

- FLOROU-PANERI P., CHRISTAKI E. a BONOS E. (2013) Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients. LACTIC ACID BACTERIA – R & D FOR FOOD, HEALTH AND LIVESTOCK PURPOSES Kongo M. ed. *InTechOpen.com* s.589-614.
- GÄNZLE, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinions in Food Science* 2, s. 106–117.
- GARCIA-CANO I., ROCHA-MENDOZA D., ORTEGA-ANAYA J., WANG K., KOSMERL E. (2019) Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103 s. 5243-5257.
- GEORGE F., DANIEL C., THOMAS M., SINGER E., GUILBAUD A. a kol. (2018) Occurrence and Dynamics of *Lactic acid bacteria* in distinct ecological niches: A multifaceted functional health perspective. *Frontiers in Microbiology* 9 s. 1-15.
- LEUSCHNER R., ROBINSON T.P., HUGAS M., COCCONCELLI P.S., RICHARD-FORGET F a kol. (2010) Qualified presumption of safety (QPS): a generic risk assessment approach for biological agents notified to the European Food Safety Authority (EFSA). *Trends in Food Science & Technology* 21 s. 425-435.
- MARTINEZ M. P., GONZALEZ PEREYRA, M. L., PENA G. A., POLONI, V., FERNANDEZ JUR G., CAVAGLIERI L. R. (2017). *Pediococcus acidolactici* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from a rainbow trout ecosystem have probiotic and ABF1 adsorbing/degrading abilities *in vitro*. *Food Additives and Contaminants*. 34 s. 2118–2130.
- MCSWEENEY P., SOUSA M. (2000) Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review. *Lait* 80 s. 293–324.
- VANDAMME P., DE BRUYNE K., POT B. (2014) Phylogenetics and systematics: Ve: Holzapfel W.H. a Wood B.J.B. (edit.) Lactic acid bacteria biodiversity and taxonomy (1. vyd) (pp.31-44). John Wiley & Sons.
- ZHAN Z-G., YE Z-Q., YU L., PENG S. (2011) Phylogenomic reconstruction of lactic acid bacteria: an update. *BMC Evolutionary Biology* 11 s. 1-12.

Korespondující autor:

Ing. Miloslava Kavková, Ph.D.
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.
Ke Dvoru 12a, 160 00 Praha 6
e-mail: m.kavkova@vum-tabor.cz

Přijato do tisku: 8. 10. 2019

Lektorováno: 13. 10. 2019

STANOVENÍ DRUHŮ MIKROORGANISMŮ POMOCÍ HRM RT-PCR

Mgr. Olga Bazalová, PhD, Mgr. Jaromír Cihlák, PhD

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.
Ke Dvoru 12a, 16000 Praha 6

Microbial species determination using HRM RT-PCR

Abstrakt

Molekulárně-genetické metody se v mikrobiologických laboratořích čím dál častěji používají pro rutinní určování druhů mikroorganismů. V naší ministudii jsme se zaměřili na určení druhů pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RT-PCR) následovanou

vysoko rozlišující analýzou křivky tání (HRM analýza). Tato studie se zaměřila především na způsob přípravy templátu pro tuto analýzu pomocí upravené colony PCR tak, aby nedocházelo k nákladnému izolování bakteriální DNA.

Klíčová slova: HRM RT-PCR, bakterie, colony PCR, izolace DNA

Abstract

Methods of molecular-genetics are widely used in the laboratory of microbiology as the routines method for the exact species determination of the microorganisms. In this paper we focused on the use of the High Resolution Real Time PCR melting analysis (HRM RT-PCR), which is widely used and function as the determining tool. Instead of expensive and time consuming DNA isolation we used modified colony PCR for providing the DNA template.

