

Využití non-kultivačních metod ke studiu mikroflóry fermentovaných potravin a nápojů

Iveta Sokolová

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: **Iveta Sokolová**
Osobní číslo: **T14730**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Využití non-kultivačních metod ke studiu mikroflóry
fermentovaných potravin a nápojů**

Zásady pro vypracování:

1. Mikroorganismy v potravinách a nápojích.
2. Mikroorganismy ve fermentovaných potravinách a nápojích, jejich význam a vývoj.
3. Přehled metod využívaných při sledování kvalitativního a kvantitativního zastoupení mikroorganismů v potravinách.
4. Non-kultivační metody využívané při studiu diversity mikroflóry fermentovaných potravin a nápojů.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] POPPING, Bert., Carmen. DIAZ-AMIGO a Katrin. HOENICKE. Molecular biological and immunological techniques and applications for food chemists. Hoboken: Wiley, 2010.

[2] D'AGOSTINO, Martin, Kenneth Clive THOMPSON a Nigel COOK. Molecular microbial diagnostic methods: Pathways to implementation for the food and water industries. 2016. ISBN 9780124169999.

[3] HOLZAPFEL, W. Advances in fermented foods and beverages: improving quality, technologies and health benefits. Boston, MA: Elsevier, 2015. ISBN 9781782420156.

[4] RAY, Ramesh C. a Didier MONTET. Microorganisms and fermentation of traditional foods. ISBN 9781482223088.

[5] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin. Ostrava: Key Publishing, 2012. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-145-0.

Vedoucí bakalářské práce:

doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

3. února 2017

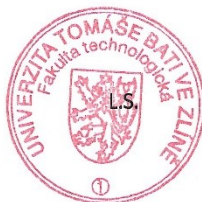
Termín odevzdání bakalářské práce:

5. května 2017

Ve Zlíně dne 3. února 2017



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



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

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 5.5.2017

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). Odpirá-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

Téma této bakalářské práce zní Využití non-kultivačních metod ke studiu mikroflóry fermentovaných potravin a nápojů.

Cílem mé bakalářské práce bylo seznámení s potravinami a působení mikroorganismů na ně, fermentovanými potravinami a nápoji a vyskytujícími se mikroorganismů v nich. Využití kultivačních a non-kultivačních metod ke studiu mikroflóry těchto potravin. Mezi nejdůležitější nekultivační metody patří mikroskopie, imunologické, sérologické a molekulárně-genetické metody. Tyto metody jsou rychlé a efektivní. Mezi imunochemické metody řadíme například metodu ELISA a mezi molekulárně genetické metody například PCR (polymerázová řetězová reakce) a sekvenaci DNA, u bakterií především genu pro 16S rRNA.

Klíčová slova: potraviny, fermentované potraviny, fermentace, kultivační metody, non-kultivační metody

ABSTRACT

The topic of the current thesis is The usage of non-cultivated methods to study of microorganism in fermented food and drinks.

The aim of the current thesis was to familiarization with food and the influence of microorganism, fermented food and drink and occurring microorganism. The usage of cultivated and non-cultivated methods to study microorganism in that food. The most important non-cultivated methods are microscopy, immunological methods, serological methods and molecular-genetic methods. These methods are quick and efektivní. The immunochemical method os for example ELISA method and the molecular-genetic methods are for example PCR and sequence of DNA.

Keywords: food, fermented food, fermentation, cultivated methods, non-cultivated methods

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé práce, doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení, konzultace, trpělivost a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat mé rodině.

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

Dne 5.5.2017 ve Zlíně

Podpis:

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 MIKROORGANISMY V POTRAVINÁCH A NÁPOJÍCH	12
1.1 POTRAVINY	12
1.2 MIKROORGANISMY V POTRAVINÁCH A MIKROBIOLOGICKÉ ZMĚNY POTRAVIN.....	13
1.2.1 Vnější a vnitřní faktory ovlivňující mikroorganismy	14
2 MIKROORGANISMY VE FERMENTOVANÝCH POTRAVINÁCH A NÁPOJÍCH, JEJICH VÝZNAM A VÝVOJ	16
2.1 FERMENTAČNÍ PROCESY PŘI VÝROBĚ POTRAVIN	18
2.2 DEFINICE A KLASIFIKACE BIOTECHNOLOGICKÝCH PROCESŮ	19
2.3 OBECNÉ SCHÉMA MIKROBIÁLNÍHO PROCESU	20
2.4 BIOREAKTORY	20
2.5 MIKROORGANISMY VE FERMENTAČNÍM PRŮMYSLU	21
3 PŘEHLED METOD VYUŽÍVANÝCH PŘI SLEDOVÁNÍ KVALITATIVNÍHO A KVANTITATIVNÍHO ZASTOUPENÍ MIKROORGANISMŮ V POTRAVINÁCH	24
3.1 KLASICKÉ KULTIVAČNÍ METODY	24
3.1.1 Kvalitativní metody	24
3.1.2 Kvantitativní metody	25
3.2 RYCHLÉ A EPIDEMIOLOGICKÉ METODY	25
4 NON-KULTIVAČNÍ METODY VYUŽÍVANÉ PŘI STUDIU DIVERZITY MIKROFLÓRY FERMENTOVANÝCH POTRAVIN A NÁPOJŮ	26
4.1 IMUNOCHEMICKÉ METODY.....	26
4.2 MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ METODY	27
4.2.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	27
4.2.2 Sekvence DNA	28
4.3 NON-KULTIVAČNÍ METODY VYUŽÍVANÉ PŘI SLEDOVÁNÍ MIKROORGANISMŮ V SÝRECH.....	29
4.4 NON-KULTIVAČNÍ METODY VYUŽÍVANÉ PŘI SLEDOVÁNÍ MIKROORGANISMŮ U KYSANÝCH MLÉČNÝCH VÝROBKŮ	29
4.5 NON-KULTIVAČNÍ METODY VYUŽÍVANÉ PŘI SLEDOVÁNÍ MIKROORGANISMŮ VE FERMENTOVANÝCH MASNÝCH VÝROBCÍCH.....	30
4.6 NON-KULTIVAČNÍ METODY VYUŽÍVANÉ PŘI SLEDOVÁNÍ MIKROORGANISMŮ V NÁPOJÍCH	31
ZÁVĚR	32

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	33
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	37
SEZNAM OBRÁZKŮ	38

ÚVOD

Fermentace je biotechnologický proces, při němž se organické látky postupně přeměňují za účasti mikrobiálních enzymů na jednodušší látky. V potravinářství se fermentace využívá při výrobě alkoholických nápojů, octa, droždí, kysaných mléčných výrobků (kefir, jogurty, aj.) a při zrání sýrů, kynutí těsta, kvašení zeleniny a k výrobě fermentovaných masných výrobků (např. Poličan). Cílem fermentace v potravinářství je získat určitou látku, dosáhnout určitých sensorických vlastností potravin a prodloužit trvanlivost výrobku.

Základem fermentačních technologií jsou mikroorganismy, které jsou využívány v široké škále, např. bakterie, kvasinky a plísně.

Má bakalářská práce zahrnuje 4 základní kapitoly.

V první kapitole je pojednáno o charakteristice potravin. Je zde vysvětleno, co je to potravin a působení různých fyzikálních, chemických a biologických nebezpečí na ni. Dále se zde pojednává o mikroorganismech v potravinách a nápojích a jejich mikrobiologických změn v potravinách. Na mikroorganismy působí vnější i vnitřní faktory, například přístup kyslíku, teplota nebo pH suroviny.

V druhé kapitole se zabýváme mikroorganismy ve fermentovaných potravinách a nápojích, jejich významem a vývojem. Nejprve si charakterizujeme fermentační procesy při výrobě potravin, dále definici a klasifikaci biotechnologických procesů a bioreaktory.

V třetí kapitole se seznámíme s kulturačními metodami, které dělíme na kvantitativní a kvalitativní metody. Kvantitativní metody nám stanovují množství mikroorganismů a kvalitativní metody nám ukazují morfologické znaky, například barvu a tvar kolonií.

