



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

**MATEMATICKÉ MODELOVÁNÍ RŮSTU
MIKROORGANISMŮ**

MATHEMATIC MODELING OF MICROORGANISMS GROWTH

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Viktória Kecskéssová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D., MBA

BRNO 2016



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK1016/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Viktória Kecskéssová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí práce	Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D., MBA	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Matematické modelování růstu mikroorganismů

Zadání bakalářské práce:

- 1) rešerše literatury na téma práce,
- 2) výběr mikrobiálních kmenů a vhodných modelů,
- 3) nastudování kultivačních technik a provedení kultivací,
- 4) analýza biomasy a stanovení růstových křivek,
- 5) optimalizace a identifikace modelů,
- 6) diskuse, závěr.

Termín odevzdání bakalářské práce: 20.5.2016

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Viktória Kecskéssová
Student(ka)

Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D., MBA
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Cílem bakalářské práce bylo matematické modelování růstu mikroorganismů, konkrétně druhu *Lactobacillus casei* CCM 4798. Mikroorganismus byl kultivován v Erlenmeyerových baňkách technikou vsádkové kultivace. Živné média byly složené z doporučených chemikálií pro růst laktobacilů, s různou koncentrací použitého substrátu. Následně byly stanoveny růstové křivky dvěma způsoby, jako závislost optické hustoty na čase a koncentrace sušiny biomasy na čase. Byly vybrány tři vhodné modely, a to model exponenciálního růstu, Monodův model a Tessierův model. Dále byla pomocí programu MATLAB, aplikace Curve Fitting toolbox a matematických modelů modelována exponenciální fáze růstových křivek. Dle statistiky v programu MATLAB bylo zjištěno, že nejlepší proložení dat nám umožnil model exponenciálního růstu.

ABSTRACT

The aim of Bachelor thesis was mathematical modeling of microbial growth, namely *Lactobacillus casei* CCM 4798. Microorganism was cultivated in Erlenmeyer flasks by technique batch cultivation. Used media were composed with recommended chemicals for the growth of lactobacilli and various concentrations of substrate. Subsequently, the growth curves were determined in two ways, as the dependence of optical density to time and the concentration of dry biomass per time. It were selected three suitable models, model of exponential growth, Monod model and Tessier model. Further, using MATLAB, application Curve Fitting Toolbox and mathematical models was modeled exponential phase of growth curves. According to statistics in MATLAB it was founded that the best fit was enabled of model of exponential growth.

KLÍČOVÁ SLOVA

Růstová křivka, *Lactobacillus casei*, matematický model, model exponenciálního růstu, Monod, Tessier, MATLAB

KEYWORDS

Growth curve, *Lactobacillus casei*, mathematic model, model of exponential growth, Monod, Tessier, MATLAB

KECSKÉSOVÁ, V. *Matematické modelování růstu mikroorganismů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 60 s. Vedoucí bakalářské práce: Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D., MBA.

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. Mgr. Liboru Babákovi, Ph.D., MBA, za vedení a odborné rady, a Ing. Heleně Hudečkové za pomoc s praktickou částí v laboratoři.

OBSAH

Obsah.....	5
Úvod	7
1 Teoretická část.....	8
1.1 Kultivace.....	8
1.2 Fermentace.....	10
1.2.1 Mléčná fermentace.....	12
1.2.2 Ethanolová fermentace.....	13
1.3 Bioinženýrské charakteristiky.....	14
1.3.1 Růstová křivka	14
1.3.2 Mikrobiální kinetika.....	17
1.4 Matematický model.....	19
1.5 Kinetické modely	21
1.5.1 Model exponenciálního růstu.....	21
1.5.2 Monodův model	21
1.5.3 Tessierův model	23
1.6 Rod <i>Lactobacillus</i>	23
1.6.1 Charakteristika rodu <i>Lactobacillus</i>	23
1.6.2 Druh <i>Lactobacillus casei</i>	24
1.7 Analytické metody	25
1.7.1 Turbidimetrie	25
1.7.2 Stanovení sušiny bakteriální biomasy.....	26
1.8 MATLAB	26
1.8.1 Charakteristika programu.....	26
1.8.2 Curve Fitting Toolbox™	28
1.8.3 Goodness of fit (Statistika)	28
2 Experimentální část.....	31
2.1 Cíl práce	31
2.2 Použité přístroje a chemikálie	31
2.2.1 Přístroje a pomůcky	31
2.2.2 Chemikálie použité k přípravě médií	31
2.3 Kultivace, příprava médií a použité substráty.....	32
2.3.1 Použité substráty	32

2.3.2 Příprava kultivačních médií	32
2.3.3 Kultivace <i>Lactobacillus casei</i>	32
2.4 Metody měření	33
2.4.1 Turbidimetrické stanovení růstové křivky	33
2.4.2 Vážkové stanovení růstové křivky	33
2.5 Zpracování výsledků v MATLABu	33
2.5.1 Výpočty hodnot parametrů v modelech	33
2.5.2 Statistické zpracování výsledků	34
3 Výsledky a diskuze	35
3.1 Růstové křivky	35
3.1.1 Zdroj uhlíku: glukóza.....	35
3.1.2 Zdroj uhlíku: xylóza.....	38
3.1.3 Zdroj uhlíku: laktóza.....	41
3.2 Identifikace modelů	44
3.2.1 Model exponenciálního růstu.....	44
3.2.2 Monodův model	46
3.2.3 Tessierův model	48
3.3 Statistické porovnání modelů	51
4 Závěr.....	53
Seznam použité literatury.....	54
Použité zkratky a symboly.....	57
Seznam obrázků	58
Seznam tabulek.....	59
Seznam grafů	60

ÚVOD

Matematické modelování je v dnešní době často využíváno, avšak nebylo tomu tak i v minulosti. Toto odvětví matematiky se stále rozvíjí a ovlivňuje ho zejména vývoj a zdokonalování výpočetní techniky (IT), která tento proces ulehčuje a poskytuje nám přesnější výsledky s možností vizualizace.

Matematické modely se využívají v mnoha oborech přírodních, technických, ekonomických i sociálních věd. Umožňuje nám matematicky proniknout do podstaty problému a získat potřebné a užitečné informace o zkoumaném problému. Matematické modelování se stalo důležitou součástí při modelování a simulacích systémů, analýzách a předpovídání procesů, chování druhů nebo stavů společenstev. Modelování se může uplatnit od zkoumání mikrosvětů po systémy velkých rozměrů, jako jsou zemětřesení nebo tvoření hvězdných mlhovin, ale nachází uplatnění i v sociálních výzkumech včetně jevů poznání a psychiky.

Mikrobiální procesy se popisují matematickým modelem velmi obtížně, protože se jedná o živý systém a je nemožné do modelu zahrnout všechny vlivy působící na procesy. V praxi často stačí, když matematický model vystihuje důležité vlastnosti a podstatné charakteristiky procesu. Takový matematický model je pro studium vlivů, k predikci průběhu procesu a pro analýzu užitečný.

Navzdory tomu, že růst mikroorganismů je složitý proces, lze jej celkem dobře popsat relativně jednoduchými modely. Kinetické modely zahrnují nejběžněji používané matematické modely využíváno pro modelování růstu mikroorganismů. Obsahují matematický popis chování pozorovaného systému a jsou reprezentovány souborem empiricky odvozených zákonů.

Pro modelování růstu mikroorganismů se hojně využívá nestrukturovaných kinetických modelů, které původně byly navrženy jenom k predikci specifické růstové rychlosti, která patří mezi hlavní parametry růstu mikroorganismů.

Mezi důležité charakteristiky růstu mikroorganismů se kromě specifické růstové rychlosti zařazuje i generační doba, celkový nárůst a růstová křivka. Růstová křivka se skládá z několika fází, přičemž pro modelování růstu se používá fáze exponenciálního růstu, která je charakteristická po celý čas nejvyšší a konstantní specifickou růstovou rychlostí.

Cílem této práce bude matematické modelování růstu mikroorganismu *Lactobacillus casei*, optimalizace parametrů matematických modelů a určení modelu, který růst mikroorganismu popisuje co nejpřesněji.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Kultivace

Kultivace je proces pěstování mikroorganismů při vhodných podmínkách. Procesu předchází naočkování mikroorganismů na živné médium. Očkování nebo inokulace znamená přenos mikroorganismů daného druhu (čistě kultury) z prostředí, v kterém se udržovaly, do sterilního kultivačního média. [1], [2]

Kultivační neboli živné média jsou zdrojem energie a živin potřebných pro růst mikroorganismů. Kultivace mohou probíhat v tekutém a na pevném kultivačním médiu, přičemž tekuté je složeno se směsí živin rozpuštěných v kapalině (např. ve vodě) a pevné je obohacený agarový gel o potřebné živiny. Při použití tekutého média se růst mikroorganismů projevuje zákalem, u pevných médií pozorujeme narostlé kolonie. [1], [2]

Hlavní faktory ovlivňující růst a rozmnožování mikroorganismů jsou teplota vnějšího prostředí, přístup kyslíku a dostupnost živin. Podle přítomnosti kyslíku při růstu mikroorganismů kultivace rozdělujeme na *aerobní* a *anaerobní*. Aerobní kultivace probíhá v přítomnosti kyslíku a anaerobní bez přístupu kyslíku. [1], [2]

Kultivační techniky rozdělujeme:

1) Povrchová technika:

Tato technika umožňuje pěstovat mikroorganismy na povrchu živného média (kapalného nebo pevného). Povrchová kultivace probíhá v klidu, což znamená, že obsah kultivační nádoby není promícháván nebo pozměňován v průběhu růstu mikroorganismů. Způsob kultivace je komplikovaný a pro průmyslové účely se často nepoužívá. Užívá se například při výrobě některých enzymů. [1], [2]

2) Submersní technika:

Mikroorganismy jsou kultivovány v kapalném médiu za stálého míchání. Mícháním se zajišťuje homogenita obsahu reaktoru nebo kultivační nádoby, a také se zlepšuje transport živin k mikroorganismu. [1], [2]

Aerobní mikroorganismy potřebují k růstu a rozmnožování kyslík, jehož přístup se zajišťuje aerací (provzdušňováním). Rozpustnost kyslíku ve vodě je nízká. Intenzivní provzdušňování se zajišťuje vhněním stlačeného vzduchu u dna a jeho rozptýlením ve formě malých bublin v celém objemu živného média. [2]

Submersní kultivační technika je využívána pro průmyslové velkoobjemové procesy, jako jsou výroba biomasy a bílkovin, fermentační výroby, produkce antibiotik, zpracování odpadů atd. Techniku lze realizovat *vsádkovou (A)*, *přítokovou (B)* nebo *kontinuální (C)* kultivací. [2]

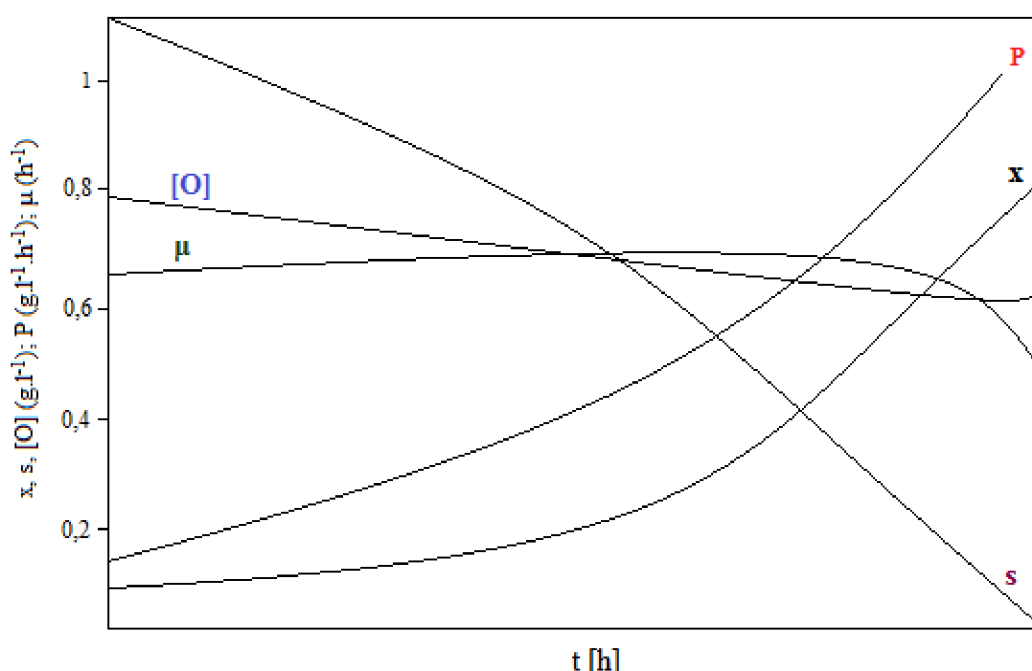
A) Vsádková (batch) kultivace:

Probíhá v uzavřeném systému, do kterého se v průběhu kultivace nezasahuje, a tedy objem vsádky je konstantní. Mikroorganismus je naočkován do kultivační nádoby s živným médiem a během růstu a rozmnožování jsou vyčerpány dostupné živiny. Podmínky kultivace se tedy mění v jejím průběhu. Mikroorganismus produkuje zplodiny metabolismu, které se hromadí

v kultivačním médiu a mohou působit na růst inhibičně. Po dosažení určitých parametrů nebo spotřebování substrátu se proces přeruší, vyrostlá a namnožená kultura se vypustí z kultivační nádoby a dále se zpracuje. [1], [2], [3]

Mezi výhody batch uspořádání patří snadno sterilizovatelné médium; nižší spotřeba média, jako při kontinuální nebo přítokové kultivaci; redukováno nebezpečí kontaminací a mutací; lze snadno měnit podmínky v jednotlivých vsádkách. [4]

Nevýhodou vsádkové kultivace jsou časové ztráty, které vznikají při provozu, neboť bioreaktor je nutné vyprázdnit, vyčistit a připravit novou vsádku. Další časové ztráty vznikají v důsledku adaptační fáze. Vsádková kultivace se využívá při výrobě antibiotik a dalších sekundárních metabolitů a aminokyselin. [2], [4]



Obrázek 1 - Koncentrační profily simulované vsádkové fermentace [4]

s – koncentrace substrátu ($g.l^{-1}$), x – koncentrace biomasy ($g.l^{-1}$), $[O]$ – koncentrace rozpuštěného kyslíku ($g.l^{-1}$), P – koncentrace produktu ($g.l^{-1}.h^{-1}$), μ – specifická růstová rychlost (h^{-1})

B) Přítoková (fed-batch) kultivace:

V průběhu fed-batch kultivace je do systému kontinuálně, diskontinuálně nebo podle optimalizovaného algoritmu přidávána jedna nebo více živin a produkt zůstává v bioreaktoru až do konce procesu kultivace. Přítok substrátu může být regulován přímo, měřením jeho koncentrace v bioreaktoru a uskutečnění příslušných zásahů v režimu nástřiku nebo může být regulován nepřímo, pomocí jiných parametrů jako je například pH. Objem bioreaktoru není konstantní, ale s časem se zvětšuje. Řízenou změnou koncentrace živin v bioreaktoru můžeme ovlivnit výtěžek nebo produktivitu žádaného metabolitu. [3], [4]

C) Kontinuální (průtoková) kultivace:

Je realizována jako otevřený systém, kde dochází k nepřetržitému dodávání živin formou kultivačního média a zároveň k plynulému odvádění pozmeněného média metabolickou činností mikroorganismů spolu s částí biomasy. Rychlost přítoku a odtoku z bioreaktoru je stejná, a tedy jeho objem je konstantní. Systém je stabilizován limitací jednoho základního substrátu a buňky rostou při konstantních podmínkách prostředí. [2], [3], [4]

Podle uspořádání rozlišujeme *homokontinuální* kultivaci, při které se v celém objemu v důsledku důkladného míchání nachází homogenní kultura, nebo *heterokontinuální* kultivaci, kde se nachází v objemu různé složení kultury. [2]

Výhody kontinuální kultivace spočívají hlavně v tom, že odpadají časové ztráty (čas na plnění, vyprazdňování bioreaktoru, jeho čištění a sterilizaci). Velkou výhodou je možnost automatizace procesu. Průtoková kultivace je využívána pro výroby, kdy žadaným produktem je samotný mikroorganismus (např. pekařské droždí), nebo metabolity, které se tvoří v průběhu růstu buněk (fermentační produkty). [2], [4]

1.2 Fermentace

Fermentace neboli kvašení je jedním ze základních typů energetického metabolismu mikroorganismů. Fermentace je definována jako metabolický proces uvolňující energii, ve kterém jsou organické sloučeniny donory elektronů a jiné organické sloučeniny jsou akceptory elektronů. Sloučeniny, které vystupují jako donory/akceptory jsou obvykle dva rozdílné metabolity vznikající ze zkvasitelného substrátu. Počátečními substráty mohou být sacharidy, jejich deriváty nebo produkty jejich metabolismu. Některé bakterie dokážou fermentovat i organické látky, jako jsou aminokyseliny, organické kyseliny, puriny a pyrimidiny. Kvašení probíhá za striktně anaerobních podmínek, tj. bez přístupu kyslíku. Při fermentaci dochází k využití pyruvátu z procesu glykolýzy, ale v některých případech se může využít i reakcí pentosového cyklu nebo Entner-Doudoroffovy cesty. [2], [5]

Glykolytickou dráhou se přeměňuje glukosa na pyruvát za současné tvorby dvou molekul ATP. Tvorba ATP má z energetického hlediska velký význam. Při fermentaci vznikají dvě molekuly ATP z jedné molekuly glukosy. ATP vzniká tak, že se na ADP přenesou fosforečnanové zbytky z fosforylovaných meziproductů, které vznikají v průběhu štěpení substrátu. Proces vzniku ATP při fermentaci nazýváme fosforylace na substrátové úrovni neboli substrátová fosforylace. Pro pokračování glykolýzy, je nutné regenerovat NAD^+ , který se redukoval na NADH. Za anaerobních podmínek se NAD^+ doplňuje redukčními reakcemi pyruvátu, které považujeme za pokračování glykolýzy. [7]

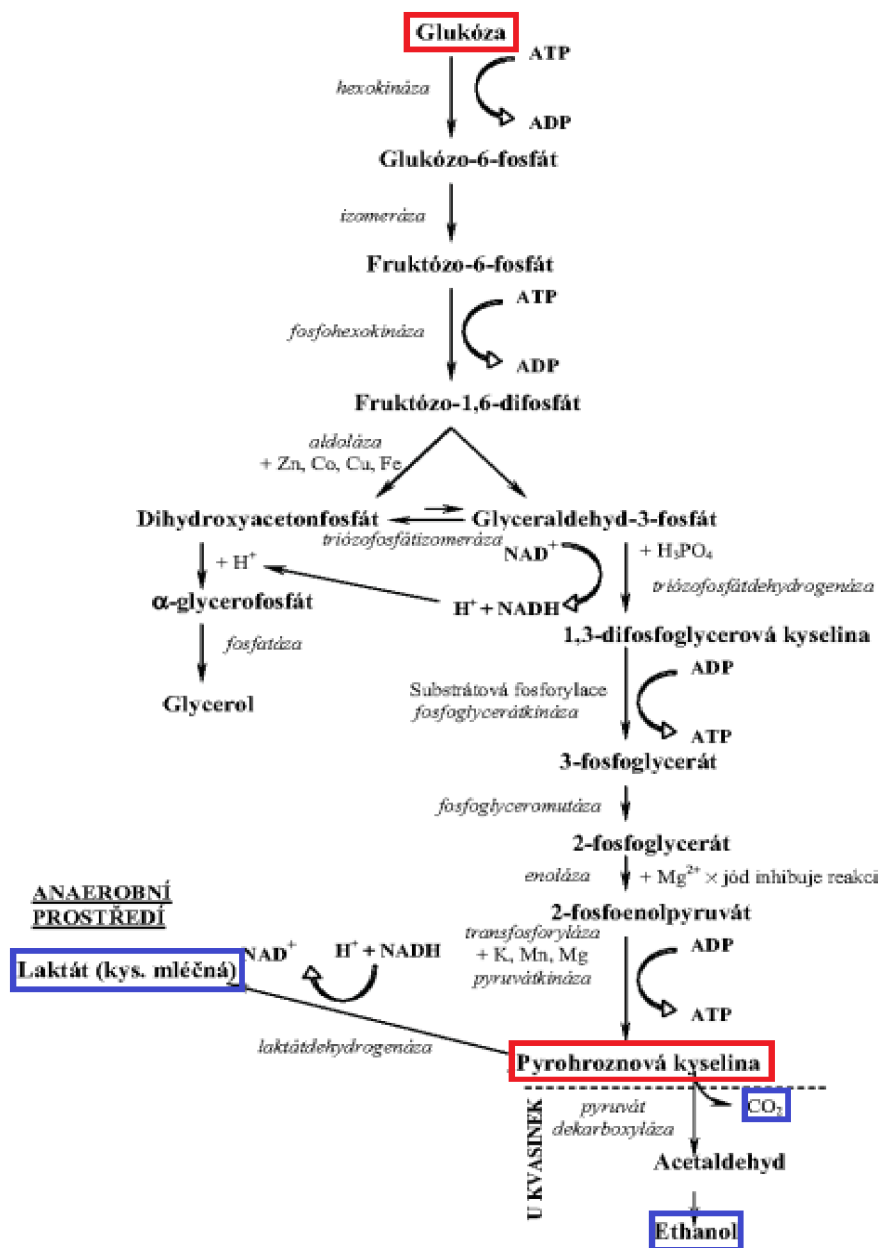
Kvašení se může uskutečňovat v buňkách všech organismů, avšak v průmyslu se využívají výhradně mikroorganismy. Skupiny fermentujících mikroorganismů, které se nejčastěji používají, jsou bakterie, kvasinky a plísně. [2], [5]

Fermentující mikroorganismy obsahují genetickou informaci pro přípravu specifických fermentačních produktů a nejsou schopny produkovat jiné. Dokážou kvašením přeměnit sacharidy na karboxylové kyseliny, alkoholy, ketony, oxid uhličitý a molekulový vodík. Mikroorganismy musí v průběhu fermentace produkovat enzym, který je schopný katalyzovat tyto reakce. Produkty fermentace daného mikroorganismu závisí na podmínkách,

jako jsou použitý substrát, počáteční pH a jeho změna v průběhu procesu nebo v některých případech i přítomnost anorganických iontů nebo organických růstových faktorů. [2]

Známe různé druhy fermentací, přičemž většinou nesou název podle hlavního nebo jedinečného produktu fermentace. Známe ethanolové, mléčné, smíšené kyselinotvorné, butandiolové, glycerolové aj. fermentace. [2], [5]

Za anaerobních probíhá degradace pyruvátu jako *alkoholové kvašení* nebo redukce pyruvátu na kyselinu mléčnou, tedy *mléčné kvašení*. [7]



