

# Využití Ramanovy spektroskopie pro detekci a identifikaci mikroorganismů v potravinách

Veronika Smetanová

---

Bakalářská práce  
2018



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie potravin  
akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Veronika Smetanová**  
Osobní číslo: **T15180**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Využití Ramanovy spektroskopie pro detekci a identifikaci mikroorganismů v potravinách**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Princip metody Ramanovy spektroskopie
2. Využití metody pro detekci mikroorganismů se zaměřením na potraviny
3. Možnost použití metody pro identifikaci mikroorganismů
4. Zhodnocení výhod a nevýhod použití metody

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- [1] YANG, Danting a Yibin YING. Applications of Raman Spectroscopy in Agricultural Products and Food Analysis: A Review. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2011, 46(7), 539–560. DOI: 10.1080/05704928.2011.593216. ISSN 0570-4928.
- [2] STÖCKEL, Stephan, Johanna KIRCHHOFF, Ute NEUGEBAUER, Petra RÖSCH a Jürgen POPP. The application of Raman spectroscopy for the detection and identification of microorganisms. *Journal of Raman Spectroscopy*. 2016, 47(1), 89–109. DOI: 10.1002/jrs.4844. ISSN 03770486.
- [3] HE, Hong-Ju a Da-Wen SUN. Microbial evaluation of raw and processed food products by Visible/Infrared, Raman and Fluorescence spectroscopy. *Trends in Food Science & Technology*. 2015, 46(2), 199–210. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.10.004. ISSN 09242244.
- [4] MEHDIZADEH, Hamidreza, David LAURI, Krizia M. KARRY, Mojgan MOSHGBAR, Renee PROCOPIO-MELINO a Denis DRAPEAU. Generic Raman-based calibration models enabling real-time monitoring of cell culture bioreactors. *Biotechnology Progress*. 2015, 31(4), 1004–1013. DOI: 10.1002/btpr.2079. ISSN 87567938.
- [5] ZHENG, Jinkai a Lili HE. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for the Chemical Analysis of Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2014, 13(3), 317–328 [cit. 2018-01-01]. DOI: 10.1111/1541-4337.12062. ISSN 15414337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12062>.

Vedoucí bakalářské práce:

**Mgr. Martina Bučková, Ph.D.**

Ústav technologie potravin

Datum zadání bakalářské práce:

**2. února 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**3. května 2018**

Ve Zlíně dne 2. února 2018



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



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

Příjmení a jméno: Smetanová Veronika

Obor: Chemie a technologie potravin

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby <sup>1)</sup>;
- 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 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> 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 <sup>3)</sup> 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 7.5.2018

  
.....

<sup>1)</sup> 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.

<sup>2)</sup> 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).

<sup>3)</sup> 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). Odírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

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

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

## **ABSTRAKT**

Bakalářská práce se zabývá Ramanovou spektroskopií a jejím využitím pro detekci a identifikaci mikroorganismů v potravinách. V práci je stručně charakterizován princip Ramanova jevu a popis povrchově zesílené Ramanovy spektroskopie (SERS), která je využívána pro detekci mikroorganismů v potravinářských matricích. Pro tyto účely je metoda SERS často kombinována s imunomagnetickou separací analyzovaných buněk, což má za následek vysokou citlivost metody a také výrazné zkrácení analýzy. Pro vzájemné rozlišení mikroorganismů jsou Ramanova spektra vyhodnocena s použitím chemometrických metod. Závěrem jsou v práci shrnuty výhody a nevýhody spojené s použitím Ramanovy spektroskopie.

**Klíčová slova:** Ramanova spektroskopie, povrchově zesílená Ramanova spektroskopie, detekce mikroorganismů v potravinách, identifikace mikroorganismů, chemometrické metody

## **ABSTRACT**

Bachelor thesis deals with Raman spectroscopy and her application for detection and identification of microorganisms in foodstuffs. There is briefly characterized principle of Raman scattering and description of Surface-enhanced Raman spectroscopy, which is able to detect microorganisms in food matrix. For these purposes SERS method is often combined with immunomagnetic separation of analyzed cells, which cause high sensitivity and significant shortening of analysis. For distinction of microorganisms are Raman spectrum evaluated using chemometric methods. In conclusion there are summarized advantages and disadvantages of Raman spectroscopy.

**Keywords:** Raman spectroscopy, Surface-enhanced Raman spectroscopy, Detection of microorganisms in foodstuffs, Identification of microorganisms, Chemometric methods

Na tomto místě bych v první řadě chtěla poděkovat Mgr. Martině Bučkové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícný přístup a cenné rady při vypracovávání mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině za podporu ve studiu.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>9</b>
<b>1 CHARAKTERISTIKA RAMANOVY SPEKTROSKOPIE</b> .....	<b>10</b>
1.1 VZNIK METODY .....	10
1.2 POPIS RAMANOVY SPEKTROSKOPIE .....	11
1.3 VIBRAČNÍ SPEKTRA MOLEKUL .....	12
1.3.1 Vibrace dvouatomových molekul .....	12
1.3.2 Vibrace víceatomových molekul.....	13
1.4 RAMANŮV ROZPTYL .....	13
1.5 REZONANČNÍ RAMANOVA SPEKTROSKOPIE (RRS).....	14
1.6 POVRCHOVĚ ZESÍLENÁ RAMANOVA SPEKTROSKOPIE (SERS).....	14
<b>2 VYUŽITÍ METODY PRO DETEKCI MIKROORGANIZMŮ V POTRAVINÁCH</b> .....	<b>16</b>
2.1 DETEKCE JEDNOTLIVÝCH MIKROORGANIZMŮ .....	18
2.1.1 Detekce <i>E. coli</i> v mase .....	20
2.1.2 Detekce <i>E. coli</i> v jablečné šťávě .....	21
2.1.3 Detekce <i>Listeria monocytogenes</i> v mléce .....	22
2.1.4 Detekce <i>Salmonella enterica</i> pomocí 3-MBPA testu .....	23
2.1.5 Detekce vinných kvasinek.....	24
2.2 DETEKCE MIKROORGANIZMŮ PŘENOSNÝM ZAŘÍZENÍM.....	25
<b>3 IDENTIFIKACE MIKROORGANIZMŮ S POUŽITÍM RAMANOVY SPEKTROSKOPIE</b> .....	<b>26</b>
3.1 METODA HLAVNÍCH KOMPONENT (PCA) .....	28
3.2 SHLUKOVÁ ANALÝZA .....	29
3.3 METODA NEJMENŠÍCH ČTVERCŮ (PLS) .....	30
3.3.1 Metoda nejmenších čtverců – diskriminační analýzy (PLS-DA) .....	32
<b>4 VÝHODY A NEVÝHODY RAMANOVY SPEKTROSKOPIE</b> .....	<b>34</b>
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>35</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>36</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>41</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>42</b>
<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>44</b>



## ÚVOD

Rychlá detekce a identifikace mikroorganismů hraje důležitou roli v potravinářském průmyslu a má vliv na kvalitu potravin. Přítomnost patogenních mikroorganismů v potravinách je jedním z hlavních problémů při zajišťování bezpečnosti potravin. Patogenní mikroorganismy jsou zodpovědné za rychlé zkažení potravin a konzumace kontaminovaných potravin způsobuje různá onemocnění. Jejich rychlá detekce a identifikace je proto velmi důležitá. Rychlá detekce a identifikace mikroorganismů může také zajistit správný průběh fermentace a zabránit jejím poruchám během technologického procesu.

Konvenční metody založené na biochemických a imunologických testech, které jsou v současnosti nejvíce využívány pro identifikaci bakterií, jsou časově náročné a spotřebuje se u nich velké množství chemikálií. V posledních letech byl zaznamenán velký pokrok ve vývoji vibrační spektroskopie, kam spadá infračervená a Ramanova spektroskopie. Pro detekci a identifikaci mikroorganismů se využívá povrchově zesílená Ramanova spektroskopie (SERS), která je rychlá, nedestruktivní, nepotřebuje žádnou nebo pouze minimální přípravu vzorku a dokáže detekovat bakterie ve velmi nízkých koncentracích.

Cílem této práce bylo popsat možnosti využití Ramanovy spektroskopie pro detekci a identifikaci mikroorganismů v potravinách a shrnout přínosy a případná negativa metody pro potravinářské aplikace.

# 1 CHARAKTERISTIKA RAMANOVY SPEKTROSKOPIE

## 1.1 Vznik metody

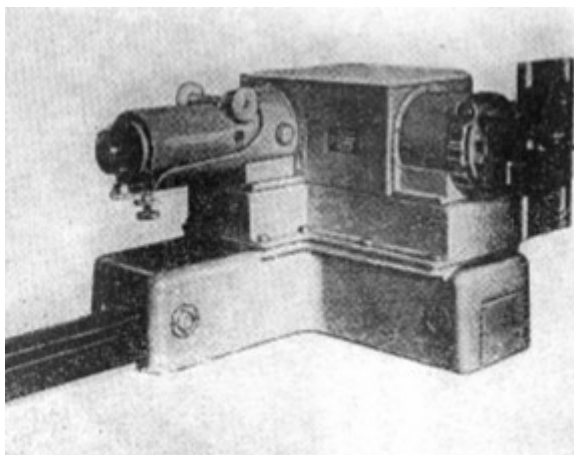
Ramanova spektroskopie je metodou vibrační molekulové spektroskopie, která je vhodná pro identifikaci látek a určování jejich struktury. Ramanova spektroskopie má v současnosti velmi široké uplatnění od mineralogie a geochemie, přes chemický a farmaceutický průmysl až po biologii a lékařství. [1]

Ramanův jev je pojmenován po jeho objeviteli indickém fyzikovi Chandrasekhara Venkata Ramanovi, který je zobrazen na obr. 1. Společně s profesorem K. S. Krišnanem popsali v roce 1928 jev neelastického optického rozptylu, který je základem metody. Za tenhle objev získal C. V. Raman v roce 1930 Nobelovu cenu. [1, 2]



*Obr. 1: C. V. Raman [2]*

U nás jsou první zmínky měření datovány kolem roku 1960, kdy se na katedře anorganické chemie na Ústavu organické chemie a biochemie ČSAV začal metodou detailněji zabývat Bohuslav Strauch. K měření se používal tříhlavý skleněný spektrograf ISP 51 (obr. 2). Měření trvalo od několika minut až po desítky hodin podle typu zkoumaného vzorku. Ramanova spektra byla zaznamenávána na speciální fotografické desky. Teprve až o pár let později bylo možné měřit na laserovém Ramanově spektroskopu. [3]



Obr. 2: Tříhranolový skleněný spektrograf ISF 51 [3]

Díky tomu, že se v současnosti přístrojová technika rychlým tempem rozvíjí a modernizuje, dochází k minimalizaci doby měření a vyhodnocování spekter je usnadněno použitím odpovídajícího softwaru.

## 1.2 Popis Ramanovy spektroskopie

Metoda Ramanovy spektroskopie je typem vibrační spektroskopie. Informace o vibracích vazeb v molekule jsou nejčastěji získávány právě z Ramanových nebo infračervených spekter. Ramanova spektra podobně jako infračervená spektra jsou rotačně-vibračními spektry molekul, liší se mechanismem vzniku a tím, že se měří ve viditelné oblasti spektra. Ramanova spektroskopie zkoumá neelastický rozptyl fotonů ultrafialového (o vlnočtu  $25\,000 - 40\,000\text{ cm}^{-1}$ ) a viditelného (vlnočty  $14\,300 - 5\,000\text{ cm}^{-1}$ ) záření, vyvolaného excitací světelného paprsku. Rozdílem mezi energií dopadajícího a rozptýleného fotonu je vždy některý z vibračních energetických přechodů v molekule. Tenhle jev lze matematicky popsat následovně:

$$\Delta E = h(v_0 - v_r), \quad (1)$$

kdy  $hv_0$  vyjadřuje energii dopadajícího fotonu a  $hv_r$  energii rozptýleného fotonu.

Tyto energetické přechody jsou nazývány jako Ramanova spektra a jsou specifická pro jednotlivé látky. Pro měření těchto energetických přechodů se využívají disperzní spektrometry nebo spektrometry s Fourierovou transformací.

V Ramanově spektroskopii se využívá pásů nazvaných jako „otisky prstů“ (*fingerprints*), které se nachází v oblasti vlnočtu  $1500-400\text{ cm}^{-1}$ . Tak jako na světě

nenajdeme dva jedince, kteří by měli stejné otisky prstů, tak prozatím nebyla objevena látka, která by byla chemicky totožná s jinou.