V čtvrté kapitole se zaměříme na non-kulturační metody využívané při studiu diverzity mikroflóry fermentovaných potravin a nápojů. Non-kulturační metody se dělí na imunochemické metody a molekulárně genetické metody. Mezi imunochemické metody řadíme například metodu ELISA a mezi molekulárně genetické metody například PCR (polymerázová řetězová reakce) a sekvenaci DNA. Tyto metody budou vysvětleny. Dále se zaměříme na non-kulturační metody u sýrů, nápojů, fermentovaných masných výrobků a kysaných mléčných výrobků.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MIKROORGANISMY V POTRAVINÁCH A NÁPOJÍCH

Potraviny musí mít pozitivní dopad na zdraví a kvalitu života všech obyvatel. Potravinářský průmysl má produkovat chutné potraviny, které splňují požadavky zdravotní nezávadnosti a požadavky spotřebitelů. V potravinách se mohou vyskytovat různá nebezpečí (biologické, chemické či fyzikální).[1]

1.1 Potraviny

Potraviny jsou podle zákona o potravinách a tabákových výrobcích (110/1997 Sb.) definovány jako: „Látky určené ke spotřebě člověkem v nezměněném nebo upraveném stavu jako jídlo nebo nápoj, nejde-li o léčiva a omamné nebo psychotropní látky. Za potravinu podle tohoto zákona se považují i přídatné látky, látky pomocné a látky určené k aromatizaci, které jsou určeny k prodeji spotřebiteli za účelem konzumace.“ [1]

Potraviny, společně s doporučenými změnami ve výživě a životním stylu, musí mít pozitivní dopad na zdraví a kvalitu života všech obyvatel. [2]

Potravinářský průmysl má za úkol produkovat chutné potraviny, které jsou v souladu se stavem zdraví a životním stylem populace, a které splňují požadavky spotřebitelů a zdravotní nezávadnost. Proto je nutné vyvinout odborné znalosti, díky kterým by bylo možné předpovídat a sledovat chování a osud známých a nově se objevujících biologických a chemických nebezpečí. Je nutné věnovat větší pozornost zlepšování hodnocení rizik a hodnocení rovnováhy mezi riziky a výhodami. To vyžaduje získávání informací o složení potravin, o chemických a biologických znečišťujících látkách a vývoj technik a přístupů, které by se měly používat při hodnocení rovnováhy mezi riziky a výhodami. Při porovnání rizik a přínosů je důležitý popis a pochopení způsobu, jakým mikroorganismy reagují na různé stimuly svého prostředí a na stresy, které představují potravinové matrice a předpověď jejich účinků na odolnost těchto mikroorganismů. Dále je třeba prohloubit pochopení chování a virulence potravinových patogenů a mechanismů jejich vzniku.[2]

Potravinářské suroviny a potraviny jsou ve většině případů neúdržné materiály, které pozvolna nebo rychle podléhají nežádoucím změnám při skladování či zpracování. Přiměřené znalosti o charakteru změn potravin či surovin, k jakým může dojít při daných podmínkách skladování nebo zpracování podle vlastností produktu, polotovaru nebo suroviny, jsou nut-

né nejenom pro pochopení smyslu jednotlivých technologických kroků, ale také k prevenci změn a k posouzení další použitelnosti potraviny či potravinářské suroviny. Zejména významné jsou takové změny potraviny, které vedou ke vzniku zdravotních nebezpečí z potravin. Během celého cyklu zpracování podléhají potravinářské materiály komplexním změnám, které zahrnují změny fyziologické, enzymové, chemické a mikrobiologické.[3]

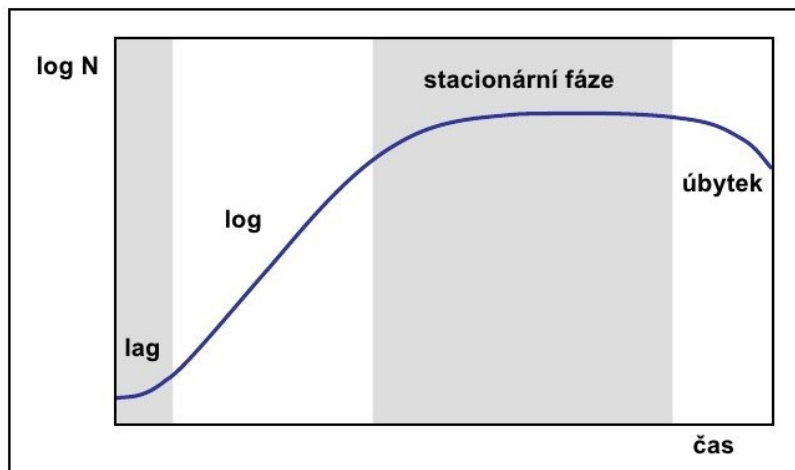
1.2 Mikroorganismy v potravinách a mikrobiologické změny potravin

Mikrobiologické změny jsou z hlediska důsledků (potenciální ohrožení zdraví konzumenta, snížení nutriční a sensorické hodnoty potraviny, znehodnocení potraviny) nejvýznamnějšími změnami, ke kterým v potravinách během zpracování a skladování dochází. Potravinářské suroviny, polotovary a výrobky mohou obsahovat mikroorganismy nebo jejich zárodky, proto jsou součástí každého technologického zpracování konzervační zákroky, které zastaví nebo zpomalí nežádoucí růst mikroorganismů, případně usmrtí ty formy, které by se za podmínek skladování mohly množit a potravinu kazit. Potraviny jsou vhodným substrátem pro mikroorganismy, jednotlivé skupiny mikroorganismů jsou však různě citlivé na životní podmínky. Pro posouzení možných mikrobiologických změn v potravině jsou významné faktory ovlivňující životní projevy mikroorganismů.[4]

Životní cyklus mikroorganismů ovlivňuje řada vnějších i vnitřních faktorů. V potravinách se mikroorganismy mohou vyskytovat v různých fázích růstu. Po vnesení mikroorganismů do produktu nebo po změně podmínek nastává adaptační fáze, tzv. lag fáze, ve které si bakterie zvyká na podmínky a chystá se na růst. Fáze adaptace může být prodlužována podmínkami manipulace, technologickou úpravou a skladováním suroviny, polotovaru nebo rozpracovaného pokrmu, např. vakuovým balením, marinací, solením, okyselením, přidávkem konzervačních látek apod. Na lag fázi navazuje tzv. log fáze, fáze logaritmického růstu, během které dochází k dělení buněk. Většina technologických postupů zpracování potravin v sobě zahrnuje některé konzervační zákroky, které ovlivňují růst mikroorganismů nebo jejich počet v potravině. Další fáze je stacionární, ve které se zpomaluje růst mikroorganismů a vzniká stav rovnováhy, kdy se počet buněk nemění a dochází k akumulaci metabolitů a je vyčerpáno živné médium. A poslední fáze je fáze odumírání, neboli fáze úbytku buněk, kdy počet odumřelých buněk je větší než počet nově vzniklých, z důvodu nedostatku živin, sníženému pH a hromaděním toxických produktů buněčného

metabolismu. Může docházet ke tvorbě klidových stádií. Růstová křivka buněčné kultury je znázorněna na obrázku číslo 1.[5]

Růstová křivka buněčné kultury



Obrázek 1: Růstová křivka mikroorganismů [5]

1.2.1 Vnější a vnitřní faktory ovlivňující mikroorganismy

Na mikroorganismy působí mnoho faktorů, které dělíme na vnější a vnitřní. Mezi vnitřní faktory řadíme dostupnost živin, pH, redoxní potenciál, vodní aktivitu a antimikrobní aktivity. Mezi vnější faktory řadíme vlhkost, teplotu, záření a atmosféru.

