důvodu dlouhé doby výrobního procesu dochází u těchto výrobků k vyšším ztrátám vody, a to i více než 20 hmotnostních %. [3] [4] [5]

Z hygienického hlediska je u těchto masných výrobků snížena teplota během počátečních fází zrání, která se musí pohybovat mezi 10-12 °C. Nízké teploty jsou obecně zárukou inhibice růstu mikroorganismů. Takto nízké teploty se musí dodržovat do snížení a_w pod hranici alespoň 0,96. Dalším důležitým znakem je nepřidání sacharidů během technologického procesu výroby. Netvoří se tak dostatečné množství kyselin, které by inhibovaly případný rozvoj mikroorganismů, pH výrobku se pohybuje v rozmezí 5,8-6,2. Je tedy nutné dodržovat předepsané nízké teploty. [3] [4] [5]

Mezi FMV s vysokou konečnou hodnotou pH se řadí uherský salám nebo pro českého spotřebitele známý Poličan. [3] [4]

1.1.2 Fermentované masné výrobky s nízkou konečnou hodnotou pH

Pro tuto skupinu FMV je typický přídavek sacharidů do salámového díla (0,3-0,7 %) a také přídavek čistých mikrobiálních kultur (startovacích kultur). Hlavní úlohou startovacích kultur je zkvašování přítomných cukrů a jejich rozklad na kyselinu mléčnou a další produkt metabolismu. Obsahem kyseliny mléčné ve výrobku dochází ke snížení pH výrobků pod 5,0. Z důvodu přidání startovacích kultur je důležitá vyšší teplota při počáteční fázi výroby, aby došlo k jejich rozmnožení v salámovém díle. V Evropě by se teplota měla pohybovat mezi 22-25 °C, v USA jsou využívány teploty vyšší, a to až 37 °C a více. [3] [4] [5]

Odlišná je i doba zrání, která bývá obvykle kratší než 3 týdny. Z toho vyplývá, že takový výrobek má vyšší hodnotu aktivity vody, než je tomu u FMV s vysokou konečnou hodnotou pH, ovšem musí být splněny všechny podmínky pro FMV stanovené vyhláškou. [3] [4] [5]

Do této skupiny se řadí výrobky jako lovecký salám, Herkules, Permoník, gombasecká a dunajská klobása a maďarské klobásy Csabay a Gyulay. [3] [4] [5]

1.1.3 Syrové salámy

Syrové šunky zastupují jednu z technologicky nejnáročnějších skupin FMV a masných výrobků vůbec. Počáteční fáze výroby musí probíhat při nízkých teplotách. Doba fermentace a sušení se pohybuje v řádech měsíců až dvou let. Typickými producenty syrových šunek jsou jihoevropské státy (Itálie, Španělsko), ovšem s jejich výrobou se můžeme setkat i například v Německu nebo České republice. Jedná se o jedny z nekvalitnějších masných výrobků. Mezi typické zástupce patří parmská šunka, iberská šunka nebo pršut. [1] [3] [5]

1.1.4 Roztíratelné fermentované masné výrobky

Roztíratelné fermentované salámy představují poměrně specifickou skupinu masných výrobků. Mezi hlavní charakteristiky patří krátká doba zrání, zpravidla kratší než 14 dní. Během doby fermentace dojde k poklesu pH na 5,4-5,6. Dále je to jejich roztíratelnost, která je dána vysokým obsahem tuku. Během technologického procesu je zcela vynechán proces sušení a dochází pouze k zauzení studeným kouřem. Nejsou tedy tak mikrobiálně odolné

jako předešlé skupiny a pro spotřebitele představují potenciální riziko, zejména pokud nejsou dodrženy nízké teploty při jejich skladování. Při produkci roztíratelných fermentovaných salámů je výrobce povinen vyšetřit suroviny na přítomnost salmonel. Dalším aspektem je krátká doba použitelnosti výrobků, která je stanovena maximálně na 48 hodin od jejich expedice. Své oblíbenosti našly zejména v Německu. Do této skupiny se řadí výrobky známé jako čajovka a métský salám. [4] [5]

2 TECHNOLOGIE FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ

Technologie výroby fermentovaných masných výrobků se řadí mezi jednu z nejnáročnějších disciplín masné výroby vůbec. Technologický proces je složen z celkem 5 po sobě navazujících kroků – výběr a ošetření suroviny, mělnění a míchání, narážení do obalových střeš, zrání a sušení a balení. [6]

2.1 Mělnění a míchání

2.1.1 Mělnění

Mělnění představuje počáteční a pro výrobu masných výrobků mimořádně důležitou technologickou operaci. Obecně při mělnění dochází ke zmenšování kousků masa na různě velké částice. Hlavním požadavkem jsou hladké a ostré ořezy. Při mělnění masa dochází k přímému řezání, ale také k drčení, trhání, strouhání a hnětení. Tím dochází k destrukci buněčné membrány a uvolnění bílkovin, což pozitivně ovlivňuje vaznost masného díla. Vazností se označuje schopnost masa vázat vodu, která masnému výrobku zaručuje požadované smyslové vlastnosti, jako je křehkost a šťavnatost. [3] [7]

Mělnění masa lze rozdělit podle dvou parametrů. Dle požadovaného stupně rozmělnění a dle použitého zařízení. K mělnění masa se využívají buďto různě konstruované řezačky nebo zařízení pod názvem kutr. Jedná se o zařízení s otočnou mísou, v níž na hřídeli osciluje soustava několika nožů. Podle požadované velikosti zrna se upravuje stupeň rychlosti nožů spolu s dobou mělnění pro kutr. U řezaček se volí průměr otvorů na desce řezačky. [1] [3]

Při mělnění dochází k mechanickému namáhání masa a s tím spojeným zahříváním masného díla. Vzniká tak nebezpečí částečné denaturace bílkovin a s tím úzce spojeným snížením vaznosti díla. Aby se tomuto nebezpečí předešlo, je nutné masné dílo chladit. Nejčastější způsob chlazení je použití šupinkového ledu. Další možností, jak zabránit nežádoucímu zahřívání, je mělnění předem zmrazeného masa. [1] [7]

2.1.2 Míchání

Míchání masného díla, stejně jako je tomu u mělnění, představuje velmi závažnou technologickou operaci při výrobě masných výrobků, která ovlivňuje mnoho parametrů posuzovaných u výsledného výrobku. Souhrnně se tyto parametry označují jako vzhled výrobku na řezu. Ke vzhledu na řezu pak jednotlivě přispívají následující parametry: barva a její

stálost, jemnost spojky, stejná velikost, zrnění či ostrost zrnění vložky, zřetelnost struktury výrobku a další. [3] [7]

Míchání masného díla lze provádět buďto v různě konstruovaných míchačkách nebo k němu dochází přímo v kutru. Počáteční operací míchání je příprava spojky, smíchání jednotlivých druhů mas, a to předem rozmělněných při použití řezačky nebo ke smíchání dochází rovnou v kutru, s přídavkem dusitanové solící směsi, koření a šupinkového ledu. Dále se do masného díla mohou přidávat další přísady, bílkoviny nebo sacharidy dle dané receptury. [1] [7]

Po přípravě spojky následuje vmíchání vložky, která zvyšuje vaznost masného díla. Spojka je jemně mělněná součást masného díla, která se připravuje z vazného, nejčastěji hovězího, masa, do něhož se vmíchává podíl méně vazného masa (vepřového). Z fyzikálně-chemického hlediska se jedná o velmi složitou polydisperzní soustavu. Hlavním významem spojky je tvorba struktury a soudržnost masných výrobků. Naproti tomu vložka je tvořena různě velkými kousky masa, syrového sádla, zeleniny a jiných složek, které se vmíchávají do spojky. Vložka tvoří tzv. mozaiku salámu. [1] [7]

2.2 Narážení a tvarování

K získání požadovaného tvaru salámu je nutné v technologii výroby zahrnout i tzv. narážení, neboli plnění salámového díla do obalů. Dílo musí být do obalu naráženo při dostatečné rychlosti, aby nedošlo k poškození obalu. [1] [3]

K narážení dochází na strojích zvaných narážky nebo narážečky, které se dají rozdělit do dvou skupin, pístové a kontinuální. Pístové narážečky jsou starší typem, kdy prvním krokem je naplnění válce dílem, ze kterého je za pomoci tlaku vytlačováno narážecí trubicí do předem navlečeného střeva. Mezi hlavní výhody tohoto typu narážky je šetrné narážení díla do obalu, což se u výrobku projeví výraznější kresbou mozaiky. Tento typ narážení se využívá zejména u fermentovaných masných výrobků, jako je Poličan, Vysočina, Herkules a jiné. [1] [3]

Naproti tomu kontinuální narážky jsou mnohem výkonnější, než je tomu u předešlého typu. Bývají také vybaveny dávkovacím zařízením a u některých typů lze nastavit rychlost narážení a velikost použitého tlaku při narážení. [3]

Nedílnou součástí tohoto technologického procesu je výběr vhodného obalu přizpůsobeného pro daný výrobek. Pro FMV se nejčastěji využívají kličkovká střeva nebo přírodní obaly. [1] [3]

2.3 Uzení

Působení kouře na masný výrobek se v minulosti využívalo zejména z důvodu zvýšení údržnosti, z důvodu současného působení tepelného zákroku, konzervačních látek kouře (formaldehyd) a osušení povrchu výrobku. V současnosti je situace zcela jiná a uzení se využívá zejména k rozvoji žádoucích sensorických vlastností, jako je chuť a aroma, vytvoření hnědé barvy, typické zejména pro Lovecký salám a Poličan a také pro vytvoření pevné povrchové struktury, vznikem methylenových můstků reakcí formaldehydu s aminokyselinami. [1]

Uzení se provádí třemi způsoby, horkým kouřem, teplým kouřem a studeným kouřem. Pro FMV je typické uzení studeným kouřem, kdy se teplota kouře pohybuje v rozmezí 18-23 °C. Celý proces trvá několik dní. Probíhá pozvolna a přerušovaně během zráního procesu. Jedná se o jednu z podmínek uváděnou i v české legislativě, ve vyhlášce 326/2001 Sb., v novelizované podobě pod číslem 69/2016 Sb. Mimo již zmíněný Lovecký salám a Poličan se s uzením studeným kouřem setkáme také u výrobků pod názvem čajovka. [1] [3]

2.4 Sušení

Proces sušení následuje po zauzení masného výrobku. Hlavním účelem tohoto procesu je snížení vodní aktivity (a_w) a zvýšení požadované údržnosti výrobku definovaného vyhláškou 69/2016 Sb., kdy se snížení vodní aktivity zabrání růstu kontaminujících mikroorganismů. Jedná se tedy o konzervační metodu při výrobě trvanlivých salámů. Sušení má také pozitivní vliv na organoleptické vlastnosti výsledného výrobku, kde dochází k rozvoji chuti aroma. [1] [7]

Je nutné, aby sušení probíhalo za respektování rovnováhy mezi odparem vody z povrchu a migrací vody z vnitřních vrstev k povrchu výrobku. Technologický proces sušení lze rozdělit do dvou kroků, resp. období. V prvním období je povrch sušeného materiálu dostatečně vlhký a rychlost sušení je konstantní. Řídícím dějem je přestup vlhkosti z materiálu do sušícího média. V tomto období dochází k velmi rychlému sušení masného výrobku. [7]

Druhé období začíná v tzv. kritickém bodě sušení. Během této časové periody je povrch již z velké části zbaven vody. Rychlost sušení proto musí být přizpůsobena rychlosti vnitřní

difúze. Přičemž k sušení již nedochází tak rychle, jako je tomu u prvního období a rychlost sušení musí být menší nebo rovna rychlosti vnitřní difúze vody z vnitřních vrstev výrobku. [7]

Doba sušení se u FMV značně liší a je specifická pro daný druh výrobku. Pro porovnání tepelně neopracovaný fermentovaný Poličan se suší po dobu několika týdnů a oproti tomu, syrové šunky, kdy parmská šunka se v extrémních případech suší po dobu až 2 let. [1]

2.5 Fermentace a zrání

Fermentací je zajištěna údržnost u tepelně neopracovaných masných výrobků. K fermentaci dochází činností mikroorganismů, bakterií mléčného kvašení, kdy dochází ke zkvašování přítomných cukrů v mase na organické kyseliny a to zejména na kyselinu mléčnou. Snížení pH daného výrobku má mimo jiné inhibiční účinek pro nechtěné mikroorganismy. [1] [4]

