

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM PODMÍNEK AEROBNÍ KULTIVACE VYBRANÝCH KMENŮ
RODU LACTOBACILLUS

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

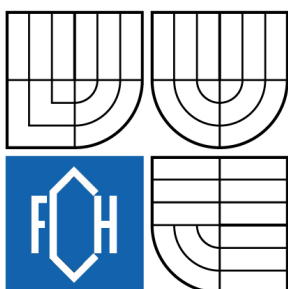
Bc. PETRA ŠUPINOVÁ

BRNO 2009



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM PODMÍNEK AEROBNÍ KULTIVACE VYBRANÝCH KMENŮ RODU LACTOBACILLUS

STUDY OF AEROBIC CULTIVATION CONDITIONS WITH SELECT STRAIN OF LACTOBACILLUS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

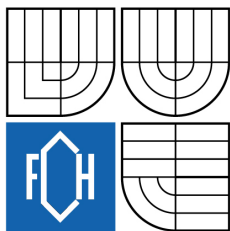
Bc. PETRA ŠUPINOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. LIBOR BABÁK, Ph.D.

BRNO 2009



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce: **FCH-DIP0258/2008** Akademický rok: **2008/2009**
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Student(ka): **Bc. Petra Šupinová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin (N2901)
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)
Vedoucí diplomové práce: **Ing. Libor Babák, Ph.D.**
Konzultanti diplomové práce: doc. Ing. Bohuslav Rittich, CSc.

Název diplomové práce:

Studium podmínek aerobní kultivace vybraných kmenů rodu *Lactobacillus*

Zadání diplomové práce:

- 1) rešerše literatury na téma práce
- 2) plán experimentů
- 3) provedení několika kultivací bakterií rodu *Lactobacillus*
- 4) analýza vybraných bioinženýrských charakteristik
- 5) diskuze nad výsledky

Termín odevzdání diplomové práce: 22.5.2009

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

Bc. Petra Šupinová
Student(ka)

Ing. Libor Babák, Ph.D.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.10.2008

doc. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Cíl práce byl zaměřen na studium podmínek růstu kmenů *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211, *Lbc. paracasei* CCDM 212, *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 213 a *Lbc. salivarius* CCDM 216 v médiích s různým obsahem zdroje uhlíku (glukóza, laktóza a syrovátka). Další část experimentu se zabývala studiem podmínek růstu bakterií při stresových podmínkách (nízké pH). Kontrola čistoty bakteriální kultury byla ověřena křížovým roztěrem. Čistota DNA izolované z bakterií byla ověřena agarózovou gelovou elektroforézou, koncentrace DNA byla stanovena spektrofotometricky. Přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus* byla ověřena pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) s rodově specifickými primery.

ABSTRACT

The aim of this study was focused on the study of conditions of growth of strains *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211, *Lbc. paracasei* CCDM 212, *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 213 and *Lbc. salivarius* CCDM 216 in media with different amount of carbon-source (glucose, lactose and whey). Next part of the experiment was dealt with study of conditions of bacteria growth at stress conditions (lower pH). The purity of bacterial culture was verified with help of streaking. Purity of DNA isolated from bacteria was tested using agarose gel electrophoresis, DNA concentration was estimated spectrophotometrically. The presence of bacteria of genus *Lactobacillus* was proved using polymerase chain reaction (PCR) with genus specific primers.

KLÍČOVÁ SLOVA

Bakterie mléčného kvašení, rod *Lactobacillus*, růst, DNA, polymerázová řetězová reakce (PCR).

KEYWORDS

Lactic acid bacteria, genus *Lactobacillus*, growth, DNA, polymerase chain reaction (PCR).

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.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

Podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu diplomové práce Ing. Liboru Babákovi, Ph.D. za vedení, odborné rady a doc. RNDr. Aleně Španové, CSc za odbornou pomoc a čas, který mi věnovala při vypracování této diplomové práce

OBSAH

Obsah	9
Úvod	11
1 Teoretická část	12
1.1 Mléčné kvašení a bakterie mléčného kvašení	12
1.1.1 Bakterie mléčného kvašení	12
1.1.2 Mléčné kvašení	12
1.2 Kyselina mléčná	14
1.3 Rod <i>Lactobacillus</i>	15
1.3.1 Zařazení	15
1.3.2 Charakteristické vlastnosti.....	16
1.3.3 Vlastnosti některých zástupců rodu <i>Lactobacillus</i> významných v potravinářském průmyslu	17
1.3.4 Probiotické preparáty	20
1.3.5 Bakteriociny.....	22
1.4 Turbidimetrie	24
1.4.1 Měření buněčné hustoty.....	25
1.4.2 Růstová křivka	26
1.5 Křížový roztěr	27
1.6 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA	28
1.6.1 NanoPhotometer TM Implen	28
1.7 Agarózová gelová elektroforéza	29
1.8 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	30
2 Experimentální část	32
2.1 Cíl práce	32
2.2 Mikroorganismy a použité materiály	32
2.2.1 Analyzované mikroorganismy.....	32
2.2.2 Chemikálie.....	32
2.3 Metody měření	33
2.3.1 Kultivace buněk v MRS médiu s glukózou	33
2.3.2 Kultivace buněk v MRS médiu s laktózou o obsahu 2% ve větším objemu	33
2.3.3 Kultivace buněk v MRS médiu s laktózou o obsahu 2%	34
2.3.4 Kultivace buněk v MRS médiu s laktózou o obsahu 4%	34
2.3.5 Kultivace buněk v MRS médiu s různým obsahem syrovátky ve stresových podmínkách	34
2.3.6 Analýza chování kultury ve stresových podmínkách	34
2.3.7 Turbidimetrické stanovení růstové křivky.....	35
2.3.8 Křížový roztěr	35
2.3.9 Izolace bakteriální DNA	35
2.3.10 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA	36
2.3.11 Gelová elektroforéza bakteriální DNA.....	36
2.3.12 Rodově specifická PCR s použitím purifikované DNA jako DNA matrice.....	37
2.3.13 Rodově specifická PCR s použitím DNA matrice z hrubého lyzátu buněk	37

3	Výsledky	39
3.1	Růstové křivky	39
3.1.1	Zdroj uhlíku: glukóza	39
3.1.2	Zdroj uhlíku: laktóza	42
3.2	Křížový roztěr	49
3.3	Kultivace buněk v MRS médiu s různým obsahem syrovátky při stresových podmínkách.....	49
3.3.1	Obsah syrovátky 2%	49
3.3.2	Obsah syrovátky 4%	51
3.3.3	Obsah syrovátky 6%	52
3.3.4	Obsah syrovátky 8%	54
3.3.5	Křížový roztěr	55
3.4	Analýza růstu bakteriálních kultur při stresových podmínkách	56
3.4.1	Analýza růstu <i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211 při stresových podmínkách	57
3.4.2	Analýza růstu <i>Lbc. paracasei</i> CCDM 212 při stresových podmínkách	58
3.4.3	Analýza růstu <i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 213 při stresových podmínkách	59
3.4.4	Analýza růstu <i>Lbc. salivarius</i> CCDM 216 při stresových podmínkách	60
3.4.5	Porovnání růstu kmenů na MRS médiu s laktózou při stresových podmínkách	61
3.5	Analýza růstu bakteriálních kultur při různém obsahu laktózy.....	62
3.5.1	Analýza růstu <i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211 při různém obsahu laktózy	62
3.5.2	Analýza růstu <i>Lbc. paracasei</i> CCDM 212 při různém obsahu laktózy	63
3.5.3	Analýza růstu <i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 213 při různém obsahu laktózy	64
3.5.4	Analýza růstu <i>Lbc. salivarius</i> CCDM 216 při různém obsahu laktózy	65
3.6	Izolace DNA a ověření čistoty	66
3.7	Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA	67
3.8	Rodově specifická PCR s použitím purifikované DNA jako DNA matrice.....	67
3.9	Rodově specifická PCR s použitím DNA matrice z hrubého lyzátu buněk.....	68
3.9.1	Určení citlivosti rodově specifické PCR s použitím DNA matrice z hrubého lyzátu buněk.....	68
3.9.2	Rodově specifická PCR s použitím DNA matrice z hrubého lyzátu buněk	69
3.9.3	Rodově specifická PCR s použitím DNA matrice z hrubého lyzátu kolonií....	71
4	Diskuze	73
	Závěr	76
	Seznam použité literatury.....	77
	Seznam použitých zkratk a symbolů	79
	Seznam obrázků	80
	Seznam tabulek.....	81
	Seznam grafů	82

ÚVOD

Rod *Lactobacillus* můžeme zařadit mezi bakterie mléčného kvašení. Výskyt je velmi hojný. Vyskytují se převážně na materiálech, které jsou bohaté na sacharidy, především glukózu nebo laktózu. Nacházejí se jak u živočichů, tak také na rostlinách. V lidském těle je možno zástupce rodu *Lactobacillus* nalézt především ve sliznici zažívacího traktu, úst a vagíny. Dále se nacházejí u savců, ptáků i hmyzu, ve fermentovaných výrobcích, mase, mléku, zelenině, na rostlinném materiálu a dokonce i v půdě a odpadní vodě.

Pozitivní účinek některých druhů rodu *Lactobacillus* spočívá v jejich probiotických vlastnostech. Probiotika mohou být přirozenou složkou potravin nebo doplňky stravy. Přispívají k ustanovení rovnováhy mezi bakteriemi zdraví prospěšnými a škodlivými. Při nevyváženém složení střevní mikroflóry dochází k různým onemocněním, ať už se jedná o infekce, záněty nebo alergie. Při léčbě onemocnění probiotiky je nejdůležitější volba vhodného kmene. Je také známo, že imunitní systém je ovlivňován správným složením střevní mikroflóry.

I když probiotické vlastnosti rodu *Lactobacillus* a jejich využití jsou známy již velmi dlouhou dobu, vědci stále zkoumají nové možnosti jejich využití. Zkoumají nejen nové potraviny, které by obsahovaly probiotické bakterie a měly pozitivní účinek na lidské zdraví, ale také zkoumají nové kmeny s probiotickými účinky. S tímto výzkumem je pevně spjata také navrhování nových technologií výroby. Jedno z nejdůležitějších hledisek výroby je cena, lépe řečeno poměr ceny výroby k účinnosti.

Rod *Lactobacillus* má i své nevýhody v potravinářství. Může způsobovat nežádoucí kažení potravin. Tomuto jevu je možné zamezit správným technologickým návrhem, správným množstvím použitých mikroorganismů nebo také přidáním bakteriocinů. Tyto látky jsou produkovány jinými mikroorganismy a jsou schopné zamezit růst mikroorganismů, které jsou nežádoucí. V dnešní době nejznámější a nejpoužívanější bakteriocin je nisin, který je produkován např. kmeny *Lactococcus lactis* a *Streptococcus lactis*.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Mléčné kvašení a bakterie mléčného kvašení

1.1.1 Bakterie mléčného kvašení

V současnosti jsou mezi bakterie mléčného kvašení (BMK) zahrnovány grampozitivní bakterie rodů *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* a *Weissella*. Bakterie mléčného kvašení jsou nejčastěji koky, s výjimkou laktobacilů a karnobakterií, které se vyskytují jako tyčinky. Většina z nich jsou považovaná za organismy GRAS (obecně považované za bezpečné). Některé druhy, např. *Streptococcus*, jsou ovšem patogenní. [2] V dnešní době se BMK využívají nejen v průmyslu mlékárenském, ale také v průmyslu masném, tukovém, konzervárenském a pekárenském. Vyskytují se v mléčných výrobcích, obilných, masných a rybích produktech, pивě, víně, ovocných šťávách a dalších rostlinných zdrojích a v odpadní vodě. Tvoří také přirozenou mikroflórou úst, trávicího traktu a vagin živočichů i lidí. [1]

Bakterie mléčného kvašení mají vysokou odolnost vůči kyselému prostředí, mohou přežívat při pH 5 a nižším v závislosti na druhu a kmeni. Optimální teplota růstu se pohybuje od 20 do 45°C. [2] Některé druhy jsou schopny růstu i při teplotě nižší než 15°C, maximální teplota, při které byl zjištěn růst, je 62°C. [1]

Bakterie mléčného kvašení jsou velmi náročné na výživu. Mají omezené schopnosti syntetizovat některé vitaminy a aminokyseliny. Proto v kultivačním médiu vyžadují kromě sacharidů, které slouží jako zdroj energie a uhlíku, i nukleotidy, aminokyseliny a vitamíny. Z aminokyselin vyžadují všechny druhy pro svůj růst kyselinu pantotenovou a nikotinovou, heterofermentativní bakterie vyžadují také thiamin. [1]

BMK nejsou schopné syntetizovat ATP dýcháním, což má za následek fermentaci sacharidů, která pomáhá zachovat energii. Při fermentaci sacharidů těmito bakteriemi je hlavním výsledným produktem kyselina mléčná. Ve všeobecnosti je možno říci, že bakterie mléčného kvašení jsou fakultativně anaerobní, katalázový test je negativní, jsou nepohyblivé a nesporulující. [1]