Pro růst mikroorganismů je nezbytné odpovídající složení a dostupnost živin. Rychlejší zkáze budou podléhat ty potravinářské suroviny, polotovary a výrobky, které mají optimální složení snadno dostupných živin (maso, mléko, vejce atd.), neboť tyto živiny jsou při dalších vlastnostech lepším substrátem pro růst mikroorganismů.[6]

Významný je také vliv teploty. S nižší teplotou klesá rozpustnost plynů v potravine, zpomalují se chemické reakce, klesá rychlost životních projevů kontaminující mikroflóry. Potravinářsky významné mikroorganismy lze podle požadavků na optimální teploty růstu rozdělit do tří skupin:

- Termofilní mikroorganismy – optimální teplota růstu kolem 55°C, rozsah růstu v rozmezí 45-70°C
- Mezofilní mikroorganismy – optimální teplota růstu je kolem 35°C, rozsah růstu mezi 10-45°C
- Psychrofilní mikroorganismy – optimální teplota růstu je kolem 15°C, rozsah růstu mezi 5-20°C

Mikroorganismy schopné růst při chladírenských teplotách se označují jako psychrotrofní. Mezi psychrotrofní mikroorganismy patří mnohé plísňe, kvasinky, gram-negativní bakterie z rodů *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Serratia* a *Aeromonas*, z gram-pozitivních to jsou *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium* a *Listeria*. [3]

Záhřev na teploty, při kterých dochází k inaktivaci mikroorganismů, je součástí většiny procesů při zpracování potravin. Pasterace a sterilace jsou používány jako základní konzervační metody. [4]

Obsah vody v potravině obvykle vyjadřovaný jako aktivita vody a_w , závisí na obsahu vody v potravině a na jejím složení. Aktivita vody je definována jako podíl parciálního tlaku vodní páry nad potravinou a parciálního tlaku vodní páry čisté vody stejné teploty. Schopnost MO růst je ovlivňována kyselostí potravin – hodnotou pH. Potravinu se podle hodnoty pH dělí na kyselé a málo kyselé, mezní hodnotou je pH 4,0, která je považována za hranici, pod kterou neklíčí spory sporulujících bakterií. Nejodolnějším potravinářsky významným sporulujícím mikroorganismem je *Bacillus coagulans*. [7]

Na mikrobiální změny potravin během skladování má vliv také přístup kyslíku v potravině. Podle potřeby kyslíku dělíme mikroorganismy na aerobní, fakultativně anaerobní a anaerobní. Mezi aerobní řadíme *Listeria monocytogenes*, rody *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Moraxella* a *Acinetobacter*. Mezi fakultativně anaerobní patří např. *Yersinia enterocolitica*, rody *Salmonella* a *Lactobacillus*. Anaerobní je rod *Clostridium*. [8]

2 MIKROORGANISMY VE FERMENTOVANÝCH POTRAVINÁCH A NÁPOJÍCH, JEJICH VÝZNAM A VÝVOJ

Zákysové kultury jsou vybrané definované a živé mikroorganismy, které se používají ve vhodné formě jako očkovací dávka s cílem zahájení procesu fermentace, která má zlepšit chuť, vůni a trvanlivost, případně zajistit další požadované funkční vlastnosti produktu. Zákysové kultury používané v mlékárenských technologiích se rozdělují podle různých kritérií, např. podle jejich složení, teploty růstu nebo na základě jejich funkcí:

- Podle obsažených skupin mikroorganismů se kultury dělí na:
 - Bakteriální – mezofilní a termofilní
 - Kvasinkové
 - Plísňové
 - Smíšené (obsahující bakterie i kvasinky)
- Podle druhové a kmenové skladby se kultury dělí na:
 - Jednokmenové
 - Vícekmenové
 - Směšné vícekmenové
 - Tradiční
- Podle funkce lze rozlišovat kultury na:
 - Startovací
 - Probiotické

Mezofilní bakteriální kultury jsou složeny z mezofilních koků rodů *Lactococcus* a *Leuconostoc*. V kulturách obvykle dominují (obsah více než 90 %) tzv. kyselinotvorné koky *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, které při homofermentativním rozkladu laktosy, obsažené v mléce, produkují L(+) izomer kyseliny mléčné, který je fyziologicky výhodnějším. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* je z uvedené dvojice mikroorganismů citlivější k působení různých vnějších a vnitřních faktorů, např. teplot nebo vyšší koncentrace NaCl a při opakovaném přeočkování se jeho podíl v mezofilních kulturách snižuje. Druhou složkou mezofilních kultur tvoří tzv. aromatvorné koky, často nazývané rovněž citrát využívající (Cit⁺) koky, které se kromě produkce kyseliny mléčné z laktosy vyznačují rozkladem citrátu v mléce, z nichž produkují oxid uhličitý a směs čtyřuhlíkatých sloučenin. Aromatvorné koky jsou zastoupeny *Lactococcus lactis*

subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, který používá homofermentační proces. Dále máme heterofermentativní druhy např. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* a *Leuconostoc lactis*, které tvoří z laktosy D(-) izomer kyseliny mléčné, oxid uhličitý a ethanol nebo acétát. Fermentované mléčné výrobky s využitím mezofilních BMK se obvykle dělí na kysaná mléka, kysané smetany a kysané podmásli.[3]

Mezi termofilní bakteriální kultury se řadí rody *Lactobacillus*, *Streptococcus* a *Bifidobacterium*. Pro mlékárenské fermentace se tradičně využívají *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* a *Lactobacillus helveticus* pro výrobu sýrů s vysokodohřívanou sýřeninou, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* jako složka jogurtové kultury společně se *Streptococcus thermophilus*, který nalézá uplatnění také při výrobě sýrů. *Lactobacillus acidophilus* je mikroorganismus intestinálního původu a je využívám pro výrobu různých mléčných výrobků z důvodů pozitivního působení na organismus člověka i zvířat. Pro výrobu mlékárenských výrobků se používají i další bakterie intestinálního původu s pozitivním působením na organismy vyšších živočichů jako jsou laktobacily a bifidobakterie. Celosvětově patří k nejrozšířenějším fermentovaným výrobkům s termofilními BMK jogurty. Jogurtové výrobky se dělí na přírodní jogurty a ochucené jogurty, které mohou obsahovat různé nemléčné složky. Z hlediska použité mikroflóry se ve většině zemí definuje jogurt jako výrobek obsahující živé bakterie *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*. [9]

Podle použitého způsobu fermentace a dalšího zpracování koagulátu se rozlišují jogurty s nerozmíchaným koagulátem – Set Yoghurts (fermentace probíhá přímo ve spotřebitelském obalu), jogurty s rozmíchaným koagulátem – Stirred Yoghurts (fermentace probíhá v tanku, po promíchání koagulátu a vychlazení naplnění do drobných obalů), jogurty pitné – Drink Yoghurts (fermentace v tanku, po ochlazení na 18-20°C přidavek přísad ve vyrovnávacím tanku a následně často ošetření s cílem prodloužení trvanlivosti). [9]

Kultury pro výrobu sýrů se obvykle dělí na kultury primární, které obsahují BMK a používají se především pro produkci kyseliny mléčné z laktosy v počáteční fázi výroby sýrů a na mikroflóru sekundární, která je z hlediska taxonomického i funkčního velmi variabilní a zahrnuje NSLAB (*Non-Starter Lactic Acid Bacteria*, tj. BMK nezákysového původu), propionové bakterie, koryneformní bakterie, mikrokoky, stafylokoky, kvasinky a plísně. Tato

sekundární mikroflóra hraje důležitou roli při zrání sýrů a významně přispívá k organoleptickým vlastnostem sýrů. [9]

Propionová kultura je tvořena druhy rodu *Propionibacterium*, které produkují velké množství kyseliny propionové a octové a oxidu uhličitého z laktosy a z laktátu. Oxid uhličitý tvoří velká oka nalézající se v sýru Ementál a podobných typech sýrů, ostatní metabolity včetně mastných kyselin a aminokyselin přispívají k typické chuti a vůni těchto sýrů.[3]

Pro výrobu sýrů s plísní na povrchu se přidává do standardizovaného mléka plísněná suspenze *Penicillium camemberti* a mezofilní kultury.[3]

Fermentované výrobky s bakteriemi a kvasinkami jsou fermentované mléčné nápoje asijského původu: kefir a kumys. Obvykle se zde vyskytují laktokoky, leukonostoky, laktobacily, laktosu fermentující kvasinky rodů *Kluyveromyces*, *Candida* a *Debaryomyces*, případně laktosu nefermentující kvasinky rodů *Saccharomyces* a *Pichia*. [3]

Probiotika jsou živé mikroorganismy, které při podání v adekvátním množství přinášejí hostiteli zdravotní výhody. Nejčastěji jsou jako probiotika používány BMK a bifidobakterie, ale lze používat i jiné rody bakterií (např. *Bacillus*) a některé kvasinky (*S. cerevisiae* *Bou-lardii*). [3]