Snížením pH dochází ke zpevnění struktury a stabilizaci barvy. Vzhledem k působení BMK dochází k rozvoji chuti a aroma výrobku, který si tak udržuje specifické organoleptické vlastnosti. [1] [4]

Proces fermentace zásadně probíhá v klimatických komorách a následuje hned po narážení do obalových střeň. Právě naražené salámy jsou zavěšeny na udírenské vozy a převezeny do klimatických komor. V tomto kroku technologického procesu dochází ke ztrátě vody a tím k poklesu vodní aktivity. [6] [8]

Proces fermentace a zrání je přímo ovlivněn podmínkami v klimatických komorách, jako je teplota proudícího vzduchu, jeho vlhkost a rychlost proudění. Důležitou podmínkou pro správný průběh je naplnění celé klimatické komory a po ukončení procesu její řádné vyčištění. [6] [8]

První fází celého procesu je tzv. vyrovnávací fáze. Hlavní podstatou této fáze procesu je odebrání kondenzované vody na povrchu salámů. Jelikož je v klimatických komorách značně vyšší teplota než při narážení masných výrobků, kdy se teplota pohybuje kolem 0 °C, teplota je v této fázi nastavena na 16-22 °C, relativní vlhkost vzduchu (RVV) se pohybuje mezi 60-70 % a rychlost proudění vzduchu kolem 0,8 m/s. Je nutné aby RVV nebyla příliš vysoká, aby se zabránilo nadměrné kondenzaci vody na povrchu masných výrobků. Doba vyrovnávací fáze se pohybuje od 1-6 hodin a závisí na naplnění komory a na průměru, tzv. kalibru, masných výrobků. Během této fáze nedochází k zasoušení masného výrob-

ku a nehrozí tedy vznik tzv. kroužku. Je nutné, aby vyrovnávací fáze probíhala po nezbytně dlouhou dobu, aby již nedocházelo ke tvorbě další zkondenzované vody na povrchu výrobku, ale nesmí trvat příliš dlouho, aby se tak zabránilo přesušení povrchu masného výrobku. [6] [9]

Po ukončení první fáze je jednak zvýšena teplota na 22-26 °C, tak i RVV v komoře, a to na 92-93 %. Rychlost proudění vzduchu během druhé fáze je doporučena v rozmezí 0,5-0,8 m/s. Zvýšení teploty zahájí rozvoj bakterií mléčného kvašení, které svým působením, tj. činností enzymů, zahájí proces fermentace. Nastavení teploty v klimatické komoře závisí na druhu výrobku, použité startovací kultuře a na požadovaném poklesu pH. Pro rychlý průběh fermentace se doporučují teploty od 25-26 °C, nikoliv však vyšší a to z důvodu možného rozvoje patogenních mikroorganismů. [6] [9]

V prvních dnech fermentace a zrání jsou masné výrobky umístěny v tzv. zakuřovacích komorách, ve kterých probíhá uzení. Technologický princip uzení je popsán v kapitole 2.3. Po uplynutí požadované doby na uzení masného výrobku (zpravidla 1 týden) jsou masné výrobky přemístěny do tzv. zraticích komor, ve kterých pokračuje proces zrání a dochází k dalšímu sušení masného výrobku až do dosažení hodnot stanovených vyhláškou 69/2016 Sb. Doba trvání tohoto období se pohybuje mezi 1-3 týdny. [6]

Doba fermentace u kvalitních výrobků je značně delší, oproti levným variantám. Během delší doby zrání se vytvoří větší množství sensoricky aktivních látek, které propůjčují výrobku typické aroma a chuť. Dlouhodobě zrající masné výrobky jsou pak značně vysušenější, což zvyšuje jejich údržnost. Naopak u levnějších variant, s krátkou dobou fermentace, není vysušení na takové úrovni a v případě nevhodného skladování, např. v místech s vyšší relativní vlhkostí, může dojít k porůstání povrchu výrobku plísněmi. Oproti déle zrajícím salámům mají méně výrazné aroma a chuť, která je v některých případech jednostranně kyselá. Tohoto jevu lze docílit například použitím chemických přípravků k okyselení, jako je glukon-delta lakton, známý také pod označením E 575. [1]

3 MIKROBIÁLNÍ DIVERZITA FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBKŮ

3.1 Startovací kultury

3.1.1 Bakterie mléčného kvašení

Bakterie mléčného kvašení (BMK) jsou jednou z nejdůležitějších skupin bakterií využívaných jako startovací kultury. Jedná se o skupinu gram-pozitivních tyčinek a koků, které sdílí společné charakteristické vlastnosti. Z obecného hlediska se jedná o skupinu kaláza negativních heterotrofních mezofilních mikroorganismů. [7] [10]

Jejich hlavní předností, které se široce využívá zejména v potravinářském průmyslu, je schopnost zkvašovat cukry. Setkáváme se jak s druhy s homofermentativním typem (zkvašují cukry na jeden produkt) nebo heterofermentativním typem metabolismu (zkvašují cukry na více produktů. Základním produktem metabolismu pro všechny druhy BMK je kyselina mléčná. U heterofermentativních to pak dále může být kyselina octová, ethanol, oxid uhličitý a další produkty. [10]

Produkovaná kyselina mléčná ovlivňuje organoleptické vlastnosti dané potraviny, její chuť a aroma, což je způsobeno aktivitou katepsinu D. Tohoto jevu je vyžadováno zejména při výrobě fermentovaných masných výrobků. Další výhodou produkce kyselin BMK je inhibice nežádoucí mikroflóry a vytvoření požadované pevné struktury masného výrobku. [1] [7]

Mezi zástupce BMK využívané ve startovacích kulturách při výrobě fermentovaných masných výrobků lze zařadit rody *Lactobacillus*, *Pediococcus*. Projevil se i zájem pro vytvoření startovacích kultur s přidavkem enterokoků, tento návrh ovšem Evropská Unie zamítla z obavy možného negativního působení enterokoků na lidské zdraví. Rody *Lactobacillus* a *Pediococcus* jsou z tohoto hlediska podstatně bezpečnější, ovšem i tak se v legislativě setkáváme s určitými omezeními. Jako startovací kultura se nemůže použít mikroorganismus s geny podporující rezistenci na antibiotika a produkci biogenních aminů. [7] [8] [11] [12]

Mezi zástupce rodu *Lactobacillus* běžně využívaných ve startovacích kulturách lze zařadit mikroorganismy *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. curvatus*, *L. rhamnosus* a *L. paracasei*. Mezi zástupce rodu *Pediococcus* se řadí *P. pentosacues* a *P. acidilactiti*. [7] [8] [10] [11] [12]

Důležitým kritériem použití vhodné mikroorganismu pro startovací kulturu je jejich schopnost růstu za určitých teplotních podmínek a rychlost produkce požadovaných kyselin ve výrobku. Pro teplotní rozmezí fermentace 20-25 °C je vhodné využít *L. plantarum*, *L. sakei*, *L. curvatus* a *P. pentosaceus*, přičemž první dva zástupci tvoří kyseliny značně rychleji. Při teplotách nad 25 °C pak nalezneme využití i druhý zástupce *P. acidilactiti*. [7] [8] [11] [12]

BMK mají tedy velký vliv na ovlivnění kyselosti výsledného masného výrobku. Pro získání jemné chuti je vhodné využít homofermentativní nebo heterofermentativní produkující pouze malé množství vedlejších produktů. Při použití laktobacilů jako startovací kultury je větší pravděpodobnost vzniku trpčí chuti masného výrobků. [7]

3.1.2 Kataláza pozitivní koky

Kataláza pozitivní koky (CPK) se podílí zejména na vývoji a stabilizaci žádaných senzoryckých vlastností, jako je vývoj a stabilizace barvy výrobků v důsledku redukce nitrátů, ochrana masného výrobku před oxidativními pochody za přítomnosti kyslíku, jeho spotřebou a katalázovou aktivitou a změna aminokyselin a lipidů a jejich degradativních produktů. [7] [8]

CPK nejlépe rostou v pomalu fermentujících neuzených výrobcích. Ovšem můžeme se s nimi setkat i v uzených rychle fermentujících masných výrobcích. Podmínkou je však přidání velkého množství vybraného mikroorganismu jako startovací kultury, literatura uvádí 10^6 - 10^7 /g. Jednotlivé kultury se liší schopností růstu a produkcí metabolitů za nízkých teplot a nižšího pH prostředí. [7] [8]

Mezi komerčně dostupné startovací kultury patří zástupci rodu *Staphylococcus* a *Kocuria*. Mezi zástupce rodu *Staphylococcus* se řadí *S. xylosus*, který je využíván zejména v řeckých, italských a španělských přirozeně zrajících masných výrobcích, *S. equorum* a *S. succinus*, který se využívá ve francouzských FMV. Mezi další zástupce se řadí *S. carnosus*, *S. saprophyticus* a *S. warneri*. Dalším mikroorganismem využívajícím ve startovacích kulturách je *Kocuria varians*. [7] [8] [11] [12]

Jednotlivé kmeny by neměly být virulentní, obsahovat geny pro rezistenci na antibiotika a tvořit biogenní aminy, jako je tomu u požadavků na bakterie mléčného kvašení. [7]

3.1.3 Kvasinky a plísně

Růst kvasinek obvykle předchází výskytu plísni. Mezi nejčastějšího zástupce lze zařadit *Debaromyces hansenii*, u plísni je to pak zástupce rodu *Penicillium*, *P. nalgiovense*. Mezi komerčně dostupné startovací kultury se dále řadí *P. chrysogenum* a *P. candidum*. [7] [8] [10] [11] [12]

Jelikož plísně produkují sekundární metabolity (mykotoxiny, antibiotika) je kladen důraz na využívání druhů, které tyto metabolity netvoří. Mezi další požadavky na plísňové kultury patří bělavý povlak na povrchu masného výrobku, takové masné výrobky jsou pak brány jako nejkvalitnější. Další žádanou vlastností je tvorba specifického aroma a chuti. [1] [7] [8]

3.2 Vztah mezi mikroorganismy a masnými výrobky

Hlavní příčinou přidavku startovacích kultur do masných výrobků je tvorba žádoucích produktů metabolismu, které mění fyzikálně-chemickou povahu masného výrobků, jako jsou změna textury, reologických vlastností, hodnoty pH, nutriční hodnoty masných výrobků a další. Druhou skupinu tvoří biochemická aktivita, během níž se tvoří žádané organoleptické vlastnosti, jako jsou chuťové a aromatické látky, které výrobek získává produkcí kyseliny mléčné BMK. Biochemická aktivita také přispívá k získání žádané struktury a konzistence masného výrobku. [7] [8] [12] [13]

Na druhou stranu jsou kladeny požadavky na to, aby použité startovací kultury negativně neovlivňovaly fermentované masné výrobky. Nesmí produkovat metabolity, které by nepříznivě ovlivnily senzorické vlastnosti. Dále pak nesmějí být jako startovací kultura použity patogenní mikroorganismy, neboli takové mikroorganismy, které by byly zdraví nebezpečné pro konzumenta. A je kladen i důraz, aby jako startovací kultura byly použity homofermentativní BMK, tedy aby netvořily plyn a další nežádoucí metabolity, které by mohly negativně ovlivnit senzorické vlastnosti masného výrobku. [8] [12] [13]

4 STANOVENÍ MIKROBIÁLNÍ DIVERZITY NON-KULTIVAČNÍMI METODAMI

4.1 Polymerázová řetězová reakce

PCR neboli „Polymerase Chain Reaction“, v českém překladu „polymerázová řetězová reakce“ představuje jednu z nejužitečnějších metod využívaných v molekulární biologii. Jedná se o snadnou a velice rychlou metodu amplifikace DNA v reakční směsi. Není proto překvapením, že tato metoda našla uplatnění ve mnoha odvětví molekulární biologie a biotechnologiích, dále v medicínské diagnostice, environmentální analýze. [14] [15]

Podstatou metody je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců dvoušroubovicové molekuly DNA. K amplifikaci dochází ve směru od 5' po 3' konec prostřednictvím příslušné DNA-polymerázy. K syntéze je nutné používat termostabilní DNA-polymerázu, která je schopna odolat působení vysokých teplot, obzvláště v prvním kroku celého procesu. Příkladem je např. Taq DNA-polymeráza, která byla izolována z mikroorganismu *Thermus aquaticus*, termofilní, aerobní, heterotrofní gram-negativní bakterie. [15] [16]

Metodu vyvinul v roce 1983 Dr. Kary Mullis. O dva roky později byla metoda zavedena do praxe. To znamenalo doslova revoluci na poli molekulární biologie. Oproti dřívějším metodám pro amplifikaci DNA, se zavedením této metody značně snížila doba pro samotné zmnožení a mnohonásobně se zvýšil její výtěžek. V literatuře je uváděno, že z jedné molekuly DNA se během 30 cyklů nasyntetizuje až 1 miliarda kopií. [14] [15]

K samotné reakci dochází ve speciálních přístrojích zvaných „termocyklery“, ve kterých se teplota pro jednotlivé kroky reakce mění automaticky podle předem nastaveného programu. Optimální počet cyklů je přímo závislý na koncentraci templátové DNA a pohybuje se v rozmezí 25-35 cyklů.[14] [15]

Jak již bylo zmíněno, PCR je cyklická metoda, během které dochází k opakování tří základních kroků:

- Denaturace – při tomto kroku dochází k rozvolnění dvoušroubovice DNA působením vysokých teplot (90-94 °C).
- Annealing – dochází ke snížení teploty na 50-60 °C, během které mohou primery nasedat na již rozvolněná vlákna molekuly.

