

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Mikroorganismy jako předmět genetické modifikace
a jejich využití v potravinářství**

Bakalářská práce

Tatiana Korobkova

Výživa a potraviny

Vedoucí práce: prof. Ing. Vlková Eva, Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Mikroorganismy jako předmět genetické modifikace a jejich využití v potravinářství" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26.4.2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní prof. Ing. Evě Vlkové Ph.D. za trpělivost, cenné rady, odborné konzultace a čas, který mi po čas psaní této bakalářské práce věnovala. Další poděkování patří mé rodině a nejbližším přátelům za jejich poskytnutou podporu.

Mikroorganismy jako předmět genetické modifikace a jejich využití v potravinářství

Souhrn

Geneticky modifikované mikroorganismy (GMM) představují mikroorganismy, jejichž genetický materiál byl uměle upraven pomocí genetického inženýrství. Tyto modifikace mohou zahrnovat vložení nových, úpravu existujících nebo vypnutí určitých genů. Hlavní úlohou genetického inženýrství je vytvořit nové organismy s požadovanými vlastnostmi nebo upravit ty existující tak, aby měly zlepšené schopnosti výroby určitých látek, optimalizovaly výrobní procesy nebo vykazovaly zvýšenou odolnost vůči nepříznivým podmínkám.

Cílem bakalářské práce bylo poskytnout komplexní přehled o současném stavu a perspektivách využití GMM v potravinářském průmyslu a diskutovat o možných důsledcích pro zdraví spotřebitelů a životní prostředí.

V potravinářském průmyslu mají mikroorganismy zásadní roli v mnoha oblastech, jako je produkce organických kyselin, enzymů, aminokyselin, fermentovaných potravin, mléčných výrobků, masných výrobků a alkoholických nápojů. Geneticky modifikované mikroorganismy mohou být využity například k vytvoření nových chuťových profilů v pivovarnickém průmyslu nebo k výrobě piva bez použití chmele. Dále k vytvoření vylepšených startovacích kultur pro masné výrobky s antimikrobiální aktivitou proti potravinovému patogenu *Staphylococcus aureus* nebo pro regulaci kažení a potlačení patogenních organismů v pekařských výrobcích. Genetické úpravy mikroorganismů pro produkci enzymů a aminokyselin umožňují výrobu velkého množství produktu v krátkém čase a s nižšími náklady, což může vést k vyšší stabilitě vůči teplotě, pH a dalším vlivům. Výroba také přináší ekologické výhody, jelikož nezahrnuje potřebu usmrcování zvířat.

Nicméně regulace geneticky modifikovaných organismů podléhá přísným legislativním požadavkům a většina studií se nachází ve fázi testování. Zatímco z vědeckého hlediska neexistují důkazy o spojitosti konzumace geneticky modifikovaných potravin s žádnými zdravotními či environmentálními riziky, je třeba stále zkoumat dlouhodobé dopady genetických modifikací na zdraví a životní prostředí.

Klíčová slova: Geneticky modifikovaný mikroorganismus, genové inženýrství, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, zdravotní rizika

Microorganism as a subject of genetic modification and their use in food industry

Summary

Genetically modified microorganisms (GMMs) are microorganisms whose genetic material has been artificially modified by genetic engineering. These modifications could include the insertion of new genes, the editing of existing genes or the switching off of certain genes. The main role of genetic engineering is to create new organisms with desired characteristics or to modify existing ones to have improved abilities to produce certain substances, to optimise production processes or to show increased resistance to adverse conditions.

The aim of the bachelor thesis was to provide a comprehensive overview of the current state and perspectives of the use of GMMs in the food industry and to discuss the potential implications for consumer health and the environment.

In the food industry, microorganisms play a crucial role in the production of organic acids, enzymes, amino acids, fermented foods, meat products and alcoholic beverages. Genetically modified microorganisms can be used, for example, to create new flavour profiles in the brewing industry or to produce beer without hops. In addition, to create improved starter cultures for meat products with antimicrobial activity against the food pathogen *Staphylococcus aureus*, or to control spoilage and suppress pathogenic organisms in bakery products. Genetic modification of microorganisms for enzyme and amino acid production allows the production of large quantities of product in a short time and at a lower cost, which can lead to higher stability to temperature, pH and other influences. Production also brings environmental benefits as it does not involve the need to kill animals.

However, the regulation of genetically modified organisms is subject to strict legislative and most studies are in the testing phase. While scientifically there is no evidence linking the consumption of GM foods to any health or environmental risks, the long-term health and environmental impacts of GM still need to be investigated.

Keywords: Genetically modified microorganism, genetic engineering, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, health risks

Obsah

1	Úvod	8
2	Cíl práce	9
3	Literární rešerše	10
3.1	<i>Genová transformace a manipulace s geny</i>	10
3.1.1	Izolace a amplifikace genů	10
3.1.2	Vložení genu do expresního vektoru.....	10
3.1.3	Vpravení připraveného genu do hostitelské buňky	11
3.1.4	Selekce transformovaných buněk.....	12
3.2	<i>Hostitelské buňky</i>	13
3.2.1	Bakteriální buňky	14
3.2.1.1	Escherichia coli	14
3.2.1.2	Bacillus sp.	14
3.2.2	Kvasinky.....	15
3.2.2.1	Saccharomyces cerevisiae	15
3.2.2.2	Pichia pastoris.....	15
3.2.3	Rod <i>Aspergillus</i>	16
3.3	<i>Legislativa</i>	16
3.3.1	V EU.....	16
3.3.2	V ČR.....	17
3.3.3	Ve světě	18
3.4	<i>Využití GMM v potravinářství</i>	18
3.4.1	Masné výrobky	19
3.4.2	Pekařské výrobky	20
3.4.3	Alkoholické nápoje.....	21
3.4.4	Enzymy.....	21
3.4.4.1	Chymosin.....	22
3.4.4.2	Amylázy	23
3.4.4.3	Proteázy	24
3.4.4.4	Invertáza	24
3.4.5	Aminokyseliny	25
3.4.5.1	Kyselina L-glutamová	25
3.4.5.2	Cystein.....	26
3.4.5.3	Glycin	26
3.5	<i>Bezpečnost a rizika</i>	27
3.5.1	Posuzování GMO	27
3.5.2	Posuzování GMM.....	29
4	Závěr	30
5	Literatura	31

1 Úvod

Obecným cílem každé společnosti je zlepšení kvality lidského života. Mezi klíčové oblasti ovlivňující lidský život patří nedostatek potravin, zdravotní problémy a environmentální komplikace (Khan et al. 2016). V současné době se genetická modifikace stává stále významnější oblastí vědy a technologie, která má dopad na mnohá odvětví, včetně biotechnologie, zemědělství, lékařství a průmyslu (Von Wright et Bruce 2003).

Geneticky modifikovaný organismus (GMO) je živý organismus, jehož genotyp byl uměle upraven pomocí technik genového inženýrství. GMO nesou potenciál výrazně zlepšit vlastnosti organismů a tím přinést výhody, zejména v potravinářském průmyslu. Na rozdíl od náhodných modifikací, které jsou charakteristické pro přirozenou a umělou mutagenézi, je genetická modifikace charakterizována záměrnou změnou genotypu organismu. Cílem vytváření GMO je uměle měnit genotyp organismu tak, aby vznikla nová výhodná vlastnost, nedosažitelná přirozeným výběrem. Tímto způsobem lze zlepšit vlastnosti organismu příjemce, například zvýšením odolnosti rostlin vůči herbicidům, hmyzím škůdcům, patogenům atd., s cílem snížit náklady na konečný produkt (Michael D. Peel 2001).

Jedním z důležitých aspektů genetické modifikace jsou geneticky modifikované mikroorganismy (GMM), které umožňují výrobu rozmanitých produktů, včetně léčiv, potravin a biopaliv. GMM jsou organismy, jejichž genetický materiál byl uměle upraven pomocí technologie rekombinantní DNA (Todd 2014). Tento proces umožňuje vložit, nahradit nebo odstranit určité geny v genomu mikroorganismů (Cohen 2013). Zlepšení vlastností mikroorganismů má potenciál zvýšit produkci různých sloučenin, včetně vitamínů, aminokyselin a enzymů. Dále umožňují vytvářet nové potraviny s vylepšenými vlastnostmi, například delší trvanlivostí, vyšší nutriční hodnotou nebo lepší chuťovou kvalitou (Aguilera et al. 2013).

Při používání genetického inženýrství je však třeba brát v úvahu možná rizika pro lidské zdraví a životní prostředí, a proto je třeba tuto technologii pečlivě regulovat (Snow et al. 2005).

2 Cíl práce

Cílem práce bylo vytvořit ucelený literární přehled o využití geneticky modifikovaných mikroorganismů a jejich enzymů v potravinářství. Dalším cílem bylo kriticky zhodnotit možná rizika spojená s aplikací geneticky modifikovaných mikroorganismů do potravin a konzumaci geneticky modifikovaných výrobků.

3 Literární rešerše

3.1 Genová transformace a manipulace s geny

Schopnost izolovat z genomu jednu sekvenci DNA a její následné vnášení do hostitelské (recipientní) buňky je klíčovým procesem v genetickém inženýrství a biotechnologii. To je podstatou klonování genů a lze jej považovat za sérii čtyř kroků (Desmond S.T. Nicholl 2023).

3.1.1 Izolace a amplifikace genů

Prvním krokem je určení cílového genu, který chceme izolovat a následně vnést do recipientní buňky. Tento gen musí obsahovat informaci pro tvorbu konkrétní biologické vlastnosti. Izolace genu obvykle začíná extrakcí DNA z buňky nebo tkáně. To lze provést různými způsoby – mechanickým rozbitím (homogenizace), chemickým rozpadem buněčných membrán nebo enzymatickým rozpadem (pomocí proteáz a lysozymu). DNA musí být oddělená od buněčných komponentů, aby byla získána purifikovaná DNA. To se obvykle provádí za pomoci různých chemických preparací a centrifugací. Existují i komerční soupravy, kterými lze dle instrukcí výrobce DNA snadno a spolehlivě extrahovat (Claassen et al. 2013; Jakubowski & Libretexts 2024).

Po extrakci DNA musí být cílový gen namnožen pomocí technik, které umožňují získat velké množství specifické DNA. Mezi nejčastější techniky patří zejména PCR (Polymerase chain reaction) neboli polymerázová řetězová reakce. Princip PCR je založený na cyklickém opakování procesu, kdy dochází k enzymové syntéze nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA. Tento proces umožňuje exponenciálně amplifikovat až miliardy kopií vybraného úseku DNA. Výsledkem PCR jsou amplikony, což jsou definované úseky DNA o určené délce, obvykle obsahující desítky až tisíce párů bází (Yilmaz et al. 2012).

3.1.2 Vložení genu do expresního vektoru

Fragmenty DNA z různých zdrojů, s vhodnou genovou sekvencí a expresí, se vkládají do vhodného vektoru. V genetickém inženýrství je vektorem molekula DNA, která slouží jako přenašeč genetické informace do buňky. Tento vektor je schopen přijmout určitou sekvenci deoxyribonukleotidů (například gen) a přenést ji do buňky nebo organismu za cílem pomnožení a exprese cílené části DNA (Galambos & Struchio 1998).

V potravinářství je vektorem nejčastěji plazmid, což je malá kruhová DNA nacházející se v bakteriích. Plazmid není součástí bakteriálního chromosomu a replikuje se nezávisle na chromozomální DNA. V genetickém inženýrství se používají plazmidy, které musí obsahovat počátek replikace, selekční marker a klonovací místo, známé také jako polylinker nebo multiple cloning site. Počátek replikace je označován jako sekvence, kterou rozpozná DNA polymeráza hostitelské buňky. Selekční marker zajišťuje, že buňky obsahující vložený vektor mají výhodu před buňkami, které vektor neobsahují. Nejčastěji používanými selekčními geny jsou geny pro rezistenci vůči antibiotikům, jako je ampicilin, kanamycin, tetracyklin, chloramfenikol a další (Maříková 2011; Urban-Chmiel et al. 2022).

3.1.3 Vpravení připraveného genu do hostitelské buňky

Vnášení izolovaného genu do hostitelské buňky se nazývá transformace (u bakterií a hub). Při tomto procesu je potřeba narušit buněčnou stěnu a membránu pro přijetí dárcovské DNA. Fragment DNA by měl být identifikovatelný, aby bylo možné odlišit transformované hostitele od netransformovaných (Lorenz & Wackernagel 1994).