2.1 Fermentační procesy při výrobě potravin

Fermentační (kvasné) technologie jsou zařazovány mezi mikrobiální technologie a jako takové jsou součástí biotechnologií. Společným jmenovatelem těchto technologií je optimální využití biologických, chemických a inženýrských technik pro transformaci substrátu na produkt. Fermentací se zajišťuje údržnost výrobků, které nejsou tepelně opracovány. Fermentační technologie často zařazujeme mezi klasické biotechnologie, které se především vyvíjely v oblasti potravinářských výrob. Kromě výroby fermentovaných nápojů (pivo, víno a nápoje získané destilací prokvašených cukerných roztoků) patří do této kategorie výrob i kvasná produkce ethanolu, jehož použití přesahuje rámec potravinářského průmyslu. Do mikrobiálních a pro potravinářský průmysl významných technologií patří i technologie založené na submerzních aerobních procesech jako je výroba pekařského droždí, octa a několika dalších organických kyselin, které našly uplatnění v potravinářském průmyslu (citronová, mléčná, glukonová aj.) Také intracelulární a extracelulární produkty a vlastní biomasa mnohých mikroorganismy poskytuje možnosti využití v potravinářském

průmyslu (např. enzymy, lipidy,..) a dále k výrobě řady látek, jako např. biofaktorů důležitých pro výživu člověka a zvířat a léčiv. Mikroorganismy mají také uplatnění při výrobě řady fermentovaných potravin, např. při výrobě některých chlebů, druhů pečiva, různých fermentovaných omáček (jejichž původ lze najít ve východní Asii), jogurtů, kefiru, některých sýrů (Roquefort, Gorgonzola, Emmental), kysané zeleniny (zelí, okurky) a při úpravě některých čajů (Pu-erh). Fermentační procesy pronikají stále do většího počtu výrob potravin. Rozšířila se především výroba antibiotik, enzymů, organických kyselin, aminokyselin, vitaminů, růstových faktorů, steroidních hormonů a podobně.[10]

Základy fermentačních technologií mají hluboké kořeny v historii lidské činnosti. Sumerové a Babyloňané vyráběli pivo a připravovali víno již před sedmi tisíci lety. Egypťané objevili, že mohou kvasný pochod využít i při přípravě těsta. Již v dávnověku se vyráběl ocet a připravoval se mléčně kvašený produkt podobný jogurtu. Vývoj fermentačních technologií lze rozdělit do pěti období. První trvalo od starověku do roku 1886, tj. období Pasteurových objevů, které postavily empirickou kvasnou technologii na exaktní základ. Druhé období (1886-1940) otevřelo možnost výroby čistých biotechnologických produktů – ethanolu, butanolu, acetonu, kyseliny citrónové aj. Třetí období (1940-1960) bylo érou antibiotik. Čtvrté období (1960-1975) přineslo kultivaci buněk *in vitro*, přípravu vakcín, krmných mikrobiálních bílkovin, čistých aminokyselin, technických enzymů a bakteriálních polysacharidů. Páté období (po roce 1975) vychází z převratných objevů molekulární biologie a genetiky. Za skutečný převrat lze uvést výrobu inzulínu pomocí genově manipulované kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a bakterie *Escherichia coli*. [11]

2.2 Definice a klasifikace biotechnologických procesů

Kvasný proces se týká pouze pochodů, při kterých probíhá kvašení, kdy dochází za nepřístupu vzduchu (=anaerobně) k odbourávání cukrů za vzniku oxidu uhličitého a některého metabolitu. Hlavní představitel tohoto kvašení je lihové kvašení, ale patří zde i mléčné nebo máselné kvašení. Ale fermentační proces se týká mikrobiálních procesů i za přístupu vzduchu (=aerobně), kdy mikroorganismy využívají kyslík a uhlíkatý zdroj. Všechny tyto mikrobiální procesy jsou obecně založeny na reakcích mikroorganismů a využívají se pro výrobu důležitých produktů nebo při zneškodnění některých nežádoucích látek vyskytujících se v životním prostředí. Pro růst mikroorganismů a pro tvorbu jimi vytvářených pro-

duktů je třeba zajistit vhodné podmínky (složení média, pH, teplota, oxidačně-redukční potenciál, aj.). Mikroorganismy musí mít pro svou činnost zajištěn dostatečný přívod živin a energie. Kromě uhlíku musí mít mikroorganismus k dispozici zdroje dusíku, fosforu a dalších biogenních prvků, specifické růstové faktory (vitaminy, aminokyseliny, minerální látky apod.), které si mikroorganismus nemůže sám syntetizovat. Z průmyslového hlediska se mikrobiální procesy dělí na:[9]

1. Procesy, kde hlavním produktem je biomasa, která slouží pro lidskou výživu a krmivářské účely
2. Procesy, kde hlavním produktem je intracelulární nebo extracelulární produkt, tj. metabolit, který dělíme na primární či sekundární.

2.3 Obecné schéma mikrobiálního procesu

Fermentační proces závisí na použité surovině, ze které se připravuje fermentační médium a vznikajícím produktem. Pokud jsou produktem nápoje, jako je pivo a víno, nebo ocet, pak nám odpadá většina izolačních a purifikačních operací (je nutné však oddělit kvasinky, v případě octa bakterie, od kvasu). Na druhé straně přibudou operace spojené se zušlechťením produktu (dokvášení, zrání, aj.). V případě výroby ethanolu nebo destilátů je produktem rafinovaný alkohol nebo koncentrovaný lihový roztok. Pak je třeba destilace a rafinace a v případě destilátů je potom důležité zrání. U produktů, které se musí z média nebo z buněk izolovat (vitaminy, některé enzymy, aj.) jsou vedle suroviny rozhodující právě konečné operace (izolace a purifikace produktu).[12]



2.4 Bioreaktory

Bioreaktory (fermentory) mají důležitou roli při submerzních fermentacích a kultivacích mikroorganismů. Jsou to nádoby různého objemu, ve kterých probíhá mikrobiální proces. Jsou opatřeny vnitřním nebo vnějším chlazením, ohříváním, míchacím zařízením, přívodem vzduchu, odvo-

dem výdechových plynů, mechanickým nebo chemickým odpěňováním, zařízením na odběr vzorků, měřením a regulací teploty, pH, měřením koncentrace rozpuštěného kyslíku, oxidu uhličitého, redox-potenciálu, obsahu kyslíku a oxidu uhličitého v odcházejícím plynu, koncentrace biomasy, substrátu.[3]

Bioreaktory jsou zhotoveny z materiálu, který nepodléhá korozi. U diskontinuálních procesů slouží též jako sterilátory fermentačního média. Bioreaktory pro anaerobní procesy jsou konstrukčně jednodušší než pro aerobní procesy.[3]

2.5 Mikroorganismy ve fermentačním průmyslu

Průmyslové fermentační technologie s výjimkou jedné (výroba octa) jsou založeny na využití kvasinek rodu *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces* aj. Kvasinky patří do skupiny eukaryontů, spolu s houbami, rostlinnými a živočišnými buňkami. Při kultivaci se rozmnožují nepohlavním (vegetativním) způsobem. Tvar buněk je různý, kulturní kvasinky pivovarské, vinařské, lihovarské a droždářské mají tvar kulovitý až vejčitý. Velikost se pohybuje kolem 6x8 μm (tj. šířka x délka) a závisí na složení média a způsobu kultivace. Kvasinky rodu *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia* a mnoha dalších rodů se vyznačují oxidačním metabolismem sacharidů, žádnou nebo jen velmi malou produkcí ethanolu a za určitých podmínek (nedostatek živin, kyslíku) tvoří pseudomycelia. Kvasinky těchto rodů se používají při výrobě krmného droždí. Kvasinky rodu *Candida* nevytvářejí spory, kdežto kvasinky rodu *Kluyveromyces* jsou sporogenní. Nejznámější kvasinky používané pro výrobu krmného droždí jsou *Candida utilis*, které jsou asexuální formou kvasinek rodu *Pichia jadinii*. [14]

Kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae* mají mimořádnou důležitost při alkoholovém kvašení různých surovin. Řadíme mezi ně i různé další poddruhy známé např. jako spodní pivovarské kvasinky (známé též jako *Saccharomyces carlsbergensis*, později jako *Saccharomyces uvarum*), vinné kvasinky apod. K výrobě piva se používají jak kvasinky spodního kvašení, tak i kvasinky svrchního kvašení. Kvasinky svrchního kvašení se vyznačují spíš hydrofobním povrchem a jsou vynášeny při kvašení vznikajícím CO₂ k hladině, kdežto kvasinky spodního kvašení mají povrch buněk spíš hydrofilního charakteru a snadno sedimentují. Kvasinky druhu *Saccharomyces cerevisiae* jsou fakultativně anaerobní mikroorganismy, což znamená, že jejich primární činností je fermentace (kvašení), ale že jsou

schopny růst a utilizovat sacharidy i za aerobních podmínek. Hlavním jejich metabolitem je ethanol tvořený v buňce z monosacharidů, které jsou následně řadou enzymových reakcí přeměny na konečný produkt ethanol a oxid uhličitý. Přitom vznikají i některé další produkty, jako je např. glycerol, acetaldehyd, diacetyl, kyselina octová aj. Kvasné médium by mělo obsahovat určité malé množství rozpuštěného kyslíku, takže stačí, aby médium bylo na počátku kvašení provětráno. Aerobního způsobu kultivace se využívá při výrobě pekařského droždí. Rychlost štěpení sacharidu je větší při anaerobním pochodu než při aerobním.[14]

Při řadě fermentačních procesů se využívají i bakterie mléčného kvašení – hlavně laktobacily a pediokoky, které zkvašují cukry (přítomné v mase a přidané) na organické kyseliny, zejména kyselinu mléčnou. Snížením pH (i tvorbou specifických bakteriocinů a peroxidu) se zabrání růstu hnilobných mikroorganismů a zajišťuje se údržnost. Ke zvýšení údržnosti pak přispívá i snížení aktivity vody (přídavkem soli a usušením) a konzervační složky z kouře. Snížením pH se zároveň zpevní struktura (denaturace svalových bílkovin v okolí izoelektrického bodu) a stabilizuje se barva. Činnostmi výše uvedených i dalších mikroorganismů (zejména mikrokoků) vznikají četné sensoricky aktivní látky, které pak dávají vznik chuti a aromatu typickému pro fermentované salámy. V minulosti se vystačilo s přirozenou, tzv. domácí mikroflórou, dnes se fermentované salámy vyrábějí s přídavkem čistých mikrobiálních kultur, tzv. startovacích kultur.[10]

U některých fermentovaných výrobků je na povrchu porost plísní. Podmínkou pro růst plísní je absence fungicidních složek kouře, proto bývají tyto salámy většinou jen sušené, a tedy neuzené. Fermentované salámy patří mezi nejkvalitnější a technologicky nejnáročnější výrobky. Nejoblíbenější jsou ty, které jsou s porostem ušlechtilých plísní.

Fermentované trvanlivé salámy nejsou tepelně opracovány. Z tradičního sortimentu zde patří Poličan, uherský salám, čabajska klobása, lovecký salám, Herkules, Křemešník aj. Při



Obrázek 3: Křemešník [15]

skladování při pokojové teplotě vydrží takto vyrobený salám i několik měsíců. Je nutné je uchovávat v suchu.[10]

3 PŘEHLED METOD VYUŽÍVANÝCH PŘI SLEDOVÁNÍ KVALITATIVNÍHO A KVANTITATIVNÍHO ZASTOUPENÍ MIKROORGANISMŮ V POTRAVINÁCH

K průkazu zastoupení mikroorganismů v potravinách a ve výrobním prostředí se používají tři typy metod- klasické kultivační metody, rychlé metody a epidemiologické metody. Tyto tři metody se vzájemně doplňují. Konvenční kultivační metody používané pro detekci mikroorganismů v potravinách jsou dobře zavedené, jednoduché, levné a mohou být použity pro kvantitativní i kvalitativní analýzu. Mezi jejich nevýhody, zejména při stanovení patogenních mikroorganismů, patří nezbytnost kultivace v několika živných médiích, detekce růstu vizuálně a potřeba provedení konfirmačních testů (biochemických a sérologických). To má za následek dlouhou dobu stanovení. [16]

3.1 Klasické kultivační metody

Tyto metody se používají ke kontrolním rozborům, jejichž účelem je rozhodnout o přípustnosti poživatiny pro lidskou nebo živočišnou konzumaci, k vystavování garančních osvědčení jakosti, k rozborům potravin, u kterých je podezření, že by mohly způsobovat alimentární onemocnění, k mikrobiologické kontrole výrobního zařízení a prostředí. Klasické kultivační metody dělíme na kvalitativní metody a kvantitativní metody. [16]

3.1.1 Kvalitativní metody

Jsou to metody průkazu přítomnosti či nepřítomnosti zjišťovaného mikroba v určitém, metodou předepsaném množství vzorku. Tento typ stanovení je časově i materiálově náročnější a obvykle probíhá v několika na sobě navazujících stupních. Skládají se z těchto operací: resuscitace, pomnožení v selektivním médiu, kultivace na selektivně-diagnostických tuhých médiích, potvrzení a identifikace. Účelem resuscitace je obnovení životaschopnosti poškozených patogenních mikrobů ve vzorku, které byly poškozeny technologickými stresey během zpracování potraviny. Poškozené mikroorganismy projevují zvýšenou citlivost k inhibičním látkám v selektivních médiích. Resuscitace slouží pouze k reparaci poškozených buněčných funkcí. Účelem pomnožení v selektivním médiu je získat patogenní mikroby v množství potřebném pro další operace. Patogeny jsou obvykle ve vzorku přítomny v nízkém počtu nebo ve smíšené populaci s velkými počty doprovodné mikroflóry. Sele-

tivní média obsahují přísady, které by měly inhibovat pouze ten mikroorganismus, který nebudeme stanovovat. Při kultivaci na selektivně-diagnostických médiích je účelem získat jednotlivé dobře izolované kolonie prokazovaného mikroba, které vykazují některé jeho typické vlastnosti (morfologické, biochemické, sérologické) a poskytnout mikrobiální materiál z kolonií k identifikačním testům. Při potvrzení a identifikaci se stanoví příslušnost vyizolovaného mikroorganismu k určité taxonomické skupině, rodu a druhu.[17]

3.1.2 Kvantitavní metody

Tyto metody se používají při stanovování počtu životaschopných kolonií cílové skupiny mikroorganismů. Mezi základní techniky patří metoda zalití, metoda roztěru a metoda MPN (most probably number = metoda pravděpodobného počtu). Očkuje se na selektivně-diagnostická média přímo z (tekutého) vzorku, základního ředění nebo dalších ředění. Při nižších počtech se stanovení provádí v tekutých selektivních médiích metodou MPN ,nebo počítáním kolonií po zkoncentrování zjišťovaného mikroba ve vzorku centrifugací, membránovou filtrací nebo imunomagnetickou separací. Stanovení počtu některých mikroorganismů (zejména patogenů) může být rozšířeno o krok resuscitace, jehož cílem je zachycení i stresovaných či subletálně poškozených buněk.[17]

3.2 Rychlé a epidemiologické metody

Klasické kultivační metody vyžadují delší dobu na průkaz patogenních mikroorganismů. Proto se využívají i rychlé metody, jejichž výhodou je především rychlé získání negativních výsledků, tj. zjištění nepřítomnosti příslušného patogenního mikroorganismu ve vzorku. Pozitivní výsledky vyžadují obvykle další vyšetření vzorku klasickou metodou.