1.1.2 Mléčné kvašení

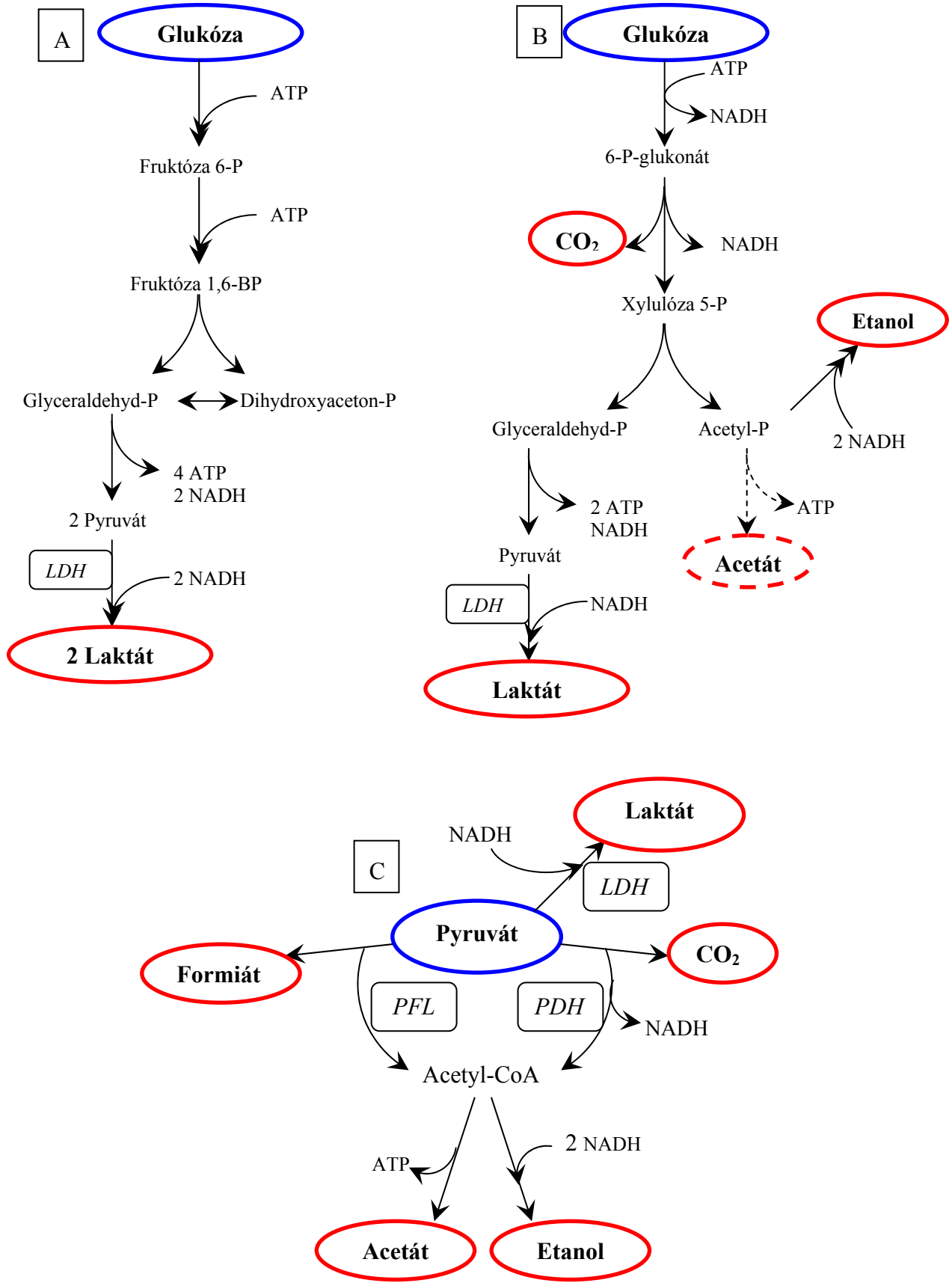
Fermentace sacharidů pomocí bakterií mléčného kvašení může probíhat třemi různými způsoby. Rozlišuje se fermentace:

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

Homofermentativní bakterie fermentují glukózu a jako výsledný produkt vzniká kyselina mléčná (Obr.1A). Při kvašení heterofermentativními bakteriemi vzniká z glukózy v ekvimolárních množstvích kyselina mléčná, oxid uhličitý a etanol nebo acetát. Tyto bakterie využívají fosfoketalázovou dráhu (Obr. 1B). Poměr vzniklého etanolu a acetátu závisí na oxidačně-redukčním potenciálu systému. Všechny bakterie mléčného kvašení, kromě laktobacilů skupiny I (např. *Lbc. delbrueckii*), jsou schopné fermentovat pentózy, z čehož vyplývá, že se jedná o fakultativně heterofermentativní bakterie. [2]

Obr. 1 Katabolické dráhy bakterií mléčného kvašení [2]

Obligátne homofermentativní (A), Obligátne heterofermentativní (B), Fakultativně heterofermentativní (C)



Mezi fakultativně heterofermentativní bakterie patří např. laktokoky. Tento způsob fermentace je využíván při nedostatku glukózy a růst probíhá na dalších sacharidech nebo při zvýšeném pH a snížené teplotě. Vedle kyseliny mléčné vzniká také etanol, acetát a formiát. Oproti homofermentativní dráze se liší produkty z pyruvátu, vedle kyseliny mléčné je metabolizován také formiát a acetyl-CoA. Acetyl-CoA vzniká pomocí enzymu pyruvát-formiát lyáza (PFL) (Obr. 1C). Za přítomnosti kyslíku je tento enzym inaktivní a aktivuje se alternativní dráha metabolismu pyruvátu pomocí pyruvát dehydrogenázy (PDH). V tomto případě vzniká oxid uhličitý, acetyl-CoA a NADH. Z acetyl-CoA vzniká acetát a etanol. [2]

1.2 Kyselina mléčná

Správný chemický název je 2-hydroxypropanová kyselina. Kyselina mléčná je sirupovitá hygroskopická kapalina, která je mísitelná s vodou. Teplota tání je 25 – 26°C a ve formě racemátu 18°C. Vzniká z glukózy anaerobní glykolýzou, např. při mléčném kvašení nebo při svalové práci. [6] Patří mezi univerzální látky. Nejčastější využití nachází kyselina mléčná např. jako:

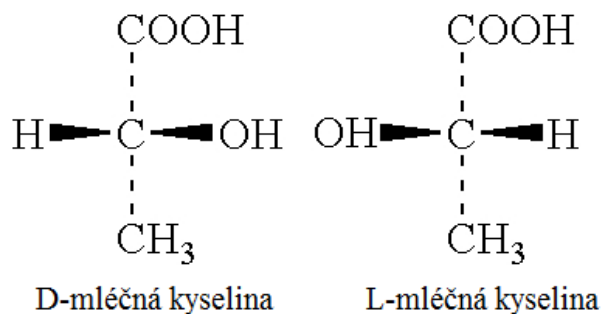
1. okyselující přípravek, ochucovadlo a konzervační přípravek v potravinářském, farmaceutickém, kožedělném a textilním průmyslu,
2. surovina při výrobě chemických sloučenin
3. monomer při přípravě biologicky odbouratelných polymléčných kyselin (PLA)

Ve své struktuře má jeden chirální uhlík, z čehož vyplývá, že se může vyskytovat jako dva optické izomery, D a L (Obr. 2). Obě izomerní formy mohou být polymerizované a v závislosti na složení mohou vznikat polymery s různými vlastnostmi. Asi 90% používané kyseliny mléčné je původem z bakteriálních fermentací a zbytek vzniká hydrolyzou laktonitrilu. Kvasná výroba má oproti syntetické výrobě tu výhodu, že výběrem vhodného kmenu bakterie mléčného kvašení vzniká jen jeden z izomerů, což umožňuje získat opticky čistý produkt. Při syntetické výrobě vždy vzniká racemická směs. Některé kmeny bakterií mléčného kvašení produkují nepatrná množství dalšího izomeru. Druhy *Lbc. helveticus* a *Lbc. plantarum* produkují racemickou směs, složení této směsi je proměnlivé. Stereospecifický enzym laktát dehydrogenáza přítomný v bakteriích mléčného kvašení určuje, který izomer kyseliny mléčné bude vytvořený. Pro některé aplikace, jako např. pro syntézu polymléčných kyselin, je žádoucí opticky čistý produkt nebo racemická směs stálého složení. [2]

Pokud je požadován izomer L kyseliny mléčné, je vhodné použít druhy *Lbc. amylophilus*, *Lbc. delbrueckii* a *Lbc. rhamnosus*, protože většinou nedochází ke tvorbě izomeru D při změně pH nebo množství živin. Na druhé straně, D-kyselina mléčná vzniká pomocí bakterií druhu *Lbc. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* při vsádkové i kontinuální kultivaci z glukózy a laktózy, i při změně množství živin. Složení racemátu vzniklého s použitím *Lbc. plantarum* je možné měnit aerací a množstvím přidaného NaCl. Množství převládajícího izomeru je vyšší při vsádkové kultivaci než při kontinuální. Množství převládajícího izomeru se zvyšuje se zvyšujícím se pH a množstvím substrátu. Naopak se toto množství snižuje s vyšší teplotou a při nekontrolovaném pH. [2]

Na výrobu kyseliny mléčné je možné využít obnovitelné zdroje jako např. škrob a celulózu. Při jejich použití se do atmosféry neuvolňuje žádný oxid uhličitý, na rozdíl od zdrojů, které nejsou obnovitelné, např. nafta anebo fosilní paliva. Celulóza, hemicelulóza a škrob jsou nejhojněji se vyskytující sloučeniny na naší planetě, je možno je hydrolyzovat převážně na glukózu, která je fermentovatelná řadou mikroorganismů. Hemicelulóza, na rozdíl od škrobu a celulózy, obsahuje také pentózy, díky kterým vznikají vedlejší produkty jako acetát a etanol. [2]

Obr. 2 Stereoizomery kyseliny mléčné [7]

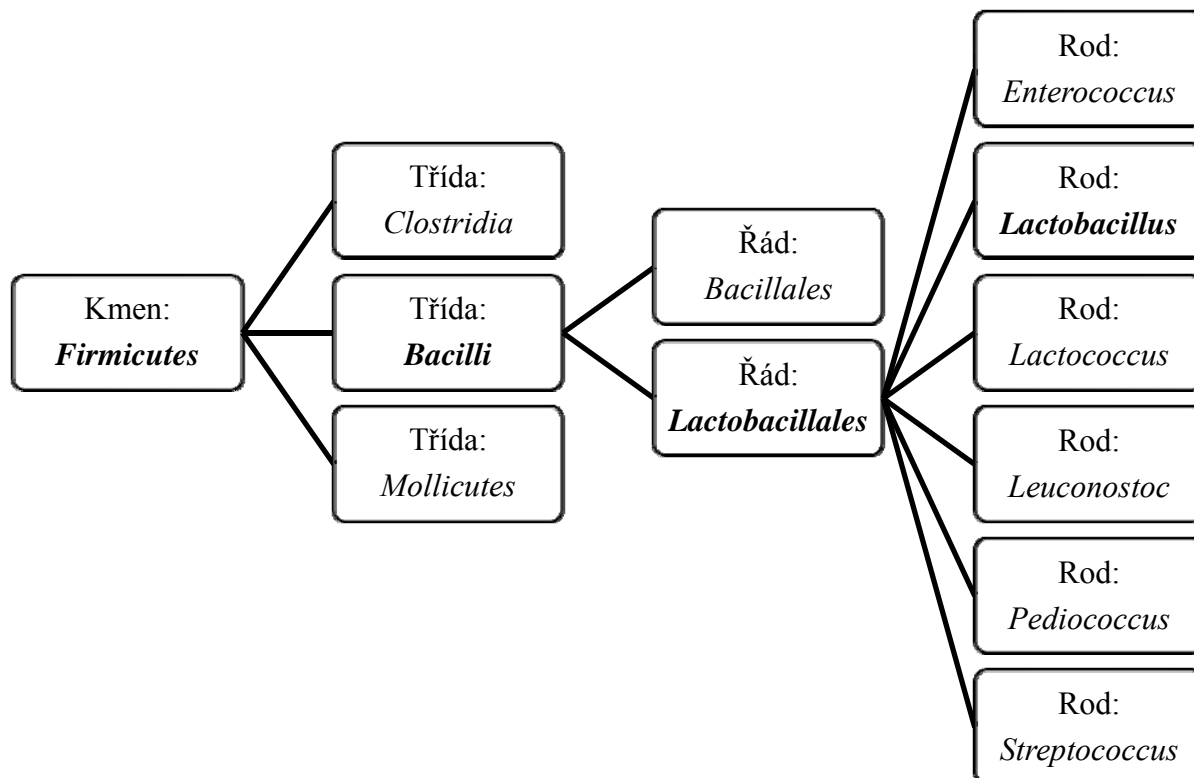


1.3 Rod *Lactobacillus*

1.3.1 Zařazení

Rod *Lactobacillus* patří mezi bakterie s buněčnou stěnou grampozitivního typu. Taxonomické zařazení tohoto rodu je uvedeno na Obr. 3. Patří do domény *Bacteria*, kmene *Firmicutes*, třídy *Bacilli*, řádu *Lactobacillales* a čeledi *Lactobacillaceae* [3]

Obr. 3 Taxonomické zařazení rodu *Lactobacillus* [3]



Pro taxonomické zařazení bakterií, které jsou důležité z hlediska potravinářského i z hlediska technické mikrobiologie, se využívá Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Tento manuál rozděluje bakterie do 33 sekcí.