Existuje několik metod pro dosažení přenosu vektoru s cílovým genem do buňky (Yoshida et Sato 2009):

Elektroporace. Tato metoda využívá krátké elektrické pulzy k vytvoření dočasných pórů v buněčné membráně, což umožňuje vstup genu do buňky. Po aplikaci elektrického pole jsou póry rychle uzavřeny. Výhody elektroporace spočívají v jednoduchosti provedení, rychlosti, vysoké účinnosti a univerzálnosti pro širokou škálu bakteriálních druhů a kvasinek (Dower 1990)

Transformace pomocí chemických látek. Metoda zahrnuje využití chemických reagensů, které narušují strukturu buněčné stěny a umožní tak vstup exogenní DNA. Tato metoda je častá pro eukaryotické buňky (Asif et al. 2017).

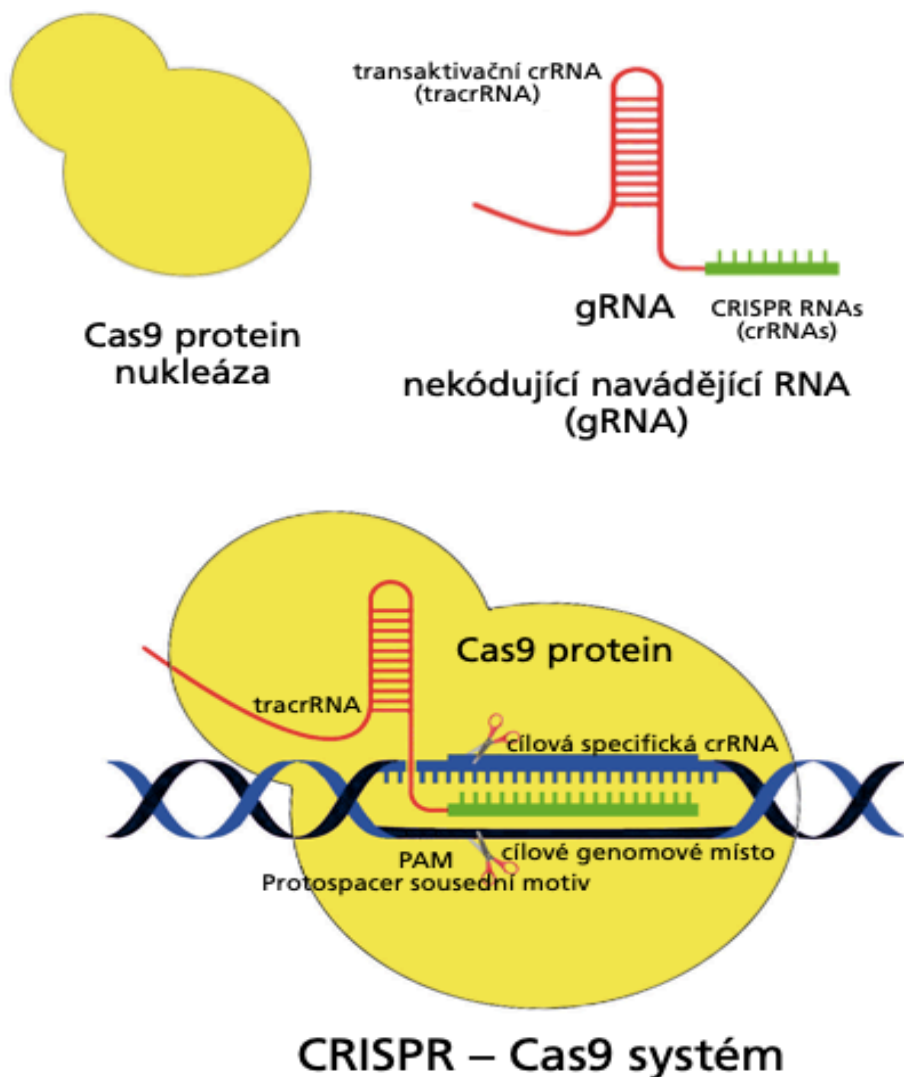
Transformace pomocí mikroinjekce. Při této metodě je vektor injektován přímo do jádra nebo cytoplazmy pomocí skleněné kapiláry. Výhodou je přesnost dávkování, načasování podání a vysoká účinnost transdukce (Zhang & Yu 2008).

„Heat shock“ neboli Tepelný šok. Pro zvýšení propustnosti membrán v buňkách a umožnění přijetí cizí plazmidové DNA jsou buňky podrobeny procesu nazývanému „kompetentnost“. U bakterií tento proces zahrnuje ošetření buněk roztokem obsahujícím dvojmocné kationty, jako je například CaCl_2 . U kvasinek se využívá acetát lithný nebo polyethylenglykol (Froger & Hall 2007).

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Je technika v genetickém inženýrství, kterou je možné modifikovat genomy živých organismů. CRISPR/Cas9 je tvořen třemi hlavními komponenty: crRNA (CRISPR RNA), tracrRNA (Trans-activating CRISPR RNA) a Cas9 proteinem (Associated protein 9). Cas9 je nukleáza, která pracuje jako tzv. genetické nůžky a otevírá oba řetězce cílové sekvence DNA pro přímé úpravy genetického materiálu v buňce. Molekuly crRNA a tracrRNA vytvářejí duplex (navádějící gRNA), který slouží k transportu Cas9 proteinu k určenému místu, kde dochází k rozštěpení DNA. CRISPR označuje úseky DNA s krátkými opakujícími se sekvencemi, které jsou odděleny unikátními úseky známými jako spacerové sekvence. Tyto spacerové sekvence jsou fragmenty DNA získané z jiných cizorodých DNA. Na obrázku č. 2 je schematicky zobrazená editace genu pomocí aplikaci CRISPR/Cas9 systému (Jaroslav Pavelka 2018).

Rozštěpení DNA vede k různým změnám v genomu, včetně vložení nových genetických informací, úpravám stávajících genů nebo jejich vypnutí (Harrison et al. 2014).

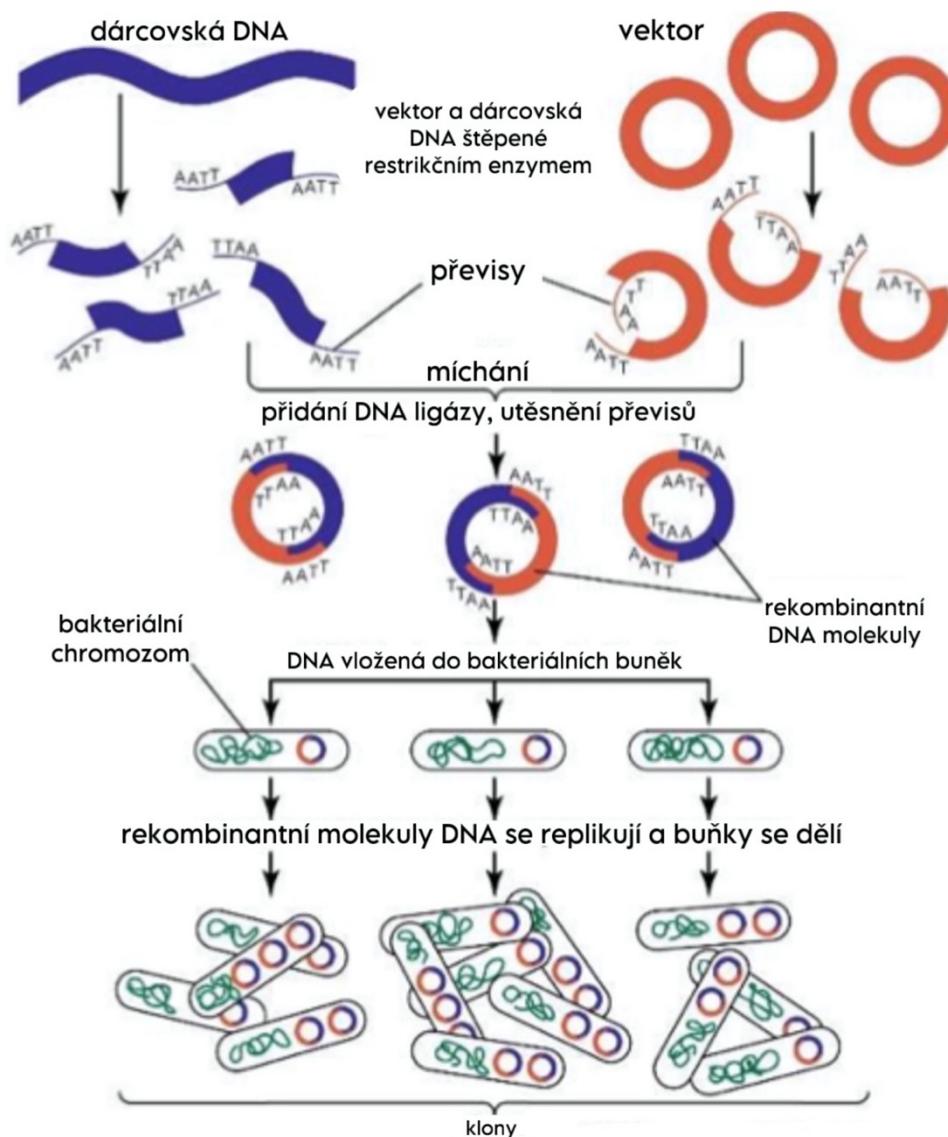
Tato technologie se stala velmi populární v oblasti genetické modifikace, protože umožňuje rychlou a efektivní úpravu genetické informace. Jednou z výhod CRISPR-Cas9 je její přesnost. Díky tomu, že se gRNA váže na specifickou sekvenci DNA, je pravděpodobnost nechtěného narušení jiných genů velmi nízká. To znamená, že CRISPR-Cas9 je užitečný nástroj pro výzkum a vývoj nových mikroorganismů s požadovanými vlastnostmi (Harrison et al. 2014).



Obrázek 2: Aplikace CRISPR/Cas9 systému na cílenou editaci vybraného úseku DNA (Jaroslav Pavelka 2018)

3.1.4 Selektce transformovaných buněk

Posledním krokem celého procesu je selektce transformovaných buněk. Je to proces identifikace a oddělení buněk, které úspěšně přijaly cílový gen, čímž získaly novou vlastnost nebo rezistenci. Identifikace klonu nesoucího gen našeho zájmu probíhá nejčastěji označením průkazného materiálu pomocí radioaktivního izotopu nebo fluorescenčního barviva. Tento proces je klíčový pro izolaci a následnou kultivaci buněk s požadovanými genetickými vlastnostmi. Celý proces rekombinantní technologie DNA je znázorněn na obrázku 3. (Desmond S. T. Nicholl 2023).



Obrázek 3: Kroky znázorňující rekombinantní technologie DNA (upraveno dle Desmond S. T. Nicholl 2023).

3.2 Hostitelské buňky

Výběr hostitele s vysokou transformační schopností a vhodného markeru je jedním z důležitých bodů genového inženýrství, který nejen snižuje riziko vzniku chybných transformací, ale také přispívá k optimalizaci výsledného produktu. V genovém inženýrství se používají různé typy hostitelských organismů v závislosti na konkrétním účelu a aplikaci. Ideální hostitelská buňka by měla být snadno manipulovatelná a množitelná. Měla by být k dispozici v široké škále geneticky definovaných kmenů a měla by snadno přijímat vektory. V této kapitole budou popsány některé z nejčastěji používaných hostitelských buněk pro genetickou modifikaci mikroorganismů (Son & Park 2021).

3.2.1 Bakteriální buňky

3.2.1.1 *Escherichia coli*

Bakterie *Escherichia coli* představuje nejčastěji využívaný prokaryotický hostitelský organismus v oblasti biologie a biotechnologie, jako je například rozluštění genetického kódu (F. H. Crick 1961) nebo pochopení replikace DNA (Lehman et al. 1958).

Je to gramnegativní, pravidelně nesporující fakultativně anaerobní pohyblivá tyčinková bakterie, která se vyskytuje zejména v tlustém střevě živočichů, včetně lidí. Díky dobře známému genomu, rychlé produkci a vysoké výkonnosti (až 0,5g na 1 litr kultury) poskytuje *E. coli* ideální základ pro efektivní genetické úpravy. Tato bakterie je také známá svými užitečnými vlastnostmi, jako je schopnost rozkládat toxické sloučeniny, znečišťující látky nebo obtížně rozložitelné polymery (Blount 2015).

Escherichia coli slouží jako univerzální platforma pro produkci různých metabolitů a průmyslově významných molekul, například potravinářských aditiv, pigmentů a poslední dobou i komplexních alifatických molekul (Tuli et al. 2015).

V parfumérském průmyslu se *E. coli* využívá při syntéze Ambroxu, což je náhražka ambry. Ambra je voskovitá látka vylučovaná střevním traktem vorvaňů, je již po tisíciletí vysoce ceněnou vonnou složkou (Schalk et al. 2012).