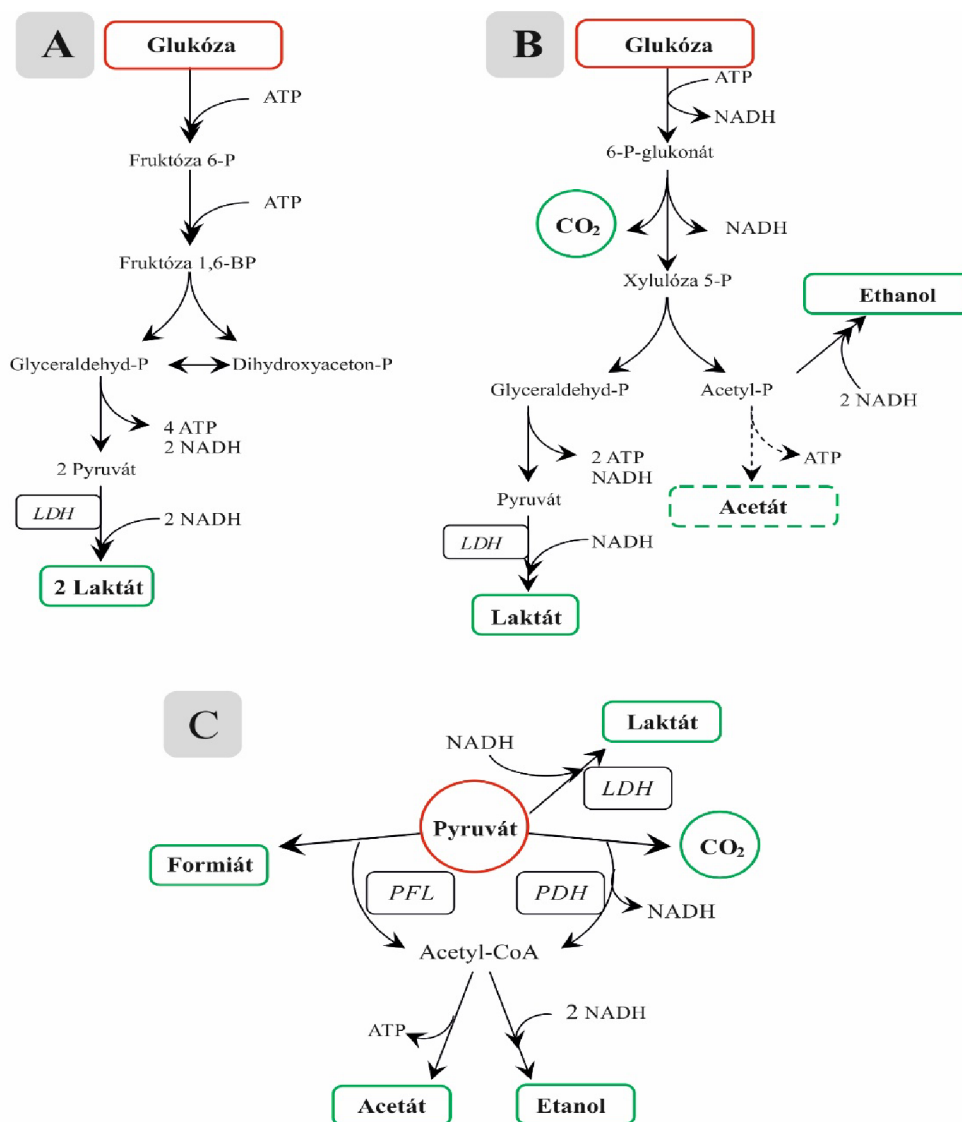
Obrázek 2 - Glykolytická dráha a následné přeměny kyseliny pyrohroznové v anaerobním prostředí [6]

1.2.1 Mléčná fermentace

Při mléčné fermentaci se jako akceptor vodíku z molekuly NADH využívá pyruvát vzniklý procesem glykolýzy. Pyruvát se přeměňuje na laktát, přičemž se NADH oxiduje na NAD^+ . Reakci katalyzuje enzym laktátdehydrogenasa s absolutní stereospecifitou. [2], [7]

Laktát je pravděpodobně nejběžnějším produktem fermentace sacharidů. Mléčné fermentace je schopna heterogenní skupina mikroorganismů, nazývaných mléčné bakterie (laktobacily, *Lactobacteriaceae*), s komplexními nároky na výživu. Bakterie mléčného kvašení neobsahují cytochromy, a tím ani dýchací řetězec. Chybějí jim též anabolické dráhy. Patří do skupiny přísně fermentujících mikroorganismů. [5]

Mléčné bakterie jsou schopny zkvašovat cukry obligátně homofermentativně, obligátně heterofermentativně a fakultativně heterofermentativně. [2], [7]



Obrázek 3 - Katabolické dráhy bakterií mléčného kvašení [9]

A) Obligátně homofermentativní, B) Obligátně heterofermentativní,
C) Fakultativně heterofermentativní

Homofermentativním mléčným kvašením (Obrázek 3A) se zkvašuje glukóza na laktát, který je jediným produktem reakce. Z jedné molekuly glukózy vznikají dvě molekuly laktátu. Mléčné bakterie tvoří převážně D-laktát, přičemž živočichy tvoří při nedostatku kyslíku výhradně L-formu laktátu. Homofermentativní mléčné bakterie se využívají pro kvasnou výrobu kyseliny mléčné. [2], [7], [9]

Heterofermentativní mléčnou fermentaci (Obrázek 3B) využívají některé laktobacily, které neobsahují glykolytický enzym a glukózu odbourávají části pentosového cyklu a části glykolytického systému. Proto se na laktát nepřeměňuje všechna glukosa, ale jenom její část a ze zbytku se vytvoří ethanol a oxid uhličitý nebo acetát a oxid uhličitý. Výsledné produkty vznikají v molárním poměru 1:1:1. Heterofermentativní mléčné kvašení uskutečňují mnohé mléčné bakterie rodu *Leuconostoc* a některé druhy rodu *Lactobacillus*. [2], [5], [9]

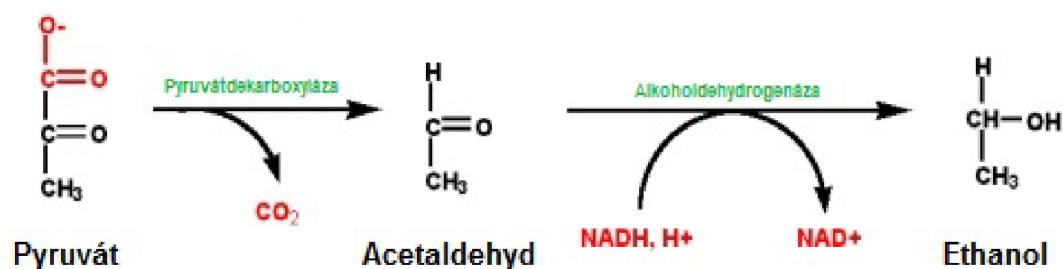
Fakultativně heterofermentativního kvašení (Obrázek 3C) jsou schopny například laktokoky. Tenhle způsob kvašení se využívá při nedostatku glukózy, kdy růst dále probíhá na dalších sacharidech. Vedle kyseliny mléčné se vytváří ethanol, acetát a formiát. [9]

Na mléčné fermentaci se zakládá sýrařství a výroba kvašených mléčných výrobků jako jsou kysané mléko, kefír nebo acidofilní mléko. Samovolné kvašení se vyskytuje při konzervaci např. zelí, a zabraňuje množení hnilobných bakterií. [8]

1.2.2 Ethanolová fermentace

Ethanolová fermentace se skládá z dvou reakcí, které jsou založeny na přeměně pyruvátu dekarboxylací na acetaldehyd a jeho následnou redukcí na ethanol. Kofaktor NADH se oxiduje na NAD^+ při redukcí acetaldehydu na ethanol. Enzym katalyzující přeměnu pyruvátu na acetaldehyd se nazývá pyruvátdekarboxyláza a je schopen dekarboxylovat pyruvát bez současné oxidace. Redukci vzniklého acetaldehydu pak umožňuje enzym alkoholdehydrogenáza. Na počátku fermentace, kdy se v prostředí nenachází dostatek acetaldehydu, je redukovaný kofaktor NADH dehydrogenován tak, že redukuje jiný meziprodukt glykolýzy. [2], [7]

Ethanolovou fermentací získáme 2 molekuly ATP z jedné molekuly glukózy, což představuje 30 % celkové uvolněné energie. [2]



Obrázek 4 - Ethanolová fermentace [2]

Ethanolová fermentace patří mezi nejstarší známé technologie. Využívají se hlavně kvasinky rodu *Saccharomyces*, ale taky jiné rody kvasinek, bakterií a plísní. S ethanolovým kvašením se setkáváme jednak v případě spontánního mikrobiálního rozkladu kyselých cukerných hmot, při zkvašování rmutů a šťáv při biologických conservačních procesech. Ve velkém měřítku se ethanolové kvašení využívá v průmyslu při výrobě alkoholických nápojů a samotného ethanolu pro lékařské nebo potravinářské účely. [2], [7]

1.3 Bioinženýrské charakteristiky

1.3.1 Růstová křivka

Mikroorganismy rostou a rozmnožují se za vhodných podmínek vysokou rychlostí. Rozmnožování se však zastaví při nedostatku živin, nebo z důvodu inhibičních účinků zplodin jejich metabolismu. Maximální možná koncentrace živých buněk v 1 ml média u bakterií dosahuje řádu 10^9 a u kvasinek 10^8 . Když přeneseme buňky z prostředí, kde se již nemohou rozmnožovat do optimálních růstových podmínek, nedochází však k okamžitému růstu při maximální rychlosti. Při grafickém znázornění růstu buněk se na osu x nanáší čas (t) a na osu y logaritmus počtu živých buněk ($\log(x)$) v 1 ml. Vzniklý graf nazýváme *růstovou křivkou*. [8]

Růstová křivka se skládá z několika úseků:

1) Lag fáze (adaptační fáze):

Lag fáze je první úsek růstové křivky, tzv. adaptační fáze, kdy se buňky ještě nerozmnožují. Touto fází prochází mikroorganismus vždy po přenesení do nového prostředí na začátku kultivace. V tomto období se buňky adaptují na nové prostředí, zvětšují svůj objem, syntetizují bílkoviny a indukovatelné enzymy. Různé mikroorganismy mohou mít různě dlouhou lag fázi. Závisí to od fyziologického stavu buněk, množstvím inokula, času potřebného k syntéze enzymů a bílkovin a na složení živného média. Když se nachází bakteriální kultura v prostředí s dvěma zdroji uhlíku, projeví se tzv. diauxie. Ta způsobuje vznik dvou lag fází a dvou exponenciálních fází, které jsou navzájem odděleny přechodnou fází. Při diauxii se nejprve využívá jednodušší substrát (např. monosacharidy) a po jeho vyčerpání se metabolismus mikroorganismu adaptuje na složitější substrát (např. polysacharid). Pro tuto fázi platí vztah:

$$\frac{dx}{dt} = 0 \quad (1)$$

kde x je koncentrace mikroorganismů a t je čas. [8], [10]

2) Fáze zrychleného růstu:

Fáze zrychleného růstu je krátké období, ve kterém je pěstovaná kultura již plně přizpůsobena podmínkám prostředí. Jejich vysoká fyziologická aktivita je provázána zvýšenou citlivostí k nepříznivým faktorům prostředí. V této fázi je rychlost růstu větší jako rychlost rozmnožování, a tedy buňky jsou v průměru větší než v jiných fázích. Čím obsahuje

prostředí méně živin, tím je fáze delší. Fáze zrychleného růstu představuje období růstu kultury, kdy je rychlost růstu menší než maximální, což lze vyjádřit vztahem (2): [10]

$$0 < \frac{dx}{dt} < \left(\frac{dx}{dt} \right)_{\max=\exp} \quad (2)$$

3) Exponenciální fáze (logaritmická):

Úsek růstové křivky, který je charakterizován tím, že buňky mají největší a po celý čas trvání konstantní specifickou růstovou rychlost. V průběhu této fáze mají buňky konstantní velikost a téměř všechny buňky v kultuře jsou živé. Hodnota specifické měrné růstové rychlosti závisí na podmínkách prostředí (pH, teplota, koncentrace živin) a na genetických faktorech. Charakteristické pro tuto fázi je přebytek živin. Kinetiku exponenciální fáze lze vyjádřit vztahem (3):

$$\frac{dx}{dt} = k \cdot x \quad (3)$$

kde k je rychlostní konstanta a platí pro ni, že $k = \mu$. Rychlostní konstantu v tomto případě nazýváme měrná (specifická) rychlost růstu. Jde o reakci 1. řádu. Integrací rovnice (3) dostáváme: [8], [10]

$$x = x_0 \cdot e^{\mu t} \quad (4)$$

Při hodnocení exponenciální fáze růstu je dobré zmínit se o vlivu limitujícího prvku. Limitujícím prvkem je sloučenina či faktor, který v příslušném rozmezí jednotek (např. koncentrace) přímo ovlivňuje rychlost růstu nebo syntézy produktu mikroorganismu. Všechny ostatní látky přítomné v médiu jsou ve větších koncentracích než limitující prvek. Pro vztah mezi specifickou růstovou rychlostí a koncentrací limitujícího prvku platí tzv. Monodův vztah:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{S + K_s} \quad (5)$$

kde μ_{\max} je maximální specifická růstová rychlost, K_s je substrátová konstanta neboli saturační koncentrace a S je koncentrace limitujícího prvku. [8], [10]

4) Fáze zpomaleného růstu (deklinační):

Postupným vyčerpáváním živin a zvýšeným množstvím metabolitů ztrácejí mikroorganismy schopnost udržovat vysokou specifickou růstovou rychlost. Rychlost rozmnožování se snižuje, neboť narůstá počet odumírajících buněk. V některých případech se těsně po exponenciální fázi objeví *fáze lineárního růstu*, kdy platí: [10]

$$\frac{dx}{dt} = konst. \quad (6)$$

Tato fáze se řadí do fáze zpomaleného růstu. Fáze lineárního růstu se objevuje např. u vláknitých mikroorganismů. [10]

5) Stacionární fáze:

Během stacionární fáze se počet odumírajících buněk vyrovná přírůstku buněk vzniklého rozmnožováním. V této fázi je tedy koncentrace mikroorganismů konstantní, a tudíž mluvíme o tzv. maximální populaci. [10]

$$\frac{dx}{dt} = 0 \quad (7)$$

Hodnota maximální koncentrace mikroorganismů závisí na několika faktorech, jako jsou koncentrace kyslíku přítomného v mediu, zdroje dusíku, koncentrace zdroje energie a uhlíku, hodnota pH. V této fázi již dochází k limitaci některým z faktorů. Pro stacionární fázi platí vztah (8): [8], [10]

$$x = x_0 + Y_{x/s} \cdot S_0 \quad (8)$$

kde x je koncentrace mikroorganismů, S_0 je počáteční koncentrace substrátu a $Y_{x/s}$ je výtěžnostní koeficient, který je definován:

$$Y_{x/s} = -\frac{dx/dt}{dS/dt} = \frac{\Delta x}{\Delta S} = \frac{x - x_0}{S_0 - S} \quad (9)$$

přičemž záporné znaménko naznačuje spotřebu substrátu. [8], [10]

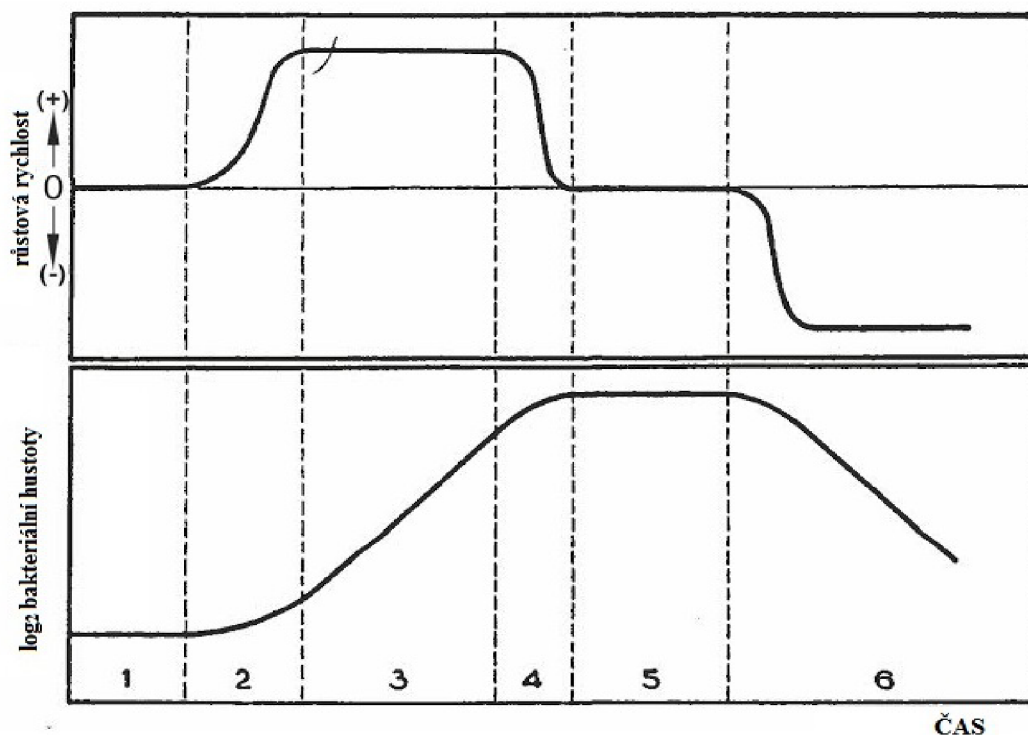
6) Fáze odumírání:

Ve fázi odumírání se snižuje počet živých buněk. Celkový počet buněk může zůstat nezměněn a zmenšuje se až v tu dobu, kdy dochází k lyzi mrtvých buněk. Rychlost dělení klesá pod nulovou hodnotu, a tím se stává negativní. Stav je způsoben neustále zhoršujícími se podmínkami prostředí. V této fázi je snížena koncentrace živin pod kritickou hodnotu, což snižuje aktivitu mikrobiálního metabolismu a způsobuje postupné odbourání rezervních látek. Obvykle se tato fáze vyjadřuje kinetikou 1. řádu: [5], [10]

$$\frac{dx}{dt} = -\mu_d \cdot x \quad (10)$$

kde μ_d je rychlostní koeficient. Po integraci získáváme: [10]

$$x = x_{mac} \cdot e^{-\mu_d t} \quad (11)$$



Obrázek 5 - Růstová křivka. [15]

1 – lag fáze, 2 – fáze zrychlujícího se růstu, 3 – exponenciální fáze,
4 – fáze zpomaleného růstu, 5 – stacionární fáze, 6 – fáze odumírání

1.3.2 Mikrobiální kinetika

V příznivých podmínkách se rostoucí jednobuněčná populace zdvojnásobuje v pravidelných intervalech. Obě dceřiné buňky, vzniklé rozdělením mateřské buňky, nesou stejný růstový potenciál jako buňka mateřská. Kdyby populace vznikala právě z jedné buňky, několik prvních dělení bude synchronizovaných, ale postupně se synchronnost vytratí z důvodu nepatrných rozdílů mezi buňkami populace. Čas potřebný k zdvojnásobení biomasy nebo počtu buněk nazýváme střední čas zdvojení. [5]

Když počet buněk v 1 ml na začátku exponenciální fáze označíme jako x_0 , pak po jedné generační době je jejich počet $2x_0$. Po n generačních dobách je tedy počet buněk roven $2^n x_0$. Po uplynutí času t platí:

$$x = 2^{r \cdot t} x_0 \quad (12)$$

kde je r počet dělení za jednotku času (h). Ze vztahu vyplývá, že logaritmus počtu buněk se zvyšuje v přímé úměře s počtem generací. [8]

Rychlost růstu v průběhu exponenciální fáze získáme derivací předchozí rovnice (12) podle času:

$$\frac{dx}{dt} = 2^{r \cdot t} r x_0 \ln 2 \quad (13)$$

Pokud za $2^{r \cdot t} x_0$ dosadíme x a $r \ln 2$ nahradíme veličinou μ (specifická rychlost růstu) dostáváme rovnici (14):

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (14)$$

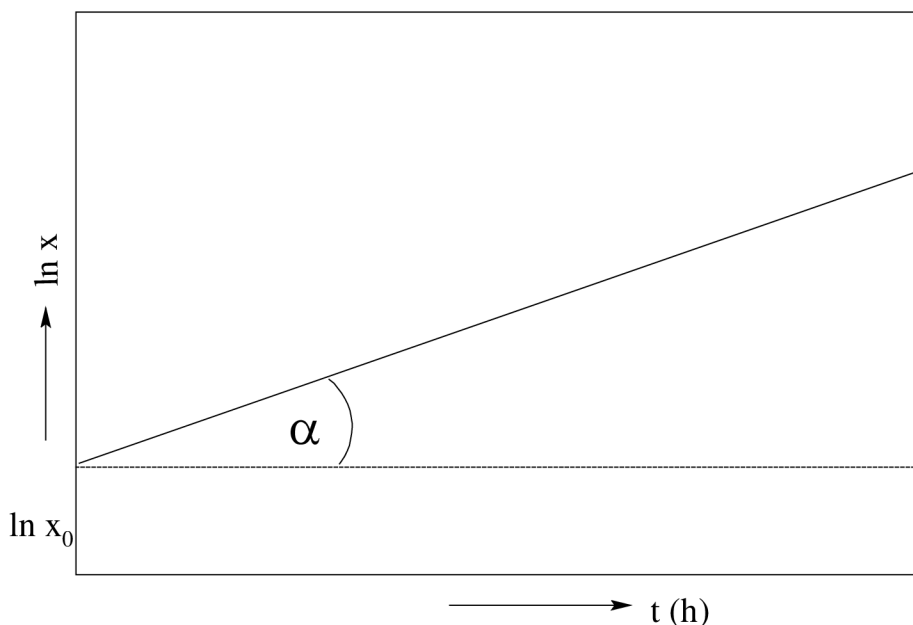
Z rovnice (14) vyplývá, že rychlost růstu mikrobiální populace je v kterémkoliv momentě exponenciální fáze úměrná počtu buněk v tomto momentě, a tedy μ je konstantou úměrnosti. Následně lze počet buněk vypočítat integrací diferenciální rovnice:

$$\int_{x_0}^x \frac{dx}{x} = \int_{t_0}^t \mu dt \quad (15)$$

z čehož vyplývá, že

$$\ln x = \mu(t - t_0) + \ln x_0 \quad (16)$$

Rovnice (16) je rovnicí přímky grafu, znázorněného na obrázku 6. [8], [10]



Obrázek 6 - Grafické zobrazení exponenciálního růstu [8]
 x – počet buněk v 1 ml, t – doba (h), $\operatorname{tg} \alpha$ – specifická růstová rychlost

Zpomalení, případně úplné zastavení rozmnožování, bývá způsobeno jednak vznikem zplodin metabolismu, které inhibují rozmnožování, jednak vyčerpáním živin. Nejčastěji dochází k vyčerpání živiny, která je přítomná v relativně nejnižší koncentraci. [8]

Celkový nárůst (G) je lineární funkcí počáteční koncentrace limitující živiny (c). Vztah vyjadřujeme:

$$G = Kc \quad (17)$$

kde K (konstanta výtěžnosti) je výtěžnost mikroorganismu na dané živině. Udává, kolik gramů sušiny se vytvoří z jednoho gramu živiny. [8]