Epidemiologické metody se používají pro zjištění sérovaru patogena, viz kapitola 4.[17]

4 NON-KULTIVAČNÍ METODY VYUŽÍVANÉ PŘI STUDIU DIVERZITY MIKROFLÓRY FERMENTOVANÝCH POTRAVIN A NÁPOJŮ

Mezi nejdůležitější nekultivační metody patří mikroskopie, imunologické, sérologické a molekulárně-genetické metody. Mikroskopie se v mikrobiologii používá k přímému vyšetření infekčního materiálu, k bližší identifikaci izolovaných kultur a také ke kontrole čistoty kultur. Lze používat nativní preparáty, které umožňují pozorovat především pohyb a dělení mikroorganismů. Častěji se používá barvených preparátů, u nichž lze pozorovat tvar, vzhled a uspořádání mikrobů a při použití speciálních technik i struktury pouzdra, bičíky, ale také bakteriální spory.[18]

Přestože se v současné době stále v široké míře využívá ke stanovení mikroorganismů klasických kultivačních metod, nutnost zrychlení a zefektivnění detekce vede ke zkoumání nových metod pro stanovení a detekci biologických makromolekul a živých buněk. Mezi tyto metody patří kromě PCR [19] různé zbarvení [20], průtoková cytometrie [21], dielektroforéza [22], field-flow frakcionace, hmotnostní spektrometrie a elektromigrační techniky. [23]

4.1 Imunochemické metody

Základem všech imunochemických metod je interakce protilátek s antigenem. Antigen je molekula schopná vyvolat v živých organismech produkci specifických protilátek. Protilátky jsou proteiny produkované bílými krvinkami živočichů po jejich infekci cizí molekulou nebo mikroorganismem. Při těchto metodách jsou používány *in vitro* polyklonální, monoklonální nebo rekombinantní protilátky tvořené proti antigenním strukturám, které jsou charakteristické pouze pro bakterie daného rodu. Mezi nejpoužívanější imunochemickou metodu patří enzymová imunoanalýza ELISA, kdy je jeden z imunoreaktantů vázán na tuhou fázi a druhý je značený enzymem. Detekce je prováděna prostřednictvím enzymové reakce. Mezi největší předností imunochemických stanovení patří rychlost, jednoduchost provedení, možnost stanovení velkého počtu vzorků současně a především možnost detekce ve složitých maticích. Rozšíření těchto technik podporuje také nenáročnost, laboratorní vybavení a relativně nízká cena. Nevýhodou je nutnost namnožit bakterie před vlastní imunodetekcí běžnými kultivačními metodami.[24]

4.2 Molekulárně genetické metody

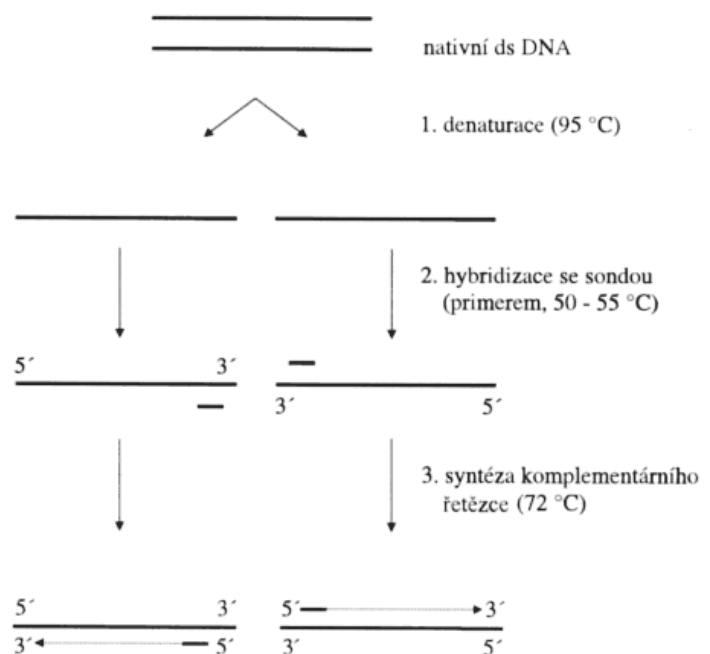
Molekulárně-genetické metody umožňují určit mikroorganismus na základě jeho genetické informace. K tomu jsou využívány různé molekulárně-genetické techniky, z nichž nejvýznamnějšími jsou hybridizace a polymerázová řetězová reakce (PCR). Tyto metody jsou založeny na specifické komplementaci (hybridizaci) mezi hledaným úsekem jednovláknové nukleové kyseliny z lyzovaných buněk bakterie a sondou.[25]

Sondou rozumíme synteticky připravenou krátkou sekvenci nukleotidů komplementární k hledanému úseku. Tyto metody využívají pro specifickou detekci bakterie charakteristické sekvence jejího genomu. Nález takové sekvence ve zkoumaném materiálu indikuje přítomnost dané bakterie. Molekulárně-genetické metody jsou velice citlivé v případě použití čistých bakteriálních kultur, ale při stanovení ve složitých maticích (např. v některých potravinách) se citlivost výrazně snižuje. Proto je často nezbytné mikroorganismy před vlastní analýzou separovat. Lze při tom využít jak metody fyzikálně-chemické (např. filtrace, extrakce), tak metody bioafinitní (např. imunochemické).[24]

4.2.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce se používá k průkazu mikrobiální DNA ve vyšetřovaném vzorku. Její výhodou je rychlé zmnožení (amplifikace) vybraného úseku DNA a má schopnost prokázat i nekultivovatelné mikroby. Uplatňuje se tedy v situacích, kde klasické mikrobiologické techniky selhávají.[26]

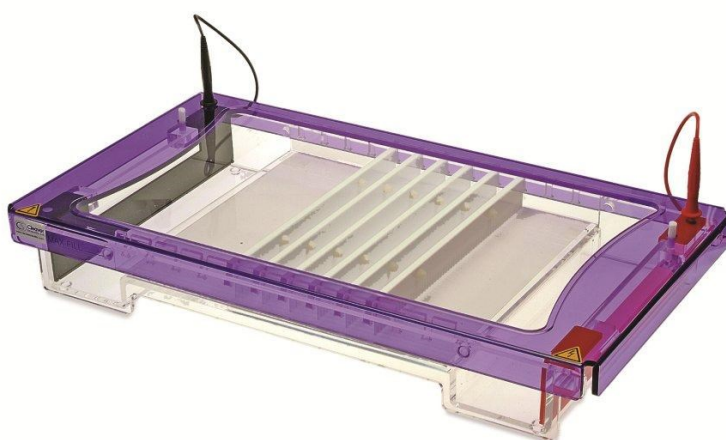
Množený (amplifikovaný) úsek DNA je ohraničen tzv. primery (oligonukleotidy), což jsou fragmenty DNA o 20-25 nukleotidech, které se díky své komplementaritě přisadí právě ke koncům vybraného úseku. Od přisedlých primerů probíhá syntéza DNA. Samotnou syntézu provádí termostabilní DNA polymeráza,



Obrázek 4: Schéma PCR

izolovaná nejčastěji z bakterie *Thermus aquaticus*, odtud název Taq polymeráza. Při reakci je využíváno cyklických změn teplot, které umožňují denaturaci DNA, přisedání primerů a syntézu DNA.[27]

K analýze produktů polymerázové řetězové reakce mohou být použity různé metody. Např. hybridizace, ELISA nebo sekvenční analýza nebo separace ampliconů pomocí agarózové gelové elektroforézy. [27]



Obrázek 5: Elektroforézní systém [38]

4.2.2 Sekvence DNA

Sekvence DNA je souhrnný termín pro biochemické metody, jimiž se zjišťuje pořadí nukleotidů (A, C, G, T) v krátkých úsecích DNA. Tyto sekvence jsou součástí dědičné informace v jádru, plasmidech, mitochondriích a plastidech. Tato metoda přečte genomy lidské, ale také mnoho jiných organismů, včetně rostlin, živočichů a mikrobů.[29]

4.3 Non-kultivační metody využívané při sledování mikroorganismů v sýrech

Mikroflóra sýrů je charakterizována přítomností velkého množství bakterií, kvasinek a plísní, například bakterií mléčného kvašení a *Penicillium camemberti*. Toto množství mikroorganismů ovlivňuje mnoho faktorů. V sýrech se vyskytují mikrobiální kultury v různých fázích dozrávání. Mikroorganismy se stanovují mikrobiologickými technikami na bázi kultivace a genotypové charakteristice. Non-kultivační metody stanovení jsou založeny na extrakci DNA nebo RNA, které nabízí možnost profilování i metabolicky neaktivních mikroorganismů. Používá se kombinace metod kultivačních a nekultivačních. U stanovení mikroorganismů, které se vyskytují v různých druzích sýrů, se z non-kultivačních metod používají především metody typu sekvenování, PCR [30], automatizovaná analýza mezerníkové oblasti mezi geny 16S rRNA a 23S rRNA (ARISA), pyrosekvence.[31]