Key words: HRM RT-PCR, bacteria, colony PCR, DNA isolation

Úvod

V běžné praxi se pracovníci v mikrobiologické laboratoři neustále potýkají s nutností přesně a rychle stanovit druhy mikroorganismů, které se ve vzorku nachází. Klasické mikrobiologické metody stanovení závisí především na správně nastavených podmínkách jejich kultivace. Nevhodné kultivační podmínky mohou přesné určení druhu mikrobů značně ztížit. Základní metody optické mikroskopie umožňují sice relativně rychlé, avšak ne zcela přesné stanovení mikroorganismů, někdy je správné určení druhu dokonce naprosto nemožné. Pro personál je tak přesné určení mikrobů velmi náročné, vyžaduje speciální proškolení a také značnou zkušenost.

Použití molekulárně-genetických metod je proto používáno stále častěji. Tyto metody používané v laboratořích dovolují relativně snadno a rychle detegovat a určit, zda a jaký mikroorganismus se ve vzorku vyskytuje. Používané jsou například tzv. ribotypizace využívající jedinečnost genetické informace ribozomální RNA (rRNA) za použití enzymů – restrikčních endonukleáz (Yansanjav a kol., 2003; Massi a kol., 2004). Ovšem nejčastějšími metodami pro rozlišení jednotlivých druhů především probiotických mikroorganismů (například různých druhů rodu *Lactobacillus*), jsou metody založené na polymerasové řetězové reakci (PCR) - například Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD, Daud a kol., 1997), rep-PCR (Gevers a kol., 2001). V posledních letech je také stále oblíbenější použití analýzy křivky tání – High Resolution Melting Analysis (HRM) jak pro rozlišení jednotlivých druhů mikroorganismů (především u bakterií rodu *Lactobacillus* – Šimec a Potočník, 2011), nebo celých skupin mikroorganismů ve vzorcích (kvasy, potravinářské výrobky – Pontonio a kol. 2017, Ripari a kol. 2016). Z těchto studií vyplývá, že HRM analýza je

velmi dobrý nástroj pro určování druhů mikroorganismů. Během postupného zahřívání dochází k tavení dvoušroubovice DNA, čímž se z ní uvolňuje předem navázané fluorescenční barvivo a dochází k poklesu fluorescence, jež je monitorováno příslušným přístrojem a vyhodnoceno softwarem. Přítomnost heteroduplexu v analyzovaném amplikonu DNA mění tvar křivky tání, který je charakteristický pro konkrétní záměnu na konkrétní pozici daného amplikonu. V naší ministudii jsme se proto zaměřili na adaptaci této metody do našich laboratorních podmínek a její menší modifikaci za předpokladu snížení nákladů na její provedení.

Vzrůstající dostupnost, vyšší kvalita a klesající ceny v posledních letech mezi základní a rutinně používané metody určení přesného druhu mikroorganismu zařazuje také přímé sekvenování mikrobiálních nukleových kyselin, nejčastěji ribozomálního 16S rRNA genu. Ovšem ve vzorcích s vysokým výskytem různých druhů mikroorganismů se mnoho mikrobiologických laboratoří stále potýká s finančním zatížením, kterým příprava vzorků pro sekvenaci a i samotný sekvenční servis ještě stále jsou. Samotnému sekvenování také předchází nutnost izolace bakteriální DNA, která navyšuje výdaje. Na trhu existuje řada komerčních souprav pro izolaci genomové DNA fungujících na různých principech. Většina operuje na principu afinitní chromatografie s realizací v kolonkách s křemíkovým nosičem (silica-gel), případně fungující na principu iontoměničů. V posledních letech je stále populárnější izolace DNA za využití magnetických mikrokuliček, které s využitím reverzní adsorpce umožňují navázání celkové DNA a její oddělení od zbytku buněčných struktur a jejího obsahu (proteinů apod.).