Ramanova spektra ve srovnání s infračervenými spektry bývají jednodušší a přehlednější. Ramanova spektroskopie se uplatňuje při analýzách životního prostředí nebo pro kvalitativní analýzu. Samotné měření je poměrně rychlé a nedestruktivní. Měření obvykle nevyžaduje úpravu vzorku. [1, 4, 5]

### 1.3 Vibrační spektra molekul

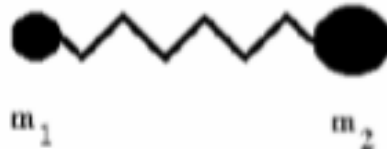
Ramanova a infračervená spektra udávají informace o vibračních a rotačních pohybech molekul. Frekvence normálních vibračních modů závisí na základních parametrech popisujících strukturu molekuly, jako je hmotnost zúčastněných atomů a síla vazeb mezi nimi. Vibrační frekvence molekul jsou nezávislé na tom, zda je studujeme infračervenou nebo Ramanovou spektroskopií. Pro obě spektroskopické metody budou intenzity spektrálních linií odlišné. V Ramanově spektru je intenzita pásů úměrná druhé mocnině změny polarizovatelnosti během vibračního pohybu, zatímco v infračerveném spektru je úměrná druhé mocnině změny dipólového momentu. V infračervených spektrech jsou intenzivní pásy pro vibrace s výraznou změnou dipólového momentu, jako jsou vibrace polárních skupin (např. -OH, -C=O, -NO<sub>2</sub>). V Ramanových spektrech jsou intenzivní pásy pro symetrické vibrace a vibrace ve fázi, obzvláště intenzivní jsou vibrace vícenásobných symetrických vazeb (např. -C≡C-, -C=C-, -N=N-).

Pomocí Ramanovy spektroskopie lze úspěšně identifikovat technicky významné prvkové materiály, např. uhlíkové nebo křemíkové materiály. Dále je možné identifikovat anorganické materiály obsahující těžké prvky. Ramanova spektroskopie umožňuje sledovat symetrické valenční S-S vibrace, které se uplatňují při studiu polypeptidů a proteinů. Komerčně jsou dostupné různě obsáhlé databáze Ramanových spekter, ale často je výhodné vytvářet jednoúčelové knihovny spekter se zpracováním vlastních měření. [1]

#### 1.3.1 Vibrace dvouatomových molekul

Vibraci dvouatomové molekuly si můžeme představit jakou klasický oscilátor, který je tvořen dvěma hmotnými body na pružině (Obr. 3). V molekule se jedná o periodickou změnu mezijaderné vzdálenosti. Frekvence vibrace molekuly je závislá na síle, kterou jsou

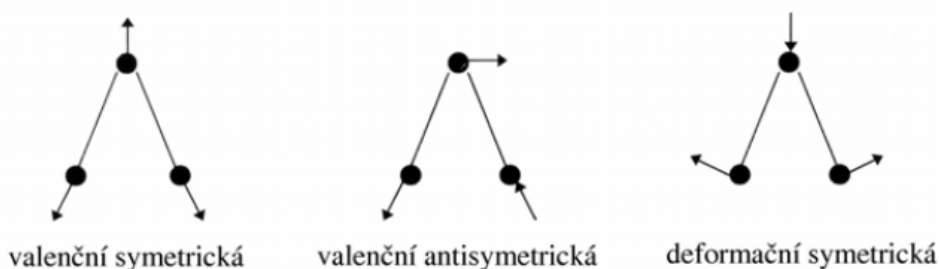
atomy mezi sebou poutány. Molekula dostává energii potřebnou k přechodu mezi energetickými hladinami ve formě elektromagnetického záření. [4]



Obr. 3: Dvouatomová molekula [4]

### 1.3.2 Vibrace víceatomových molekul

Víceatomovou molekulu lze podle mechanického modelu popsat jako soustavu hmotných bodů (atomů), vázaných silami chemických vazeb. Vibrace víceatomové molekuly je složitá forma kmitavého pohybu, kterou můžeme popsat jako součet jednoduchých harmonických pohybů, tzv. normálních vibrací. Při normální vibraci vibrují všechny atomy v molekule stejnou frekvencí a ve stejné fázi, ale s různými amplitudami. Na obrázku 4 jsou znázorněny možné způsoby vibrace atomů v molekule vody. [4]



Obr. 4: Příklad vibrace molekuly vody [4]

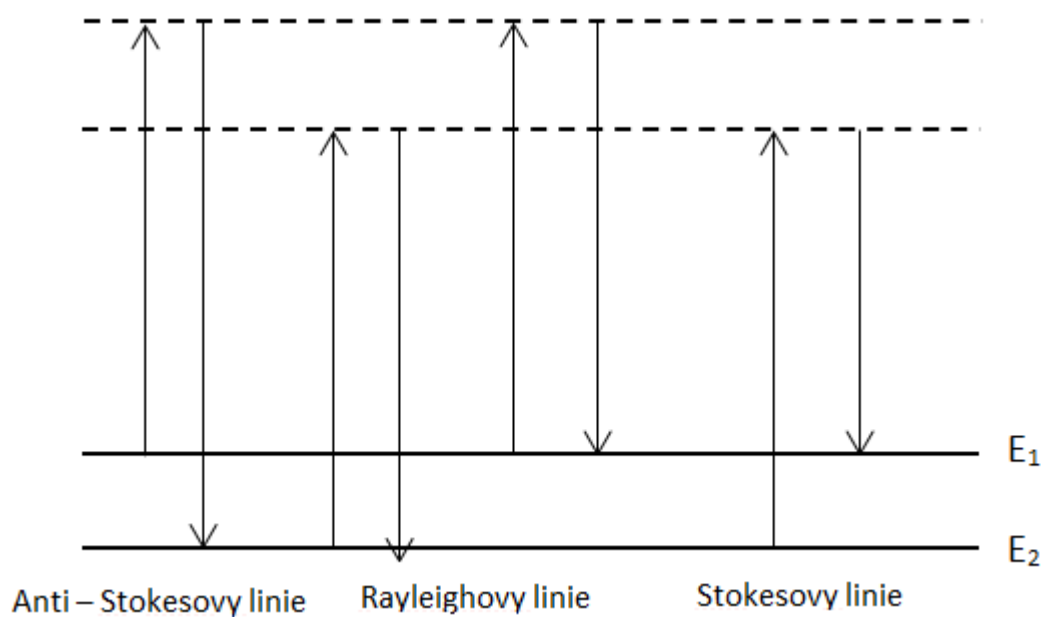
## 1.4 Ramanův rozptyl

Ramanův rozptyl je popsán jako neelastický rozptyl světla. Podstatou Ramanova rozptylu je zářivý dvoufotonový přechod mezi dvěma stacionárními vibračními stavy molekuly, jejichž energie jsou  $E_1$  a  $E_2$ , vyvolaný interakcí s fotonem dopadajícího záření o frekvenci  $\nu_0$ . Matematicky lze tenhle jev zapsat následovně:

$$\nu_0 = \frac{|E_1 - E_2|}{h}, \quad (2)$$

kde  $h$  je Planckova konstanta se současným vyzářením fotonu rozptýleného záření. Pokud se vrací molekula do původního stavu, vyzáří se určité kvantum energie a frekvence rozptýleného vlnění se nezmění, jedná se o Rayleighův rozptyl. [1, 6]

Přechody fotonů molekul posunuté k větším vlnovým délkám se nazývají Stokesovy přechody. Tyhle přechody jsou vyzařovány radiací. Anti-Stokesovy přechody jsou přechody, ve kterých je molekula de-excitována. Tyto přechody jsou posunuty k menším vlnovým délkám. Jelikož nejnižší vibrační úroveň je nejvíce energeticky příznivá, existuje vyšší frekvence výskytu a následně silnější intenzita signálu pro Ramanův rozptyl odpovídající Stokesovým přechodům (Obr. 5). [7]



Obr. 5: Schéma rozptylu světla v Ramanově spektroskopii [6]

## 1.5 Rezonanční Ramanova spektroskopie (RRS)

Pro zvýšení intenzity Ramanova signálu je používána tzv. Rezonanční Ramanova spektroskopie. Rezonanční Ramanův rozptyl nastane, pokud frekvence použitého excitačního laseru odpovídá frekvenci záření potřebného na přechod v molekule zkoumané látky do elektronového excitovaného stavu a rezonuje s ním. Intenzita Ramanových pásů, které procházejí z těchto částí molekul, kde nastal elektronový přechod, se může zesílit o 3-6 řádů. Tohle násobné zvýšení rezonančního Ramanova signálu umožňuje studovat a získávat spektra vzorků s velmi nízkou koncentrací a to až  $10^{-8}$  mol/l. [8]

## 1.6 Povrchově zesílená Ramanova spektroskopie (SERS)

Dalším často používaným způsobem zvýšení intenzity Ramanova rozptylu je tzv. povrchově zesílená Ramanova spektroskopie (SERS). Metoda SERS je atraktivním nástrojem pro snímání molekul ve stopových množstvích v oblasti chemické a

biochemické analýzy. SERS využívá optických vlastností kovů jako je Ag a Au. Metoda využívá interakcí elektromagnetických vln s kovovými nanočásticemi, které jsou mnohem menší než vlnová délka dopadajícího světla, způsobují přemístění elektronového oblaku směrem ke kladně nabitým atomovým jádrům a tím vyvolávají polarizaci uvnitř kovové částice. [9]

Byly navrženy dva mechanismy, které vysvětlují posílení Ramanových signálů za přítomnosti nanostruktur vzácných kovů a to elektromagnetické a chemické zesílení. Elektromagnetický rozptyl je pro SERS dominantní. Zabývá se indukovaným dipólem, který při Ramanově rozptylu vzniká působením elektromagnetického světelného pole na molekulu s polarizovatelností. Chemický rozptyl nastává, pokud jsou molekuly adsorbovány na zdrsňených plochách povrchu kovu, kde dochází k velkému zvýšení molekulové polarizace adsorbátu. [10]

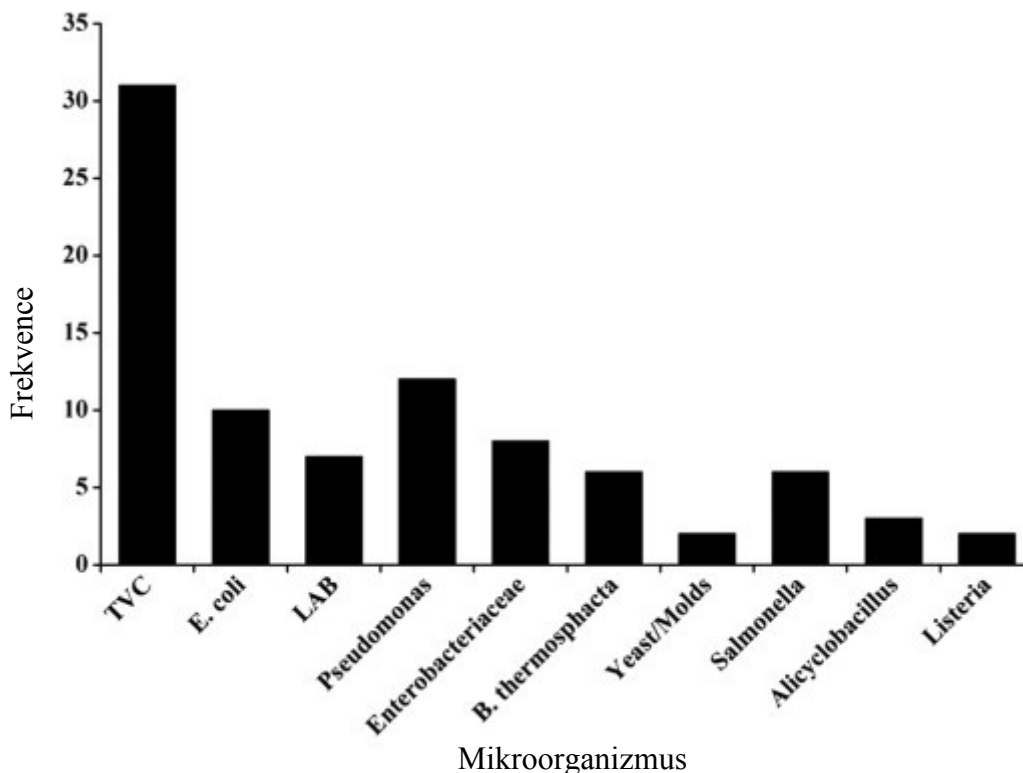
Metoda SERS se velmi často využívá pro studium biomolekul v řadě biologických disciplín. Od konce devadesátých let 20. století se technologie SERS uplatňuje také na potraviny, a to především kvůli potřebě rychlého a citlivého nástroje pro detekci kontaminantů potravin. Hlavními aplikacemi SERS v potravinářství jsou v současnosti detekce chemických a mikrobiálních rizik spíše, než analýza potravinových složek. Kromě chemického rozboru potravin je SERS vyvinuta také jako diagnostický nástroj pro potravinářské mikroorganismy. Patogenní látky izolované z potravinových vzorků lze identifikovat pomocí Ramanových spektrálních pásů *fingerprintu*. [10]