Rod *Lactobacillus* je řazen do Sekce 14, ve které se vyskytují *Pravidelné nesporulující grampozitivní tyčinky*. V této sekci se vyskytuje kromě rodu *Lactobacillus* dalších 6 rodů (Tabulka 1). Čtyři rody jsou mikroaerofilní a získávají energii mléčným kvašením. Zbývající rody jsou aerobní a nefermentují. Pro růst všech rodů jsou nutná média s řadou růstových látek. [4]

Tabulka 1 Charakteristické vlastnosti Sekce 14 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [4]

Rod	Katabol. metabolismus	Schopnost fermentace	Patogenita
<i>Lactobacillus</i>	anaerobní	mléčné kvašení	velmi vzácná
<i>Erysipelothrix</i>	anaerobní	mléčné kvašení	u obratlovců
<i>Brochothrix</i>	anaerobní	mléčné kvašení	nezjištěna
<i>Listeria</i>	anaerobní	mléčné kvašení	u obratlovců
<i>Kurthia</i>	aerobní	nekvasí	nezjištěna
<i>Caryophanon</i>	aerobní	nekvasí	nezjištěna
<i>Renibacterium</i>	aerobní	nekvasí	u lososovitých ryb

1.3.2 Charakteristické vlastnosti

Výskyt bakterií rodu *Lactobacillus* je velmi hojný. Zástupce tohoto rodu je možno nalézt v mléce, v ústech a trávicím traktu savců, na travinách, obilí i jiných rostlinách a v půdě. Většina druhů zkvašuje laktózu. Rod *Lactobacillus* je možno rozdělit i podle produktů katabolického metabolismu na tzv.:

- homofermentativní mléčné bakterie (např.: *Lbc. delbrueckii*, *Lbc. acidophilus*, *Lbc. plantarum*)
- heterofermentativní mléčné bakterie (např.: *Lbc. fermentum*, *Lbc. brevis*, *Lbc. buchneri*)

Zajímavý je druh *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*, neboť je schopen fermentovat sacharózu, která je obsažena v melase, na kyselinu mléčnou. Dále např. *Lactobacillus plantarum* se využívá při konzervaci zeleniny a píce, je součástí keřových zrn a ve směsi s heterofermentativními druhy (*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*) se vyskytuje v pekařském kvásku. Výskyt laktobacilů má i své nevýhody. Ve vinařství a pivovarství způsobují heterofermentativní druhy chuťové vady. Při výrobě uzenin způsobují peroxidy vodíku a jiné peroxidy, které jsou uvolňovány heterofermentativními druhy (nejčastěji *Lactobacillus viridescens*), zelenání výrobků. [4]

Obr. 4 Melasa [10]



1.3.3 Vlastnosti některých zástupců rodu *Lactobacillus* významných v potravinářském průmyslu

Dnes je známo 117 druhů laktobacilů a stále jsou popisovány nové druhy. Některé druhy jsou známy a využívány mnoho let. Složení jednotlivých doporučených médií je uvedeno v Tabulce 2. V potravinářském průmyslu jsou významné následující druhy:

1.3.3.1 *Lactobacillus acidophilus*

Kultivace:

- optimální teplota: 37°C
- doba kultivace: 16 h
- doporučená kultivační média: obnovené mléko, MRS médium, syrovátkový agar

Vlastnosti:

- tyčinky jednotlivě, ve dvojicích nebo trojicích, fakultativně anaerobní
- chuť mléčná, čistá, ostře kyselá, konzistence hustá
- výroba fermentovaných mléčných výrobků, probiotické preparáty
- zvýšená antibiotická aktivita

1.3.3.2 *Lactobacillus casei* subsp. *casei*

Kultivace:

- optimální teplota: 30°C
- doba kultivace: 48 h
- doporučená kultivační média: odstředěné mléko, MRS médium

Vlastnosti:

- chuť čistě kyselá, konzistence hustá
- doplňková kultura pro výrobu sýrů

1.3.3.3 *Lactobacillus casei* var. *rahamnosus*

Kultivace:

- optimální teplota: 30°C
- doba kultivace: 16-18 h, aerobně
- doporučená kultivační média: odstředěné mléko s 0,5% kvasničného autolyzátu, MRS médium

Vlastnosti:

- antifungální účinky

1.3.3.4 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

Kultivace:

- optimální teplota: 37 - 45°C
- doba kultivace: 16 - 20 h v tekutém médiu, 3-5 dní v agaru, aerobně i anaerobně
- doporučená kultivační média: MRS médium

Vlastnosti:

- chuť výrazně kyselá, aromatická jogurtová, konzistence hustá, film potrhaný
- pro výrobu jogurtů a sýrů

1.3.3.5 *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*

Kultivace:

- optimální teplota: 37 - 40°C
- doba kultivace: 16 - 24 h
- doporučená kultivační média: obnovené mléko, MRS médium

Vlastnosti:

- G⁺ dlouhé tyčinky, fakultativně anaerobní
- citlivost vůči bakteriocinům acidocinu a nisinu v odstředěném mléce
- chuť mléčná, čistá, výrazně kyselá, konzistence hustá
- sýrařská kultura, výroba sýrů s nízko- i vysokodohřívanou syřeninou

1.3.3.6 *Lactobacillus kefir*

Kultivace:

- optimální teplota: 30 - 42°C
- doba kultivace: 16 až 18 h
- doporučená kultivační média: obnovené mléko, MRS médium

Vlastnosti:

- G⁺ tyčinky jednotlivě nebo ve dvojicích, fakultativně anaerobní
- tvorba vláken
- chuť čistě mléčná
- součást směsných kefirových kultur

1.3.3.7 *Lactobacillus plantarum*

Kultivace:

- optimální teplota: 30°C
- doba kultivace: 18 h
- doporučená kultivační média: obnovené mléko, MRS médium

Vlastnosti:

- G⁺ krátké tyčinky, aerobní
- jednotlivě i ve shlucích
- chuť čistě mléčná, ostře kyselá
- doplňková sýrařská kultura, výroba sýrů z ovčího mléka, součást silážních kultur

1.3.3.8 *Lactobacillus reuteri*

Kultivace:

- optimální teplota: 37°C
- doba kultivace: 16 - 18 h, aerobně
- doporučená kultivační média: odstředěné mléko s 0,5% kvasničného autolyzátu, MRS médium

Vlastnosti:

- G⁺ tyčinky
- antifungální účinky

1.3.3.9 *Lactobacillus rhamnosus*

Kultivace:

- optimální teplota: 37°C
- doba kultivace: 18 h
- doporučená kultivační média: obnovené mléko

Vlastnosti:

- G⁺ krátké tyčinky, anaerobní
- jednotlivě, ve dvojicích nebo trojicích
- chuť čistě mléčná, výroba fermentovaných mléčných výrobků, probiotické preparáty

1.3.3.10 *Lactobacillus sakei*

Kultivace:

- optimální teplota: 37°C
- doba kultivace: 16 - 18 h, aerobně
- doporučená kultivační média: odstředěné mléko s 0,5% kvasničného autolyzátu, MRS médium

Vlastnosti:

- G⁺ tyčinky
- citlivý vůči acidocinu, pomalý růst v agaru, slabý nárůst v tekutém médiu

1.3.3.11 *Lactobacillus salivarius* subsp. *salicinus*

Kultivace:

- optimální teplota: 37°C
- doba kultivace: 16 - 18 h, aerobně
- doporučená kultivační média: odstředěné mléko s 0,5% kvasničného autolyzátu, MRS médium

Vlastnosti:

- G⁺ tyčinky
- antifungální účinky [5]

Tabulka 2 Složení doporučených kultivačních médií [5]

MRS médium	g.l ⁻¹	Syrovátkový agar	g.l ⁻¹	Obnovené mléko	g.l ⁻¹
kvasničný extrakt	5	sladká syrovátka	600 ml	SUNAR	130
hovězí extrakt	10	kvasničný extrakt	5	voda	900
pepton	10	K ₂ HPO ₄	1	Sterilizace: 99°C, 90 min	
glukóza	20	MgSO ₄ .7H ₂ O	1		
Tween 80	5 ml	NaCl	2		
K ₂ HPO ₄	2	citrát sodný	1		
octan sodný	5	FeCl ₃	0,05		
citrát amonný	2	voda	300 ml		
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2	agar	20		
MnSO ₄ .7H ₂ O	0,05	pH=6,9 - 7,0			
pH=6,2 - 6,6		Sterilizace: 121°C, 15 min			
Sterilizace: 121°C, 15 min					

1.3.4 Probiotické preparáty

Probiotika jsou podle definice Organizace spojených národů pro výživu a zemědělství (FAO) a Světové zdravotnické organizace živé nepatogenní mikroorganismy převážně lidského původu. V přiměřeném množství příznivě ovlivňují zdravotní stav a předchází nebo zlepšují některá onemocnění. Název „probiotikum“ pochází z řečtiny a znamená „prostředek pro život“. Ilja Iljič Mečnikov je autorem teorie antibioly, tj. potlačování růstu a jiných životních projevů jednoho mikroorganismu jiným mikroorganismem. [8]

V roce 1908 byla prof. I. I. Mečnikovi udělena Nobelova cena za výzkum imunity. Vyslovil jako první hypotézu, že dlouhověkost – a to zejména u zemědělského obyvatelstva – je způsobena stravováním, převážně co se týče konzumace velkého množství fermentovaného kysaného mléka. Prof. I. I. Mečnikov v kysaném mléku identifikoval dva kmeny mikroorganismů a přisoudil jim onen pozitivní vliv na dlouhověkost. Později byly tyto dva kmeny identifikovány jako *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus bulgaricus* žijící v symbióze. [14]

Obr. 5 Ilja Iljič Mečnikov [9]



Jako probiotika se používají zejména kmeny laktobacilů a bifidobakterií, některé nepatogenní kmeny *Escherichia coli* a kvasinka *Saccharomyces boulardii*. Množství bakterií přirozených ve střevní mikroflóře není dostatečné a může být potravou (probiotiky) doplněno. V Tabulce 4 jsou uvedeny nejdůležitější komerčně používané kmeny bakterií s probiotickým účinkem. Růst střevní mikroflóry podporují *prebiotika* (tj. různé druhy vlákniny a oligosacharidů a jejich štěpné produkty). Ke štěpení prebiotik dochází působením mikrobiálních enzymů a vznikají krátké mastné kyseliny, některé aminokyseliny, polyaminy, růstové faktory, vitaminy a antioxidanty, které ovlivňují růst probiotik. [14]

Tabulka 3 Nejdůležitější komerčně používané kmeny bakterií s probiotickým účinkem [15]

Kmen	Výrobce
<i>Lbc. acidophilus</i> NCFM	Rhodia Inc.
<i>Lbc. acidophilus</i> DDS-1	Nebraska Cultures
<i>Lbc. acidophilus</i> SBT-2062	Snow Brand Milk Products
<i>Lbc. acidophilus</i> LA-1/LA-5	Chr. Hansen
<i>Lbc. casei</i> Shirota	Yakult
<i>Lbc. casei</i> Immunitas	Danone
<i>Lbc. fermentum</i> RC-14	Urex Biotech
<i>Lbc. johnsonii</i> La1/Lj1	Nestlé
<i>Lbc. paracasei</i> CRL 431	Chr. Hansen
<i>Lbc. plantarum</i>	Probi AB
<i>Lbc. reuteri</i> SD 2112/MM2	xBiogaia
<i>Lbc. rhamnosus</i> GG	Valio
<i>Lbc. rhamnosus</i> GR-1	Urex Biotech
<i>Lbc. rhamnosus</i> 271	Probi AB
<i>Lbc. rhamnosus</i> LB 21	Essum AB
<i>Lbc. salivarius</i> UCC 118	Univesity College Cork
<i>Lbc. lactis</i> L 1A	Essum AB
<i>Bifidobacterium lactis</i> B6-12	Chr. Hansen
<i>Bifidobacterium longum</i> BB 536	Marinaja Milk Industry
<i>Bifidobacterium longum</i> SBT-2928	Snow Brand Milk Products
<i>Bifidobacterium breve</i>	Yakult
<i>Enterococcus faecium</i>	Arla Foods

1.3.4.1 Požadované vlastnosti probiotik

Používané mikroorganismy mají splňovat následující požadavky. Nesmí mít žádné patogenní vlastnosti, musí být rezistentní k nízkému pH žaludeční šťávy a žluči, musí mít schopnost kolonizovat střevo a adherovat na střevní epitel. Musí být prokázán příznivý účinek na zdravotní stav jedince a zabezpečena bezpečnost. Další důležitou podmínkou je aplikace v živém stavu. Probiotické preparáty mohou obsahovat jeden kmen mikroorganismu

(jednosložkové) nebo více kmenů (vícesložkové). Žádný kmen nebo preparát není optimální pro všechny indikace, z toho důvodu je použití vícesložkových probiotických preparátů přijatelné pouze za předpokladu dostatečně detailní definice jednotlivých kmenů.