Vztah (17) platí i pro zdroje fosforu, dusíku a jiné růstové látky, které sám mikroorganismus není schopen syntetizovat. Konstanta výtěžnosti ovšem není pro každou z těchto látek stejná. Lineární vztah mezi nárůstem a koncentrací limitující živiny umožňuje stanovit koncentraci přítomné růstové látky v potravinách z nárůstu vhodného auxotrofního mikroorganismu, který danou růstovou látku potřebuje. [8]

1.4 Matematický model

Matematický model je abstraktní analogií reálného procesu, představuje zobecnění experimentálních výsledků a teoretických úvah o procesu a formuluje závislosti mezi proměnnými. K matematickému modelu patří i soubor údajů o vlastnostech procesu (soustavy), které jsou nevyhnutné k jeho popisu a mají často formu parametrů vystupujících v daném modelu. Modely umožňují srozumitelný popis všech faktorů dané situace. Umožňují nám odhalit vazby v studovaném systému. Modelování se stalo součástí mnoha oborů např. přírodních, technických, ekonomických a sociálních věd. Každý model obsahuje tři základní skupiny objektů: *proměnné a konstanty, matematické struktury a řešení*. [12], [13]

V matematickém modelu rozlišujeme základní skupiny proměnných: řídicí, vstupní, výstupní proměnné aj. Matematické struktury v modelech nazýváme omezující podmínky. Dělíme je podle užitého matematického aparátu z některého odvětví matematiky na analytické struktury, geometrické, topologické, arteficiální a kvalitativní struktury. Řešení modelů dělíme podle cílů modelování, např. optimální řešení, výchozí řešení, alternativní řešení aj. [12], [13]

Během identifikace a analýzy systému je vhodné určit, do jaké kategorie spadá matematický model, což nám umožní jednodušeji rozeznat základní vlastnosti a strukturu hledaného modelu. Když se v modelu nachází místo konkrétních číselných hodnot obecné konstanty, nazýváme jej *prázdný matematický model*. V praxi bývá nejobtížnější získat právě hodnoty parametrů, přičemž odvození prázdného modelu bývá poměrně jednoduché. Model, který obsahuje číselné hodnoty všech parametrů modelovaného procesu, nazýváme *objektově orientovaný model*. [13]

Matematické modely lze rozdělit na dva základní druhy podle toho, zda zahrnují náhodné veličiny na modely *deterministické* a *stochastické*. Dále lze tyto skupiny rozdělit podle vztahu k průběhu času (dynamické, statické) nebo spojitosti (spojité a diskrétní). Modely jsou obvykle složeny z proměnných, které jsou abstraktní analogií hledaných složek daného systému a operátorů nad těmito proměnnými, které mohou reprezentovat algebraické funkce, diferenciální operátory, atd. Pokud operátory v matematickém modelu jsou lineární, mluvíme o lineárních modelech, v opačném případě o modelech nelineárních. Dále rozeznáváme modely se soustředěnými (u homogenních modelů) s distribuovanými

(u heterogenních modelů) parametry. Existuje ještě mnoho druhů modelů, které se dále třídí podle mnoha různých kritérií. [12]

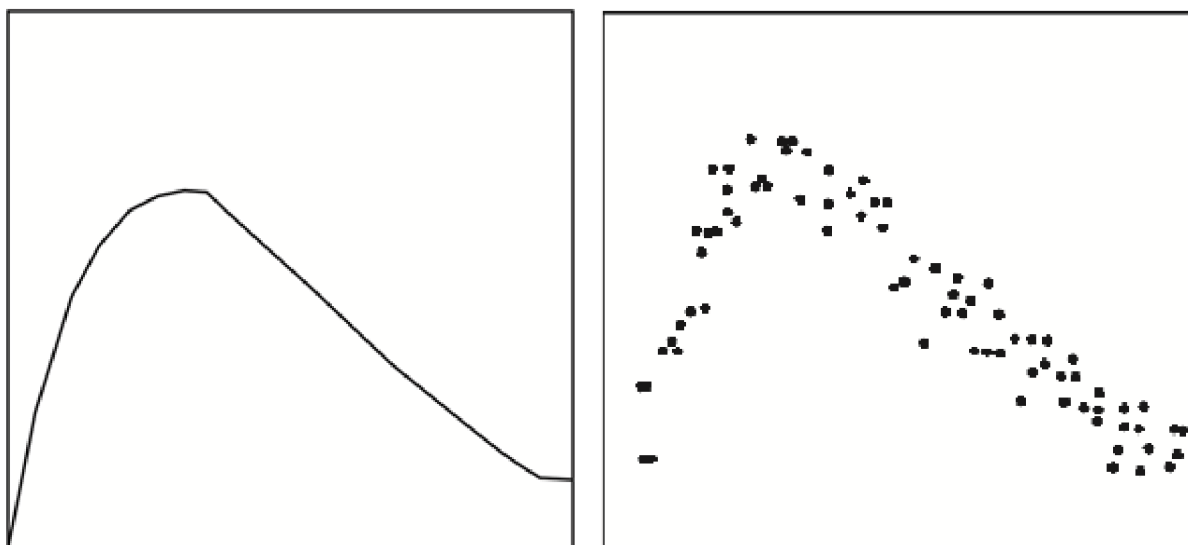
Deterministické modely jsou odvozeny na základě analýzy a matematického popisu reálného děje. Při těchto modelech vycházíme z fyzikálních, fyzikálně-chemických a chemických zákonů, které mají své matematické vyjádření. V modelech jsou zahrnuté všechny vlivy působící na systém a parametry jsou přesně definované. Modely předpokládají, že když jsme schopni přesně popsat hodnoty vstupů do soustavy, víme přesně určit i hodnoty výstupů. [13], [14]

Deterministické modely živých systémů vycházejí ze spojitosti růstové křivky a využívají analytického způsobu vyjádření funkčních závislostí, diferenciálních rovnic a reakční kinetiky. Modely tedy využívají vlastností průměrných buněk (zjišťujeme analýzou průměrně odebraného vzorku). Deterministického chování se uvažuje při modelování většiny chemických zařízení. Příklad deterministického modelu $\mu = f(S)$:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{S + K_s} \quad (18)$$

kde S je koncentrace substrátu, K_s a μ_{\max} jsou konstanty, μ je měrná růstová rychlost. [10], [12], [13]

Stochastické modely využívají předpokladu, že v případě, kdy jsme schopni přesně určit vstupy do soustavy, můžeme určit jen pravděpodobné hodnoty výstupu, nikoliv přesnou hodnotu. V těchto modelech se nacházejí náhodné veličiny, charakterizované na základě pravděpodobnosti a parametry jsou popsány distribučními funkcemi. Řešením stochastického matematického modelu je pravděpodobnost, že za daných podmínek bude systém v určitém stavu. Stochastické modely se využívají v oblasti kvantové mechaniky, při modelování turbulence a v meteorologii. [12], [13], [14]



Obrázek 7 - Porovnání deterministického modelu (nalevo) a stochastického modelu (napravo) [13]

1.5 Kinetické modely

Vztah mezi specifickou růstovou rychlostí a koncentrací substrátu je důležitým v oblasti biotechnologií. Tento vztah je reprezentován souborem empiricky odvozených zákonů, které jsou označovány jako teoretické modely. Kinetické modely obsahují matematický popis chování daného systému. [16]

Nestrukturované kinetické modely pro buněčné kultury byly původně navrženy k predikci specifické růstové rychlosti. Charakteristickým rysem modelu je, že rychlost tvorby nebo spotřeby reakčních složek jsou úměrné specifické růstové rychlosti. V těchto modelech označujeme všechny buněčné komponenty jako biomasu s určitou koncentrací x . Specifickou růstovou rychlost můžeme vyjádřit jako funkci nezávislých proměnných (koncentrace substrátu, pH, teplota). [16]

Jednoduché strukturované kinetické modely odrážejí některé základní fyziologické odezvy kultury na změny v prostředí. Mají empirickou povahu a obvykle bývají založeny na dobře popsáných buněčných mechanismech. Dokážou tedy docela dobře simulovat různé experimenty. [16]

1.5.1 Model exponenciálního růstu

Nejstarším matematickým modelem růstu biomasy je model exponenciálního růstu, jehož předpoklady vycházejí z toho, že změna koncentrace složek v kultivačním médiu nemá vliv na růst a rozmnožování buněk, protože buňky se vzájemně neovlivňují. Nejčastěji se vychází z analogie s chemickou reakcí, tedy z kinetiky 1. řádu. Tento model můžeme zapsat: [11], [18]

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (19)$$

Platnost modelu exponenciálního růstu je omezená, protože koncentrace biomasy nemůže růst neomezeně z důvodu vzájemných prostorových omezení buněk. Specifická růstová rychlost je konstantní jen v případě nelimitovaného růstu, jinak se během kultivace mění v závislosti na koncentraci substrátu, produktu, inhibitorů, ale i v závislosti na samotných podmínkách kultivace. Pro vyjádření právě specifické růstové rychlosti existuje celá řada modelů. [11], [18]

1.5.2 Monodův model

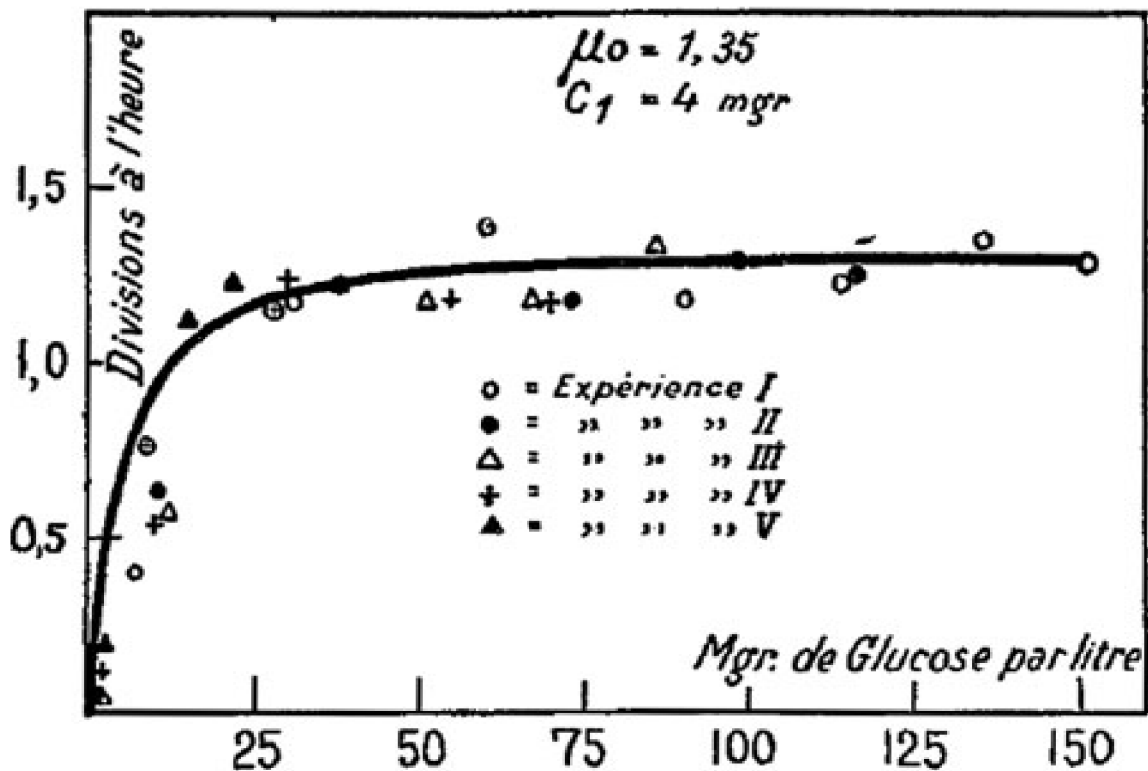
V roce 1942, Jacques Monod, představil empirický popis pro specifickou rychlost růstu biomasy. Monodův model je nadčasový a je doteď používán více, než kterýkoliv jiný kinetický model pro růst biomasy. [16]

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{S + K_S} \quad (20)$$

V letech 1930 až 1940 prováděl Monod (v spolupráci s Georgesem Tessierem) experimenty v oblasti bakteriální výživy, kdy bakterie druhu *Escherichia coli*, nechal růst

v prostředí s jednou limitující živinou. Jeho cílem bylo zjistit, zda logaritmické rovnice dokážou popsat bakteriální růst. Tohle tvrzení se však nepotvrdilo. [11], [16]

Všechny experimenty byly prováděné v malém vsádkovém reaktoru při vhodné teplotě s možností kontroly pH. Vsádková kultivace začíná s počáteční koncentrací substrátu $S = S_0$ mnohem vyšší než substrátová konstanta K_s . Specifická růstová rychlost je většinu času konstantní. Když klesne koncentrace substrátu S na hodnotu blízkou substrátové konstantě K_s , začne specifická růstová rychlost klesat. Hodnoty K_s a μ_{max} se stanovuje za normálních podmínek experimentálně v chemostatu. V modelu označuje K_s hodnotu koncentrace limitujícího substrátu, při které je velikost specifické růstové rychlosti právě polovina maximální specifické růstové rychlosti a její velikost se obvykle pohybuje v mikromolech (mikrogramech) na litr. [16]



Obrázek 8 - Kopie originálního grafu z Monodovy práce (1942) [16]

Monodova rovnice popisuje růst v exponenciální fázi, avšak nezahrnuje inhibici. Když je nutné inhibici brát v úvahu, poznáme modifikované Monodovy rovnice: [16]

pro inhibici substrátem:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{\left(S + K_s + \frac{S^2}{K_1} \right)} \quad (21)$$

pro inhibici produktem:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{\left(S + K_s + \frac{P}{K_1} \right)} \quad (22)$$

1.5.3 Tessierův model

Tessierův model růstu prezentuje algebraické řešení, které je mnohem složitější, než Monodova rovnice pro růst biomasy. Popisuje růst v exponenciální fázi a nezahrnuje inhibici. Pro model je charakteristické, že rychlost růstu velmi závisí od koncentrace substrátu. [17]

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \left(1 - e^{\frac{-S}{K_s}}\right) \quad (23)$$

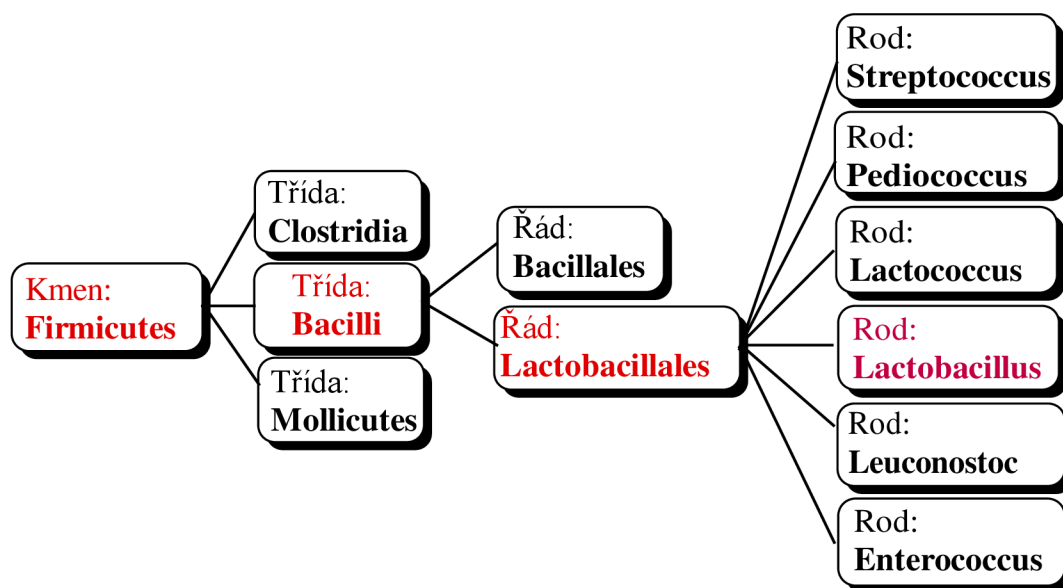
Při nízké koncentraci substrátu S , Tessierův model poskytuje velmi podobné výsledky jako model Monodův. [16]

1.6 Rod *Lactobacillus*

1.6.1 Charakteristika rodu *Lactobacillus*

Bakterie rodu *Lactobacillus* patří do řádu *Lactobacillales*. Bakterie jsou pravidelné, grampozitivní, nesporulující tyčky nebo koky a často tvoří řetízky. Nevytvářejí pigmenty, jsou mezofilní, chemoorganotrofní a katalasa-negativní se striktně fermentativním typem metabolismu. Ve vztahu ke kyslíku jsou anaerobní nebo mikroaerofilní. Pro laktobacily obecně platí, že v přítomnosti 5% CO₂ rostou lépe. Jsou schopný růstu jen na kompletním médiu, kde vyžadují přítomnost zkvasitelných cukrů, aminokyselin, peptidů, esterů mastných kyselin, solí, derivátů nukleových kyselin a vitamínu skupiny B. Laktobacily rostou v širokém rozmezí teplot (2–53°C), avšak teplotní optimum pro většinu zástupců je 30–40°C. Optimální pH na počátku kultivace je 5,5–6,2, ale laktobacily jsou schopní růst i v prostředí s pH pod 5,0. Při neutrálním a zásaditém pH je jejich růst obvykle inhibován. [19], [22]

Rod *Lactobacillus* je druhově mnohohočetný, jehož je více než sedm desítek druhů a jsou poměrně dobře charakterizovány. Většina druhů rodu *Lactobacillus* jsou schopny fermentovat glukózu a laktózu na laktát. [19], [21]



Obrázek 9 - Taxonomické zařazení rodu *Lactobacillus* [20]

Do rodu *Lactobacillus* patří bakterie, které tvoří část přirozené mikroflóry úst člověka a gastrointestinálního traktu. Protože kyselina mléčná snižuje pH, a tím zastavuje množení hnilobných bakterií, některé bakterie rodu *Lactobacillus* se využívají při konzervaci potravin. Dále se laktobacily nacházejí v nejrůznějších potravinách živočišného i rostlinného původu, v nápojích, v čisté a znečištěné vodě aj. Pouze vzácně jsou bakteriální druhy rodu *Lactobacillus* patogenní. [19], [21]

Na základě produktů fermentace cukrů dělíme laktobacily do tří fyziologických skupin:

1. Obligátně homofermentativní
2. Obligátně heterofermentativní
3. Fakultativně heterofermentativní

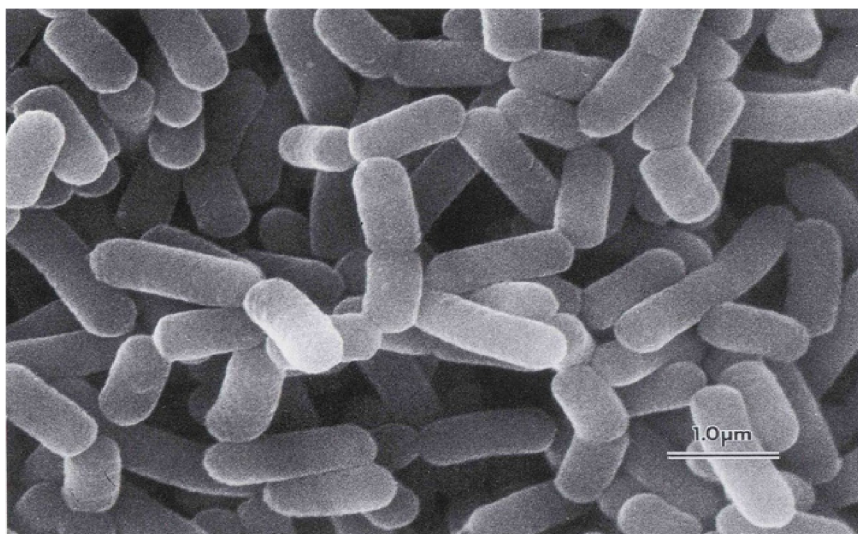
Obligátně homofermentativní jsou schopny zkvašovat hexózy výhradně na mléčnou kyselinu. Nedokážou však fermentovat pentózy ani glukonát. Patří sem druhy *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. helveticus*. [19]

Obligátně heterofermentativní druhy rodu *Lactobacillus* kvasí hexózy na kyselinu mléčnou, kyselinu octovou a CO₂. Pentózy jsou schopny fermentovat za vzniku kyseliny mléčné a octové. Do této skupiny se zařazují druhy jako *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. kefir*. [19]

Fakultativně heterofermentativní laktobacily fermentují hexózy na kyselinu mléčnou nebo na směs kyseliny mléčné, octové, mravenčí a ethanolu. Pentózy fermentují na kyselinu mléčnou a octovou. Řadíme sem druhy *L. casei*, *L. plantarum*, *L. sake*. [19]

1.6.2 Druh *Lactobacillus casei*

Bakterie druhu *Lactobacillus casei* patří mezi fakultativní anaeroby. Jsou to nepohyblivé tyčinky s hranatými nebo zaoblenými konci, které se mohou vyskytovat jednotlivě nebo spojené v řetízcích. Velikost buňky se pohybuje od 2,0–4,0 μm x 0,7–1,1 μm. *L. casei* je grampozitivní druh bakterií mléčného kvašení s nízkým obsahem G-C párů. Bakterie jsou schopny růstu v rozmezí teplot 15–45°C. [24], [25]



Obrázek 10 - *Lactobacillus casei* [27]

Bakterie druhu *Lactobacillus casei* se zařazuje do skupiny fakultativně heterofermentativních laktobacilů, štěpí sacharidy (hexózy i pentózy) na L-kyselinu mléčnou a nejsou schopny redukovat nitráty. [26]

L. casei je univerzální bakterie mléčného kvašení, která byla izolovaná z různých produktů, včetně fermentovaných mléčných výrobků (zejména sýrů) a rostlinných materiálů (například z vína), a taktéž se nacházejí v reprodukčních orgánech a gastrointestinálním traktu lidí a zvířat. [22]

Patří mezi průmyslově významné bakterie mléčného kvašení a má rozsáhlé a rozmanité aplikace v potravinářském a zdravotnickém průmyslu. V potravinářství se využívá pro intenzifikaci a urychlení vývoje chuti v zrajících sýrech, a je dominantním druhem startovacích bakterií mléčného kvašení u sýrů. *L. casei* je součástí probiotik s pozitivními účinky na zdraví člověka a je používán i v některých vakcínách. Fyziologické studie zatím neodhalily žádné závažné informace, které by mohly omezit uplatnění tohoto druhu při průmyslné výrobě. [22]

Existuje již mnoho bakterií z druhu *L. casei*, které mají rozluštěnou kompletní sekvenci genomu. Tyto informace poskytují cenné poznatky o evoluci, adaptaci a metabolické rozmanitosti druhu *Lactobacillus casei*. [23], [24]