Použití komerčně vyráběných kitů pro izolaci DNA však celý proces stanovení druhu mikroorganismu ještě více ekonomicky zatěžuje, především pak ve vzorcích s vysokým celkovým počtem mikroorganismů. Naši snahou tedy je najít metodiku, která nebude obsahovat nutnost izolace DNA pomocí kitu a celý proces tak udělá ekonomicky zajímavější, zachová stávající kvalitu a především rychlost přesného určení jednotlivých druhů mikroorganismů v takových vzorcích. Naše metodika je založená na použití různých páru primerů používaných k identifikaci mikroorganismů na základě sekvenování 16S rDNA genu, použití upravené colony

PCR a následné HRM analýze bez nutnosti izolace genetické informace bakterií. Metoda colony PCR, neboli PCR na koloniích bakterií či kvasinek, byla představena roku 2013 a slouží především jako nástroj pro ověření rekombinace při genetických manipulacích s bakteriemi či kvasinkami. Tato metoda využívá vysoké senzitivity PCR, kdy stačí jen velmi malé množství vstupního materiálu (templátu) a dvojice primerů umožňující diskriminaci kolonií, u kterých došlo ke správné rekombinaci. Jako templát je využívána buď DNA izolována pomocí hydroxidu sodného (tzv. hrubý lyzát z buněk), případně malé množství buněk (v případě použití *Escherichia coli*), které je přímo přidáno z petriho misky do PCR reakce (Bergkessel a Guthrie, 2013). Naším úkolem bylo ověřit, zda budeme tuto techniku moci použít pro výrobu templátu pro následnou HRM RT-PCR.

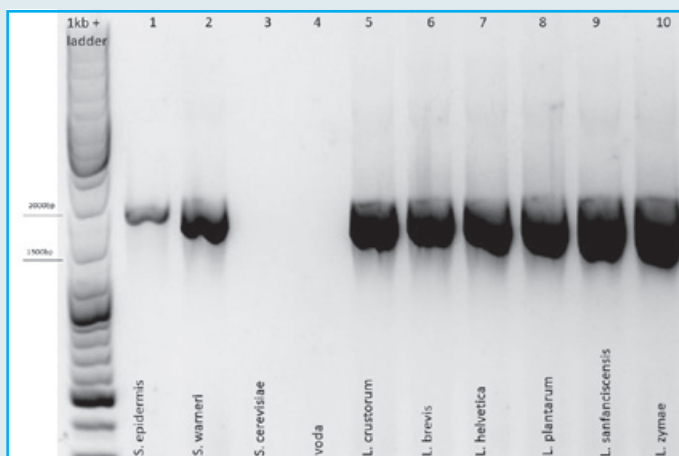
Materiál a metody

Použité kmeny a jejich kultivace

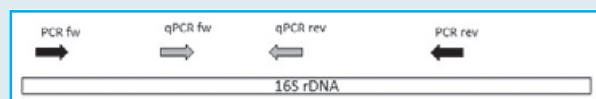
Pro pokusy byly vybrány 4 druhy laktobacilů ze sbírky mlékařských mikroorganismů Laktoflora: CCDM451 (*Lbc. sanfranciscensis*), CCM7190 (*Lbc. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) CCDM777 (*Lbc. reuteri*) a *Lbc. helveticus* (CCDM108). Dále byly použity další dva poddruhy *Lbc. sanfranciscensis* (JCM 12444 a jiný, blíže neurčený kmen) k ověření, zda pomocí naší metodiky budeme schopni od sebe rozeznat i bakterie v rámci jednoho druhu. Dále po jednom kmeni druhů *Lbc. plantarum*, *Lbc. brevis*, *Lbc. rossiae*, *Lbc. paralimentarius*, *Lbc. zymae*, *Lbc. xiangfangensis* a *Lbc. mindensis*, které byly vyizolovány z různých druhů kvasových vzorků. Také byly použity dva druhy stafylokoků (*Staphylococcus epidermis* a *Staphylococcus warneri*) pro případné zařazení i jiných druhů bakterií. Kultivační podmínky a media byly použity v závislosti na druhu bakterie (tab. 1). Nejčastěji bylo použito De Man, Rogosa and Sharpe růstové medium (MRS, GranuCult®, Merck KGaA, EMD Millipore Corporation; de Man a kol., 1960). Dále M103 medium – APT Broth M227 (Himedia, Čaderský-Envitek, s.r.o.) + maltóza (7 g/L, Sigma-Aldrich spol. s.r.o.), fruktóza (7 g/L, Sigma-Aldrich spol. s.r.o.), glutamát sodný (2 g/L, Sigma-Aldrich spol. s.r.o.). A také M225 medium (připraveno dle Line a Sugihara, 1971) – malt extrakt (25 g/L), kvasničný ex-