Další důležitou oblastí bylo zapojení bakterie *E. coli* do výroby biopaliv. *E. coli* byly úspěšně upraveny pro syntézu mastných kyselin s rozvětveným řetězcem nebo mastných kyselin s krátkým řetězcem, což může v konečném důsledku vést k masové výrobě prekurzorů paliv nebo užitečných materiálů získaných z ropy (Jawed et al. 2016; Koppolu et Vasigala 2016).

Experimentálně bylo zjištěno, že vypnutí minimálně 23 % genomu bakterie *E. coli* nezpůsobilo závažné problémy v jejím fungování. To ukazuje, že ne všechny geny jsou pro *E. coli* nezbytné a vypnutí určitých částí genomu může dokonce přispět k lepšímu růstu za určitých podmínek a zvýšení schopnosti produkovat proteiny, jelikož se sníží počet nebo vložení na plazmidech (Park et al. 2014).

Celkově lze říci, že díky technologickému pokroku se zdá budoucnost využití *E. coli* v různých biotechnologických aplikacích perspektivní.

3.2.1.2 *Bacillus sp.*

Rod *Bacillus* (zaveden r. 1930) je tvořen různorodým seskupením aerobních, fakultativně anaerobních, anaerobních, grampozitivních, sporulujících bakterií tyčinkového tvaru. Patří do kmene *Firmicutes*. Bakterie rodu *Bacillus* se běžně vyskytují v různých prostředích, jako je půda, voda nebo zažívací trakt (Su et al. 2020).

Bakterie rodu *Bacillus* jsou dalším často využívaným mikroorganismem v genovém inženýrství. Endospory rodu *Bacillus* představují jednu z nejdolnějších známých forem života. Endospory mají charakteristickou světlolomnou strukturu a vykazují extrémní odolnost vůči různým faktorům vnějšího prostředí (vysoké teploty, vysušení nebo UV záření), což je výhodné pro průmyslovou produkci. Endosporulace také zlepšuje stabilitu geneticky modifikovaných kmenů (Hosseini et al. 2018).

3.2.2 Kvasinky

Kvasinky jsou jedním z nejčastěji využívaných mikroorganismů na světě. V dnešní době zaujímají kvasinky klíčové místo mezi průmyslovými mikroorganismy, zejména v potravinářském průmyslu, kde se využívají při výrobě kynutého pečiva, alkoholických nápojů a potravinářských a krmných biomateriálů (Mallikarjuna & Yellamma 2018).

3.2.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* je nejlépe prozkoumaným eukaryotickým mikroorganismem a dalším často používaným hostitelem v genetickém inženýrství. Tato kvasinka se velmi dobře kultivuje, což je velmi výhodné pro mnoho aplikací genové manipulace (Wang et al. 2017).

S. cerevisiae má jedinečné biologických vlastnosti. Patří sem schopnost fermentace, při níž vzniká alkohol a oxid uhličitý, a odolnost vůči nepříznivým podmínkám, jako je vysoká osmolarita a nízké pH. Jednou z klíčových výhod této kvasinky je schopnost přijímat cizí geny a provádět jejich expresi. Tímto způsobem lze do kvasinek vkládat geny kódující různé látky, jako jsou rostlinné alkaloidy nebo specifické enzymy, například inzulin (Baeshen et al. 2014).

Genom kvasinky *S. cerevisiae* byl kompletně sekvenován v roce 1996, což odhalilo přibližně 6000 genů, z nichž 5570 jsou předpokládané geny kódující proteiny. Bioinformatické analýzy naznačují, že mnoho genů kódujících proteiny má původ z jiných organismů, tj. výsledkem laterálního neboli horizontálního přenosu genů (Goffeau et al. 1996; Wood et al. 2001).

Jedním z příkladů je gen *FSY1*, který kóduje fruktózový transportér. Předpokládá se, že tento gen byl získán z jiného organismu, pravděpodobně blízkého příbuzného kvasinky *S. cerevisiae*. *FSY1* je klíčovým genem, protože jeho produkt umožňuje kvasince využívat fruktózu za podmínek nízkých koncentrací hexóz, což je důležité při fermentaci moštu (Galeote et al. 2010).

3.2.2.2 *Pichia pastoris*

Kvasinka *Pichia pastoris* se v dnešní době stala významným organismem v molekulární biologii pro výrobu rekombinantních proteinů. Je to metylotrofní kvasinka, která patří do třídy *Ascomycetes*. Dosud bylo v této kvasince exprimováno více než 200 cizích proteinů. Díky pokroku ve vývoji nových kmenů a vektorů, zdokonaleným technikám a široké dostupnosti těchto nástrojů, spolu s lepším porozuměním biologii druhu *Pichia*, získal tento mikroorganismus na významu a schopnosti posloužit jak v komerční sféře, tak i ve výzkumných laboratořích (Batt 2014).

Silná regulace pomocí vhodného promotéru, minimální produkce endogenních proteinů mimo buňku a schopnost posttranslačních modifikací pro expresi funkčních proteinů z ní činí užitečný expresní systém pro fermentaci a následnou purifikaci cílových proteinů. Pro dosažení nejlepších podmínek pro produkci rekombinantního proteinu v expresním systému *P. pastoris*, je nutné upravit teplotu a dobu inkubace, které se mohou lišit v závislosti na konkrétních kmenech a exprimovaných proteinech (Karbalaei et al. 2020; Mastropietro et al. 2021).

Kromě všeho *Pichia pastoris* je považována za unikátního hostitele pro výrobu podjednotkových vakcín, což by mohlo v budoucnu výrazně ovlivnit rostoucí trh lékařských biotechnologií (Karbalaei et al. 2020).

3.2.3 Rod *Aspergillus*

Rod *Aspergillus* je zařazen do třídy *Ascomycetes*, jeho vegetativní cyklus je charakterizován tvorbou konidií. Jedná se o jeden z nejrozšířenějších a nejhojněji se vyskytujících rodů vláknitých mikroskopických hub. Vláknité houby jsou v bioinženýrství velmi vítány, protože jsou považovány za továrny na produkci a sekreci proteinů (Li et al. 2017). Tyto houby mohou být nalezeny v půdě, vzduchu, potravinách, organických zbytcích a dalších prostředích (Ruiz-Dõ Áez 2002).

Genom *Aspergillus* je relativně malý, s odhadovanou velikostí přibližně 35 Mb, a je snadno manipulovatelný, což umožňuje úspěšnou konkurenci s bakteriemi. Druhy rodu *Aspergillus* mají tuhou buněčnou stěnu, která představuje hlavní překážku pro proces transformace. V současnosti bylo vyvinuto několik metod transformace pro *Aspergillus spp.* Nejčastěji se používají tři metody, a to transformace pomocí polyetylglykolu, transformace zprostředkovaná agrobakterií a elektroporace (Son & Park 2021).

Rod *Aspergillus* zahrnuje širokou škálu druhů, které mají různé fyziologické vlastnosti a mnohé z nich mají potenciál ke komerčnímu využití díky svým metabolickým schopnostem. Například *Aspergillus oryzae* se tradičně využívá k výrobě fermentovaných potravin, a je známo, že může produkovat mykotoxin aflatoxin. Pro řešení tohoto problému byl vytvořen mutantní kmen BECh2, u kterého byl odstraněn gen pro aflatoxin a gen zodpovědný za produkci kyseliny cyklopiazonové. Tím byla také snížena produkce kyseliny kojové. Tento mutantní kmen se nyní využívá jako hostitel pro produkci triacylglycerolové lipázy a glukózooxidázy (Deckers et al. 2020; Olempska-Beer et al. 2006).

3.3 Legislativa

3.3.1 V EU

V Evropské unii (EU) je použití geneticky modifikovaných organismů povoleno pouze za přísných podmínek a s povolením Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA). V roce 2003 bylo v EU zavedeno nové nařízení o geneticky modifikovaných organismech, které zahrnuje přísné postupy hodnocení rizik a povolování výroby, výzkumu a uvádění geneticky modifikovaných potravin na trh (Nařízení (ES) 1829/2003). Základem této legislativy je tzv. systém certifikace bezpečnosti potravin, který se vztahuje na všechny nové potraviny, včetně těch, které obsahují geneticky modifikované mikroorganismy. Podle tohoto systému musí být každý nový potravinářský výrobek před uvedením na trh předložen k posouzení Úřadu EU pro bezpečnost potravin. EFSA poté posoudí, jestli výrobek splňuje kritéria bezpečnosti a kvality a doporučí, zda by měl být schválen k prodeji (Bruetschy 2019).

V EU je schváleno 65 odrůd GM rostlin (38x kukuřice, 10x bavlník, 12x sója, 4x řepka olejka, 1x řepa), bakterie a kvasinka. Avšak pěstovat pro komerční účely je v Evropské unii

povolena pouze jedna geneticky modifikovaná plodina, a to „Bt kukuřice“. Tato kukuřice obsahuje gen z bakterie *Bacillus thuringiensis*, což jí poskytuje odolnost proti zavíječi kukuřičnému (Trnková 2017).

EU také stanovuje limity pro určité látky a metabolity, které mohou být přítomny v potravinách, jež jsou produktem geneticky modifikovaných mikroorganismů. V Evropské unii jsou geneticky modifikované mikroorganismy (GMM) povoleny pro použití při výrobě produktů jako jsou enzymy, aminokyseliny nebo vitaminy. Aktuálně platí hlavní zásada, že pokud konečný produkt neobsahuje životaschopné buňky produkčního mikroorganismu ani zjiitelné množství jeho DNA (s detekčním limitem 10 ng DNA/1 g produktu), pak tento produkt nespadá do oblasti působnosti evropského nařízení o geneticky modifikovaných potravinách a krmivech (Nařízení (ES) 1829/2003), a tudíž se na něj nevztahuje povinnost označování. Většina společností je schopna tyto požadavky splnit (Maříková 2011).

Seznam mikroorganismů oznamovaných úřadu EFSA v rámci technické dokumentace (pro přímé záměrné použití nebo jako zdroje potravinářských a krmných doplňkových látek, potravinářských enzymů, přípravků na ochranu rostlin a geneticky modifikovaných mikroorganismů pro posouzení bezpečnosti) se průběžně mění a aktualizuje v souladu s nejnovějšími vědeckými poznatky a bezpečnostními požadavky (Koutsoumanis et al. 2024; Rodriguez et al. 2014). V následujících kapitolách budou podrobně popsány geneticky modifikované mikroorganismy a jejich využití v potravinářství.

3.3.2 V ČR

Regulace nakládání s geneticky modifikovanými mikroorganismy v České republice je přísná a odpovídá postupům a směrnicím Evropské unie. Stanovené podmínky musí být přesně dodržovány, což zajišťuje úroveň bezpečnosti potravin a ochrany spotřebitele (Maříková 2011).

V České republice jsou GMO včetně mikroorganismů regulovány zákonem o geneticky modifikovaných organismech (č.78/2004 Sb.) a několika souvisejícími vyhláškami (č. 209/2004 Sb). Tento zákon definuje, které kategorie geneticky modifikovaných organismů lze v ČR používat, za jakých podmínek a jaké jsou povinné značky na výrobcích a potravinách obsahujících GMO. Podle zákona je povoleno používání geneticky modifikovaných mikroorganismů v průmyslu a výzkumu. Výzkum a vývoj nových GMO a výrobků, které je obsahují, musí být před uvedením na trh předem schválen a testován na bezpečnost potravin a životního prostředí. Pro získání povolení musí být podrobně prokázáno, že nově vyvinuté GMO nepředstavují žádné riziko pro lidské zdraví a životní prostředí. Tento proces v České republice řídí Státní zemědělská a potravinářská inspekce (SZPI) a další orgány a instituce s kompetencemi v této oblasti, jako je Ministerstvo zemědělství a Státní zemědělský intervenční fond, které provádějí kontrolu a hodnocení bezpečnosti potravin a potravinových surovin, včetně surovin získaných genetickou modifikací (Trnková 2017).

Další důležitou institucí v této oblasti je Státní ústav pro kontrolu léčiv, který má na starosti registraci, kontrolu a hodnocení bezpečnosti léčivých přípravků a biotechnologických léčiv, včetně léčiv získaných genetickou modifikací. SZPI rovněž kontroluje dodržování podmínek povolení k nakládání s geneticky modifikovanými mikroorganismy (Zákon č.78/2004 Sb.).

3.3.3 Ve světě

Kanada a USA jsou předními zeměmi v oblasti biotechnologií a mají významný vliv na mezinárodní vývoj (Todd 2014).