Minimální denní dávka probiotického preparátu k dosažení žádaného fyziologického nebo terapeutického účinku se pohybuje v rozmezí asi 100–1000 jednotek tvořících kolonie (CFU). Ztráty životaschopnosti mikroorganismů vznikají působením kyseliny chlorovodíkové, žlučových kyselin a trávicích proteolytických enzymů. Pro snížení těchto ztrát je možné použití enkapsulace s využitím vhodného materiálu. Množství probiotika a jeho funkční stav ovlivňuje také celkovou aktivitu enzymu. [8]

1.3.4.2 Rekombinantní probiotika

V současnosti existují také rekombinantní probiotika. Je možno zde využít některé kmeny laktobacilů a *Escherichia coli* (zejména *E. coli* Nissle viz Obr. 6). Tento kmen byl modifikován s využitím technik genových manipulací. Novou terapeutickou strategií je vytváření mimikry pro vazbu mikrobiálních toxinů (např. toxinu cholery) na povrchu rekombinantního kmene *E. coli*. Při podání mimikry dochází k vazbě toxinu na membránu probiotika, čímž se snižuje množství toxinu navázaného na epiteliální receptory. [8]

Obr. 6 *E. coli* Nissle [11]



1.3.5 Bakteriociny

Využití bakteriocinů je převážně v potravinářství jako konzervační přípravek a v medicíně jako baktericidní a antivirová léčiva. V Tabulce 4 je uveden přehled mléčných bakterií a jimi produkováných bakteriocinů a bakterií, které jsou těmito bakteriociny potlačovány.

Bakteriociny, které jsou produkovány mléčnými bakteriemi, můžeme zařadit do následujících tříd:

- *Třída I:* lantibiotika
 - obsahují zvláštní aminokyseliny jako např. lantionin, 3-metyllantionin a malé molekuly: 2 až 3 kDa
 - patří sem: nisin, subtilin, galidermin, epidermin a pep 5
- *Třída II:* nemodifikované tepelně odolné bakteriociny
 - velikost do 10 kDa, produkovány kmeny rodů *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* a *Enterococcus*
 - podtřída IIa: pediocinové bakteriociny se silným antilistériálním účinkem
 - podtřída IIb: dvoupeptidové bakteriociny
- *Třída III:* velké tepelně labilní bakteriociny

V potravinářství by největší uplatnění našly bakteriociny třídy I a II. Nejvýznamnější je antibakteriální polypeptid nisin izolovaný z buněk *Lactococcus lactis*. Nisin zamezuje růstu nežádoucí mikroflóry při výrobě mléčných výrobků a chrání před spory *Clostridium botulinum* v pasterovaných sýrech. V průběhu kvašení piva a vína je možné použít nisin také k zamezení růstu mléčných bakterií, což by umožnilo snížení množství použitého oxidu siřičitého. K řízenému štěpení požadovaných kyselin v potravinách by ovšem bylo potřeba

použit mléčné bakterie rezistentní vůči nisinu. Bakterie rodu *Lactobacillus* produkují řadu polypeptidů s podobnými vlastnostmi.

Bakteriociny se využívají např. proti bakteriím *Listeria monocytogenes* a dalším (např. nisin, brevicin 286, sakacin A, divercin V41, pediociny, mesentericin Y105, enterocin A), *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* a *Staphylococcus aureus*. Vyšší účinností než nisin a stabilitou při vysokých teplotách a spektru pH = 3 - 8 se vyznačují bakteriociny produkované bakteriemi rodu *Pediococcus*, tzv. pediociny. [16]

Tabulka 4 Přehled mléčných bakterií, produkovaných bakteriocinů a potlačovaných bakterií [16]

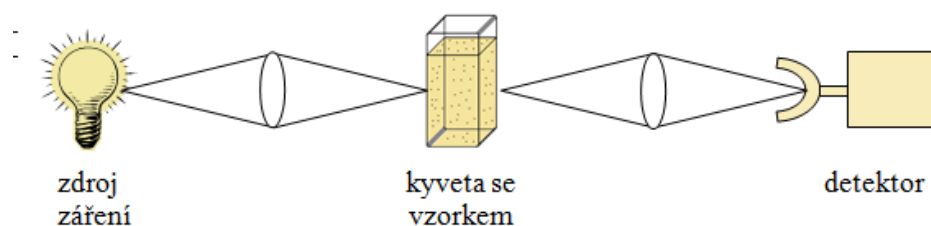
Producent	Bacteriocin	Potlačované bakterie
<i>Lactobacillus brevis</i>	Brevicin 286	<i>Lactobacillus</i> ssp., <i>Listeria innocua</i> , <i>Listeria grayi</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	Brevicin 37	<i>Lactobacillus</i> ssp., <i>Leuconostoc</i> ssp., <i>Pediococcus</i> ssp.
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Helveticin J	<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus casei</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Lactocin 27	<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lactacin B	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus leichmanii</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lactobacillus sakei</i>	Lactocin S	<i>Lactobacillus</i> ssp., <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>
<i>Lactobacillus sakei</i>	Sakacin A	<i>Lactobacillus</i> ssp., <i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Plantaricin A	<i>Lactobacillus</i> ssp., <i>Pediococcus</i> ssp., <i>Leuconostoc</i> ssp., <i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Plantaricin B	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus damnosus</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Plantaricin S	<i>Lactobacillus</i> ssp., <i>Pediococcus</i> ssp., <i>Leuconostoc</i> ssp., <i>Lactococcus</i> ssp.
<i>Carnobacterium divergens</i> V41	Divercin V41	<i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Enterococcus faecium</i>
<i>Carnobacterium piscicola</i>	Pisciocin V1A	<i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Clostridium divergens</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>

<i>Lactococcus lactis</i>	Lactacin 481	<i>Lactococcus</i> ssp., <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc</i> ssp., <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Clostridium tyrobutyricum</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	Lactostrepsin	<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Enterococcus</i> ssp. <i>Leuconostoc</i> ssp., <i>Clostridium</i> ssp., <i>Lactococcus</i> ssp.
<i>Lactococcus lactis</i>	Nisin	<i>Lactococcus</i> ssp., <i>Lactobacillus</i> ssp., <i>Clostridium</i> ssp., <i>Bacillus</i> ssp., <i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Lactococcin A	<i>Lactococcus</i> ssp.
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pediocin A	<i>Lactobacillus</i> ssp., <i>Clostridium</i> ssp., <i>Bacillus cereus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Pediocin AcH	<i>Lactobacillus</i> ssp., <i>Clostridium</i> ssp., <i>Bacillus cereus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Pediocin PA-1	<i>Lactobacillus</i> ssp., <i>Lactococcus</i> ssp., <i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Mesentericin Y105	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Listeria innocua</i> , <i>Listeria ivanovii</i> , <i>Listeria seeligeri</i> , <i>Listeria welshimeri</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	Enterocin A	<i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>

1.4 Turbidimetrie

Turbidimetrie je optická metoda založená na měření procházejícího světla, které je zeslabené rozptylem na částicích. Hlavní podmínkou vzorku je získání reprodukovatelné suspenze, která je dostatečně stálá. Absorbované záření koloidním roztokem nebo roztokem zakaleným jemnou sraženinou se měří absorpčními fotometry a spektrofotometry. Schéma turbidimetrie je uvedeno na Obr. 7.

Obr. 7 Schéma turbidimetrie [13]



Fotometrická citlivost je nepřímě úměrná vlnové délce. Vztah mezi absorbcí a koncentrací částic pro malé částice bývá obvykle lineární. To ale většinou neplatí pro imunochemické reakce. Linearita se také může měnit se změnou vlnové délky záření. Výslednou absorbcí může dále ovlivnit vznik částic odlišné velikosti. Pokud měříme

turbiditu bezbarvé suspenze, můžeme použít jakýkoliv fotometr nebo spektrofotometr. U této metody je nutné eliminovat vliv interferujících látek, i kdyby to mělo snížit citlivost měření.

Závislost intenzity prošlého záření na vlastnostech absorbujícího prostředí je exponenciální: $I_t = I_0 \cdot e^{-\tau \cdot l}$, kde I_t = intenzita prošlého záření, I_0 = intenzita světelného zdroje, τ = turbiditní koeficient, l = světelná dráha kyvetou. [12]

Turbidimetrická měření zákalu (OD) kultivačních médií v průběhu růstu bakteriálních buněk se provádí při hodnotě $\lambda = 600$ nm.

1.4.1 Měření buněčné hustoty

Cell density meter biowave WPA CO 8000 (Obr. 8) je přístroj určený k měření hustoty buněk v suspenzi. Jedna z výhod tohoto přístroje je integrovaná baterie, která umožňuje přenášet přístroj přímo tam, kde se buňky kultivují. Výsledky mohou být uloženy do paměti nebo po připojení přeneseny do PC nebo vytisknuty tiskárnou. Výsledky jsou udávány v jednotkách absorbance (OD).

Je možné použít různé druhy kyvet a zkumavek o průměru 10, 12 a 16 mm. Tento malý přístroj využívá LED diodu s neomezenou životností a pro měření nejsou potřeba žádné filtry. Před samotným měřením není potřeba žádné zahřívání, stačí přístroj zapnout a je připravený pro použití. Poskytnuté výsledky jsou srovnatelné s většími a dražšími spektrofotometry. Specifikace tohoto přístroje je uvedena v Tabulce 5.

Obr. 8 Cell density meter biowave WPA CO 8000 [17]



Tabulka 5 Specifikace přístroje Cell density meter biowave WPA CO 8000 [17]

Vlnová délka	600nm
Vlnový rozsah	40nm
Rozsah	Optická hustota - 0.3A až 1.99A
Přesnost	<±0.05A při 1A
Reprodukovatelnost	±0.02A při 1A
Ovládací prvky	6 tlačítek - on/off, REF, TEST, paměť, reset, vyvolat paměť/tisk
Držák kyvet	Nepohyblivý s otvorem pro výtok vody. Akceptuje semi-mikro a makro kyvety s optickou délkou 10mm nebo kulaté zkumavky o průměru 16mm. Může akceptovat zkumavky 10 a 12 mm s adaptérem (nestandardní)
Výstup	RS232
Paměť	99 údajů
Displej	Uživatelský LCD
Požadavky výkonu	Externí adaptér (110 nebo 220V) nebo interní dobíjecí NiMH baterie
Přibližné rozměry	180 x 150 x 60 mm
Váha	0.5kg

1.4.2 Růstová křivka

Růstová křivka se využívá jako grafické znázornění vzrůstu počtu živých buněk. Při submersní „batch“ kultivaci (tj. jednorázové) v tekutém médiu je celý systém uzavřený, to znamená, že v průběhu kultivace nejsou přidávány ani odebírány jeho jednotlivé složky. Na osu x se vynáší čas udávaný nejčastěji v hodinách, na osu y logaritmus počtu živých buněk nebo optická hustota. Logaritmus počtu buněk se používá při počítání buněk mikroskopicky v počítací komůrce nebo kultivačně po výsevu na ztuženém kultivačním mediu na Petriho misce. Optická hustota se využívá při měření nárůstu buněčné hmoty turbidimetricky. Při kultivaci po zaočkování kultury do médií můžeme rozlišit několik fází růstu (Obr. 9).

Lag-fáze:

Během této fáze se buňky nerozmnožují, prozatím zvětšují svůj objem a aktivuje se jejich enzymový systém. Délka lag-fáze se liší podle druhu mikroorganismu, fyziologického stavu buněk, podle složení růstového média a nepřímo úměrně podle velikosti inokula.

Fáze zrychlujícího se růstu:

Tato fáze je většinou krátká a přechodná. Buňky se začínají dělit zvyšující se rychlostí a zkracující se generační dobou.

Exponenciální fáze:

Exponenciální fáze se vyznačuje intenzivním a pravidelným růstem buněk. Generační doba je v této fázi nejkratší a konstantní. Počet buněk roste exponenciálně s časem. Tato fáze je také označována jako logaritmická, protože mezi logaritmem počtu buněk a dobou růstu dochází k lineární závislosti.

Fáze zpomalujícího se růstu:

V průběhu této fáze rychlost dělení buněk klesá až k rovnovážnému stavu. Zde již dochází k odumírání buněk.

Stacionární fáze:

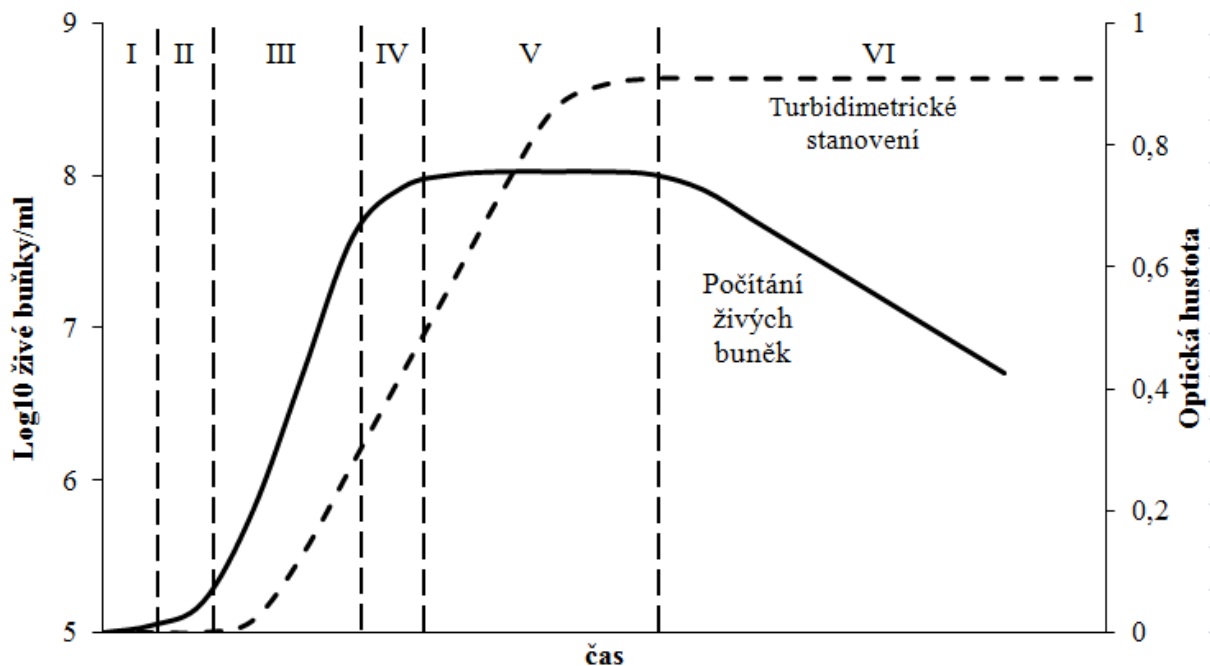
Většinou dochází k vyčerpání živin nebo vzrůstu koncentrace toxického metabolitu nad určitou hranici a dochází k zastavení růstu buněčné populace. Buňky se pomalu dělí a zároveň i odumírají, jejich počet zůstává konstantní. Délka stacionární fáze se liší u jednotlivých mikroorganismů v závislosti na jejich citlivosti k stresovým podmínkám (hladovění, přítomnost toxického metabolitu apod.). Při umírání bakteriálních buněk většinou klesá obsah glykogenu a intracelulární RNA, později jsou metabolizovány vnitrobuněčné proteiny.