1.7 Analytické metody

1.7.1 Turbidimetrie

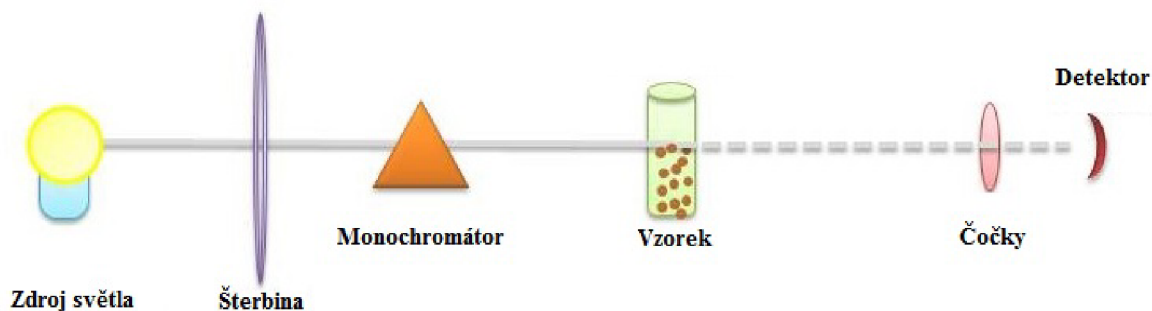
V praxi se často setkáváme se vzorky, které mají koloidní charakter, například emulze, suspenze, prášky atd. V těchto případech je absorbance záření provázána jeho rozptylem. Rozptyl záření je obecný jev a způsobuje, že záření po interakci s částicemi nebude postupovat pouze směrem procházejícího záření, ale bude rozptýleno i do jiných směrů. Úhlové rozložení rozptýleného záření, v tomto případě, závisí na poměru vlnové délky a velikosti rozptylujících částic. Rozptyl záření na částicích koloidního vzorku využívají dvě metody: turbidimetrie a nefelometrie. [31]

Turbidimetrie je optická metoda založená na měření procházejícího světla zeslabeného rozptylem na částicích. Měří se zdánlivá propustnost záření vzorkem, která je výsledkem absorpce primárního i sekundárního záření v přímém směru, rozptylem záření do stran a rozptylem záření do přímého směru. Pro turbidimetrii platí vztah analogický Lambert - Beerovu zákonu, podle něhož je záporný logaritmus transmitance (turbidance) přímo úměrný koncentraci suspendované látky. [29], [31]

Vztah pro zdánlivou turbidanci:

$$S = \log \frac{I_0}{I} = \frac{kr^3}{r^4 + \alpha\lambda^4} cl = \eta cl \quad (24)$$

kde η je turbiditní koeficient, k je konstanta závislá na povaze zákalu, α je konstanta závislá na uspořádání měření, r je velikost částic. [29]



Obrázek 11 – Turbidimetrie [30]

Turbidimetrické metody preferujeme, je-li koncentrace suspendovaných částic velká, protože je poměrně jednoduché detegovat změny (významně zeslabeného) toku prošlého záření. Stanovení se provádí na základě kalibrační křivky. Výsledek měření ovlivňuje řada faktorů: koncentrace částic, velikost a tvar částic, absorbance záření vzorkem, poměr indexu lomu částic a okolního prostředí atd. [31]

1.7.2 Stanovení sušiny bakteriální biomasy

Biomasa je směs všech látek tvořících tělo mikroorganismů. Mikrobiální biomasa je důležitý biotechnologický parametr. Tradiční způsob stanovení biomasy zahrnuje sušení při vyšší teplotě a následné ochlazení před vážením. Hmotnost sušiny v analyzovaném vzorku je stanovena vážením před a po sušení při 105°C do konstantní hmotnosti. [32], [34]

Při metodě dochází k transportu vody z vnitřních vrstev na povrch a následnému odpařování vody. Konstantní hmotnost nastává, když vznikne rovnováha mezi parciálním tlakem odpařované vody a parciálním tlakem sušeného média. Rychlost sušení závisí na charakteru vzorku, velikosti navážky, tvare částic, teplotě, vlhkosti a na rychlosti a směru proudění sušícího média. [33]

1.8 MATLAB

1.8.1 Charakteristika programu

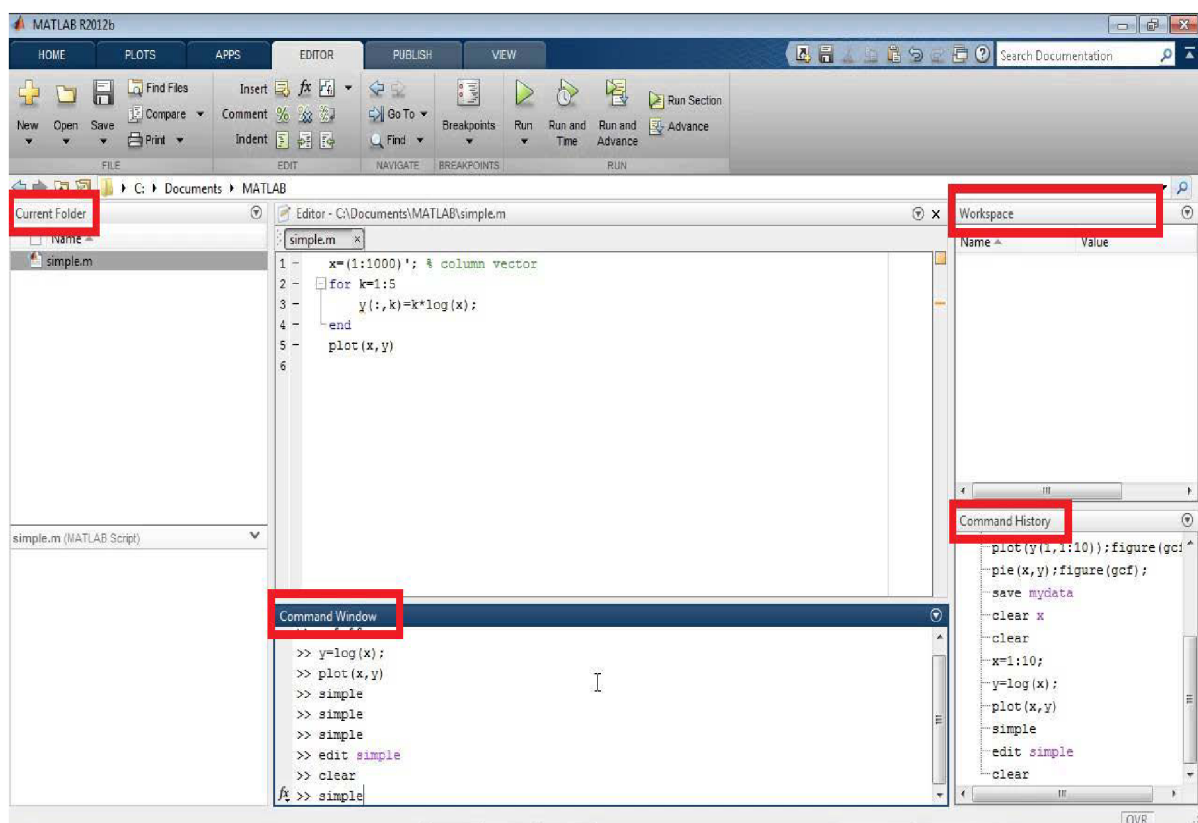
V roce 1984 představila americká společnost The MathWorks, Inc. programový balík MATLAB. MATLAB (z anglického MATrix LABoratory) je tedy programovací jazyk a interaktivní prostředí pro vědecké a technické výpočty, analýzu dat, vizualizaci a vývoj algoritmů. Aby všechny tyto funkce mohli být zabezpečeny, obsahuje MATLAB základní části: výpočetní jádro, grafický subsystém, pracovní nástroje, toolboxy a otevřenou architekturu. [38]

Základem je výpočetní jádro, které provádí numerické operace s maticemi reálných nebo komplexních čísel. Základním datovým prvkem je matice, u které se nezadáva rozměr a to umožňuje řešit různé numerické problémy podstatně rychleji. Kromě matic má MATLAB tzv. pole buněk, což je struktura podobná maticím, avšak každý prvek v poli buněk může být jiného typu. Uživatel tedy může pracovat s datovými strukturami a prvky v nich nejsou rozlišeny souřadnicemi, ale názvem. Výpočty se implicitně vykonávají v tzv. dvojnásobné

přesnosti. V prostředí programu lze taky efektivně pracovat s vektory, které mohou představovat například časové řady nebo signály různých typů. [38]

Nové verze MATLABu pracují s tzv. okenní strukturou, což je interaktivní prostředí, ve kterém má většina příkazů pro manipulaci a základní ovládání své ekvivalenty v podobě ikoněk. Možnosti MATLABu se dají rozšířit pomocí knihovny funkcí, tzv. *toolboxy*, což jsou soubory M-funkcí určené pro specifické účely jako je statistika, optimalizace, zpracování signálů a obrazu, apod. Nejznámější a největší z nich je *Simulink* - program pro simulaci a modelování dynamických systémů. [36]

Základem grafického rozhraní programu je *Command Window* (příkazové okno), *Command history* (okno historie příkazů), *Workspace* (pracovní prostor) a *Current folder* (okno pro správu aktuální složky). Příkazové okno se zobrazuje po spuštění MATLABu a složí nám ke komunikaci s výpočetním jádrem. Je to tedy nejdůležitější část programu a většina práce se odehrává právě v tomto okně. Slouží k zadávání různých příkazů a k zobrazení výstupů funkcí, varování nebo chybných vstupních dat. MATLAB si pamatuje všechny zadané příkazy a hodnoty proměnných, a ty jsou uchovány v tzv. pracovním prostoru (*Workspace*). [36]



Obrázek 12 - Prostedí MATLABu s okenní strukturou [35]

MATLAB patří mezi nejrozšířenější program pro technické výpočty v mnoha oborech. Všechny aktuální informace může uživatel najít na webových stránkách americké firmy The MathWorks, Inc. nebo firmy HUMUSOFT, která je zástupcem The MathWorks pro Českou republiku a jiné státy. [36], [38]

1.8.2 Curve Fitting Toolbox™

Curve Fitting Toolbox™ je rozšíření programu MATLAB, které umožňuje prokládání dat křivkami a plochami s využitím regrese, interpolace aj. Poskytuje grafické nástroje a příkazové řádky určené k vepsání funkcí, kterými se data prokládají. Toolbox umožňuje zpracování a analýzu dat, porovnávání vybraných modelů nebo vyloučení nevhodných datových bodů. K regresní analýze lze využít knihovnu lineárních a nelineárních modelů nebo specifikovat vlastní rovnice. Po nalezení vhodného proložení dat lze aplikovat řadu metod pro následné zpracování, jako je interpolace, extrapolace, odhad intervalu spolehlivosti nebo výpočet integrálů a derivací. [39]

1.8.3 Goodness of fit (Statistika)

V programu MATLAB umožňuje aplikace Curve Fitting toolbox statistiku Goodness of fit, což ve volném překladu znamená kvalita (přesnost) proložení dat modelem. Tato statistika je vhodná pro matematické modely obsahující parametry a zahrnuje statistické výpočty: [35]

- Suma čtverců reziduí (SSE)
- Koeficient determinace (R^2)
- Upravený koeficient determinace (R_{adj}^2)
- Efektivní hodnota chyby

Suma čtverců reziduí (SSE) je statistika udávající nevysvětlitelnou variabilitu výsledkové proměnné:

$$SSE = \sum_{i=1}^n w_i (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (25)$$

Výsledná hodnota blízká se k 0 naznačuje, že model má menší náhodné chybové složky, a tedy je vhodnější k predikci. [35]

Statistická metoda *koeficientu determinace* měří, jako úspěšně proložení dat modelem vysvětluje jejich variace. Je definován jako poměr součtu čtverců regrese (SSR) a celkového součtu čtverců (SST). SSR a SST jsou definované:

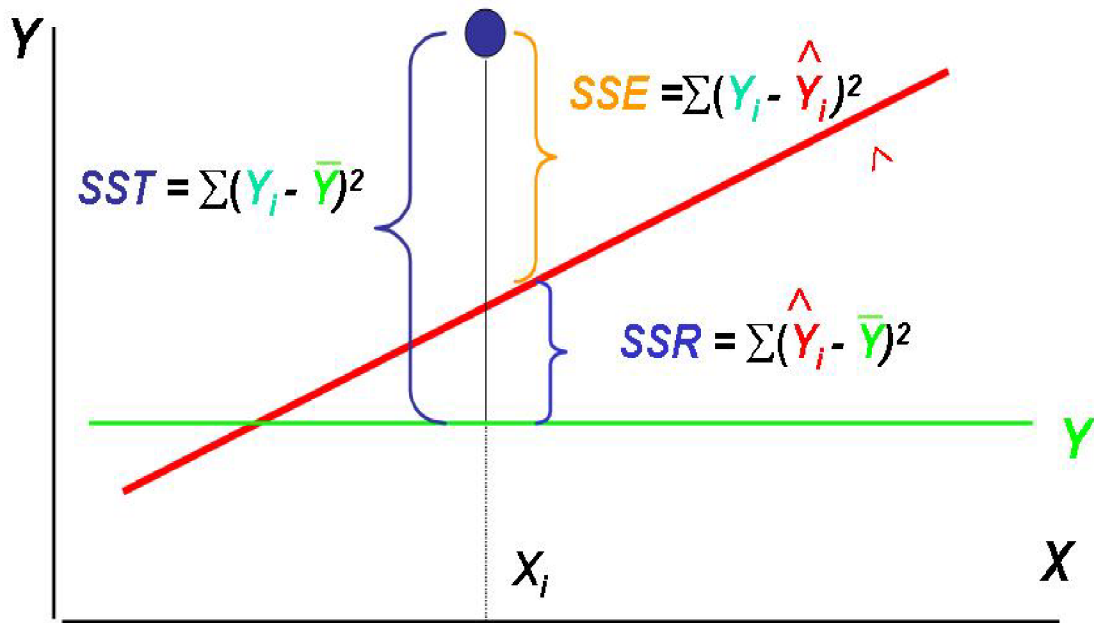
$$SSR = \sum_{i=1}^n w_i (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \quad (26)$$

$$SST = \sum_{i=1}^n w_i (y_i - \bar{y})^2 \quad (27)$$

kde $SST = SSR + SSE$. Vzhledem k rovnicím (26) a (27) lze zapsat koeficient determinace:

$$R^2 = \frac{SSR}{SST} = 1 - \frac{SSE}{SST} \quad (28)$$

Koeficient determinace může nabývat jakoukoliv hodnotu mezi 0 a 1. Čím více se hodnota přibližuje k 1, tím lépe model vysvětluje variabilitu dat kolem průměru. [35]



Obrázek 13 - Znáornění statistik SST, SSE s SSR [40]

Statistika *upravený koeficient determinace* využívá statistiku koeficientu determinace a upravuje se na základě zbytkových stupňů volnosti. Zbytkové stupně volnosti jsou vypočítané z rozdílu počtu datových hodnot (v) a koeficientů (m) použitých k odhadu pomocí regresního modelu. [35]

$$v = n - m \quad (29)$$

Statistika *upravený koeficient determinace* je obecně nejlepším ukazatelem kvality proložení dat modelů.

$$R_{adj.}^2 = 1 - \frac{SSE(n-1)}{SST(v)} \quad (30)$$

Upravený koeficient determinace může nabývat hodnot menších nebo rovných 1. Hodnoty blíží se k 1 označují lepší proložení dat. Může nabývat i záporných hodnot v případě, když je model nevhodný pro použití. [35]

Statistika *efektivní hodnota chyby (RMSE)* je také známa jako standardní chyba nebo standardní chyba regrese. Jedná se o odhad směrodatné odchylky náhodné složky v datech a je definována:

$$RMSE = s = \sqrt{MSE} \quad (31)$$

kde MSE je střední kvadratická chyba

$$MSE = \frac{SSE}{v} \quad (32)$$

Stejně jako v případě statistiky SSE, i při MSE statistice hodnota blížící se k 0 znamená, že model je vhodnější pro předpověď. [35]

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Cíl práce

Cílem bakalářské práce byl zaměřen na matematické modelování růstu vybraného druhu mikroorganismů, konkrétně *Lactobacillus casei* CCM 4798, při různých koncentracích zdroje uhlíku (glukóza, xylóza, laktóza).

Dalším cílem byla následná optimalizace parametrů obsažených ve vybraných modelech.

2.2 Použité přístroje a chemikálie

2.2.1 Přístroje a pomůcky

- Laminární box Aura Mini, BioAir
- Třepačka Unimax1010
- Ultrospec™ 10 Cell Density Meter
- Centrifuga Hettich EBA 20
- Minitřepačka lab dancer vario
- Sušárna Binder FD 53
- Analytické váhy PIONEER™ (OHAUS)
- Běžné laboratorní sklo



Obrázek 14 - Centrifuga EBA 20

2.2.2 Chemikálie použité k přípravě médií

- D-glukosa bezvodá, (p.a., výrobce Lach-Ner)
- Xylosa čistá (výrobce LACHEMA)
- Laktosa čistá (výrobce LACHEMA)
- pepton (výrobce HIMEDIA)
- hovězí extrakt (výrobce HIMEDIA)
- kvasničný extrakt (výrobce HIMEDIA)
- citrát amonný (p.a., výrobce ROTH)
- MgSO₄·7H₂O (p.a., výrobce Lach-Ner)

- MnSO₄.H₂O čistý (výrobce Lach-Ner)
- octan sodný bezvodý (p.a., výrobce Lach-Ner)
- K₂HPO₄ (p.a., Lach-Ner)

2.3 Kultivace, příprava médií a použité substráty

2.3.1 Použité substráty

K přípravě kultivačních médií a následnému studování růstu byly použité tři různé substráty – glukóza, xylóza, laktóza. Každý substrát byl následně použitý při kultivaci v sedmi různých koncentracích od 10 g.l⁻¹ do 40 g.l⁻¹.

2.3.2 Příprava kultivačních médií

Bylo naváženo potřebné množství chemikálií k přípravě 200 ml kultivačního média. Přesné navážky jsou uvedeny v tabulce 1. Jako zdroj uhlíku byla použita glukóza, xylóza a laktóza. Navážky sacharidů jsou uvedeny v tabulce 2, dle příslušných koncentrací. Všechny chemikálie byly rozpuštěny v 200 ml destilované vody a důkladně promíchané. Připravené média byla následně vysterilizována.

Tabulka 1 - Navážka chemikálií použitých pro přípravu 200 ml kultivačního média

Chemikálie	m [g]
pepton	2
hovězí extrakt	2
kvasničný extrakt	1
citrát amonný	0,4
octan sodný	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,02
MnSO ₄ .H ₂ O	0,01
K ₂ HPO ₄	0,4

Tabulka 2 - Navážka substrátu při různých koncentracích

c [g.l ⁻¹]	10	15	20	25	30	35	40
navážka substrátu [g]	2	3	4	5	6	7	8

2.3.3 Kultivace *Lactobacillus casei*

Kultivace byly prováděny v Erlenmeyerových baňkách v médiích připravených dle kapitoly 2.3.2. Do 200 ml kultivačního média bylo přidáno 20 ml inokula. Očkování bylo prováděno v laminárním boxu Aura Mini. Kultivace probíhala na temperované třepačce Unimax1010 při teplotě 37 °C za intenzivního míchání při 150 ot.min⁻¹. Všechny kultivace byly ukončeny po 24 hodinách.

2.4 Metody měření

2.4.1 Turbidimetrické stanovení růstové křivky

V průběhu kultivace byla každé dvě hodiny měřena optická hustota odebraného vzorku pomocí přístroje Ultrospec™ 10 Cell Density Meter. Turbidance byla měřena při vlnové délce 600 nm proti blanku. Jako blank bylo použité kultivační médium. Když hodnota optické hustoty přesáhla 1, bylo nutné vzorky ředit. V kapitole 3 Výsledky a diskuze jsou uvedené tabulky všech absorbancí s příslušným ředěním.

2.4.2 Vážkové stanovení růstové křivky

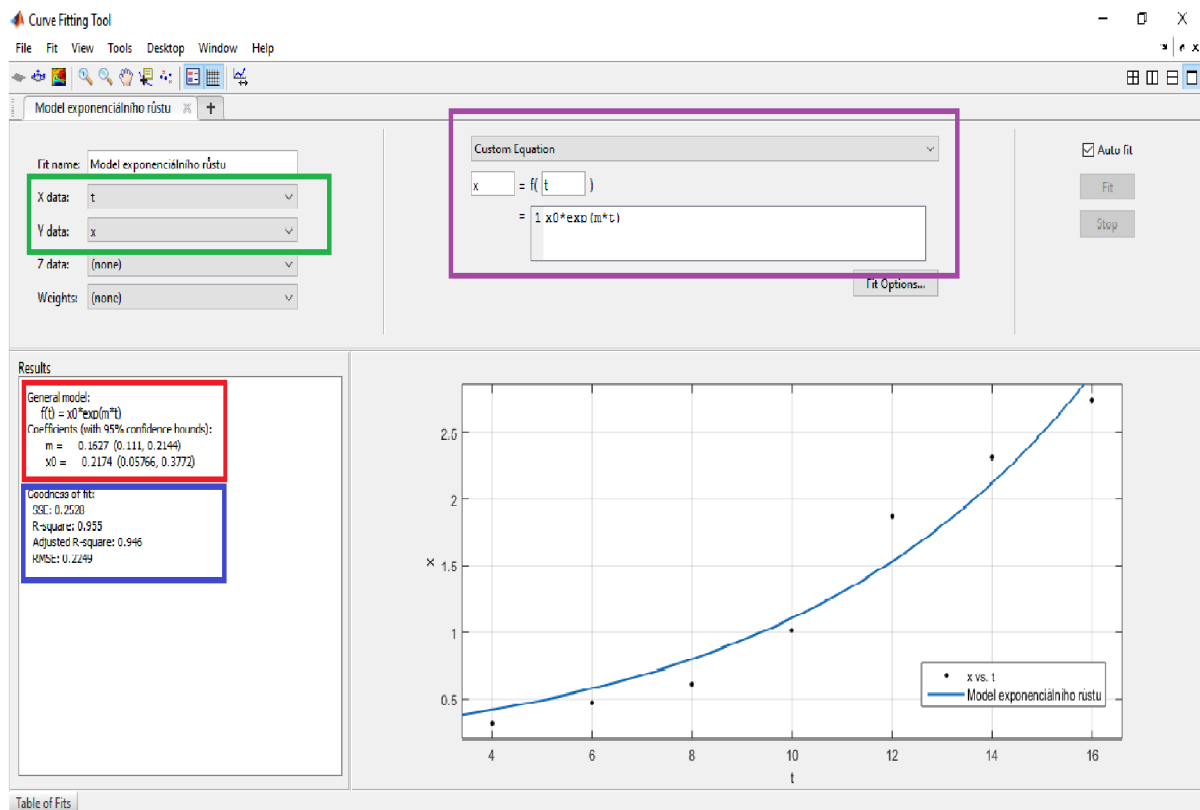
Během kultivace bylo odebíráno 10 ml vzorku v dvou hodinových intervalech. Vzorek byl následně centrifugován při 6000 ot.min⁻¹ po dobu 10 minut. Vzniklý supernatan byl slit a zbylý sediment byl promytý v 10 ml destilované vody, důkladně promíchán pomocí vortexu a opět zcentrifugován při 6000 ot.min⁻¹ po dobu 10 minut. Po centrifugaci byl supernatant vylit do odpadu a sediment byl protřepán s malým množstvím destilované vody a následně kvantitativně převeden na vysušené a zvážené odpařovací misky. Sušení probíhalo při teplotě 105 °C po dobu 60 minut. Po vysušení byla zvážená odpařovací miska se vzorkem na analytických vahách a z rozdílu hmotností bylo stanovené množství sušiny.