V Kanadě byly geneticky modifikované organismy regulovány již od roku 1994, kdy byly schváleny první geneticky modifikované plodiny – sója, kukuřice a řepka (Smyth 2014). V roce 1996 byl pak schválen první geneticky modifikovaný potravinářský produkt – rbGH, což je hormon, který se podává kravám ke zvýšení produkce mléka (Raux et al. 2022).

Využívání geneticky modifikovaných organismů je regulováno federálními a provinciálními zákony. Federální vláda je zodpovědná za schvalování nových GMO pro využití v zemědělství a potravinářství, zatímco provincie mají pravomoc regulovat použití GMO v průmyslových aplikacích. Regulace geneticky modifikovaných mikroorganismů je podobná jako v Evropské unii. Kanadská vláda prostřednictvím kanadské agentury pro regulaci biotechnologií (Canadian Biotechnology Strategy) má pravomoc regulovat výzkum, vývoj, produkci a uvolňování GMO, včetně mikroorganismů. Federální agentura pro kontrolu potravin a léčiv (Health Canada) a Kanadská agentura pro ochranu životního prostředí (Environment Canada) společně zajišťují regulaci a schvalování nových GM produktů (Canada. Health Canada. 2008).

Ve Spojených státech amerických jsou geneticky modifikované mikroorganismy předmětem regulace již od roku 1986. Federální orgány v USA, které jsou odpovědné za regulaci GMM, jsou Agentura pro ochranu životního prostředí (EPA), Úřad pro bezpečnost potravin a léčiv (FDA) a Úřad pro zemědělství (USDA) (Hanlon & Sewalt 2021).

FDA je hlavním regulačním orgánem pro GMM v oblasti potravin a léčiv. FDA stanovuje, jaké GMM jsou bezpečné pro lidskou spotřebu, a jejich rozhodnutí jsou založena na podrobných testech vědeckého výzkumu. EPA se zabývá regulačními otázkami týkajícími se environmentálního dopadu GMM, jako jsou např. rizika pro životní prostředí a pro člověka v důsledku používání pesticidů vyráběných GMM. USDA zase reguluje GMM v oblasti zemědělství (Hanlon & Sewalt 2021).

V Asii v posledních letech výrazně narůstají zájmy o genetickou modifikaci, proto asijské země mohou být důležitým účastníkem na trhu v rámci širšího ekonomického a obchodního kontextu. Čína je jednou z největších zemí, která se intenzivně zabývá výzkumem a používáním GM mikroorganismů. V roce 2019 byly pro komerční využití v potravinářském průmyslu schváleny první geneticky modifikované kvasinky. V roce 2001 Čína přijala zákon o bezpečnosti GMO, který stanovuje proces registrace a schvalování GMO pro uvádění na trh a do oběhu. Registrační proces zahrnuje posouzení vlivu na životní prostředí, lidské zdraví a bezpečnost zvířat, jakož i posouzení dopadu na biologickou rozmanitost (Feng & Yang 2019).

3.4 Využití GMM v potravinářství

V současném potravinářském průmyslu se stává běžným trendem začleňování geneticky modifikovaných mikroorganismů do výrobního procesu. Takové mikroorganismy hrají klíčovou roli ve výrobě potravin s inovativními vlastnostmi a zlepšenými charakteristikami, což v konečném důsledku zvyšuje jejich výnos a kvalitu (Hanlon & Sewalt 2021).

V potravinářském průmyslu mikroorganismy hrají primární roli ve výrobě organických kyselin (například kyseliny citronové, mléčné, askorbové atd.), enzymů (chymosin, amylázy, invertáza atd.), aminokyselin (například glycin), mléčných výrobků (jogurty, sýry), fermentovaných potravin (nakládaná zelenina), masných výrobků (klobásy a salámy), alkoholických nápojů (pivo, víno). Tato široká škála produktů je vyráběna především díky biochemickým a metabolickým schopnostem mikroorganismů (Kallscheuer 2018; Hanlon & Sewalt 2021).

Tato kapitola se zaměří na dva klíčové aspekty využití geneticky modifikovaných mikroorganismů v potravinářství.

V první části se budou popsány potraviny, které jsou přímo vyráběny pomocí činnosti geneticky modifikovaných mikroorganismů. Tyto mikroorganismy jsou záměrně upraveny tak, aby přímo vykonávaly určité funkce nebo produkci látek. Takový přístup umožňuje přizpůsobit mikroorganismy, aby splňovaly specifické požadavky výroby potravin. Tabulka 1 popisuje konkrétní genetické modifikované mikroorganismy a oblasti jejich využití v potravinářství. V Evropské unii jsou GMM v současné době primárně využívány v rámci experimentů s jejich aplikací v potravinářství, avšak jejich průmyslové použití není běžné v důsledku přísných regulačních opatření a omezení (Mallikarjuna & Yellamma 2018).

Tabulka 1, Geneticky modifikované mikroorganismy a potraviny z nich

Název geneticky modifikovaného mikroorganismu:	Geneticky modifikované potraviny:
1. <i>Rhizomucor miehei</i> , <i>Endothia parasitica</i> , <i>Rhizomucor pusillus</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. lactis</i> , <i>A. niger</i> , yeast, and <i>L. lactis</i> DN209	sýr
2. <i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Kluyveromyces (Kazachstania) lodderae</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i> , <i>I. orientalis</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Candida inconspicua</i> , and <i>Candida maris</i>	jogurt a kefir
3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Saccharomyces exiguus</i> , <i>Candida humilis</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida milleri</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>Pichia anomala</i> , <i>Pichia subpelliculosa</i> , and <i>Torulaspora delbrueckii</i>	pekařské výrobky
4. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , and <i>Lactobacillus plantarum</i>	kysané zelí a nakládané okurky
5. <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , and <i>Pediococcus acidilactici</i> , which are used together with <i>Micrococcus</i> and <i>Staphylococcus</i> . <i>L. sakei</i> LTH673 and <i>L. curvatus</i> LTH 1432	klobásy a párky

Tabulka 1: Geneticky modifikované mikroorganismy a oblasti jejich využití v potravinářství (upraveno dle Mallikarjuna & Yellamma 2018).

Další část se bude věnovat využití geneticky modifikovaných mikroorganismů při produkci enzymů, kyselin a vitaminů, které jsou následně aplikovány v potravinářském průmyslu.

3.4.1 Masné výrobky

Bakterie mléčného kvašení jako *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactiplantibacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* a *Pediococcus acidilactici* spolu s rody *Micrococcus* a *Staphylococcus* hrají důležitou roli při výrobě uzenin. Tyto bakterie se používají

jako startovací kultury během fermentace, kde uvolňují aromatické sloučeniny, které dodávají masným výrobkům jejich charakteristickou chuť (Boyacioglu et al. 2010).

Bakterie mléčného kvašení jsou schopny vytvářet různé organické kyseliny, které přispívají ke snížení pH uzenin. To vede ke změně konzistence bílkovin, inhibici mikrobiálních kmenů podílejících se na kažení potravin a vytváření charakteristické kyselé chuti (Marchi et al. 2012).

Příklad vylepšené startovací kultury pro masné výrobky s využitím techniky genového inženýrství popsali v Německu Hammes a Hertel (1996), kteří vytvořili kmeny laktobacilů s antimikrobiální aktivitou proti potravinovému patogenu *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* je jeden z nejvýznamnějších patogenů člověka a zvířat. Přítomnost *S. aureus* v potravinách představuje potenciální riziko pro zdraví spotřebitele v důsledku schopnosti produkovat enterotoxiny, které vznikají jako metabolické produkty při množení těchto bakterií v potravě. Kontaminace potravin může nastat v průběhu výrobního procesu při nedodržování hygienických zásad (Atanassova et al. 2001; Hammes & Hertel 1996).

Výsledky ukázaly, že transformované kmeny měly významnou schopnost eliminovat stafylokoky, což přispívá k bezpečnosti během procesu fermentace uzenin. Jednalo se hlavně o experiment, který ovšem nenašel uplatnění v praxi (Csutak & Sarbu 2018).

3.4.2 Pekařské výrobky

Nejčastěji používaným druhem kvasinek pro kynutí těsta je *Saccharomyces cerevisiae*. Nicméně byly identifikovány i další kvasinky izolované z kvásku, včetně *Saccharomyces exiguus*, *Candida humilis*, *Candida krusei*, *Candida milleri*, *Issatchenkia orientalis*, *Pichia anomala*, *Pichia subpelliculosa* a *Torulaspora delbrueckii* (Pulvirenti et al. 2004). Kmeny kvasinek lze geneticky modifikovat, aby se zvýšila jejich účinnost kvašení. Toto zlepšení může vést k rychlejšímu kynutí těsta a zkrácení celkové doby kvašení při výrobě chleba (Salema-Oom et al. 2011).

Druhy bakterií z rodu *Bacillus* představují vážné riziko pro pekařský průmysl, kde způsobují nemalé ekonomické ztráty. Pro regulaci kažení a potlačení patogenních organismů v potravinách se v laboratorních podmínkách využívají bakteriociny. Tyto látky jsou peptidy a vykazují výrazné antimikrobiální účinky. Produkují se bakteriemi mléčného kvašení (BMK), které jsou součástí mikrobioty chlebového kvásku. Mimo to mají bakterie mléčného kvašení další pozitivní efekt, jehož mechanismus působení spočívá ve snižování pH, kompetici o živiny a produkci inhibičních metabolitů (Khelissa et al. 2021). Bakteriociny mohou produkovat i patogenními kmeny, ty však nelze v potravinářském průmyslu používat. V důsledku toho se vědci snažili klonovat geny pro tyto bakteriociny do bezpečnějších hostitelů (Yang et al. 2014). Příkladem je hiracin, bakteriocin produkováný bakterií *Enterococcus hirae*, známou svou účastí na kažení potravin a nozokomiálních infekcích. Klonování a exprimace genů pro hiracin do bezpečnějších hostitelů, jako jsou *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus sakei*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* a kvasinky *Pichia pastoris*, ukázaly úspěšné využití geneticky modifikovaných kmenů BMK s antimikrobiální aktivitou proti potravinovým patogenům. Produkce bakteriocinů v jiných hostitelích by mohla vést ke zvýšení produkce a získání multibakteriocinogenních kmenů s širším antimikrobiálním spektrem. Tyto studie

zdůrazňují perspektivu využití geneticky modifikovaných mikroorganismů jako potenciálních startovacích kultur s pozitivním vlivem na bezpečnost a kvalitu potravin (Sánchez et al. 2008).

Výzkum však pokračuje ve zkoumání způsobů, jakými může genetické inženýrství přispět ke zlepšení kmenů kvasinek pro lepší výkonnost v pekařském průmyslu. Přijetí spotřebiteli a schválení regulačními orgány hrají významnou roli při rozhodování o širokém využití geneticky modifikovaných organismů při výrobě potravin (Sánchez et al. 2008).

3.4.3 Alkoholické nápoje

V posledních desetiletích došlo k nárůstu počtu pivovarů a značek piva po celém světě. Současně roste poptávka spotřebitelů po výrobcích vyšší kvality a pivech s novými a různorodými chuťovými vlastnostmi (Viejo et Fuentes 2020).

Optimalizace pivovarských kvasinek vede k efektivnějšímu procesu výroby piva a zlepšení jeho celkové kvality. To platí zejména pro ležácké pivovarské kvasinky *Saccharomyces pastorianus* nebo *Saccharomyces cerevisiae*, které dominují v pivním průmyslu s podílem kolem 90 %. Nedávné prozkoumání DNA ležáckých pivovarských kvasinek otevřelo možnosti využití pokročilých technologií v genetickém inženýrství (Saerens et al. 2010).

Genetické úpravy byly provedeny zejména v oblasti aromatických a chuťových vlastností piva, což je zatím schválené pouze v USA.

Příkladem je zvýšení aktivity β -lyázy u kvasinek pomocí CRISPR/CAS-9 s cílem zlepšit jejich schopnost fermentace a posílit chmelovou chuť piva (Krogerus et al., 2021). β -lyáza je enzym, který katalyzuje rozklad prekurzorů aromatických sloučenin na aromatické thiolové sloučeniny. Zvýšená aktivita β -lyázy v kvasinkách vede k větší produkci těchto thiolů, což přispívá k intenzivnější chmelové chuti piva (Roncoroni et al. 2011).

Nejprve byl proveden screening kmenů a identifikovány potenciální rodičovské kmeny s vysokou aktivitou β -lyázy. Plazmid byl transformován pomocí elektroporace do bakterie *Escherichia coli*, která sloužila jako hostitelská buňka. Následně byly vytvořeny hybridy a vybrány ty s požadovanými vlastnostmi. V důsledku těchto úprav kmeny kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* byly schopny produkovat piva se zvýšenou koncentrací aromatických thiolových sloučenin (Krogerus et al. 2021).