## 2 VYUŽITÍ METODY PRO DETEKCI MIKROORGANISMŮ V POTRAVINÁCH

Nejpoužívanějším způsobem pro detekci mikroorganismů je kultivační metoda. Kultivační metody, které se používají pro stanovení mikroorganismů v potravinách, jsou dobře zavedené, jednoduché a mohou být použity pro kvalitativní i kvantitativní analýzu. Nevýhodou kultivačních metod, hlavně při stanovení patogenních mikroorganismů, je nutnost kultivace v několika různých živných médiích a je zde zapotřebí provedení řady biochemických a sérologických testů, proto jsou kultivační metody poměrně pracné, mají subjektivní hodnocení výsledků a mají dlouhou dobu stanovení. Mezi další používané způsoby detekce mikroorganismů patří polymerázová řetězová reakce (PCR), plynová chromatografie (GC), vysokoúčinná plynová chromatografie (HPLC), enzymově vázaná imunosorpční zkouška (ELISA). Detekce mikroorganismů pomocí těchto metod je však poměrně časově náročné a spotřebuje se u nich velké množství chemikálií. Další používanou metodou je infračervená spektroskopie (NIR), ale není příliš vhodná pro stanovování vodných roztoků, kvůli nízkému spektrálnímu rozsahu. Naproti tomu Ramanova spektroskopie nabízí řadu výhod. Metoda Ramanovy spektroskopie je nedestruktivní, rychlá a je vhodná pro měření pevných i kapalných vzorků. [11, 12, 13]

V poslední době je věnována pozornost spektroskopickým technikám, které jsou využívány pro stanovení celé řady kvalitativních parametrů při kontrole bezpečnosti potravin, včetně mikrobiální kontaminace. Jedná se také o Ramanovu spektroskopii a fluorescenční spektroskopii. Nejčastěji sledovaným parametrem při použití spektroskopických technik pro mikrobiologickou kontrolu je TVC – celkový počet bakterií (Obr. 6). TVC je běžným a účinným indikátorem mikrobiálního znehodnocení a může zahrnovat bakterie, kvasinky a různé druhy plísní. Kromě toho výzkumy prokázaly zájem detekovat některé specifické bakterie, jako jsou *E. coli*, *Pseudomonas* a *Enterobacteriaceae*, které jsou nejvíce zodpovědné za mikrobiální kontaminaci potravinových produktů. [14]





Obr. 6: Frekvence použití spektroskopických metod pro hodnocení mikroorganismů v potravinářských produktech od roku 2002 do roku 2015 [14]

Kultivační metoda i metoda SERS jsou schopny detekovat bakterie. Způsob, jakým detekují bakterie je odlišný. Kultivační metoda detekuje bakterie na základě schopnosti bakterií růst ve specifickém prostředí. Kinetika růstu bakterií je rozdělena do čtyř základních životních cyklů: lag fáze, logaritmická fáze, stacionární fáze a fáze odumírání. Ve stacionární fázi dochází k vyrovnání růstu a odumírání bakterií. Naopak metoda SERS detekuje bakterie na základě vibrací molekul v buňce. Pro předběžnou detekci bakterií se využívá Ramanův mikroskop. Vzhledem k tomu, že obě metody detekují různé znaky bakterií, mohou existovat situace, kdy jsou pozorovány rozdíly ve výsledcích. [15]

Spektrální informace o mikroorganismech závisí na použitém substrátu a použité technice. Nejčastěji se bakterie mísí se stříbrem nebo se zlatými koloidy. Pomocí tohoto způsobu lze získat informace z povrchu buňky. Pokud je substrát pro SERS selektivně vytvořen uvnitř bakteriální buňky, získávají se další informace. [16]

Existuje několik faktorů, které mohou ovlivnit výsledná Ramanova spektra. Mezi tyto faktory patří doba kultivace bakterií, růstová teplota, použití typu kultivačního média a výběr vlnočtu. [17]

V tabulce 1 jsou uvedeny příklady detekce bakterií v různých potravinách.

Tab. 1: Příklad detekovaných mikroorganismů v potravinách Ramanovou spektroskopií [14]

Potravina	Mikroorganismus
Hovězí maso	<i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>E. coli</i>
Kuřecí maso	<i>Salmonella enterica</i> , <i>Pseudomonas</i>
Mléko	<i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>
Jablečná šťáva	<i>E. coli</i>
Špenát	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella enterica</i>
Sýr	<i>Listeria monocytogenes</i>

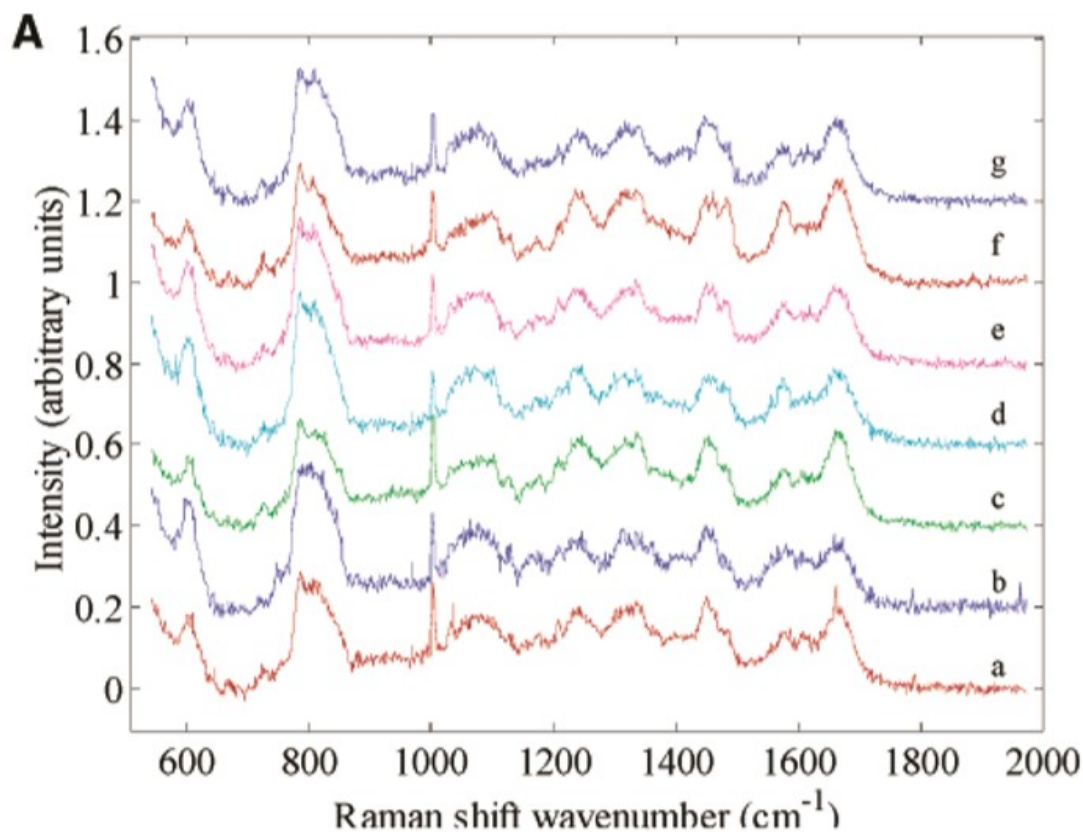
## 2.1 Detekce jednotlivých mikroorganismů

Pro příklad detekce mikroorganismů je uvedeno sedm druhů bakterií, které byly zkoumány ve studii podle Huang a kol.. Byly vybrány jak grampozitivní tak i gramnegativní bakterie. Jedná se o *Acinetobacter sp.*, *Agrobacterium sp.*, *Bacillus sp.*, *Chromobacterium violaceum*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Citrobacter sp.*. Druhy *Escherichia coli* a *Citrobacter sp.* byly ve studii zvoleny záměrně, protože spolu geneticky úzce souvisí a jsou obtížně identifikovatelné pomocí mnoha tradičních metod. [18]

Ve studii byly jednotlivé druhy bakterií před měřením kultivovány na agarrech a pro samotné měření byly použity tři kolonie každého druhu. Cílem studie bylo zároveň zjistit, jestli jsou získaná Ramanova spektra závislá na růstové fázi daných bakterií, proto u vybraných bakterií (*Acinetobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*) byla měřena spektra v různých časech, které korespondují s exponenciální a stacionární fází růstu daných bakterií. Buňky byly odebrány po 4, 8 a 22 hodinách kultivace.[18]

Měření jednotlivých buněk bylo provedeno pomocí Ramanova mikroskopu, kde bylo možné analyzovat buňky o velikosti 1  $\mu\text{m}$  a menší. Ramanův mikroskop pro získání Ramanových spekter byl vybaven laserem s excitační vlnovou délkou 532 nm. Měření probíhalo tak, že v mikroskopu byla nejprve zaostřena jedna bakteriální buňka a následně

byl na buňku zaměřen laserový paprsek, s jehož pomocí bylo získáno Ramanovo spektrum v rozsahu vlnových délek 1972 až 544  $\text{cm}^{-1}$ . Ramanova spektra jednotlivých bakterií jsou uvedena na obrázku 7. Identifikace jednotlivých spekter byla provedena statistickými metodami, které jsou podrobněji popsány v kapitole 3. [18]



Obr. 7: Ramanova spektra jednotlivých bakterií (a - *Acinetobacter sp.*, b - *Agrobacterium sp.*, c - *Bacillus sp.*, d - *Chromobacterium violaceum*, e - *Escherichia coli*, f - *Pseudomonas fluorescens*, g - *Citrobacter sp.*) [18]

Ačkoli jsou profily pro různé druhy bakterií obecně podobné, některé rozdíly ve výškách vrcholů jsou pozorovatelné i vizuálně. Ramanova spektra na obrázku 7 zobrazují tzv. oblasti otisku prstů jednotlivých mikroorganismů. [18]

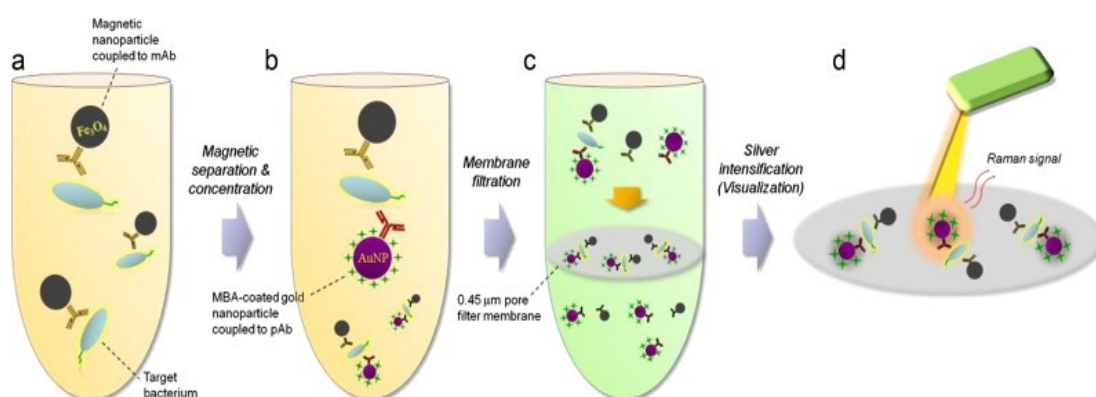
Pro běžný mikrobiologický rozbor vzorků je nutná nejprve kultivace k vytvoření dostatečné biomasy. V případě použití Ramanovy spektroskopie je možné měření provádět bez předběžné kultivace. [16]

Huang a kol. prokázali užitečnost Ramanovy mikroskopie jako nedestruktivní a neinvazivní spektroskopické techniky pro mikrobiální analýzu na úrovni jedné buňky. Tato technika může být užitečným nástrojem pro klasifikaci bakteriálních kultur bez nutnosti standardizace růstových podmínek. [18]

### 2.1.1 Detekce *E. coli* v mase

*E. coli* O157:H7 je jedním z klíčových potravinářských patogenů, které mohou způsobit těžké onemocnění jako je průjem a akutní selhání ledvin. Cho a kol. zkoumali potenciál metody SERS s využitím membránové filtrace a nanočástic stříbra, pro stanovení přítomnosti buněk *E. coli* v různých koncentracích u hovězího masa. [19]

Oddělení malých zbytkových částic masa od patogenů je obtížné, proto izolace bakterií ze vzorků masa je náročná. Cho a kol. izolovali *E. coli* ze vzorku mletého hovězího masa pomocí imunomagnetické separace (IMS). [16]



Obr. 8: Schéma membránové filtrace SERS [19]

Na obrázku 8 je uvedeno schéma membránové filtrace SERS pro rychlou detekci *E. coli* v mletém hovězím masu. Na obrázku 8a jsou cílové bakterie zachyceny magnetickými nanočásticemi ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) spojené specifickými monoklonálními protilátkami pro patogeny. Na obrázku 8b je znázorněna reakce nanočástic zlata s patogenem potaženým magnetickými nanočásticemi. Uvolnění reakčních složek, které jsou odstraněny odstředivou silou (centrifugací) je znázorněno na obrázku 8c. Na obrázku 8d jsou dané patogeny podrobeny Ramanově analýze. [19]