Fáze postupného odumírání:

Během této fáze se buňky už nedělí. Pouze hynou a koncentrace živých buněk klesá. Tato fáze není při turbidimetrickém měření pozorovatelná, protože turbidimetr nerozpozná živé a mrtvé buňky. [18]

Obr. 9 Fáze růstové křivky [19]

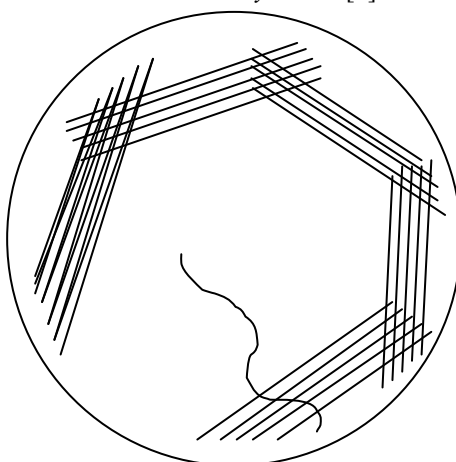
I - Lag-fáze, II - Fáze zrychlujícího se růstu, III - Exponenciální fáze, IV - Fáze zpomalujícího se růstu, V - Stacionární fáze, VI - Fáze postupného odumírání



1.5 Křížový roztěr

Princípem křížového roztěru je postupné vyředování vzorku na agarové plotně pomocí očkovací kličky. Výsledkem správného roztěru jsou izolované kolonie bakterií, které jsou uniformní u čisté kultury a různé u kultury směsné. Při hodnocení kolonií se sleduje velikost, tvar, okraje, povrch, konzistence, profil, transparence, barva, okolí kolonie, zápach. Správné provedení křížového roztěru je zobrazeno na Obr. 10. [1]

Obr. 10 Křížový roztěr [1]



1.6 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

Pro stanovení koncentrace DNA se využívá molekulová absorpční spektrometrie v UV/VIS oblasti. Tato analytická metoda je přesná, rychlá, citlivá a nenáročná. Umožňuje sledovat absorpci elektromagnetického záření v intervalu 200 - 800 nm. Během měření dochází k absorpci energie, což znázorňuje $\Delta E = E_1 - E_0 = h \cdot \nu = \Delta E_e + \Delta E_v + \Delta E_r$. U atomů bereme v úvahu pouze přechod elektronů, ale u molekul je nutné započítat také vibrační (E_v) a rotační (E_r) stupně volnosti. Vzniká pásové absorpční spektrum.

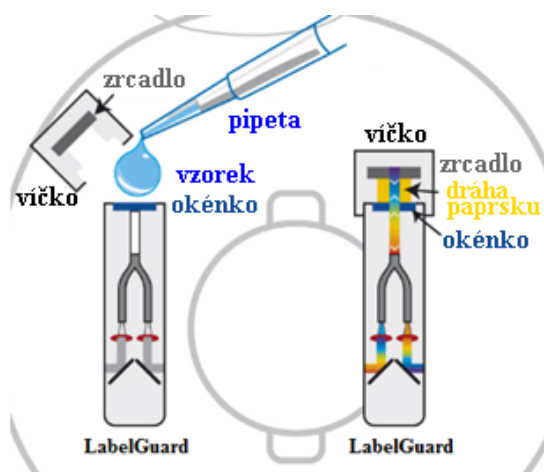
V organických sloučeninách dochází k intramolekulárním přechodům a k přechodům náboje. Pod pojmem intramolekulární přechody se skrývají přechody vazebných elektronů z orbitalů σ nebo π a nevazebných elektronů n do antivazebných orbitalů σ^* nebo π^* . Při přechodu náboje dochází k přechodu elektronu ze základního vazebného orbitalu π nebo nevazebného orbitalu n donoru na antivazebný orbital akceptoru π^* . [20]

1.6.1 NanoPhotometer™ Implen

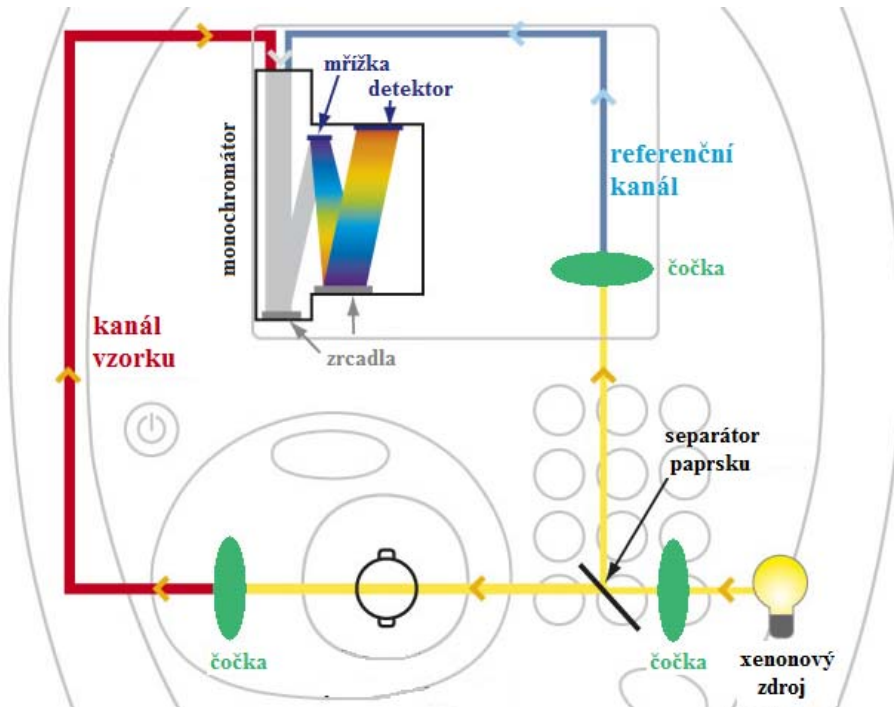
NanoPhotometer má všestranné využití. Umožňuje provádět analýzu o submikrolitrových, mikrolitrových i běžných mililitrových objemech. Při velmi malých objemech (0,7 μ l - 10 μ l) se využívá LabelGuard™ Cell, při větších objemech je možné využít běžně dostupné kyvety. Speciální použití má DiluCell™, která umožňuje stanovení kolorimetrických proteinů nebo hustoty mikrobiálních buněk (A_{600nm}) při objemech v rozmezí 100 - 200 μ l.

Tento přístroj umožňuje nejvyšší flexibilitu ve fotometrii. Je schopný provést měření při jedné vlnové délce i při více vlnových délkách najednou, měření koncentrace, skenování celkého absorpčního spektra, stanovení kalibrační křivky, výpočet poměru a kinetiky. V paměti přístroje jsou již přednastaveny některé aplikace a je možné si i uložit často používané aplikace. K přístroji je možno připojit tiskárnu nebo přístroj propojit s počítačem přes USB nebo Bluetooth. [21] Způsob nanesení vzorku a průchod světelného paprsku přes celou LabelGuard je zobrazen na Obr. 11 a optická dráha v nanofotometru je zobrazena na Obr. 12.

Obr. 11 Způsob nanesení vzorku a průchod světelného paprsku LabelGuard Cell [22]



Obr. 12 Optická dráha v nanofotometru [23]

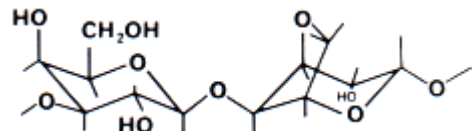


1.7 Agarózová gelová elektroforéza

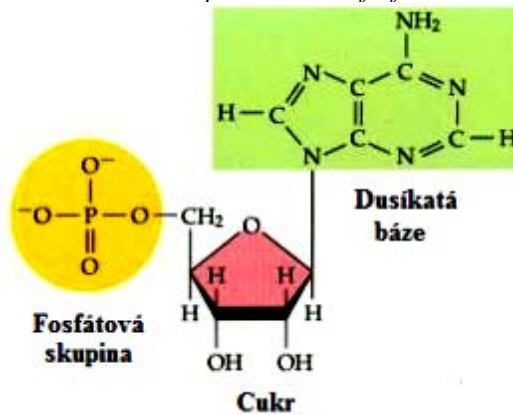
Tato technika má mnoho aplikací, kromě využití v běžných výzkumných technikách je využívána i k detekci DNA při soudních procesech. Umožňuje rozdělit fragmenty DNA podle jejich velikosti.

Pro pohyb molekuly DNA přes agarózový gel se využívá elektrický proud. Agaróza (Obr. 13) je polysacharid, jehož matice funguje jako jakési síto a pomáhá "zachytit" molekuly podle toho, jak jsou transportovány elektrickým proudem. Pomocí této techniky můžeme analyzovat jednotlivé fragmenty DNA a určit jejich velikost.

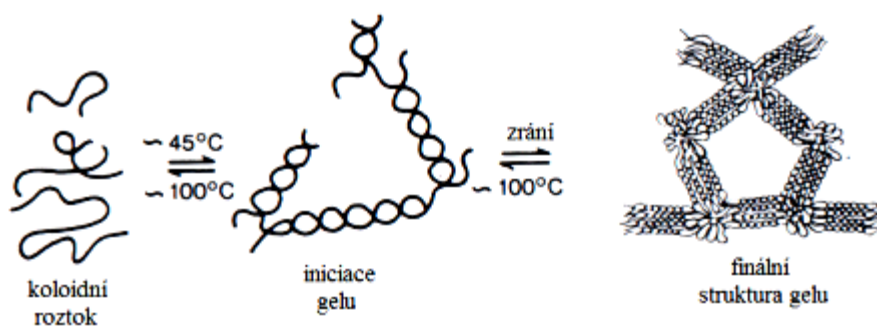
Obr. 13 Struktura agarózy [25]



Obr. 14 Struktura DNA se záporně nabitou fosfátovou skupinou [27]



Obr. 15 Struktura agarózového gelu [26]



Molekuly fosfátu, které se nacházejí na hlavním řetězci DNA, nesou záporný náboj (Obr. 14). Když je molekula DNA umístěna do pole s elektrickým proudem, tyto negativně nabitě molekuly DNA migrují směrem ke kladné elektrodě. Agarózový gel je ponořen do vany s puřem. Při průchodu gelem se molekuly setkávají s odporem zesíťené agarózy (Obr. 15). Principem rozdělení fragmentů podle jejich velikosti je to, že menší molekuly jsou schopné procházet rychleji než ty větší, proto doputují na gelu dále od nanášecích komůrek. Při vyhodnocení se využívá barvení DNA na gelu ethidium bromidem nebo značení molekul DNA. Obě tyto metody zvýrazní jednotlivé bandy fragmentů na gelu.

Při stanovení velikosti DNA fragmentů se využívá standard, u kterého jsou známé velikosti jednotlivých fragmentů. Po provedení elektroforézy se bandy neznámého vzorku srovnávají s bandy standardu a určí se jejich přibližná velikost. [24]

1.8 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

K amplifikaci specifické DNA sekvence se využívá polymerázová řetězová reakce, při které dochází k enzymatické syntéze DNA *in vitro*. Během relativně krátké doby je možno syntetizovat z jedné molekuly DNA až 100 miliard kopií. Jde o velmi jednoduchou metodu, která je důležitá pro výzkum a diagnostiku DNA a RNA. Specifičnost metody závisí na výběru vhodných primerů a vhodné teploty pro jejich připojení k DNA matrici. Při splnění těchto podmínek je ve většině případů možno amplifikovat bakteriální DNA přímo z lyzátu buněk.