Další studie se zaměřila na modifikaci genů esteráz. Vysoká aktivita esteráz může omezovat celkové množství esterů a být klíčovým faktorem při určování aromatického profilu kvašených alkoholických nápojů. Cílem bylo zabránit degradaci esterů a tím i ztrátě ovocných aromat. K tomuto účelu byla použita technika CRISPR-Cas9, která odstranila geny zodpovědné za kódování esteráz v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*. Výsledek ukazuje, že odstranění esterázových genů má pozitivní vliv na aromatický profil uvolňovaný *S. cerevisiae* (Dank et al. 2018).

Kromě kvasinek se na chuti piva významně podílí také chmel, který dodává pivu hořkost a charakteristickou „chmelovou příchutí“. Chmel je pro pivovary drahým zdrojem surovin (celkový domácí prodej se za posledních 10 let ztrojnásobil v důsledku rostoucí poptávky) a je plodinou, která vyžaduje velké množství přírodních zdrojů. Ročně je na zavlažování domácího chmele potřeba přibližně 100 miliard litrů vody, a k dopravě této vody

od zdroje na farmu je třeba značné infrastruktury. Navíc se obsah silic v chmelu výrazně liší, což ztěžuje dosažení konzistentní chmelové chuti piva. Genetické inženýrství umožňuje upravit kvasinky tak, aby vytvářely tuto charakteristickou příchut' bez nutnosti přímého přidání chmele během výrobního procesu (Denby et al. 2018).

Byly vyvinuty drop-in kmeny pivovarských kvasinek, které byly navrženy tak, aby mohly nahradit tradiční kmeny bez potřeby změn v procesu výroby. Drop-in kvasinky jsou schopné biosyntetizovat monoterpeny, a to pomocí inkorporace genů rostlinného sekundárního metabolismu, konkrétně genů geraniolu a linalool syntázy z bazalky a máty. Výsledky sensorické analýzy, provedené u piva uvařeného v pilotních průmyslových fermentacích, prokazují, že upravené kmeny dodávají hotovému pivu výraznou chmelovou chuť (Denby et al., 2018; Lermusieau et al. 2001).

Inovace v oblasti pivovarnictví, které otevírá biotechnologie, představuje cestu, kterou je třeba ještě projít. Počet mikroorganismů, které mohou kvasit a které se mohou vyskytovat od doby sklizně ječmene až do doby stáčení piva do lahví, je obrovský. Výzkum v této oblasti se postupně rozšiřuje, avšak většina studií zatím probíhá v laboratorním měřítku. Nicméně bez širšího přijetí společností a považování biotechnologických řešení za formu pokroku může průmysl tyto inovace zanedbat, nebo dokonce přestat s jejich využíváním. Proto je nezbytné zvyšovat povědomí o výhodách spojených s biotechnologickými řešeními v potravinářském průmyslu (Astola et al. 2023).

3.4.4 Enzymy

Oblastí, kde GMM našly široké uplatnění, je výroba potravinářských enzymů. Potravinářské enzymy se běžně používají při výrobě potravin k provádění řady procesů, jako je například snižování obsahu laktózy v potravinách, zpevňování těsta nebo úprava škrobu při pečení, přeměna škrobů na cukry a hydrolyzace bílkovin (Eskin et Shahidi 2013).

Výroba geneticky modifikovaných enzymů vychází z potřeby zlepšit a zefektivnit výrobní procesy. Tradiční metody výroby enzymů mohou být pomalé, nákladné a méně účinné. Genetické modifikace umožňují vložit geny pro produkci enzymů do různých mikroorganismů a produkovat tak velké množství enzymů v krátkém čase a s nižšími náklady. Genetická modifikace může zlepšit stabilitu enzymů vůči teplotě, pH a dalším faktorům. Výroba enzymů pomocí GMM je často šetrná k životnímu prostředí, protože při ní nejsou usmrcována zvířata. Kromě toho lze GM enzymy optimalizovat pro konkrétní účely, což může vést ke zlepšení funkčnosti a zvýšení efektivity (Choct 2006). Dále budou podrobněji popsány některé potravinářské enzymy vyráběné pomocí GM mikroorganismů.

3.4.4.1 Chymosin

Chymosin, známý také jako rennin, je enzym, který se přirozeně vyskytuje v žaludku savců a slouží k trávení bílkovin v mléce. Chymosin byl prvním registrovaným potravinářským enzymem vyrobeným komerčně pomocí technologie rekombinantní DNA. Chymosin se také používá v potravinářském průmyslu při výrobě sýrů za účelem srážení mléčných bílkovin při výrobě sýřeniny (Kumar et al. 2010). Tradičně se chymosin vyráběl ze žaludeční sliznice mladých telat. Dnes se chymosin může vyrábět pomocí geneticky modifikovaných mikroorganismů. Používají se geny, které jsou schopny rozkládat kasein v mléce, zejména gen

ze *Streptomyces lactis*. Tento gen se pak vloží do genomu mikroorganismu, jako jsou bakterie *Escherichia coli* nebo *Kluyveromyces lactis* (Lambré et al. 2022).

Testovala se toxicita potravinářského enzymu chynosinu, který byl vyráběn pomocí geneticky modifikovaného kmene *Kluyveromyces lactis* CIN společností DSM Food Specialties B.V. a *Aspergillus niger* DSM 29546 společností Chr. Hansen a je určený k použití při zpracování mléka na výrobu sýru nebo k výrobě fermentovaných mléčných výrobků. Byla provedena 90denní studie orální toxicity s opakovanou dávkou u potkanů, která ukázala, že nejvyšší testovaná dávka potravinářského enzymu nevyvolává nežádoucí účinky. Byly také provedeny analýzy podobnosti aminokyselinové sekvence enzymu s alergeny, ale byly nalezeny jen malé shody. I když nelze úplně vyloučit možnost alergických reakcí u některých osob, komise dospěla k závěru, že tento enzym je bezpečný za normálních podmínek použití (Lambré et al. 2022; Silano et al. 2022).

V rámci další studie byla prozkoumaná indukovatelná exprese rekombinantního buvolího chymosinu v kvasinkovém kmeni *Pichia pastoris*, následovanou jeho chromatografickým čištěním a použitím při výrobě sýra mozzarella. Pro syntézu cDNA prochymosinu byla využita RNA extrahovaná z abomasu sajícího telete buvolce, která byla následně exprimována v kmeních *P. pastoris* X-33 a SMD1168. Výsledky ukázaly, že kmen X-33 vykazoval o 68 % vyšší úroveň exprese rekombinantního buvolího chymosinu ve srovnání s kmenem SMD1168. Po úspěšné expresi následovalo 28krát opakované čištění enzymu. Použití tohoto přípravku chymosinu bylo rovněž testováno v procesu výroby sýra Mozzarella. Enzym jasně prokázal účinné srážení mléka s omezenou proteolýzou, což v konečném důsledku přispělo k zachování žádoucí chuti sýra. Tyto výsledky naznačují, že nový rekombinantní kmen kvasinek může představovat nový zdroj pro vysokou úroveň exprese chymosinu, což je důležité pro průmyslovou výrobu sýra (Tyagi et al. 2017).

3.4.4.2 Amylázy

Amylázy jsou enzymy, které katalyzují hydrolýzu glykosidické vazby v polysacharidech. V potravinářském průmyslu se amyláza používá k enzymatickému štěpení škrobu a jeho přeměně na sacharid, což zvyšuje sladkost a zlepšuje strukturu potravin. Příklady potravin, v nichž se amyláza používá, jsou sladidla, cukrovinky, cereálie, pečivo, alkoholické nápoje a další (Authors et al. 2011).

Existují tři typy amylázy: alfa-amyláza, beta-amyláza a gama-amyláza.

Alfa-amyláza. Alfa-amyláza je nejběžnějším typem amylázy a je schopna štěpit vazby mezi glukózovými jednotkami v škrobu. Tento enzym je aktivní v ústní dutině a v tenkém střevě, kde začíná proces štěpení na jednoduché cukry (Authors et al. 2011).

Beta-amyláza. Beta-amyláza katalyzuje štěpení vazeb mezi dvěma glukózovými jednotkami na konci molekuly. Výsledkem je uvolnění maltózy, disacharidu složeného ze dvou molekul glukózy. Tento enzym se obvykle nachází v semenech obilovin a je důležitým faktorem při klíčení (Thalmann et al. 2019).

Gama-amyláza. Gama-amyláza je specializovaná na štěpení polysacharidů na koncových místech řetězců, čímž produkuje maltózu a glukózu. Tento enzym pomáhá zlepšit výtěžnost při výrobě sladového extraktu a sladkých sirupů, jako je kukuřičný sirup s vysokým obsahem fruktózy (Choct 2006).

Tradiční metody získávání amylázy, jako je extrakce ze slinivky břišní prasat nebo z houby *Aspergillus oryzae*, jsou poměrně nákladné a méně účinné než výroba pomocí geneticky modifikovaných mikroorganismů. Gen *amyE*, který kóduje exoenzymatickou alfa-amylázu, se používá k výrobě amylázy genetickou modifikací z bakterie *Bacillus subtilis*. Studie naznačuje, že amyláza z *Bacillus subtilis* CB-18 má kombinovanou aktivitu na různé typy škrobu, což z ní činí široce využitelný enzym (Nwokoro & Anthonia 2015).

Další studie se zaměřila na výrobu gama-amylázy pomocí geneticky modifikovaných mikroorganismů (Liu et al. 2022). Hostitelskými mikroorganismy byly *Escherichia coli* nebo *Saccharomyces cerevisiae*. Genetická modifikace umožnila optimalizovat enzymatické vlastnosti glukoamylázy tak, aby měl enzym lepší tepelnou stabilitu, substrátovou specifitu nebo zvýšenou aktivitu. Toto lze využít k výrobě enzymů s lepšími vlastnostmi pro specifické aplikace, jako je průmyslová výroba sladových cukrů. Další výhodou je možnost získat větší množství enzymu z jediného klonu geneticky modifikovaného mikroorganismu, což pomáhá usnadnit rozšiřování výroby na větší množství v průmyslové výrobě (Silano et al. 2018).

3.4.4.3 Proteázy

Proteázy jsou skupina enzymů, které štěpí peptidové vazby mezi aminokyselinami v bílkovinách. V potravinářství se často používají při výrobě uzenin a masa. Proteázy pomáhají urychlit zrání masa a zjemnit jeho strukturu. Při výrobě se obvykle používají dvě různé proteázy: endopeptidáza a exopeptidáza. Endopeptidáza štěpí bílkoviny uvnitř řetězců v místech, kde jsou přítomny určité aminokyseliny, zatímco exopeptidáza odštěpuje aminokyseliny z konců řetězců. Tyto proteázy se často používají společně, aby se maximalizoval rozklad bílkovin (Raveendran et al. 2018).

V potravinářství a dalších průmyslových oblastech je široce využívána alkalická proteáza.

Alkalická proteáza je schopná štěpit bílkoviny za alkalických podmínek, tedy při vyšším pH. Nicméně současná aktivita a výtěžnost tohoto enzymu nepokrývá poptávku, a proto je důležité identifikovat nové alkalické proteázy s vysokou aktivitou. V roce 2022 byl klonován potenciální gen alkalické proteázy BSP-1 z kmenu *Bacillus subtilis*, který byl izolován v laboratorních podmínkách. Následně BSP-1 byl exprimován v kmeni *Bacillus amyloliquefaciens* BAX-9. Analyzovala se úroveň exprese proteinu pod různými promotorovými sekvencemi. Výsledky naznačovaly, že promotor P43 vedl k nejvyšší úrovni transkripce, hladině proteinu a aktivitě enzymu. Po optimalizaci fermentačního média bylo dosaženo maximální aktivity 524,12 U/ml při použití promotoru P43. Celkově lze tedy říci, že tato studie identifikovala gen alkalické proteázy BSP-1 z *B. subtilis* a navrhla novou metodu pro vysoce účinnou expresi alkalické proteázy v kmenu *B. amyloliquefaciens* (Das & Prasad 2010; Jiang et al. 2022)

3.4.4.4 Invertáza

Invertáza (beta-fruktofuranosidáza) je enzym, který katalyzuje rozklad sacharózy na fruktózu a glukózu. Nachází se v mnoha rostlinách a mikroorganismech, jako jsou bakterie, kvasinky a plísně. Invertáza se v potravinářském průmyslu využívá zejména při procesu rozkladu sacharózy a způsobuje, že se roztok stává sladší a lépe rozpustný. Produkt se nazývá invertní cukr. Používá se jako sladidlo v nápojích, cukrovinkách, pečivu a dalších sladkých

výrobci. Další využití invertázy v potravinářském průmyslu je v procesu zvaném lyofilizace nebo kryofixace, invertní cukr slouží jako kryoprotektivum. Invertáza se přidává do roztoku před zmrazením, kde hydrolyzuje sacharózu na glukózu a fruktózu, čímž snižuje množství krystalů, které se tvoří při zmrazování. Tím se zlepšuje chuť, struktura a vzhled mražených potravin (Manoochehri et al. 2020).