Před provedením Ramanovy analýzy bylo zapotřebí zachycené bakterie na membráně zviditelnit. Za tímhle účelem byl ve studii použit jednoduchý krok barvení. Během tohoto procesu hraje důležitou roli jako katalyzátor zlatý povrch, který přenáší elektrony z redukčních činidel na ionty stříbra, což vede k ukládání kovových nanočástic stříbra na nanočástice zlata. Průběhem katalytické reakce se zvyšuje velikost nanočástic zlata pokrytých stříbrem kolem povrchu bakterií, což má za následek zvyšování intenzity barev nanočástic, které lze vnímat za použití mikroskopu. Tohle ukládání nanočástic

stříbra vede ke zvýšení Ramanova signálu a proto můžou být dané bakterie podrobeny analýze SERS. [19]

Tímto způsobem bylo možné detekovat *E. coli* O157:H7 v hovězím mase v nízkých koncentracích (~ 10 CFU/ml). Je zcela možné, že tahle metoda je schopna detekovat *E. coli* i v koncentracích menší než 10 CFU/ml. Délka trvání analýzy zahrnovala imonomagnetickou separaci (20 min), reakce SERS (15 min), intenzifikaci signálu pomocí stříbra (10 min) a samotné měření SERS spektra (10min). [19]

### 2.1.2 Detekce *E. coli* v jablečné šťávě

V posledních dvou desetiletích došlo k několika epidemiím, které byly způsobeny bakterií *E. coli*, kterou byla kontaminovaná nepasterizovaná jablečná šťáva. Proto Najafi a kol. použili tepelně neošetřenou jablečnou šťávu jako modelovou potravinu pro detekci *E. coli* za použití nano-imunomagnetické separace (NIMS). Dalším důvodem pro použití jablečné šťávy bylo to, že jablečná šťáva má poměrně nízkou koncentraci sedimentujících nerozpustných částic. [20]

Najafi a kol. použili kombinaci imunomagnetické separace (IMS) s nanočásticemi zlata pro izolaci *E. coli* z jablečné šťávy. V potravinářských mikrobiologických aplikacích může imunomagnetická separace (IMS) využívající magnetických nanočástic (MNP) pro zachycení cílového analytu, potažení vzácným kovem a následnou detekcí založenou na metodě SERS významně snížit celkový čas testu, protože nevyžaduje pokovování zachycených bakteriálních buněk. Tahle kombinace byla nazvána jako nano-imunomagnetická separace (NIMS) [20, 16]

Ve studii přidali *E. coli* v různých koncentracích ( $10^1 - 10^7$  CFU/ml) ke vzorku pasterované jablečné šťávy společně s magnetickými nanočásticemi. Po důkladném přimíchání magnetických nanočástic ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), byla provedena NIMS separace. Poté byly vzorky podrobeny analýze SERS. [20]

Cílem studie bylo použití menších objemů reakčních činidel a bakteriálních vzorků než u klasické imunomagnetické separace (popsána v kapitole 2.1.1.). Jelikož finanční náklady na reagující protilátky jsou velké, snížení objemu reakčních činidel by snížilo náklady na provedení testu. Proto pro NIMS separaci bylo použito 5  $\mu\text{l}$  magnetických nanočástic na 250  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze. U klasické IMS separace se používá 20  $\mu\text{l}$  magnetických nanočástic na 1 ml buněčné suspenze. Po snížení množství magnetických

nanočástic pro měření bylo zjištěno, že výsledné hodnoty detekce nejsou významně odlišné od hodnot klasické IMS. Také bylo zjištěno, že při větší koncentraci magnetických nanočástic (20  $\mu\text{l}$  na 1 ml vzorku) je možné lépe detekovat bakterie při nízkých koncentracích ( $10^2 - 10^4$  CFU/ml), ale u vyšší koncentrace bakterií je účinnost detekce stejná. [20]

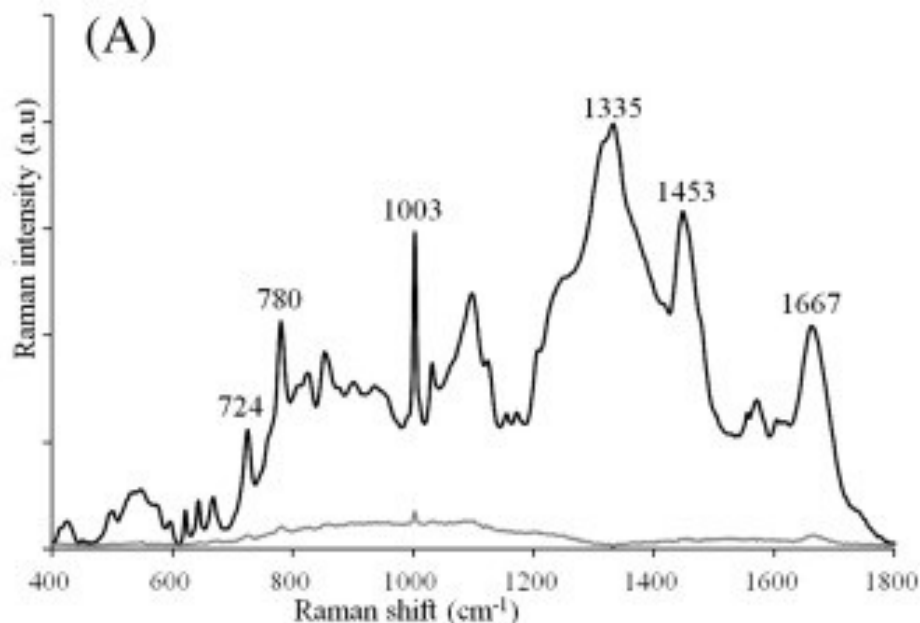
Nejnižší detekované množství *E. coli* touto metodou v jablečné šťávě bylo  $10^2$  CFU/ml. *E. coli* ve vzorku jablečné šťávy může být detekována metodou SERS do 5 minut. Účinnost detekovat *E. coli* pomocí SERS je 84 – 94%. Výhodou metody je, že má mnohonásobný potenciál a lze využít pro více patogenů v potravinových matricích. [20]

### 2.1.3 Detekce *Listeria monocytogenes* v mléce

Listerie jsou grampozitivní, fakultativně anaerobní nesporeující mikroorganismy. Rod *Listeria* se skládá ze šesti příbuzných druhů: *Listeria monocytogenes*, *Listeria grayi*, *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii* a *Listeria welshimeri*. Z toho pouze *Listeria monocytogenes* je vážnou hrozbou pro člověka, způsobuje u vnímavých jedinců život ohrožující onemocnění známé jako listerióza. Zpráva společnosti FoodNet konstatovala, že listerióza souvisí s 30 % úmrtí způsobené potravinami. V celosvětovém měřítku jsou mléko a mléčné výrobky největším zdrojem *Listeria monocytogenes*. *Listeria* se dále nachází v čerstvých potravinách, jako jsou mořské plody a maso. [17]

Pro identifikaci *Listeria* bylo využito Ramanových spektrálních otisků prstů, které odráží chemické složení bakteriální buněčné membrány a buněčné stěny. Obecně platí, že různé druhy *Listeria* vykazovaly podobná Ramanova spektra, proto bylo nutné další zpracování daných spekter pomocí chemometrické analýzy, která bude popsána v následující kapitole (kapitola č. 3) [17]

Na obrázku č. 9 je znázorněno Ramanovo spektrum *Listeria monocytogenes*. Pásmo s vibracemi o vlnočtu  $724\text{ cm}^{-1}$ , odpovídá vibracím adeninu. Pásmo  $780\text{ cm}^{-1}$  je přiřazeno vibracím cytosinu nebo uracilu (nukleové kyseliny). Pásmo  $1003\text{ cm}^{-1}$  odpovídá vibracím fenylalaninu a pás při  $1335\text{ cm}^{-1}$  je spojen s vibracemi skupiny  $\text{CH}_3\text{CH}_2$ . Pásky s vlnočtem  $1453\text{ cm}^{-1}$  a  $1667\text{ cm}^{-1}$  jsou přiřazeny deformaci C-H skupiny a amidu. [17]



Obr. 9: Ramanovo spektrum *Listeria monocytogenes* [17]

Jelikož výsledky detekce a identifikace *Listeria monocytogenes* kultivované v médiu byly slibné, použili Wang a kol. metodu pro stanovení *L. monocytogenes* ve vzorcích mléka. Vzorky mléka byly obohaceny bakteriemi *Listeria* o koncentraci  $10^8$  CFU/ml a byly analyzovány po 24 hodinách skladování. Získaná Ramanova spektra byla opět podrobena chemometrické analýze. Wang a kol. uvádí úspěšnost detekce *Listeria monocytogenes* v mléce  $> 95\%$ . [17]

#### 2.1.4 Detekce *Salmonella enterica* pomocí 3-MBPA testu

Bylo vyvinuto mnoho testů, které detekují bakterie pomocí metody SERS, ale většina z nich byla provedena za použití jednoduchých potravinových matric. V průmyslu je však zapotřebí detekovat bakterie v chemicky různorodých matricích. Metoda SERS v kombinaci s kyselinou 3-merkaptofenylboronovou (3-MBPA), která slouží jako detekční a indikační molekula pro rychlou detekci bakterií. Tahle metoda umožňuje detekovat bakterie do 3 hodin. [15]

Jako modelová bakterie byla ve studii použita *Salmonella enterica subsp enterica*. Stanovovanými vzorky byla jezírková voda z Campusu na univerzitě v Massachusetts, listy špenátu a jablečná šťáva. [15]

Měření probíhalo tak, že nejprve byly vyrobeny čipy ze zlatého povlaku, který byl nadále rozřezán na obdélníkové kusy (přibližně 2,5 x 3,5 mm). Poté byly čipy promyty

destilovanou vodou a etanolem a vloženy do zkušební zkumavky, která byla naplněna roztokem 3-MPBA-etanol, po dobu přibližně 17 hodin. Čipy byly následně vloženy do sterilní destičky, na kterou byly nanášeny měřené vzorky společně se 100  $\mu$ l nanočástic stříbra. [15]

Pro detekci za použití 3-MPBA kombinovaného testu byla důležitá hodnota pH vzorků. Proto muselo být pH upraveno na hodnotu 8,4 za pomoci vysoce koncentrovaného roztoku hydrogenuhličitanu amonného, který nijak neovlivňoval 3-MPBA Ramanův otisk.

3-MPBA kombinovaný test vykazoval vysokou citlivost detekce bakterií ve stacionární fázi růst. V jablečné šťávě bylo možné detekovat bakterie již v koncentraci  $10^2$  CFU/ml. V jezírkové vodě bylo možné tímhle testem detekovat více bakterií než klasickou kultivační metodou. Tento nárůst byl ve studii odůvodněn tím, že test 3-MPBA je schopen detekovat i neživotaschopné buňky. Na listech špenátu bylo možné detekovat chemicky inaktivovanou *Salmonella enterica* v koncentraci  $10^8$  CFU/ml. [15]

### 2.1.5 Detekce vinných kvasinek

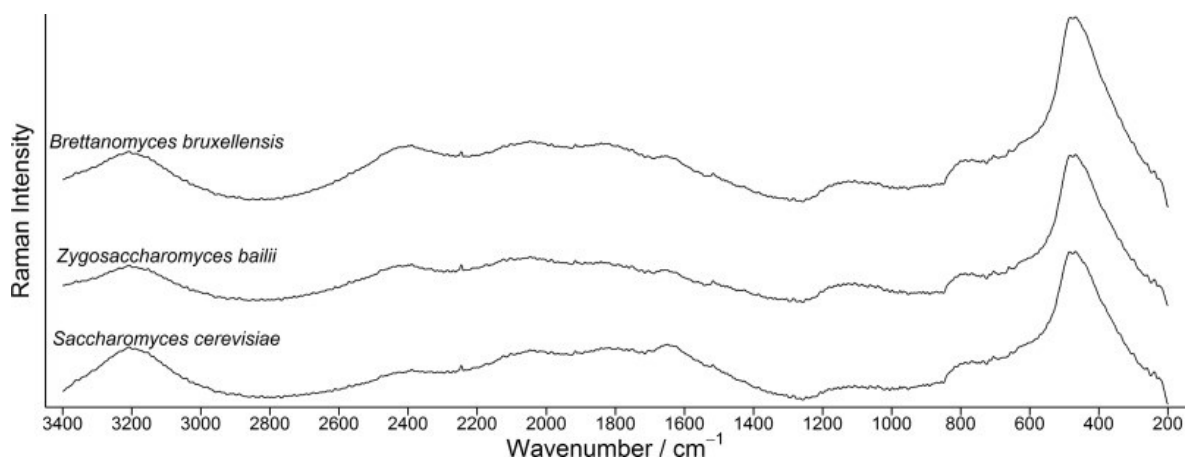
Vinné kvasinky *Zygosaccharomyces bailii*, *Dekkera bruxellensis* (neboli *Brettanomyces bruxellensis*) a *Sacharomyces cerevisiace* jsou převážně zodpovědné za znehodnocení archivních a balených vín. [21]

*B. bruxellensis* je běžně spojována s červenými víny, které přicházejí do kontaktu s dubovými sudy. *B. bruxellensis* může měnit aroma vína produkcí těžkých fenolových sloučenin. Někteří vinaři považují změnu za žádoucí, zatímco ostatní ji považují za zkažení vína. [21]

*Z. bailii* je běžným kontaminantem ovocných šťáv, které vinaři přidávají do suchých vín před plněním do lahví, aby zvýšili hladinu zbytkového cukru a tím získali vína sladká. *Z. bailii* je extrémně osmotolerantní kvasinka, která dokáže růst až do 72 % hm. glukózy. Dále je velmi tolerantní vůči etanolu (až do 20 % obj.) a je velmi odolná proti slabým konzervačním prostředkům, jako je kyselina sorbová. [21]

Před měřením Ramanových spekter byly dané kvasinky nejprve kultivovány na agaru YM (Yeast and molds – kvasinky a plísně) při 30°C. Následně byla provedena Ramanova analýza na Ramanově spektroskopu s excitační vlnovou délkou laseru při 532 nm. [21]





Obr. 10: Ramanova spektra kvasinek po odečtení fluorescence [21]

Po provedení analytických metod za účelem identifikace bakterií bylo zjištěno, že spektra jednotlivých kvasinek se výrazně liší v oblasti otisku prstů (viz obr.10). Proto bylo možné provést klasifikaci kvasinek na úroveň kmene.

