

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ  
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY  
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

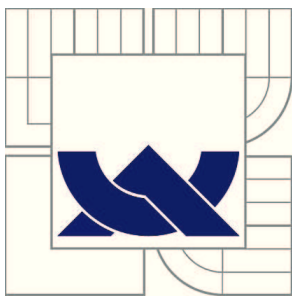
STUDIUM RŮSTOVÝCH A METABOLICKÝCH VLASTNOSTÍ  
VYBRANÝCH MIKROORGANISMŮ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE  
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

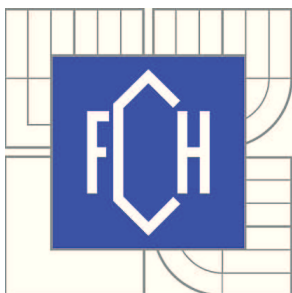
HELENA HUDEČKOVÁ

BRNO 2012



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

## STUDIUM RŮSTOVÝCH A METABOLICKÝCH VLASTNOSTÍ VYBRANÝCH MIKROORGANISMŮ

STUDY OF GROWTH AND METABOLIC PROPERTIES OF SELECTED MICROORGANISMS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

HELENA HUDEČKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. LIBOR BABÁK, Ph.D.

BRNO 2012



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0646/2011** Akademický rok: **2011/2012**  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student(ka): **Helena Hudečková**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin (B2901)  
Studijní obor: Biotechnologie (2810R001)  
Vedoucí práce **Ing. Libor Babák, Ph.D.**  
Konzultanti:

### Název bakalářské práce:

Studium růstových a metabolických vlastností vybraných mikroorganismů

### Zadání bakalářské práce:

1. Literární rešerše současného stavu řešené problematiky
2. Provedení několika kultivací vybraných kmenů mikroorganismů, stanovení růstových křivek
3. Analýza vybraných metabolitů
4. Zhodnocení výsledků

### Termín odevzdání bakalářské práce: 4.5.2012

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

-----  
Helena Hudečková  
Student(ka)

-----  
Ing. Libor Babák, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2012

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Cílem této bakalářské práce bylo studium růstu a produkce vybraných metabolitů mikroorganismy, konkrétně *Lactobacillus casei* a *Saccharomyces cerevisiae*. Mikroorganismy byly kultivovány v Erlenmeyerových baňkách za použití médií doporučených pro jejich růst a byly stanoveny růstové křivky z hodnot optické hustoty a koncentrace sušiny biomasy. Dále byl ve vzorcích analýzou na HPLC stanoven obsah glukosy a ethanolu u *S. cerevisiae* a obsah glukosy a kyseliny mléčné u *L. casei*.

## **ABSTRACT**

The aim of this Bachelor thesis was study of the growth and production of selected metabolites of microorganisms, namely *Lactobacillus casei* and *Saccharomyces cerevisiae*. Microorganisms were cultivated in Erlenmeyer flasks by using the recommended media for their growth. The growth curves were determined from the values of optical density and concentration of biomass. Samples were then analyzed by HPLC for determination of the content of glucose and ethanol in *S. cerevisiae* and the content of glucose and lactic acid by *L. casei*.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Růstová křivka, rod *Saccharomyces*, rod *Lactobacillus*

## **KEYWORDS**

Growth curve, genus *Saccharomyces*, genus *Lactobacillus*

HUDEČKOVÁ, H. *Studium růstových a metabolických vlastností vybraných mikroorganismů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2012. 49 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Libor Babák, Ph.D..

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

### *Poděkování:*

*Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Liboru Babákovi, Ph.D. za vedení a odborné rady, a Ing. Miroslavě Zichové za pomoc s praktickou částí v laboratoři.*

## OBSAH

Úvod .....	7
<b>1 Teoretická část .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1 Kvašení .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2 Mléčné kvašení .....</b>	<b>9</b>
1.2.1 Původci a jejich metabolismus .....	9
1.2.2 Produkty metabolismu .....	12
<b>1.3 Lihové kvašení .....</b>	<b>13</b>
1.3.1 Původci a jejich metabolismus .....	13
1.3.2 Produkty metabolismu .....	14
<b>1.4 Bioinženýrské charakteristiky .....</b>	<b>14</b>
1.4.1 Růstová křivka .....	14
1.4.2 Kinetika růstu koncentrace buněk .....	16
<b>1.5 Analytické metody .....</b>	<b>18</b>
1.5.1 Stanovení sušiny biomasy .....	18
1.5.2 Turbidimetrie .....	18
1.5.3 HPLC .....	19
<b>1.6 Užité mikroorganismy .....</b>	<b>20</b>
1.6.1 Rod <i>Lactobacillus</i> .....	20
1.6.2 Rod <i>Saccharomyces</i> .....	22
<b>2 Experimentální část .....</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Cíl práce .....</b>	<b>25</b>
<b>2.2 Přístroje a pomůcky .....</b>	<b>25</b>
<b>2.3 Mikroorganismy a příprava média .....</b>	<b>25</b>
2.3.1 Analyzované mikroorganismy .....	25
2.3.2 Chemikálie použité k přípravě médií .....	25
2.3.3 Příprava kultivačního média .....	26
<b>2.4 HPLC .....</b>	<b>26</b>
2.4.1 Chemikálie a standardy .....	26
2.4.2 Kolona a předkolona .....	27
2.4.3 Parametry a podmínky .....	27
2.4.4 Detektory .....	27
<b>2.5 Metody měření .....</b>	<b>27</b>
2.5.1 Postup stanovení množství sušiny .....	27
2.5.2 Stanovení růstové křivky .....	28
2.5.3 Analýza metabolitů pomocí HPLC .....	28
<b>3 Výsledky a diskuze .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Růstové křivky .....</b>	<b>29</b>
3.1.1 Růstové křivky <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	29

3.1.2	Růstové křivky <i>Lactobacillus casei</i> .....	31
<b>3.2</b>	<b>Analýza na HPLC</b> .....	<b>33</b>
3.2.1	Kalibrační křivky - analýza metodou HPLC .....	33
3.2.2	Spotřeba glukosy a produkce ethanolu - kultivace <i>S. cerevisiae</i> .....	36
3.2.3	Spotřeba glukosy a produkce kyseliny mléčné - kultivace <i>L. casei</i> .....	38
<b>Závěr</b>	.....	<b>41</b>
<b>Seznam použité literatury</b>	.....	<b>43</b>
<b>Použité zkratky a symboly</b>	.....	<b>46</b>
<b>Seznam obrázků</b>	.....	<b>47</b>
<b>Seznam tabulek</b>	.....	<b>48</b>
<b>Seznam grafů</b>	.....	<b>49</b>

## ÚVOD

Většina životních projevů mikrobiálních buněk je v podstatě vázána na určitá období jejich růstu. Sledování růstu bakterií a kvasinek patří mezi základní mikrobiologické činnosti.

Růst a rozmnožování mikroorganismů je závislé na vlastnostech prostředí, především na složení substrátu a okolí, dostupnosti energie a působení fyzikálních a chemických faktorů, kam patří například teplota, tlak, pH kultivačního média, apod. Z toho vyplývá, že kultivace za přirozených či cílených podmínek neprobíhá rovnoměrně. [1]

Během statické kultivace je průběh růstu mikroorganismů charakterizován několika fázemi, které jako celek tvoří tzv. růstovou křivku. Z jejího tvaru a veličin charakteristických pro určité fáze je možné porovnávat růstové vlastnosti různých mikroorganismů za určitých podmínek, nebo naopak vlastnosti jedné kultury s různými podmínkami prostředí. Druhá zmíněná možnost je důležitá z hlediska optimalizace kultivace průmyslově významných mikrobiálních kultur. Nejvýznamnějšími veličinami charakteristickými pro určité fáze růstu jsou doba Lag-fáze, generační doba, rychlost růstu a specifická rychlost růstu ( $\mu$ ). Růstovou křivku je možno sestavit sledováním růstu určité kultury v definovaném prostředí, a to měření optické hustoty vzorků odebíraných během kultivace, či sledováním nárůstu biomasy mikroorganismů. [1]

Mezi průmyslově významné metabolické pochody mikroorganismů patří mléčné a alkoholové kvašení. Produkty vznikající při těchto kvašeních, tedy ethanol a kyselina mléčná, jsou metabolity primárními, což znamená, že se tvoří současně s růstem. [2]

Obecné schéma mikrobiálního procesu se skládá z přípravy média, přípravy inokula (zákvasu), vlastní fermentace (růst buněk a tvorba metabolitů), oddělení buněk a jejich případné zpracování a nakonec z izolace produktu. Fermentační proces ovšem nemusí být tvořen všemi těmito kroky, jelikož jejich volba závisí na použité surovině k přípravě fermentačního média a především také na vlastním produktu. Pokud se jedná například o produkty, jako jsou pivo a víno, tak není nutno provádět většinu izolačních a purifikačních operací, stačí pouze oddělení kvasinek, avšak přibudou operace spojené se zušlechťením produktu (dokvašení, zrání, aj.). V případě výroby čistého ethanolu či destilátů je ovšem potřeba věnovat se izolaci a zakoncentrování produktu, což se provádí destilací a rafinací. Pro celý proces fermentace je ovšem důležitá i použitá surovina, jelikož ta určuje podstatnou měrou, spolu s energií, konečnou výrobní cenu produktu. [2]

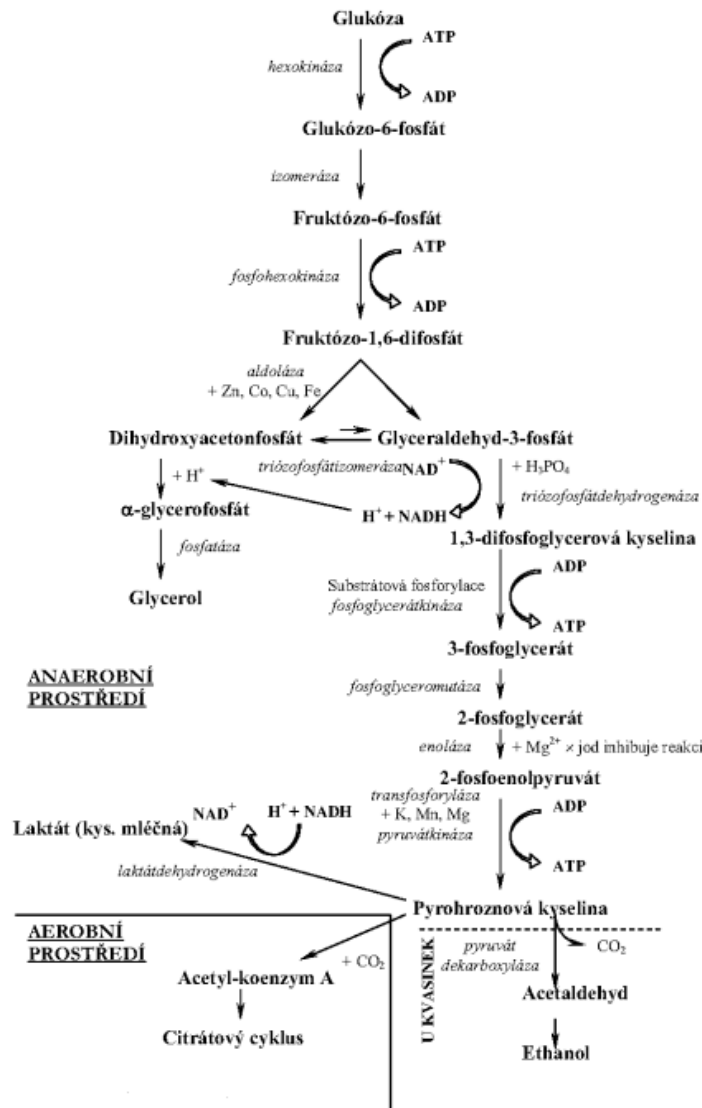
# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Kvašení

Pojmem kvašení či fermentace jsou označovány procesy anaerobní dehydrogenace, v jejichž průběhu je zkvašovaný organický substrát zpravidla rozštěpen po předchozí aktivaci na meziprodukty, které dále vstupují do oxidačně redukčních reakcí. Aktivace substrátu probíhá fosforylací za účasti ATP a příslušných enzymů. Přenos vodíku při redoxních reakcích je obstaráván pomocí NAD-dehydrogenáz. [3]

Po energetické stránce představuje kvašení proces, při němž se uvolňuje jen malé množství energie. Je to tím, že anaerobně dehydrogenační procesy přeměny substrátu se zastavují většinou na tvorbě jednodušších organických sloučenin, které nemohou být buňkou za daných podmínek dále odbourávány pro nepřítomnost enzymatických systémů katalyzujících procesy terminální oxidace. Celkové množství energie uvolněné přeměnou daného substrátu v procesech fermentace se podstatně snižuje vytvořením neúplně oxidovaných organických metabolitů. [3]

Kvasnými procesy získávají energii výlučně jen chemoorganotrofní bakterie. Substrátem při fermentaci jsou jednoduché organické látky, nejčastěji sacharidy. Základní metabolickou drahou pro anaerobní oxidaci sacharidů je tzv. glykolýza neboli Embden-Meyerhof-Parnasova (EMP) dráha. V této dráze je několik reakcí, během kterých dochází k postupné přeměně substrátu, většinou hexosy, až na kyselinu pyrohroznovou. Tato kyselina je při glykolýze důležitá, jelikož způsob její přeměny, závislý na vlastnostech původce a podmínek kvašení rozhoduje o charakteru konečných produktů a tím i typu fermentace. Hlavními reakcemi glykolýzy jsou postupná fosforylace hexos až na fruktosa-1,6-bisfosfát, jeho štěpení na dva triosafosfáty a jejich oxidace na 1,3-bisfosfoglycerát. Tato oxidace, kdy se redukuje koenzym  $\text{NAD}^+$  v  $\text{NADH}$  a  $\text{H}^+$ , je pro některé mikroorganismy jediným zdrojem energie glykolýzy. Část této energie se uloží v ATP a další část se uvolní až po dalších reakčních stupních, tj. při přeměně makroergické sloučeniny fosfoenolpyruvátu na pyruvát za vzniku další molekuly ATP. Čistý zisk odbourání jedné molekuly hexosy jsou 2 ATP, jelikož přeměnou jednoho triosafosfátu vznikají 2 ATP, což znamená, že z celé hexosy vzniknou 4 ATP, avšak 2 ATP jsou spotřebovány na fosforylaci hexos ve fruktosa-1,6-bisfosfát na počátku glykolýzy. [1, 3, 4]



Obrázek 1 - Glykolytická dráha [5]

## 1.2 Mléčné kvašení

### 1.2.1 Původci a jejich metabolismus

Mléčnou fermentaci provádí početná, morfologicky heterogenní skupina mikroorganismů, zvaných mléčné bakterie. Mezi tyto bakterie jsou v současnosti zahrnovány grampozitivní bakterie rodů: *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, a *Weissella*. Neobsahují cytochromy a tím ani dýchací řetězec a chybějí jim běžné anabolické dráhy. Jsou to přísné fermentující organismy. [4, 6, 7, 8]

Z hlediska morfologického jsou bakterie mléčného kvašení nejčastěji koky, s výjimkou laktobacilů a karnobakterií, které se vyskytují jako tyčinky. Většina bakterií mléčného kvašení jsou fakultativně anaerobní, negativní na katalasu, nepohyblivé a nesporulující. Mají vysokou toleranci kyselého prostředí a jsou schopny přežít i při hodnotě pH nižší než 5. Tato vlastnost jim dává výhodu nad ostatními bakteriemi. Optimální teplota růstu se liší mezi rody

od 20 do 45 °C. Většina z nich jsou považovány za organismy GRAS (obecně považované za bezpečné). Některé druhy, např. *Streptococcus*, jsou ovšem patogenní. [9]

Mléčné kvašení je anaerobní kvasný pochod, při němž bakterie vyrábějí z jednoduchých sacharidů kyselinu mléčnou. Název tohoto procesu je odvozen od hlavního produktu (kyselina mléčná), nikoliv od druhu zkvašovaného substrátu. Nejjednodušším řešením problému nalezení vhodného akceptoru pro odstranění vodíkových atomů, odebraných na cestě od glukosy k pyruvátu, je tvorba laktátu, protože akceptorem je sám pyruvát. Zisk 2 ATP představuje asi 36 % celkové uvolněné energie. Přeměnu pyruvátu na laktát realizuje enzym laktátdehydrogenasa. Laktát je asi nejběžnějším produktem fermentace cukrů a vzniká při většině kvasných procesů používaných v mlékárenském průmyslu. [7, 10]