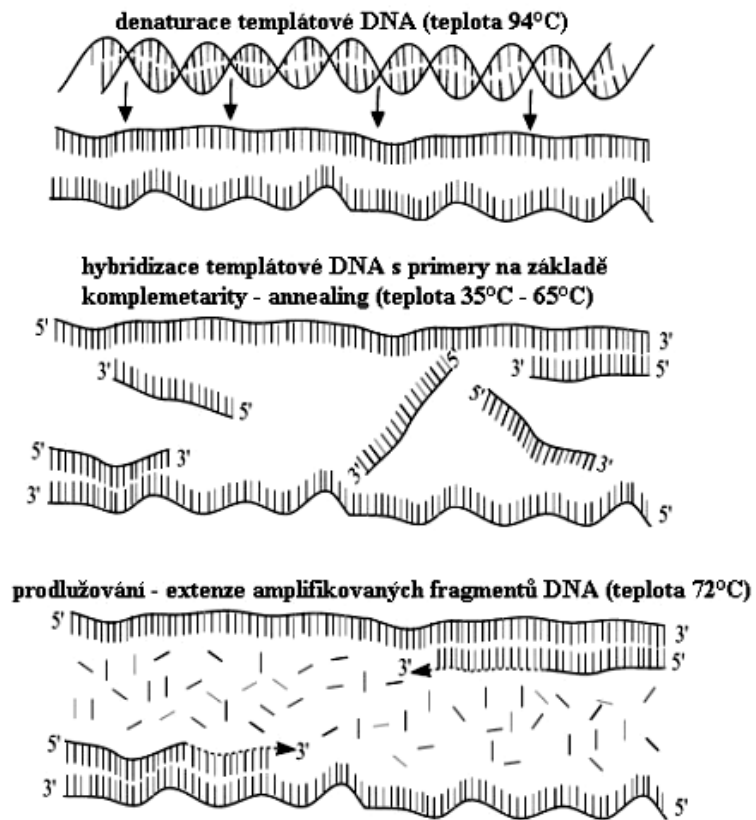
Amplifikace DNA probíhá v polymeračních cyklech, které se skládají ze tří kroků:

1. denaturace DNA
2. hybridizace primerů
3. syntéza komplementárního řetězce DNA.

Poslední krok, syntéza řetězce DNA, využívá termostabilní DNA polymerázu. Čistota a výtěžnost produktů PCR jsou ovlivněny více parametry, z nichž nejdůležitější je již zmíněná teplota připojení primeru. Při teplotě, která není optimální pro připojení, dochází k syntéze nespecifických produktů, čímž dochází ke snížení výtěžku specifického PCR produktu. Největší nebezpečí vzniku nespecifických produktů je při syntéze dlouhých PCR produktů. Jsou-li všechny parametry této metody dokonale optimalizovány, je možno získat z 1 molekuly DNA až jeden mikrogram PCR produktu. [28]

Schéma průběhu polymerázové řetězové reakce je uvedeno na Obr. 16.

Obr. 16 Schéma metody PCR [29]



2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Cíl práce

Cíl diplomové práce byl zaměřen na studium podmínek růstu čtyř vybraných kmenů rodu *Lactobacillus* v médiích s různým obsahem zdroje uhlíku (glukóza, laktóza, syrovátka) a v médiích s odlišným pH (stresové podmínky).

Dalším cílem bylo izolovat z bakteriální kultury DNA a prokázat přítomnost bakterií rodu *Lactobacillus* pomocí PCR s využitím rodově specifických primerů. Materiály a metody

2.2 Mikroorganismy a použité materiály

2.2.1 Analyzované mikroorganismy

Ke studiu podmínek aerobní kultivace byly použity mikroorganismy rodu *Lactobacillus*, které byly izolovány ze stolice zdravých plně kojených dětí. Byly použity kmeny:

- *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211 (OM10N)9/07
- *Lactobacillus paracasei* CCDM 212 (OM10N)8/07
- *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 213 (OM10N)9/07
- *Lactobacillus salivarius* CCDM 216 (OM10N)9/07.

2.2.2 Chemikálie

2.2.2.1 Pro přípravu kultivačních médií

- | | |
|--|--|
| – citrát amonný | – MnSO ₄ ·7H ₂ O |
| – destilovaná voda | – MRS agar (Oxoid, Anglie) |
| – glukóza (20%) | – MRS broth (Oxoid, Anglie) |
| – HCl (1 M) | – NaOH (1 M) |
| – hovězí extrakt | – octan sodný |
| – K ₂ HPO ₄ | – pepton |
| – kvasničný extrakt | – syrovátka sušená |
| – laktóza (20%) | – Tween 80 |
| – MgSO ₄ ·7H ₂ O | |

2.2.2.2 Roztoky pro lyzi buněk

- | | |
|----------------------------|----------------------------|
| – Lyzační roztok (A) | – Lyzační roztok (B) |
| ○ Tris-HCl (10 mM, pH 7,8) | ○ Tris-HCl (10 mM, pH 7,8) |
| ○ EDTA (5 mM, pH 8,0) | ○ EDTA (5 mM, pH 8,0) |
| – proteináza K (100 µg/ml) | ○ lysozym (3 mg/ml) |
| – SDS (20%) | |

2.2.2.3 Roztoky pro purifikaci DNA

- | | |
|--|------------------------|
| – CIZ (chloroform:izoamylalkohol 24:1) | – TE pufr |
| – ethanol | ○ Tris (10 mM, pH 7,8) |
| – fenol (předestilovaný, pH 7,8) | ○ EDTA (1 mM, pH 8,0) |
| – octan sodný (3 M) | |

2.2.2.4 Roztoky pro spektrofotometrické stanovení

- *TE pufr*
 - Tris-HCl (10 mM, pH 7,8)
 - EDTA (1 mM, pH 8,0)

2.2.2.5 Komponenty pro agarózovou gelovou elektroforézu

- agaróza
- ethidium bromid (1 µg/ml)
- nanášecí pufr (pro gelovou elektroforézu DNA)
- PCR vkládací pufr (pro PCR produkt)
- *TBE pufr* (5x koncentrovaný)
 - 54 g Tris-base
 - 27,5 g kyselina boritá
 - 20 ml EDTA (0,5 M, pH 8)

2.2.2.6 Komponenty pro PCR

- 10x reakční pufr kompletní
- dNTP směs (10 mM)
- DNA polymeráza Taq 1.1 (1U/µl)
- voda pro PCR
- *DNA primery*
 - LbLMA 1(10 pmol/µl)
 - R 16-1 (10 pmol/µl)

2.2.2.7 Roztoky pro přípravu hrubého lyzátu buněk povařením

- PCR voda

2.3 Metody měření

2.3.1 Kultivace buněk v MRS médiu s glukózou

- pro přípravu kultivačního média bylo použito komerčně dostupné MRS médium a destilovaná voda (5,2 g média na 100 ml H₂O)
- kultivace byla prováděna v 50 ml kultivačního média s 1 ml kultury narostlé přes noc (ON, over night) aerobně bez třepání při teplotě 37°C
- v průběhu kultivace byly odebírány vzorky v hodinových intervalech a byla měřena optická hustota při 600 nm (A_{600}) pomocí přístroje Cell density meter biowave WPACO 8000
- čistota kultury byla ověřena křížovým roztěrem a metodou PCR

2.3.2 Kultivace buněk v MRS médiu s laktózou o obsahu 2% ve větším objemu

- bylo připraveno MRS médium bez glukózy a 20% roztok laktózy
- kultivace byla prováděna v 50 ml kultivačního média (45 ml média + 5 ml 20% roztoku laktózy) s 1 ml kultury narostlé přes noc (ON, over night) aerobně bez třepání při teplotě 37°C
- v průběhu kultivace byly odebírány vzorky v hodinových intervalech a byla měřena optická hustota při 600 nm (A_{600}) pomocí přístroje Cell density meter biowave WPACO 8000

2.3.3 Kultivace buněk v MRS médiu s laktózou o obsahu 2%

- bylo připraveno MRS médium bez glukózy a 20% roztok laktózy
- kultivace byla prováděna v 10 ml kultivačního média (9 ml média + 1 ml 20% roztoku laktózy) se 100 μ l kultury narostlé přes noc (ON, over night) aerobně bez třepání při teplotě 37°C
- v průběhu kultivace byly odebírány vzorky a byla měřena optická hustota při 600 nm (A_{600}) pomocí přístroje Cell density meter biowave WPACO 8000

2.3.4 Kultivace buněk v MRS médiu s laktózou o obsahu 4%

- bylo připraveno MRS médium bez glukózy a 20% roztok laktózy
- kultivace byla prováděna v 10 ml kultivačního média (8 ml média + 2 ml 20% roztoku laktózy) se 100 μ l kultury narostlé přes noc (ON, over night) aerobně bez třepání při teplotě 37°C
- v průběhu kultivace byly odebírány vzorky a byla měřena optická hustota při 600 nm (A_{600}) pomocí přístroje Cell density meter biowave WPACO 8000

2.3.5 Kultivace buněk v MRS médiu s různým obsahem syrovátky ve stresových podmínkách

- bylo připraveno MRS médium bez glukózy a roztok syrovátky, aby obsah sacharidů v syrovátce byl 20% (13,1 g syrovátky na 50 ml)
- byla připravena média s různým obsahem syrovátky:
 - 2% sacharidů: 9 ml MRS média + 1 ml roztoku syrovátky
 - 4% sacharidů: 8 ml MRS média + 2 ml roztoku syrovátky
 - 6% sacharidů: 7 ml MRS média + 3 ml roztoku syrovátky
 - 8% sacharidů: 6 ml MRS média + 4 ml roztoku syrovátky
- tyto média byly upraveny 1 M HCl na pH 4,0; 4,5; 5,0 a 5,5
- kultivace byla prováděna se 100 μ l kultury *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211 narostlé přes noc (ON, over night) aerobně bez třepání při teplotě 37°C
- v průběhu kultivace byly odebírány vzorky a byla měřena optická hustota při 600 nm (A_{600}) pomocí přístroje Cell density meter biowave WPACO 8000, jako blak bylo použito kultivační médium i MRS médium
- čistota kultury byla ověřena křížovým roztěrem a příslušnost k rodu *Lactobacillus* byla prokázána metodou PCR z hrubých lyzátů bakteriálních kolonií kultivovaných na MRS agaru

2.3.6 Analýza chování kultury ve stresových podmínkách

- stresové podmínky byly vytvořeny snížením pH MRS média s laktózou, pH bylo upraveno 1 M HCl na hodnoty 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5
- do zkumavek bylo napipetováno 9 ml média o daném pH, 1 ml 20% roztoku laktózy

- po sterilizaci bylo médium zaočkováno 100 μ l kultury narostlé přes noc (ON, over night) aerobně bez třepání při teplotě 37°C
- kultura byla kultivována v termostatu při 37°C
- v průběhu kultivace byly odebírány vzorky a byla měřena optická hustota při 600 nm (A_{600}) pomocí přístroje Cell density meter biowave WPACO 8000
- na počátku byl vzorek i blank zředěn 5x, při hodnotě OD vyšší než 0,90 byl vzorek i blank zředěn 10x ve sterilní H₂O
- čistota kultury byla ověřena metodou PCR

2.3.7 Turbidimetrické stanovení růstové křivky

- růst buněčné kultury byl stanoven měřením optické hustoty při 600 nm (A_{600}) pomocí přístroje Cell density meter biowave WPACO 8000
- jako blank bylo použito kultivační médium
- při hodnotě OD vyšší než 0,90 byl vzorek i blank naředěn (viz jednotlivá měření)

2.3.8 Křížový roztěr

- kultura narostlá přes noc v MRS médiu byla nanesena očkovací kličkou křížovým roztěrem na MRS agar
- Petriho miska byla vložena do termostatu nastaveného na 37°C na dobu asi 30 hodin
- narostlé kolonie byly vyfotografovány a vizuálně vyhodnoceny

2.3.9 Izolace bakteriální DNA

Příprava a lyze buněk

- 1 ml kultury narostlé v MRS médiu byl napipetován do zkumavky eppendorf
- suspenze byla centrifugována při 15 000 otáčkách po dobu 3 minuty, supernatant byl opatrně slit
- sediment byl rozsuspendován v 100 μ l roztoku A, po důkladném promíchání bylo přidáno 900 μ l roztoku A
- suspenze byla centrifugována při 15 000 otáčkách po dobu 5 minut, supernatant byl opatrně slit
- sediment byl rozsuspendován v 500 μ l roztoku B
- vzorky byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny za občasného promíchání
- k suspenzi bylo přidáno 12,5 μ l 20% SDS a 5 μ l proteinázy K (100 μ g/ml)
- po promíchání byly vzorky inkubovány při 55°C do druhého dne

Fenolová extrakce

- k lyzátu buněk bylo přidáno 500 μ l fenolu a směs byla kývavým pohybem promíchávána po dobu 4 minuty
- suspenze byla centrifugována při 15 000 otáčkách po dobu 5 minut

- pomocí pipety s ustřiženou špičkou byla odebrána vodná fáze s DNA do nové zkumavky eppendorf
- k vodné fázi s DNA bylo přidáno 700 μ l CIZ
- suspenze byla kývavým pohybem promíchávána po dobu 4 minuty
- suspenze byla centrifugována při 15 000 otáčkách po dobu 3 minuty
- vodná fáze s DNA byla opět odebrána do nové zkumavky eppendorf