Tento způsob detekce kvasinek, který je jednoduchý, rychlý a má nízké provozní náklady má významný potenciál pro pracovníky na vinicích při identifikaci kvasinkových kolonií izolovaných ze vzorků vína. [21]

## 2.2 Detekce mikroorganismů přenosným zařízením

Během posledních pár let byly provedeny studie o měření metodou SERS pomocí přenosného Ramanova spektroskopu. Tohle měření bylo podle studií vyhodnoceno jako praktičtější, ekonomičtější a pohodlnější. Analýza spektrálních dat shromážděných pomocí přenosných Ramanových spektroskopů ale stále vyžaduje přímou kontrolu spektra v počítači. [10]

V současné době však existují dvě překážky spojené s použitím ručního Ramanova spektroskopu s využitím metody SERS v reálné praxi. Zaprvé, Ramanův ruční spektrometr byl primárně navržen pro identifikaci syvkých materiálů v důsledku slabých Ramanových signálů. Zadruhé, kvůli spektrální shodě ruční Ramanův spektrometr obvykle poskytuje výsledek PASS/FAIL. Do budoucna je zapotřebí dalších studií, aby bylo možné vyhodnotit výsledky na různých analytech a ve vzorcích skutečných potravin. Budoucí směry spočívají především ve vývoji přístrojové techniky a statistického softwaru. [10]

### 3 IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ S POUŽITÍM RAMANOVY SPEKTROSKOPIE

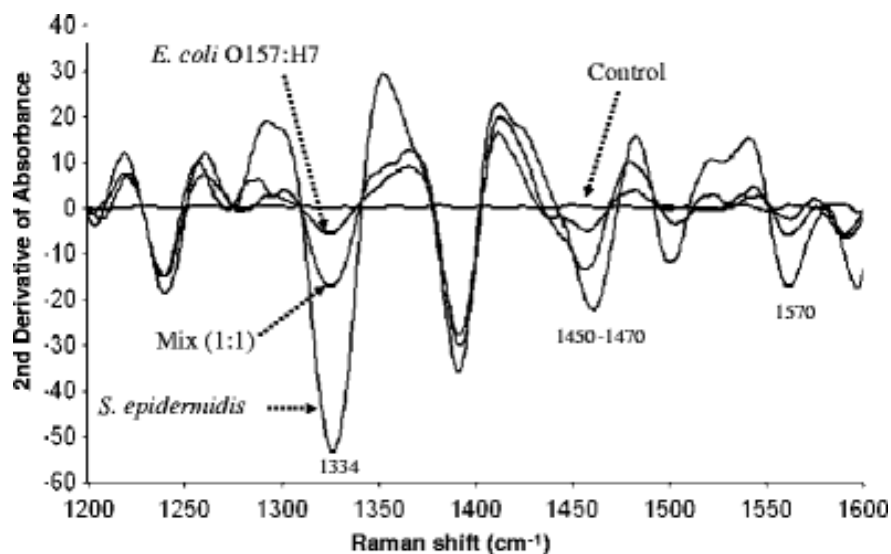
Ramanova spektroskopie je široce rozšířená technika chemického profilování. Spektra z jednotlivých bakteriálních buněk jsou shromažďována během několika sekund a mohou být použita k identifikaci až na úroveň kmene. Jelikož Ramanův otisk je fenotypově závislý, je náročné shromáždit sbírku Ramanových spekter, která budou vhodná pro sestavení chemometrického modelu používaného při identifikaci mikroorganismů. [22]

Pro identifikaci mikroorganismů se využívá i multivariační analýza, která současně sleduje a analyzuje vliv více než jedné proměnné. Multivariační analýza se často využívá v průmyslu pro on-line sledování a řízení výrobního procesu. Přesné multivariační kalibrační modely založené na Ramanových spektrech mohou v průmyslu nahradit referenční modely a tím umožnit snadnější kontrolu průběhu fermentace. [23]

V Ramanově spektroskopii je zapotřebí pro kalibraci aplikovat složitější kalibrační modely s využitím pokročilých chemometrických algoritmů, které však obvykle vyžadují rozsáhlou řadu standardů (více než 30 kalibračních vzorků). Sada kalibračních vzorků musí pokrýt celou očekávanou nebo odhadovanou variabilitu charakteristik vzorků, které mají být následně analyzovány. Příprava kalibračních vzorků proto vyžaduje pečlivé plánování experimentu. Pro správné vyhodnocení musí být zachovány stejné podmínky měření i způsoby úprav všech spekter od kalibračních, přes validační až po neznámé vzorky. [2]

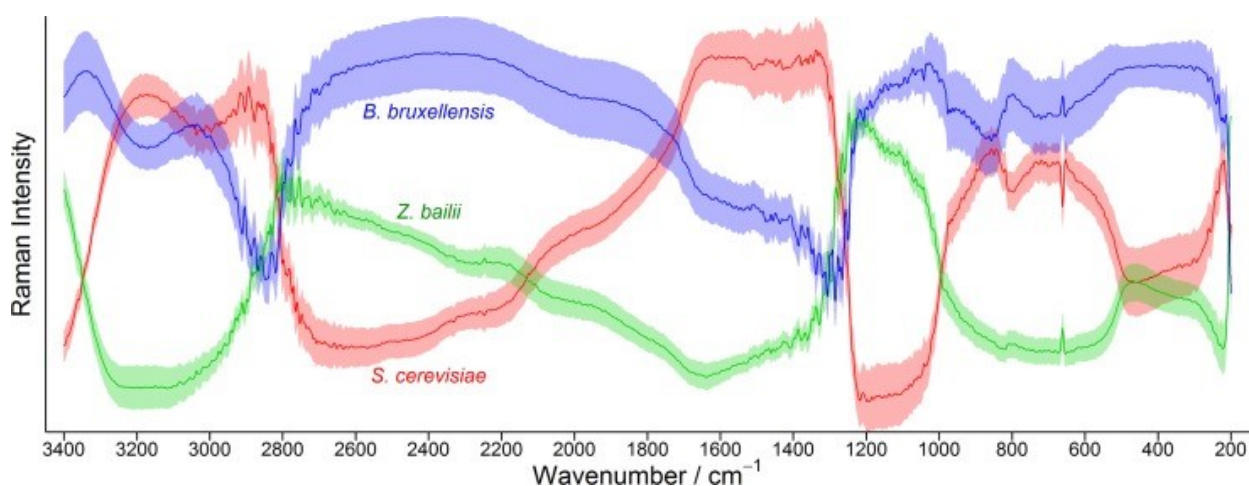
Chemometrická analýza může zesílit slabší spektrální signály a vytvořit modely segregace nebo kvantitativní analýzy. Chemometrické metody pro kvalitativní analýzu jsou obvykle založeny na diskriminační analýze. Mezi tyto metody běžně patří analýza hlavních komponent (PCA), metoda částečné regrese nejmenších čtverců (PLS), shluková analýza (CA). [16, 17, 24]

Před stanovením chemometrické analýzy je zapotřebí provést předběžné zpracování dat. Tohle předběžné zpracování dat spočívá ve vyhlazení a transformaci spekter za pomoci druhé derivace intenzity. Vyhlazování spekter eliminuje vysokofrekvenční instrumentální šumy zpřůměrováním sousedních datových bodů. Transformace spekter do druhé derivace odděluje některé překrývající se pásy a odstraňuje výchozí odchylky [25]



Obr. 11: Transformace Ramanových spekter *Staphylococcus epidermidis* a *E. coli* O157:H7 [25]

Na obrázku 11 je názorná ukázka transformace Ramanových spekter. Zároveň na obrázku 11 jdou pozorovat rozdíly spekter mezi *E. coli* a *S. epidermidis* a směsnou kulturou, která byla složena z těchto dvou mikroorganismů v poměru 1:1. Rozdíly jsou rozlišitelné v pásmech  $1334\text{ cm}^{-1}$  (uhlohydráty),  $1450\text{-}1470\text{ cm}^{-1}$  (lipidy) a pásmu  $1570\text{ cm}^{-1}$  (guanin, adenin). [25]



Obr. 12: Upravená Ramanova spektra kvasinek [21]

Na obrázku 12 je zobrazen další příklad předběžného zpracování spekter. Na obrázku jsou zobrazena Ramanova spektra tří kvasinek (*Zygosaccharomyces bailii*, *Brettanomyces bruxellensis* a *Sacharomyces cerevisiace*) po odečtení fluorescence a variabilní transformace u všech vlnočtů. Šířka stínované oblasti kolem každého spektra udává 95%

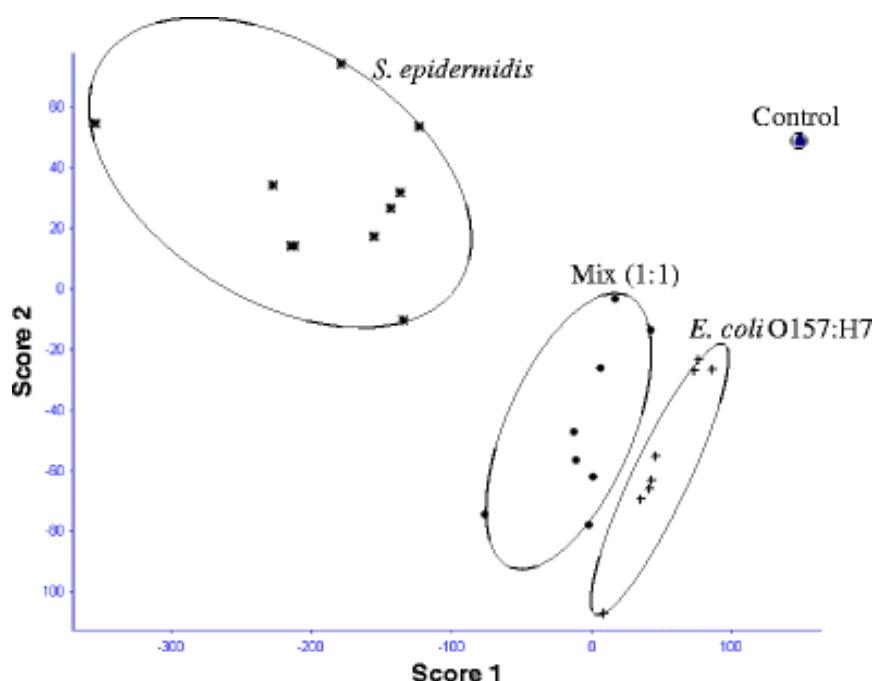
interval spolehlivosti pro spektrum měřeného mikroorganismu. Na obrázku 10 v kapitole 2.1.5 jsou zobrazena takhle spektra bez předběžného zpracování. [21]

### 3.1 Metoda hlavních komponent (PCA)

Metoda hlavních komponent (Principal Component Analysis – PCA) patří k nejstarším a nejpoužívanějším metodám vícerozměrné analýzy. Metoda je schopná oddělit od sebe různé kmeny mikroorganismů. [26]