Tab. 1 Seznam použitých kmenů a jejich kultivační podmínky

název	kult. metody	kult. podmínky	název	kult. metody	kult. podmínky
<i>Lbc. crustorum</i>	M103	30°C, AN	<i>Lbc. rossiae</i>	MRS	30°C, AN
<i>Lbc. brevis</i>	M103	30°C, AN	<i>Lbc. sanfranciscensis</i> CCDM451	M225	30°C, AN
<i>Lbc. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	MRS	30°C, AN	<i>Lbc. sanfranciscensis</i> JCM 12444	M103	30°C, AN
<i>Lbc. helveticus</i>	MRS	30°C, AN	<i>Lbc. sanfranciscensis</i> (blíže neurčený)	MRS	30°C, AN
<i>Lbc. mindensis</i>	FHN	30°C, AN	<i>Lbc. xiangfangensis</i>	M225	30°C, AN
<i>Lbc. paralimentarius</i>	M103	30°C, AN	<i>Lbc. zymae</i>	MRS	30°C, AN
<i>Lbc. plantarum</i>	MRS	30°C, AN	<i>Staph. epidermis</i>	BHI	30°C, A
<i>Lbc. reuteri</i>	MRS	30°C, AN	<i>Staph. warneri</i>	BHI	30°C, A



Obr. 1 Kontrola správnosti colony PCR. Jamka 1 jako templát použita suspenze *Staphylococcus epidermidis*, 2 *Staphylococcus warneri*, 3 a 4 jsou negativní kontroly (v jamkách by se neměly objevit žádné viditelné proužky), v jamkách 5-10 byly použity různé druhy laktobacilů.



Obr. 2 Grafické znázornění umístění použitých párů primerů pro colony PCR a HRM RT-PCR v rámci 16S rDNA. Primery označené PCR fw a PCR rev byly použity při colony PCR, primery označené qPCR fw a qPCR rev byly použity v HRM RT-PCR reakci.

byl amplifikován jen velmi krátký úsek daného genu (do 1 kb) byly použity primery, kdy amplikon dosahoval více než 1,5 kb (tab. 2). Byly zhotoveny i dvě negativní kontroly: 1) kontrola vzniku nespecifických amplikonů, kde byla jako templát použita kolonie *Saccharomyces cerevisiae*, a 2) 0,5 µl sterilní vody bez nukleáz bylo použito jako kontrola případné kontaminace použitých roztoků (pufru, primerů, vody). Samotná PCR sestávala z Q5 polymerázy (NEB) ve finální koncentraci 0,01 U/µl (oproti výrobcem doporučených 0,02 U/µl), 1x pufr, 200 µM dNTP's, 0,5 µM forward 1 primer nasedající na 16S rRNA gen a 0,5 µM reverse 1 primer nasedající na 16S rRNA gen (sekvence primerů v tab. 2) a vše bylo doplněno do celkového objemu 7 µl sterilní vodou bez nukleáz. Vše bylo řádně smícháno a vloženo do thermocycleru (Biometra). Zvolený program: 1) 95°C – 5 min; 2) 35 cyklů: 95°C – 30 s, 52°C – 30 s, 72°C – 90 s; 3) 72°C – 10 min. Po skončení PCR bylo 5 µl použito pro kontrolu správně proběhlé reakce pomocí gelové elektroforézy (ukázka - obr. 1), 2 µl vzorku byly smíchány s 98 µl vody bez nukleáz a dále použity jako templát pro RT-PCR a následnou HRM analýzu.

trakt (3 g/L), čerstvý kvasničný extrakt (15 ml/L), Tween 80 (0,3 g/L), trypton (6 g/L). V případě bakterií rodu *Staphylococcus* pak Brain Heart Infusion medium (BHI, Himedia, Čadarský-Envitek, s.r.o., Atlas 2004). Bakterie byly kultivovány v příslušném tekutém mediu (5 ml) přes noc (dokud A620 = 0,5 - 1,0), poté byla suspenze centrifugována (4 000 g, 3 min), část použita rovnou pro PCR (cca 1 µl narostlé kultury, viz. dále) a zbytek byl použit pro izolaci bakteriální DNA.