Přesrážení DNA ethanolem

- ke vzorku DNA bylo přidáno 40 μ l octanu sodného, suspenze byla promíchána
- k suspenzi byl přidán 1 ml ethanolu a suspenze byla opět důkladně promíchána
- suspenze byla ponechána při - 20°C po dobu 15 minut, aby došlo k vysrážení DNA
- suspenze byla centrifugována při 15 000 otáčkách po dobu 15 minut, supernatant byl slit
- sediment byl sušen v exikátoru po dobu asi 15 minut
- vysušený sediment byl rozpuštěn v 500 μ l TE pufru

2.3.10 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

- spektrofotometrické stanovení bylo provedeno na přístroji Nanophotometer Implen
- podle předpokládané koncentrace a tabulky přiložené k přístroji byl zvolen LID faktor 10, faktor 50 a potřebný objem 3 μ l
- po napipetování byla cela přikryta víčkem a byla změřena koncentrace a absorbance vzorku
- jako blank byl použit TE pufr

2.3.11 Gelová elektroforéza bakteriální DNA

- byl připraven 0,6% agarózový gel (0,3 g agaru, 50 ml TBE pufru), suspenze byla dobře rozvařena v mikrovlnné troubě, nalita do misky s hřebínkem a ponechána asi 1 hodinu zatuhnout
- na podložce bylo smícháno 20 μ l DNA v TE pufru s 4 μ l nanášecího pufru, případně 30 μ l DNA v TE pufru s 6 μ l nanášecího pufru, připravené směsi byly naneseny do komůrek gelu
- vanička s gelem byla opatrně převrstvena 0,5x TBE pufrům a bylo zapnuto napětí (60 V), elektroforéza probíhala asi 2 a půl hodiny
- po ukončení byl gel obarven ethidium bromidem (0,5 μ g/ml) po dobu asi 1 hodiny
- gel byl opláchnut v destilované vodě a umístěn na transiluminátor
- gel byl vyfotografován v UV světle pomocí digitálního fotoaparátu

2.3.12 Rodově specifická PCR s použitím purifikované DNA jako DNA matrice

- byla připravena PCR směs, jednotlivé komponenty byly vkládány v následujícím pořadí a množství:
 - o PCR voda 19 μ l
 - o 10x reakční pufr kompletní 2,5 μ l
 - o dNTP směs (10 mM) 0,5 μ l
 - o primer LbLMA1 (10 pmol/ μ l) 0,5 μ l
 - o primer R16-1 (10 pmol/ μ l) 0,5 μ l
 - o DNA polymeráza Taq 1.1 (1U/ μ l) 1 μ l
 - o DNA matrice (10 ng/ μ l) 1 μ l
- jako matrice DNA byla použita purifikovaná DNA zředěná na požadovanou koncentraci v TE pufru (10 ng/ μ l)
- byla připravena negativní a pozitivní kontrola, do negativní kontroly byla vložena PCR voda místo DNA matrice, do pozitivní byla vložena DNA *Lactobacillus casei* (10 ng/ μ l)
- PCR směs byla vložena cykleru a byl zvolen program požadovaný pro rod *Lactobacillus* (LBC ROD), jehož průběh je:
 1. 95°C – 5 minut
 2. 95°C – 30 vteřin- dochází k denuraci DNA
 3. 55°C – 30 vteřin - připojují se primery
 4. 72°C – 30 vteřin - probíhá syntéza DNA řetězce

} Při tomto nastavení bylo provedeno 30 cyklů
- při posledním cyklu byl poslední krok (72°C) proveden po dobu 10 minut

Detekce PCR produktu pomocí agarosové gelové elektroforézy

- byl připraven 1,8% agarózový gel (0,9 g agaru, 50 ml TBE pufru), suspenze byla dobře rozvařena v mikrovlnné troubě, nalita do misky s hřebínkem a ponechána asi 1 hodinu zatuhnout
- PCR směs vzorku i kontrol (25 μ l) byla smíchána s 5 μ l stop pufru
- směs vzorků byla nanášena do komůrek, vedle byl nanášen DNA standard (5 μ l), pak negativní kontrola a nakonec kontrola pozitivní
- vanička s gelem byla opatrně převrstvena TBE puftrem a bylo zapnuto napětí (60 V), elektroforéza probíhala asi 2 hodiny
- po ukončení byl gel obarven ethidium bromidem po dobu asi 1 hodiny
- gel byl opláchnut v destilované vodě a umístěn na transiluminátor
- gel byl vyfotografován v UV světle pomocí digitálního fotoaparátu

2.3.13 Rodově specifická PCR s použitím DNA matrice z hrubého lyzátu buněk

Příprava hrubého lyzátu buněk povražením

- do zkumavky eppendorf byl napipetován 1 ml kultury narostlé při stresových podmínkách (pH 5,0; 5,5; 6,0; 6,5)

- suspenze byla centrifugována při 15 000 otáčkách po dobu 1 minuty, supernatant byl opatrně slit, sediment byl rozsuspendován v 1 ml sterilní vody
- suspenze byla centrifugována při 15 000 otáčkách po dobu 1 minuty, supernatant byl opatrně slit, sediment byl dokonale rozsuspendován v 100 µl serilní vody
- suspenze byla vložena do cykleru a program BOIL na dobu 10 minut

Příprava PCR směsi s DNA z hrubého lyzátu buněk

- byla připravena PCR směs, jednotlivé komponenty byly vkládány v následujícím pořadí a množství:

○ PCR voda	18 µl
○ 10x reakční pufr kompletní	2,5 µl
○ dNTP směs (10 mM)	0,5 µl
○ primer LbLMA1 (10 pmol/µl)	0,5 µl
○ primer R16-1 (10 pmol/µl)	0,5 µl
○ DNA polymeráza Taq 1.1 (1U/µl)	1µl
○ DNA matrice	2 µl
- jako matrice DNA byl použit 10x, 100x a 1000x zředěný hrubý lyzát, před přidáním do směsi byla DNA matrice vložena do cykleru, kde byla zahřívána po dobu 5 minut na 95°C
- byla připravena negativní a pozitivní kontrola, do negativní byla vložena PRC voda místo DNA matrice, do pozitivní byla vložena DNA *Lactobacillus paracasei* subsp. *parnasie* CCDM 211 (10 ng/µl)
- PCR směs byla vložena cykleru a byl zvolen program požadovaný pro rod *Lactobacillus* (LBC ROD), jehož průběh je:

1. 95°C – 5 minut	}	Při tomto nastavení bylo provedeno 30 cyklů
2. 95°C – 30 vteřin- dochází k denuraci DNA		
3. 55°C – 30 vteřin - připojují se primery		
4. 72°C – 30 vteřin - probíhá syntéza DNA řetězce		
- při posledním cyklu byl poslední krok (72°C) proveden po dobu 10 minut

Detekce PCR produktu s hrubým lyzátem buněk pomocí agarosové gelové elektroforézy

- byl připraven 1,8% agarózový gel (1,8 mg agaru, 100 ml TBE pufru), suspenze byla dobře rozvařena v mikrovlnné troubě, nalita do misky s hřebínkem a ponechána asi 1 hodinu zatuhnout
- PCR směs vzorku i kontrol (25µl) byla smíchána s 5 µl stop pufru
- směs vzorků byla nanášena do komůrek, vedle byl nanášen DNA standard (5 µl), pak negativní kontrola a nakonec kontrola pozitivní
- vanička s gelem byla opatrně převrstvena TBE pufrem a bylo zapnuto napětí (60 V), elektroforéza probíhala asi 2 hodiny
- po ukončení byl gel obarven ethidium bromidem po dobu asi 1 hodiny
- gel byl opláchnut v destilované vodě a umístěn na transiluminátor
- gel byl vyfotografován v UV světle pomocí digitálního fotoaparátu

3 VÝSLEDKY

3.1 Růstové křivky

Byly studovány podmínky růstu vybraných mikroorganismů v MRS médiu s různým obsahem zdroje uhlíku (glukóza, laktóza). Růst byl sledován jako závislost hodnoty absorbance měřené při 600 nm (A_{600}) na čase.

3.1.1 Zdroj uhlíku: glukóza

Hodnoty absorbance A_{600} získané při měření růstové křivky během kultivace kmenů *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211, *Lbc. paracasei* CCDM 212, *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 213 a *Lbc. salivarius* CCDM 216 v MRS médiu s glukózou při 37°C jsou uvedeny v Tabulce 6. V 5. hodině růstu bylo nutné vzorky ředit, protože hodnoty absorbance přesahovaly hodnotu 0,9. Při ředění byla hodnota absorbance vypočítána ze změřených hodnot jako trojnásobek hodnoty (resp. devítinásobek hodnoty). Vypočítané hodnoty byly vyneseny do Grafů 1, 2, 3 a 4 jako závislost absorbance na čase.

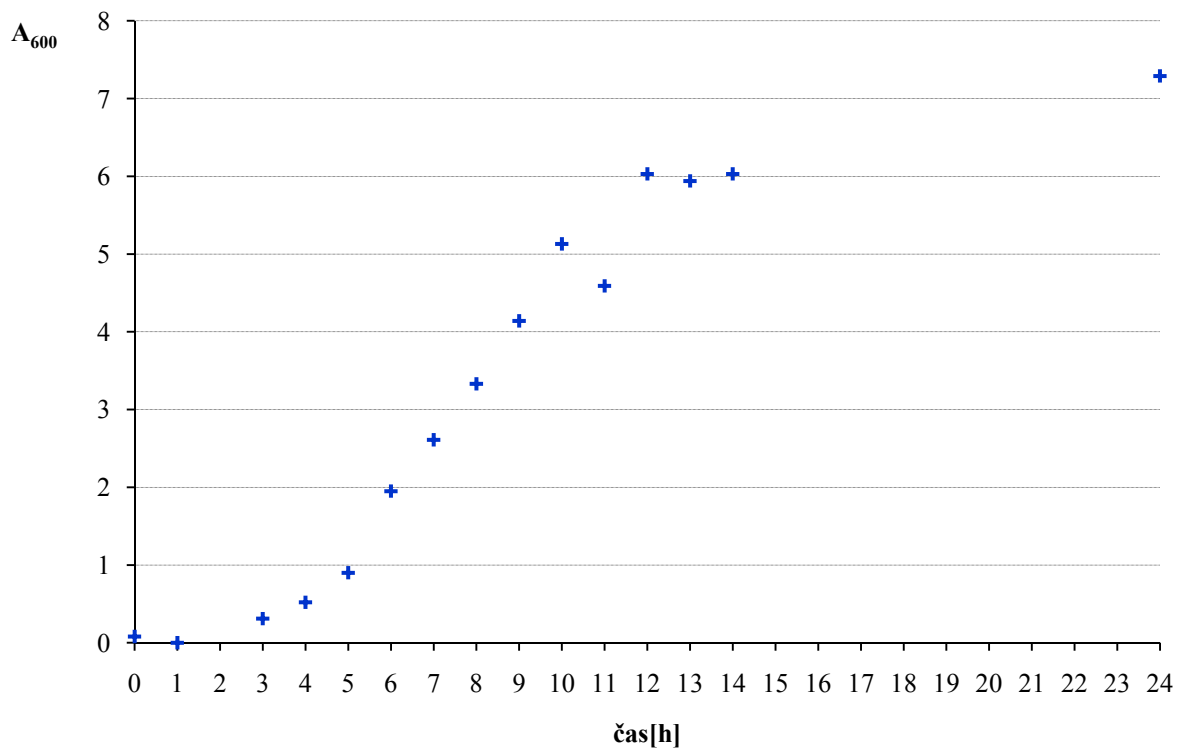
Tabulka 6 Závislost absorbance A_{600} na čase během kultivace

čas [h]	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211	<i>Lbc. paracasei</i> CCDM 212	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 213	<i>Lbc. salivarius</i> CCDM 216	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211	<i>Lbc. paracasei</i> CCDM 212	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 213	<i>Lbc. salivarius</i> CCDM 216
0	0,08	0,07	0,07	0,05				
1	0,00	0,00	0,01	0,00				
3	0,31	0,33	0,32	0,25				
4	0,52	0,58	0,52	0,45				
5	0,90	0,99	1,02	0,86		0,33	0,34	
6	1,95	1,98	1,92	1,77	0,65	0,66	0,64	0,59
7	2,61	2,67	2,64	2,55	0,87	0,89	0,88	0,85
8	3,33	3,87	3,42	3,15	0,37	0,43	0,38	0,35
9	4,14	4,68	4,14	4,41	0,46	0,52	0,46	0,49
10	5,13	5,40	4,86	4,68	0,57	0,60	0,54	0,52
11	4,59	4,77	4,77	4,32	0,51	0,53	0,53	0,48
12	6,03	5,67	5,58	5,67	0,67	0,63	0,62	0,63
13	5,94	5,85	5,85	5,85	0,66	0,65	0,65	0,65
14	6,03	6,03	6,30	6,03	0,67	0,67	0,70	0,67
24	7,29	7,47	7,38	7,20	0,81	0,83	0,82	0,80