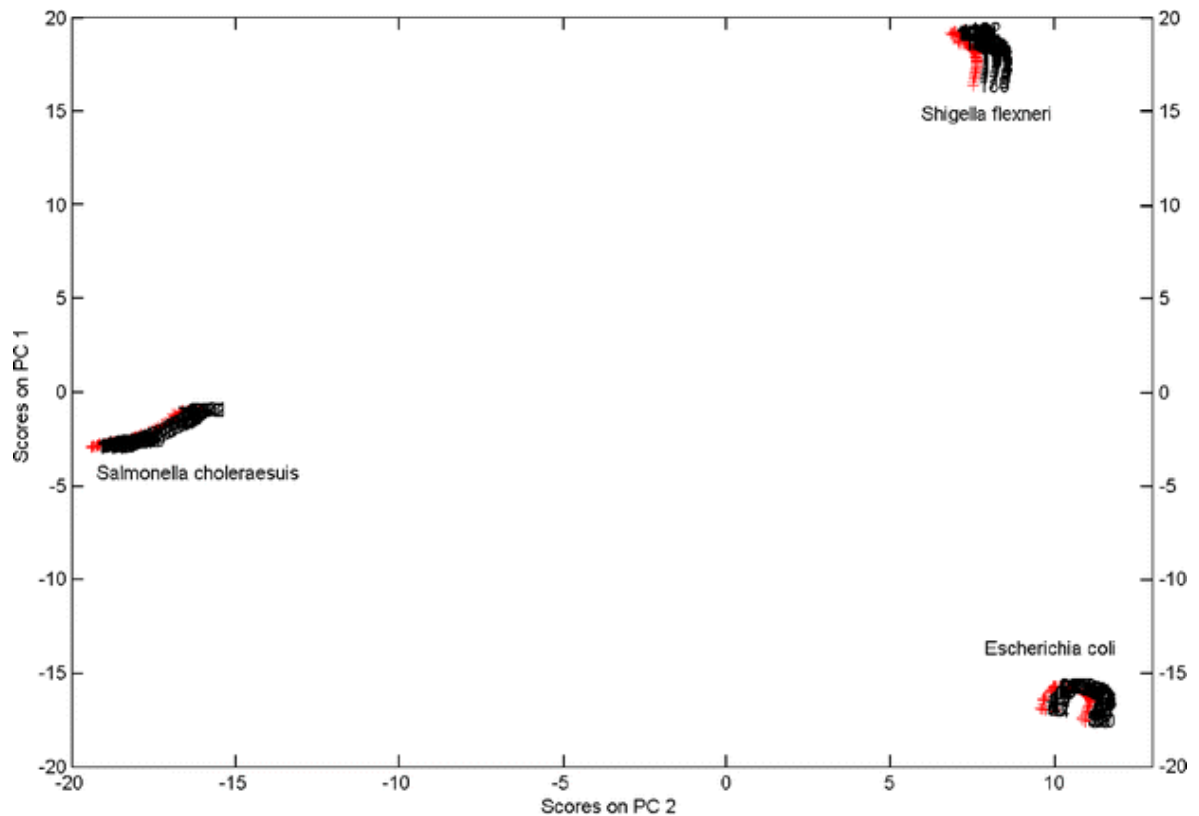
PCA je mnohostranná statistická analýza, která se široce používá k zachycení a vysvětlení odchylek spektrálních dat získaných metodou SERS. Data jsou obvykle zobrazena jako seskupené vzorky v závislosti na rozdílech spektrálních informací. [25]

Cílem metody je nahrazení velkého nepřehledného počtu původních proměnných menším počtem proměnných tak, aby nedošlo k velké ztrátě informací. Tyto nově vytvořené proměnné se nazývají hlavní komponenty. [27]



Obr. 13: Analýza hlavních komponent pro *S. epidermidis* a *E. coli* O157:H7 [25]

Na obr. 13 a 14 jsou zobrazeny variace dat mezi bakteriálními druhy, které jsou způsobeny rozdíly v hlavních buněčných složkách, jako jsou nukleové kyseliny, proteiny a fosfolipidy. [25]



Obr. 14: PCA analýza pro *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli* a *Shigella flexneri* [24]

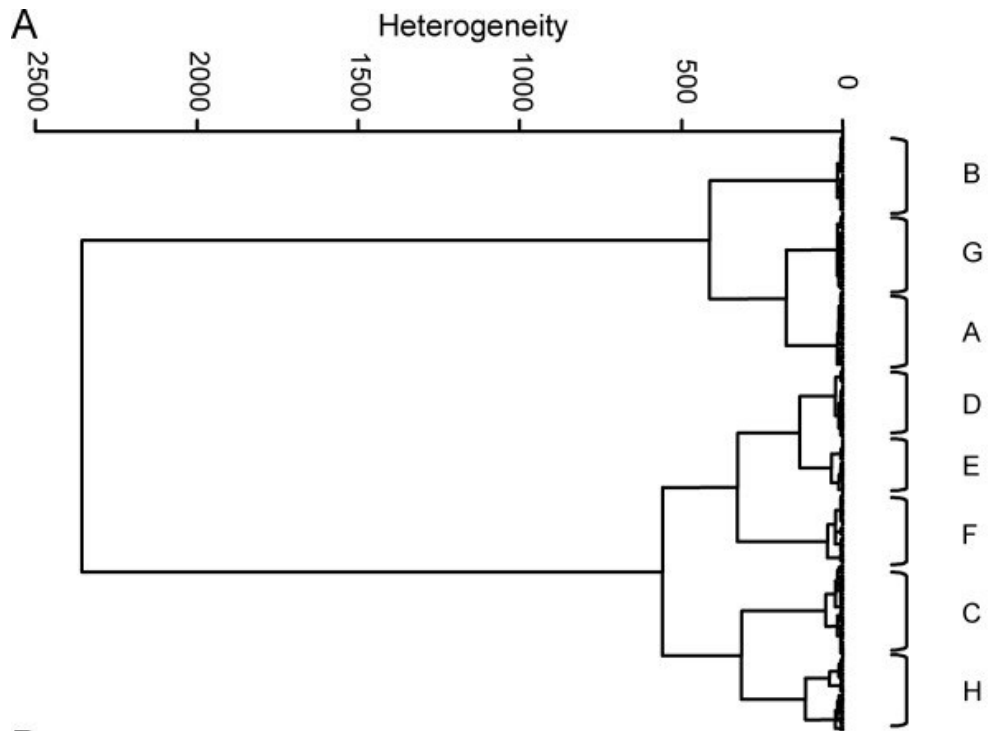
### 3.2 Shluková analýza

Shluková analýza (Cluster Analysis) se zabývá metodami a algoritmy, pomocí kterých seskupuje data s podobnými vlastnostmi do shluků. Ve shlukové analýze je snaha získat uspořádaná data ve smysluplných strukturách. Shluk je skupina objektů, které jsou si navzájem podobné a rozdílné od objektu, který do této skupiny nepatří. [28]

Na výsledek shlukové analýzy mají vliv dva parametry. Prvním z parametrů, který ovlivňuje výsledek shlukové analýzy, je vzdálenost jednotlivých shluků. Druhým podstatným parametrem je rozhodnutí, které dva shluky budeme považovat za jeden. Používanými metodami je například mediánová metoda, Wardova metoda anebo použití metody tzv. nejbližšího souseda. Zobrazením shlukové analýzy je tzv. dendrogram, což je vlastně vývojový strom, který znázorňuje průběh shlukování. [29]

Na obrázku č. 15 je znázorněna ukázka dendrogramu bakterií mléčného kvašení za použití Wardovy metody shlukování. Kmeny bakterií jsou rozděleny do jednotlivých skupin a jsou považovány za jednotné. Největší rozdíl je možné pozorovat u *S.*

*thermophilus* DSM 20617 (H). Kmeny *L. delbrueckii ssp. bulgaricus*, DSM 20080 (D) a DSM 20081 (E) jsou kmeny s nejmenší spektrální vzdáleností. [26]



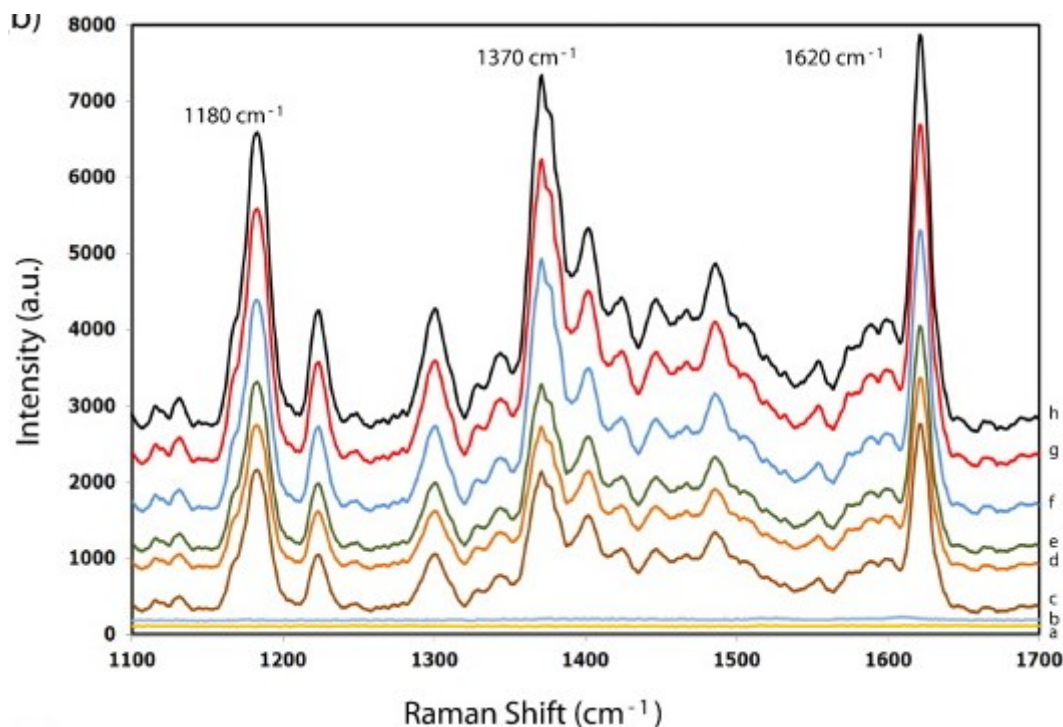
Obr. 15: Dendrogram bakterií mléčného kvašení. A-C: *Lactobacillus. acidophilus* DSM 9126, DSM 20079, DSM 20142; D-E: *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* DSM 20080, DSM 20081; F-H: *Streptococcus. thermophilus* DSM 20259, DSM 20479, DSM 20617 [26]

### 3.3 Metoda nejmenších čtverců (PLS)

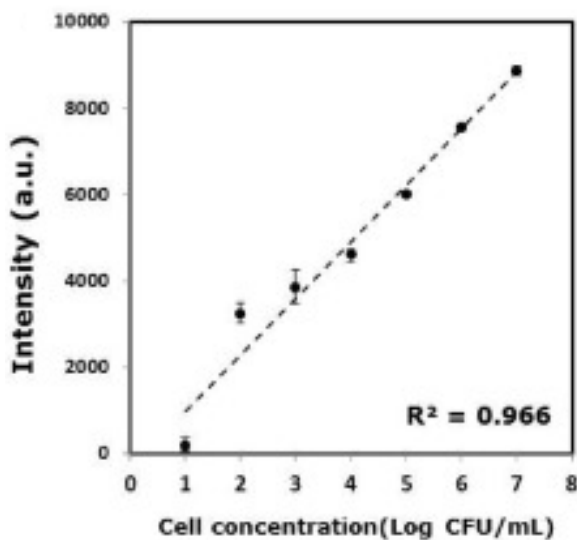
Metoda nejmenších čtverců, označována jako metoda PLS (Partial Least Squares), někdy nazývaná také jako K-matrix, našla největší uplatnění v chemometrii. Metodu PLS je možné použít zejména pro řešení regresních problémů. [27, 29]

Metoda je založena na zisku hodnot  $x$ , kterým odpovídají příslušné hodnoty  $y$  a jejich výsledek je vyneseno do grafu. Získané body se snažíme proložit přímkou tak, aby přímka ležela co nejbližší bodům z měření. Za optimální považujeme takovou přímkou, která minimalizuje součet ploch čtverců, které jsou vyneseny od bodu k přímce. [31]

Metodu je vhodné použít, pokud jsou známa spektra čistých složek. Při použití metody je brán v úvahu vnitřní vztah mezi vlastnostmi vzorku, jako je například koncentrace (Obr. 16). [31]



Obr. 16: Ramanovo spektrum různých koncentrací *E. coli* v jablečné šťávě (a –  $10^1$  CFU/ml; b –  $10^2$  CFU/ml; c –  $10^3$  CFU/ml; d –  $10^4$  CFU/ml; e –  $10^5$  CFU/ml; f –  $10^6$  CFU/ml; g –  $10^7$  CFU/ml; h –  $10^8$  CFU/ml) [20]



Obr. 17: Graf intenzity SERS při  $1620\text{ cm}^{-1}$  na log CFU/ml *E. coli* [20]