- Elongace – po úspěšném nasednutí primerů dochází ke zvýšení teploty, která je závislá na použité DNA-polymeráze, literatura uvádí rozmezí 60-75 °C. V tomto kroku dochází k vlastní syntéze nové dvouřetězcové molekuly DNA od 5' po 3' konec. [14] [15]

Produktem reakce jsou tzv. amplikony, neboli úseky DNA definované délky o obvyklé velikosti desítky až tisíce párů bází. Přítomnost produktů se prokazuje stanovením velikosti gelovou elektroforézou na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Pro podrobnější analýzu je možné využít i dalších metod stanovení, jako je DGGE (denaturační gradientová gelová elektroforéza), TGGE (teplotní gradientová gelová elektroforéza) a dalšími metodami. [15]

Metoda PCR byla úspěšně použita pro detekci mnoha patogenů způsobující alimentární onemocnění, jako je *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp. a *Shigella* sp. [17]

4.1.1 Reakční směs

K úspěšnému průběhu reakce je nutné vhodné složení reakční směsi. Mezi komponenty lze zahrnout: templátovou DNA, primery, DNA-polymerázu, nukleotidy a základní reakční roztok.

4.1.1.1 Templátová DNA

Templátová, neboli základní, molekula DNA, u které dojde během reakce k amplifikaci. K úspěšnému namnožení stačí velmi malé množství, obvykle se využívá 1 µl. [14]

4.1.1.2 Primery

Pro úspěšnou amplifikaci molekuly DNA je nutný správný návrh použitých primerů. K jejich návrhu byly vytvořeny specializované softwary. Délka se zpravidla pohybuje mezi 18-25 páry bází, jednotlivé primery musí být dostatečně dlouhé, aby došlo ke správnému nasednutí na specifická místa v molekule DNA. Navrhovaný primer by měl mít rovnoměrnou distribuci G/C a A/T párů, přičemž obsah guaninu (G) a cytosinu (C) by se měl pohybovat mezi 40-60 %. [14] [15]

Další důležitou vlastností je teplota tání primerů, která by měla být alespoň 50 °C. U obou použitých primerů by se teplota tání neměla lišit o více jak pár °C. Primery musí upřednostňovat napojení na molekulu DNA, nesmí tedy docházet ke vzájemnému spojení obou

primerů. V reakční směsi musí být mnohonásobně větší množství primerů, oproti množství templátové DNA, tím je docíleno toho, že všechna vlákna templátové DNA se spojí s primery, než aby se spojily za snížené teploty spolu dohromady. [14] [15]

Pokud je přítomna jen část sekvence, je možné využít tzv. degenerativních primerů. Jedná se o takové primery, které obsahují několik alternativních bází na definovaných pozicích [14]

4.1.1.3 DNA-polymeráza

DNA-polymeráza představuje enzym účastnící se replikace DNA. Syntetizuje nové vlákno molekuly. Její funkce spočívá ve vazbě na předem nasednutý primer. Hlavní podmínkou je termostabilita. Nejčastěji využívaná je tzv. Taq-polymeráza, izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*, s optimem aktivity mezi 75-80 °C. Dalšími příklady DNA-polymeráz jsou Tht, Tfl, Pfu, Pwo, Tgo a další. [15] [16]

4.1.1.4 Základní reakční roztok

Další nedílnou součástí reakční směsi jsou chlorid hořečnatý ($MgCl_2$), 2'-deoxyribonukleosid-5'-fosfáty (dNTP), pufovací roztok a tzv. PCR-voda. [15]

Hořečnaté ionty (Mg^{2+}) představují kofaktor pro reakční směs. Ionty tvoří rozpustný komplex s jednotlivými 2'-deoxyribonukleosid-5'-fosfáty (dNTP). dNTP představují, jak již bylo zmíněno, deoxynukleotidtrifosfáty, jež nese čtyři nukleotidy adenin (A), cytosin (C), guanin (G) a thymin (T), které jsou využívány DNA-polymerázou k prodloužení navázaných primerů. Nedílnou součástí směsi je také pufovací roztok, který udržuje stabilní pH celého roztoku. Tento faktor je opět důležitý pro DNA-polymerázu a to pro dosažení její maximální aktivity. Poslední součástí základního reakčního roztoku představuje voda. Pro účely PCR je nutné použití dvakrát destilované (redestilované) vody. Tímto se zabrání případné kontaminaci. [15] [18]

4.2 Gelová elektroforéza

Elektroforéza jako taková patří v molekulární biologii k jedné z nejpoužívanějších separačních metod při izolaci a následné analýze nukleových kyselin nebo proteinů. Principem této metody je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. U nukleových kyselin jsou nositelem náboje negativně nabitě fosfátové skupiny, z toho plyne pohyb iontů k anodě. [15] [19]

V případě gelové elektroforézy je nutné využít vhodného nosiče, gelu. Rozlišujeme dva typy těchto gelů: polyakrylamidový nebo agarózový gel. U obou gelů dochází k vytvoření síťované polymerní struktury s póry. Velikost pórů přítomných v gelu je možné ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymeru. [15] [19]

Agarózový gel se využívá při separaci molekul nukleových kyselin o velikosti od 100 párů po 50 tisíc párů bází. Naopak polyakrylamidové gely naleznou své uplatnění pro separaci menších molekul, je uváděno 10 až 1000 párů bází. Polyakrylamidového gelu se využívá například při metodách DGGE nebo TGGE. [15]

4.3 DGGE

Denaturační gradientová gelová elektroforéza, zkráceně DGGE, představuje přesnější metodu separace nukleových kyselin. Její podstatou je detekce rozdílů v sekvenci v krátkých molekulách DNA. Tato metoda využívá elektroforetické mobility u částečně denaturované a nedenaturované DNA. Jak již bylo zmíněno u gelové elektroforézy, využívá se zde polyakrylamidového gelu s lineárním denaturačním gradientem zajišťujícím zvyšující se koncentraci denaturačního činidla, kterým je močovina a formamid. [15] [20]

Zvýšená rozlišovací schopnost metody je způsobena připojením GC-svorky na konce analyzovaných fragmentů, jež zamezí úplné denaturaci a dojde tak ke vzniku jednořetězcové formy DNA. Při správném dodržení postupu metoda umožní sekvenčně specifickou separaci molekul o stejné délce, lišící se pouze jednou bází. Během elektroforézy dochází k postupné denaturaci molekuly DNA a vytvoření větvené struktury s lokálními jednořetězcovými oblastmi. [15]

Mezi hlavní výhody při použití této metody stanovení lze zařadit spolehlivost výsledků, opakovatelnost, rychlost a celkové nízké náklady. Tato metoda má také svá omezení, mezi která lze zahrnout: laboratorní podmínky, zkušenosti laboratorních pracovníků a čistotu izolované DNA. [21] [22]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem této bakalářské práce byla optimalizace metody pro izolaci DNA z fermentovaných masných výrobků. Byly zkoumány jednotlivé modifikace pro izolaci DNA s cílem získat nejvyšší možné koncentrace a čistoty izolované DNA. K dosažení tohoto cíle vedlo několik dílčích cílů:

1. Vypracování literární rešerše na téma charakterizace FMV, technologie výroby FMV a mikrobiální diverzity FMV s využitím dostupných odborných publikací a vědeckých prací.
2. Optimalizace metody izolace mikrobiální DNA ze vzorků FMV s cílem získání DNA o co nejvyšší koncentraci a čistotě.
3. Vyhodnocení výsledků, diskuze a formulace závěrů.

6 MATERIÁL A METODIKA

V první části této kapitoly jsou uvedeny použité přístroje, zařízení a chemikálie, které byly využívány v rámci bakalářské práce. Ve druhé části je uvedena metodika práce pro jednotlivé metody, které byly v rámci práce využívány.

6.1 Použité přístroje, zařízení a chemikálie

Chemikálie:

Agaróza (SIGMA)

APS (Amonium persulfát – SIGMA)

Quick-Load 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs, Inc.)

Etanol 70 % (SIGMA)

Ethidiumbromid (1:30 H₂O) (SIGMA)

FastStart PCR Master (ROCHE)

Formamid (SIGMA)

GoTaq[®] Hot Start Green MasterMix (Promega)

Chloroform (PENTA)

Močovina (Urea – Promega)

PBS (fosfátový pufr) (PENTA)

Power Food[®] DNA Isolation Kit (MO BIO)

Primery (Eastport – Metabion)

SDS (dodecylsírán sodný - SERVA)

TEMED (NNN'N'-tetraethylendiamin – SIGMA)

Voda pro molekulárně biologické metody (SIGMA)

Primery:

Zásobní roztok primerů 100 pmol/μl

Pracovní roztok primerů 20 pmol/ μl

Tabulka 1: Použité primery [23]

| Primer* | Sekvence | Reference |
|------------|----------------------------|----------------------------|
| 341 F | CCT ACG GGA GGC AGC AG | Muyzer et al., 1993 [24] |
| 24341 F GC | CCT ACG GGA GGC AGC AG | Muyzer et al., 1993 [24] |
| 907 R | CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT | Lane, 1991 [25] |
| FD 1 | AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG | Weisburg et al., 1991 [26] |
| RD 1 | AAG GAG GTG ATC CAG CC | Weisburg et al. 1991 [26] |

*Primery, které obsahovaly v sekvenci GC svorku (CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG), mají v názvu uvedeno „GC“

Přístroje a zařízení:

Analytické váhy (KERN ABJ, d = 0,0001 g)

Centrifuga (HERMLE Z 100M)

Centrifuga Minispin 12 (Eppendorf)

Elektroforetická soustava MU-10 (SCIE-PLAS)

Laminární box (Major Science – Aura PCR BIOAIR MP-300N)

Lednice s mrazničkou (BEKO CSA34020)

Magnetické míchadlo (Heindolph MR1000)

Magnetické míchadlo s ohřevem (Heidolph MR Hei-Tec)

Mikropipety (Eppendorf, Gilson, Nichiro Nicipipet EX)

Mikrovlnná trouba (Elektrolux)

Navážky (KERN KB, d = 0,01 g)

Nitrilové ochranné rukavice

Sterilní špičky

Sterilní špičky s filtem

Tecan Infinite 200 Pro

Thermocykler ESCO (AERIS)

Thermocykler PIKO (FINNZYMES)

Transiluminátor (SYGENE, Model InGenius LHR)

Třepačka (Heindolph Titramax 100)

Vortex Genie 2 (MOBIO)

Vortex V-1 plus (BIOSAN)

Zdroj el. proudu MP 300N (MajorScience)

6.1.1 Příprava roztoků

50x TAE pufr – (2 mol/l Tris báze, 0,05 mol/l Na₂EDTA, 1 mol/l CH₃COOH) pro přípravu 100 ml roztoku bylo naváženo 24,23 g Tris báze, 1,86 g Na₂EDTA a 5,654 ml kyseliny octové kvantitativně převedeno do odměrné baňky. Jednotlivé složky roztoku byly rozpuštěny a bylo upraveno pH na hodnotu 8,0 (10 % roztok NaOH). Roztok byl následně doplněn na požadovaných 100 ml a sterilizován v autoklávu.

10x TAE pufr – 200 ml 50x koncentrovaného TAE pufru bylo doplněno na objem 1000 ml

1x TAE pufr – 20 ml 50x koncentrovaného TAE pufru bylo doplněno na objem 1000 ml

6.2 Charakteristika vzorků

Testovaným vzorkem fermentovaného masného v rámci praktické části této bakalářské práce, byl salám Paprikáš. Byly testovány dvě sady vzorků. První sada vzorků byla získána z únorových odběrů (vzorky po fermentaci před sušením), druhá sada z odběrů dubnových vzorků (vyzrálý FMV po vysušení s nízkou hodnotou vodní aktivity).