2.5 Zpracování výsledků v MATLABu

2.5.1 Výpočty hodnot parametrů v modelech

Pomocí programu MATLAB byly vypočítané parametry nacházející se ve vybraných modelech, a to maximální specifická růstová rychlost μ_{max} , počáteční koncentrace mikroorganismu x_0 a saturační koncentrace K_s . Vypočítané hodnoty parametrů a příslušné grafy modelů byly získané pomocí aplikace Curve Fitting toolbox metodou nejmenších čtverců.

Prvním krokem bylo importování naměřených a vypočítaných dat do MATLABu z příslušného souboru v programu Excel. Naměřené a vypočítané data v tomto případě jsou hodnoty času a koncentrace mikroorganismu v exponenciální fázi, při použití daného substrátu v příslušné koncentraci (např. glukóza, koncentrace 10 g.l⁻¹). Potom byla spuštěna aplikace Curve Fitting toolbox a do kolonek X data a Y data (Obrázek 15, zelené ohraničení) byly vloženy předem importované hodnoty času a koncentrace mikroorganismu. Následně byla z nabídky rovnic pro proložení dat vybraná tzv. uživatelská rovnice, což znamená, že byla vepsaná rovnice daného modelu do příslušného okénka (Obrázek 15, fialové ohraničení). V MATLABu byla křivka v grafu automaticky přizpůsobena danému modelu a vloženým datem. Na levé straně obrázku 15 byly ihned zobrazeny výsledky, tedy hodnoty parametrů (červený ohraničení) a statistická analýza modelu (modré ohraničení). Parametry byly vypočítané v MATLABu s 95 % pravděpodobností.



Obrázek 15 - Zpracování výsledků pomocí programu MATLAB a aplikace Curve Fitting toolbox

2.5.2 Statistické zpracování výsledků

V programu MATLAB byla vypočítaná základní statistická charakteristika matematického modelu. Po vepsání rovnice daného modelu (Obrázek 15, fialový rámeček) se zobrazí statistika (Obrázek 15, modrý rámeček), která nám říká o jeho přesnosti. V MATLABu je statistika nazvaná Goodness of fit a skládá se ze statistických výpočtů sumy čtverců reziduálních odchylek, koeficientu determinace, upraveného koeficientu determinace a efektivní hodnoty chyby. Tyto statistiky dostatečně popisují přesnost proložení dat modelem a dávají nám představu, do jaké míry je matematický model schopen predikce. Všechny zjištěné hodnoty statistik jsou zapsané v tabulkách v kapitole 3.1.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1 Růstové křivky

V průběhu kultivace byl sledován růst bakterií druhu *Lactobacillus casei* při optimální teplotě 37 °C. Zdrojem uhlíku v první sérii kultivací byla glukóza v sedmi různých koncentracích. V druhé sérii kultivací zdroj uhlíku byla xylóza a ve třetí sérii laktóza, taktéž v sedmi různých koncentracích.

Zdroje uhlíku byly zvoleny tak, aby každý z nich patřil do jiné skupiny sacharidů a následně se dalo zjistit, který zdroj uhlíku je mikroorganismem nejlépe využíván. Glukóza a xylóza jsou monosacharidy a laktóza je disacharid složený z galaktózy a glukózy navzájem spojených β-1,4-glykosidickou vazbou. Glukóza se zařazuje dle struktury mezi aldohexózy a xylóza patří mezi pentózy.

Růst bakterií byl sledován jako závislost optické hustoty měřené při vlnové délce 600 nm na čase a jako závislost koncentrace sušiny biomasy na čase.

$$\text{Výpočet koncentrace sušiny: } c = \frac{m}{V} = \frac{m_{\text{miska se sušinou}} - m_{\text{miska}}}{V}$$

$$\text{Příklad pro } t = 0 \text{ a koncentraci glukózy } 10 \text{ g.l}^{-1} : c = \frac{1,1802 - 1,1786}{0,01} = 0,16 \text{ g.l}^{-1}$$

3.1.1 Zdroj uhlíku: glukóza

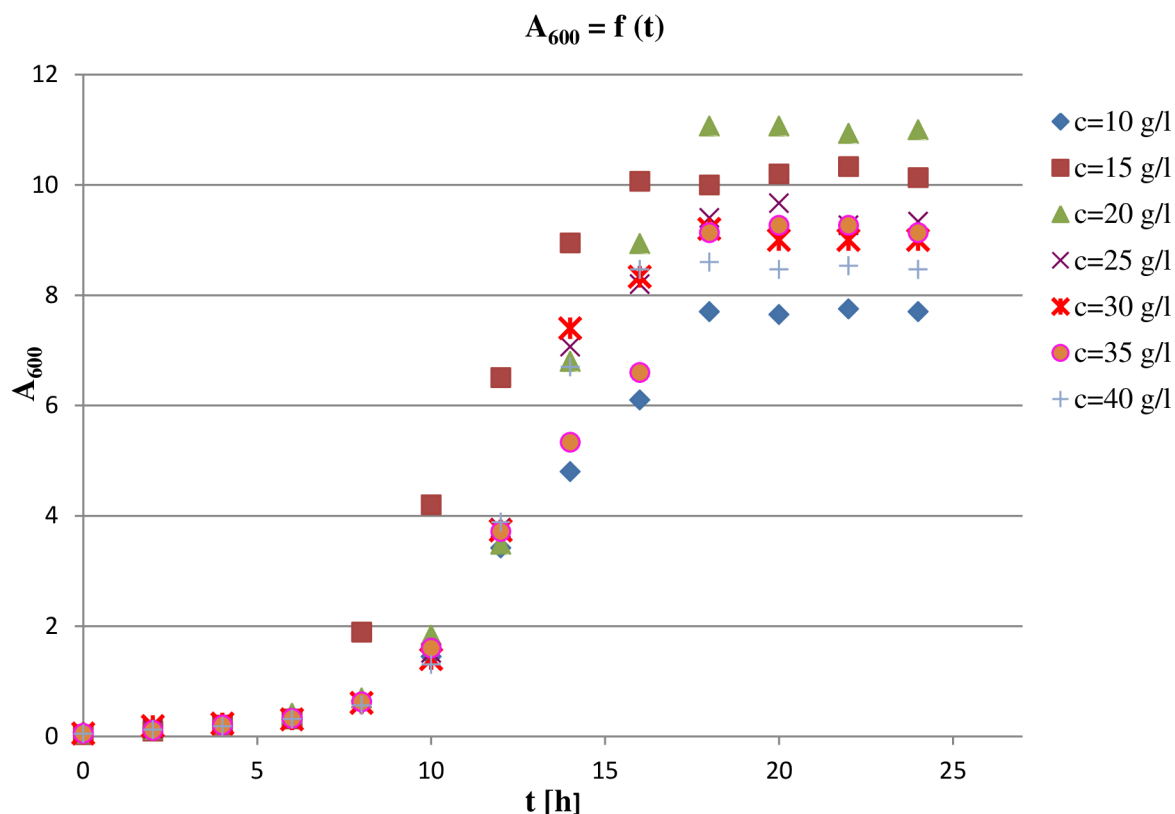
Růstové křivky stanovené turbidimetricky

Naměřené hodnoty absorpance A_{600} během kultivace *Lactobacillus casei* v médiu s glukózou při 37 °C jsou uvedeny v tabulce 3. Od 10. hodiny růstu bylo nutné odebrané vzorky ředit, protože měřené hodnoty absorpance přesahovaly hodnotu 1. Při ředění byly hodnoty absorpance vypočítané jako dvojnásobek, pětinasobek, desetinásobek nebo patnáctinásobek naměřených hodnot. Takhle vypočítané hodnoty byly vloženy do tabulky 3 a byly vyneseny do grafu 1, jako závislost absorpance A_{600} na čase.

Tabulka 3 - Závislost absorpance A_{600} na čase (zdroj uhlíku glukóza)

čas [h]	A_{600}							ředění
0	0,07	0,03	0,06	0,06	0,05	0,06	0,05	-
2	0,15	0,10	0,13	0,14	0,19	0,11	0,12	
4	0,21	0,21	0,23	0,21	0,23	0,21	0,18	
6	0,31	0,32	0,42	0,32	0,31	0,33	0,32	
8	0,65	1,89	0,70	0,61	0,61	0,63	0,56	
10	1,45	4,20	1,83	1,51	1,40	1,60	1,31	2
12	3,42	6,51	3,48	3,78	3,73	3,72	3,88	5
14	4,80	8,95	6,80	7,07	7,40	5,33	6,70	10
16	6,10	10,07	8,93	8,20	8,33	6,60	8,67	15
18	7,70	10,00	11,07	9,40	9,20	9,13	8,60	
20	7,65	10,20	11,07	9,67	9,00	9,27	8,47	
22	7,75	10,33	10,93	9,27	9,00	9,27	8,53	
24	7,70	10,13	11,00	9,33	9,00	9,13	8,47	
c [g.l ⁻¹]	10	15	20	25	30	35	40	

Graf 1 - Růstové křivky *L. casei* v médiu s glukózou v sedmi různých koncentracích (závislost absorbance na čase při 600 nm)



Z grafu 1 lze vidět, že největší nárůst byl prokázán v médiu s koncentrací glukózy 20 g.l⁻¹, kde maximální absorbance dosahuje hodnoty 11,07. Nejnižší nárůst byl pozorován v médiu s koncentrací glukózy 10 g.l⁻¹, z čehož lze usuzovat limitaci růstu *Lactobacillus casei* nízkou koncentrací glukózy. Maximální absorbance v tomto případě dosáhla pouze hodnoty 7,75. Nízkého nárůstu se dosáhlo i v médiu s koncentrací glukózy 40 g.l⁻¹, a tedy vysoká koncentrace mohla působit na růst inhibičně.

Z růstových křivek jsou zřejmé všechny fáze růstu. Z grafu 1, lze usoudit, že nejkratší lag fáze probíhala v médiu s koncentrací glukózy 15 g.l⁻¹, a v tomto případě nastal i vysoký nárůst *L. casei*. Exponenciální fáze většiny růstových křivek začínala kolem 8. hodiny a končila 18. hodinou. Exponenciální fáze růstu v médiu s koncentrací glukózy 15 g.l⁻¹ začínala i končila o dvě hodiny dříve jako u ostatních koncentrací. Kultivace a měření absorbance bylo zastaveno po 24 hodinách z důvodu průběhu stacionární fáze růstu.

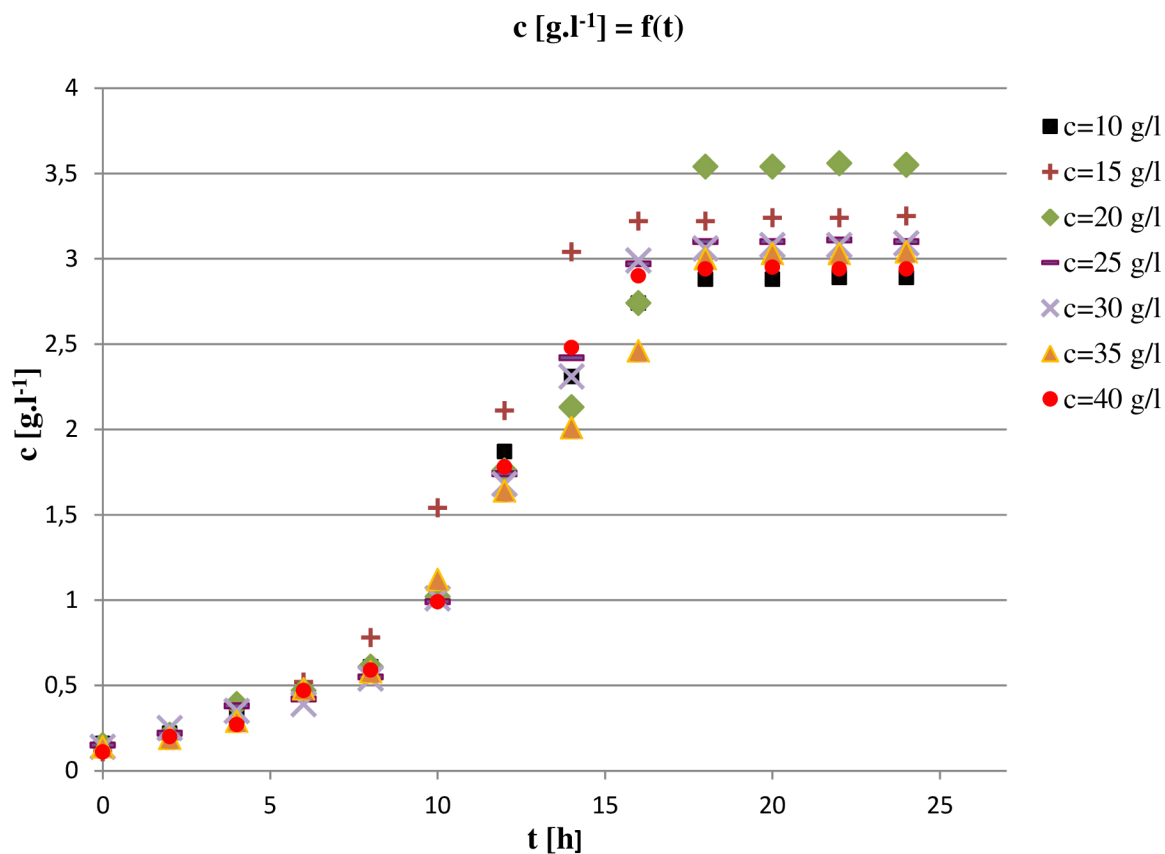
Růstové křivky stanovené vázkovou metodou

Odebírané vzorky v průběhu kultivace *Lactobacillus casei* při 37 °C v přítomnosti glukózy byly zcentrifugované, pročištěné destilovanou vodou a sušené při 105 °C. Vypočítané hodnoty koncentrace sušiny biomasy jsou uvedeny v tabulce 4. Do grafu 2 byla vynesena závislost koncentrace sušiny biomasy na čase.

Tabulka 4 - Závislost koncentrace sušiny biomasy na čase (zdroj uhlíku glukóza)

čas [h]	koncentrace sušiny biomasy [g.l ⁻¹]						
0	0,16	0,11	0,15	0,15	0,14	0,14	0,11
2	0,22	0,19	0,21	0,22	0,25	0,19	0,20
4	0,32	0,40	0,39	0,38	0,35	0,29	0,27
6	0,47	0,52	0,47	0,42	0,39	0,48	0,47
8	0,61	0,78	0,61	0,55	0,54	0,58	0,59
10	1,02	1,54	1,02	0,99	1,01	1,12	0,99
12	1,87	2,11	1,76	1,74	1,68	1,64	1,78
14	2,31	3,04	2,13	2,42	2,31	2,01	2,48
16	2,74	3,22	2,74	2,97	2,99	2,46	2,90
18	2,88	3,22	3,54	3,10	3,06	3,00	2,94
20	2,88	3,24	3,54	3,10	3,08	3,03	2,95
22	2,89	3,24	3,56	3,11	3,08	3,03	2,94
24	2,89	3,25	3,55	3,10	3,09	3,04	2,94
c [g.l ⁻¹]	10	15	20	25	30	35	40

Graf 2 - Růstová křivka *L. casei* v médiu s glukózou v sedmi různých koncentracích (závislost koncentrace biomasy na čase)



Růstové křivky sestrojené jako závislost koncentrace sušiny biomasy na čase (Graf 2) mají podobné charakteristiky jako křivky sestrojené turbidimetricky (Graf 1). Nejvyššího nárůstu se dosáhlo v médiu s koncentrací glukózy 20 g.l⁻¹ a maximální dosažená koncentrace biomasy byla 3,56 g.l⁻¹. Nejnižší růst byl prokázán v médiu s koncentrací glukózy 10 g.l⁻¹, a tato koncentrace tedy působila na růst limitně. Maximální koncentrace biomasy v médiu dosáhla hodnoty 2,89 g.l⁻¹. Nízký nárůst byl pozorován i v médiu s koncentrací glukózy 40 g.l⁻¹, která mohla působit inhibičně na růst a koncentrace biomasy v tomto případě dosáhla maximální hodnoty 2,94 g.l⁻¹.

Nejkratší lag fáze bylo dosaženo v médiu s koncentrací glukózy 15 g.l⁻¹, exponenciální fáze v tomto případě začala mezi 2. až 4. hodinou a konec nastal v 16. hodině. V ostatních případech exponenciální fáze začala v 4. hodině a konec nastal v hodině 18.

3.1.2 Zdroj uhlíku: xylóza

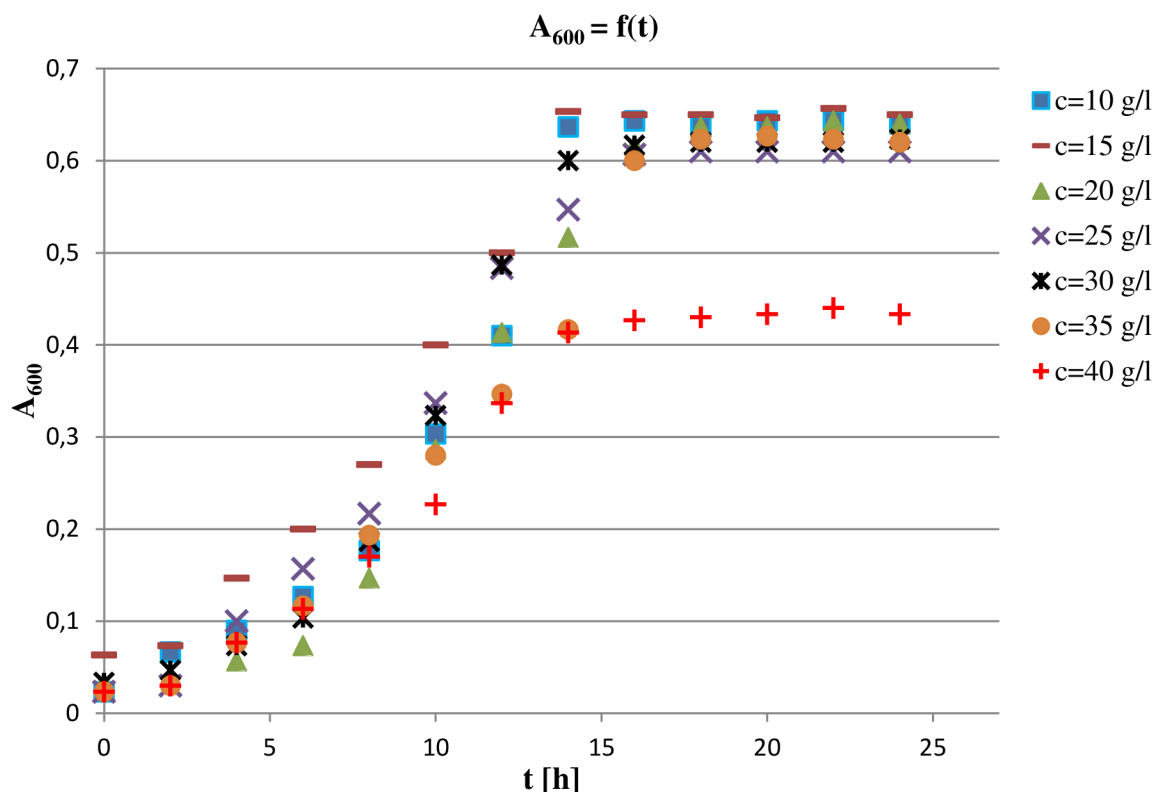
Růstové křivky stanovené turbidimetricky

Naměřené hodnoty absorbance A_{600} v průběhu kultivace *L. casei* v médiu s xylózou v sedmi různých koncentracích při 37 °C jsou uvedeny v tabulce 5. Vzorok bylo nutné ředit, protože hodnoty absorbance dosáhly nejvyšší hodnoty 0,64. Hodnoty byly vyneseny do grafu 3 jako závislost absorbance A_{600} na čase.

Tabulka 5 - Závislost absorbance A_{600} na čase (zdroj uhlíku xylóza)

t [h]	A_{600}							ředění
	0,02	0,06	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	
0	0,02	0,06	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	-
2	0,07	0,07	0,04	0,03	0,05	0,03	0,03	
4	0,09	0,15	0,06	0,10	0,07	0,08	0,08	
6	0,13	0,20	0,07	0,16	0,10	0,12	0,11	
8	0,18	0,27	0,15	0,22	0,19	0,19	0,17	
10	0,30	0,40	0,29	0,34	0,32	0,28	0,23	
12	0,41	0,50	0,41	0,48	0,49	0,35	0,34	
14	0,64	0,65	0,52	0,55	0,60	0,42	0,41	
16	0,64	0,65	0,62	0,61	0,62	0,60	0,43	
18	0,64	0,65	0,64	0,61	0,62	0,62	0,43	
20	0,64	0,65	0,64	0,61	0,62	0,63	0,43	
22	0,64	0,66	0,64	0,61	0,62	0,62	0,44	
24	0,64	0,65	0,64	0,61	0,62	0,62	0,43	
c [g.l ⁻¹]	10	15	20	25	30	35	40	

Graf 3 - Růstové křivky *L. casei* v médiu s xylózou v sedmi různých koncentracích (závislost absorbance na čase při 600 nm)



V grafu 3 jsou zobrazeny růstové křivky *L. casei* v závislosti absorbance na čase. Graf 3 obsahuje všech sedem růstových křivek, které se mění v závislost od koncentrace zdroje uhlíku, v tomto případě xylózy.

Nejnižší nárůst byl dosažený při koncentraci xylózy 40 g.l⁻¹ v médiu, a tím lze usuzovat, že vysoká koncentrace xylózy působí na růst *L. casei* inhibičně. Hodnota absorbance v tomto případě dosáhla maximální hodnoty 0,44. Exponenciální fáze růstové křivky v případě koncentraci xylózy 40 g.l⁻¹ v médiu začala mezi 2. až 4. hodinou a konec nastal v 14. hodině.

Největší nárůst lze dle grafu 3 pozorovat při koncentraci xylózy 15 g.l⁻¹. Při této koncentraci xylózy začala exponenciální fáze od 2. hodiny a skončila v 14. hodině. Maximální naměřená hodnota absorbance byla 0,66.

Růstové křivky *L. casei* při ostatních koncentracích xylózy v médiu jsou velmi podobné, lag fáze je kratší než při použití glukózy jako zdroje uhlíku a exponenciální fáze probíhá od 2. až 4. hodiny do 14. až 16. hodiny.