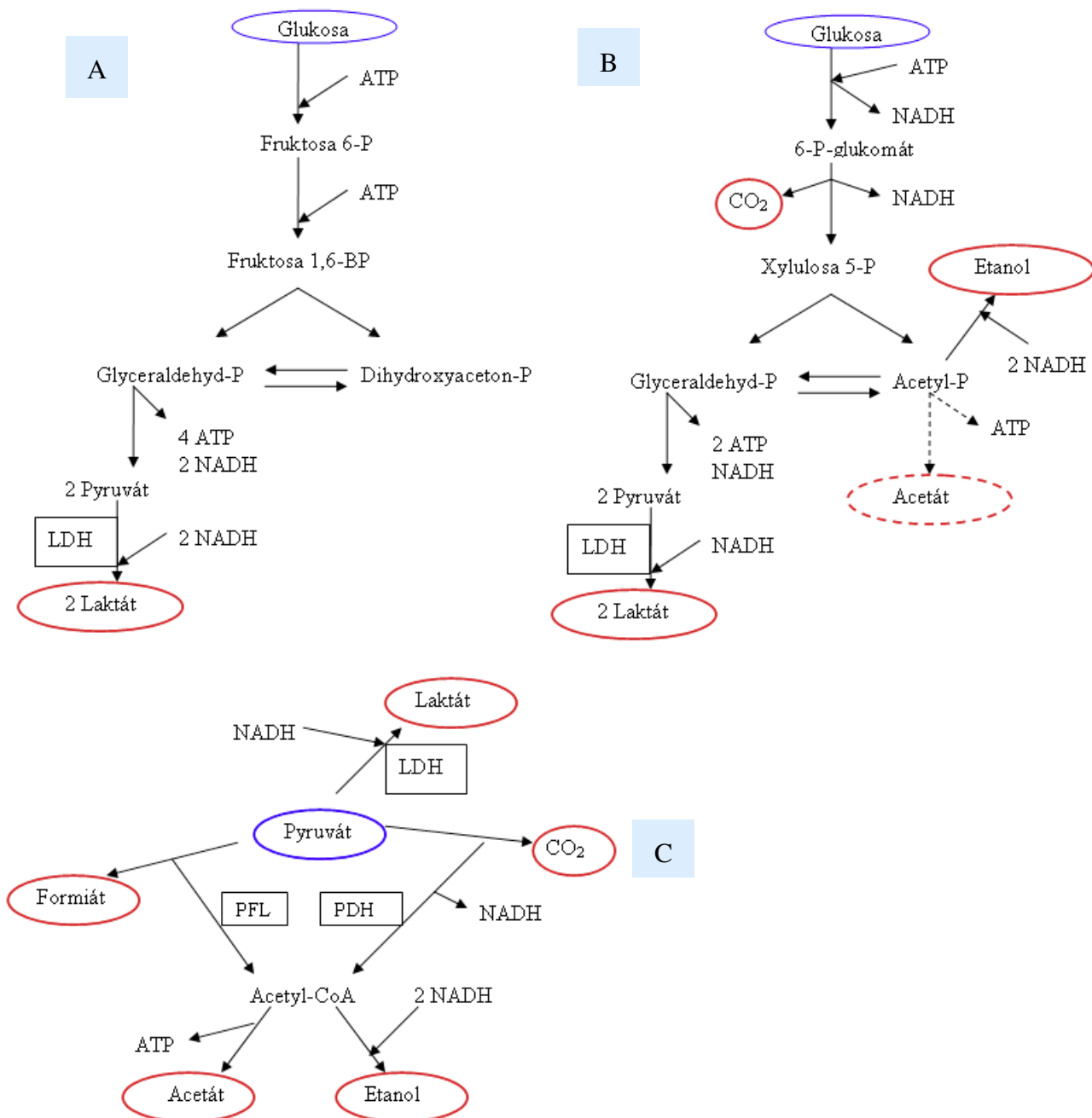
Na základě enzymového vybavení, mohou být bakterie mléčného kvašení rozděleny do tří skupin, a to na obligátně homofermentativní, obligátně heterofermentativní a fakultativně heterofermentativní. Vzájemný poměr a množství jednotlivých produktů je závislý značně na podmínkách daného prostředí a individuálních vlastnostech jednotlivých kmenů. [7]

Při tzv. obligátně homofermentativním mléčném kvašení (obrázek 2 A), prováděném vedle různých laktobacilů také koky (např. rod *Streptococcus*), vzniká prakticky jen kyselina mléčná (90%). Homofermentativní mléčné bakterie fermentují laktosu, glukosu i další monosacharidy. Na rozdíl od živočichů, tvořících při nedostatku kyslíku výhradně L-formu laktátu, vyrábějí mléčné bakterie většinou jen D-laktát. Obligátní homofermentativní bakterie obsahují enzym fruktoso-bisfosfát-aldolasu, avšak nemají glukoso-6 fosfát-dehydrogenasu ani 6-fosfoglukonát-dehydrogenasu. [7, 10]

Obligátně heterofermentativní mléčné kvašení (obrázek 2 B), se vyskytuje u laktobacilů, kteří obsahují obě dehydrogenasy, avšak neobsahují enzym fruktoso-bisfosfát-aldolasu a odbourávají proto glukosu kombinací pentosového cyklu a částí glykolytického systému. Na laktát se proto mění jen část glukosy; ze zbytku se tvoří ethanol a oxid uhličitý nebo acetát a oxid uhličitý. Poměr etanolu a vzniklého acetátu závisí na redoxním potenciálu systému. Tato cesta je využívána fakultativními anaeroby, jako *Lactobacillus casei* pro fermentaci pentosy, a pro fermentaci hexosy a pentosy obligátně heterofermentativním organismem jako je *Leuconostoc*. [9, 10]

Fakultativně heterofermentativní kvašení (obrázek 2 C), mezi mikroorganismy využívající tento způsob fermentace můžeme zařadit například laktokoky. Bakterie mající schopnost tohoto kvašení obsahují všechny tři enzymy. Využití tohoto způsobu nastává při nedostatku glukózy, kdy růst probíhá na dalších sacharidech, například *Lactobacillus lactis* na maltose, laktose a galaktose, případně nastává při zvýšeném pH a snížené teplotě. Vedle kyseliny mléčné se tvoří také ethanol, acetát a formiát. Od homofermentativního kvašení se liší tato dráha tím, že z pyruvátu se tvoří krom kyseliny mléčné i formiát a acetyl-CoA. Poslední uvedený produkt je tvořen za pomoci enzymu pyruvátformiát lyasy (PFL). Za přítomnosti kyslíku je tento enzym inaktivován a je aktivovány alternativní dráha metabolismu pyruvátu za pomoci pyruvát dehydrogenasy (PDH). V tomto případě vzniká oxid uhličitý, NADH a acetyl-CoA, který je dále přeměněn na acetát a etanol. [9]

Při ostatních typech fermentací, navazujících na odbourání glukosy na pyruvát, se musí pyruvát přeměnit na různé produkty, schopné reoxidovat NADH enzymu glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenasy. [10]



**Obrázek 2 - Katabolické dráhy bakterií mléčného kvašení [9]**

A) Obligatně homofermentativní, B) Obligatně heterofermentativní,

C) Fakultativně heterofermentativní

Některé kmeny bakterií mléčného kvašení kromě D-laktátu produkují nepatrná množství L-izomeru. Druhy *Lactobacillus helveticus* a *Lactobacillus plantarum* produkují racemickou směs, složení této směsi je proměnlivé. Stereospecifický enzym laktátdehydrogenáza přítomný v bakteriích mléčného kvašení určuje, který izomer kyseliny mléčné bude vytvořený. Pro některé aplikace, jako např. pro syntézu polymléčných kyselin, je žádoucí opticky čistý produkt nebo racemická směs stálého složení. [4]

Nepřítomnost katalasy u bakterií mléčného kvašení umožňuje jejich kvantitativní zjišťování v potravinách nebo jiném prostředí: kolonie vyrostlé na bohaté agarové půdě se

přelijí 3% roztokem peroxidu vodíku a ty, jež neuvolňují bublinky kyslíku, jsou s největší pravděpodobností příslušníci rodu *Lactobacillus*. [4]

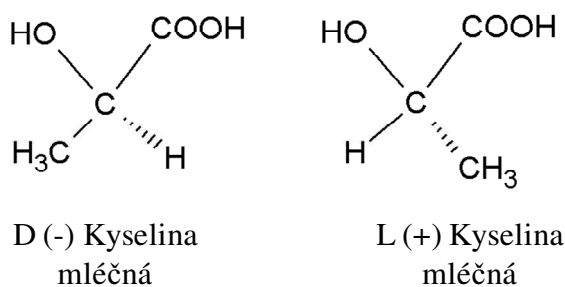
Vyskytují se přirozeně v prostředí bohatém na živiny, jako jsou např.: mléko, rostliny a uvnitř lidského a zvířecího těla. Bakterie mléčného kvašení jsou používány lidmi pro fermentaci potravin a krmiv od pradávna. Dnes je jejich hlavní využití stále v potravinářském průmyslu, například ve výrobě mléčných výrobků, nakládané zeleniny, masa a vína. Homofermentativní mléčné bakterie se používají pro kvasnou výrobu mléčné kyseliny. Při postupné neutralizaci vznikajícího laktátu (např.  $\text{CaCO}_3$ ) se získá až 90 % laktátu ze spotřebovávaného substrátu. Samovolné mléčné kvašení se využívá při konzervaci zelí, okurek a zelené píce (tzv. silážování), neboť zabraňuje rozvoji hnilobných bakterií. Na použití mléčného kvašení je založeno také sýrařství a výroba kvašených mléčných nápojů (kysaného mléka, acidofilního mléka, kefiru, kumysu, aj.). [6, 10]

### 1.2.2 Produkty metabolismu

Hlavním produktem mléčného kvašení je kyselina mléčná, neboli kyselina 2-hydroxypropanová. Je to kapalina dobře rozpustná ve vodě. Ve své struktuře má jeden chirální uhlík, z čehož vyplývá, že se může vyskytovat ve formě dvou optických izomerů, D a L (viz Obrázek 3). Obě izomerní formy mohou být polymerizované a v závislosti na složení mohou vznikat polymery s různými vlastnostmi. [11]

Má výbornou reaktivitu pramenící z toho, že karboxylová i hydroxylová skupina může podléhat různým chemickým přeměnám v potenciálně užitečné chemikálie jako propylen oxid, propylen glykol, kyselinu akrylovou, pentan-2,3-dion a laktátové estery. [6]

Kyselina mléčná zastavuje rozmnožování hnilobných bakterií a stafylokoků, proto je využívána činnost mléčných bakterií odedávna pro konzervaci zeleniny a některých krmiv (kysání zelí a okurek, atd.). [4]



Obrázek 3 - Stereoizomery kyseliny mléčné [12]

Dalším produktem mléčného kvašení vznikajícím menším množstvím je kyselina octová, také nazývána ethanová kyselina ( $\text{HCOOH}$ ). Za normálních podmínek se jedná o bezbarvou kapalinu ostrého zápachu, dokonale mísitelná s vodou. Slouží jako rozpouštědlo a acetylační činidlo. Vodný roztok této kyseliny o 5 až 8% koncentraci se nazývá ocet. [13]

Stejně tak, jako kyselina octová, může v menším množství vznikat i kyselina mravenčí, neboli methanová kyselina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ). Je to kapalina s leptavými účinky o teplotě varu  $100^\circ\text{C}$ , silně čpící, neomezeně rozpustná ve vodě. Využití nachází při konzervaci potravin. [13]

## 1.3 Lihové kvašení

### 1.3.1 Původci a jejich metabolismus

Pojmem kvasinky jsou označovány chemoheterotrofní eukaryotické jednobuněčné mikroorganismy. Většinou se rozmnožují pučením nebo dělením. Systematicky jsou zařazovány mezi nižší houby (*Fungi*). Základním tvarem kvasinek je rotační elipsoid. Mohou mít i tvar kulatý, citrónovitý, oválný, lahvovitý, ogivální, podlouhlý a vláknitý. V rámci druhů a rodů existuje určitá variabilita rozměrů buněk. Některé rody kvasinek krom jednotlivých buněk vytvářejí i zaškrčená vlákna složená z protáhlých buněk, tzv. pseudomycelia, nebo vlákna se stejným průřezem po celé délce a rozdělená přepážkami, tzv. pravé mycelium. [4, 7]

Většina druhů kvasinek tvoří na kultivačních půdách bělavě zbarvené kolonie, patří tedy mezi tzv. bílé kvasinky. Dále se mohou vyskytovat kvasinky červené (růžové), kam patří například kolonie rodu *Rhodotorula*. Zbarvení je způsobeno karotenoidními barvivy. Mezi další výjimky patří tzv. černé kvasinky s tmavými až černými koloniemi, které má například rod *Aureobasidium*. Na sladidlovém agaru jsou kolonie této kvasinky zpočátku bílé, avšak později černají. [10]

Vyskytují se hojně v přírodě, obzvláště na cukerných substrátech, které mohou zkvašovat. Charakteristickou schopností většiny druhů kvasinek je právě fermentativní odbourávání monosacharidů a některých disacharidů, trisacharidů na ethanol a oxid uhličitý. Vzhledem k této schopnosti dostaly český název kvasinky. Některé druhy mohou vyvolávat mykotická onemocnění člověka a zvířat, jiné znehodnocují potraviny či suroviny, např. pivo, sirupy, šťávy. Kvasinky mají nezastupitelný význam v průmyslové mikrobiologii, při výrobě piva, vína, pekařského a krmného droždí ap. [10]

Původci ethanolového kvašení vycházejícího z glykolýzy jsou hlavně kvasinky (*Saccharomyces* a *Torula*). Mezi bakteriemi uskutečňuje tento proces pouze *Sarcina ventriculi*. Jiné bakterie mající schopnost tvorby ethanolu uskutečňují jeho tvorbu jinými metabolickými drahami. [3]

V praxi je tento proces velmi důležitý, zejména při výrobě ethanolu a alkoholických nápojů, např. víno, pivo, aj. Čistý ethanol se používá hlavně ve farmacii a medicíně. Sumárně lze vyjádřit ethanolové kvašení pomocí rovnice: [3]



Výchozím substrátem ethanolového kvašení jsou hexosy, které jsou dále glykolyticky přeměňovány až na kyselinu pyrohroznovou, ze které v konečné fázi vzniká ethanol a oxid uhličitý. [3]

Energetická bilance ethanolového kvašení se skládá ze 2 spotřebovaných a 4 nově vzniklých makroergických vazeb typu ATP, což znamená celkový výtěžek 2 ATP. Účinnost tohoto procesu lze vyjádřit procentuálním poměrem mezi volnou energií 2 makroergických vazeb a celkovým množstvím uvolněné energie:

$$E = \frac{2 \cdot 30,6}{234,5} \cdot 100 \text{ (kJ)} = 26 \%$$

Krom ethanolového kvašení vycházejícího z glykolýzy vzniká ethanol prostřednictvím Entner-Doudoroffovy dráhy, která je prováděna druhy rodu *Zymomonas*. Ty zkvašují glukosu za tvorby ethanolu, avšak ne pomocí glykolýzy, nýbrž metabolickou drahou označovanou jako Entner-Doudoroffova. Po fosforylaci glukosu na glukosu-6-fosfát přechází působením

glukosa-P-dehydrogenasou na kyselinu 6-P-glukonovou, která je dehydratována na kyselinu 2-keto-3-deoxy-6-P-glukonovou. Ta je poté účinkem aldolasy štěpena na glyceraldehyd-3-P a kyselinu pyrohroznovou. Obě sloučeniny jsou následně přeměňovány na ethanol a oxid uhličitý, stejně jako při etanolovém kvašení. [3]

### 1.3.2 Produkty metabolismu

Hlavním produktem alkoholového kvašení je ethanol, nazývaný také ethylalkohol, alkohol nebo líh. Je to kapalina s vodou neomezeně mísitelná, s teplotou varu 78 °C. Má mírné dezinfekční účinky. Patří mezi jednu z prvních připravených a čištěných organických sloučenin. Po tisíciletí se vyrábí kvašením obilnin a sacharidů a jeho čištění destilací je doloženo již ve 12. století př. n. l. [13, 14]

Průmyslově se vyrábí kyselou katalyzovanou hydratací ethenu nebo fermentací glukosy. Tato sloučenina nachází využití jako rozpouštědlo, surovina k získávání acetaldehydu, ethylchloridu a různých esterů. Hlavní využití nachází k výrobě alkoholických nápojů. Pro laboratorní účely je ethanol denaturován například benzínem, aby byl nepoživatelný. [13, 14]

Při alkoholovém kvašení dále vzniká oxid uhličitý. Je to bezbarvý plyn, bez zápachu, rozpustný ve vodě. Je těžší než vzduch, nehořlavý a působí dusivě. [13]

## 1.4 Bioinženýrské charakteristiky

### 1.4.1 Růstová křivka

Růstová křivka se využívá jako grafické znázornění vzrůstu počtu živých buněk. Tudiž vyjadřuje časovou změnu koncentrace mikroorganismů a je stěžejní charakteristikou růstu. [4]

Fyziologické vlastnosti buněk, nacházejících se v různých fázích růstových křivek, se značně liší. Například buňky ve stacionární fázi a na počátku lag-fáze jsou méně citlivé vůči nepříznivým podmínkám (vysoká teplota, osmotický tlak, atd.), než buňky nacházející se v pozdní lag-fázi a ve fázích růstu. [4]

Růstová křivka má následující úseky:

#### 1) Lag fáze (přípravná fáze - adaptační):

Buňky se nerozmnožují, zvětšuje se jejich objem a je aktivován enzymový systém buněk (dochází například k syntéze indukovatelných enzymů nutných pro využití přítomných substrátů). Délka této fáze se liší podle druhu mikroorganismu, fyziologického stavu buněk, na velikosti inokula a na složení substrátu. [4]

#### 2) Fáze zrychleného růstu (akcelerační):

Kultura je přizpůsobena podmínkám prostředí, rychlost růstu buněk se zrychluje, začínají se množit. Buňky jsou větší než v jiných fázích. Vliv fyziologického stavu inokula na tuto fázi. [4]

#### 3) Fáze exponenciální (logaritmická):

Je charakterizována nejkratší generační dobou buněk, konstantní během celé této fáze, a intenzivním množením buněk. Dochází k rychlému vyčerpávání substrátu, avšak nedochází

ještě k limitaci živinami. Limitující mohou být vlastnosti kultury, charakter prostředí a teplota kultivace. Tato fáze je nejdůležitější z důvodu tvorby primárních metabolitů. Po přenesení buněk v této fázi do nového kultivačního média se stejným složením pokračují buňky v rozmnožování se stejnou generační dobou, tedy bez zřetelné lag-fáze. Tato fáze se také často označuje jako logaritmická vzhledem k lineární závislosti mezi logaritmem počtu buněk a dobou růstu. [4]