6.3 Stanovení mikrobiální diverzity non-kultivačními metodami

6.3.1 Optimalizace přípravy vzorků pro izolaci DNA

Během praktické části bakalářské práce byly testovány tři metody přípravy vzorků pro izolaci DNA s cílem dosáhnout nejvyšší možné koncentrace a čistoty izolované DNA.

Modifikace č. 1: vzorek salámu byl navážen a vložen do sterilního plastového sáčku, do sáčku byla následně přidána sterilní destilovaná voda v poměru 1:2. Sáček byl vložen do Stomacheru, kde byl po dobu cca 2 minut homogenizován. Homogenizovaná směs byla dále filtrována přes sterilní gázu. Získaný filtrát byl dále použit pro izolaci DNA.

Modifikace č. 2: vzorek salámu byl navážen a vložen do sterilního plastového sáčku, do sáčku byla následně přidána sterilní destilovaná voda v poměru 1:2. Sáček byl vložen do Stomacheru, kde byl po dobu cca 2 minut homogenizován. Homogenizovaná směs byla dále filtrována přes sterilní gázu. Získaný filtrát byl smíchán v poměru 1:1 s chloroformem. Směs byla po dobu 3 minut protřepávána. Filtrát byl odpipetován a dále použit pro izolaci DNA.

Modifikace č. 3: vzorek salámu byl navážen a vložen do sterilního plastového sáčku, do sáčku byla následně přidána sterilní destilovaná voda v poměru 1:2. Sáček byl vložen do Stomacheru, kde byl po dobu cca 2 minut homogenizován. Homogenizovaná směs byla dále filtrována přes sterilní gázu. Ke směsi bylo přidáno SDS (dodecylsírán sodný) v poměru 3:0,075. Směs byla zahřívána po dobu 1 hodiny při 55 °C. Získaná směs byla dále použita pro izolaci DNA.

6.3.2 Izolace DNA

DNA byla izolována pomocí Power Food[®] Microbial DNA Isolation kitu od společnosti MO BIO Laboratories, Inc. Izolace proběhla za využití silika kolonek. Izolace byla provedena podle pracovního postupu dodaného výrobcem kitu s několika modifikacemi pro zvýšení výtěžku a čistoty izolované DNA, následovně:

1. 1,8 ml filtrátu bylo pipetováno do 2ml mikrozkušavky a byla provedena centrifugace při 13000 x g po dobu 1 minuty. Supernatant byl dekantován a bylo přidáno 1,8 ml filtrátu. Supernatant byl opět dekantován a byla provedena další centrifugace při 13000 x g po dobu 1 minuty. Zbylý supernatant byl odpipetován automatickou pipetou.

2. Vzniklá usazenina byla rozpuštěna ve 450 μ l roztoku PF1 předem předeřátého na teplotu 65 °C po dobu 10 minut.
3. Rozpuštěná usazenina byla převedena pomocí automatické pipety do rozbíjecí mikrozkušky MicroBead Tube, která byla umístěna do vortexu MO BIO Vortex Adapter.
4. Následovalo důkladné promíchání na vortexu při maximální rychlosti po dobu 10 minut.
5. Následně byla provedena centrifugace vzorku při 13000 x g po dobu 1 minuty za pokojové teploty.
6. Supernatant byl převeden do nové 2 ml mikrozkušky.
7. K supernatantu bylo přidáno 100 μ l roztoku PF2 a bylo provedeno krátké promíchání na vortexu.
8. Následovalo ochlazení mikrozkušky po dobu 5 minut při 4 °C.
9. Po ochlazení byla mikrozkuška centrifugována při 13000 x g po dobu 1 minuty.
10. Obsah byl převeden do čisté 2 ml mikrozkušky.
11. Následně bylo přidáno 900 μ l roztoku PF3 a celý obsah byl promíchán na vortexu.
12. 650 μ l supernatantu bylo převedeno do kolonky v nové 2 ml mikrozkušce a bylo provedeno odstředění při 13000 x g po dobu 1 minuty.
13. Kolonka byla vyndána z mikrozkušky a vložena do čisté 2 ml mikrozkušky.
14. Na kolonku bylo napipetováno 650 μ l předem promíchaného roztoku PF4 a bylo provedeno odstředění při 13000 x g po dobu 1 minuty za pokojové teploty.
15. Následovalo vylití přefiltrovaného roztoku. Na kolonku bylo napipetováno 650 μ l roztoku PF5 a bylo provedeno odstředění při 13000 x g po dobu 1 minuty.
16. Přefiltrovaný roztok byl vylit a bylo provedeno další odstředění při 13000 x g po dobu 2 minut pro odstranění přebytečných zbytků roztoků.
17. Kolonka byla vyjmuta a umístěna do čisté mikrozkušky.
18. Následně bylo přidáno 30 μ l roztoku PF6 na střed filtru kolonky, která se po aplikaci nechala 10 minut odstát.
19. Poté bylo provedeno odstředění při 13000 x g po dobu 1 minuty.

20. Kolonka byla odstraněna. DNA zůstala rozpuštěná v roztoku v mikrozkuhavce a připravena pro další použití.

6.3.3 Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA bylo prováděno na přístroji Tecan Infinite 200 Pro. Byla sledována absorbance UV záření při vlnové délce 260 nm, kterou byla změřena koncentrace izolované DNA ve vzorku a poměr absorbance při 260 nm a 280 nm, kterým byla změřena její čistota. Měření probíhalo dle následujícího postupu:

1. Na počítači byl spuštěn program a z přístroje Tecan Infinite 200 Pro byla vyjmuta destička (NanoQuant Plate).
2. Destička byla omyta destilovanou vodou a opláchnuta etanolem, který se nechal odpařit.
3. Na destičku byly nejprve naneseny 2 μ l rozpouštědla (roztok PF6), první měření sloužilo ke kalibraci přístroje.
4. Destička byla opatrně uzavřena a vložena do přístroje. Pomocí laboratorního počítače byla destička uzavřena v přístroji a pomocí programu bylo spuštěno kalibrační měření.
5. Po změření došlo k vyjmutí destičky a jejímu opláchnutí etanolem.
6. Na jamky destičky byly následně naneseny mikropipetou vzorky DNA o objemu 2 μ l. Po nanesení vzorků byla destička opatrně uzavřena a vložena do přístroje. Pomocí programu byla destička uzavřena do přístroje a bylo spuštěno měření.
7. Po vyhodnocení byl uložen soubor v programu Microsoft Office Excel.

Z hodnot absorbance při 260 nm byla pomocí programu vypočtena koncentrace mikrobiální DNA ve vzorcích. Čistota mikrobiální DNA byla vypočtena z poměru absorbancí při 260 nm a 280 nm. Pro vlnovou délku 260 nm platí, že ji nejlépe absorbují nukleové kyseliny. Pro vlnovou délku 280 nm pak platí, že ji nejlépe absorbují bílkoviny. Optimální hodnota čistoty izolované DNA by se měla pohybovat mezi 1,8-2,0.

6.3.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Princip metody PCR (polymerázové řetězové reakce) je popsán v teoretické části bakalářské práce. Pro účely amplifikace izolované DNA byly využity primery 907 R, 341F, 341

FGC, FD1 a RD1. Jednotlivé programy pro PCR reakce jsou uvedeny níže s podrobným popisem.

6.3.4.1 Pracovní postup přípravy reakční směsi:

Reakční směs se skládala z: mastermixu (s polymerázou – ROCHE nebo Promega), 2 primerů (forward a reverse), redestilované vody pro molekulární biologii, tzv. PCR-vody. Reakční směs byla připravována v objemech 20 μ l.

Reakční směs byla připravována v laminárním boxu za aseptických podmínek, kterých bylo dosaženo vysvícením prostředí boxu s laboratorními pomůckami, UV zářením po dobu minimálně 20 minut, z důvodu zamezení potenciální kontaminace. Jednotlivé složky reakční směsi byly pipetovány do tzv. PCR stripů o objemu 0,2 ml.

Pro ověření správnosti pracovního postupu byla připravena také negativní kontrola. Negativní kontrola obsahovala všechny složky reakční směsi, uvedené v tabulce č. 2, až na templátovou DNA.

PCR reakce probíhala ve dvou stupních. Tato metoda provedení PCR reakce se nazývá nested polymerázová řetězová reakce. Hlavním důvodem využití nested PCR je zvýšení výtěžku a zvýšení citlivosti stanovení.

6.3.4.2 1. stupeň amplifikace:

Pro první stupeň amplifikace bylo využito Touch Down polymerázové řetězové reakce (Touch Down PCR). Podstatou této metody je postupné snižování teploty nasednutí (annealingu) primerů. Vyšší počáteční teplota pro nasednutí primerů má za důsledek zabránění amplifikace nespecifických sekvencí molekuly DNA, ke které dochází při nižších teplotách. Zvyšuje se tedy pravděpodobnost amplifikace požadované sekvence.

Pro zvýšení přesnosti amplifikace požadované sekvence bylo využito v tomto kroku modifikace Hot Start. Tato modifikace využívá speciální DNA-polymerázu, která pro aktivaci vyžaduje vysoké teploty, jež se pohybuje okolo 95 °C.

Tabulka 2: Složení reakční směsi pro 1. stupeň amplifikace pomocí PCR

| | Množství pro 1 reakci [μ l] |
|--|----------------------------------|
| GoTaq [®] Hot Start Green MasterMix | 10 |
| Voda pro molekulární biologii | 7 |
| Forward primer | 1 |

| | |
|----------------|----|
| Reverse primer | 1 |
| Templátová DNA | 1 |
| Celkový objem | 20 |

Během prvního stupně amplifikace bylo využito primerů FD1 a RD1. Použitím těchto primerů byl získán produkt o délce přibližně 1500 bp. Bylo pracováno s roztoky primerů o pracovní koncentraci 20 pmol/ μ l.

Pracovní postup přípravy reakční směsi pro 1 stupeň byl následovný:

1. Do sterilní mikrozkuřavky o objemu 1,5 ml byl napipetován MasterMix, redestilovaná voda pro molekulární biologii, reverse a forward primer. Množství jednotlivých složek bylo předem vypočítáno podle počtu vzorků, společně s negativní kontrolou a rezervou. Obsah mikrozkuřavky byl důkladně promíchán.
2. Do PCR stripů o objemu 0,2 ml bylo napipetováno 19 μ l připravené směsi. Po rozpipetování byly stripy vysvíceny UV paprsky po dobu zhruba 5 minut, aby se zabránilo potenciální kontaminaci.
3. Následně byl do reakční směsi přidán 1 μ l vyzolované DNA a do negativní kontroly voda pro molekulární biologii.
4. Reakční směs byla následně důkladně promíchána a centrifugována.
5. Stripy byly vloženy do termocykleru, na kterém byl navolen příslušný program.

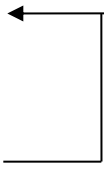
PCR reakce probíhala podle příslušného programu. Pro 1. stupeň byl zvolen program FD1RD1TD:

| | | | | |
|---|----------|----------|---|---|
| Počáteční denaturace: | 95 °C | 5-10 min | | |
| Denaturace (denaturation): | 95 °C | 30 s | ← | 10x opakováno, s každým cyklem se teplota snížila o 0,5 °C |
| Nasednutí primerů (annealing): | 57 °C | 30 s | | |
| Elongace (extension): | 72 °C | 2 min | | |
| Denaturace (denaturation): | 94-95 °C | 30 s | ← | 25x opakováno |
| Nasednutí primerů (annealing): | 52 °C | 20 s | | |
| Elongace (extension): | 72 °C | 2 min | | |
| Závěrečná extenze (final extension): | 72 °C | 10 min | | |
| Uchování (storage): | 4 °C | ∞ | | |

6.3.4.3 2. stupeň amplifikace:

Pro druhý stupeň amplifikace bylo, rovněž jako v prvním stupni, využito modifikace Hot Start. Pracovní postup i připravovaný objem byl totožný jako u prvního stupně amplifikace (tabulka 2). Zásadním rozdílem oproti 1. stupni bylo použití jiných primerů. Pro účely tohoto stupně bylo využito dvou sad primerů: 341F a 907R a 341FGC a 907R. Jako templátová DNA sloužil produkt 1. stupně amplifikace.