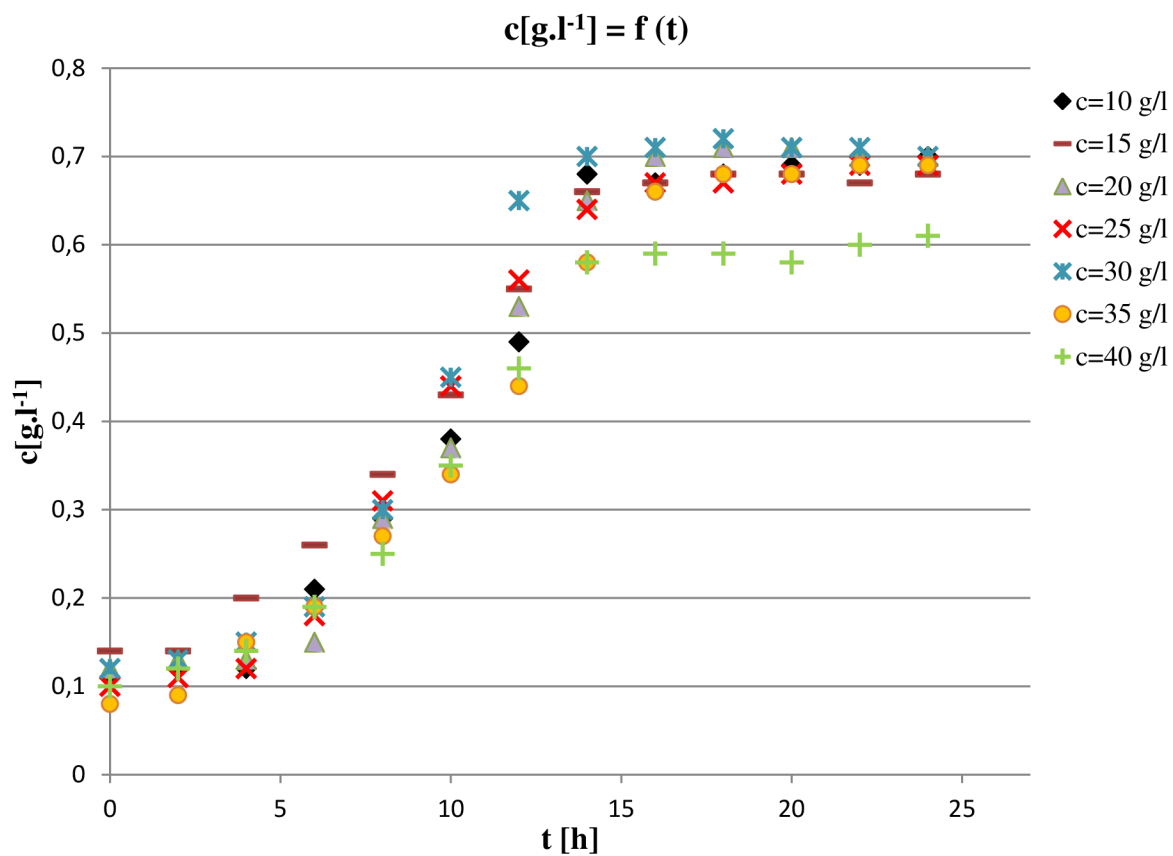
Růstové křivky stanovené vázkovou metodou

Vypočítané hodnoty koncentrace sušiny biomasy jsou uvedeny v tabulce 6. Do grafu 4 byla vynesena závislost koncentrace sušiny biomasy na čase, která se mění v závislosti od počáteční koncentrace xylózy v médiu.

Tabulka 6 - Závislost koncentrace sušiny biomasy na čase (zdroj uhlíku xylóza)

čas [h]	koncentrace sušiny biomasy [g.l ⁻¹]						
	10	15	20	25	30	35	40
0	0,11	0,14	0,12	0,1	0,12	0,08	0,1
2	0,12	0,14	0,13	0,11	0,13	0,09	0,12
4	0,12	0,2	0,13	0,12	0,15	0,15	0,14
6	0,21	0,26	0,15	0,18	0,19	0,19	0,19
8	0,29	0,34	0,29	0,31	0,3	0,27	0,25
10	0,45	0,41	0,37	0,44	0,45	0,34	0,35
12	0,59	0,55	0,53	0,56	0,65	0,44	0,46
14	0,68	0,66	0,65	0,64	0,7	0,58	0,58
16	0,67	0,67	0,7	0,67	0,71	0,66	0,59
18	0,68	0,68	0,71	0,67	0,72	0,68	0,59
20	0,69	0,68	0,71	0,68	0,71	0,68	0,58
22	0,69	0,67	0,7	0,69	0,71	0,69	0,6
24	0,7	0,68	0,7	0,69	0,7	0,69	0,61
c [g.l⁻¹]	10	15	20	25	30	35	40

Graf 4 - Růstová křivka *L. casei* v médiu s xylózou v sedmi různých koncentracích (závislost koncentrace biomasy na čase)



Růstové křivky zobrazené v grafu 4 jsou svým průběhem velmi podobné. Exponenciální fáze začíná mezi 2. až 4. hodinou a její konec nastává v 14. hodině (při počáteční koncentraci xylózy v médiu 35 g.l⁻¹ konec nastává až v 16. hodině).

Nejnižší prokazatelný růst nastal při koncentraci xylózy 40 g.l⁻¹, a tedy vysoká koncentrace substrátu (zdroje uhlíku) působí na růst inhibičně. Maximální koncentrace sušiny biomasy dosáhla hodnoty 0,61 g.l⁻¹.

Nejvyšší nárůst v tomto případě definovat s přesností nejde, protože jak vizuální zobrazení v grafu 4, tak i číselné hodnoty v tabulce 6 jsou v případě počáteční koncentrací xylózy v médiu 10–35 g.l⁻¹ téměř totožné. Nejvyšší vypočítané koncentraci sušiny biomasy se však dosáhlo při koncentraci xylózy 30 g.l⁻¹, a to koncentrace 0,72 g.l⁻¹.

3.1.3 Zdroj uhlíku: laktóza

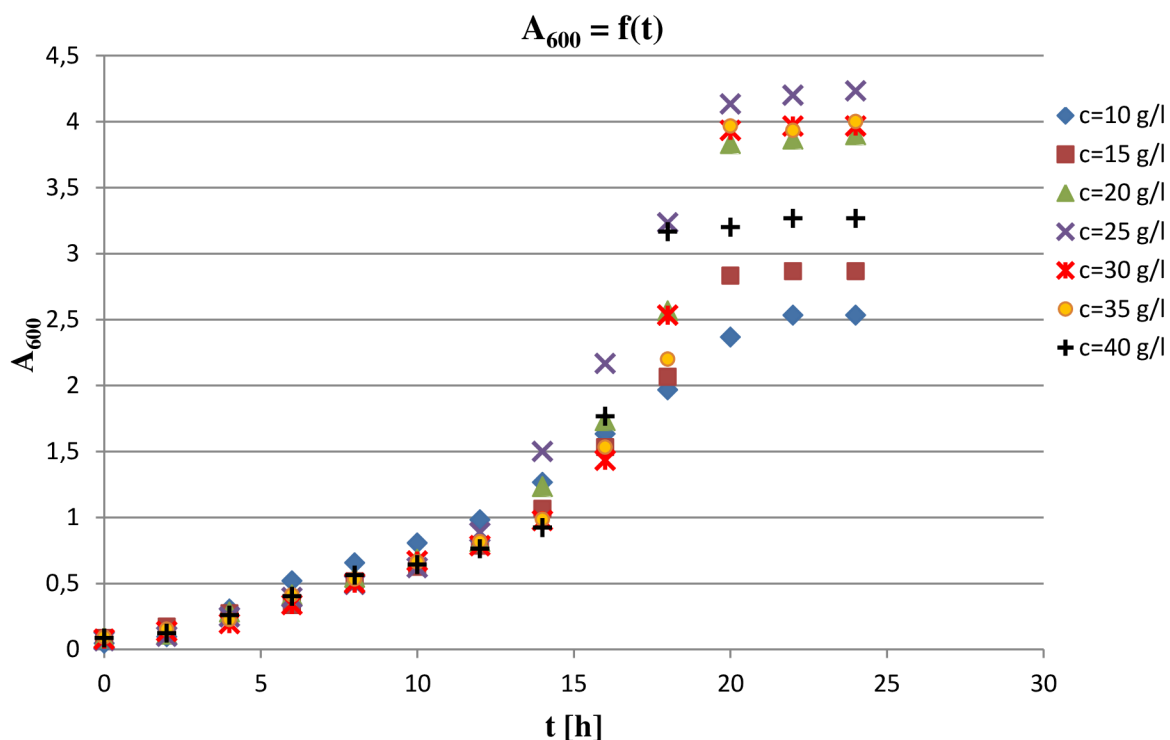
Růstové křivky stanovené turbidimetricky

Hodnoty absorbance A_{600} naměřené v průběhu pěstování *L. casei* v médiu s laktózou v sedmi různých koncentracích při 37 °C jsou uvedeny v tabulce 7. Od 14. hodiny bylo nutné odebrané vzorky ředit, protože hodnota absorbance přesáhla hodnotu 1. V tabulce 7 a v grafu 5 jsou hodnoty absorbance již vynásobené příslušným ředěním.

Tabulka 7 - Závislost absorbance A_{600} na čase (zdroj uhlíku laktóza)

čas [h]	A_{600}							ředění	
0	0,05	0,09	0,09	0,07	0,08	0,09	0,09	-	
2	0,10	0,17	0,12	0,10	0,14	0,15	0,12		
4	0,31	0,27	0,28	0,25	0,20	0,23	0,26		
6	0,52	0,34	0,41	0,39	0,34	0,41	0,40		
8	0,66	0,52	0,55	0,49	0,50	0,53	0,56		
10	0,81	0,63	0,68	0,62	0,67	0,66	0,64		
12	0,98	0,79	0,82	0,89	0,79	0,82	0,76		
14	1,27	1,07	1,23	1,50	0,98	0,99	0,92		10
16	1,63	1,53	1,73	2,17	1,43	1,53	1,77		
18	1,97	2,07	2,57	3,23	2,53	2,20	3,17		
20	2,37	2,83	3,83	4,13	3,93	3,97	3,20		
22	2,53	2,87	3,87	4,20	3,97	3,93	3,27		
24	2,53	2,87	3,90	4,23	3,97	4,00	3,27		
c [g/l]	10	15	20	25	30	35	40		

Graf 5 - Růstové křivky *L. casei* v médiu s laktózou v sedmi různých koncentracích (závislost absorbance na čase při 600 nm)



Z grafu 5 nelze zcela dobře určit fáze růstových křivek. Kromě křivky *L. casei* rostoucího v médiu s laktózou o koncentraci 10 g.l^{-1} , všechny ostatní jsou téměř totožné do 12 hodiny. Od této hodiny je z grafu znát rozdíly v růstu a nejvyšší nárůst byl dosažený v médiu s koncentrací laktózy 25 g.l^{-1} . Maximální naměřená absorbance při této koncentraci byla 4,23. Nejnižší nárůst byl pozorován v médiu s laktózou o koncentraci 10 g.l^{-1} , přičemž maximální naměřené absorbance byla 2,53.

Začátek exponenciální fáze z grafu určit nelze, ale konec u všech sedmi koncentrací laktózy nastal v 20 hodině.

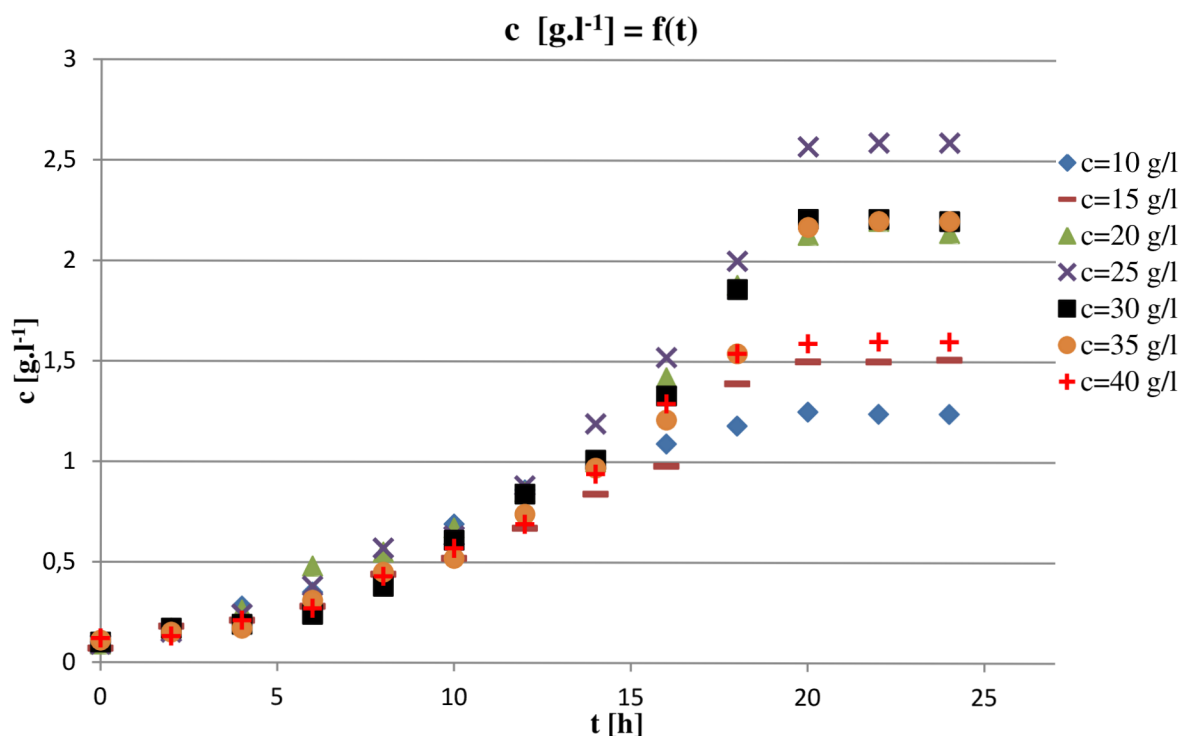
Růstové křivky stanovené vázkovou metodou

Vzorky odebírané v průběhu kultivace *Lactobacillus casei* při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ v přítomnosti laktózy v sedmi různých koncentracích v médiu byly zcentrifugované, pročištěné destilovanou vodou a sušené při $105 \text{ }^\circ\text{C}$. Vypočítané hodnoty koncentrace sušiny biomasy jsou uvedeny v tabulce 8. Do grafu 6 byla vynesena závislost koncentrace sušiny biomasy na čase.

Tabulka 8 - Závislost koncentrace sušiny biomasy na čase (zdroj uhlíku laktóza)

čas [h]	koncentrace biomasy [g.l ⁻¹]						
	10	15	20	25	30	35	40
0	0,10	0,07	0,09	0,09	0,10	0,11	0,12
2	0,15	0,18	0,17	0,15	0,17	0,15	0,13
4	0,28	0,21	0,26	0,24	0,19	0,17	0,21
6	0,35	0,28	0,48	0,38	0,24	0,31	0,27
8	0,42	0,44	0,55	0,57	0,38	0,45	0,43
10	0,69	0,52	0,67	0,63	0,61	0,52	0,57
12	0,86	0,67	0,85	0,88	0,84	0,74	0,69
14	0,97	0,84	1,00	1,19	1,01	0,97	0,94
16	1,09	0,98	1,42	1,52	1,33	1,21	1,29
18	1,18	1,39	1,88	2,00	1,86	1,54	1,54
20	1,25	1,50	2,13	2,57	2,21	2,17	1,59
22	1,24	1,50	2,20	2,59	2,21	2,19	1,60
24	1,24	1,51	2,14	2,59	2,20	2,18	1,60
c [g.l ⁻¹]	10	15	20	25	30	35	40

Graf 6 - Růstová křivka *L. casei* v médiu s laktózou v sedmi různých koncentracích (závislost koncentrace sušiny biomasy na čase)



Z grafu 6, podobně jako z grafu 5, nelze vizuálně rozlišit začátek exponenciální fáze růstových křivek, ale její konec nastává v 20. hodině.

Nejvyšší nárůst biomasy byl pozorován v médiu s koncentrací laktózy 25 g.l⁻¹ a maximální vypočítaná koncentrace dosahuje hodnoty 2,59 g.l⁻¹.

Nejnižšího růstu se dosáhlo v médiu s koncentrací laktózy 10 g.l⁻¹ a nejvyšší koncentrace sušiny biomasy byla určena na 1,25 g.l⁻¹, což je přibližně o polovinu méně jako u média, kde byl nejvyšší růst. V tomto případě dochází k limitaci růstu nízkou koncentrací substrátu.

3.2 Identifikace modelů

3.2.1 Model exponenciálního růstu

Hodnoty maximální specifické růstové rychlosti μ_{max} a počáteční koncentrace mikroorganismu x_0 byly získané pomocí programu MATLAB a jeho aplikace Curve Fitting toolbox. Všechny hodnoty jsou uvedeny v tabulce 9.

Nejvyšší maximální specifická růstová rychlost v případě zdroje uhlíku glukózy byla zjištěna při počáteční koncentraci glukózy 10 g.l^{-1} , a to $0,1627 \text{ h}^{-1}$. Počáteční koncentrace mikroorganismu v tomto případě má hodnotu $0,2175 \text{ g.l}^{-1}$, teda nejnižší v případě použití glukózy v kultivačním médiu. Nejnižší max. specifické růstové rychlosti bylo dosaženo v médiu s koncentrací glukózy 40 g.l^{-1} a při této koncentraci se dosáhlo i nejvyšší počáteční koncentrace mikroorganismu $0,3085 \text{ g.l}^{-1}$.

Při použití xylózy v kultivačním médiu pro *L.casei*, byla nejvyšší μ_{max} dosažena při počáteční koncentraci xylózy 10 g.l^{-1} . V tomto případě bylo dosaženo i nejnižší počáteční koncentrace mikroorganismu $0,09392 \text{ g.l}^{-1}$. Nejnižší max. specifická růstová rychlost dosáhla hodnoty $0,09801 \text{ h}^{-1}$ při koncentraci xylózy v médiu 35 g.l^{-1} .

Když zdrojem uhlíku v kultivačním médiu byla laktóza, nejnižší μ_{max} se dosáhlo při počáteční koncentraci laktózy 10 g.l^{-1} , přičemž koncentrace mikroorganismu na začátku kultivace byla v tomto případě nejvyšší, a to $0,2467 \text{ g.l}^{-1}$. Nejvyšší μ_{max} byla zjištěná při koncentraci laktózy 35 g.l^{-1} a dosahuje hodnoty $0,1381 \text{ h}^{-1}$. Při koncentraci laktózy 35 g.l^{-1} je dosažena zároveň nejnižší počáteční koncentrace *L. casei*, $0,1344 \text{ g.l}^{-1}$.

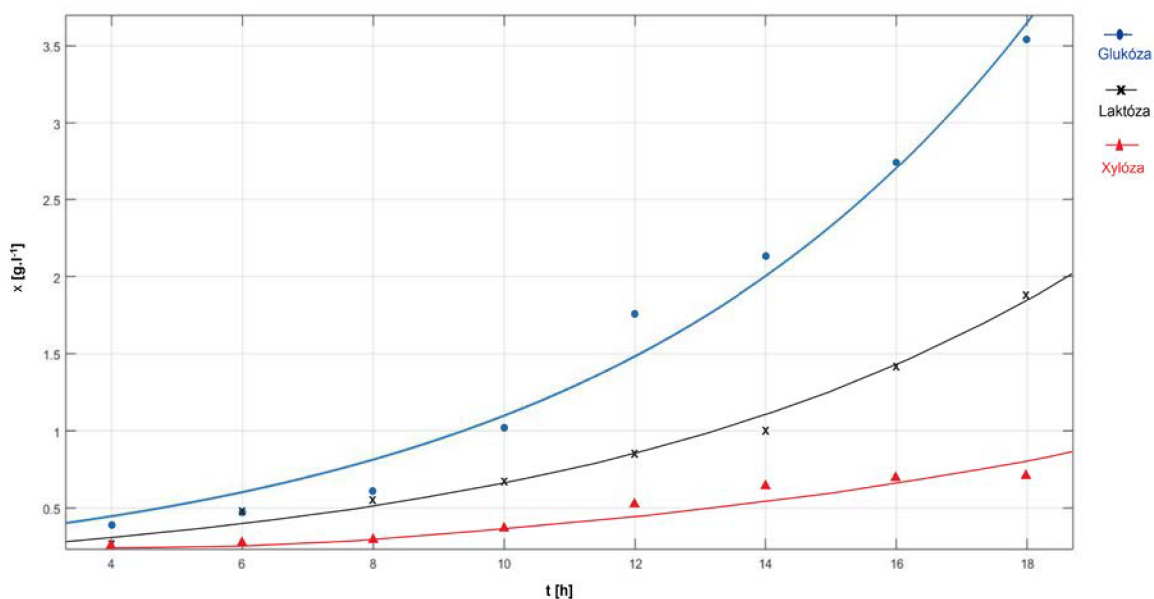
Tabulka 9 - Hodnoty parametrů modelu exponenciálního růstu

c[g/l]	Glukóza		Xylóza		Laktóza	
	$\mu_{max} [\text{h}^{-1}]$	$x_0 [\text{g.l}^{-1}]$	$\mu_{max} [\text{h}^{-1}]$	$x_0 [\text{g.l}^{-1}]$	$\mu_{max} [\text{h}^{-1}]$	$x_0 [\text{g.l}^{-1}]$
10	0,1627	0,2175	0,1458	0,09392	0,0914	0,2467
15	0,1545	0,2996	0,1172	0,13	0,111	0,1719
20	0,1501	0,2451	0,1251	0,1032	0,1181	0,2085
25	0,1385	0,2883	0,1108	0,1266	0,1346	0,1755
30	0,1405	0,2753	0,1112	0,136	0,1374	0,1473
35	0,136	0,2731	0,09801	0,1285	0,1381	0,1344
40	0,1328	0,3085	0,1101	0,1114	0,1115	0,1891

Ze získaných hodnot lze tedy konstatovat, že nejvyšší maximální specifické růstové rychlosti bylo dosaženo za použití glukózy v kultivačním médiu, a taky se v tomto případě dosahovalo nejvyšších hodnot počáteční koncentrace mikroorganismů. Za použití laktózy v médiu se v průměru dosahovalo vyšších hodnot μ_{max} a x_0 , jako u xylózy.

Graf 7 slouží jako ukázka proložení dat modelem exponenciálního růstu. Jsou v něm zobrazeny modelované exponenciální fáze při použití substrátu glukózy, laktózy a xylózy pro porovnání.