Tradiční metoda výroby invertázy z kvasinek má několik nevýhod, jako je nízká produktivita a nestabilita enzymu. Proto se k produkci invertázy s vyšší účinností a stabilitou stále častěji používá genetická modifikace mikroorganismů. Na Novém Zélandu, v Austrálii a USA byl schválen enzymový přípravek z geneticky modifikovaného kmene *Trichoderma reesei* s cílem produkovat enzymatický kmen *T. reesei* (AR-996) obsahující gen pro β -fruktofuranosidázu z *Aspergillus niger*. Enzym má být používán pro snížení obsahu cukru a produkci oligosacharidů s krátkým řetězcem (Munkvold 2017).

3.4.5 Aminokyseliny

Aminokyseliny jsou základními stavebními složkami bílkovin a podílejí se na mnoha biochemických procesech v těle. Aminokyseliny se také hojně využívají v průmyslové výrobě. Tradiční způsob výroby aminokyselin zahrnuje chemické syntézy, které jsou však obvykle finančně nákladné a neekologické. Proto se v posledních desetiletích stále více využívá genetická modifikace mikroorganismů pro produkci aminokyselin. EU schválila tři proteinogenní aminokyseliny jako látky zvýrazňující chuť a vůni, a to kyselinu L-glutamovou (E620), glycin (E640) a L-cystein (E920). V potravinářském průmyslu se používají především jako látky určené k aromatizaci, potravinářské přídatné látky a doplňky stravy (Kallscheuer 2018).

3.4.5.1 Kyselina L-glutamová

Kyselina L-glutamová (označovaná také jako glutamát) je aminokyselinou, která je důležitá pro mnoho funkcí v těle, včetně podpory imunitního systému, regenerace tkání a přenosu nervových signálů (Emery 2012).

V potravinářském průmyslu se kyselina L-glutamová používá ke zvýraznění chuti a zintenzivnění přirozeného aroma potravin. Pro výrobu této kyseliny se v potravinářském průmyslu využívá bakterie *Corynebacterium glutamicum*. Tato bakterie je ideální pro výrobu kyseliny L-glutamové z několika důvodů. Jedná se o grampozitivní aerobní bakterii, která se snadno kultivuje a má schopnost produkovat velké množství kyseliny. Má také vysokou citlivost na aminokyseliny v médiu, což usnadňuje její použití při výrobě vysoce čisté kyseliny L-glutamové (Ganguly 2023).

V nedávné době byla bakterie *C. glutamicum* úspěšně upravována pomocí technik genetického inženýrství. Ve výsledku byl vyvinut nový kmen tohoto mikroorganismu, který je schopen produkovat 100 g kyseliny L-glutamové na litr kultivačního média s výtěžkem 0,6 g na g glukózy (Shyamkumar et al., 2014). Celkově lze říci, že geneticky modifikovaný kmen *C. glutamicum* je vhodným mikroorganismem pro průmyslovou výrobu kyseliny L-glutamové (Tsuge et Matsuzawa 2021).

V nedávné studii Katashkina a kol. (2009) zjistili, že alternativní organismy, jako je bakterie *Pantoea ananatis*, jsou slibnými producenty kyseliny L-glutamové (Katashkina et al.

2009). *Pantoea ananatis* byla izolována z půdy v Iwata-shi v Japonsku. Je schopná růst při kyselém pH a vykazuje odolnost vůči vysokým koncentracím kyseliny L-glutamové (Kinoshita et al. 1961). Do nedávné doby absence účinných genetických nástrojů bránila manipulaci s touto bakterií a zpomalovala základní výzkum. Technika Lambda Red, která byla původně vyvinutá pro *E.coli*, se ukázala jako efektivní nástroj pro rychlou a přesnou modifikaci genomu. Lambda Red pomáhá odstranit určité geny, aniž by bakterii poškodil (Yamamoto et al. 2009). V této studii bylo také zjištěno, že exprese genů Lambda Red u *P.ananatis* je vysoce toxická kvůli nesprávné regulaci expresních mechanismů. Proto byl proveden screening za účelem výběru vhodného mutantů *P.ananatis*, který vedl k identifikaci kmenu SC17(0). Následně technologie Lambda Red byla úspěšně použita ve vybraném kmeni, což výrazně urychlilo základní výzkum a zvýšilo produkci kyseliny L-glutamové (Katashkina et al. 2009).

3.4.5.2 Cystein

Cystein je aminokyselina, která se používá v potravinářském průmyslu jako přísada při výrobě pečiva a dalších potravin obsahujících pšeničnou mouku. Cystein se také používá jako ochucovadlo při výrobě některých potravin, například křupavých smažených výrobků. Kromě toho se používá jako přísada do nápojů pro zlepšení jejich chuti. Příkladem jsou nápoje s ovocnou příchutí a energetické nápoje. V potravinářském průmyslu se označuje kódem E920 (Clemente Plaza et al. 2018).

Obvykle se L-cystein získává převážně hydrolyzou bílkovin z živočišného materiálu, např. drůbežního peří. Přírozená biosyntetická cesta založená na L-serinu a acetyl-CoA byla použita k inženýrské produkci cysteinu v *Escherichia coli* a *Corynebacterium glutamicum*. Při tomto postupu jsou do genomů *E. coli* a *C. glutamicum* vloženy geny pro enzymy zapojené do biosyntézy cysteinu. To umožňuje produkci cysteinu jako vedlejšího produktu. Cystein může být produkován v bakteriálních buňkách a uvolňován do prostředí, odkud může být izolován (Wada & Takagi 2006).

V současné době se v průmyslovém měřítku často využívá alternativní metoda fermentační výroby L-cysteinu, která je založena na rekombinantních bakteriích *E. coli*. Tento postup umožňuje efektivní a usnadněnou produkci L-cysteinu díky syntetickým plazmidovým konstrukcím. Přestože tato metoda poskytuje mnoho výhod, metabolický stres a související únikové mechanismy jsou limitujícími faktory při průmyslové biomanuální výrobě (Wei et al. 2019).

Vzhledem ke složité regulaci L-cysteinu byl speciálně vyvinut potravinářský mikroorganismus *Corynebacterium glutamicum*. U upraveného kmene byla po přidání 6 g/l Na₂S₂O₃ dosažena produkce L-cysteinu 947,9 ± 46,5 mg/l, což představuje přibližně 14,1krát více než u původního kmene. Tyto výsledky ukázaly, že *C. glutamicum* je perspektivní platformou pro produkci L-cysteinu (Wei et al. 2019).

3.4.5.3 Glycin

Glycin je neesenciální aminokyselina, která se nachází v bílkovinách, ale také v různých zdrojích potravin, jako je maso, ryby, sója a ořechy. V potravinářském průmyslu se glycin používá jako složka některých potravinářských aditiv a sladidel, např. sladidel na bázi stévie.

Glycin se také používá jako součást náhradních zdrojů bílkovin a v doplňcích stravy (Shankar Ponnusha et al. 2011).

V posledních letech se zvýšil zájem o použití glycinu jako funkční složky v potravinářských výrobcích. Důvodem je pozitivní vliv glycinu na některé fyziologické procesy v lidském těle, jako je snižování krevního tlaku, podpora imunitního systému a zlepšení spánku. Použití glycinu v potravinách tak může přinést přidanou hodnotu pro zdraví spotřebitelů (Soh et al. 2024).

V současné době probíhá výzkum využití glycinu jako potenciální funkční složky v potravinářských materiálech, jako jsou bílkoviny, sacharidy a tuky. Výsledky ukazují, že glycin lze použít jako antioxidantní, antibakteriální a protizánětlivou složku. V budoucnu se tak glycin může stát zajímavou alternativou k tradičním potravinářským aditivům a poskytnout nové možnosti pro vývoj nových potravinářských výrobků (Soh et al. 2024).

Jedním z perspektivních způsobů výroby glycinu je genetická modifikace mikroorganismů. K výrobě glycinu se často používají mikroorganismy, jako jsou *Escherichia coli* a *Corynebacterium glutamicum*. Geneticky modifikované mikroorganismy mají oproti tradičním metodám výroby glycinu několik výhod. Jsou schopny produkovat glycin v množství, kterého je obtížné nebo nemožné dosáhnout pomocí přírodních mikroorganismů nebo tradičních výrobních metod. Genetická modifikace může také zlepšit vlastnosti mikroorganismů, jako je rychlost růstu, výtěžnost a stabilita produkce. Geneticky modifikované mikroorganismy lze navíc snadno manipulovat, což umožňuje rychlou optimalizaci procesu a zlepšení výroby glycinu (Farwick et al. 1995).

3.5 Bezpečnost a rizika

Bezpečnost a rizika spojená s využitím rekombinantních technologií představují důležitý a komplexní problém, který zaujímá významné místo v diskusi o potravinách a životním prostředí. Veřejnost má mnoho obav ohledně nových geneticky modifikovaných produktů, zejména z hlediska bezpečnosti pro lidské zdraví a životního prostředí, etiky a potravinové bezpečnosti. Mezi nejčastější obavy patří rizika spojená s možnými alergiemi, změnami nutričních vlastností, potenciální toxicitou a vznikem rezistence vůči antibiotikům u mikroorganismů (Bawa & Anilakumar 2013).

Před uvedením jakéhokoli geneticky modifikovaného výrobku na trh však probíhají přísná testování.

Posuzování většinou probíhá na základě porovnání vlastností GM produktu s jeho tradičním protějškem. Na rozdíl od geneticky modifikovaných plodin nejsou konvenční plodiny podrobeny přísným testům na toxické nebo alergické účinky na spotřebitele. Je třeba mít na paměti, že i tradiční potraviny mohou obsahovat přírodní toxiny, antinutriční látky a sloučeniny s potenciálně karcinogenními účinky (Nicolia et al. 2014).

3.5.1 Posuzování GMO

V současné době bylo provedeno více než 3000 vědeckých studií, které hodnotily bezpečnost GM výrobků a plodin z hlediska zdraví a vlivu na životní prostředí. Hlavním orgánem odpovědným za posuzování GMO v Evropské unii stále zůstává Evropský úřad pro bezpečnost potravin (Lemaux 2008, 2009; Nicolía et al. 2014).

V některých studiích se testoval vliv GM plodin na zdraví zvířat. U zvířat, která byla krmena geneticky modifikovanou kukuřicí, nebyly zjištěny žádné patologické změny orgánů ani změny v jejich funkcích ve srovnání se zvířaty krmenými běžnou kukuřicí. Nebyly pozorovány žádné nepříznivé účinky geneticky modifikované kukuřice na morfologii tenkého střeva ani na střevní mikrobiom. Protilátky specifické pro bílkovinu Cry1Ab, obsaženou v geneticky modifikované kukuřici, nebyly detekovány v krvi, což naznačuje absenci alergické imunitní odpovědi na tuto bílkovinu (Van Eenennaam & Young 2014).

Dále nebyl prokázán žádný vliv na užitkovost a hematologické ukazatele, včetně parametrů erytrocytů, leukocytů a trombocytů, u prasnic krmených geneticky modifikovanou kukuřicí a sójou. Studie ukázala, že krmení březích prasnic směsí obsahující geneticky modifikované organismy nemělo vliv na jejich reprodukční schopnosti ani na vývoj potomstva. Také se neprokázal přenos transgenní DNA z krmiva do krevního oběhu (Świątkiewicz et al. 2013).

V další studii byl vytvořen literární přehled, který zkoumal výsledky 12 dlouhodobých studií (trvajících déle než 90 dní až 2 roky) a 12 vícegeneračních studií (2 až 5 generací) o vlivu na zdraví zvířat, krmených GM kukuřicí, sójou, tritikále a bramborami. Bylo provedeno mnoho analýz včetně biochemických, histologických a hematologických testů, stejně jako detekce transgenní DNA. Výsledky všech 24 studií neprokazují žádná zdravotní rizika a obecně nebyly zaznamenány žádné statisticky významné rozdíly mezi sledovanými parametry. Byly zjištěny pouze nepatrné rozdíly, které však spadaly do běžného rozmezí variability posuzovaných parametrů a neměly biologický ani toxikologický význam. Tato analýza studií poskytuje důkazy o tom, že geneticky modifikované rostliny jsou z nutričního hlediska srovnatelné se svými geneticky nemodifikovanými protějšky a mohou být bezpečně používány v potravinách a krmivech (Snell et al. 2012).