Ve vlastní PCR reakci bylo využito dvou programů 341G907R a 341FGC907R. Programy probíhaly podle následujícího schématu:

| | | | | |
|--------------------------------|-------|--------|---|---------------|
| Počáteční denaturace: | 95 °C | 2 min | | |
| Denaturace (denaturation): | 95 °C | 30 s |  | 35x opakováno |
| Nasednutí primerů (annealing): | 57 °C | 30 s | | |
| Elongace (extension): | 72 °C | 1 min | | |
| Závěrečná extenze | 72 °C | 10 min | | |
| (final extension): | | | | |
| Uchování (storage): | 4°C | ∞ | | |

Správnost průběhu PCR reakce byla následně elektroforeticky ověřena na agarózovém gelu a poté pro produkty s GC svorkou separována pomocí metody DGGE.

6.3.5 Gelová elektroforéza

Pro provedení PCR reakce byla provedena kontrola PCR amplikonů pomocí gelové elektroforézy.

Rozdělení amplikonů pomocí elektroforézy probíhalo na 1% agarózovém gelu. Pro přípravu 1% agarózového bylo gelu bylo použito:

| | |
|----------------|------------|
| Agaróza | 1 g |
| 1x TAE pufr | 100 ml |
| Ethidiumbromid | 90 μ l |

Pro všechny provedené kontroly bylo připraveno 100 ml agarózového gelu. 1 % agarózový gel byl připraven podle následujícího postupu:

1. Agaróza byla kvantitativně převedena pomocí 1x TAE pufru do Erlenmayerovy baňky a doplněna na požadovaný objem (100 ml). Pro rozpuštění agarózy byla využita mikrovlnná trouba po dobu 45-60 s, během které byla agaróza přivedena k varu.
2. Baňka byla vyjmuta z mikrovlnné trouby a následně byly do roztoku přidány 3 kapky (90 μ l) etidiumbromidu.
3. Roztok byl řádně promíchán a nalit do formy. V gelu byly pomocí plastového hřebínku vytvořeny jamky, které sloužily pro aplikaci PCR produktů.
4. Po ztuhnutí gelu (cca 30 minut) byl hřebínek vyndán, do elektroforetické vany bylo nalito přiměřené množství 1x koncentrovaného TAE pufru a forma do ní byla vložena.
5. Do první a poslední jamky bylo napipetováno 5 μ l DNA markeru: 200-1600 nebo Markeru Quick-Load 100 bp DNA Ladder, tzv. velikostní standardy.
6. Do ostatních jamek gelu bylo napipetováno 5 μ l (10 μ l) amplifikované DNA a 2-3 μ l (4-5 μ l) barvy pro zvýraznění průběhu reakce.
7. Při elektroforéze bylo použito napětí 120 V po dobu cca 30 minut.
8. Po skočení elektroforézy byla forma vyjmuta z elektroforetické vany. Gel byl následně přenesen do UV-transiluminátoru a osvětlen UV zářením. Pomocí programu GeneSnap byl elektroforeogram detekován.

6.3.6 DGGE

Skládání skel pro polymeraci gelu:

Gel pro reakci byl připravován ve skleněné aparatuře. Byl kladen velký důraz na správné složení aparatury, aby se zabránilo vytékání gelu, během polymerace. Dále byl kladen důraz na práci v rukavicích a ochranných brýlích, a to z důvodu manipulace s karcinogenními či toxickými látkami.

Aparatura se skládala pomocí dvou skleněných desek, dvou oddělovačů, které vytvořily mezi skleněnými deskami dostatečnou mezeru pro aplikaci gelu a silikonovým těsněním.

Pracovní postup pro složení skleněné aparatury:

1. Skleněné desky byly důkladně omyty, osušeny a následně opláchnuty etanolem, který se nechal odpařit.
2. Na skleněnou desku se zaoblenými rohy bylo přiloženo silikonové těsnění. Poté byly na desku položeny dva spacers, každý po jedné straně. Spacers musely dokonale přiléhat k silikonovému těsnění, aby se tak předešlo vytékání gelu během polymerace.
3. Na desku se silikonovým těsněním a spacers byla opatrně přiložena druhá skleněná deska. Na spodní straně byla skla k sobě přichycena 2 plastovými sponami a po bocích dalšími 2 na každé straně

Příprava roztoku gelu:

Pro denaturační gradientovou gelovou elektroforézu byly připraveny dva roztoky o různém gradientu denaturačních činidel. V první fázi byly připravovány roztoky s gradientem 40 % a 60 % (tabulka 4). Ve druhé fázi byly připravovány roztoky s gradientem 30 % a 70 % (tabulka 5). Roztoky gelu byly připraveny v objemu 100 ml, složení roztoků bylo následující:

Tabulka 3: Složení roztoku gelu s gradientem 40 % a 60 %

| Složky roztoku | Množství pro gradient 40 % | Množství pro gradient 60 % |
|------------------|----------------------------|----------------------------|
| Akrylamid (40 %) | 18,8 ml | 18,8 ml |
| Formamid (99+ %) | 16 ml | 24 ml |
| TAE pufr (50x) | 2 ml | 2 ml |
| Močovina | 16,8 g | 25,2 g |

Tabulka 4: Složení roztoku gelu s gradientem 30 % a 70 %

| Složky roztoku | Množství pro gradient 40 % | Množství pro gradient 60 % |
|------------------|----------------------------|----------------------------|
| Akrylamid (40 %) | 18,8 ml | 18,8 ml |
| Formamid (99+ %) | 12 ml | 28 ml |
| TAE pufr (50x) | 2 ml | 2 ml |
| Močovina | 12,6 g | 29,4 g |

U všech roztoků byla doplněna demineralizovaná voda pro molekulární biologii do celkového objemu roztoku 100 ml.

1. Jednotlivé složky roztoku byly naváženy a napipetovány do baňky. Do baňky bylo vloženo magnetické míchadlo a roztok byl míchán při 450 ot./min. a zahříván na 50 °C do úplného rozpuštění močoviny po dobu 15-20 minut.
2. Po vyhladnutí roztoku bylo odpipetováno 15 ml roztoku gelu se 40 % a 60 % gradientem (příp. 30% a 70 % gradientem) a přidána polymerační činidla. Do obou roztoků bylo přidáno 104,4 µl 10 % roztoku APS (amonium persulfát), který byl připraven následujícím způsobem: 0,025 g APS bylo kvantitativně převedeno do ependorfovy mikroskopické kumavky a rozpuštěno ve 250 µl demineralizované vody pro molekulární biologii, roztok byl vždy připraven čerstvý. Následně bylo do jednotlivých roztoků přidáno 6,5 µl TEMED (NNN'N'-tetramethyldiaminu). Roztok byl během přidávání intenzivně míchán při 950 ot./min

Sestavení aparatury pro aplikaci gelu:

1. Na magnetické míchadlo byla postavena aparatura pro smíchávání obou roztoků, tzv. gradient maker (GM-40), který se skládal ze dvou dávkovačů pro roztoky.
2. Aparatura byla upevněna svorkou pro lepší stabilitu.
3. Aparatura byla propojena s mini-pumpou pomocí hadičky, která na svém druhém konci měla jehlu pro dávkování gelu. Jehla byla vložena do předem připravené skleněné aparatury.

Dávkování roztoku gelu:

Dávkování gelu bylo prováděno pomocí mini-pumpy od společnosti C.B.S. Scientific Company, Inc. do skleněné aparatury.

1. Do pravého dávkovače gradient markeru byl nalit roztok s vyšším gradientem. Do levého dávkovače byl nalit roztok s nižším gradientem. Následně byly otevřeny obě zábrany. První pro promíchání roztoků a druhá pro dávkování roztoků do skleněné aparatury.
2. Byla spuštěna mini-pumpa, pro lepší dávkování gelu byla použita polovina maximální rychlosti čerpání gelu.
3. Při dávkování gelu byla sledována těsnost skel, aby nedocházelo k vytékání gelu mimo skleněnou aparaturu. Gel byl do skleněné aparatury dávkován po horní okraj.
4. Po dosažení horního okraje skleněné aparatury byla jehla odstraněna a do horní části byl vložen plastový hřebínek, díky kterému se v gelu vytvořily jamky pro aplikaci PCR produktů.
5. Následovala polymerace roztoku gelu po dobu 1-2 hodin.

Elektroforéza v denaturačním gradientu:

Během praktické části bakalářské práce bylo pracováno se systémem DGGEK-1001 od společnosti C.B.S. Scientific Company, Inc.

Pracovní postup spuštění reakce:

1. Do vany přístroje byl nalit 10x TAE pufr na minimální hranici.
2. Po polymeraci gelu byl odstraněn hřebínek a ve spodní části skleněné aparatury odchlípnuto silikonové těsnění pro prostup proudu gelem. Skleněná aparatura byla vložena do plastového nástavce a přichycena po stranách 3 plastovými svorkami.
3. Aparatura byla vložena do přístroje naplněného 10x TAE pufrem.
4. Do první a poslední jamky gelu bylo napipetováno pomocí speciálních špiček určených pro DGGE 6 μ l DNA markeru (200-1600 bp). Do ostatních jamek bylo napipetováno 10-15 μ l vzorků.
5. Následně byly připojeny gumové hadičky, které čerpaly TAE pufr.
6. Víko přístroje bylo uzavřeno a byl zapnut zdroj napětí (EPS-300X, C.B.S. Scientific Company, Inc.). Na zdroji bylo nastaveno napětí 120 V a doba 900 minut. Zdroj byl po nastavení zapnut.
7. Po ukončení DGGE byla aparatura vyjmuta a dále barvena.

Barvení polyakrylamidového gelu:

Polyakrylamidový gel byl barven pomocí fluorescenční barvy GelStar od společnosti Cambrex Bio Science Rockland, Inc. Barva byla uchovávána při -20 °C. Pracovní postup barvení gelu byla následující:

1. Barva byla vyjmuta z mrazícího zařízení a ponechána při laboratorní teplotě do úplného roztátí. Následně byla barva promíchána a centrifugována.
2. Do plastové vaničky bylo přidáno 450 ml destilované vody, 50 ml 10x TAE pufru a 50 μ l barvy GelStar. Roztok byl ve vaničce řádně promíchán.
3. Polyakrylamidový gel na skleněné desce byl vložen do vaničky.
4. Vanička s gelem byla položena na třepačku a zakryta alumíniovou fólií. Třepání probíhalo při 450 ot./min. Doba třepání byla 2-3 hodiny.

Odečtení výsledků:

Pro odečtení výsledků z gelu byl využit transiluminátor.

1. Po uplynutí doby (2-3 hodiny) byl gel se skleněnou deskou vyjmut z vaničky a vložen do transiluminátoru (bez skleněné desky).
2. Na přístroji byl zapnut zdroj UV záření a na laboratorním počítači spuštěn program GeneSnap.
3. Prostřednictvím programu byla dokumentována fotografie gelu ozářená UV zářením.
4. Fotografie byla uložena do laboratorního počítače ve formátu .sgd a .bmp.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

V praktické části této bakalářské práce bylo pracováno se 2 vzorky fermentovaného masného výrobku Paprikáš, které byly v různém stupni zralosti. Obě sady vzorků pocházely ze stejné výroby, jedna sada vzorků byla získána z únorových odběrů (vzorky po fermentaci před sušením), druhá sada z odběrů dubnových (vyzrálý FMV po vysušení, nízká hodnota vodní aktivity). Vzorky byly do doby analýz uchovávány při mrazírenské teplotě (-20 °C) v mrazícím zařízení. Největší důraz byl kladen na izolaci mikrobiální DNA z komplikované potravinové matrice (zejména vysušené vzorky s dubnových odběrů) a její následné modifikace pro získání požadované čistoty a koncentrace. Dále byla za účelem potvrzení dostatečné koncentrace a čistoty vyizolované DNA provedena amplifikace a kontrola amplifikované DNA na agarózovém gelu a metodou DGGE.

7.1 Optimalizace metody izolace DNA

Pro získání maximálního možného množství a čistoty izolované mikrobiální DNA byly na testovaných vzorcích vyzkoušeny tři metody modifikace izolace DNA.

První metoda modifikace zahrnovala homogenizaci vzorků FMV, filtraci směsi přes sterilní gázu a její následnou izolaci pomocí komerčně dostupného kitu (Power Food[®] DNA Isolation Kit od společnosti MOBIO).