Graf 7 Ukázka proložení dat modelem exponenciálního růstu

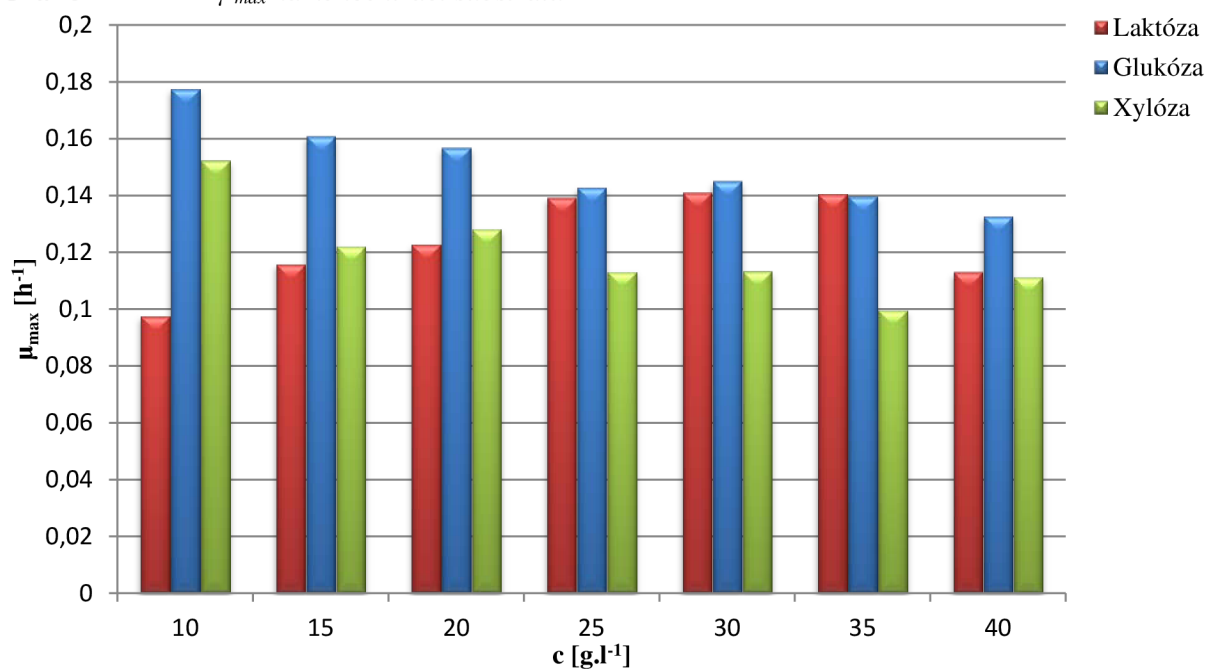


V grafu 7 je vynesena závislost koncentrace sušiny mikroorganismů na čase. Jsou tam zobrazeny exponenciální fáze *L. casei* při kultivaci v médiu s glukózou, laktózou a xylózou, přičemž všech zdroje uhlíku byly v počáteční koncentraci 20 g.l⁻¹.

V tomto případě lze vidět, že model exponenciálního růstu nejpřesněji prokládá exponenciální fázi při použití laktózy a xylózy, přičemž při těchto substrátech byl nižší nárůst mikroorganismů, jako při použití glukózy.

V grafu 8 je zobrazena závislost max. specifické růstové rychlosti na koncentraci příslušného substrátu použitého v kultivačním médiu pro *L. casei*.

Graf 8 - Závislost μ_{max} na koncentraci substrátu



Z grafu 8 lze vidět, že při glukóze jako substrátu se hodnota μ_{max} snižuje se zvyšující se počáteční koncentrací glukózy. Když byla substrátem laktóza, hodnota μ_{max} stoupala se stoupající počáteční koncentrací laktózy, přičemž při koncentracích 25, 30, 35 g.l⁻¹ jsou hodnoty μ_{max} velmi podobné a při koncentraci 40 g.l⁻¹ velikost μ_{max} klesla. Při použití xylózy se μ_{max} střídavě snižuje a zvyšuje od nejnižší počáteční koncentrace.

3.2.2 Monodův model

Hodnoty maximální specifické růstové rychlosti μ_{max} , saturační koncentrace K_s a počáteční koncentrace mikroorganismu x_0 byly vypočítané pomocí MATLABu a všechny hodnoty jsou uvedeny v tabulce 10. Hodnoty x_0 jsou v převážné většině totožné s hodnotami x_0 při použití modelu exponenciálního růstu, nebo se liší hodnotou na čtvrtém desetinném místě.

Nejvyšší μ_{max} v případě glukózy v médiu byla dosažená při počáteční koncentraci glukózy 10 g.l⁻¹, a to 0,1777 h⁻¹. Počáteční koncentrace mikroorganismu v tomto případě dosáhla nejnižší hodnoty 0,2174 g.l⁻¹. Nejnižší max. specifické růstové rychlosti 0,1354 h⁻¹ bylo dosaženo v médiu s koncentrací glukózy 40 g.l⁻¹ a v tomto případě bylo dosaženo i nejvyšší počáteční koncentrace mikroorganismů 0,3086 g.l⁻¹.

Při použití xylózy v živném médiu pro *L.casei*, byla nejvyšší μ_{max} , 0,1523 h⁻¹, zjištěna při počáteční koncentraci xylózy 10 g.l⁻¹, a při této koncentraci se dosáhlo i nejnižší hodnoty počáteční koncentraci mikroorganismů 0,0939 g.l⁻¹. Nejnižší max. specifická růstová rychlost dosáhla hodnoty 0,0998 h⁻¹ při koncentraci xylózy v médiu 35 g.l⁻¹.

Když substrátem v kultivačním médiu byla laktóza, nejnižší hodnota μ_{max} , 0,0977 h⁻¹, byla zjištěná při počáteční koncentraci laktózy 10 g.l⁻¹, přičemž koncentrace mikroorganismu na začátku kultivace, 0,2468 g.l⁻¹, je v tomto případě nejvyšší. Nejvyšší μ_{max} byla zjištěná při koncentraci laktózy 30 g.l⁻¹ a dosahuje hodnoty 0,1411 h⁻¹, přičemž při této koncentraci byla dosažena zároveň nejnižší počáteční koncentrace *L. casei* 0,1344 g.l⁻¹.

Hodnoty saturační koncentrace jsou nejvyšší při glukóze, pak při laktóze a nejnižších hodnot se dosahuje při použití xylózy.

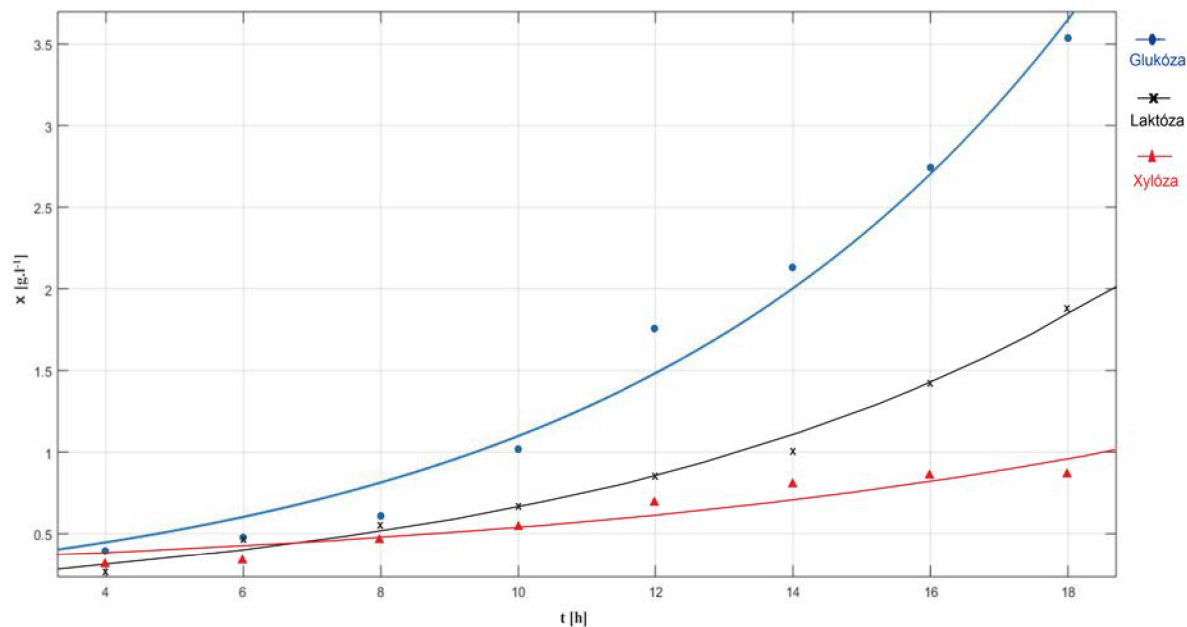
Tabulka 10 - Hodnoty parametrů při použití Monodova modelu

c [g.l ⁻¹]	Glukóza			Xylóza			Laktóza		
	μ_{max} [h ⁻¹]	x_0 [g.l ⁻¹]	K_s [g.l ⁻¹]	μ_{max} [h ⁻¹]	x_0 [g.l ⁻¹]	K_s [g.l ⁻¹]	μ_{max} [h ⁻¹]	x_0 [g.l ⁻¹]	K_s [g.l ⁻¹]
10	0,1777	0,2174	0,9224	0,1523	0,0939	0,4509	0,0977	0,2468	0,6832
15	0,161	0,2996	0,6254	0,1223	0,1300	0,6540	0,1161	0,1719	0,6962
20	0,1569	0,2451	0,9118	0,1283	0,1032	0,5132	0,1229	0,2085	0,8083
25	0,143	0,2883	0,8166	0,1134	0,1265	0,5868	0,1393	0,1755	0,8619
30	0,1451	0,2754	0,983	0,1132	0,136	0,5468	0,1411	0,1473	0,8145
35	0,1398	0,2731	0,9826	0,0998	0,1285	0,6281	0,1408	0,1344	0,6677
40	0,1354	0,3086	0,9577	0,1116	0,1114	0,5391	0,1131	0,1891	0,5519

Ze zjištěných dat lze konstatovat stejné závěry jako při modelu exponenciálního růstu. V grafu 9 jsou zobrazeny data exponenciální fáze proložené Monodovým modelem.

Pro vizuální ukázkou proložení dat modelem v programu MATLAB byly vybrány naměřené data exponenciálních fází při použití substrátu glukózy, laktózy a xylózy při koncentraci 20 g.l^{-1} .

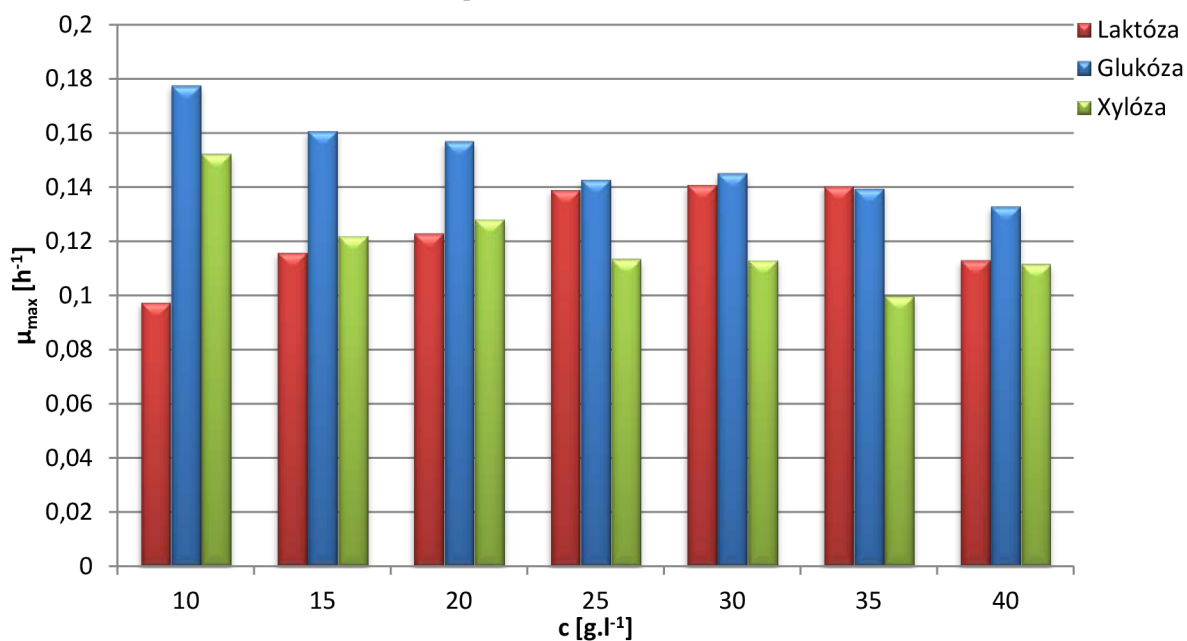
Graf 9 - Ukázka proložení dat Monodovým modelem



Z grafu 9 je vidět, že Monodův model nejlépe prokládá exponenciální fázi při kultivaci *L. casei* v přítomnosti laktózy. V případě použití glukózy v kultivačním médiu se data exponenciální fáze odchyľují od modelu nejvíc.

V grafu 10 je vynesena závislost max. specifické růstové rychlosti na koncentraci příslušného substrátu použitého v živném médiu pro *L. casei*.

Graf 10 - Závislost μ_{max} na koncentraci použitého substrátu



Graf 10 má stejné charakteristiky jako graf 8. Jediným rozdílem jsou o něco vyšší hodnoty maximálních specifických růstových rychlostí.

3.2.3 Tessierův model

Hodnoty parametrů μ_{max} , K_s a x_0 byly vypočítané pomocí MATLABu a všechny hodnoty jsou uvedeny v tabulce 11. Hodnoty x_0 a μ_{max} jsou v převážné většině totožné s hodnotami x_0 a μ_{max} při použití modelu exponenciálního růstu.

Všechny charakteristiky nejvyšších i nejnižších hodnot x_0 a μ_{max} jsou totožné s modelem exponenciálního růstu.

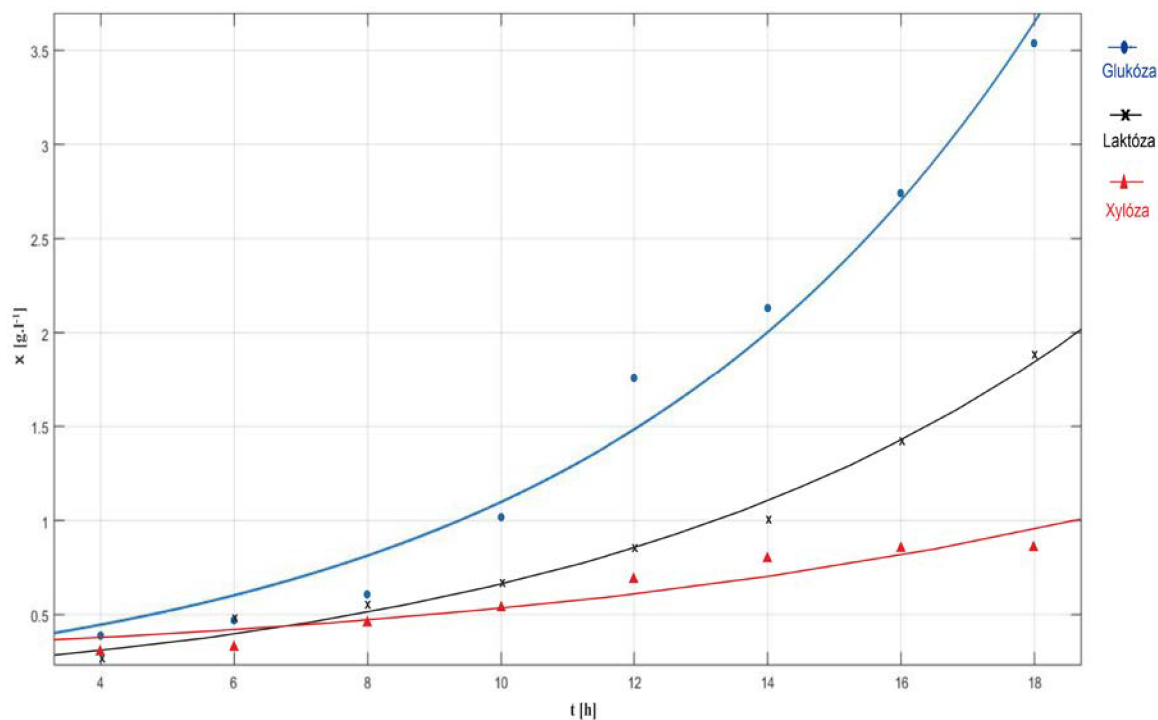
Hodnoty K_s jsou ve všech případech použitého substrátu nižší jako při Monodovém modelu. V průměru se nejvyšších hodnot saturační konstanty dosahuje při použití glukózy jako substrátu, pak při použití laktózy a nejnižší hodnoty byly zjištěny při xylóze.

V grafu 11 je vynesena závislost koncentrace mikroorganismu na čase. Graf slouží jako vizuální ukázka proložení dat Tessierovým modelem v programu MATLAB. Pro ukázku byly modelované data exponenciálních fází při použití substrátu glukózy, laktózy a xylózy při koncentraci 20 g.l⁻¹.

Tabulka 11 - Hodnoty parametrů při použití Tessierova modelu

c [g.l ⁻¹]	Glukóza			Xylóza			Laktóza		
	μ_{max} [h ⁻¹]	x_0 [g.l ⁻¹]	K_s [g.l ⁻¹]	μ_{max} [h ⁻¹]	x_0 [g.l ⁻¹]	K_s [g.l ⁻¹]	μ_{max} [h ⁻¹]	x_0 [g.l ⁻¹]	K_s [g.l ⁻¹]
10	0,1627	0,2175	0,8676	0,1458	0,0939	0,4108	0,0915	0,2463	0,5470
15	0,1545	0,2996	0,5577	0,1172	0,1300	0,5797	0,1110	0,1719	0,5861
20	0,1501	0,2451	0,8068	0,1251	0,1032	0,4893	0,1181	0,2085	0,6878
25	0,1385	0,2884	0,6820	0,1108	0,1266	0,5328	0,1346	0,1755	0,8256
30	0,1405	0,2754	0,9816	0,1111	0,1360	0,4711	0,1374	0,1473	0,6664
35	0,1360	0,2731	0,9686	0,0979	0,1285	0,5186	0,1381	0,1344	0,4985
40	0,1328	0,3086	0,7805	0,1101	0,1114	0,3986	0,1116	0,1891	0,4325

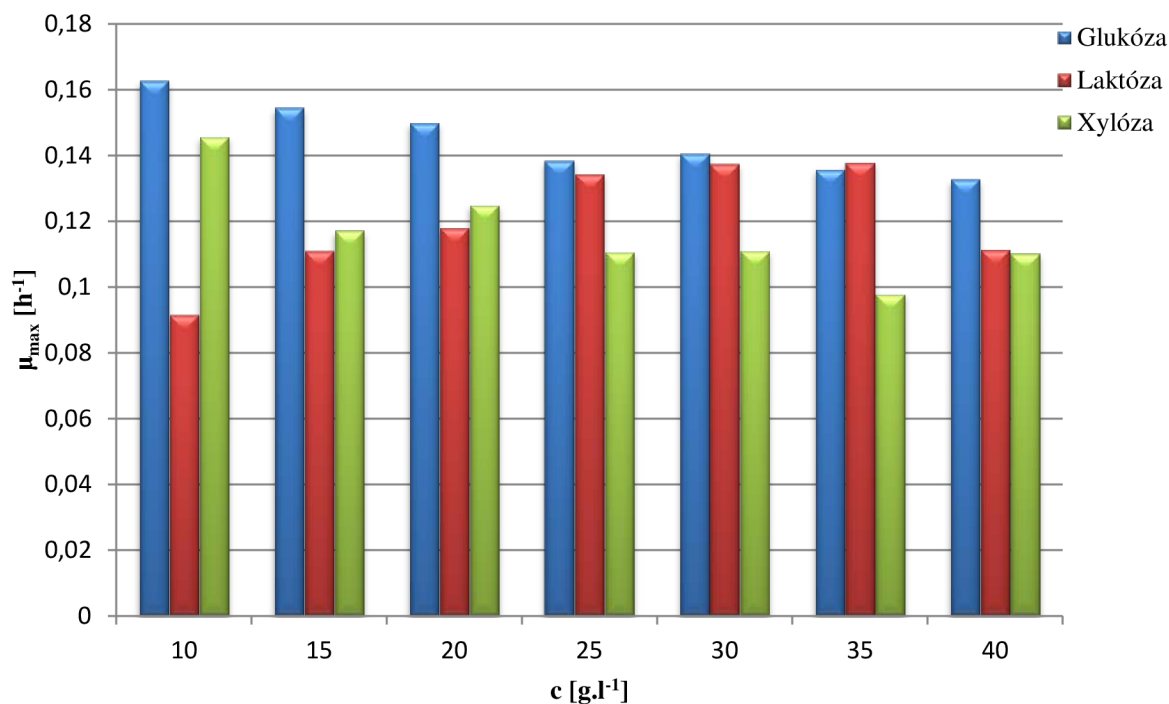
Graf 11 - Zobrazení proložení dat Tessierovým modelem



Graf 11 zobrazuje stejné proložení dat, jako při použití Monodova modelu, a tedy charakteristiky jsou stejné jako při graf 9.

V grafu 12 je vynesena závislost μ_{max} na koncentraci použitého substrátu v kulturačním médiu pro *L. casei*.

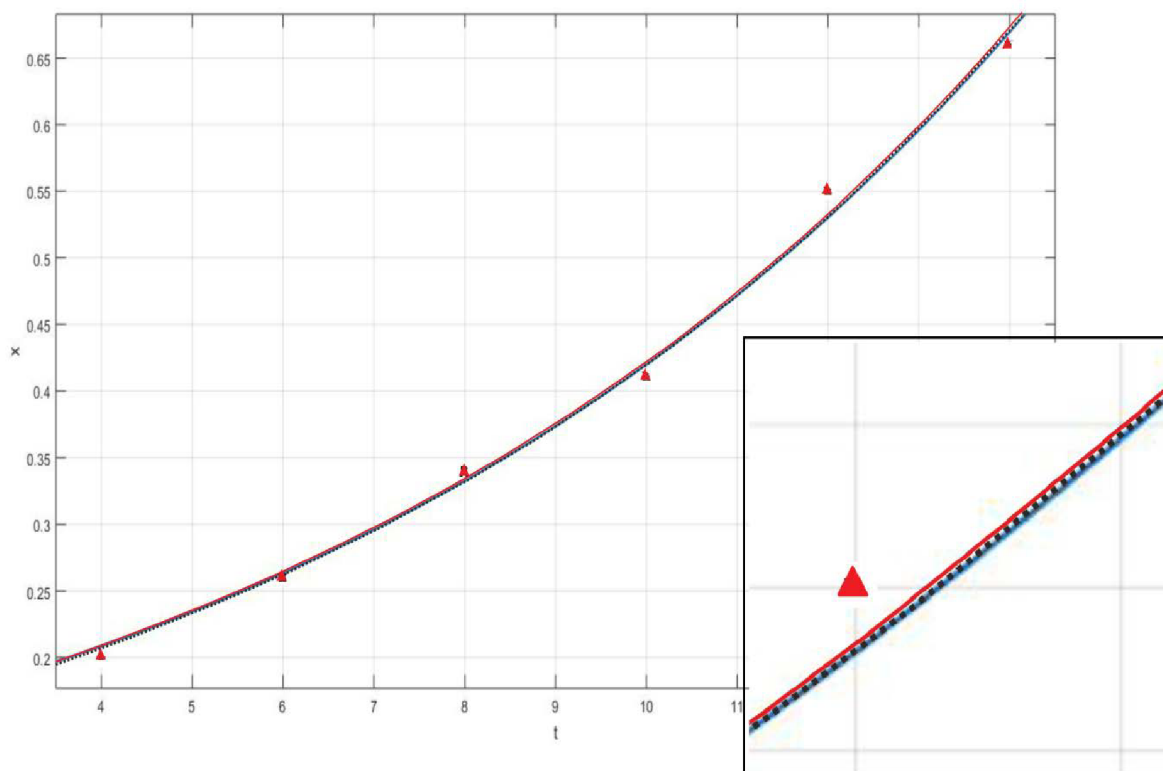
Graf 12 - Závislost μ_{max} na koncentraci použitého substrátu



Graf 12 je zcela totožný s grafem 8, protože zjištěné hodnoty parametru μ_{max} jsou stejné, jako při modelu exponenciálního růstu.