Česká republika se také aktivně zapojila do výzkumů týkajících se bezpečnosti geneticky modifikovaných rostlin již před přijetím prvního zákona o nakládání s geneticky modifikovanými organismy v roce 2001. Studie se zaměřovaly na mapování, kontrolu a poskytování podkladů pro vytvoření národní legislativy. Postupně byly vyvíjeny detekční metody, prováděny kontroly polních pokusů a sbírána data o možném přenosu genů do sousedních porostů. Studie se zaměřily také na necílové organismy, přičemž výsledky potvrdily nepřítomnost negativního vlivu na členovce a hmyz. Poznatky byly následně sdíleny v mezinárodních databázích, jako je například Evropský úřad pro bezpečnost potravin neboli EFSA nebo Evropská komise (EK). Výzkumy v oblasti GMO a bezpečnosti GM potravin v České republice provádějí různé vysoké školy, kontrolní instituce, ústavy Akademie věd České republiky a další relevantní pracoviště (Rakouský & Doubková 2016).

Celosvětově byly provedeny rozsáhlé studie bezpečnosti rekombinantního bovinního somatotropinu rbGH, který se podává krávám pro zvýšení dojitosti. Tento hormon se dostává do krevního oběhu, kde ovlivňuje produkci mléka tím, že zvyšuje produkci mléčných žláz. Nicméně v důsledku metabolismu a rozkladu hormonu se většina rbGH rozloží nebo inaktivuje, aniž by se dostala do mléka. To znamená, že i když je krávám podáván rbGH, nedochází k významnému zvýšení obsahu bovinního somatotropinu v mléce. Publikované údaje tak naznačují, že používání rbGH nemá vliv na nutriční kvalitu mléka a zdraví konzumentů (Juskevich & Guyert 1990; Parodi 2005).

Evropská unie však takové mléko tvrdě odmítá, částečně kvůli obavám spotřebitelů, které vznikly v 90. letech 20. století v souvislosti s některými bezpečnostními problémy potravin, jako je například onemocnění bovinní spongiformní encefalopatie (Brown P et al. 2001).

EU rozhodla neschválit prodej mléka od krav ošetřených rbGH v členských zemích EU, a to nikoliv na základě obav o lidské zdraví, ale na základě otázek týkajících se welfare zvířat (Lemaux 2008).

3.5.2 Posuzování GMM

Při posuzování produktů obsahujících GMM se Vědecká komise pro geneticky modifikované organismy Evropského úřadu pro bezpečnost potravin řídí čtyřmi kategoriemi v závislosti na povaze výrobků a vědeckých informací potřebných pro hodnocení rizik (European Food Safety Authority 2011).

Kategorie 1 zahrnuje chemicky definované purifikované sloučeniny a směsi bez GMM nebo nově zavedených genů. Příkladem jsou aminokyseliny a vitaminy.

Kategorie 2 zahrnuje komplexní produkty, z nichž byly odstraněny GMM i nově zavedené geny. Patří sem buněčné extrakty a většina enzymových přípravků.

Kategorie 3 zahrnuje produkty odvozené z GMM, kde GMM schopné množení nebo přenosu genů chybí, ale nově vnesené geny zůstávají. Příkladem jsou tepelně inaktivované startovací kultury.

Kategorie 4 zahrnuje produkty obsahující GMM schopné množení nebo přenosu genů, jako jsou živé startovací kultury pro fermentované potraviny a krmiva.

Srovnávací přístup se používá jako mezinárodně uznávaný základ pro hodnocení rizik v rámci zdraví lidí a zvířat. Z toho dokumentu vyplývá, že GMM lze považovat za bezpečné, pokud jsou podrobeny přísnému posouzení a srovnání s vhodnými protějšky, což jsou podobné mikroorganismy bez genetické modifikace a s dobře zavedenou historií bezpečného používání (European Food Safety Authority 2011).

Výše uvedené výsledky prokazují, že zatím neexistují vědecky ověřené důkazy o tom, že by potraviny získané z geneticky modifikovaných zdrojů měly negativní vliv na zdraví spotřebitelů. Navzdory tomu, že EU zůstává ve větší míře skeptická, nemůžeme ignorovat fakt, že podíl geneticky modifikovaných potravin na světovém trhu neustále roste.

4 Závěr

Z literárního přehledu zabývajícího se využitím geneticky modifikovaných mikroorganismů vyplývá, že tyto mikroorganismy přináší řadu výhod. GMM nabízejí možnost vylepšit výrobní procesy prostřednictvím produkce specifických enzymů a látek, což může vést k efektivnější výrobě potravin a snížení nákladů. Díky GMM mohou být vytvořeny nové potraviny s vylepšenými vlastnostmi, jako je chuť, textura nebo vzhled, což umožňuje rozšíření nabídky potravin na trhu. Efektivnější výrobní procesy a produkce potravin s vyšší výživovou hodnotou mohou přispět k udržitelnějšímu potravinářskému systému. Méně spotřeby surovin, energie, vody a snížení množství odpadu mohou mít pozitivní dopad na životní prostředí. Avšak většina studií v této oblasti je pouze experimentálního charakteru, což naznačuje potřebu dalšího výzkumu a ověření přínosů a rizik spojených s využitím GMM v praxi.

Lze konstatovat, že zatím neexistují vědecky podložené důkazy spojující konzumaci geneticky modifikovaných potravin s žádným zdravotním nebo environmentálním rizikem. Nicméně celá problematika je spojena s etickými otázkami a obavami veřejnosti.

I přesto, že Evropa zůstává ve větší míře skeptická vůči geneticky modifikovaným potravinám, nelze pominout fakt, že jejich podíl na světovém trhu neustále roste. Tato oblast je stále relativně mladá a její dlouhodobé dopady nejsou dosud plně prozkoumány, proto je nezbytné pokračovat v monitorování a posuzování dlouhodobých dopadů genetických modifikací na zdraví a životní prostředí. Důkladné zhodnocení a transparentní informování veřejnosti jsou klíčové pro řízení tohoto procesu a budování důvěry v geneticky modifikované potraviny.

5 Literatura

- Aguilera J, Gomes AR, Olaru I. 2013. Principles for the risk assessment of genetically modified microorganisms and their food products in the European Union. *International Journal of Food Microbiology* **167**:2–7. Elsevier B.V.
- Asif A, Mohsin H, Tanvir R, Rehman Y. 2017, November 7. Revisiting the mechanisms involved in calcium chloride induced bacterial transformation. *Frontiers Media S.A.*
- Astola A, Durán-Guerrero E, Díaz AB, Lasanta C, Castro R. 2023, July 1. Impact of the genetic improvement of fermenting yeasts on the organoleptic properties of beer. *Springer Science and Business Media Deutschland GmbH.*
- Atanassova V, Meindl A, Ring C. 2001. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins in raw pork and uncooked smoked ham—a comparison of classical culturing detection and RFLP-PCR. *Page International Journal of Food Microbiology*. Available from www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro.
- Authors C, Singh S, Sharma V, Lal M. 2011. *International Journal of Pharma and Bio Sciences BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS OF INDUSTRIALLY IMPORTANT AMYLASE ENZYME SHIPRA DAS*. Available from www.ijpbs.net.
- Baeshen NA, Baeshen MN, Sheikh A, Bora RS, Morsi M, Ahmed M, Ramadan HAI, Saini KS, Redwan EM. 2014. Cell factories for insulin production. Available from <http://www.microbialcellfactories.com/content/13/1/141>.
- Batt CA. 2014. *Pichia pastoris*. Pages 42–46 *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*. Elsevier Inc.
- Bawa AS, Anilakumar KR. 2013, December. Genetically modified foods: Safety, risks and public concerns - A review.
- Blount ZD. 2015. THE NATURAL HISTORY OF MODEL ORGANISMS. *Elife* DOI: 10.7554/eLife.05826.001.
- Boyacioglu D, ND, CE. 2010. *Advances in Food Biochemistry*.
- Brown P, Will RG, Bradley R, Asher DM, Detwiler L. 2001. Bovine Spongiform Encephalopathy.
- Bruetschy C. 2019. The EU regulatory framework on genetically modified organisms (GMOs). *Transgenic Research* **28**:169–174. Springer International Publishing.
- Canada. Health Canada. 2008. Health Canada's role in the regulation of products from biotechnology. Health Canada.
- Choct M. 2006, March. Enzymes for the feed industry: Past, present and future.
- Claassen S, du Toit E, Kaba M, Moodley C, Zar HJ, Nicol MP. 2013. A comparison of the efficiency of five different commercial DNA extraction kits for extraction of DNA from faecal samples. *Journal of Microbiological Methods* **94**:103–110.
- Cohen SN. 2013, September 24. DNA cloning: A personal view after 40 years.
- Csutak O, Sarbu I. 2018. Genetically modified microorganisms: Harmful or helpful? Pages 143–175 *Genetically Engineered Foods*. Elsevier Inc.
- Dank A, Smid EJ, Notebaart RA. 2018. CRISPR-Cas genome engineering of esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae* steers aroma formation. *BMC Research Notes* **11**. BioMed Central Ltd.
- Das G, Prasad MP. 2010. Isolation, purification & mass production of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. *Page International Research Journals of microbiology*. Available from <http://www.interestjournals.org/IRJM>.
- Deckers M, Deforce D, Fraiture MA, Roosens NHC. 2020. Genetically modified microorganisms for industrial food enzyme production: An overview. *MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute*.

- Denby CM et al. 2018. Industrial brewing yeast engineered for the production of primary flavor determinants in hopped beer. *Nature Communications* **9**. Nature Publishing Group.
- Desmond S. T. Nicholl. 2023. *An Introduction to Genetic Engineering*.
- Emery PW. 2012. Amino acids: Metabolism. Pages 72–78 *Encyclopedia of Human Nutrition*. Elsevier Inc.
- Eskin NAM (Neason AM, Shahidi F. 2013. *Biochemistry of foods*. Elsevier/Academic Press.
- European Food Safety Authority. 2011. Guidance on the risk assessment of genetically modified microorganisms and their products intended for food and feed use. *EFSA Journal* **9**. Wiley-Blackwell Publishing Ltd.
- F. H. Crick LBSBRJW-T. 1961. General nature of the genetic code for proteins. *Nature*:192:1227–32.
- Feng J, Yang F. 2019, October 1. The regulation of genetically modified food in China. Mary Ann Liebert Inc.
- Froger A, Hall JE. 2007. Transformation of Plasmid DNA into E. Coli using the heat shock method. *Journal of Visualized Experiments* DOI: 10.3791/253.
- Galeote V, Novo M, Salema-Oom M, Brion C, Valério E, Gonçalves P, Dequin S. 2010. FSY1, a horizontally transferred gene in the *Saccharomyces cerevisiae* EC1118 wine yeast strain, encodes a high-affinity fructose/H⁺ symporter. *Microbiology* **156**:3754–3761. Microbiology Society.
- Ganguly S. 2023, January 1. The pivotal role of *Corynebacterium glutamicum* in L-Glutamic acid fermentation: A concise review. Elsevier Ltd.
- Goffeau A BBBH. 1996. Life with 6000 genes. *Science*:547–563–.
- Hammes WP, Hertel C. 1996. Selection and improvement of lactic acid bacteria used in meat and sausage fermentation. *Page Lait*.
- Hanlon P, Sewalt V. 2021. GEMs: genetically engineered microorganisms and the regulatory oversight of their uses in modern food production. Bellwether Publishing, Ltd.
- Harrison MM, Jenkins B V., O’Connor-Giles KM, Wildonger J. 2014, September 1. A CRISPR view of development. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hosseini S, Curilovs A, Cutting SM. 2018. Biological Containment of Genetically Modified *Bacillus subtilis*. Available from <https://journals.asm.org/journal/aem>.
- Ing. Jana Trnková. 2017. Organizace a kontrola pěstování GM plodin v ČR. Ministerstvo zemědělství, odbor rostlinných komodit s použitím podkladů mj. z ČIŽP, MŽP, SZPI, ÚKZÚZ a VÚRV, Praha.
- Jakubowski H, Libretexts PF. 2024. FUNDAMENTALS OF BIOCHEMISTRY I- STRUCTURE AND CATALYSIS. Available from <https://LibreTexts.org>.
- Jaroslav Pavelka. 2018. CRISPR: Nová kapitola do učebnic biologie pro střední školy. Nová kapitola do učebnic biologie pro střední školy.
- Jawed K, Mattam AJ, Fatma Z, Wajid S, Abdin MZ, Yazdani SS. 2016. Engineered production of short chain fatty acid in *Escherichia coli* using fatty acid synthesis pathway. *PLoS ONE* **11**. Public Library of Science.
- Jiang C, Ye C, Liu Y, Huang K, Jiang X, Zou D, Li L, Han W, Wei X. 2022. Genetic engineering for enhanced production of a novel alkaline protease BSP-1 in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **10**. Frontiers Media S.A.
- Juskevich JC, Guyert CG. 1990. Bovine Growth Hormone: Human Food Safety Evaluation. Available from www.sciencemag.org.
- Kallscheuer N. 2018, August 3. Engineered microorganisms for the production of food additives approved by the European Union-A systematic analysis. *Frontiers Media S.A.*