#### 4) Fáze zpomaleného růstu (deklinační):

Dochází ke zpomalování rychlosti množení, celkového metabolismu a nárůstu počtu odumírajících buněk. Postupně se vyčerpávají živiny a začínají se hromadit metabolity. Vlivem toho se mění například pH a redoxní potenciál, což působí nepříznivě na růst. [4]

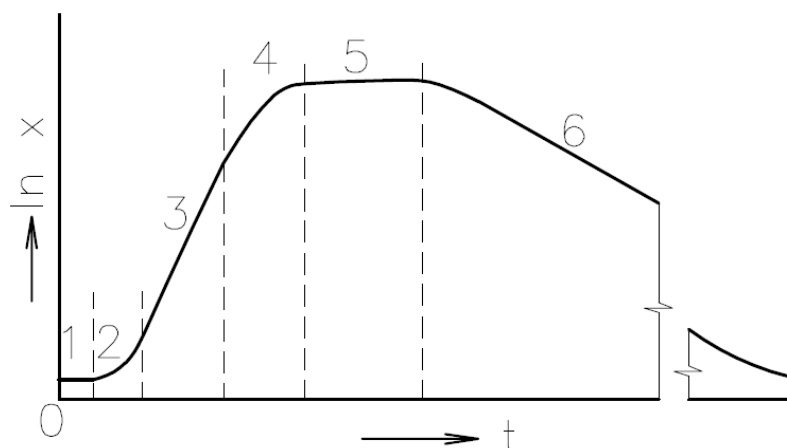
#### 5) Fáze stacionární:

V této fázi se zastavuje přírůstek živých buněk, to může být způsobeno vyčerpáním živin nebo vzrůstem koncentrace toxického metabolitu nad určitou hranici. Počet odumírajících buněk je vyrovnáván velmi pomalým rozmnožováním, což udržuje konstantní počet buněk. Délka stacionární fáze je odlišná u jednotlivých mikroorganismů, dále je závislá na citlivosti daného mikroorganismu vůči stresovým podmínkám, jako je hladovění, přítomnost toxického metabolitu aj. Během této fáze tvoří sporulující mikroorganismy endospory. V této fázi dochází k největší produkci sekundárních metabolitů. [4]

#### 6) Fáze zrychleného odumírání:

Během této fáze klesá koncentrace živých buněk, ty už se nedělí a pouze hynou. Koncentrace živin klesla pod kritickou hladinu, čímž se snižuje aktivita metabolismu. [4]

Grafické znázornění vzrůstu počtu živých buněk se provede tak, že na osu  $x$  je nanesen čas [h] a na osu  $y$  je nanesen logaritmus počtu živých v 1 litru (viz obrázek 4). [4]



**Obrázek 4 - Růstová křivka [4]**

$t$  – doba [h],  $x$  – počet živých buněk v 1 ml, 1 – Lag fáze, 2 – fáze zrychlujícího se růstu, 3 – exponenciální fáze růstu, 4 – fáze zpomalujícího se růstu, 5 – stacionární fáze růstu, 6 – fáze odumírání

### 1.4.2 Kinetika růstu koncentrace buněk

Tzv. růstové konstanty obvykle charakterizují růst bakterií v exponenciální fázi. Jestliže na počátku exponenciální fáze byl počet buněk v 1 ml vyjádřen jako  $x_0$ , tak po jedné generační době je počet buněk dvojnásobný, tedy  $2x_0$  a po  $n$  generačních dobách je počet buněk  $x$  roven  $2^n x_0$ . Po uplynutí doby  $t$  tedy platí:

$$x = 2^{rt} x_0 \quad (1)$$

kde veličina  $r$  vyjadřuje počet dělení buněk za jednotku času [h], lze také vyjádřit jako převrácená hodnota generační doby. Rychlost růstu buněk neboli přírůstek buněk s časem během exponenciální fáze lze získat derivací rovnice (1) podle času:

$$\frac{dx}{dt} = 2^{rt} x_0 \ln 2 \quad (2)$$

Za člen  $2^{rt} x_0$  lze z rovnice (1) do rovnice (2) dosadit veličinu  $x$  vyjadřující koncentraci buněk a získáme:

$$\frac{dx}{dt} = xr \ln 2 \quad (3)$$

Dále lze nahradit člen  $r \ln 2$  veličinou  $\mu$ , která se nazývá měrná růstová rychlost, čímž dostáváme vztah, kterým můžeme vyjádřit růst buněk binárním dělením:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (4)$$

Z toho vyplývá, že počet buněk v daném okamžiku je úměrný rychlosti růstu mikrobiální populace v jakémkoliv okamžiku exponenciální fáze. Veličina  $\mu$  je zde konstantou úměrnosti. [4, 15]

Po určitém trvání růstu v exponenciální fázi lze vypočítat počet buněk v prostředí řešením diferenciální rovnice (4) metodou separace proměnných.

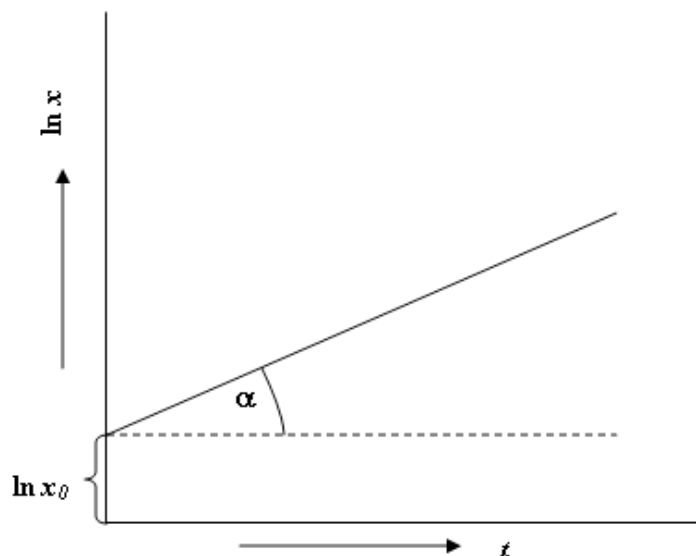
$$\int_{x_0}^x \frac{dx}{x} = \int_{t_0}^t \mu dt \quad (5)$$

z čehož plyne, že

$$\ln x - \ln x_0 = \mu(t - t_0) \quad (6)$$

$$\ln x = \mu(t - t_0) + \ln x_0 \quad (7)$$

Rovnice (6) a (7) jsou rovnicemi přímky protínající osu  $y$  v bodě  $\ln x_0$  a mající směrnici  $\mu$ . Častěji se ovšem vypočte  $\mu$ , jelikož hodnoty  $x$  a  $x_0$  je možno experimentálně zjistit, a to například přímým nebo kultivačním počítáním buněk. Exponenciální fáze růstu se často označuje také jako logaritmická fáze, vzhledem k lineární závislosti logaritmu počtu buněk na čase. [4, 15]



**Obrázek 5** - Grafické znázornění růstu buněk v exponenciální fázi [4]  
 $x$  - počet buněk v 1 ml,  $t$  - doba [h],  $\alpha$  - specifická růstová rychlost ( $\mu$ )

Specifická růstová rychlost není závislá pouze na druhu mikroorganismu, ale i na vnějších podmínkách, kam patří teplota, pH prostředí, či koncentrace živin. Závislost kinetické konstanty  $\mu$  na koncentraci živin lze podle Monoda vyjádřit jako analogii k enzymatické kinetice Michaelis-Mentenové vztahem:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{s}{s + K_s}, \quad (8)$$

kde  $\mu_{\max}$  znamená maximální specifickou růstovou rychlost daného mikroorganismu za dané teploty a pH;  $c_s$  značí koncentraci substrátu přítomného v nedostatečném množství a za nadbytku ostatních potřebných živin;  $K_s$  je saturační konstanta. Tato konstanta vyjadřuje koncentraci substrátu, kdy  $\mu = \frac{\mu_{\max}}{2}$ , a afinitu buňky k živině. Čím menší je hodnota  $K_s$ , tím větší je afinita. Při velmi nízkých koncentracích a nízkém  $K_s$  je dosaženo prakticky  $\mu_{\max}$ . Vyčerpáním této živiny klesá prudce rychlost růstu. Hodnoty  $K_s$  se pohybují například u cukrů v desítkách  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . [4, 15]

K postupnému snižování obsahu živých buněk dochází v období nedostatku substrátu, tím může být například i rozpuštěný kyslík u aerobních procesů. Je proto zaveden pojem tzv. limitujícího substrátu, což je taková složka, při jejímž nedostatku dochází k zastavení růstu buněk. [15]

Limitujícím substrátem obecně může být nejen jednosložkový, ale i dvou- a vícesložkový substrát. Rovnici růstové rychlosti pro dvousložkový limitující substrát lze psát ve tvaru:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{s_1}{s_1 + K_{s1}} \cdot \frac{s_2}{s_2 + K_{s2}}$$

K limitaci vícesložkovým substrátem se nejčastěji vyskytuje u vsádkových fermentorů, kde ke konci fermentace rychle ubývá obsah substrátu a živin. Zvláštním případem limitace

dvousložkového substrátu může být současná limitace uhlíkových substrátem a kyslíkem při aerobní kultivaci buněk. [15]

Zpomalení až ukončení rozmnožování na konci exponenciální fáze může být způsobeno dvěma faktory, a to vznikem metabolických zplodin nebo vyčerpáním živin. Nejčastěji je vyčerpána živina zastoupená v nejnižší koncentraci. Celkový nárůst ( $G$ ), kterého je dosaženo, je lineární funkcí výchozí koncentrace této limitující živiny ( $c$ ), z čehož vyplývá vztah:

$$G = K \cdot c$$

kde  $K$  je výtěžková konstanta neboli výtěžnost mikroorganismu na dané živině. Vyjadřuje, kolik gramů sušiny biomasy se vytvoří z 1 g živiny, tato veličina je konstantní v průběhu celé růstové křivky. Výtěžnost je závislá na druhu mikroorganismu, ale i na celkovém složení půdy, tzn. vyšší hodnota výtěžnosti na půdě s vitaminy a aminokyselinami, než na půdě s minimem těchto složek. Vztah pro výpočet celkového nárůstu platí i pro zdroje dusíku, fosforu a pro růstové látky, které není daný mikroorganismus schopen sám syntetizovat, což jsou např. již zmíněné vitaminy a aminokyseliny. Avšak hodnota  $K$  je pro každou z těchto sloučenin odlišná u daného mikroorganismu. Lineární závislosti mezi růstem a koncentrací limitující živiny se využívá v potravinářském průmyslu ke stanovení koncentrace vitamínu nebo jiné růstové látky v potravinách z nárůstu vhodného auxotrofního mikroorganismu vyžadujícího danou látku. [4]

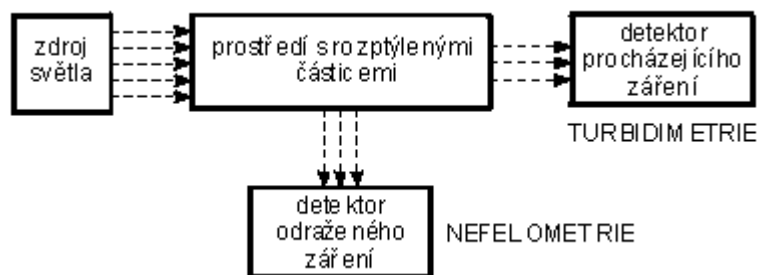
## 1.5 Analytické metody

### 1.5.1 Stanovení sušiny biomasy

V potravinářském průmyslu je nejpoužívanější arbitrážní metodou ke stanovení sušiny a vody sušení při 105 °C. Sušení při této teplotě probíhá až do konstantního úbytku hmotnosti. Při této metodě dochází k difúzi, tzn. transportu vody z vnitřních vrstev na povrch, a odpařování povrchové vody. Konstantní hmotnosti dosáhneme, když nastane rovnováha mezi parciálním tlakem odpařované vody na povrchu materiálu a parciálním tlakem sušícího média. Rychlost sušení ovlivňuje povaha vzorku, tvar částic, množství navážky, teplota, vlhkost, rychlost a směr proudění sušícího média. [16]

### 1.5.2 Turbidimetrie

Je optická metoda založená na měření procházejícího světla zeslabeného rozptylem na částicích se nazývá turbidimetrie. Při měřeních je důležité získat reprodukovatelnou suspenzi měřené reakční směsi, která je dostatečně stálá. Záření absorbované nehomogenním prostředím, tj. koloidním roztokem nebo roztokem zakaleným jemnou sraženinou, se měří absorpčními fotometry a spektrofotometry. [17]



Obrázek 6 - Schématické znázornění turbidimetrie a nefelometrie [18]

Fotometrická citlivost je nepřímo úměrná vlnové délce. Vztah mezi absorbancí a koncentrací částic pro malé částice obvykle lineární, ale obvykle to neplatí pro imunochemické reakce. Se změnou vlnové délky záření se však může lineární odezva měnit na nelineární. Jakýkoliv vliv způsobený vznikem částic odlišné velikosti bude měnit výsledky měření absorbance. Za předpokladu, že je suspenze bezbarvá, lze turbiditu měřit pomocí jakéhokoliv fotometru nebo spektrofotometru. I za cenu snížení citlivosti reakce, je třeba snížit na minimum vliv interferujících látek. Závislost intenzity prošlého záření na vlastnostech absorbujícího prostředí je exponenciální:

$$I_t = I_0 \cdot e^{-\tau \cdot l}$$

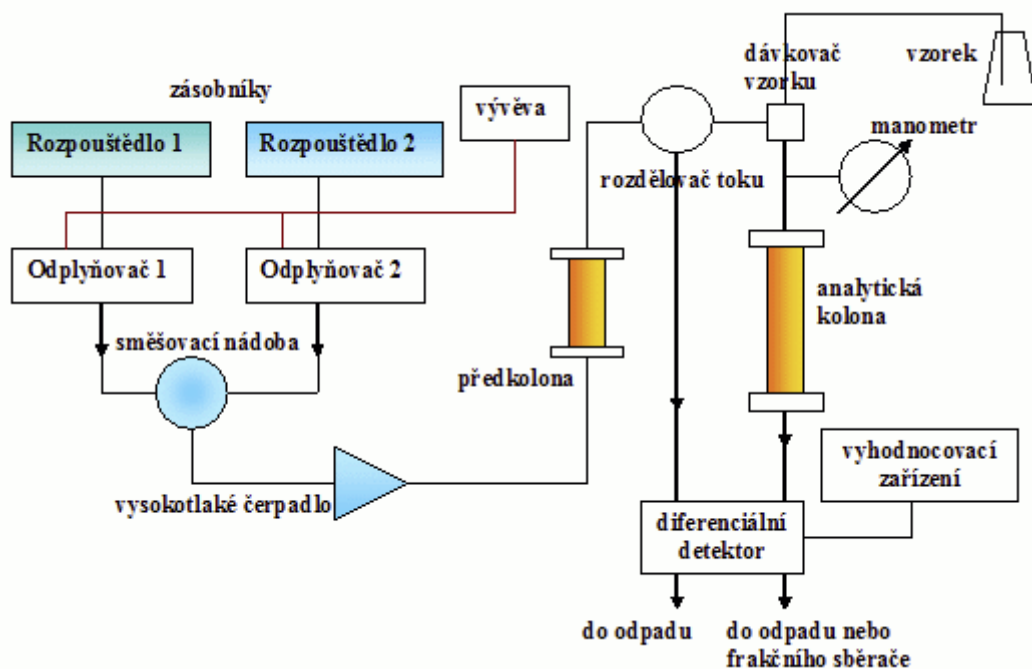
kde  $I_t$  = intenzita prošlého záření,  $I_0$  = intenzita světelného zdroje,  $\tau$  = turbiditní koeficient,  $L$  = světelná dráha kyvetou. [17]

### 1.5.3 HPLC

HPLC je zkratkou anglického high performance liquid chromatography, v překladu vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Tato chromatografická technika slouží k separaci složek vzorku za účelem stanovení přítomnosti a koncentrace daných složek ve vzorku. Může sloužit také k izolaci jednotlivých složek, což se nazývá preparativní chromatografie. HPLC aparatura se liší od běžné sloupcové zejména přítomností vysokotlakého čerpadla umožňujícího průtok mobilní fáze kolonou o menších rozměrech. V koloně je vázána stacionární fáze na částice o velikosti několik mikrometrů. Dané uspořádání je příčinou vyšší účinnosti separace látek u HPLC za kratší dobu, oproti klasické sloupcové chromatografii. [19, 20]

HPLC přístroje se skládají z nádržky s mobilní fází, čerpadla, injektoru, separační kolony a detektoru. Sloučeniny jsou oddělovány tak, že vzorek je pomocí injektoru vnesen do kolony. Různé složky směsi prochází kolonou s různou rychlostí v důsledku odlišné rozdělovací schopnosti mezi kapalnou mobilní fází a stacionární. [19, 20]