V grafu 13 je zobrazeny model exponenciálního růstu, Monodův a Tessierův model při použití xylózy v médiu v koncentraci 15 g.l^{-1} . Graf slouží k vizuálnímu porovnání modelů.

Graf 13 - Grafické zobrazení všech třech modelů při použití xylózy v médiu v koncentraci 15 g.l^{-1}



Z grafu 13 lze vidět, že modely jsou velmi podobné. Červenou křivkou je označený Tessierův model, který se od modelu exponenciálního růstu (modrá křivka) a Monodova modelu (černá přerušovaná křivka) liší nejvíc. Monodův model a model exponenciálního růstu se překrývají.

3.3 Statistické porovnání modelů

Program MATLAB umožnil základní statistiku jednotlivých modelů. Tato statistika měla sloužit k porovnání přesnosti modelů, avšak hodnoty SSE (suma čtverců reziduí) a koeficient determinace R^2 byly ve všech třech modelech stejné na 4 až 5 desetinných míst a jsou uvedeny v tabulce 12.

Tabulka 12 - Hodnoty SSE a koeficientu determinace (platí pro všechny použité modely)

c [g.l ⁻¹]	Glukóza		Xylóza		Laktóza	
	SSE	R ²	SSE	R ²	SSE	R ²
10	0,2528	0,955	0,009187	0,9622	0,05768	0,9322
15	0,4977	0,9394	0,000717	0,9953	0,01219	0,9887
20	0,1748	0,9815	0,0181	0,943	0,0432	0,9872
25	0,6821	0,9256	0,0277	0,9047	0,01096	0,9978
30	0,6423	0,929	0,04181	0,8806	0,04436	0,9892
35	0,2263	0,9673	0,01617	0,9383	0,01663	0,9951
40	0,8352	0,9041	0,01112	0,9335	0,09368	0,9584

Z tabulky 12 lze vidět, že hodnoty SSE jsou při použití glukózy, jako substrátu, o mnoho vyšší, než při použití xylózy nebo laktózy. Hodnota SSE blíží se k 0 naznačuje, že model má menší náhodné chybové složky, a proto je vhodnější k predikci. Čím vyšší je hodnota koeficientu determinace, tím nám model lépe vysvětluje variabilitu dat od průměru. Při použití xylózy nebo laktózy v médiu byla přesnost proložení dat modely vysoká, protože se dosáhlo nízkých hodnot SSE a poměrně vysokých hodnot koeficientu determinace. Z těchto statistik však nelze určit, který model je nepřesnější.

V tabulkách 13 a 14 se nacházejí statistiky RMSE a upravený koeficient determinace. Hodnoty těchto statistik se již více odlišují. Pro model exponenciálního růstu jsou hodnoty statistiky v tabulce 13. Statistika RMSE a upravený koeficient determinace je stejná pro Tessierův a Monodův model a hodnoty jsou uvedeny v tabulce 14.

Tabulka 13 - Hodnoty RMSE a R_{adj}^2 pro model exponenciálního růstu

c [g.l ⁻¹]	Glukóza		Xylóza		Laktóza	
	RMSE	R_{adj}^2	RMSE	R_{adj}^2	RMSE	R_{adj}^2
10	0,2249	0,946	0,04792	0,9527	0,09805	0,9209
15	0,3155	0,9273	0,01339	0,9942	0,04507	0,9869
20	0,1707	0,9784	0,06017	0,9316	0,07856	0,9854
25	0,3372	0,9132	0,07443	0,8856	0,03957	0,9975
30	0,3272	0,9172	0,09144	0,8567	0,0796	0,9876
35	0,1942	0,9619	0,05191	0,9383	0,04873	0,9944
40	0,3731	0,8882	0,04715	0,9335	0,1157	0,9524

Tabulka 14 - Hodnoty RMSE a R^2_{adj} pro Monodův a Tessierův model

c [g.l ⁻¹]	Glukóza		Xylóza		Laktóza	
	RMSE	R^2_{adj}	RMSE	R^2_{adj}	RMSE	R^2_{adj}
10	0,2514	0,9325	0,05534	0,937	0,1074	0,9051
15	0,3527	0,9091	0,01546	0,9922	0,04937	0,9842
20	0,187	0,974	0,06727	0,9145	0,08485	0,9829
25	0,3693	0,8958	0,08321	0,857	0,04274	0,9971
30	0,3584	0,9006	0,1022	0,8209	0,1473	0,9856
35	0,2127	0,9542	0,05686	0,9259	0,05264	0,9934
40	0,4087	0,8656	0,05272	0,9169	0,125	0,9445

Čím nižší je hodnota RMSE statistiky a čím více se hodnota R^2_{adj} blíží k 1, tím je model vhodnější pro použití. Z tabulek 13 a 14 je tedy vidět, že statistika modelu exponenciálního růstu obsahuje nižší hodnoty RMSE a vyšší hodnoty upraveného koeficientu determinace, jako tyto statistiky pro Monodův a Tessierův model. Odchyly mezi hodnotami statistik modelu exponenciálního růstu, Monodova a Tessierova modelu se liší málo, avšak lze usoudit, že pro modelování růstu mikroorganismu *Lactobacillus casei* za daných podmínek, je nejpřesnější model exponenciálního růstu z důvodu nejmenších kvadratických chyb a nejlepšího proložení dat modelem.

4 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo matematické modelování růstu mikroorganismů, konkrétně mikroorganismu druhu *Lactobacillus casei* CCM 4798. Bylo provedeno 21 kultivací vsádkovou technikou, přičemž bylo využito v kultivačních médiích třech různých substrátů, vždy v sedmi různých koncentracích. Jako substrát byly použité glukóza, xylóza a laktóza.

Všechny kultivace probíhaly 24 hodin, kdy ve všech případech již probíhala stacionární fáze růstu. Růstové křivky byly sestrojeny dvojím způsobem, jako závislost A_{600} na čase a jako závislost koncentrace sušiny biomasy na čase. Dle růstových křivek bylo zjištěno, že největší nárůst vykazuje *Lactobacillus casei* při kultivaci v médiu s glukózou. Nejnižšího nárůstu se dosahuje při použití xylózy v kultivačním médiu. Optimální koncentrace pro růst při použití glukózy v médiu byla 20 g.l^{-1} , při použití laktózy 25 g.l^{-1} a při xylóze byl nárůst *L. casei* téměř totožný v koncentracích $10\text{--}35 \text{ g.l}^{-1}$. Z růstových křivek lze dále konstatovat, že ve většině případů při koncentraci 10 g.l^{-1} nastává limitace růstu nízkou koncentrací substrátu a při koncentraci 40 g.l^{-1} již nastává inhibice růstu substrátem. Exponenciální fáze při použití glukózy v kultivačním médiu nastává mezi 2. až 4. hodinou a končí mezi 16. až 18. hodinou. Když se v médiu nacházela xylóza, jako zdroj uhlíku, exponenciální fáze probíhala přibližně mezi 4. až 14. hodinou. Při kultivaci *Lactobacillus casei* v kultivačním médiu s laktózou exponenciální fáze začíná mezi 2. až 4. hodinou a končí v hodině 20. Z výsledků lze konstatovat, že nejdelší exponenciální fáze růstu probíhala v médiu s laktózou.

Pro modelování exponenciální fáze růstové křivky byly vybrány tři modely, a to model exponenciálního růstu, Monodův model a Tessierův model. Modelování bylo prováděno v programu MATLAB pomocí aplikace Curve Fitting toolbox. Program vypočítal hodnoty parametrů v jednotlivých modelech s 95 % pravděpodobností. Hodnoty parametrů maximální specifické růstové rychlosti μ_{max} a počáteční koncentrace mikroorganismu x_0 vypočítaných z modelu exponenciálního růstu a Tessierova modelu byly stejné. Hodnoty maximální specifické růstové rychlosti vypočítané z Monodova modelu byly vyšší než u předcházejících modelů, ale hodnota parametru x_0 se ve většině případů shodovala s hodnotami vypočítaných pomocí modelu exponenciálního růstu i Tessierova modelu. Hodnoty maximální specifické růstové rychlosti a počáteční koncentrace mikroorganismu byly nejvyšší při substrátu glukóze a nejnižší při substrátu xylóze. Saturační konstanta K_s byla počítaná v případě Monodova a Tessierova modelu. Hodnoty K_s byly vyšší při použití Monodova modelu. Nejvyšší hodnoty K_s byly opět zaznamenány při glukóze v kultivačním médiu a nejnižší při použití xylózy.

Dle statistiky modelu exponenciálního růstu víme, že obsahoval o něco menší střední kvadratickou chybu a vyšší hodnotu upraveného koeficientu determinace, čím se model stal nejvhodnějším k použití. Monodův a Tessierův model byly hlavně při použití xylózy a laktózy v kultivačním médiu při kultivaci taky velmi přesné, což dokazují malé odchylky v jejich statistice od modelu exponenciálního růstu.

Z naměřených a vypočítaných dat lze konstatovat, že nejlepším substrátem pro kultivaci *Lactobacillus casei* je glukóza. Optimální koncentrace, při které bylo dosaženo nejvyššího nárůstu, byla 20 g.l^{-1} , což odpovídá hodnotě koncentrace v doporučeném médiu pro kultivaci laktobacilů. Ze statistiky lze usoudit, že model exponenciálního růstu byl nejvhodnější pro matematické modelování růstu *Lactobacillus casie*.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VESELÁ, Mária. Praktikum z obecné mikrobiologie. Vyd. 3. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2004, 99 s. ISBN 80-214-2567-9.
- [2] VODRÁŽKA, Zdeněk. *Biochemie 3*. 1.vyd. Praha: Academia, 1993, 191 s. ISBN 80-200-0471-8.
- [3] STANBURY, Peter F., Allan WHITAKER a Stephen J. HALL. *Principles of Fermentatiou Technology*. Second Edition. Oxford: Butterworth-Heinemann, c1995. ISBN 07-506-4501-6.
- [4] KAŠTÁNEK, František. Bioinženýrství. Vyd. 1. Praha: Academia, 2001, 334 s. ISBN 80-200-0768-7.
- [5] BETINA, Vladimír. *Mikrobiológia. 1. vyd., dotlač.* Bratislava: Slovenská technická univerzita, 1995, ISBN 80-227-0755-4.
- [6] ŘÍHOVÁ AMBROŽOVÁ, Jana. *Mikrobiologie v technologii vod*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2008. ISBN 978-80-7080-676-0.
- [7] VOET, Donald a Judith G. VOET. *Biochemistry*. 3rd ed. Hoboken: John Wiley, c2004. ISBN 04-713-9223-5.
- [8] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. 2. vyd., ve VP 1. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-856-0571-6.
- [9] HOFVENDAHL, Karin a Bärbel HAHN–HÄGERDAL. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources1. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, 26(2-4), 87-107. DOI: 10.1016/S0141-0229(99)00155-6. ISSN 01410229. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022999001556>
- [10] RYCHTERA, Mojmir a Jan PÁCA. Bioinženýrství kvasných procesů. 1. vyd. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1985, 154 s.
- [11] SMITH H.L., Bacterial Growth. Arizona State University, Tempe (2006). Dostupné také z: <https://math.la.asu.edu/~halsmith/bacteriagrow.pdf>
- [12] HŘEBÍČEK, Jiří a Michal ŠKRDLA. *Úvod do matematického modelování*[online]. In: 2006, s. 83 [cit. 2016-05-09]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/1431/podzim2007/Bi3101/um/skripta.pdf>
- [13] HORÁK, Josef, Zdeněk BĚLOHLAV a Zina VALÁŠKOVÁ. *Modelování a optimalizace*. Praha: VŠCHT Praha, 1988.
- [14] KADLEC, Karel a Miloš KMÍNEK. Vytváření matematických modelů. *Ústav počítačové a řídicí techniky - VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE* [online]. 2005 [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: <http://uprt.vscht.cz/kminekm/mrt/F2/F2k21-mod.htm>
- [15] MONOD, J. The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology*. 1949, 3(1), 371-394. DOI: 10.1146/annurev.mi.03.100149.002103. ISSN 0066-4227. Dostupné také z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>

- [16] JOHN VILLADSEN, Jens Nielsen. *Bioreaction engineering principles*. 3rd ed. New York: Springer, 2011. ISBN 978-144-1996-886.
- [17] NAJAFPOUR, Ghasem D. *Biochemical Engineering and Biotechnology*. 2. Amsterdam: Elsevier, 2015. ISBN 9780444633576. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444633576010014>
- [18] HANIKA, Jiří. *Vícefázové reaktory*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1997. ISBN 80-708-0290-1.
- [19] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 978-80-210-4207-0.
- [20] ŠUPINOVÁ, P. Studium podmínek aerobní kultivace vybraných kmenů rodu *Lactobacillus*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 83 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Libor Babák, Ph.D.
- [21] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. vyd. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902-8966-5.
- [22] MATOULKOVÁ, Dagmar a Petra KUBIZNIAKOVÁ. Mikrobiologie pivovarské výroby – Bakterie mléčného kvašení a kultivační metody pro jejich detekci – I. část. *Kvasný průmysl: odborný časopis pro výrobu nápojů a biochemické technologie*. Praha: Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha ve spolup. se Sahn, s. r. o, 2015, (3), 13. ISSN 0023-5830.
- [23] CAI, H., R. THOMPSON, M. F. BUDINICH, J. R. BROADBENT a J. L. STEELE. Genome Sequence and Comparative Genome Analysis of *Lactobacillus casei*: Insights into Their Niche-Associated Evolution. *Genome Biology and Evolution*. 2009, 1, 239-257. DOI: 10.1093/gbe/evp019. ISSN 1759-6653. Dostupné také z: <http://gbe.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/gbe/evp019>
- [24] XU, Nan, Jie LIU, Lianzhong AI a Liming LIU. Reconstruction and analysis of the genome-scale metabolic model of *Lactobacillus casei* LC2W. *Gene*. 2015, 554(2), 140-147. DOI: 10.1016/j.gene.2014.10.034. ISSN 03781119. Dostupné také z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111914011949>
- [25] NORDBERG, H., M. CANTOR, S. DUSHEYKO, et al. The genome portal of the Department of Energy Joint Genome Institute: *Lactobacillus casei* ATCC 334 [online]. 2014 [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: <http://genome.jgi.doe.gov/lacca/lacca.home.html>
- [26] ŠTĚTINA. *Miniatlas mikroorganismů: Lactobacillus casei subsp. casei* [online]. 2002 [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: <http://old.vscht.cz/main/soucasti/fakulty/fpbt/ostatni/miniatlas/lac-c.htm>
- [27] Buffalo beer biochemist. *Beer Science: Lactobacillus in Beer - Buffalo Beer Biochemist* [online]. 2015 [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: <http://buffalobeerbiochemist.com/beer-science-lactobacillus-in-beer/>

- [28] OPEKAR, František, Ivan JELÍNEK, Petr RYCHLOVSKÝ a Zbyněk PLZÁK. Základní analytická chemie. 2. vyd. Praha: Karolinum, 2010, 203 s. ISBN 978-80-246-1775-6.
- [29] SOMMER, Lumír. Teoretické základy analytické chemie II. 1. vyd. Brno: Vysoké učení technické, 1995, 76 s. ISBN 80-214-0659-3.
- [30] Nephelometry, turbidometry and Reflectance photometry. YADAV, Anurag. Slideshare [online]. 2015 [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: http://www.slideshare.net/anurag_yadav/photometry-ii-anu
- [31] VOLKA, Karel a Bohuslav DOŇAR. *Analytická chemie: úvod do používání*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1995. ISBN 80-708-0227-8.
- [32] BRATBAK, Gunnar a Ian DUNDAS. Bacterial Dry Matter Content and Biomass Estimations. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*,. 1984, (48), 3. Dostupné také z: <http://aem.asm.org/content/48/4/755.full.pdf>
- [33] PRÍBELA, Alexander. *Analýza potravín*. 1. vyd. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 1991. ISBN 80-227-0374-5.
- [34] LI, E. a R. MIRA DE ORDUÑA. A rapid method for the determination of microbial biomass by dry weight using a moisture analyser with an infrared heating source and an analytical balance. *Letters in Applied Microbiology*. 2010, 50(3), 283-288. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2009.02789.x. ISSN 02668254. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2009.02789.x>
- [35] MATLAB®. *HUMUSOFT* [online]. [cit. 2016-03-21]. Dostupné z: <http://www.humusoft.cz/matlab/details/>
- [36] KARBAN, Pavel. *Výpočty a simulace v programech Matlab a Simulink*. Brno : Computer Press, 2006. 80-251-1301-9.
- [37] DUŠEK, František a Daniel HONC. *Matlab a Simulink: úvod do používání*. Vyd. 1. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2005. ISBN 80-719-4776-8.
- [38] ZAPLATÍLEK, Karel a Bohuslav DOŇAR. *MATLAB pro začátečníky: úvod do používání*. 2. vyd. Praha: BEN - technická literatura, 2005. ISBN 80-730-0175-6.
- [39] Curve Fitting Toolbox™. *HUMUSOFT* [online]. 2010 [cit. 2016-04-04]. Dostupné z: <http://humusoft.cz/matlab/curvefitting/>
- [40] Regression. *WELCOME TO TRIZ SIGMA QUALITY* [online]. trizsigma.com, 2008 [cit. 2016-04-26]. Dostupné z: <http://www.trizsigma.com/regression.html>

POUŽITÉ ZKRATKY A SYMBOLY

ADP	adenosindifosfát
ATP	adenosintrifosfát
NAD ⁺ , NADH	nikotinamidadenindinukleotid
S, s	koncentrace substrátu [g.l ⁻¹]
S ₀ , s ₀	počáteční koncentrace substrátu [g.l ⁻¹]
x	koncentrace biomasy [g.l ⁻¹]
x ₀	počáteční koncentrace biomasy [g.l ⁻¹]
[O]	koncentrace rozpuštěného kyslíku [g.l ⁻¹]
P	koncentrace produktu [g.l ⁻¹]
t	čas [h]
k	rychlostní konstanta [h ⁻¹]
K	konstanta výtěžnosti [1]
r	počet dělení za jednotku času [h ⁻¹]
n	generační doba [h]
μ	specifická růstová rychlost [h ⁻¹]
μ _{max}	maximální specifická růstová rychlost [h ⁻¹]
K _s	saturační koncentrace [g.l ⁻¹]
Y _{X/S}	výtěžnostní koeficient biomasy ze substrátu [1]
c	koncentrace limitující živiny [g.l ⁻¹]
G-C	guanin - cytosin
<i>L. casie</i>	<i>Lactobacillus casie</i>
SSR	součet čtverců regrese
SST	celkový součet čtverců
SSE	suma čtverců reziduí
RMSE	efektivní hodnota chyby
MSE	střední kvadratická chyba
R ²	koeficient determinace
R ² _{adj.}	upravený koeficient determinace

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - <i>Koncentrační profily simulované vsádkové fermentace</i> [4].....	9
Obrázek 2 - <i>Glykolytická dráha a následné přeměny kyseliny pyrohroznové v anaerobním prostředí</i> [6].....	11
Obrázek 3 - <i>Katabolické dráhy bakterií mléčného kvašení</i> [10].....	12
Obrázek 4 - <i>Ethanolová fermentace</i> [2].....	13
Obrázek 5 - <i>Růstová křivka</i> . [16]	17
Obrázek 6 - <i>Grafické zobrazení exponenciálního růstu</i> [8].....	18
Obrázek 7 - <i>Porovnání deterministického modelu a stochastického modelu</i> [14].....	20
Obrázek 8 - <i>Kopie originálního grafu z Monodovy práce (1942)</i> [17].....	22
Obrázek 9 - <i>Taxonomické zařazení rodu Lactobacillus</i> [21].....	23
Obrázek 10 - <i>Lactobacillus casei</i> [28].....	24
Obrázek 11 - <i>Turbidimetrie</i> [31]	26
Obrázek 12 - <i>Prostředí MATLABu s okenní strukturou</i> [36].....	27
Obrázek 13 - <i>Znázornění statistik SST, SSE s SSR</i> [41].....	29
Obrázek 14 - <i>Centrifuga EBA 20</i>	31
Obrázek 15 - <i>Zpracování výsledků pomocí programu MATLAB a aplikace Curve Fitting toolbox</i>	34

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Navážka chemikálií použitých pro přípravu 200 ml kultivačního média	32
Tabulka 2 - Navážka substrátu při různých koncentracích	32
Tabulka 3 - Závislost absorbance A_{600} na čase (zdroj uhlíku glukóza)	35
Tabulka 4 - Závislost koncentrace sušiny biomasy na čase (zdroj uhlíku glukóza)	37
Tabulka 5 - Závislost absorbance A_{600} na čase (zdroj uhlíku xylóza)	38
Tabulka 6 - Závislost koncentrace sušiny biomasy na čase (zdroj uhlíku xylóza).....	40
Tabulka 7 - Závislost absorbance A_{600} na čase (zdroj uhlíku laktóza)	41
Tabulka 8 - Závislost koncentrace sušiny biomasy na čase (zdroj uhlíku laktóza)	43
Tabulka 9 - Hodnoty parametrů modelu exponenciálního růstu	44
Tabulka 10 - Hodnoty parametrů při použití Monodova modelu	46
Tabulka 11 - Hodnoty parametrů při použití Tessierova modelu.....	48
Tabulka 12 - Hodnoty SSE a koeficientu determinace (platí pro všechny použité modely) ...	51
Tabulka 13 - Hodnoty RMSE a R_{adj}^2 pro model exponenciálního růstu	51
Tabulka 14 - Hodnoty RMSE a R_{adj}^2 pro Monodův a Tessierův model	52

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 - Růstové křivky <i>L. casei</i> v médiu s glukózou v sedmi různých koncentracích (závislost absorbance na čase při 600 nm)	36
Graf 2 - Růstová křivka <i>L. casei</i> v médiu s glukózou v sedmi různých koncentracích (závislost koncentrace biomasy na čase).....	37
Graf 3 - Růstové křivky <i>L. casei</i> v médiu s xylózou v sedmi různých koncentracích (závislost absorbance na čase při 600 nm)	39
Graf 4 - Růstová křivka <i>L. casei</i> v médiu s xylózou v sedmi různých koncentracích (závislost koncentrace biomasy na čase).....	40
Graf 5 - Růstové křivky <i>L. casei</i> v médiu s laktózou v sedmi různých koncentracích (závislost absorbance na čase při 600 nm)	42
Graf 6 - Růstová křivka <i>L. casei</i> v médiu s laktózou v sedmi různých koncentracích (závislost koncentrace sušiny biomasy na čase).....	43
Graf 7 Ukázka proložení dat modelem exponenciálního růstu	45
Graf 8 - Závislost μ_{max} na koncentraci substrátu.....	45
Graf 9 - Ukázka proložení dat Monodovým modelem	47
Graf 10 - Závislost μ_{max} na koncentraci použitého substrátu	47
Graf 11 - Zobrazení proložení dat Tessierovým modelem	49
Graf 12 - Závislost μ_{max} na koncentraci použitého substrátu	49
Graf 13 - Grafické zobrazení všech modelů při použití xylózy v médiu v koncentraci 15 g.l ⁻¹	50