Výroba templátu pro HRM RT-PCR

Bakteriální DNA byla izolována ze suspenze centrifugovaných bakterií pomocí DNeasy UltraClean Microbial Kit (Quiagen), postupovaly jsme přesně dle stanovených instrukcí v manuálu. 20 ng DNA bylo poté použito jako templát při RT-PCR a pro následnou HRM analýzu.

Polymerázová řetězová reakce (PCR) na „koloniích“

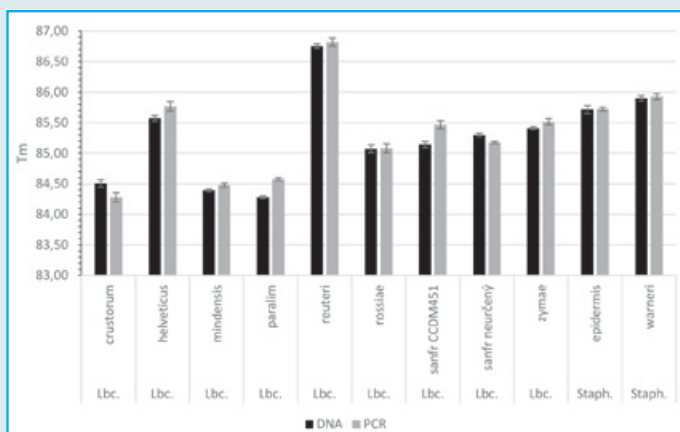
Dříve popsaná metodika PCR na bakteriálních koloniích Bergkessel a Guthrie (tzv. colony PCR, 2004) byla modifikována následovně: namísto lyzování buněk pomocí NaOH byl pomocí sterilní kličky odebrán 1 µl stočených bakterií (centrifugace 4000 g, 3 min) do 50 µl sterilní vody bez nukleáz, vše bylo promícháno pomocí vortexu, ponecháno 30 min v lednici (7°C). 0,5 µl této vodné suspenze bylo následně použito jako templát pro PCR. Místo použití dvojice primerů, pomocí které by

Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (RT-PCR) a vysoko rozlišující analýza křivky tání (HRM analýza)

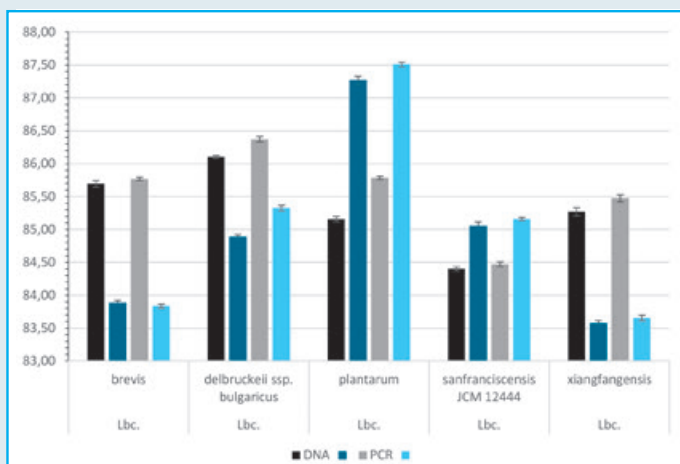
RT-PCR byla provedena pomocí přístroje StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) v 0,1 ml zkumavkách (Applied Biosystems). 20 ng vyzolované bakteriální DNA, nebo 3 µl 50x naředěné DNA po upravené colony PCR reakci bylo použito jako templát v 12 µl RT-PCR reakci (AccuMelt™ HRM Super-Mix – 1x, Quantabio, 0,4 µM HRM-F primer, 0,4 µM HRM-R primer, H₂O bez nukleáz). Namnožení produktů probíhalo dle následujícího protokolu: 1) 95°C – 5 min; 2) 35 cyklů: 95°C – 15 s, 60°C – 60 s (+měření míry fluorescence po každém cyklu); 3) kontinuální měření křivky tání: 95°C – 60 s, 60°C – 60 s, následované vzestupným zvyšování teploty o 0,3°C po každých 15 s až do dovršení 95°C (+kontinuální měření míry fluorescence). Primery použité v HRM RT-PCR byly umístěny uvnitř amplikonu po colony PCR (obr. 2). Pro vyhodnocení byl použit StepOne™ v 2.3 software a High Resolution Melt Software v 3.0. Výsledné grafy a tabulky byly zpracovány pomocí excell (Microsoft). Všechny vzorky byly amplifikovány v oddělených zkumavkách ve dvou opakováních. Vždy byla prováděna negativní kontrolu bez přidaného templátu (pouze s vodou). Celý proces byl