Použitá rozpouštědla musí být odplyněna z důvodu eliminace vzniku bublin. Čerpadla by měla poskytovat vysoký tlak a konstantnost průtoku bez pulzů. Mohou být naprogramována tak, aby se měnilo složení rozpouštědla během separace. Kapalný vzorek je zaveden do dávkovací smyčky vstříknutím pomocí injektoru. Po naplnění smyčky je vzorek vnášen do blízkosti počátku chromatografického lože vřazením dávkovací smyčky do proudu mobilní fáze. Přítomnost analytů protékajících kolonou je zaznamenán detekcí změny indexu lomu, UV-VIS absorpce s měnitelnou vlnovou délkou, fluorescence po excitaci vhodnou vlnovou délkou nebo elektrochemickou reakcí. K detekci může být také použita hmotnostní spektrometrie, která může krom detekce separovaných látek poskytnout informaci o struktuře oddělených analytů a jejich identifikaci. [19, 20]

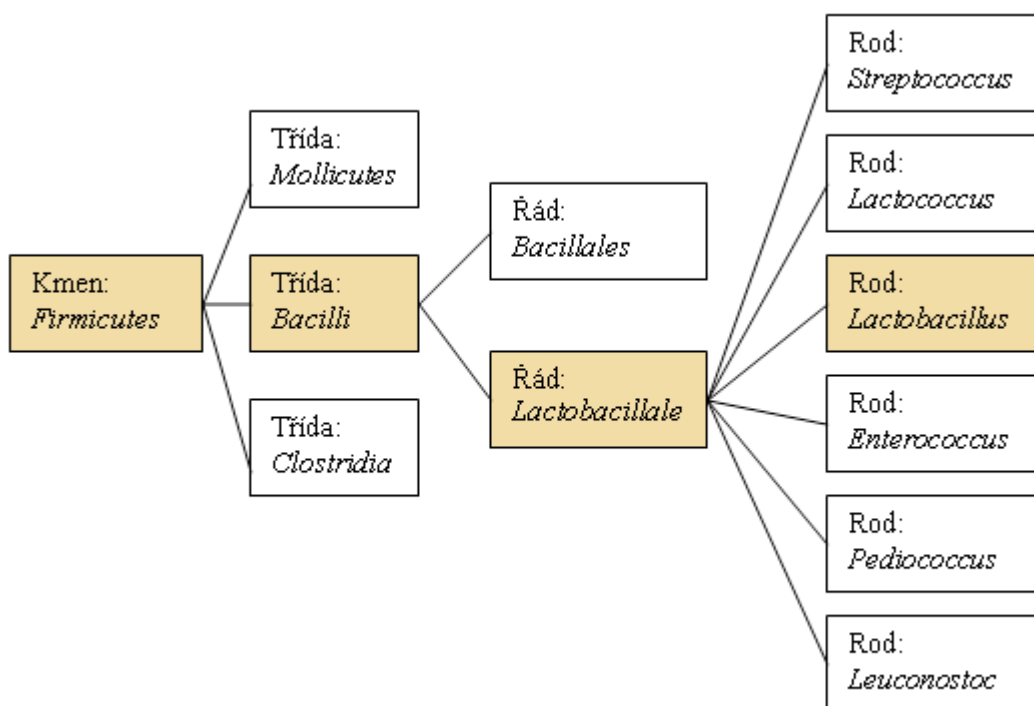


Obrázek 7 - Schéma vysokotlaké kapalinové chromatografie [19]

## 1.6 Užité mikroorganismy

### 1.6.1 Rod *Lactobacillus*

Patří do čeledi *Lactobacillaceae*, která spadá do řádu *Lactobacillales*, třídy *Bacilli* a kmene *Firmicutes*. Taxonomické zařazení je názorněji ukázáno na obrázku 8. [21]



Obrázek 8 - Taxonomické zařazení rodu *Lactobacillus* [21]

Název je odvozen z latinského *lac*, neboli mléko. Do tohoto rodu jsou zařazovány mléčné bakterie mající buňky ve tvaru pravidelných tyčinek, které jsou obvykle delší, občas kokovité. Jsou uspořádány v palisádách nebo krátkých řetězcích. Mají buněčnou stěnu grampozitivního typu, netvoří spory, pouze zřídka pohyblivé peritrichálními bičíky. Z hlediska nároků na kyslík jsou považovány laktobacily za fakultativně anaerobní, občas mikroaerofilní (lepší růst při redukované koncentraci kyslíku). Někteří zástupci však vyžadují striktně anaerobní podmínky při izolaci. Obecně je růst laktobacilů podporován přítomností 5 % oxidu uhličitého. Zástupci tohoto rodu patří mezi chemoorganotrofní mikroorganismy vyžadující bohatá komplexní média. Nemají schopnost redukovat nitráty, nehydrolyzují želatinu a jsou negativní na kalatázu, která katalyzuje rozklad peroxidu vodíku na kyslík a vodu. Optimální teplota pro růst je 30 až 40 °C a pH optimum je obvykle mezi 5,5 až 6,2. [21]

Rod *Lactobacillus* je v přírodě velmi rozšířen, obzvláště v nejrůznějších potravinách rostlinného nebo živočišného původu. Jeho druhy se vyskytují například v mléce, kde vyvolávají zkvašování laktosu na kyselinu mléčnou. Dále se vyskytují v ústech a trávicím traktu savců, na rostlinách a v půdě. Mají schopnost zkvašovat laktosu. Pouze vzácně jsou patogenní. [7]

Mezi homofermentativní mléčné bakterie patří například tyto druhy rodu *Lactobacillus*: *L. delbrueckii*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, a mezi heterofermentativní mléčné bakterie patří např. *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. buchneri*. V mlékárenském průmyslu se homofermentativní laktobacily používají při výrobě sýrů (např. *L. casei*, *L. delbrueckii subsp. lactis*, *L. helveticus*). Některé druhy rodu *Lactobacillus* se používají pro výrobu kysaných mléčných výrobků (např. *L. acidophilus* pro přípravu tzv. acidofilního mléka, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* pro přípravu jogurtu). *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii* zkvašuje sacharosu a používá se pro průmyslovou výrobu kyseliny mléčné z melasy. [4]

Laktobacily jsou poměrně náročné na výživu, vyžadují kromě sacharidů jako zdroje energie a uhlíku i nukleotidy, aminokyseliny a vitamíny. Téměř všechny druhy vyžadují pro svůj růst kyselinu pantotenovou a nikotinovou, heterofermentativní bakterie navíc vyžadují i thiamin. K jejich pěstování in vitro je používáno tekutého nebo pevného média, zejména MRS. Tekutá i pevná půda MRS je složena z: peptonu, masového extraktu, kvasničného extraktu, glukosy, tweenu 80, hydrogenfosforečnanu draselného, octanu sodného, citranu amonného, síranu hořečnatého a síranu manganatého. Pevná půda MRS navíc obsahuje 1,5 až 1,8 % agaru. Půda podle Rohosy je podobného složení s menšími rozdíly. Místo peptonu a masového extraktu obsahuje trypton, navíc obsahuje ledovou kyselinu octovou a síran železnatý. Stanovení laktobacilů v některých potravinářských výrobcích a surovinách je předepsáno. [7, 8]

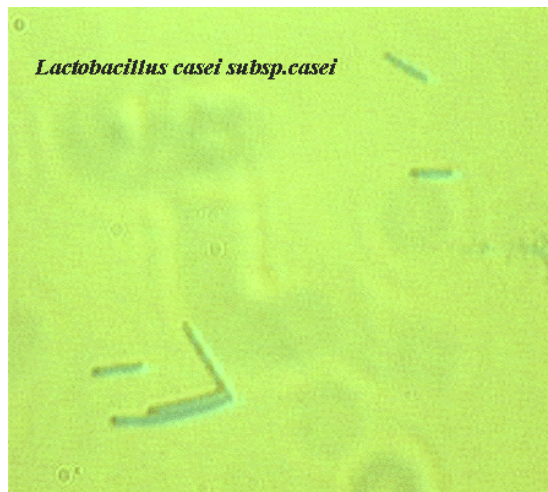
Jejich růstu nejvíce vyhovuje slabě kyselé prostředí, kdy počáteční pH je v rozmezí 4,5 až 6,4. Jestliže pH dosáhne hodnoty 3,6 až 4,0, růst se zastavuje v závislosti od druhu a kmene. Optimální teplota pro růst je 40 °C, avšak některé rostou i při teplotě nižší než 15 °C. Horním limitem teploty pro růst je 62 °C. Doba inkubace bývá 2 až 7 dní v závislosti od druhu vzorku a půdy. Obvyklá doba inkubace laktobacilů je 5 až 6 dní. [7]

### ***Lactobacillus casei***

Dříve nazýván *Lactobacterium casei*. Druhové jméno je odvozeno z latinského *caseus*, což znamená v překladu sýr. Je jedním z mnoha druhů bakterií patřících do rodu *Lactobacillus*. Jedná se o mezofilní, grampozitivní nepohyblivé bakterie tyčinkovitého tvaru, které se mohou

agregovat do řetízků. Dále jsou nesporeující, bez cytochromů. Patří mezi fakultativně anaerobní mikroorganismus, který získává energii pomocí fermentace. Většina kmenů *L. casei* může kvasit galaktosu, glukosu, mannosu, mannitol, N-acylglukosamin a tagatosu. Schopnost fermentace laktosy je méně častá u kmenů izolovaných z rostlinných materiálů, než u těch izolovaných ze sýrů či zažívacího traktu člověka. Při růstu *L. casei* hrají roli podmínky fermentace, jako jsou teplota, pH, složení kultivačního média, množství kyslíku. [8, 22, 23]

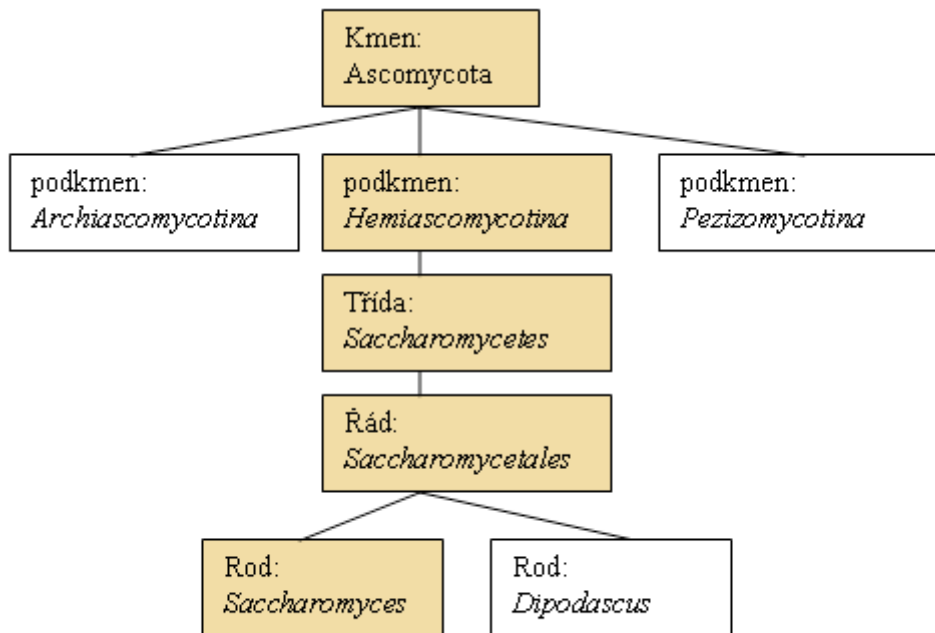
Tento druh bakterie můžeme nalézt v různých prostředích, jako jsou syrové a fermentované mléčné výrobky, čerstvé a fermentované rostlinné produkty, dále se vyskytují například v zažívacím či rozmnožovacím traktu člověka a zvířat. Okyseluje a koaguluje mléko po 3 až 5 dnech a způsobuje jeho hlenovitost. Má schopnost intenzivně rozkládat bílkoviny až na volné aminokyseliny, zvláště například kasein. Optimální pH pro *L. casei* je 5,5 a optimální teplota se pohybuje okolo 30 °C. Kyselina mléčná produkovaná *L. casei* je důležitá z hlediska použití k výrobě sýrů, případně jogurtů, pomáhá snižovat hladinu cholesterolu, zlepšují imunitní systém a trávení, zmírňuje nesnášenlivost laktosy, inhibuje střevní patogeny a slouží jako probiotikum. Probiotika jsou mikroorganismy, které podporují či udržují rovnováhu mikroorganismů žijících v zažívacím traktu. [8, 22, 24]



**Obrázek 9** - Mikroskopický obraz buněk *Lactobacillus casei* [26]

### 1.6.2 Rod *Saccharomyces*

Je rodem tvořícím askospory, patří tedy do kmene *Ascomycota*, ve kterém patří do podkmene *Hemiascomycotina*, třídy *Saccharomycetes* a řádu *Saccharomycetales*. Taxonomické zařazení je názorněji ukázáno na obrázku 10. [27]



**Obrázek 10 - Taxonomické zařazení rodu *Saccharomyces* [27]**

Patří mezi nejznámější a nejprozkoumanější rod kvasinek. Název vychází z řeckých slov *sakcharon* = cukr a *mykés* = houba, tedy doslovně „cukerná houba“. Buňky rodu *Saccharomyces* se vyznačují většinou elipsoidním, vejčitým nebo protáhlým tvarem. Hlavní složku buněčné stěny tvoří glukán a mannoproteiny. [4, 7]

Obsahuje sedm druhů, které jsou schopny zkvašovat většinou několik cukrů. Jako zdroj uhlíku nevyužívají laktosu a jako zdroj dusíku nevyužívají  $\text{NO}_3^-$ . Vegetativní rozmnožování probíhá multilaterálním pučením a vegetativní stádium je až na výjimky diploidní. Dochází také ke konjugaci mezi buňkami, kdy výsledkem je tvorba spor s hladkým povrchem v počtu 1 až 4 v jednom vřecku. Askospory obsahují chitosan a dityrosin. [4, 7]

Optimální teplota pro kvašení je 22 až 25 °C. Při pivovarském spodním kvašení se adaptovaly na teploty 5 až 12 °C, vzhledem k tomu, že tento typ kvašení probíhá za nízkých teplot. Růst kvasinek se v kapalném médiu projeví zákalem. Potřeba většího množství kyslíku při rozmnožování se projeví slizovitou vrstvou, tzv. mázdrou. Na povrchu tekutiny se jindy rozprostírají jako tenká blanka (kožka), ta se mlže zachytávat na stěnách nádoby se zbytky živné tekutiny. Pokud nepotřebují tolik kyslíku, na povrchu se tvoří prstenec nebo ostrůvky mázdry. [7]

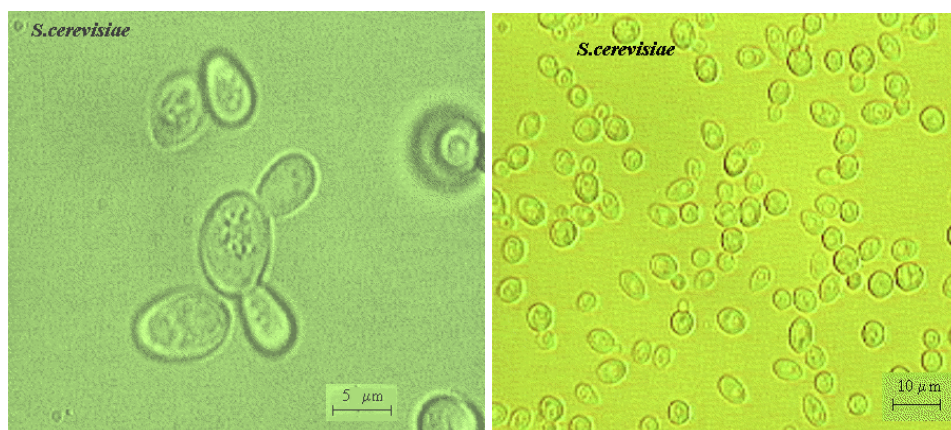
Ke kultivaci je nejčastěji používána sladina jako kapalné živné médium a jako tuhé živné médium. Na jejich izolaci nebo přesnou identifikaci při mikrobiologické kontrole jsou používána selektivní nebo selektivně-diagnostická živná média. [7]

## *Saccharomyces cerevisiae*

Patří mezi nejdůležitější druh rodu *Saccharomyces*, vzhledem k výrazným fermentačním schopnostem se uplatňuje jako pekařská, lihovarská, vinařská nebo spodní či svrchní pivovarská kvasinka. Druhový název pochází z latinského *cerevisiae*, znamenající pivo. Slouží jako modelový mikroorganismus pro biochemické a genetické práce, z toho důvodu je neprostudovanější kvasinkou. Zkvašuje glukosu, maltosu, galaktosu, sacharosu a také částečně či zcela rafinosu. Naproti tomu trisacharid rafinosu zkvašují z jedné třetiny tak, že z ní odštěpují pouze fruktosu, zbytek zůstává nerozštěpen jako disacharid. [4]

Vegetativně se rozmnožují výhradně pučením. Téměř vždy je oddělená dceřiná buňka menší než mateřská buňka. Buňky jsou oválného tvaru. Na agaru vyrůstají ve formě bělavě krémových, vyvýšených, hladkých, lesklých kolonií s kruhovitým nevláknitým okrajem. Byl zjištěn výskyt homothalických i heterothalických kmenů. Při pohlavním rozmnožování dochází k tvorbě vřecek s askosporami, jež jsou kruhovitého nebo oválného tvaru po 1 až 4 v jednom vřecku. [8]

Kvasinky *S. cerevisiae* jsou používány také například k přípravě očkovací látky proti žloutence typu B. Pomocí genového inženýrství je do buněk kvasinek vložen gen pro tvorbu HBs antigenu (= povrchový antigen proti žloutence typu B). Vlivem rychlého množení kvasinek dochází k produkci velkého množství čistého HBs antigenu. Ten je inaktivován a následně použit k vakcinaci proti hepatitidě B. Tato metoda přípravy vakcíny nahradila původní, kdy se získával antigen HBs z krve chronických nosičů. [8]



**Obrázek 11 - Mikroskopický obraz buněk *Saccharomyces cerevisiae* [28]**

## 2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 2.1 Cíl práce

Cíl bakalářské práce byl zaměřen na studium růstu vybraných mikroorganismů, a to konkrétně *Lactobacillus casei* a *Saccharomyces cerevisiae*. Dále byla cílem analýza metabolitů vzniklých při kultivaci.