Druhá metoda modifikace rovněž zahrnovala homogenizaci vzorků FMV, jejich filtraci přes gázu a následně přidání chloroformu v poměru 1:1 izolace probíhala pomocí komerčně dostupného kitu. Přidáním chloroformu došlo k efektivní denaturaci bílkovin, zabránění zadržování vody v organické fázi a zlepšení separace zvýšením hustoty organické fáze. [27]

Třetí metoda modifikace opět probíhala zpočátku jako předešlé dvě, tedy došlo k homogenizaci vzorků FMV, jejich filtraci přes sterilní gázu a následně přidání SDS, který způsobil rozpuštění buněčné membrány a denaturaci bílkovin. Rozrušené molekuly by pak měly snadněji reagovat prostřednictvím hydrofobních interakcí za vzniku sraženiny, jež je snadno oddělitelná od roztoku nukleových kyselin centrifugací. [28]

Jednotlivé metody modifikace přinesly odlišné výsledky. Hlavním požadavkem aplikace modifikací bylo odseparování bílkovin a jejich zbytků při izolaci DNA, což vede ke zvýšení čistoty izolované DNA. Koncentrace byla stanovována v ng/μl a čistota v poměru absorbance UV záření o vlnových délkách 260 nm a 280 nm.

Na obrázku 1 jsou uvedeny výsledky z prvotní izolace DNA z FMV Paprikáš. Jednotlivé vzorky byly izolovány bez použití modifikací. U vzorků 1A a 1B se jedná o paralelní izolaci DNA z téhož salámu, stejně tomu tak je pro vzorky 2A a 2B. Jedná se o prvotní (orientační) kontrolu izolované DNA. Všechny vzorky splňovaly předepsaná kritéria pro čistotu izolované DNA, která je určena z poměru vlnových délek absorbance a pohybuje se v rozmezí od 1,8-2,0. [29]

| 1A Abs | | | Value | | 2A Abs | | | Value | |
|---------------|--------|----|--------------|-------------------|---------------|--------|----|--------------|-------------------|
| 260 | 0,0409 | OD | | 40,9 ng/μl | 260 | 0,0331 | OD | | 33,1 ng/μl |
| 280 | 0,0217 | OD | | 1,88 ratio | 280 | 0,018 | OD | | 1,84 ratio |
| 1B Abs | | | Value | | 2B Abs | | | Value | |
| 260 | 0,0147 | OD | | 14,7 ng/μl | 260 | 0,038 | OD | | 38 ng/μl |
| 280 | 0,0081 | OD | | 1,81 ratio | 280 | 0,0201 | OD | | 1,89 ratio |

Obrázek 1: Koncentrace a čistota izolované DNA

1A – únorový vzorek 1 (bez modifikace), 2A – únorový vzorek 2 (bez modifikace),
1B – dubnový vzorek 1 (bez modifikace), 2B – dubnový vzorek 2 (bez modifikace)

Za účelem zvýšení čistoty izolované metody byly použity modifikace, zmíněné výše. U vzorků 1A a 2A se jedná o paralelní izolaci DNA u téhož salámu, totéž platí i pro vzorky 1B a 2B a 1C a 2C.

| 1A Abs | | | Value | | 2A Abs | | | Value | |
|---------------|--------|----|--------------|-------------------|---------------|--------|----|--------------|-------------------|
| 260 | 0,0527 | OD | | 52,7 ng/μl | 260 | 0,0163 | OD | | 16,3 ng/μl |
| 280 | 0,0279 | OD | | 1,89 ratio | 280 | 0,0087 | OD | | 1,87 ratio |
| 1B Abs | | | Value | | 2B Abs | | | Value | |
| 260 | 0,0051 | OD | | 5,1 ng/μl | 260 | 0,0156 | OD | | 15,6 ng/μl |
| 280 | 0,0027 | OD | | 1,89 ratio | 280 | 0,0081 | OD | | 1,93 ratio |
| 1C Abs | | | Value | | 2C Abs | | | Value | |
| 260 | 0,0142 | OD | | 14,2 ng/μl | 260 | 0,0066 | OD | | 6,6 ng/μl |
| 280 | 0,0085 | OD | | 1,67 ratio | 280 | 0,0036 | OD | | 1,83 ratio |

Obrázek 2: Koncentrace a čistota izolované DNA

1A – únorový vzorek (modifikace č. 1), 2A – dubnový vzorek (modifikace č. 1), 1B – únorový vzorek (modifikace č. 2), 2B – dubnový vzorek (modifikace č. 2), 1C – únorový vzorek (modifikace č. 3), 2C – dubnový vzorek (modifikace č. 3)

Pokud byla ze vzorků odebraných v únoru DNA izolována s použitím modifikace č. 1 a č. 2, tak došlo k mírnému zvýšení čistoty izolované DNA oproti kontrole čistoty izolovaných vzorků bez použití modifikace (obrázek 2). Naopak tomu bylo u únorových vzorků, u kterých byla při izolaci použita modifikace č. 3, kde došlo ke snížení čistoty izolované DNA.

Z důvodu nízké hodnoty čistoty izolované DNA (<1,8), lze usuzovat na to, že izolovaný vzorek byl kontaminován bílkoviny. U vyzrálých vzorků odebíraných v měsíci dubnu došlo použitím modifikací (č. 1-3) k vyizolování dostatečně čisté mikrobiální DNA, jak potvrzují hodnoty uvedené na obrázku 2. Použití izolované DNA s hodnotami čistoty >1,8 pro další aplikace bylo následně ověřeno provedením metody PCR a následně i DGGE.

Z důvodu nedostatečné hodnoty čistoty vyizolované DNA ze vzorků odebraných v únoru za pomoci modifikace č. 3 byla provedena opětovná izolace, a to jak pro únorový, tak i pro dubnový vzorek FMV (obrázek č. 3). Opět se jedná o paralelní izolaci DNA z téhož salámu.

| 1B | Abs | Value | 2B | Abs | Value |
|-----------|-----------|-------------------|-----------|-----------|-------------------|
| 260 | 0,0135 OD | 13,5 ng/μl | 260 | 0,0126 OD | 12,6 ng/μl |
| 280 | 0,0076 OD | 1,78 ratio | 280 | 0,0056 OD | 2,25 ratio |

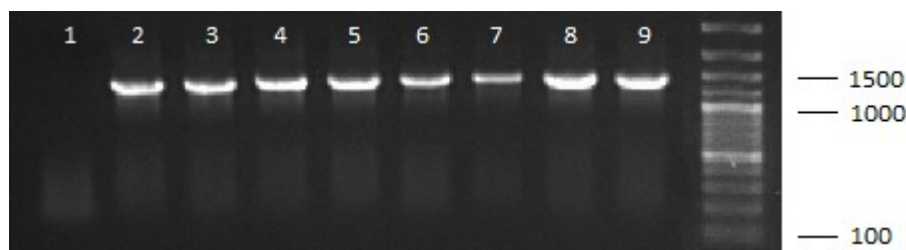
Obrázek 3: Koncentrace a čistota izolované DNA
1B – únorový vzorek (modifikace č. 3), 2B – dubnový vzorek (modifikace č. 3)

Opětovná izolace přinesla lepší výsledky pro únorový vzorek, kde hodnota čistoty byla zvýšena, ovšem opět nedošlo k získání požadované čistoty v intervalu 1,8-2,0, nicméně získaná hodnota čistoty se požadovanému intervalu blížila. Lze tedy uvést, že izolovaný vzorek byl mírně kontaminován bílkoviny. Co se týče dubnového vzorku, u toho hodnota čistoty výrazně stoupla nad hodnotu 2,0. Lze proto předpokládat, že izolovaný vzorek byl kontaminován RNA. [29]

7.2 PCR

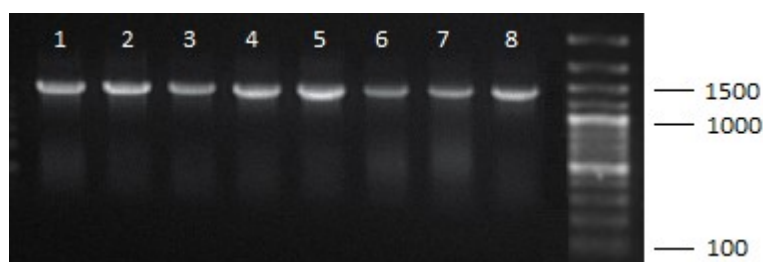
Pro účely dalšího stanovení pomocí metody DGGE byla amplifikace izolované DNA prováděna vždy ve 2 krocích. Po každém kroku byla provedena kontrola separací v elektroforetické soustavě na agarózovém gelu. Pro určení správného pracovního postupu při PCR byla ke vzorkům přidána negativní kontrola, kdy do reakční směsi byla místo izolované DNA přidána sterilní PCR voda. Negativní kontrola po elektroforetické separaci určovala kvalitu provedené metody, přítomností či absencí kontaminace. Pro kontrolu úspěšnosti byla provedena kontrola v transiluminátoru. Úspěšnost určovala intenzita bandů po prosvícení gelu zdrojem UV záření.

První krok amplifikace zahrnoval použití primerů FD1 a RD1. Použitím těchto primerů došlo k amplifikaci PCR produktů o celkové délce 1500 bp, jak je patrné z obrázků 4 a 5.



Obrázek 4: PCR 1. stupeň, 1500 bp

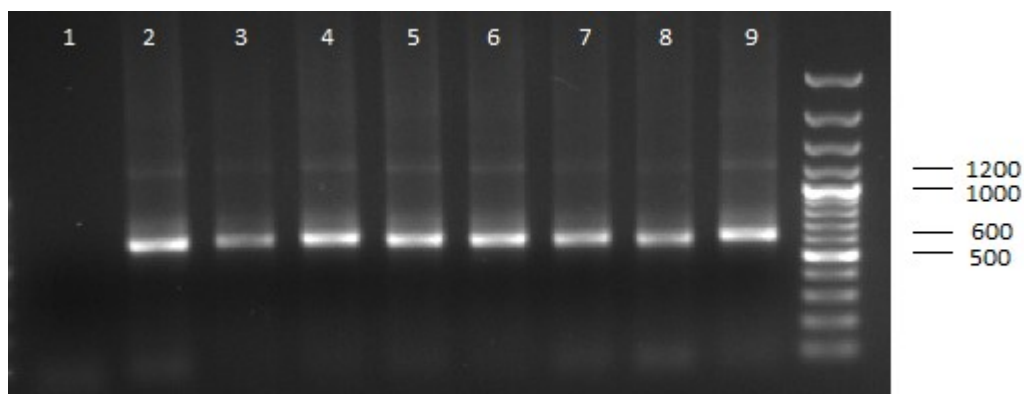
1 – negativní kontrola, 2 – dubnový vzorek 1, 3 – dubnový vzorek 2, 4 – dubnový vzorek (modifikace č. 1), 5 – dubnový vzorek (modifikace č. 2), 6 – dubnový vzorek (modifikace č. 3), 7 – dubnový vzorek (modifikace č. 2), 8 – dubnový vzorek (modifikace č. 3), 9 – dubnový vzorek 3



Obrázek 5: PCR 1. stupeň, 1500 bp

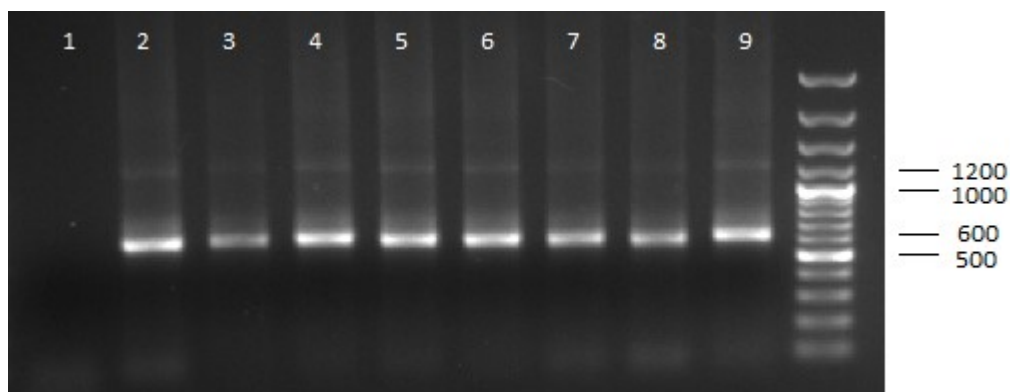
1 – únorový vzorek 1, 2 – únorový vzorek 2, 3 – únorový vzorek (modifikace č. 1), 4 – únorový vzorek (modifikace č. 2), 5 – únorový vzorek (modifikace č. 3), 6 – únorový vzorek (modifikace č. 2), 7 – únorový vzorek (modifikace č. 3), 8 – únorový vzorek 3