Tab. 2 Použité primery

primer	sekvence 5' - 3'	teplota nasedání [°C]	velikost produktu [bp]
PCR fw	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	52°C	1500-1700
PCR rev	ACGGCTACCTTGTACGACTT		
qPCR fw	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	60°C	400-600
qPCRrev	TCCTACGGGAGGCAGCAGT		



Obr. 3 HRM RT-PCR – vyhodnocení analýzy křivky teploty tání (T_m) amplikonů bakterií, u kterých po derivaci míry fluorescence oproti teplotě byl pouze jeden pík. Černé sloupce – templátem byla DNA izolována z bakterií pomocí kitu. Šedivé sloupce – templátem byla 50x zředěná colony PCR.



Obr. 4 HRM RT-PCR – vyhodnocení analýzy křivky teploty tání (T_m) amplikonů bakterií, u kterých po derivaci míry fluorescence oproti teplotě byly 2 píky. Jako první je uvedena hodnota T_m vyššího píku (sloupce - odstíny černé) a jako druhá hodnota píku nižšího (sloupce - odstíny modré). Pouze u *Lbc. plantarum* vyšší pík odpovídal nižší hodnotě T_m , u ostatních studovaných bakterií vyšší pík odpovídal vyšší hodnotě T_m . černý a tmavě modrý sloupec – templátem byla DNA izolována z bakterií pomocí kitu. Šedivý a světle modrý sloupec – templátem byla 50x zředěná colony PCR.

3x opakován (izolace DNA, colony PCR i RT-PCR spolu s HRM analýzou). Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí softwaru GraphPad Prism 8.2.1. a to buď pomocí Studentova t-testu, nebo jednocestné ANOVY.

Výsledky

Výsledky HRM analýzy námi studovaných kmenů bakterií jsou uvedeny na obrázcích 3 a 4. Zkoumali jsme nejen to, zda pomocí HRM dokážeme rozlišit studované bakteriální kmeny, ale také zda jsme schopni dosáhnout stejného výsledku HRM analýzy i bez izolace DNA z bakterií, ale za použití modifikované colony PCR. Na obrázku 3 jsou uvedené kmeny, jejichž HRM

Tab. 3 Statistické vyhodnocení výsledků pomocí Studentova t-testu

název	P value (t test)
<i>Lbc. crusterum</i>	0,0153
<i>Lbc. helveticus</i>	0,0191
<i>Lbc. mindensis</i>	0,0147
<i>Lbc. paralim</i>	0,0001
<i>Lbc. reuteri</i>	0,1955
<i>Lbc. rossiae</i>	0,8707
<i>Lbc. sanfr CCDM451</i>	0,0025
<i>Lbc. sanfr neurčený</i>	0,0043
<i>Lbc. zymae</i>	0,0329
<i>Staph. epidermis</i>	0,879
<i>Staph. warneri</i>	0,5216