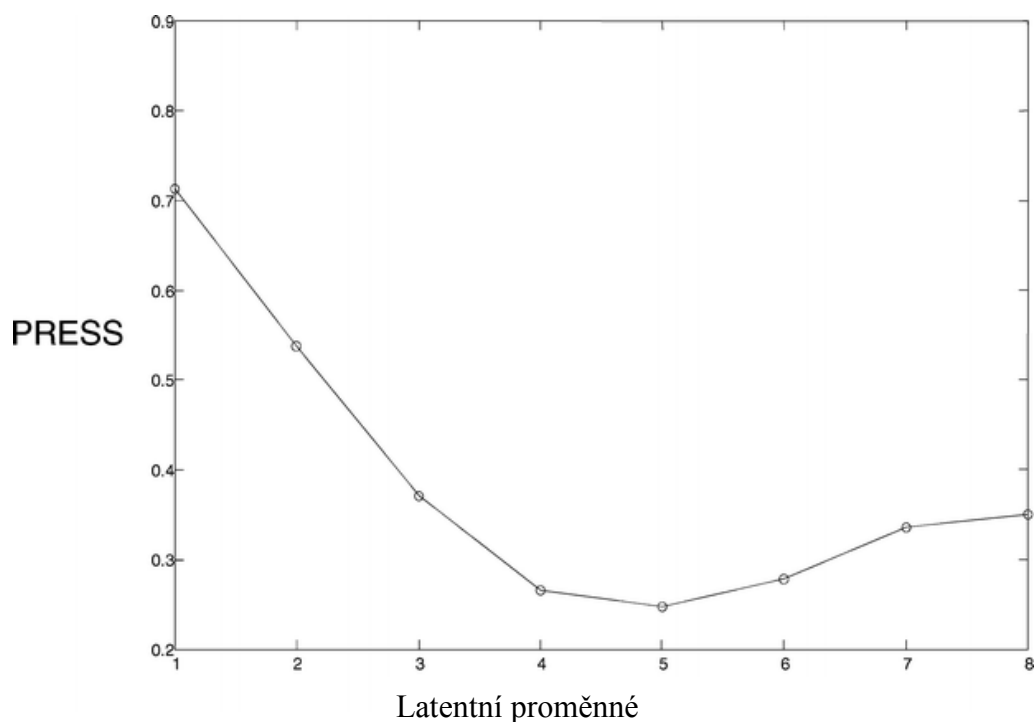
Písmeno  $R^2$  udává hodnotu 0,966, která se získá lineární regresi analýzy všech piků proti koncentraci log CFU/ml cílové *E. coli* (Obr. 17). [20]

Metoda PLS je používána spíše pro vytvoření kalibrační křivky než k samotné identifikaci mikroorganismů. [30]

### 3.3.1 Metoda nejmenších čtverců – diskriminační analýzy (PLS-DA)

Cílem metody nejmenších čtverců diskriminační analýzy (PLS-DA) je určit rozdíly mezi skupinami úzce příbuzných Ramanových spekter. Jedním ze způsobu provedení diskriminační analýzy je vytvoření tzv. fiktivních proměnných, které představují určité druhy bakterií. Fiktivní proměnná je taková proměnná, která může mít pouze dvě nebo tři hodnoty. Tyhle fiktivní proměnné se používají k označení vlastností získaných spekter. [24]

Pro příklad metody nejmenších čtverců diskriminační analýzy pro hodnocení Ramanových spekter jsou použity fiktivní proměnné podle studie Mello a kol. [1 0 0] k *E. coli*, [0 2 0] k *Salmonella choleraesuis* a [0 0 3] k *Shigella flexneri*. [24]

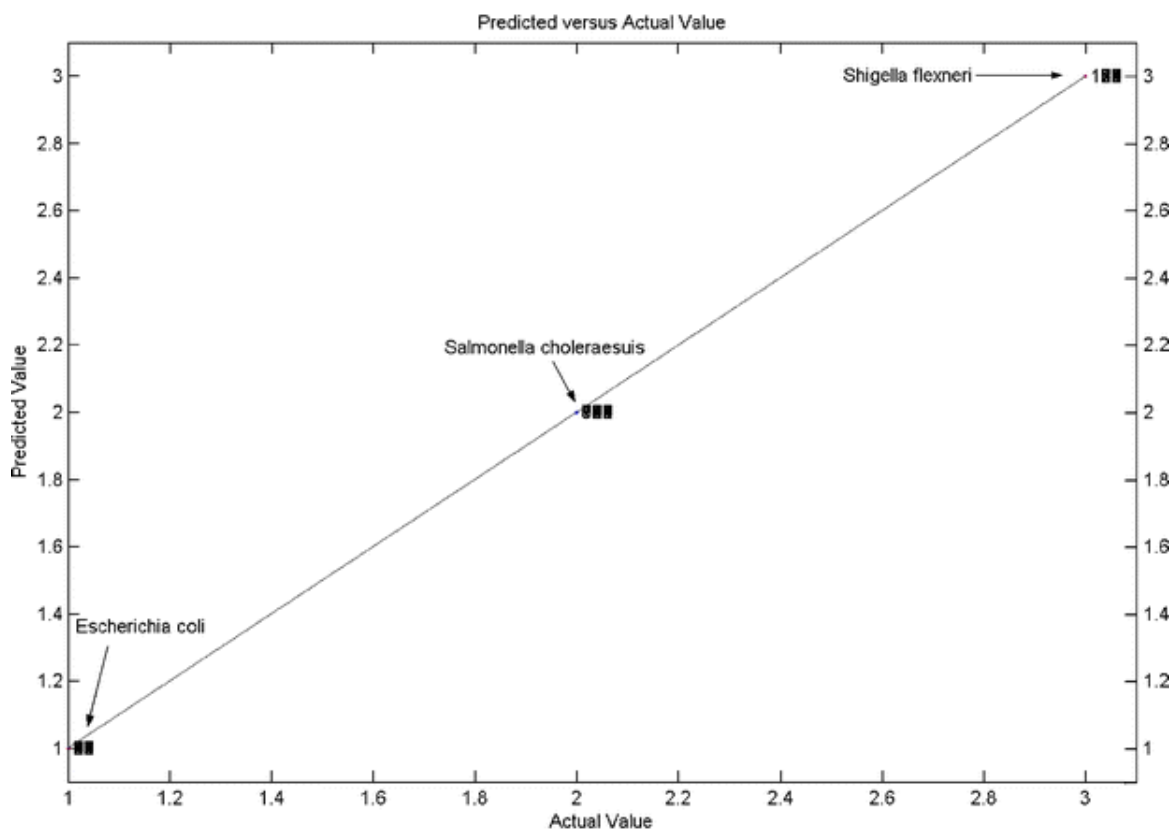


Obr. 18: Graf závislosti součtu nejmenších čtverců (PRESS) na latentních proměnných [24]

Pro vytvoření modelu PLS-DA se vyberou čtyři latentní proměnné, které se získají křížovou validací. Optimální počet latentních proměnných byl vybrán podle obrázku 18, kde čtyři latentní proměnné odpovídají nejmenším hodnotám součtu nejmenších čtverců.



Latentní proměnné byly odhadnuty jako lineární kombinace kmitočtů na základě spektrálních změn. [24]



Obr. 19: kalibrační graf skutečných a předpovídaných vzorků s využitím PLS-DA analýzy [24]

Na obrázku 19 je vynesena analýza tří odlišných skupin spekter daných bakterií. Odlišnost spekter je pozorována na obrázku 14 v kapitole 3.1., kde byly daná spektra vyšetřena pomocí analýzy hlavních komponent. [24]

Analýza zobrazená na obrázku 19 ukazuje, že model PLS-DA se čtyřmi latentními proměnnými byl schopen správně klasifikovat 100 % všech typů bakterií ve vzorcích. Malé rozdíly, které jsou zachycené modelem PLS-DA jsou způsobeny různým uspořádáním amidové skupiny v buněčné stěně bakterií. Tenhle model může být použit jako výkonný analytický nástroj pro rychlou identifikaci bakterií ve vzorcích. [24]

Bylo zjištěno, že metoda PLS je nejoblíbenější metodou pro analýzu spekter v mikrobiálním hodnocení. To znamená, že většina zkoumaných mikroorganismů lineárně koreluje s Ramanovým spektrem a tahle korelace by mohla být vhodná pro mikrobiální hodnocení potravin. [14]

## 4 VÝHODY A NEVÝHODY RAMANOVY SPEKTROSKOPIE

Potenciál pro analytické aplikace Ramanovy spektroskopie v potravinářství je obrovský. Ramanova spektroskopie představuje nástroj, který lze použít pro rychlou detekci kvality, a také poskytnout řadu detailních strukturních informací o potravinářských systémech. [7]

Ramanova spektroskopie je nedestruktivní a neinvazivní spektroskopická technika, která je vhodná pro detekci mikroorganismů v potravinách různého skupenství. Metoda Ramanovy spektroskopie je vhodným nástrojem pro klasifikaci bakterií bez nutnosti jejich kultivace. Vzorky pro měření potřebují pouze minimální přípravu nebo přípravu nepotřebují vůbec. Objem vzorků pro měření je v řádech mikrolitrů.

Velkou výhodou Ramanovy spektroskopie je časová nenáročnost měření. Délka jednotlivých měření se pohybuje v řádech několika sekund. Naměřené informace jsou zaznamenávány do rozsáhlých databází spekter. Databáze spekter jsou komerčně dostupné, ale často se pro jednotlivá měření musí tvořit databáze vlastní. Získaná spektra musí být za účelem identifikace jednotlivých mikroorganismů vyšetřena statistickou analýzou, což podle druhu použité statistické metody a výkonosti počítače, na kterém je analýza spekter prováděna, zabere několik hodin. Ramanova spektroskopie je schopná identifikovat bakterie až na úroveň kmene. Další výhodou použití Ramanovy spektroskopie je eliminace použití chemikálií, případně použití menších objemů reagenčních činidel. Přenosný přístroj nabízí možnost měření v terénu nebo přímo v potravinářském provozu. Pomocí Ramanovy spektroskopie je možné měřit vzorky v různých obalech.

Nevýhodou Ramanovy spektroskopie je vysoká pořizovací cena přístroje. Tato nevýhoda by se dala kompenzovat pořízením přenosného Ramanova spektroskopu, jehož pořizovací náklady ve srovnání se stolním přístrojem jsou menší. [10]

Častým problémem Ramanovy spektroskopie je vyskytující se fluorescence. Fluorescenci je možné odstranit zahřátím vzorku nebo může být odstraněna použitím matematického softwaru, pomocí kterého se fluorescence odečte ještě před zpracováním naměřených spekter. Další nevýhodou Ramanovy spektroskopie je nutnost vytvořit rozsáhlou řadu kalibračních vzorků, ze kterých se následně vytvoří kalibrační spektra a s těmi jsou následně srovnávána spektra nová.

## ZÁVĚR

V rámci bakalářské práce byl vytvořen stručný přehled studií využívající Ramanovu spektroskopii pro detekci mikroorganismů v potravinách. V práci byly také nastíněny postupy identifikace mikroorganismů s využitím chemometrických metod. Závěry zpracovaných studií lze shrnout do několika bodů:

- Ramanova spektroskopie s využitím Ramanovy mikroskopie je nedestruktivní a neinvazivní metoda, která je schopna detekovat jednotlivé mikrobiální buňky a může být užitečným nástrojem pro detekci buněk bez předchozí úpravy růstových podmínek bakterií.
- S využitím SERS v kombinaci s imunomagnetickou separací je možné detekovat velmi nízké koncentrace bakteriálních buněk.
- Ramanova spektroskopie je vhodná pro detekci mikroorganismů v potravinách různého skupenství
- Vzorky pro měření potřebují pouze minimální přípravu nebo přípravu nepotřebují vůbec.
- Objem vzorků pro měření se pohybuje v řádech mikrolitů, což přináší úsporu také v objemu použitých reagensů.
- Ramanova spektroskopie je schopná identifikovat bakterie až na úroveň kmene.
- Velkou výhodou Ramanovy spektroskopie je časová nenáročnost měření. Jednotlivá měření se pohybují v řádech několika sekund. Celková doba měření tak může dosahovat pouze 1-3 hodiny.
- Získaná spektra musí být za účelem identifikace jednotlivých mikroorganismů vyšetřena statistickou analýzou, což podle druhu použité statistické metody a výkonosti počítače, na kterém je analýza spekter prováděna, zabere několik hodin.