### 2.2 Přístroje a pomůcky

- Centrifuga Hettich EBA 20
- Pečící trouba Mora 524
- Ultrospec™ 10 Cell Density Meter
- Termostat Memmert
- Minitřpačka lab dancer vario
- Běžné laboratorní sklo
- Mikropipety
- Analytické váhy
- HPLC (vysokoučinný kapalinový chromatograf)



Obrázek 12 - Cell density meter biowave WPA CO 8000

### 2.3 Mikroorganismy a příprava média

#### 2.3.1 Analyzované mikroorganismy

Ke studiu růstových charakteristik byli použiti zástupci kvasinek rodu *Saccharomyces* a bakterií rodu *Lactobacillus*:

- *Saccharomyces cerevisiae*
- *Lactobacillus casei*

#### 2.3.2 Chemikálie použité k přípravě médií

Kultivační médium pro *Saccharomyces cerevisiae*:

- D-glukosa (bezvodá), (p.a., výrobce PENTA)
- kvasničný extrakt (výrobce Carl Roth)
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (p.a., výrobce Lach-Ner)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (p.a., výrobce Lach-Ner)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (p.a., výrobce Lach-Ner)

Kultivační médium pro *Lactobacillus casei*:

- MRS Bouillon (výrobce Carl Roth)

### 2.3.3 Příprava kultivačního média

*Kultivační médium pro Saccharomyces cerevisiae*

Byly naváženy chemikálie pro přípravu 100 a 200 ml kultivačního média. Pro přípravu 100 ml kultivačního média bylo naváženo: 10 g bezvodé D-glukosy; 0,3 g kvasničného extraktu; 0,1 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 0,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 0,05 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Pro objem 200 ml byla potřeba dvojnásobných navážek. Dále bylo přidáno 100 a 200 ml destilované vody, média byla důkladně promíchána a vysterilována.

*Kultivace Saccharomyces cerevisiae*

Na inokulum bylo použito médium o objemu 100 ml, které bylo zaočkováno kličkou ze šikmého agaru. Inokulum bylo kultivováno v termostatu při 35 °C po dobu 13 hodin. Pro studium produkce biomasy a metabolitu bylo použito 200 ml média, které bylo zaočkováno 20 ml inokula. Baňka byla umístěna opět do termostatu nastaveného na 35 °C a byla zahájena kultivace, která byla ukončena po 24 hodinách.

*Kultivační médium pro Lactobacillus casei*

Opět byly připraveny dvě kultivační média o objemu 100 a 200 ml. Pro přípravu 100 ml kultivačního média bylo naváženo 5,2 g MRS. Pro objem 200 ml byla navážka dvojnásobná. Dále bylo přidáno 100 a 200 ml destilované vody, média byla důkladně promíchána a vysterilována.

*Kultivace Lactobacillus casei*

Na inokulum bylo použito médium o objemu 100 ml, které bylo zaočkováno 10 ml ze zamražené kultury. Inokulum bylo kultivováno v termostatu při 35 °C po dobu 13 hodin. Pro studium produkce biomasy a metabolitu bylo použito 200 ml média, které bylo zaočkováno 20 ml inokula. Baňka byla umístěna opět do termostatu nastaveného na 35 °C a byla zahájena kultivace, která byla ukončena po 24 hodinách.

## 2.4 HPLC

### 2.4.1 Chemikálie a standardy

- Kyselina mléčná (čistá, 80%, výrobce LACHEMA)
- Ethanol (absolut p.a., výrobce MERCK)
- D-glukosa (bezvodá), (p.a., výrobce PENTA)
- $\text{H}_2\text{SO}_4$  (p.a., výrobce LACHEMA)

## 2.4.2 Kolona a předkolona

- Předkolona: Watrex Polymer IEX H-forma, 40 x 8 mm
- Kolona: Watrex Polymer IEX H-forma, 8 x 250 mm

## 2.4.3 Parametry a podmínky

- průtok:  $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$
- teplota:  $40 \text{ }^\circ\text{C}$
- čas analýzy vzorku: 35 min
- tlak v koloně: 1,7 MPa
- mobilní fáze:  $1,3 \text{ mM H}_2\text{SO}_4$

## 2.4.4 Detektory

- UV/VIS
- RID



**Obrázek 13** - Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s automatickým dávkovačem

## 2.5 Metody měření

### 2.5.1 Postup stanovení množství sušiny

Z každé kultivace bylo odebráno 10 ml vzorku, ten byl zcentrifugován 10 minut při 6000 otáčkách za minutu. Supernatant nad sraženinou byl uchován k dalším analýzám a získaný sediment z centrifugace byl promyt vodou, protřepán na vortexu a opět zcentrifugován. Po centrifugaci byl získán druhý supernatant, který byl vylit do odpadu a zbylý sediment byl protřepán s malým množstvím vody a kvantitativně převeden do předem zvážené a vysušené odpařovací misky, kde byl dále sušen při  $105 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po vysušení byla miska i se vzorkem zvážena na analytických vahách a z rozdílu hmotností bylo stanoveno množství sušiny.

### **2.5.2 Stanovení růstové křivky**

V průběhu kultivace byla v hodinových intervalech měřena optická hustota kultury pomocí přístroje Ultrospec™ 10. Byla měřena absorbance při vlnové délce 600 nm. Jako blank byla použita destilovaná voda. V okamžiku, kdy byla absorbance vyšší než 1,0, byl vzorek naředěn.

### **2.5.3 Analýza metabolitů pomocí HPLC**

Na analýzu metodou HPLC byly jako vzorky použity zředěné supernatanty získané při stanovení sušiny biomasy. Supernatant získaný z kultivace *Lactobacillus casei* byl zředěn 4x a u *Saccharomyces cerevisiae* bylo ředění desetinásobné. Naředěné vzorky byly přefiltrovány do vialek a dány k analýze na HPLC.

### 3 VÝSLEDKY A DISKUZE

#### 3.1 Růstové křivky

Byl studován růst jednotlivých mikroorganismů za optimálních podmínek v Erlenmeyerově baňce. Růst byl sledován jako závislost hodnoty optické hustoty měřené za vlnové délky 600 nm (OD) na čase. A dále jako závislost koncentrace sušiny na čase. Z naměřených hodnot byly sestrojeny grafy růstových křivek.

$$\text{Výpočet koncentrace sušiny: } c = \frac{m}{V} = \frac{m_{\text{misky+sušiny}} - m_{\text{misky}}}{V}$$

$$\text{Pro } S. cerevisiae, t = 0: c = \frac{1,1526 - 1,1507}{0,01} = \underline{\underline{0,19 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}}}$$

##### 3.1.1 Růstové křivky *Saccharomyces cerevisiae*

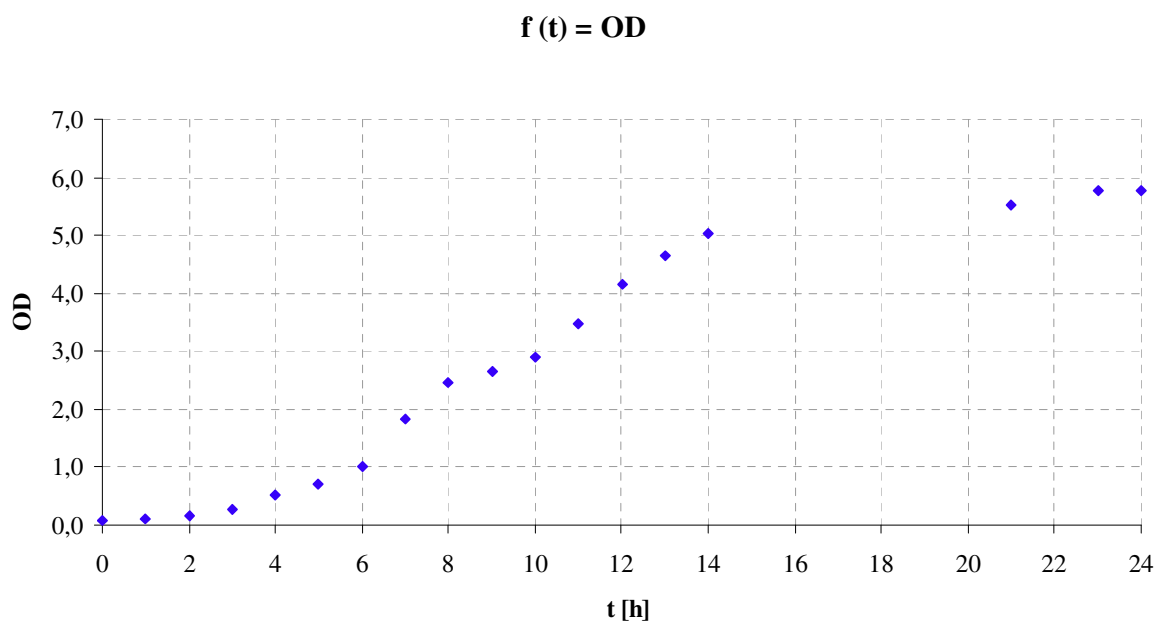
**Tabulka 1** - Závislost optické hustoty (OD) na čase během kultivace pro *S. cerevisiae*

t [h]	OD	ředění	t [h]	OD	ředění
0	0,08	-	9	2,64	3x
1	0,10		10	2,91	
2	0,17		11	3,48	4x
3	0,28		12	4,16	
4	0,51		13	4,65	5x
5	0,72		14	5,04	6x
6	1,02	2x	21	5,52	12x
7	1,84		23	5,76	
8	2,46		3x	24	

**Tabulka 2** - Závislost koncentrace biomasy na čase pro *S. cerevisiae*

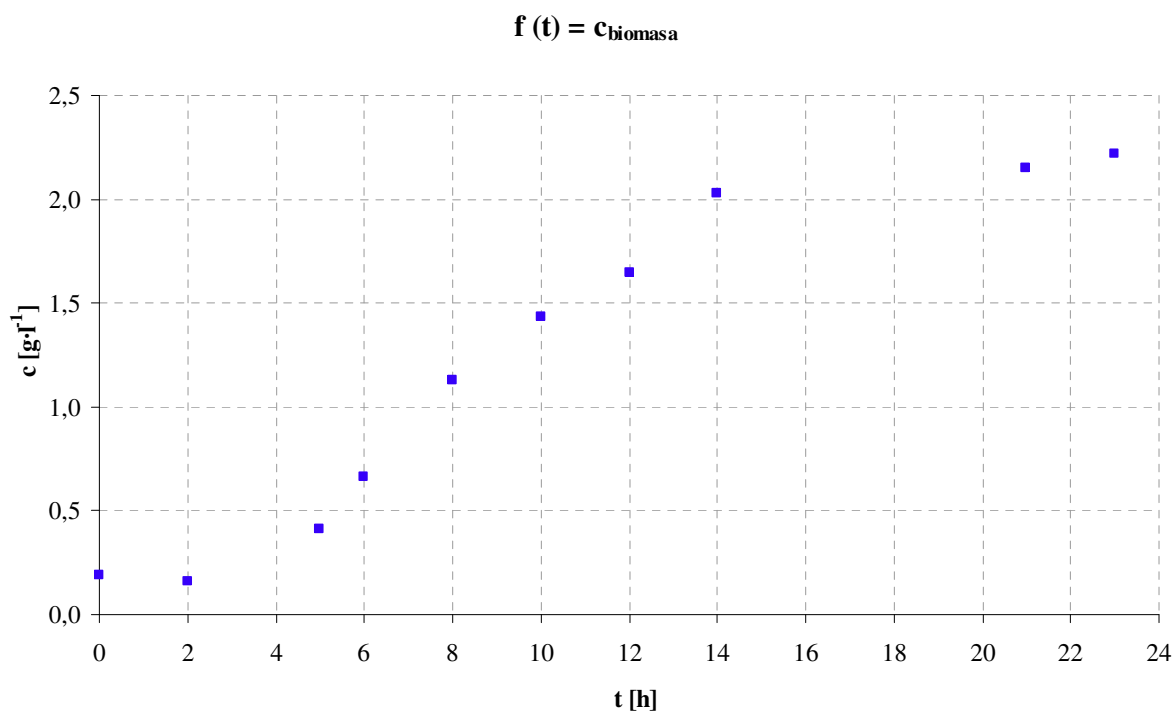
t [h]	0	2	5	6	8	10	12	14	21	23
c [g·l <sup>-1</sup> ]	0,19	0,16	0,41	0,66	1,13	1,43	1,65	2,03	2,15	2,22

**Graf 1 - Růstová křivka kultivace *Saccharomyces cerevisiae* (závislost optické hustoty na čase)**



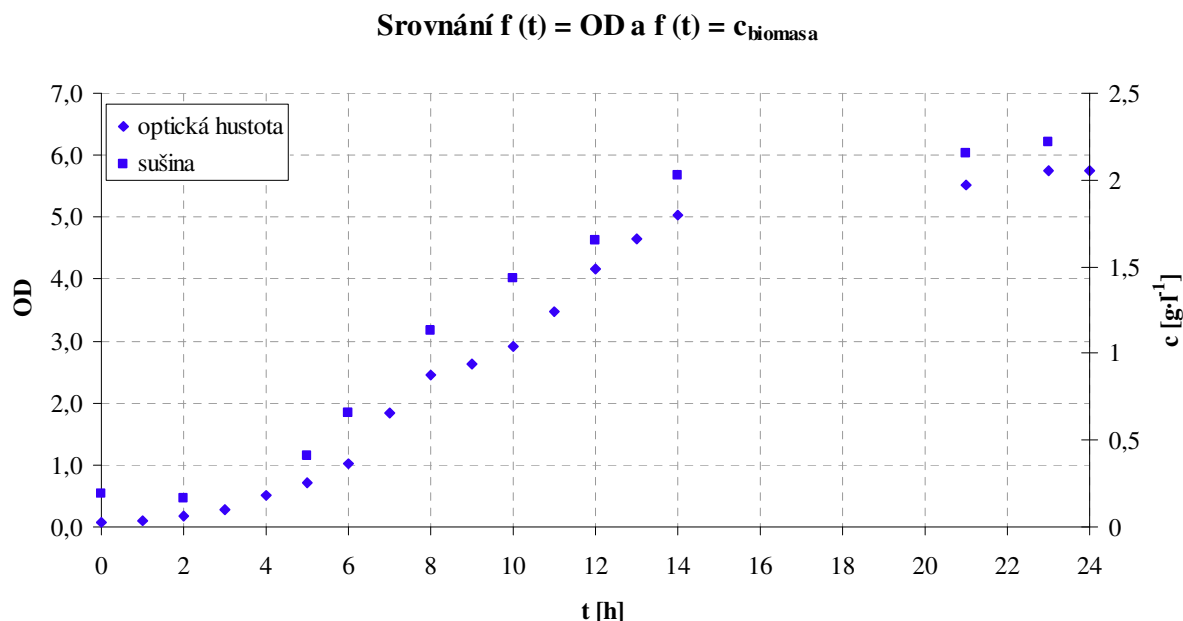
Na tomto grafu lze vidět, že exponenciální fáze *S. cerevisiae* začala pravděpodobně od 2. hodiny měření. Lze usuzovat, že na počátku měření ještě probíhala Lag-fáze. Konec exponenciální fáze nastal podle všeho mezi 21. a 23. hodinou.

**Graf 2 - Růstová křivka kultivace *Saccharomyces cerevisiae* (závislost koncentrace biomasy na čase)**



Z tohoto grafu měření koncentrace biomasy na čase pro *S. cerevisiae* lze usuzovat stejné závěry jako při měření závislosti absorbance na čase. Nepatrný pokles v 2. hodině mohl být způsoben špatným promícháním média před odběrem.

**Graf 3** - Porovnání růstových křivek *Saccharomyces cerevisiae* (závislost optické hustoty a koncentrace biomasy na čase)



Tento graf ukazuje srovnání obou použitých metod pro stanovení růstových křivek. Stanovení hmotnosti sušiny bylo prováděno ve větším časovém intervalu vzhledem k tomu, že metoda měření optické hustoty je poněkud přesnější a méně časově náročná. Dále tento graf ukazuje, že se průběhy růstových křivek získaných oběma metodami příliš neliší.