- Karbalaie M, Rezaee SA, Farsiani H. 2020, September 1. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. Wiley-Liss Inc.
- Katashkina JI, Hara Y, Golubeva LI, Andreeva IG, Kuvaeva TM, Mashko S V. 2009. Use of the λ Red-recombineering method for genetic engineering of *Pantoea ananatis*. *BMC Molecular Biology* **10**.
- Khan S, Ullah MW, Siddique R, Nabi G, Manan S, Yousaf M, Hou H. 2016. Role of recombinant DNA technology to improve life. Hindawi Publishing Corporation.
- Khelissa S, Chihib NE, Gharsallaoui A. 2021, March 1. Conditions of nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and its main uses as a food preservative. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH.
- Kinoshita S, Tanaka K, Akita S. 1961. METHOD of PRODUCING GLUTAMIC ACID. Tokyo.
- Koppolu V, Vasigala VK. 2016. Role of *Escherichia coli* in Biofuel Production . *Microbiology Insights* **9**:MBI.S10878. SAGE Publications.
- Koutsoumanis K et al. 2024. Update of the list of qualified presumption of safety (QPS) recommended microbiological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 19: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2023. *EFSA Journal* **22**. John Wiley and Sons Inc.
- Krogerus K, Fletcher E, Rettberg N, Gibson B, Preiss R. 2021. Efficient breeding of industrial brewing yeast strains using CRISPR/Cas9-aided mating-type switching. *Applied Microbiology and Biotechnology* **105**:8359–8376. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH.
- Kumar A, Grover S, Sharma J, Batish VK. 2010, December. Chymosin and other milk coagulants: Sources and biotechnological interventions.
- Lambré C et al. 2022. Safety evaluation of the food enzyme chymosin from the genetically modified *Kluyveromyces lactis* strain CHY. *EFSA Journal* **20**. John Wiley and Sons Inc.
- Lehman IR, Bessman MJ, Simms ES, Kornberg A. 1958. Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid I. PREPARATION OF SUBSTRATES AND PARTIAL PURIFICATION OF AN ENZYME FROM *ESCHERICHIA COLI*.
- Lemaux PG. 2008. Genetically engineered plants and foods: A scientist's analysis of the issues (part I).
- Lemaux PG. 2009. Genetically engineered plants and foods: A Scientist's analysis of the issues (Part II). *Annual Review of Plant Biology* **60**:511–559.
- Lermusieau G, Bulens M, Collin S. 2001. Use of GC-olfactometry to identify the hop aromatic compounds in beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49**:3867–3874.
- Li D, Tang Y, Lin J, Cai W. 2017, October 3. Methods for genetic transformation of filamentous fungi. BioMed Central Ltd.
- Lorenz MG, Wackernagel W. 1994. Bacterial Gene Transfer by Natural Genetic Transformation in the Environment. Page MICROBIOLOGICAL REVIEWS.
- Mallikarjuna N, Yellamma K. 2018. Genetic and metabolic engineering of microorganisms for the production of various food products. Pages 167–182 *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*. Elsevier.
- Manoochehri H, Hosseini NF, Saidijam M, Taheri M, Rezaee H, Nouri F. 2020, May 1. A review on invertase: Its potentials and applications. Elsevier Ltd.
- Maříková H. 2011. Rekombinantní enzymy používané při zpracování potravin rostlinného původu. BiProspect.
- Mastropietro G, Aw R, Polizzi KM. 2021. Expression of proteins in *Pichia pastoris*. Pages 53–80 *Methods in Enzymology*.
- Michael D. Peel. 2001. A Basic Primer on Biotechnology.
- Munkvold G. 2017. Application Data (60) Provisional application No. 62 / 467.

- Nicolia A, Manzo A, Veronesi F, Rosellini D. 2014, March. An overview of the last 10 years of genetically engineered crop safety research.
- Nwokoro O, Anthonia O. 2015. Studies on the production of Alkaline α -amylase from *Bacillus subtilis* CB-18. *Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria* **14**:71–75. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.
- Olempska-Beer ZS, Merker RI, Ditto MD, DiNovi MJ. 2006. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms-a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **45**:144–158.
- Park MK, Lee SH, Yang KS, Jung SC, Lee JH, Kim SC. 2014. Enhancing recombinant protein production with an *Escherichia coli* host strain lacking insertion sequences. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**:6701–6713. Springer Verlag.
- Parodi PW. 2005. Dairy Product Consumption and the Risk of Breast Cancer. *Journal of the American College of Nutrition* **24**:556S–568S.
- Pulvirenti A, Solieri L, Gullo M, De Vero L, Giudici P. 2004. Occurrence and dominance of yeast species in sourdough. *Letters in Applied Microbiology* **38**:113–117.
- Rakouský S, Doubková Z. 2016. Vědecké zkoumání rizik a účinků GMO. Available from [https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/aktualni_informace/\\$FILE/oeres-rizika_ucinky_GMO-20161101.pdf](https://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/aktualni_informace/$FILE/oeres-rizika_ucinky_GMO-20161101.pdf) (accessed April 16, 2024).
- Raux A, Bichon E, Benedetto A, Pezzolato M, Bozzetta E, Le Bizec B, Dervilly G. 2022, February 1. The Promise and Challenges of Determining Recombinant Bovine Growth Hormone in Milk. MDPI.
- Raveendran S, Parameswaran B, Ummalyma SB, Abraham A, Mathew AK, Madhavan A, Rebello S, Pandey A. 2018. Applications of microbial enzymes in food industry. University of Zagreb.
- Roncoroni M, Santiago M, Hooks DO, Moroney S, Harsch MJ, Lee SA, Richards KD, Nicolau L, Gardner RC. 2011. The yeast IRC7 gene encodes a β -lyase responsible for production of the varietal thiol 4-mercapto-4-methylpentan-2-one in wine. *Food Microbiology* **28**:926–935.
- Ruiz-Dõ Âez B. 2002. A REVIEW Strategies for the transformation of filamentous fungi.
- Saerens SMG, Duong CT, Nevoigt E. 2010, May. Genetic improvement of brewer's yeast: Current state, perspectives and limits.
- Salema-Oom M, De Sousa HR, Assunção M, Gonçalves P, Spencer-Martins I. 2011. Derepression of a baker's yeast strain for maltose utilization is associated with severe deregulation of HXT gene expression. *Journal of Applied Microbiology* **110**:364–374.
- Sánchez J, Borrero J, Gómez-Sala B, Basanta A, Herranz C, Cintas LM, Hernández PE. 2008. Cloning and heterologous production of hiracin JM79, a Sec-dependent bacteriocin produced by *Enterococcus hirae* DCH5, in lactic acid bacteria and *Pichia pastoris*. *Applied and Environmental Microbiology* **74**:2471–2479.
- Schalk M, Pastore L, Mirata MA, Khim S, Schouwey M, Deguerry F, Pineda V, Rocci L, Daviet L. 2012. Toward a biosynthetic route to sclareol and amber odorants. *Journal of the American Chemical Society* **134**:18900–18903.
- Shyamkumar R, Muthu I, Moorthy G, Ponmurugan K, Baskar R. 2014. Production of L-glutamic Acid with *Corynebacterium glutamicum* (NCIM 2168) and *Pseudomonas reptilivora* (NCIM 2598): A Study on Immobilization and Reusability.
- Silano V et al. 2018. Safety of the food enzyme glucoamylase from a genetically modified *Aspergillus niger* (strain NZYM-BF). *EFSA Journal* **16**. Wiley-Blackwell Publishing Ltd.
- Smyth SJ. 2014. The state of genetically modified crop regulation in Canada. *GM crops & food* **5**:195–203.

- Snell C, Bernheim A, Bergé JB, Kuntz M, Pascal G, Paris A, Ricroch AE. 2012, March. Assessment of the health impact of GM plant diets in long-term and multigenerational animal feeding trials: A literature review.
- Snow AA, Andow DA, Gepts P, Hallerman EM, Power A, Tiedje JM, Wolfenbarger LL. 2005. ESA Report GENETICALLY ENGINEERED ORGANISMS AND THE ENVIRONMENT: CURRENT STATUS AND RECOMMENDATIONS 1. Page Ecological Applications.
- Soh J, Raventhiran S, Lee JH, Lim ZX, Goh J, Kennedy BK, Maier AB. 2024, February 1. The effect of glycine administration on the characteristics of physiological systems in human adults: A systematic review. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH.
- Son YE, Park HS. 2021. Genetic Manipulation and Transformation Methods for *Aspergillus* spp. Taylor and Francis Ltd.
- Su Y, Liu C, Fang H, Zhang D. 2020, September 3. *Bacillus subtilis*: A universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. BioMed Central Ltd.
- Świątkiewicz M, Bednarek D, Markowski J, Hanczakowska E, Kwiatek K. 2013. Effect of feeding genetically modified maize and soybean meal to sows on their reproductive traits, haematological indices and offspring performance. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* **57**:413–418. National Veterinary Research Institute.
- Thalmann M, Coiro M, Meier T, Wicker T, Zeeman SC, Santelia D. 2019. The evolution of functional complexity within the α -amylase gene family in land plants. *BMC Evolutionary Biology* **19**. BioMed Central Ltd.
- Todd ECD. 2014a. Safety of Food and Beverages: Safety of Genetically Modified Foods. Pages 453–461 *Encyclopedia of Food Safety*. Elsevier.
- Todd ECD. 2014b. Safety of Food and Beverages: Safety of Genetically Modified Foods. Pages 453–461 *Encyclopedia of Food Safety*. Elsevier.
- Tsuge Y, Matsuzawa H. 2021, March 1. Recent progress in production of amino acid-derived chemicals using *Corynebacterium glutamicum*. Springer Science and Business Media B.V.
- Tuli HS, Chaudhary P, Beniwal V, Sharma AK. 2015, August 2. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. Springer India.
- Tyagi A, Kumar A, Mohanty AK, Kaushik JK, Grover S, Batish VK. 2017. Expression of buffalo chymosin in *Pichia pastoris* for application in mozzarella cheese. *LWT* **84**:733–739. Academic Press.
- Urban-Chmiel R, Marek A, Stępień-Pyśniak D, Wieczorek K, Dec M, Nowaczek A, Osek J. 2022, August 1. Antibiotic Resistance in Bacteria—A Review. MDPI.
- Van Eenennaam AL, Young AE. 2014. Prevalence and impacts of genetically engineered feedstuffs on livestock populations. *Journal of Animal Science* **92**:4255–4278. Oxford University Press (OUP).
- Viejo CG, Fuentes S. 2020. Beer aroma and quality traits assessment using artificial intelligence. *Fermentation* **6**. MDPI AG.
- Von Wright A, Bruce Å. 2003. Genetically modified microorganisms and their potential effects on human health and nutrition. Pages 264–276 *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd.
- Wang G, Huang M, Nielsen J. 2017, December 1. Exploring the potential of *Saccharomyces cerevisiae* for biopharmaceutical protein production. Elsevier Ltd.
- Wei L, Wang H, Xu N, Zhou W, Ju J, Liu J, Ma Y. 2019. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for l-cysteine production. *Applied Microbiology and Biotechnology* **103**:1325–1338. Springer Verlag.

- Wood V, Rutherford KM, Ivens A, Rajandream MA, Barrell B. 2001. A re-annotation of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Comparative and Functional Genomics* 2:143–154.
- Yamamoto N et al. 2009, January 20. Update on the Keio collection of *Escherichia coli* single-gene deletion mutants.
- Yang SC, Lin CH, Sung CT, Fang JY. 2014. Antibacterial activities of bacteriocins: Application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers Research Foundation*.
- Yilmaz A, Onen I, Alp E, Menevse S. 2012. Real-Time PCR for Gene Expression Analysis. Available from www.intechopen.com.
- Yoshida N, Sato M. 2009, July. Plasmid uptake by bacteria: A comparison of methods and efficiencies.
- Zhang Y, Yu LC. 2008, October. Microinjection as a tool of mechanical delivery.