Tab. 4 Statistické vyhodnocení výsledků pomocí jednocestné ANOVY

název	P value (ANOVA)
<i>Lbc. brevis</i>	0,0001
<i>Lbc. delbruckeii ssp. bulgaricus</i>	0,0001
<i>Lbc. plantarum</i>	0,0001
<i>Lbc. sanfranciscensis JCM 12444</i>	0,0001
<i>Lbc. xiangfangensis</i>	0,0001

analýza odhalila po záporné derivaci fluorescence oproti teplotě pouze jeden pík v křivce tání (označen T_m – melt temperature = teplota tání). Na obrázku 4 jsou pak kmeny, jejichž křivky tání vykazovaly po záporné derivaci píky 2, které se dále mohou lišit profilem jednotlivých křivek (vše vyhodnoceno softwarem High Resolution Melt Software v 3.0.1.). Ač je z výsledků patrné, že se hodnoty T_m liší v závislosti na použité metodě přípravy templátu pro HRM RT-PCR (hodnoty P value jsou u většiny <0.05, tab. 3 a 4), k amplifikaci dochází a jsme schopni rozlišit jednotlivé druhy mikroorganismů mezi sebou (s výjimkou *Lbc. paralimentarius* vs. *Lbc. mindensis*, k jejich rozlišení však nedochází HRM analýzou ani po izolaci DNA) a dokonce jsme schopni i rozlišit jednotlivé poddruhy u *Lbc. sanfranciscensis*.

Diskuze a závěr

Předmětem této mini studie bylo zjistit, zda budeme schopni amplifikovat pomocí RT-PCR DNA dříve amplifikovanou pomocí modifikované colony PCR, abychom se mohli vyhnout nákladnému použití kitu pro izolaci bakteriální DNA. Z našich výsledků vyplývá, že k amplifikaci takto připraveného vzorku dochází zcela bez problémů, oproti klasicky izolované bakteriální DNA sice dochází k určitým statisticky významným změnám v teplotě tání jednotlivých amplikonů, ovšem u některých vzorků k tomu nedošlo (*Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rossiae*, *Staphylococcus epidermis* a *Staphylococcus*

cus warneri). Na druhou stranu i přes tyto změny v hodnotách Tm křivek tání ještě zcela jasně můžeme rozlišit jednotlivé druhy, a dokonce i poddruhy například u *Lactobacillus sanfranciscensis* (JCM 12444 vs. CCDM451). Bohužel dva druhy a sice *Lactobacillus paralimentarius* a *Lactobacillus mindensis* pomocí HRM analýzy rozlišit nedokážeme a to ani v případě izolace DNA pomocí kitu. Pro tento prvotní pokus byla pro colony PCR použita Q5 polymeráza, ale v budoucnu bychom rádi ověřili, zda je možno stejný proces zopakovat i s levnějšími variantami již předpřipravených PCR master mixů, což sníží výdaje celého procesu ještě mnohem razantněji.

Poděkování

Tento projekt vznikl za podpory: Program aplikovaného výzkumu Ministerstva zemědělství na období 2017-2025, ZEMĚ projekt QK1910036 a QK 1910024.