### 3.1.2 Růstové křivky *Lactobacillus casei*

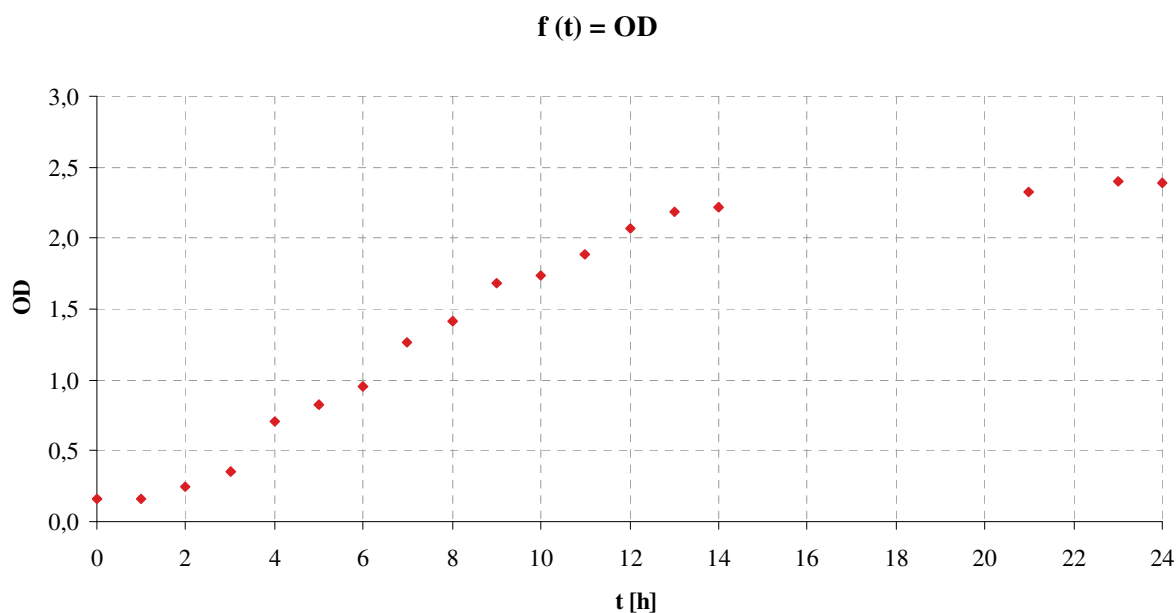
**Tabulka 3** - Závislost optické hustoty (OD) na čase během kultivace pro *L. casei*

t [h]	OD	ředění	t [h]	OD	ředění
0	0,16	-	9	1,68	3x
1	0,16		10	1,74	
2	0,25		11	1,89	
3	0,35		12	2,07	
4	0,71		13	2,19	
5	0,82		14	2,22	
6	0,95		21	2,32	4x
7	1,26	2x	23	2,40	
8	1,41	3x			

**Tabulka 4** - Závislost koncentrace biomasy na čase pro *L. casei*

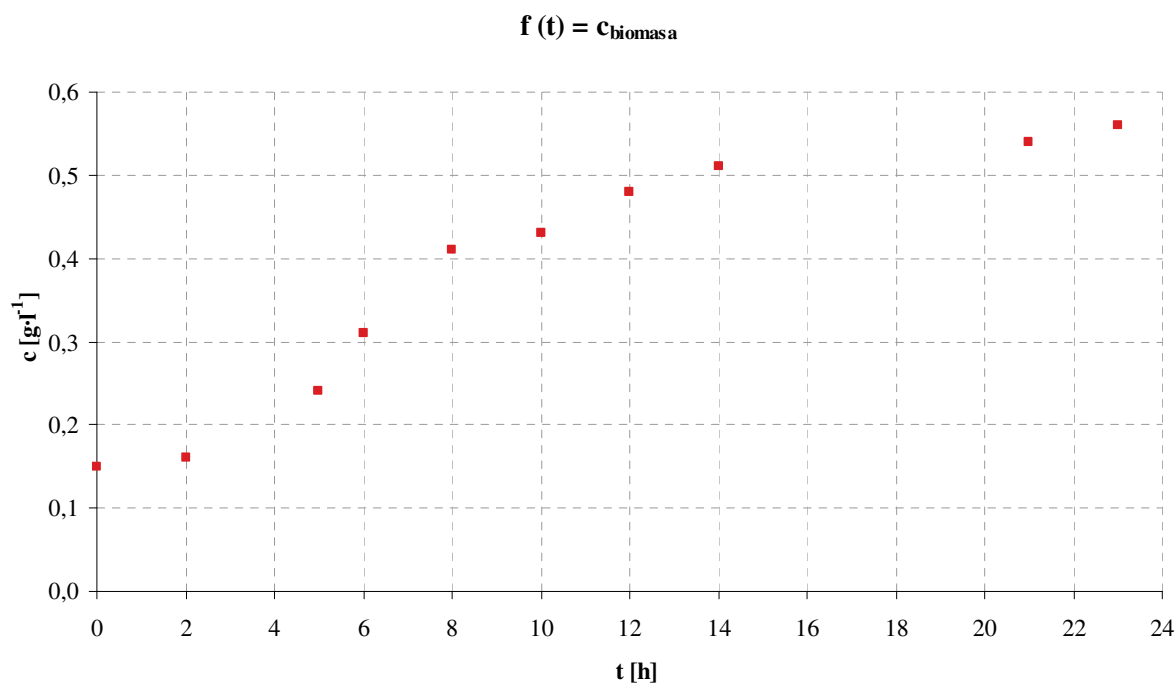
t [h]	0	2	5	6	8	10	12	14	21	23
c [g·l <sup>-1</sup> ]	0,15	0,16	0,24	0,31	0,41	0,43	0,48	0,51	0,54	0,56

**Graf 4 - Růstová křivka kultivace *Lactobacillus casei* (závislost optické hustoty na čase)**



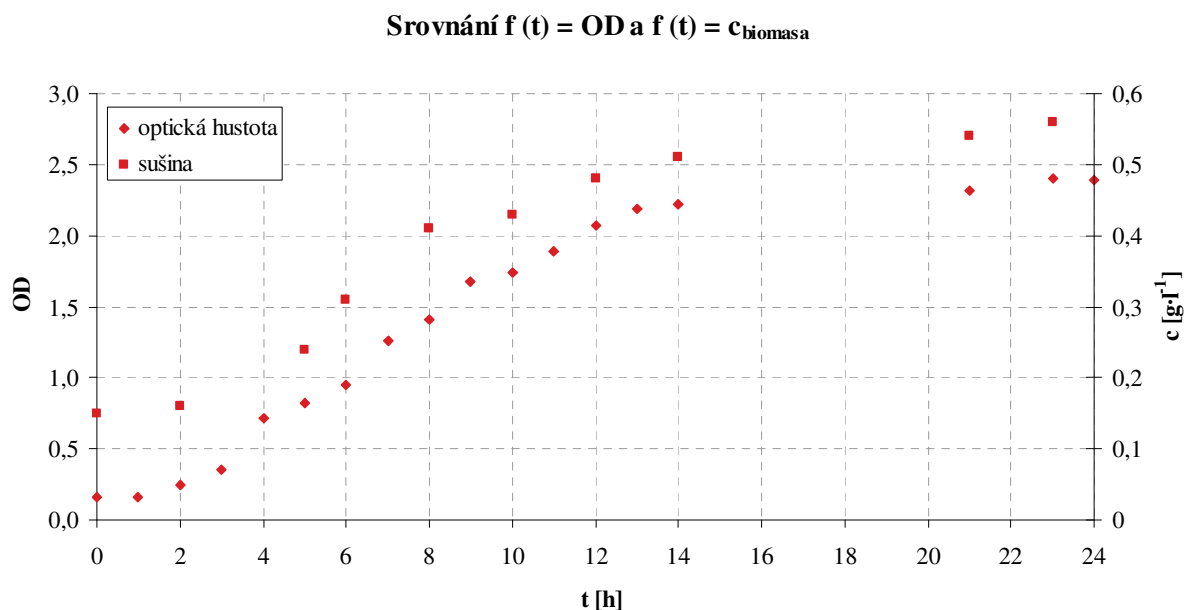
Z tohoto grafu lze usuzovat, že počátek exponenciální fáze u *L. casei* začal někdy po 1. hodině kultivace a konec nastal pravděpodobně kolem 13. hodiny.

**Graf 5 - Růstová křivka kultivace *Lactobacillus casei* (závislost koncentrace biomasy na čase)**



Zde je zobrazena růstová křivka *L. casei* získána měřením hmotnosti sušiny. Opět lze usuzovat stejné závěry jako u růstové křivky získané měřením optické hustoty.

**Graf 6 - Porovnání růstových křivek *Lactobacillus casei* (závislost optické hustoty a koncentrace biomasy na čase)**



Z tohoto grafu porovnání růstových křivek získaných různými metodami lze opět vyčíst, že se dané růstové křivky příliš neliší. Důvodem většího časového intervalu mezi měřeními hmotnosti sušiny je opět to, že stanovení růstové křivky měřením optické hustoty je přesnější a méně časově náročnější.

### 3.2 Analýza na HPLC

Ze standardů byly naředěny vzorky pro kalibraci a analyzovány na HPLC. Následně byly pomocí HPLC stanoveny vzorky vzniklé ředěním supernatantů získaných při stanovení sušiny biomasy. Supernatanty získány z kultivace *Saccharomyces cerevisiae* byly ředěny 10x a z kultivace *Lactobacillus casei* byly ředěny 4x. Na analýzu byly použity pouze vzorky odebrány do 21. hodiny.

#### 3.2.1 Kalibrační křivky - analýza metodou HPLC

**Tabulka 5 - Závislost koncentrace glukosy na ploše píku**

c [g·l <sup>-1</sup> ]	plocha píku [mV·s]
0	0
2	4206,253
4	8504,312
6	13495,96
8	16939,29
10	21373

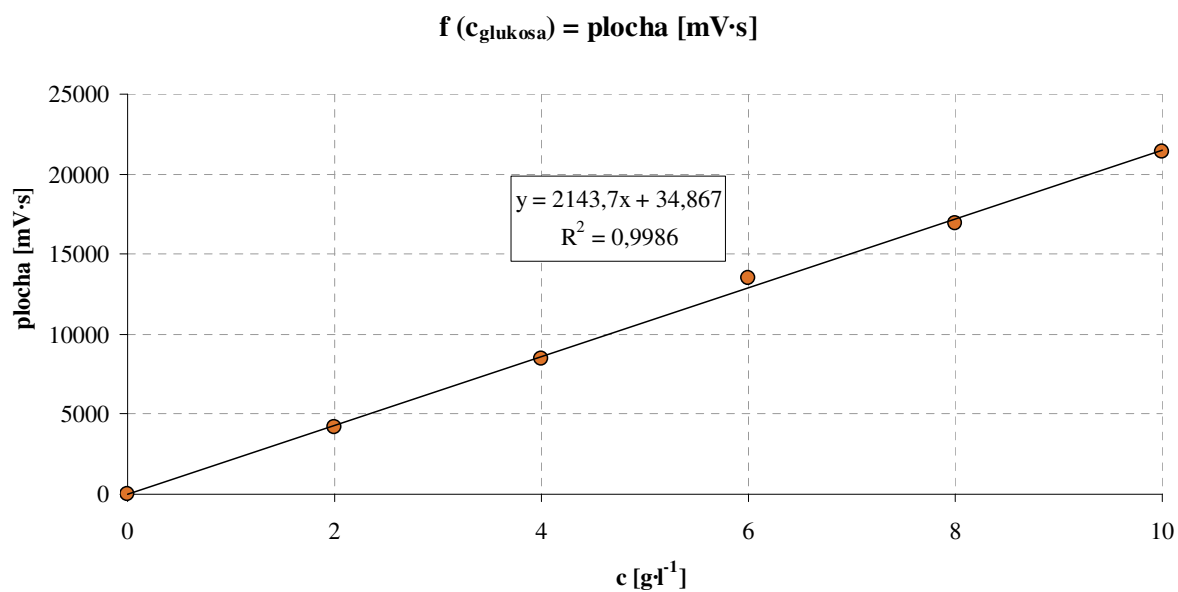
**Tabulka 6 - Závislost koncentrace ethanolu na ploše píku**

c [g·l <sup>-1</sup> ]	plocha píku [mV·s]
0	0
2	1649,64
4	3137,09
6	4443,082
8	6264,145
10	7786,628

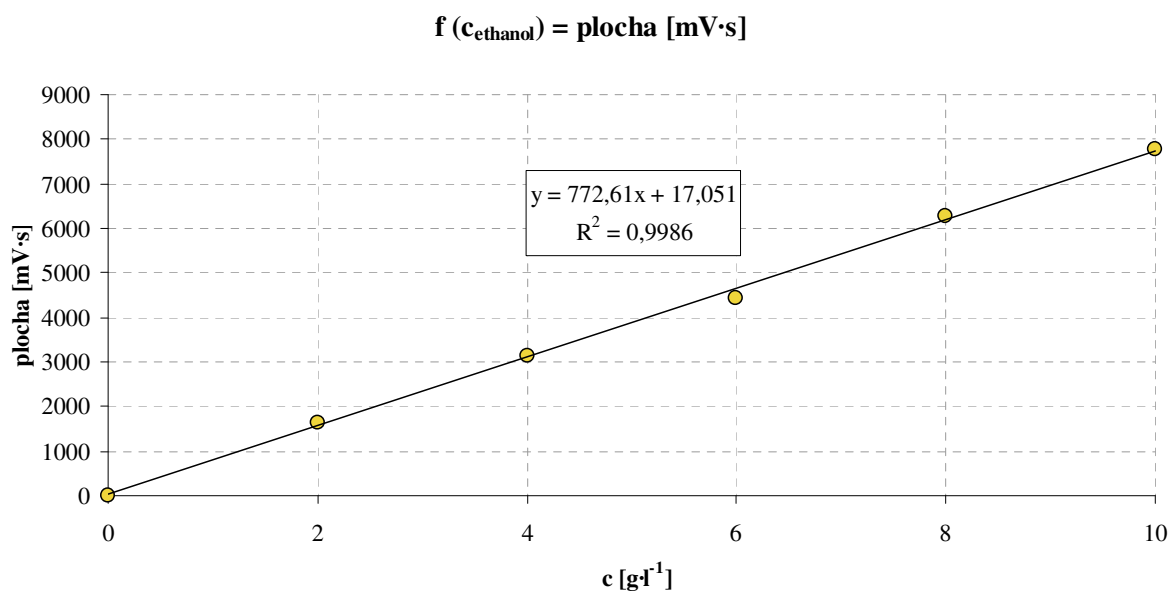
**Tabulka 7 - Závislost koncentrace kyseliny mléčné na ploše píku**

c [g·l <sup>-1</sup> ]	plocha píku [mV·s]
0	0
2	1159,673
4	2269,469
6	3721,331
8	5218,948
10	6009,488

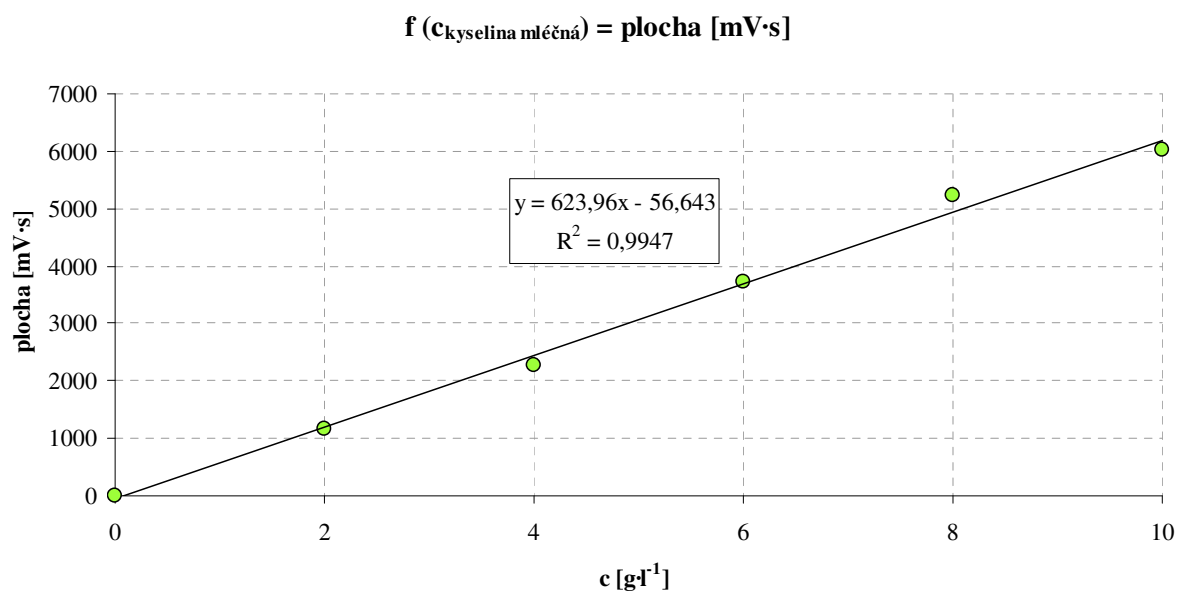
**Graf 7 - Kalibrační křivka glukosy (závislost koncentrace glukosy na ploše píku)**