Pro 2. stupeň amplifikace bylo využito primerů 341F(GC) a 907R. Předpokládaná délka amplifikovaného úseku pro 2. stupeň byla 560 bp, při započítání velikosti primerů 635 bp. Tento předpoklad byl potvrzen následnou elektroforetickou detekcí. Na obrázcích č. 6 a č. 7 lze pozorovat ještě jeden produkt amplifikace o velikosti přibližně 1200 bp. Výskyt většího počtu bandů na agarózovém gelu může poukazovat na více míst pro nasedání primerů. Ve většině případů je možné tento jev odstranit zvýšením teploty hybridizace. [30]



Obrázek 6: PCR 2. stupeň, 560 bp

1 – negativní kontrola, 2 – únorový vzorek 1, 3 – únorový vzorek 2, 4 – únorový vzorek (modifikace č. 1), 5 – únorový vzorek (modifikace č. 2), 6 – únorový vzorek (modifikace č. 3), 7 – únorový vzorek (modifikace č. 2), 8 – únorový vzorek (modifikace č. 3), 9 – únorový vzorek 3



Obrázek 7: PCR 2. stupeň, 560 bp

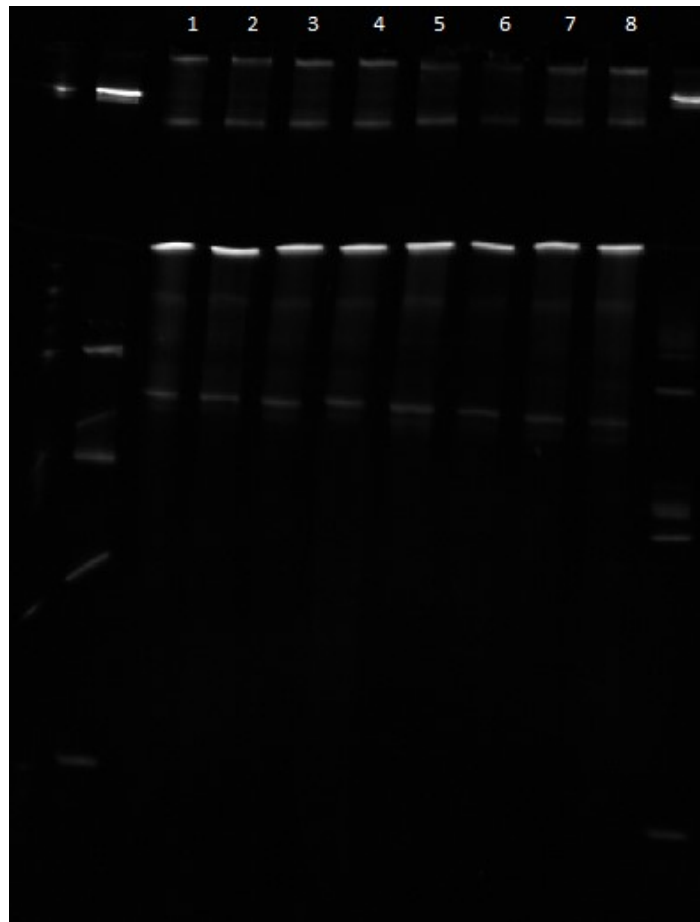
1 – negativní kontrola, 2 – dubnový vzorek 1, 3 – dubnový vzorek 2, 4 – dubnový vzorek (modifikace č. 1), 5 – dubnový vzorek (modifikace č. 2), 6 – dubnový vzorek (modifikace č. 3), 7 – dubnový vzorek (modifikace č. 2), 8 – dubnový vzorek (modifikace č. 3), 9 – dubnový vzorek 3

7.3 DGGE

Pro stanovení mikrobiální diverzity testovaných masných výrobků byla zvolena metoda elektroforézy v gradientovém denaturačním gelu (DGGE). Pro účely této práce byly testovány dva gradienty denaturačních činidel, konkrétně 40 % a 60 % a gradienty 30 % a 70 %. Jako výchozí produkt byl použit PCR produkt s použitými primery 341FGC a 907R.

Jako první bylo provedeno otestování gradientu koncentrace denaturačních činidel 40 % a 60 %. Testování prokázalo, že pro stanovení mikrobiální diverzity takto složité komplexní matrice, kterou právě fermentované masné výrobky a potraviny celkově jsou, je tento koncentrační gradient denaturačních činidel nevhodný. Na obrázku č. 8 je možné vidět účin-

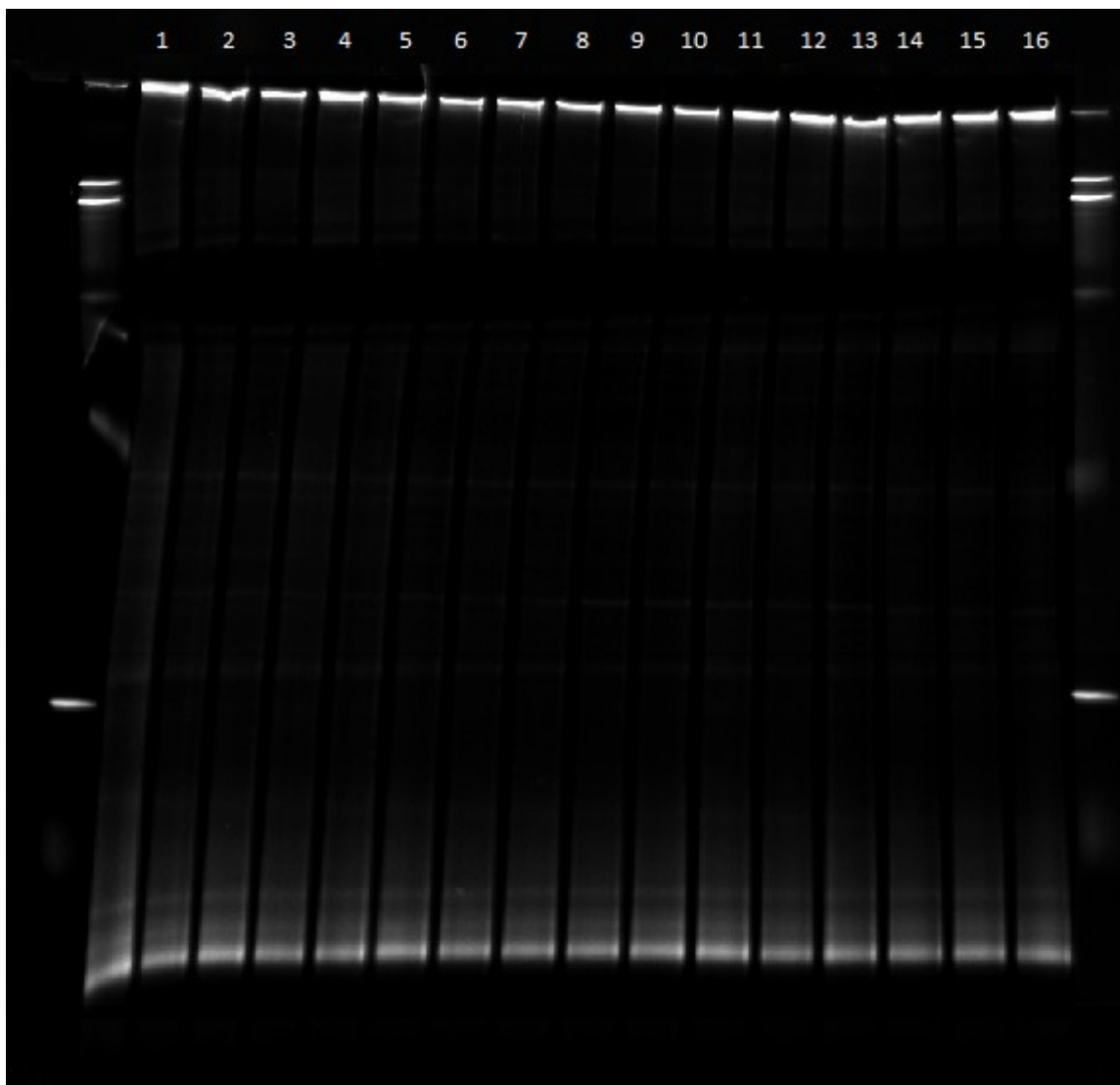
nost separace na fotografii obarveného a prosvíceného gelu. Metoda byla opakována, ovšem bez jakýchkoliv známek zlepšení.



Obrázek 8: DGGE, gradient 40/60 %

1 – únorový vzorek 1, 2 – únorový vzorek 2, 3- únorový vzorek (modifikace č. 1), 4 – únorový vzorek (modifikace č. 2), 5 – únorový vzorek (modifikace č. 3), 6 – únorový vzorek (modifikace č. 2), 7 – únorový vzorek (modifikace č. 3), 8 – únorový vzorek 3

Testování druhého gradientu (30 % a 70 %) denaturačních činidel přineslo oproti původně stanovenému gradientu lepší výsledek. Na obrázku č. 9, je možné vidět výrazně větší množství přítomných mikroorganismů.



Obrázek 9: DGGE, gradient 30/70 %

1 – únorový vzorek 1, 2 – únorový vzorek 2, 3- únorový vzorek (modifikace č. 1), 4 – únorový vzorek (modifikace č. 2), 5 – únorový vzorek (modifikace č. 3), 6 – únorový vzorek (modifikace č. 2), 7 – únorový vzorek (modifikace č. 3), 8 – únorový vzorek 3, 9 – dubnový vzorek 1, 10 – dubnový vzorek 2, 11 – dubnový vzorek (modifikace č. 1), 12 – dubnový vzorek (modifikace č. 2), 13 – dubnový vzorek (modifikace č. 3), 14 – dubnový vzorek (modifikace č. 2), 15 – dubnový vzorek (modifikace č. 3), 16 – dubnový vzorek 3

Navzdory tomu, že použití jiného gradientu denaturačních činidel přineslo lepší výsledky, zásadní problém při stanovení pomocí metody DGGE představovala intenzita jednotlivých bandů na gelu po prosvícení zdrojem UV záření. Základním předpokladem pro nízkou intenzitu bandů bylo pravděpodobně použití nedostatečného objemu vzorku. Další možností odstranění tohoto problému může být použití jiného postupu barvení gelu. Mimo již zmí-

něné barvičky GelStar se k barvení dá použít například ethidiumbromid, který ovšem oproti novějším typům barviček má nejen nižší rozpoznávací schopnost, ale také je značně toxičtější [31]. Další možností je barvení pomocí stříbra. Tato technika barvení má oproti použití ethidiumbromidu větší citlivost, nižší toxicitu a také redukuje cenu testování z důvodu snížení potřebného objemu PCR produktu. Ovšem největší výhodou barvení pomocí stříbra je vyšší odolnost signálu vůči degradaci. [31] [32].

Další problém představovalo zachycení velkého množství PCR produktu v jamkách, jak lze například vidět na obrázku č. 9. Jako důvod lze uvést nedostatečné pročištění jednotlivých jamek před aplikací produktu. [33] To je ovšem velice nepravděpodobné, jelikož promývání jamek před aplikací produktu byla věnována zvýšená pozornost a jednotlivé jamky byly několikrát promývány. Další možností odstranění tohoto problému je snížení koncentrace polyakrylamidového gelu. [33] Jako další možnost odstranění tohoto problému je možné snížení elektrického proudu a zvýšení doby po kterou bude metoda probíhat [33].

Sledování mikrobiální diverzity fermentovaných masných výrobků je důležité z několika hledisek. Například pro stanovení mikroorganismů způsobujících alimentární onemocnění. Law a kol. [34] se zabývá touto problematikou. Ke stanovení mikroflóry byly ve vědecké práci využity techniky PCR, multiplex PCR, real-time PCR, NASBA (nucleic acid sequence-based amplification) a LAMP (loop-mediated isothermal amplification) a pro stanovení jednotlivých patogenních mikroorganismů metoda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) [34].

Mezi další důležité aspekty studia mikrobiální diverzity fermentovaných masných výrobků je sledování produkce biogenních aminů. Fermentované masné výrobky, společně s ostatními fermentovanými potravinami, představují skupinu potravin s možným vysokým výskytem biogenních aminů. Podle Latorre-Moratally a kol. [35] je ve fermentovaných masných výrobcích v největším množství zastoupen tyramin, který vzniká činností bakterií mléčného kvašení a ve výjimečných případech i činností kataláza pozitivních koků [35]. Galgano a kol. [36]. upozorňují na fakt, že přidávkem cukru do fermentovaných masných výrobků může být zapříčiněn vznik biogenních aminů fermentačními procesy bakterií mléčného kvašení [36]. Ve vysokých hladinách představují biogenní aminy zdravotní riziko pro konzumenty fermentovaných masných výrobků, je tedy důležité sledovat jejich výskyt.