Literatura

- Atlas RM (2004). Handbook of Microbiological Media (3rd ed.). CRC Press. s. 237–247.
- Bergkessel M., Guthrie C. (2013): Colony PCR. *Methods in Enzymology*. 529 (9), s. 299-309.
- Daud Khaled, A. K., Neilan, B. A., Henriksson, A., & Conway, P. L. (1997). Identification and phylogenetic analysis of *Lactobacillus* using multiplex RAPD-PCR. *FEMS Microbiology Letters*. 153(1), s. 191–197.
- de Man, J.C.; Rogosa, M.; Sharpe, M.E. (1960). A Medium for the Cultivation of *Lactobacilli*. *J Appl Bact.* 23, s. 130–135.
- Gevers, D., Huys, G., & Swings, J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*. 205(1), s. 31–36.
- Kline L., Sugihara T.F. (1971): Microorganisms of the San Francisco Sour Dough Bread Process
- II. Isolation and Characterization of Undescribed Bacterial Species Responsible for the Souring Activity. *Appl Microbiol.*, 21 (3), s. 459-465.
- Lin X.B., Gänzle M.G. (2014): Quantitative high-resolution melting PCR analysis for monitoring of fermentation microbiota in sourdough. *Int J Food Microbiol.* Sep 1;186, s. 42-8.
- Massi M., Vitali B., Federici F., Matteuzzi, D., Brigidi P. (2004): Identification method based on PCR combined with automated ribotyping for tracking probiotic *Lactobacillus* strains colonizing the human gut and vagina. *Journal of Applied Microbiology*. 96(4), s. 777–786.
- Pontonio E., Di Cagno R., Mahony J., Lanera A., De Angelis M., van Sinderen D., Gobbetti M. (2017): Sourdough authentication: quantitative PCR to detect the lactic acid bacterial microbiota in breads. *Sci Rep.* Apr 3;7(1), s. 624.
- Ripari V., Gänzle M. G., Berardi E. (2016): Evolution of sourdough microbiota in spontaneous sourdoughs started with different plant materials. *Int J of Food Microbiology*. 232, s. 35–42.
- Simenc J., Potocnik U. (2011): Rapid differentiation of bacterial species by high resolution melting curve analysis. *Prikl Biokhim Mikrobiol.* May-Jun;47(3), s. 283-90.
- Yansanjav A., Švec P., Sedláček I., Hollerová I., Němec M. (2003): Ribotyping of *Lactobacilli* isolated from spoiled beer. *FEMS Microbiology Letters*. 229(1), s. 141–144.

Korespondující autor: Mgr. Olga Bazalová, Ph.D.

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Ke Dvoru 12a, 160 00 Praha 6

e-mail: o.bazalova@vum-tabor.cz

Přijato do tisku: 8. 10. 2019

Lektorováno: 14. 10. 2019

SENZORICKÉ HODNOCENÍ BEZLAKTÓZOVÝCH MLÉČNÝCH VÝROBKŮ

Eva Samková, Hedvika Bártová, Lucie Hasoňová

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,

Zemědělská fakulta, Studentská 1668,

370 05 České Budějovice

Sensory evaluation of lactose-free dairy products

Abstrakt

Cílem práce bylo posoudit preference vzorků mléka s laktosou a bez laktosy a provést senzorní hodnocení tří vzorků bílých bezlaktózových jogurtů. Ve sledované skupině hodnotitelů ve věku 21 – 70 let (n=60, 67 % žen a 33 % mužů) byla zjištěna vyrovnanost v preferencích pro oba vzorky mléka, s laktosou a bez laktosy (46 a 44 %). Senzorické hodnocení bezlaktózových jogurtů prokázalo, že hodnotitelé se v preferencích řídili především konzistencí a kyselostí jogurtů.

Klíčová slova: laktózová intolerance; bezlaktózové mléčné výrobky; senzorní hodnocení

Abstract

The aim of the work was to assess the preferences of lactose and lactose-free milk samples and to evaluate sensory properties of three samples of natural lactose-free yoghurt. There was found a similar tendencies in the preference for both milk samples, with and without lactose (46, and 44%) among the evaluators (age 21-70 years, n=61; 67% women and 33% men). Sensory evaluation of lactose-free yoghurts showed that the preferences were primarily determined by consistency and acidity of the yoghurts.

Keywords: lactose intolerance; lactose-free dairy products, sensory evaluation

Úvod

Laktózová intolerance (LI) je metabolický stav, při kterém člověk nemůže trávit disacharid laktosu. Nejčastěji vzniká v souvislosti s geneticky podmíněným poklesem aktivity enzymu laktasa (β -galaktosidasový komplex) po odstavu (Tomar, 2014). Laktasa, produkována buňkami kartáčového lemu střevní sliznice tenkého střeva, rozkládá laktosu na absorbovatelné monosacharidy (glukosu a galaktosu), které poskytují novorozenci potřebnou energii. Laktosa mateřského mléka zajišťuje přibližně 40 % energetické potřeby (Frühaufer, 2010). Nejvyšší aktivita laktasy je proto v postnatálním období