Pomocí pyrosekvence bylo odhaleno několik mikrobiálních kmenů (*phyllum*), a to kmen *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroides*, *Acinetobacteria* a také houbový kmen *Ascomycota*. Další vyšetření sekvenace zjistila rod *Penicillium*. Další druhy bakterií, které byly touto metodou zjištěny byli zástupci rodů *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Arthrobacter*, *Staphylococcus* a *Faecalibacterium*. Na mikrobiální složení v sýrech má velký vliv obsah soli, doba zrání sýru a další složení sýru. Sýry s vyšším obsahem soli obsahují především *Lactobacillus*. *Brevibacterium* je známý, že vytváří na povrchu sýru skvrny a jiný odstín sýru. *Psychrobacter* se celkem často objevuje na sýrových površích, ale jeho role je nejasná, nejspíš přispívá chuti sýru, protože vytváří aldehydy. [32]

4.4 Non-kultivační metody využívané při sledování mikroorganismů u kysaných mléčných výrobků

Kysané mléčné výrobky jsou všechny mléčné výrobky, které byly připraveny z mléka za přídavku kysacích kultur neboli fermentujících bakterií. Nejčastěji se používají bakterie rodu *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Lactococcus*. Tyto bakterie mají schopnost přeměnit laktosu na kyselinu mléčnou. Při této přeměně stoupá kyselost mléka. Řadíme sem jogurty,

kysaná, acidofilní nebo jogurtová mléka a kysanou smetanu. Kefír například obsahuje ještě kvasinky.[3]

Pro stanovení mikrobiálních kultur u kysaných mléčných výrobků se používá nejčastěji metoda PCR, která je založená na syntéze specifické sekvenace DNA. Pro identifikaci a separaci fragmentů DNA, které byly získány pomocí metody PCR, je možné využít řadu různých metod. Nejčastěji se používá elektroforéza v agarózovém, nebo polyakrylamidovém gelu a denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE). Výběr typu gelu je závislý na velikosti produktu PCR, tedy fragmentů. [33]

Složení kefiru a kefirových zrn se zkoumá pomocí široké škály mikrobiologických a molekulárních metod. Pro identifikaci a zjišťování mikrobiálních populací se nejčastěji používá PCR a DGGE. Hlavní bakteriální druhy, které se vyskytují v kefiru, byly identifikovány jako *Lactobacillus kefiranofaciens* a *Lactobacillus kefir*. Dalšími identifikovanými bakteriálními druhy jsou např.: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, a další zástupci, např. *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus*, *Acetobacter aceti* a další. U některých kefirových zrn byly izolovány i octové bakterie. Tyto bakterie hrají významnou roli v chuti a v celkové konzistenci. Z kvasinek se v kefiru nacházejí druhy *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Torulaspora*, *Candida*. Některé mikroorganismy jsou schopny produkovat slabé organické kyseliny a antibiotika s baktericidním účinkem pro patogenní mikroorganismy.[33]

4.5 Non-kultivační metody využívané při sledování mikroorganismů ve fermentovaných masných výrobcích

U masných fermentovaných výrobků se můžeme setkat s řadou mikroorganismů a to především s bakteriemi mléčného kvašení. Některé druhy masných výrobků mohou mít také porost s ušlechtilou plísní.[10]

U masných fermentovaných výrobků se nejčastěji setkáme s metodou PCR s agarózovou gelovou elektroforézou a s metodou NIR spektroskopie, což je nedestruktivní metoda, kterou lze stanovit obsah základních chemických látek. Tato metoda spočívá v měření změny intenzity absorbovaného nebo odraženého elektromagnetického záření v oblasti vlnových délek 780-2500 nm molekulami ve vzorku. Pomocí NIR spektroskopie jsme schopni sta-

novit množství vody, tuku a bílkovin. [34] Tato metoda se dá však použít i pro prokázání činnosti mikroorganismů, které mají podíl na fermentačních procesech. Mikroorganismy se podílí na tvorbě charakteristických vlastností masných výrobků, je možné sledovat změnu fyzikálních vlastností, např. aktivitu vody či pH. [35]

U masných výrobků, zejména suroviny používané k výrobě, se mohou objevovat bakterie ze střevního traktu zvířat a to například kampylobakterie, shigely a salmonely. Tyto bakterie způsobují průjemová onemocnění u lidí. Při výskytu v masných výrobcích způsobují hnilobu a změnu barvy. Kampylobakterie v masných výrobcích se detekují imunochemickými metodami, které jsou založené na interakci antigenu se specifickou protilátkou, molekulárními metody, kde řadíme PCR a sérotypizací.[36]

4.6 Non-kultivační metody využívané při sledování mikroorganismů v nápojích

Mezi fermentované nápoje řadíme kefir, kumys, burčák, pivo, víno, cidre, boza, kombucha a Perry aj. U fermentovaných nápojů se vyskytuje široké množství mikroorganismů, především bakterie mléčného kvašení a kvasinky. Nápoje se stanovují nejčastěji metodou PCR, ISR-PCR (PCR s intergenovou distanční oblastí), RAPD-PCR, specifická PCR a genová sekvenace RNA, denaturační gradientovou gelovou elektroforézou DGGE.[33]

Pomocí PCR proběhla identifikace mikroorganismů ve třech krocích. Nejprve byl rod vložen na PCR amplifikaci s ribozomální intergenovou distanční analýzou (ISR) mezi 16S a 23S rRNA geny s porovnáním elektroforetického profilu s referenčními kmeny. Jako druhý krok se tento rod izoluje z každé skupiny ISR společně s referenčními kmeny, které byly podrobeny RAPD-PCR, což je analýza za použití univerzálního primeru M13. Jako třetí krok byla provedena specifická PCR pro *Lactobacillus plantarum/pentosus/brevis*, *Enterococcus faecium*, a *Leuconostoc mesenteroides*. Tyto mikroorganismy během fermentace okyselují nápoje, vytvářejí kyselinu mléčnou a snižují množství škrobu, sacharózy a maltózy a vytvářejí ethanol.[37]

ZÁVĚR

Bakalářská práce byla zaměřena na využití non-kultivačních metod ke studiu mikroflóry fermentovaných potravin a nápojů. Byl zde vysvětlen rozdíl mezi kultivačními a non-kultivačními metodami.

Kultivační metody se používají ke kontrolním rozborům, jejichž účelem je rozhodnout o přípustnosti poživatiny pro lidskou nebo živočišnou konzumaci, k rozborům potravin, u kterých je podezření, že by mohly způsobovat alimentární onemocnění, k mikrobiologické kontrole výrobního zařízení a prostředí. Tyto metody dělíme na kvantitativní a kvalitativní.

Mezi nejdůležitější non-kultivační metody patří mikroskopie, imunologické, imunochemické, sérologické a molekulárně-genetické metody. U některých non-kultivačních metod je potřeba předkultivace mikroorganismů. Non-kultivační metody jsou rychlejší a efektivnější než kultivační metody, jsou však zpravidla finančně nákladnější.

Mezi non-kultivační metody můžeme zahrnout PCR metodu, metodu sekvenace DNA, průtokovou cytometrii, dielektroforézu, field-flow frakcionaci, metodu ELISA a elektro-migrační techniky.