Detekce a identifikace bakterií s využitím Ramanovy spektroskopie je v současnosti ve fázi výzkumu a v potravinářství se zatím moc nevyužívá. Do budoucna je však předpokládán velký rozvoj této metody.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] DENDISOVÁ, Marcela., Pavel ŽVÁTORA a Pavel MATĚJKA. VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE. Ramanova spektroskopie. [online]. [cit. 2018-01-19]. Dostupné z: <<http://www.vscht.cz/anl/lach2/RAMAN.pdf>>.
- [2] Sir Chandrasekhara Venkata Raman - Facts. *Nobel media AB* [online]. [cit. 2018-01-19]. Dostupné z: [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/physics/laureates/1930/raman-facts.html](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1930/raman-facts.html)
- [3] STRAUCH, Bohuslav, Blanka. VLČKOVÁ a Ivan. NĚMEC. Infračervená a Ramanova spektroskopie na katedrách chemie Přírodovědné fakulty Univerzity Karlovy v Praze – od historie k současnosti. *Chemické listy*. Praha: Česká společnost chemická, 2010, č. 104, s. 1210-1219. ISSN 0009-2770. [online]. [cit. 2018-01-19]. Dostupné z: <[http://chemickelisty.cz/docs/full/2010\\_12\\_1210-1219.pdf](http://chemickelisty.cz/docs/full/2010_12_1210-1219.pdf)>.
- [4] TRCHOVÁ, Miroslava. Jak vibrují atomy v molekulách. Ústav makromolekulární chemie, Akademie věd ČR. [online]. [cit. 2018-03-14]. Dostupné z: <<http://archiv.otevrenaveda.cz/users/Image/default/C1Kurzy/NH2006pdf/15.pdf>>.
- [5] HORÁK, Milan a Antonín VÍTEK. *Zpracování a interpretace vibračních spekter*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1980. Moderní metody v chemické laboratoři.
- [6] HORÁK, Milan a Dušan PAPOUŠEK. *Infračervená spektra a struktura molekul: použití vibrační spektroskopie při určování struktury molekul*. Praha: Academia, 1976.
- [7] LI-CHAN, Eunice. The applications of Raman spectroscopy in food science. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 1996, 7(11), 361-370 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1016/S0924-2244(96)10037-6. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224496100376>
- [8] MILATA, Viktor. *Aplikovaná molekulová spektroskopie*. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 2008. Edícia vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-227-2960-4.
- [9] CIALLA, Dana, Anne MÄRZ, René BÖHME, Frank THEIL, Karina WEBER, Michael SCHMITT a Jürgen POPP. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2012, 403(1), 27-54 [cit. 2018-03-17]. DOI: 10.1007/s00216-011-5631-x. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-011-5631-x>

- [10] ZHENG, Jinkai a Lili HE. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for the Chemical Analysis of Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 2014, **13**(3), 317-328 [cit. 2018-01-01]. DOI: 10.1111/1541-4337.12062. ISSN 15414337. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1541-4337.12062>
- [11] YANG, Danting a Yibin YING. Applications of Raman Spectroscopy in Agricultural Products and Food Analysis: A Review. *Applied Spectroscopy Reviews* [online]. 2011, **46**(7), 539-560 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1080/05704928.2011.593216. ISSN 0570-4928. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/05704928.2011.593216>
- [12] DUAN, Nuo, Boya CHANG, Hui ZHANG, Zhouping WANG a Shijia WU. Salmonella typhimurium detection using a surface-enhanced Raman scattering-based aptasensor. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2016, **218**, 38-43 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.006. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160515301690>
- [13] BURSOVÁ, Šárka, Lenka NECIDOVÁ a Marta DUŠKOVÁ. *Mikrobiologie potravin a mikrobiologické laboratorní metody*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-741-1.
- [14] HE, Hong-Ju a Da-Wen SUN. Microbial evaluation of raw and processed food products by Visible/Infrared, Raman and Fluorescence spectroscopy. *Trends in Food Science & Technology* [online]. 2015, **46**(2), 199-210 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1016/j.tifs.2015.10.004. ISSN 09242244. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224415002198>
- [15] PEARSON, Brooke, Alexander MILLS, Madeline TUCKER, Siyue GAO, Lynne MCLANDSBOROUGH a Lili HE. Rationalizing and advancing the 3-MPBA SERS sandwich assay for rapid detection of bacteria in environmental and food matrices. *Food Microbiology* [online]. 2018, **72**, 89-97 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1016/j.fm.2017.11.007. ISSN 07400020. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002017307281>
- [16] STÖCKEL, Stephan, Johanna KIRCHHOFF, Ute NEUGEBAUER, Petra RÖSCH a Jürgen POPP. The application of Raman spectroscopy for the detection and identification of microorganisms. *Journal of Raman Spectroscopy* [online]. 2016, **47**(1), 89-109 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1002/jrs.4844. ISSN 03770486. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jrs.4844>

- [17] WANG, Junping, Xinfang XIE, Jinsong FENG, Jessica C. CHEN, Xin-jun DU, Jiangzhao LUO, Xiaonan LU a Shuo WANG. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in milk using confocal micro-Raman spectroscopy and chemometric analysis. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2015, **204**, 66-74 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.03.021. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160515001609>
- [18] HUANG, Wei E., Yizhi SONG a Jian XU. Single cell biotechnology to shed a light on biological 'dark matter' in nature. *Microbial Biotechnology* [online]. 2015, **8**(1), 15-16 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1111/1751-7915.12249. ISSN 17517915. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1751-7915.12249>
- [19] CHO, Il-Hoon, Pushpak BHANDARI, Pradip PATEL a Joseph IRUDAYARAJ. Membrane filter-assisted surface enhanced Raman spectroscopy for the rapid detection of *E. coli* O157: H7 in ground beef. *Biosensors and Bioelectronics* [online]. 2015, **64**, 171-176 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1016/j.bios.2014.08.063. ISSN 09565663. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S095656631400659>
- [20] NAJAFI, Roya, Shubhasish MUKHERJEE, Jim HUDSON, Anup SHARMA a Pratik BANERJEE. Development of a rapid capture-cum-detection method for *Escherichia coli* O157 from apple juice comprising nano-immunomagnetic separation in tandem with surface enhanced Raman scattering. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2014, **189**, 89-97 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.036. ISSN 01681605. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160514003912>
- [21] RODRIGUEZ, Susan B., Mark A. THORNTON a Roy J. THORNTON. Raman Spectroscopy and Chemometrics for Identification and Strain Discrimination of the Wine Spoilage Yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, and *Brettanomyces bruxellensis*. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2013, **79**(20), 6264-6270 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1128/AEM.01886-13. ISSN 0099-2240. Dostupné z: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.01886-13>
- [22] BARITAUX, Jean-Charles, Anne-Catherine SIMON, Emmanuelle SCHULTZ, C. EMAIN, P. LAURENT a Jean-Marc DINTEN. A study on identification of bacteria in environmental samples using single-cell Raman spectroscopy: feasibility and reference libraries. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2016, **23**(9), 8184-8191

[cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1007/s11356-015-5953-x. ISSN 0944-1344. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-015-5953-x>

[23] MEHDIZADEH, Hamidreza, David LAURI, Krizia M. KARRY, Mojgan MOSHGBAR, Renee PROCOPIO-MELINO a Denis DRAPEAU. Generic Raman-based calibration models enabling real-time monitoring of cell culture bioreactors. *Biotechnology Progress* [online]. 2015, **31**(4), 1004-1013 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1002/btpr.2079. ISSN 87567938. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/btpr.2079>

[24] MELLO, Cesar, Diórginis RIBEIRO, Fábio NOVAES a Ronei J. POPPI. Rapid differentiation among bacteria that cause gastroenteritis by use of low-resolution Raman spectroscopy and PLS discriminant analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2005, **383**(4), 701-706 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1007/s00216-005-0017-6. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-005-0017-6>

[25] FAN, Cui, Zhiqiang HU, Azlin MUSTAPHA a Mengshi LIN. Rapid detection of food- and waterborne bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with silver nanosubstrates. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2011, **92**(5), 1053-1061 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1007/s00253-011-3634-3. ISSN 0175-7598. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-011-3634-3>

[26] GAUS, Katharina a kol. Classification of lactic acid bacteria with UV-resonance Raman spectroscopy. *Biopolymers* [online]. 2006, **82**(4), 286-290 [cit. 2018-04-19]. DOI: 10.1002/bip.20448. ISSN 0006-3525. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bip.20448>

[27] KRÁLOVÁ, Hana. Vybrané moderní metody mnohorozměrné statistické analýzy [online]. Olomouc, 2013 [cit. 2018-04-18]. Dostupné z: <<https://theses.cz/id/orpkza/>>. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci, Faculty of Science. Vedoucí práce RNDr. Karel Hron, Ph.D.

[28] Kučera Jiří. In: *Shluková analýza* [online]. [cit. 2018-04-18]. Dostupné z: [https://is.muni.cz/th/172767/fi\\_b/5739129/web/web/main.html](https://is.muni.cz/th/172767/fi_b/5739129/web/web/main.html)

[29] KUCHAR, Miroslav. *Výzkum a vývoj léčiv: studijní program: syntéza a výroba léčiv*. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN isbn978-80-7080-677-7.

[30] ESKILDSEN, C.E., F. VAN DEN BERG a S.B. ENGELSEN. Vibrational Spectroscopy in Food Processing. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry* [online]. Elsevier, 2017, 2017, s. 582-589 [cit. 2018-05-05]. DOI: 10.1016/B978-0-12-

409547-2.12156-0. ISBN 9780128032244. Dostupné z:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124095472121560>

[31] MAŘÍK Robert. *Metoda nejmenších čtverců* [online]. 2006 [cit. 2018-04-19].  
Dostupné z: <http://user.mendelu.cz/marik/wiki/aplikace/mnc-cz.pdf>



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

E	Energie
h	Planckova konstanta
v	Vlnočet
SERS	Povrchově zesílená Ramanova spektroskopie
RRS	Rezonanční Ramanova spektroskopie
TVC	Celkový počet bakterií
IMS	Imunomagnetická separace
NIMS	Nano-imunomagnetická separace
3-MPBA	3-merkaptofenylboronová kyselina
PCA	Analýza hlavních komponent
CA	Shluková analýza
PLS	Metoda nejmenších čtverců
PLS-DA	Metoda nejmenších čtverců – diskriminační analýzy

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: C. V. Raman [2] .....	10
Obr. 2: Tříhranolový skleněný spektrograf ISF 51 [3] .....	11
Obr. 3: Dvouatomová molekula [4] .....	13
Obr. 4: Příklad vibrace molekuly vody [4] .....	13
Obr. 5: Schéma rozptylu světla v Ramanově spektroskopii [6] .....	14
Obr. 6: Frekvence použití spektroskopických metod pro hodnocení mikroorganismů v potravinářských produktech od roku 2002 do roku 2015 [14] .....	17
Obr. 7: Ramanova spektra jednotlivých bakterií (a - <i>Acinetobacter sp.</i> , b - <i>Agrobacterium sp.</i> , c - <i>Bacillus sp.</i> , d - <i>Chromobacterium violaceum</i> , e - <i>Escherichia coli</i> , f - <i>Pseudomonas fluorescens</i> , g - <i>Citrobacter sp.</i> ) [18] .....	19
Obr. 8: Schéma membránové filtrace SERS [19] .....	20
Obr. 9: Ramanovo spektrum <i>Lysteria monocytogenes</i> [17] .....	23
Obr. 10: Ramanova spektra kvasinek po odečtení fluorescence [21] .....	25
Obr. 11: Transformace Ramanových spekter <i>Staphylococcus epidermidis</i> a <i>E. coli</i> O157:H7 [25] .....	27
Obr. 12: Upravená Ramanova spektra kvasinek [21] .....	27
Obr. 13: Analýza hlavních komponent pro <i>S. epidermidis</i> a <i>E. coli</i> O157:H7 [25] .....	28
Obr. 14: PCA analýza pro <i>Salmonella choleraesuis</i> , <i>Escherichia coli</i> a <i>Shigella flexneri</i> [24] .....	29
Obr. 15: Dendrogram bakterií mléčného kvašení. A-C: <i>Lactobacillus. acidophilus</i> DSM 9126, DSM 20079, DSM 20142; D-E: <i>L. delbruckeii ssp. bulgaricus</i> DSM 20080, DSM 20081; F-H: <i>Streptococcus. thermophilus</i> DSM 20259, DSM 20479, DSM 20617 [26] ...	30
Obr. 16: Ramanovo spektrum různých koncentrací <i>E. coli</i> v jablečné šťávě (a – $10^1$ CFU/ml; b – $10^2$ CFU/ml; c – $10^3$ CFU/ml; d – $10^4$ CFU/ml; e – $10^5$ CFU/ml; f – $10^6$ CFU/ml; g – $10^7$ CFU/ml; h – $10^8$ CGU/ml) [20] .....	31
Obr. 17: Graf intenzity SERS při $1620\text{ cm}^{-1}$ na log CFU/ml <i>E. coli</i> [20] .....	31

---

<i>Obr. 18: Graf závislosti součtu nejmenších čtverců (PRESS) na latentních proměnných [24] .....</i>	<i>32</i>
<i>Obr. 19: kalibrační graf skutečných a předpovídaných vzorků s využitím PLS-DA analýzy [24] .....</i>	<i>33</i>

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1: Příklad detekovaných mikroorganismů v potravinách Ramanovou spektroskopií [14]</i> .....	18
---	----