**Graf 8 - Kalibrační křivka ethanolu (závislost koncentrace ethanolu na ploše píku)**



**Graf 9 - Kalibrační křivka kyseliny mléčné (závislost koncentrace kyseliny mléčné na ploše píku)**



### 3.2.2 Spotřeba glukosy a produkce ethanolu - kultivace *S. cerevisiae*

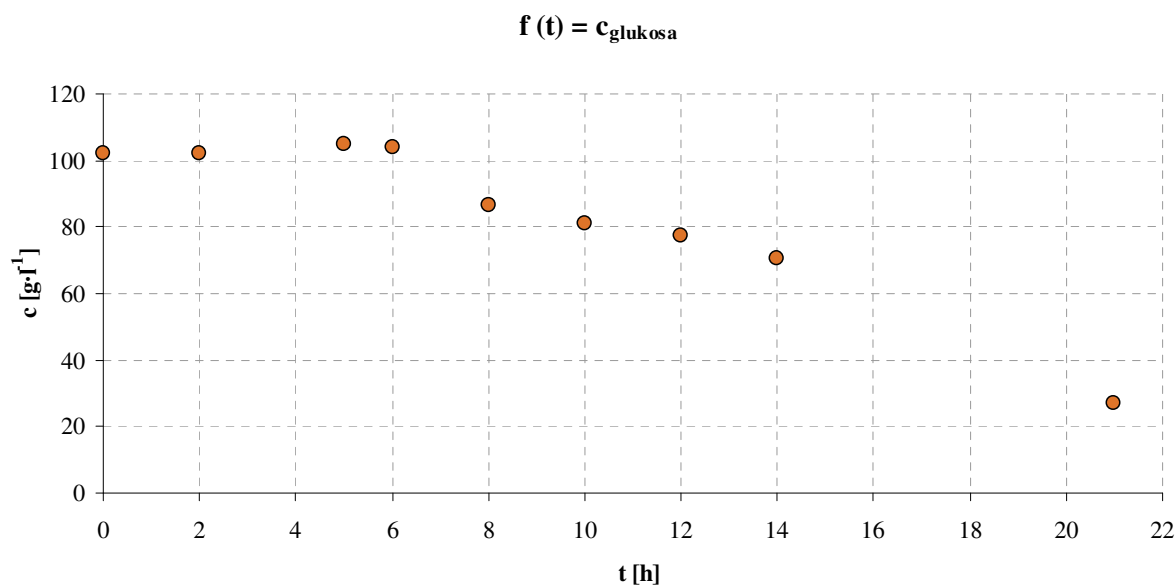
**Tabulka 8** - Závislost koncentrace glukosy na ploše píku a čase pro kultivaci *S. cerevisiae*

vzorek	t [h]	plocha píku [mV·s]	c [g·l <sup>-1</sup> ]
1	0	21882,95	101,92
2	2	21947,28	102,22
3	5	22495,80	104,78
4	6	22329,74	104,00
5	8	18588,03	86,55
6	10	17374,28	80,89
7	12	16617,75	77,36
8	14	15160,19	70,56
9	21	5822,11	27,00

**Tabulka 9** - Závislost koncentrace ethanolu na ploše píku a čase pro kultivaci *S. cerevisiae*

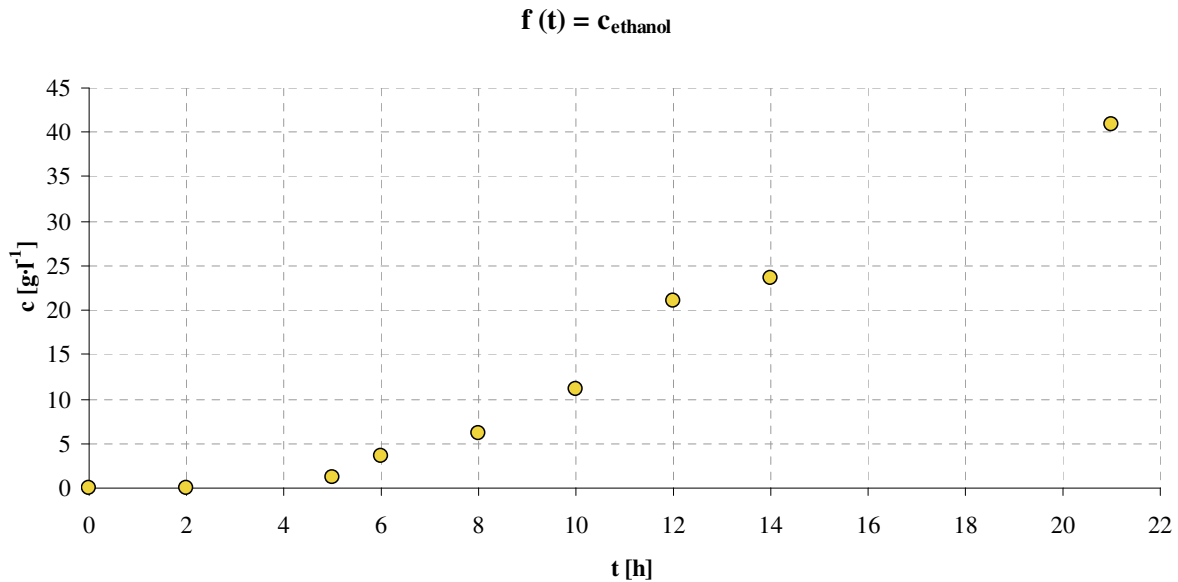
vzorek	t [h]	plocha píku [mV·s]	c [g·l <sup>-1</sup> ]
1	0	0,00	0,00
2	2	0,00	0,00
3	5	104,72	1,13
4	6	296,12	3,61
5	8	487,78	6,09
6	10	875,25	11,11
7	12	1647,83	21,11
8	14	1836,04	23,54
9	21	3170,68	40,82

**Graf 10** - Spotřeba glukosy při kultivaci *Saccharomyces cerevisiae* (závislost koncentrace glukosy na čase)

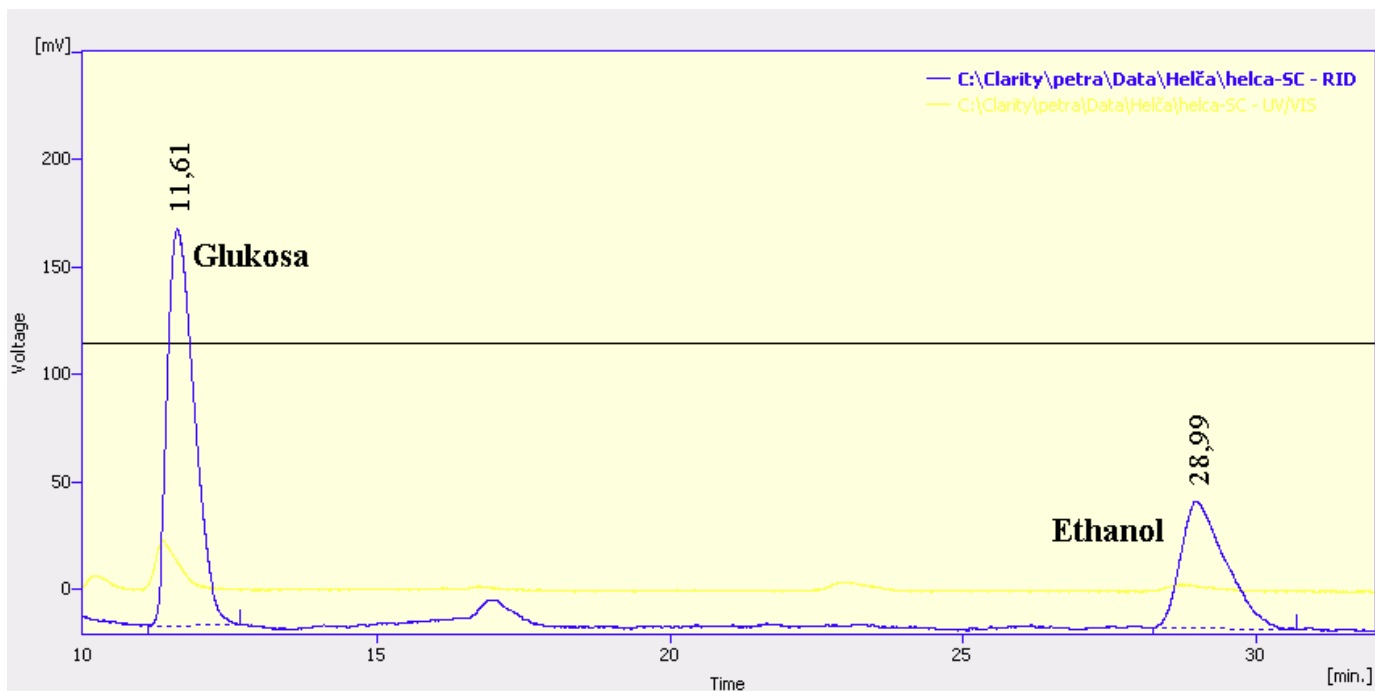


Z grafu spotřeby glukosy je patrné, že koncentrace glukosy v průběhu kultivace *S. cerevisiae* klesala s časem. To dokazuje teoretické znalosti o tom, že glukosa slouží jako zdroj uhlíku pro růst a dále vlivem metabolických drah vzniká jako produkt ethanol.

**Graf 11** - Produkce ethanolu při kultivaci *Saccharomyces cerevisiae* (závislost koncentrace ethanolu na čase)



Zde lze usuzovat, že kvasinky *S. cerevisiae* začaly produkovat ethanol mezi 2. až 5. hodinou, což by i odpovídalo začátku exponenciální fáze růstu zjištěné z růstových křivek. Koncentrace ethanolu s časem stoupala. Koncentrace v 21. hodině se dostala na 40,82 g·l<sup>-1</sup> ethanolu, což lze považovat za dobrou výtěžnost. Pokles glukosy je však na předešlém grafu zřejmý až po 6. hodině, ale měl by být už u 5. hodiny. Tato skutečnost je zřejmě způsobená špatným označením píku. Plocha je relativně velká a každé odchytky u označení mají vliv také na vypočtenou koncentraci.



Obrázek 14 - Chromatogram odběru ve 21. hodině pro *S. cerevisiae*

### 3.2.3 Spotřeba glukosy a produkce kyseliny mléčné - kultivace *L. casei*

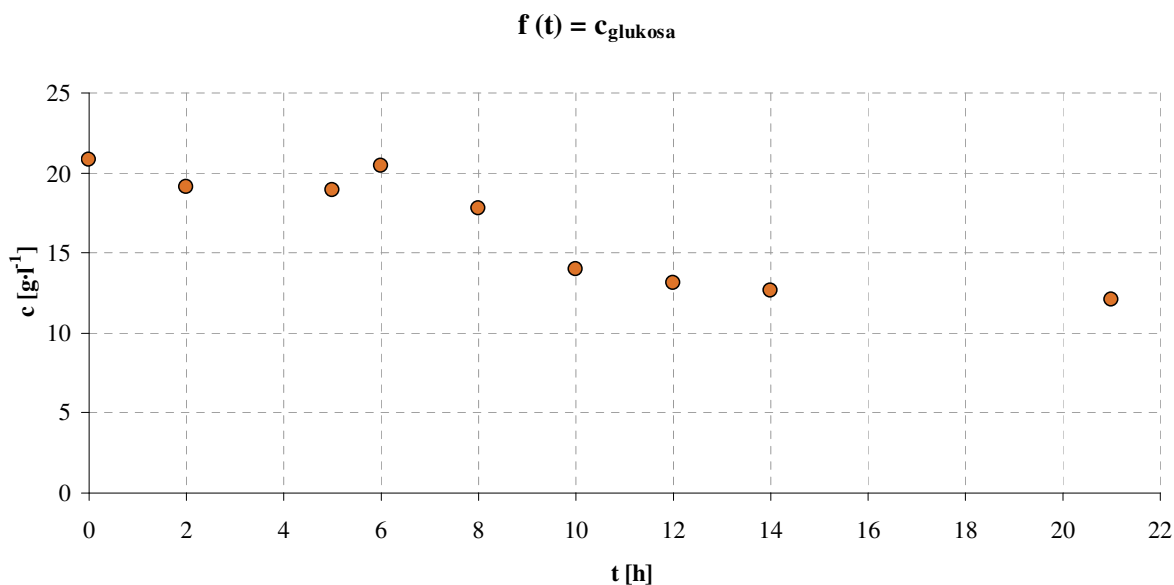
Tabulka 10 - Závislost koncentrace glukosy na ploše píku a čase pro kultivaci *L. casei*

vzorek	t [h]	plocha píku [mV·s]	c [g·l <sup>-1</sup> ]
1	0	11212,46	20,86
2	2	10285,33	19,13
3	5	10192,28	18,95
4	6	11002,36	20,47
5	8	9565,70	17,78
6	10	7504,18	13,94
7	12	7085,19	13,16
8	14	6817,33	12,66
9	21	6512,07	12,09

Tabulka 11- Závislost koncentrace kyseliny mléčné na ploše píku a čase pro kultivaci *L. casei*

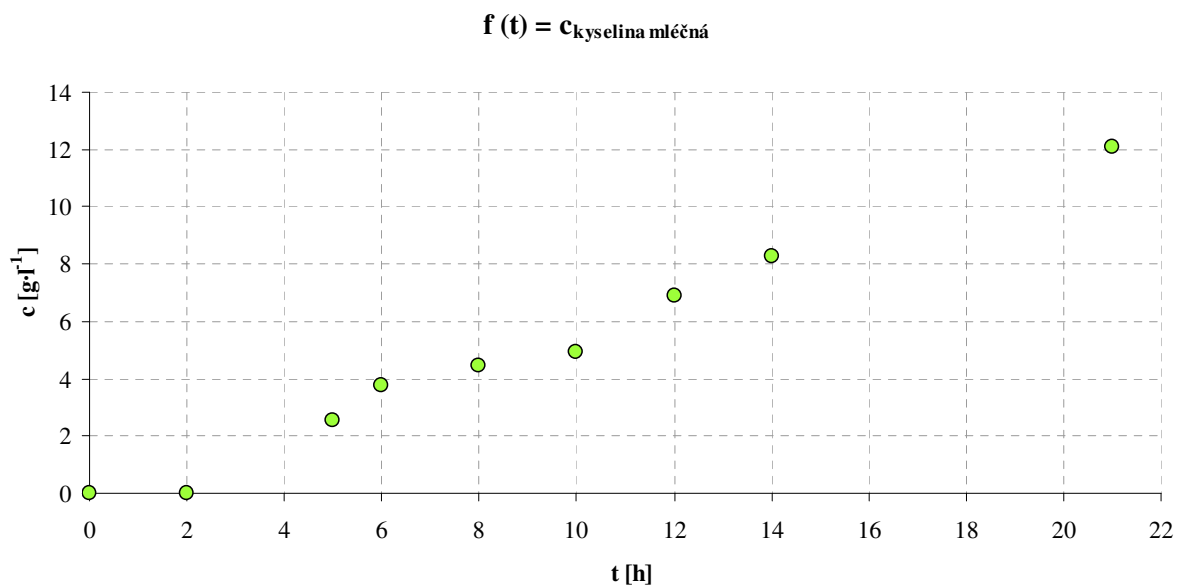
vzorek	t [h]	plocha píku [mV·s]	c [g·l <sup>-1</sup> ]
1	0	0,00	0,00
2	2	0,00	0,00
3	5	338,13	2,53
4	6	531,99	3,77
5	8	636,63	4,44
6	10	711,87	4,93
7	12	1021,93	6,91
8	14	1236,70	8,29
9	21	1831,18	12,10

**Graf 12** - Spotřeba glukosy při kultivaci *Lactobacillus casei* (závislost koncentrace glukosy na čase)

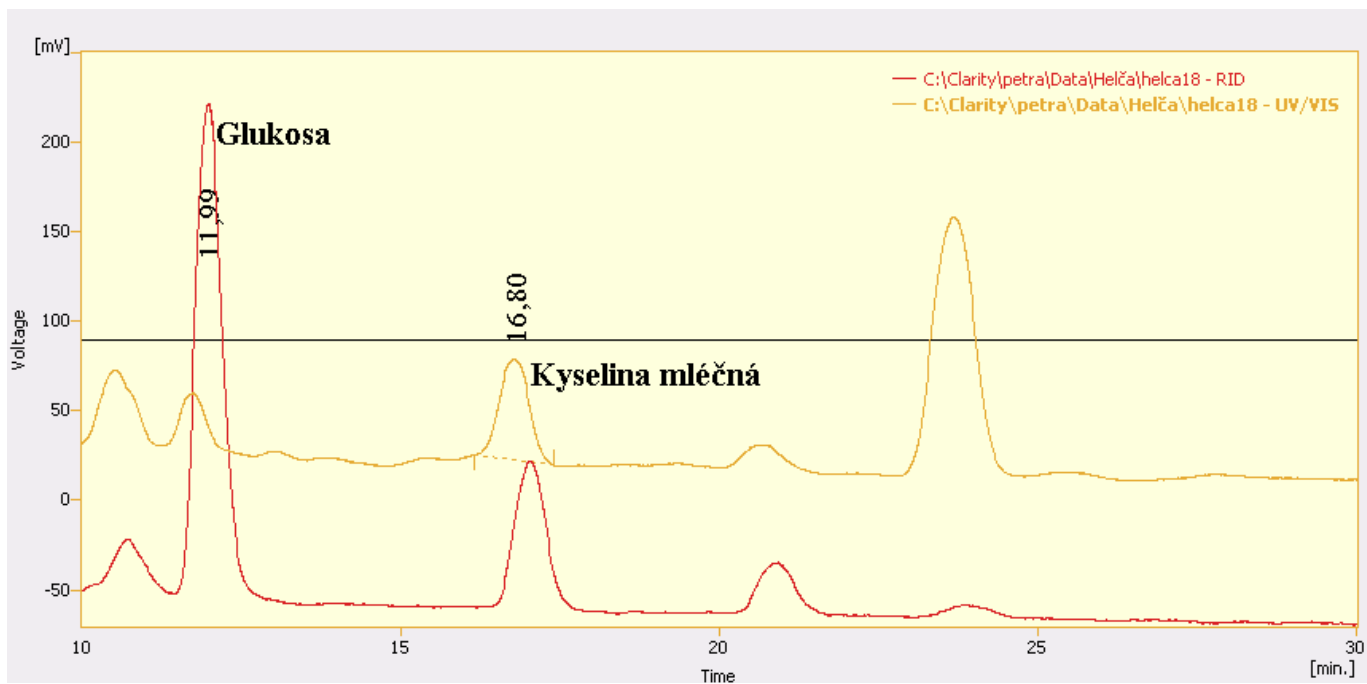


Z grafu spotřeby glukosy je patrné, že koncentrace glukosy v průběhu kultivace *L. casei* klesala s časem. To dokazuje teoretické znalosti o tom, že glukosa slouží jako zdroj uhlíku pro růst a dále vlivem metabolických drah vzniká jako hlavní produkt kyselina mléčná.