Diverzita mikroflóry u fermentovaných potravin se v průběhu jejich zrání nejčastěji sleduje pomocí metody PCR, sekvenování DNA a elektroforézy. Tyto metody se používají především při rychlém stanovení přítomnosti mikroorganismů v těchto potravinách.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [2] <http://eagri.cz/public/web/mze/potraviny/legislativa/zakon-o-potravinach/>
- [2] RAY, Bibek a Arun K. BHUNIA. *Fundamental food microbiology*. Fifth edition. ISBN 978-1-4665-6443-5
- [3] KADLEC, Pavel, Karel MELZOCH a Michal VOLDŘICH. *Přehled tradičních potravinářských výrob: technologie potravin*. Ostrava: Key Publishing, 2012. Monografie (Key Publishing). ISBN 978-80-7418-145-0.
- [4] GILBERT JA, NEUFELD JD (2014) Life in a World without Microbes. PLoS Biol 12(12): e1002020. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002020>
- [5] <https://www.slideshare.net/medik.cz/biologie-pro-bakale-praktikum-2>
- [6] HARTMAN, WH, RICHARDSON, CJ (2013) Differential Nutrient Limitation of Soil Microbial Biomass and Metabolic Quotients (qCO_2): Is There a Biological Stoichiometry of Soil Microbes? PLoS ONE 8(3): e57127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057127>
- [7] <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76457.aspx>
- [8] <http://www.lamission.edu/lifesciences/lecturenote/mic20/Chap06Growth.pdf>
- [9] RAY, Ramesh C. a Didier MONTET. *Microorganisms and fermentation of traditional foods*. ISBN 9781482223088
- [10] BAMFORTH, Charles W. a Robert E. WARD. *The Oxford handbook of food fermentations*. ISBN 978-0-19-974270-7.
- [11] JOSHI, V.K. *International Journal of Food and Fermentation Technology* [online]. New Delhi Publishers, 2012(2) [cit. 2017-04-20]. DOI: 10.5958/j.2277-9396. Dostupné z: <http://ndpublisher.in/ndpjournal.php?j=IJFFT>
- [12] SOCCOL, Carlos Ricardo., Ashok. PANDEY a Christian. LARROCHE. *Fermentation processes engineering in the food industry*. ISBN 9781439887684
- [13] https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/b1/Bioreaktor_quer2.jpg
- [14] WOOD, Brian J.B. *Microbiology of Fermented Foods* [online]. 2. Springer Science & Business Media, 2012. ISBN 1461303095. Dostupné také z:

https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=JyvUBwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR17&dq=microorganisms+in+fermented+foods&ots=pGxi1RNk96&sig=KhXYvRL4iKcHNhd-q2lXXdHKGak&redir_esc=y#v=onepage&q=microorganisms%20in%20fermented%20foods&f=false

[15] <http://www.promeat.cz/promeat/eshop/7-1-Uzeniny/46-2-Trvanlive-salamy/5/72-Kremesnik>

[16] JIČÍNSKÁ, Eva a Jana HAVLOVÁ. *Metody detekce patogenních mikroorganismů v potravinách*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1996, 115 s. ISBN 8085120496

[17] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. *Mikrobiologie v technologii vod*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2004. ISBN 80-7080-534-x

[18] JÍLEK, Petr. *Úvod do mikrobiologických vyšetřovacích metod ve zdravotnictví*. Praha: Karolinum, 2002. Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. ISBN 80-246-0459-0

[19] KOURKINE, I. V., RISTICK-PETROVI, M., Davis, E., RUFFOLO, C. G., KAPSALIS, A., BARRON, A. E. (2003): *Detection of Escherichia coli O157 : H7 bacteria by a combination of immunofluorescent staining and capillary electrophoresis, Electrophoresis* 24, 665 – 661

[20] STEEN, H. B. (2000): *Flow cytometry: glimpses from the past with a view to the future, J.Microbiol. Methods* 42, 65 – 74

[21] BREHM-STECHER, B. F., JOHNSON, E. A. (2004): *Single-Cell Microbiology: Tools, Technologies, and Applications, Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 538 - 559

[22] RESCHLIGIAN, P., ZATONNI, A., RODA, B., MICHELINI, E., RODA, A. (2005): *Field-flow fractionation and biotechnology, Trends in Biotechnology* Vol. 23 No. 9, 475 – 300

[23] BETTS, W. B. (1995): *The potential of dielectrophoresis for the real-time detection of microorganisms in foods, Trends in Food Science & Technology* 6, 51 - 58

- [24] WEIHONG, Xu, KRISHNAKUMAR Sujatha, MIRANDA Molly, et al. *Targeted and Highly Multiplexed Detection of Microorganisms by Employing an Ensemble of Molecular Probes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014, (14), 4153-4161
- [25] BLAŽKOVÁ, M., KARAMONOVÁ, L., FUKAL, L., RAUCH, P. (2005): *Listeria monocytogenes - nebezpečný patogen a jeho detekce v potravinách*. *Chem. Listy* 99, 467 – 463
- [26] VOTAVA, M., R. HORVÁTH a M. DENDIS. *Polymerázová řetězová reakce v mikrobiologické diagnostice* [online]. 2000, **11**. DOI: 632-634. Dostupné z: http://www.prolekare.cz/prakticky-lekar-clanek/polymerazova-retezova-reakce-v-mikrobiologicke-diagnostice-25156?confirm_rules=1
- [27] POSTOLLEC, Florence, Helene FALENTIN, Sonia PAVAN, Jerome COMBRISON a Daniele SOHIER. *Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology* [online]. 2011, (28), 848-861. Dostupné z: www.elsevier.com/locate/fm
- [28] <https://stary.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa6.htm>
- [29] LAW, Jodi Woan-Fei, Nurul-Syakima Ab MUTALIB, Kok-Gag CHAN a Hearn-Lan LEE. *Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations* [online]. 2015, (5), 1-19. Dostupné z: www.frontiersin.org
- [30] NDOYE, Bassirou, Eric Andriamahery RASOLOFO, Gisele LAPOINTE a Denis ROY. *A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota*. *Dairy Science & Technology* [online]. 2011, 91(5), 495-524 [cit. 2017-04-26]. DOI: 10.1007/s13594-011-0031-8. ISSN 1958-5586. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13594-011-0031-8>
- [31] PORCELLATO, D., BRIGHTON, C., OBERG, C.J. a M., LEFEVRE. *Application of ARISA to assess the influence of salt content and cation type on microbiological diversity of Cheddar* [online]. *Letters in Applied Microbiology*, 2014, (59). ISSN 0266-8254.
- [32] TOBA, T., ARIHARA, K. and ADACHI, S. Comparative study of polysaccharide from kefir grains, an encapsulated homofermentative *Lactobacillus* species and *Lactobacillus* kefir. *Milchwissenschaft*. 1987, 42(9), 565–568. ISSN 0026-3788.

- [33] ELIZAQUÍVEL, Patricia, Alba PERÉZ-CATALUNA, Alba YÉPEZ a Graciela VIGNOLO. *Pyrosequencing vs. culture-dependent approaches to analyze lactic acid bacteria associated to chicha, a traditional maize-based fermented beverage from Northwestern Argentina* [online]. 2015 [cit. 2017-04-26]. Dostupné z: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro
- [34] SARKAR, S. Biotechnological innovations in kefir production: a review. *British Food Journal*. 2008, 110(3), 283–295. ISSN 0007-070x.
- [35] DVOŘÁK, Lukáš, Květoslava ŠUSTKOVÁ a Jiří MLČEK. *Blízká infračervená spektroskopie jako pomocník při kontrole kvality* [online]. 2016, , 838-873. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2016_12_868-873.pdf
- [36] HOCHÉL, Igor. Metody detekce a charakterizace *Campylobacter* sp. *Chemické listy* [online]. 2009, (103), 814-822. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2009_10_814-822.pdf
- [37] VIGNOLO. *Pyrosequencing vs. culture-dependent approaches to analyze lactic acid bacteria associated to chicha, a traditional maize-based fermented beverage from Northwestern Argentina* [online]. 2015 [cit. 2017-04-26]. Dostupné z: www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro
- [38] <http://abo.com.pl/pl/p/Zestaw-do-elektroforezy-poziomej-MultiSUB-Screen-26x32-26x24-26x16-cm-zasilacz-CS-500/59229>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
PCR	Polymerázová řetězová reakce
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
a_w	Vodní aktivita vody
BMK	Bakterie mléčného kvašení
NSLAB	Non-Starter Lactic Acid Bacteria (bakterie mléčného kvašení nezákysového původu)
MPN	Most Probably Number (metoda pravděpodobného počtu)
rRNA	Ribosomální ribonukleová kyselina
NIR	Near-infrared (v blízké infračervené oblasti)
ISR	Integrovaná distanční část
RAPD	Random amplified polymorphic DNA
DGGE	Denaturační gradientová gelová elektroforéza

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Růstová křivka mikroorganismů [5].....	14
Obrázek 2: Bioreaktor [13].....	20
Obrázek 3: Křemešník [15].....	22
Obrázek 4: Schéma PCR	27
Obrázek 5: Elektroforézní systém [38].....	28