Dalším předmětem studia mikrobiální diverzity pro fermentované masné výrobky je obeznámení se s fermentačním procesem a dynamikou růstu bakterií mléčného kvašení a kataláza pozitivních koků. Pro tuto problematiku bylo v posledních letech vypracováno mnoho vědeckých prací, zejména zaměřujících se na dynamiku růstu mikroorganismů. Fonseca a kol. [37] ve své práci rozebírají dynamiku růstu mikroorganismů během sušení španělských fermentovaných masných výrobků. Ke studiu mikrobiální diverzity byly v této studii použity kultivační metody a metody molekulární biologie, přičemž nejvíce vypovídající výsledky byly dosaženy při použití real-time PCR [37]. Wanangkarh a kol. [38] se zaměřili na studium dynamiky růstu mikroorganismů během sušení u thajských fermentovaných masných výrobků. Ke stanovení mikroflóry využili analýzy polymorfismu délky restričních fragmentů (RFLP) [38]. Pro studium mikroflóry fermentovaných masných výrobků pomocí analýzy RFLP byla vypracována řada studií, např.– Chenoll a kol. [39], Christensen a kol. [40].

Sledování mikrobiální diverzity fermentovaných masných výrobků je bezesporu velice důležité, a to jak z pohledu zdraví konzumentů, zejména možný záchyt mikroorganismů způsobujících alimentární onemocnění, tak i studium běžně vyskytující se mikroflóry (BMK, CPK) v důsledku produkce biogenních aminů. Nesmí se také zapomenout na studium dynamiky růstu přítomné mikroflóry během technologických procesů výroby.

ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zaměřena na optimalizaci metody izolace DNA z fermentovaného masného výrobku Paprikáš a na kontrolu jejího množství a čistoty.

Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že:

- fermentované masné výrobky představují složitou matici pro izolaci DNA,
- ze vzorků z únorových odběrů byla izolována DNA s vyššími hodnotami množství,
- metody modifikace výrazně ovlivnily množství izolované DNA,
- hodnoty čistoty izolovaných DNA ze vzorků salámů byly v menší míře ovlivněny testovanými modifikacemi, metodou DGGE byla stanovena mikrobiální diverzita FMV Paprikáš a tím i ověřena kvalita a vhodnost použití izolované DNA pro metodu DGGE.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] INGR, I.: *Produkce a zpracování masa*. vyd. 2., nezměn. V Brně: Mendelova univerzita, **2011**, 202. ISBN 978-80-7375-510-2.
- [2] Ministerstvo zemědělství České republiky. Vyhláška č. 69/2016 ze dne 17. února 2016 o požadavcích na maso, masné výrobky, produkty rybolovu a akvakultury a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich. *Sbírka zákonů ČR*, 2016.
- [3] PIPEK, P.: *Technologie masa II*. vyd. 1., Karmelitánské nakladatelství Praha, **1998**, 360. ISBN 80-7192-283-8.
- [4] STEINHAUSER, L. a kol.: *Hygiena a technologie masa*. vyd. 1., LAST, **1995**, 643. ISBN 80-900260-4-4.
- [5] KADLEC, P. a kol.: *Technologie potravin: Co byste měli vědět o výrobě potravin*. vyd. 1, KEY Publishing, **2012**, 588. ISBN 978-80-7418-145-0.
- [6] KAMENÍK, J.: *Hygiena a technologie masa – trvanlivé masné výrobky*. vyd. 1, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, **2012**, 117. ISBN 978-80-7305-608-7.
- [7] BAMFORTH, Ch. W., WARD, R. E.: *The Oxford Handbook of Food Fermentations*. Oxford University Press, **2014**, 805. ISBN 978-0-19-974270-7.
- [8] HUI, Y. H at al.: *Handbook of Meat and Meat Processing*. vyd. 2, CRC Press, **2012**, 943. ISBN 978-1-4398-3683-5.
- [9] MARIANSKI, Stanley; MARIANSKI, Adam. *The Art of Making Fermented Sausages*. 2nd ed. Bookmagic LLC, **2009**, 276. ISBN 978-0-9824267-1-5.
- [10] HUTKINS, R. W.: *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. 2nd ed. Blackwell Publishing Professional, **2006**, 473. ISBN 978-0813800189.
- [11] RAY, R. C., MONTET, D.: *Microorganisms and Fermentation of Traditional Foods*. CRC Press, **2014**, 390. ISBN 978-1-4822-2308-8.
- [12] RANKEN, M. D.: *Handbook of Meat Product Technology*. Blackwell Science, **2000**, 246. ISBN 0-632-05377-1.
- [13] CAMPBELL-PLATT, G.: *Food Science and Technology*. Blackwell Publishing Ltd., **2009**, 520. ISBN 978-0-632-06421-2.
- [14] CLARK, D. P., PAZDERNIK, N. J.: *Molecular Biology*. 2nd ed. Academic Press, **2013**, 907. ISBN 978-0-12-378594-7.

- [15] ŠMARDA, J. a kol.: *Metody molekulární biologie*. vyd. 1, Masarykova univerzita, **2005**, 188. ISBN 978-80-210-3841-7.
- [16] KING, R. C.: *A Dictionary of Genetics, 7th Edition*, Oxford University Press, **2006**, 596. ISBN 0-19-530762-3.
- [17] LAW, J., AB MUTALIB, N., CHAN, K., LEE, L.: *Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations*, **2015**, 5, 770, DOI: 10.3389/fmicb.2014.00770, ISSN: 1664-302x.
- [18] STEPHENSON, F. H.: PCR Optimization Student Guide Fall 2012: Optimizing the Polymerase Chain Reaction. In: *Applied Biosystems: BABEC* [online]. [cit. 2016-05-12]. Dostupné z:
http://www.babec.org/files/PCR_2012/PCR_Optimization_Student_Guide_2012.pdf
- [19] MALÝ, J.: *Molekulární a buněčná biologie*. Univerzita Jana Evangelisty Purkyně, **2006**, 65. Dostupné z:
http://biology.ujep.cz/vyuka/file.php/1/opory/Molekularni_a_bunecna_biologie.pdf
- [20] MUYZER, G.: DGGE/TGGE a Method for Identifying Genome from Natural Ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*. **1999**, 2(3), 317-322. ISSN 1369-5274.
- [21] FAKRUDDIN, M.: Methods for Analyzing Diversity of Microbial Communities in Natural Environments. *Ceylon Journal of Science*, **2013**, 42, 1, 19-33, ISSN: 0069-2379.
- [22] KOCHERGINSKAYA, S. A., CANN, I, MACKIE R. I.: Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants, **2005**, 119-128, ISBN: 978-1-4020-3790-0.
- [23] SEVIOUR, R., NIELSEN, P. H.: Microbial Ecology of Activated Sludge. *IWA Publishing*. **2010**, 9, DOI: 10.2166/9781780401645. ISBN 978-1-8433-9032-9.
- [24] MUYZER, Gerard; DE WAAL, Ellen C.; UITTERLINDEN, Andre G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **1993**, 59(3), 695-700 ISSN 0099-5336.
- [25] LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, **1991**, 115-175.
- [26] WEISBURG, William G., et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, **1991**, 173. 2: 697-703.

- [27] GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Molecular cloning: a laboratory manual, vol 1, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. **2012**.
- [28] OSWALD, Nick. The Basics: How Alkaline Lysis Works. In: *Bitesize Bio* [online]. Science Squared LTD Solutions, Inc., **2014**. [cit. 2_4_2016]. Dostupné z: <http://bitesizebio.com/180/the-basics-how-alkaline-lysis-works/>
- [29] WILFINGER W. W., MACKEY, K., CHOMCZYNSKI, P.: Effect of pH and Ionic Strength of the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *Bio-techniques*. **1997**, 22, 3, 474-480. ISSN 0736-6205.
- [30] ANONYM. Gel Electrophoresis of PCR Products. In: *National Diagnostics* [online]. National Diagnostics Inc., **2011**. [cit. 2_4_2016]. Dostupné z: <https://www.nationaldiagnostics.com/electrophoresis/article/gel-electrophoresis-pcr-products>
- [31] GREEN, S., J. Don't panic: a guide to denaturing gradient gel electrophoresis. **2005**. 32.
- [32] RADAJKOVIC, D., KUŠIC, J.: Silver Staining of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Gels. *Clinical chemistry*, **2000**, 46, 6, 883-884. ISSN 0009-9147.
- [33] GRADZIEL, J.: DGGE - Why DNA remains in wells? [příspěvek v diskuzním fóru]. In: *Research Gate* [online]. 11.5.2016, [cit. 11_5_2016]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/post/DGGE-Why_DNA_remains_in_wells
- [34] LAW, J. W. at al.: Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*, **2015**, DOI: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.00223/full>. ISSN 1664-302X
- [35] LATORRE-MORATALLA, M. L. at al.: Control of biogenic amines in fermented sausages: role of starter cultures. *Frontiers in Microbiology*, **2012**, DOI: 10.3389/fmicb.2012.00169. ISSN 1664-302X.
- [36] GALGANO, F. at al.: Focused Review: Agmatine in fermented foods. *Frontiers of Microbiology*. **2012**, DOI: 10.3389/fmicb.2012.00199. ISSN 1664-302X
- [37] FONSECA, S. at al.: Monitoring the bacterial population dynamics during the ripening of Galician chorizo, a traditional dry fermented Spanish sausage. *Food Microbiology*, **2013**, 33, 77-84. ISSN 0740-0020.

- [38] WANANGKARN, A. at al.: Lactic acid bacterial population during fermentation and storage of Thai sausage according to restriction fragment length polymorphism analysis. *International Journal of Food Microbiology*, **2014**, 186, 61-67, ISSN 0168-1605.
- [39] CHENOLL, E. at al.: Identification of *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus* by rDNA-based techniques. *Systematic and Applied Microbiology*, **2003**, 26, 546-556. ISSN 0723-2020.
- [40] CHRISTENSEN, J. E. at al.: Rapid molecular diagnosis of *Lactobacillus bacteremia* by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *Clinical Medicine & Research*. **2004**, 2, 37-45. ISSN 1554-6179.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|-------|--|
| A | adenin. |
| APS | amoniumpersulfát (persíran amonný) |
| BMK | bakterie mléčného kvašení |
| bp | base pairs (páry bázi) |
| DGGE | denaturing gradient gel electrophoresis (denaturační gradientová gelová elektroforéza) |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| dNTP | deoxyribonukleotid |
| EDTA | ethylenediaminetetraacetic acid (etylendiamintetraoctová kyselina) |
| FMV | fermentovaný masný výrobek |
| PBS | phosphate buffered saline (fosfátový pufr) |
| RNA | ribonukleová kyselina |
| rRNA | ribozomální ribonukleová kyselina |
| SDS | sodium dodecyl sulfate (dodecylsírán sodný) |
| TAE | tris-acetát-EDTA |
| TEMED | N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (N,N,N',N'-tetrametyletyldiamin) |
| TGGE | temperature gradient gel electrophoresis (gelová elektroforéza s teplotním gradientem) |
| UV | ultraviolet (ultrafialové) |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| <i>Obrázek 1: Koncentrace a čistota izolované DNA</i> | 45 |
| <i>Obrázek 2: Koncentrace a čistota izolované DNA</i> | 45 |
| <i>Obrázek 3: Koncentrace a čistota izolované DNA</i> | 46 |
| <i>Obrázek 4: PCR 1. stupeň, 1500 bp</i> | 47 |
| <i>Obrázek 5: PCR 1. stupeň, 1500 bp</i> | 47 |
| <i>Obrázek 6: PCR 2. stupeň, 560 bp</i> | 48 |
| <i>Obrázek 7: PCR 2. stupeň, 560 bp</i> | 48 |
| <i>Obrázek 8: DGGE, gradient 40/60 %</i> | 49 |
| <i>Obrázek 9: DGGE, gradient 30/70 %</i> | 50 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|---|----|
| Tabulka 1: Použité primery..... | 29 |
| Tabulka 2: Složení reakční směsi pro 1. stupeň amplifikace pomocí PCR | 34 |
| Tabulka 3: Složení roztoku gelu s gradientem 40 % a 60 % | 40 |
| Tabulka 4: Složení roztoku gelu s gradientem 30 % a 70 % | 40 |