**Graf 13** - Produkce kyseliny mléčné při kultivaci *Lactobacillus casei* (závislost koncentrace kyseliny mléčné na čase)



Zde lze usuzovat, že bakterie *L. casei* začaly produkovat kyselinu mléčnou mezi 2. až 5. hodinou, což by i odpovídalo začátku exponenciální fáze růstu zjištěné z růstových křivek vzhledem k tomu, že se jedná o primární metabolit. Koncentrace kyseliny mléčné s časem stoupala. Koncentrace v 21. hodině se dostala na 12,1 g·l<sup>-1</sup> kyseliny mléčné.



Obrázek 15 - Chromatogram odběru ve 21. hodině pro *L. casei*

## ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo sledování růstových a metabolických vlastností vybraných mikroorganismů, a to konkrétně kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a bakterií *Lactobacillus casei*. Byla provedena kultivace daných mikroorganismů za optimálních podmínek a poté sestrojeny růstové křivky.

Růstové křivky byly sestrojeny z měření optické hustoty a hmotnosti sušiny, z čehož vznikly závislosti absorbance při 600 nm a koncentrace sušiny na čase. Byly sestrojeny i grafy porovnávající obě tyto metody pro sestrojení růstových křivek.

Růstové křivky získané kultivací *S. cerevisiae* byly sigmoidního tvaru. Bylo možno z nich vyčíst, že exponenciální fáze začala pravděpodobně od 2. hodiny měření. Dále bylo možno usoudit, že na počátku měření ještě probíhala Lag-fáze. Konec exponenciální fáze byl podle všeho mezi 21. a 23. hodinou. Maximální hodnota optické hustoty, které bylo dosaženo, činila 5,76 a maximální koncentrace sušiny byla 2,22 g·l<sup>-1</sup>.

Také v průběhu kultivace *L. casei* byly získány růstové křivky sigmoidního tvaru. Začátek exponenciální fáze byl zjištěn již po 1. hodině kultivace a konec ve 13. hodině. Ve srovnání se *S. cerevisiae* trvala exponenciální fáze kratší dobu. Výtěžek biomasy je menší. Optická hustota dosahovala maximální hodnoty 2,40 a koncentrace sušiny hodnoty 0,56 g·l<sup>-1</sup>. Vliv na nižší výtěžek má jistě i velikost buněk.

Srovnáním metod užitých pro stanovení růstových křivek bylo zjištěno, že se průběhy růstových křivek získaných oběma metodami příliš nelišily. Dále bylo zjištěno, že metoda měření optické hustoty pro stanovení růstové křivky je přesnější než metoda stanovením hmotnosti sušiny.

Dále bylo analýzou na HPLC zjištěn obsah glukosy a hlavního metabolitu vybraných mikroorganismů během kultivace, tedy u *Lactobacillus casei* obsah kyseliny mléčné a u *Saccharomyces cerevisiae* obsah ethanolu. Nejprve byly sestrojeny kalibrační křivky ze standardů, poté byla zjištěna podle retenčního času píku daná látka a podle plochy píku byla vypočtena její koncentrace ve vzorku.

Byly sestaveny grafy pro spotřebu glukosy a produkci ethanolu z hodnot získaných ze vzorků odebraných během kultivace *S. cerevisiae* analýzou na HPLC. Bylo zjištěno, že koncentrace glukosy v průběhu kultivace klesala s časem, konkrétně z hodnoty 101,92 g·l<sup>-1</sup> na hodnotu 27,00 g·l<sup>-1</sup>. Během kultivace bylo celkem spotřebováno 74,92 g·l<sup>-1</sup> glukosy. Dále bylo zjištěno, že kvasinky *S. cerevisiae* začaly produkovat ethanol mezi 2. až 5. hodinou, což by i odpovídalo začátku exponenciální fáze růstu zjištěné z růstových křivek. Koncentrace ethanolu s časem stoupala a v 21. hodině se dostala na hodnotu 40,82 g·l<sup>-1</sup> ethanolu.

Ze vzorků odebraných během kultivace *L. casei* byla pomocí metody HPLC sledována spotřeba glukosy a produkce kyseliny mléčné. Také tyto data byly vyneseny do grafů jako závislost spotřeby (produkce) na čase. Koncentrace glukosy v průběhu kultivace klesla z hodnoty 20,86 g·l<sup>-1</sup> na hodnotu 12,09 g·l<sup>-1</sup> a graf měl klesající tendenci. Bakterie během kultivace spotřebovaly celkem 8,77 g·l<sup>-1</sup> glukosy. Průběh produkce kyseliny mléčné bakterií *L. casei* odpovídal jednotlivým fázím růstu zjištěným z růstových křivek. Začátek produkce je možno pozorovat mezi 2. až 5. hodinou, což odpovídá začátku exponenciální fáze růstu. Průběh křivky má rostoucí charakter a v 21. hodině dosahovala koncentrace kyseliny mléčné hodnoty 12,1 g·l<sup>-1</sup>.

Z měření vyplynulo, že daná média byla optimální pro růst a produkci metabolitů, což lze usuzovat z koncentrací kyseliny mléčné a ethanolu v posledních vzorcích. Z růstových křivek bylo možno určit průběh exponenciální fáze a z toho odvodit dobu, po kterou mikroorganismy produkovaly.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *Úloha č. 7: Růst mikroorganismů a jeho sledování*. 2005-2012. Dostupné z: [uiozp.ft.utb.cz/studmat/2008912145649/Úloha7.doc](http://uiozp.ft.utb.cz/studmat/2008912145649/Úloha7.doc)
- [2] VŠCHT [online]. 2003 [cit. 2012-04-11]. Tradiční technologie – sylabus k předmětu. Dostupné z : [http://eso.vscht.cz/cache\\_data/1171/www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/tradtech.pdf](http://eso.vscht.cz/cache_data/1171/www.vscht.cz/kch/kestazeni/sylaby/tradtech.pdf).
- [3] ROSYPAL, S. *Obecná bakteriologie*. 1. vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1981. 749 s.
- [4] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Praha : Academia, 2002. 3. oprav. a dopl. vyd., 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [5] AMBROŽOVÁ, Jana. *Mikrobiologie v technologii vod*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2004, 244 s. ISBN 80-708-0534-X.
- [6] SHAOFENG, Ding; TIANWEI, Tan. L-lactic acid production by *Lactobacillus casei* fermentation using different fed-batch feeding strategies. *Process Biochemistry* [online]. 2006, 41, [cit. 2012-01-29]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511306000201>
- [7] VESELÁ, Mária. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2004. 99 s. ISBN 80-214-2567-9.
- [8] KLABAN, Vladimír. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. 1. vyd. Praha: Galén, 2005. ISBN 80-7262-341-9.
- [9] HOFVENDAHL, Karin, HAHN-HÄGERDAL, Bärbel. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2000, roč. 26, č. 2-4 [cit. 2012-01-20], s. 87-107. Dostupný z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TG1-3YMW4HK1/2/7df455f8d2fa8727bf0cafea20177ed5>
- [10] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie*. 2. opravené vydání. Praha: Academia, 2002. 508 s. ISBN 978-80-200-0600-4.
- [11] KODÍČEK, M. kyselina mléčná. *Biochemické pojmy: výkladový slovník* [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [cit. 2012-02-08]. Dostupné z: [http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid\\_es-002/ebook.html?p=kyselina\\_mlecna](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=kyselina_mlecna)
- [12] NARAYANAN, Niju; ROYCHOUDHURY, Pradip; SRIVASTAVA, Aradhana. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology* [online]. 2004, č. 2, [cit. 2012-03-30]. Dostupné z:

<http://ejbiotechnology.info/content/vol7/issue2/full/7/>

- [13] VACÍK, Jiří. *Přehled středoškolské chemie*. 2. vyd. Praha: SPN, 1999, 365 s. ISBN 80-7235-108-7. 80-7235-108-7
- [14] MCMURRY, John. *Organická chemie*. Vyd. 1. VUTIUM: VŠCHT, 2007, 1176 s. ISBN 978-80-214-3291-8 (VUT V BRNĚ).
- [15] KAŠTÁNEK, František. *Bioinženýrství*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2001, 334 s. ISBN 80-200-0768-7.
- [16] PRÍBELA, A. *Analýza potravin*. 2. vyd. Bratislava: STU, 1991. 394 s. ISBN 80-227-0398-2.
- [17] ŠTERN, P. Současné možnosti turbidimetrie a nefelometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2006, roč. 14, č. 3 [cit. 2012-03-05], s. 146-151. Dostupné z: <http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0603-146.pdf>
- [18] Měření složení: Turbidimetry a nefelometry. In: *VŠCHT: Ústav počítačové a řídicí techniky* [online]. 2005 [cit. 2012-03-11]. Dostupné z: <http://uprt.vscht.cz/kminekm/mrt/F4/F4k46-sloz.htm>
- [19] SOMMER, Lumír et al. *Základy analytické chemie II*. 1. vyd. Brno: VUTIUM, 2000, 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [20] TISSUE, Brian. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). In: *Chemistry Hypermedia Project* [online]. 2000 [cit. 2012-04-04]. Dostupné z: <http://www.files.chem.vt.edu/chem-ed/sep/lc/hplc.html>
- [21] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007, 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [22] HOLZAPFEL, W.H., HABERER, P., GEISEN, R., BJORKROTH, J. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American journal of clinical nutrition* [online]. 2001, roč. 73, č. 2 [cit. 2012-03-23]. ISSN 1938-3207. Dostupné z: <http://www.ajcn.org/content/73/2/365S.full>
- [23] CAI, H., B. T. RODRIGUEZ, W. ZHANG, J. R. BROADBENT a J. L. STEELE. Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus casei* strains isolated from different ecological niches suggests frequent recombination and niche specificity. *Microbiology* [online]. 2007, roč. 153, č. 8 [cit. 2012-03-23]. Dostupné z: <http://mic.sgmjournals.org/cgi/doi/10.1099/mic.0.2007/006452-0>
- [24] MISHRA, V a D PRASAD. Application of in vitro methods for selection of strains as potential probiotics. *International journal of food microbiology* [online]. 2005, roč. 103, č. 1 [cit. 2012-03-23]. Dostupné z:

- <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168160504005379>
- [25] HA, Mi-Young, Si-Wouk KIM, Yong-Woon LEE, Myong-Jun KIM a Seong-Jun KIM. Kinetics analysis of growth and lactic acid production in pH-controlled batch cultures of *Lactobacillus casei* KH-1 using yeast extract/corn steep liquor/glucose medium. *Journal of bioscience and bioengineering* [online]. 2003, roč. 96, č. 2 [cit. 2012-03-23]. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172303901150>
- [26] Galerie mikroorganismů. VŠCHT. *Bakterie* [online]. 2003 [cit. 2012-03-23]. Dostupné z: [http://eso.vscht.cz/cache\\_data/1154/www.vscht.cz/kch/galerie/kvasinky.htm](http://eso.vscht.cz/cache_data/1154/www.vscht.cz/kch/galerie/kvasinky.htm)
- [27] VOLFOVÁ. Oddělení: Vřeckovýtrusné houby, vřeckaté houby, askomycety. In: *Západočeská univerzita v Plzni* [online]. Pedagogická fakulta, katedra biologie, 2011 [cit. 2012-03-09]. Dostupné z: <http://www.kbi.zcu.cz/studium/bot1/asco.htm>
- [28] Galerie mikroorganismů. VŠCHT. *Kvasinky* [online]. 2003 [cit. 2012-03-23]. Dostupné z: [http://eso.vscht.cz/cache\\_data/1154/www.vscht.cz/kch/galerie/kvasinky.htm](http://eso.vscht.cz/cache_data/1154/www.vscht.cz/kch/galerie/kvasinky.htm)

## POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY

ATP	adenosintrifosfát
NAD, NADH, NAD <sup>+</sup>	nikotinamid adenin dinukleotid
GRAS	obecně považované za bezpečné
PFL	pyruvátformiát lyasa
PDH	pyruvát dehydrogenasy
D izomer	pravotočivý izomer
L izomer	levotočivý izomer
$x_0$	počet buněk na počátku exponenciální fáze
$x$	koncentrace buněk
$t$	doba, čas
$\mu$	měrná růstová rychlost
$\mu_{max}$	maximální specifická růstová rychlost
$K_s$	je saturační konstanta.
G	Celkový nárůst
K	výtěžková konstanta
$I_t$	intenzita prošlého záření
$I_0$	intenzita světelného zdroje
$\tau$	turbiditní koeficient
L	světelná dráha kyvetou
HBs antigen	povrchový antigen proti žloutence typu B
$c [g \cdot l^{-1}]$	koncentrace
HPLC	high performance liquid chromatography (vysokoúčinná kapalinová chromatografie)
OD	optical density (optická hustota)
UV/VIS	spektrofotometrický detektor v oblasti ultrafialového záření a viditelného světla
RID	Refractive Index Detector (refraktometrický detektor)
MRS	Man Rogosa Sharpe medium
<i>L.casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L.</i>	<i>Lactobacillus</i>

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Glykolytická dráha [5] .....	9
Obrázek 2 - Katabolické dráhy bakterií mléčného kvašení [9] .....	11
Obrázek 3 - Stereoizomery kyseliny mléčné [12] .....	12
Obrázek 4 - Růstová křivka [4] .....	15
Obrázek 5 - Grafické znázornění růstu buněk v exponenciální fázi [4] .....	17
Obrázek 6 - Schématické znázornění turbidimetrie a nefelometrie [18] .....	18
Obrázek 7 - Schéma vysokotlaké kapalinové chromatografie [20] .....	20
Obrázek 8 - Taxonomické zařazení rodu <i>Lactobacillus</i> [21] .....	20
Obrázek 9 - Mikroskopický obraz buněk <i>Lactobacillus casei</i> [26] .....	22
Obrázek 10 - Taxonomické zařazení rodu <i>Saccharomyces</i> [27] .....	23
Obrázek 11 - Mikroskopický obraz buněk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> [28] .....	24
Obrázek 12 - Cell density meter biowave WPA CO 8000 .....	25
Obrázek 13 - Vysokoúčinný kapalinový chromatograf s automatickým dávkovačem .....	27
Obrázek 14 - Chromatogram odběru ve 21. hodině pro <i>S. cerevisiae</i> .....	38
Obrázek 15 - Chromatogram odběru ve 21. hodině pro <i>L. casei</i> .....	40

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Závislost optické hustoty (OD) na čase během kultivace pro <i>S. cerevisiae</i> .....	29
Tabulka 2 - Závislost koncentrace biomasy na čase pro <i>S. cerevisiae</i> .....	29
Tabulka 3 - Závislost optické hustoty (OD) na čase během kultivace pro <i>L. casei</i> .....	31
Tabulka 4 - Závislost koncentrace biomasy na čase pro <i>L. casei</i> .....	31
Tabulka 5 - Závislost koncentrace glukosy na ploše píku .....	33
Tabulka 6 - Závislost koncentrace ethanolu na ploše píku .....	34
Tabulka 7 - Závislost koncentrace kyseliny mléčné na ploše píku .....	34
Tabulka 8 - Závislost koncentrace glukosy na ploše píku a čase pro kultivaci <i>S. cerevisiae</i> .....	36
Tabulka 9 - Závislost koncentrace ethanolu na ploše píku a čase pro kultivaci <i>S. cerevisiae</i> .....	36
Tabulka 10 - Závislost koncentrace glukosy na ploše píku a čase pro kultivaci <i>L. casei</i> ....	38
Tabulka 11 - Závislost koncentrace kyseliny mléčné na ploše píku a čase pro kultivaci <i>L. casei</i> .....	38

## SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 - Růstová křivka kultivace <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (závislost optické hustoty na čase).....	30
Graf 2 - Růstová křivka kultivace <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (závislost koncentrace biomasy na čase).....	30
Graf 3 - Porovnání růstových křivek <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (závislost optické hustoty a koncentrace biomasy na čase).....	31
Graf 4 - Růstová křivka kultivace <i>Lactobacillus casei</i> (závislost optické hustoty na čase) ....	32
Graf 5 - Růstová křivka kultivace <i>Lactobacillus casei</i> (závislost koncentrace biomasy na čase).....	32
Graf 6 - Porovnání růstových křivek <i>Lactobacillus casei</i> (závislost optické hustoty a koncentrace biomasy na čase).....	33
Graf 7 - Kalibrační křivka glukosy (závislost koncentrace glukosy na ploše píku) .....	34
Graf 8 - Kalibrační křivka ethanolu (závislost koncentrace ethanolu na ploše píku) .....	35
Graf 9 - Kalibrační křivka kyseliny mléčné (závislost koncentrace kyseliny mléčné na ploše píku) .....	35
Graf 10 - Spotřeba glukosy při kultivaci <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (závislost koncentrace glukosy na čase).....	36
Graf 11 - Produkce ethanolu při kultivaci <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (závislost koncentrace ethanolu na čase).....	37
Graf 12 - Spotřeba glukosy při kultivaci <i>Lactobacillus casei</i> (závislost koncentrace glukosy na čase).....	39
Graf 13 - Produkce kyseliny mléčné při kultivaci <i>Lactobacillus casei</i> (závislost koncentrace kyseliny mléčné na čase) .....	39