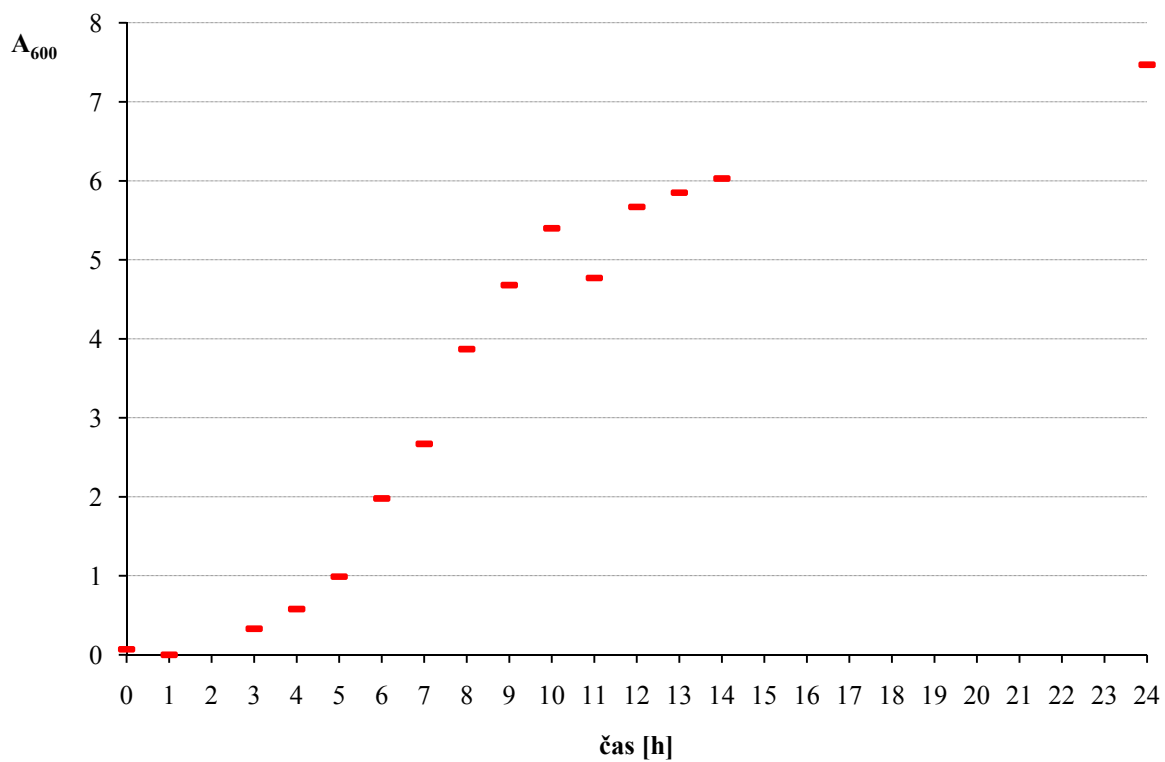
3x zředěno

9x zředěno

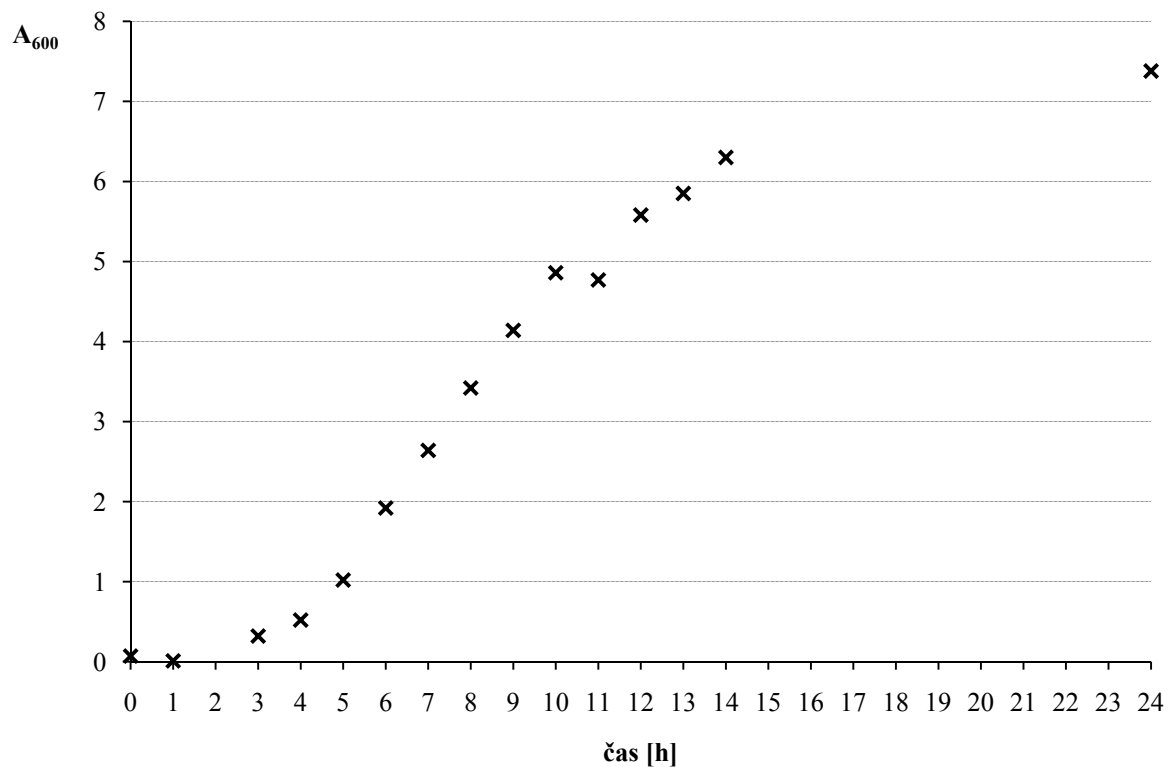
Graf 1 Růstová křivka kultivace *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211 v MRS médiu s glukózou (závislost absorbance na čase při 600 nm)



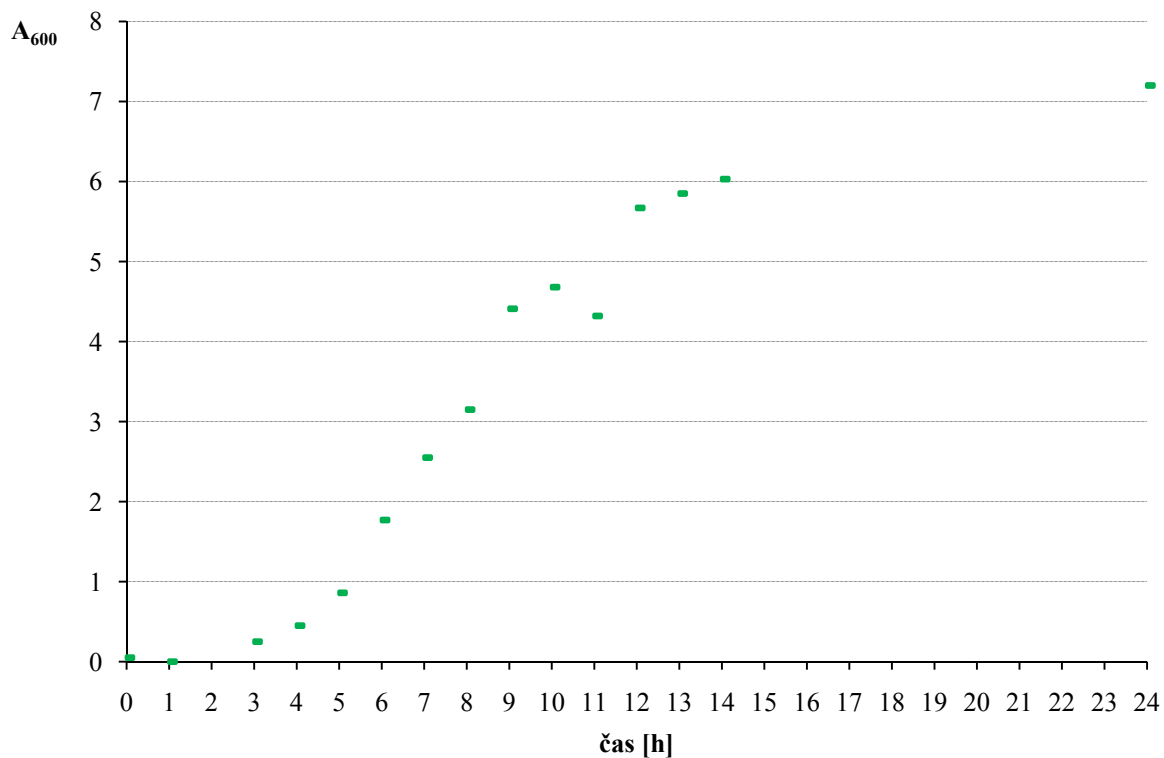
Graf 2 Růstová křivka kultivace *Lbc. paracasei* CCDM 212 v MRS médiu s glukózou (závislost absorbance na čase při 600 nm)



Graf 3 Růstová křivka kultivace *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 213 v MRS médiu s glukózou (závislost absorbance na čase při 600 nm)



Graf 4 Růstová křivka kultivace *Lbc. salivarius* CCDM 216 v MRS médiu s glukózou (závislost absorbance na čase při 600 nm)

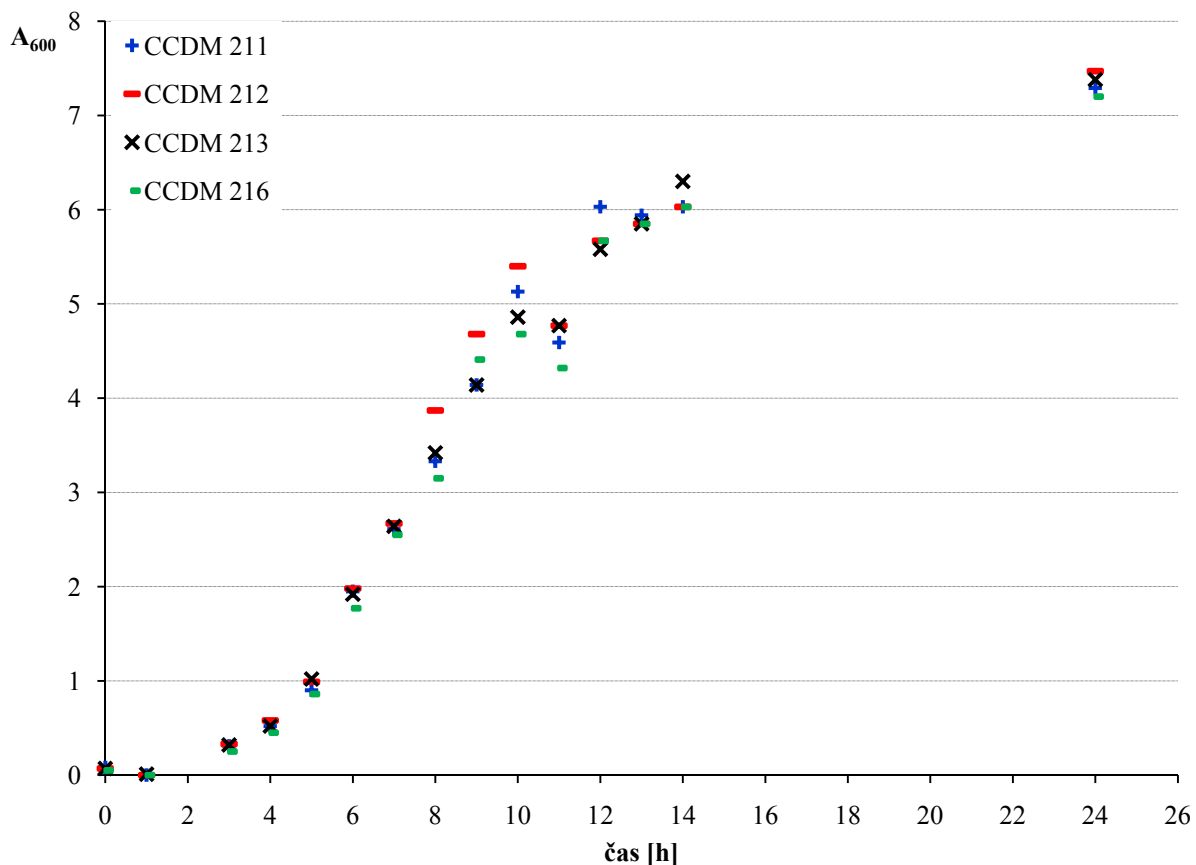


⇒ Ze všech růstových křivek jsou zřejmé všechny fáze růstu. Maximální zjištěná absorbance je do hodnoty 7,5.

3.1.1.1 Porovnání růstu kmenů na MRS médiu s glukózou jako zdrojem uhlíku

Porovnání růstových křivek kmenů *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211, *Lbc. paracasei* CCDM 212, *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 213 a *Lbc. salivarius* CCDM 216 během kultivace v MRS médiu s glukózou je uvedeno na Grafu 5.

Graf 5 Porovnání růstových křivek během kultivace v MRS médiu s glukózou (závislost absorbance na čase při 600 nm)



⇒ Při porovnání jednotlivých růstových křivek bylo zjištěno, že do 7. hodiny je růst jednotlivých mikroorganismů téměř shodný. Po 8. hodině růstu se hodnoty již mírně lišily.

3.1.2 Zdroj uhlíku: laktóza

Hodnoty absorbance A_{600} získané při měření růstové křivky během kultivace kmenů *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211, *Lbc. paracasei* CCDM 212, *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 213 a *Lbc. salivarius* CCDM 216 v MRS médiu s laktózou při 37°C jsou uvedeny v Tabulce 7. V 7. hodině růstu bylo nutné vzorky ředit, protože hodnoty absorbance přesahovaly hodnotu 0,9. Při ředění byla hodnota absorbance vypočítána ze změřených hodnot jako trojnásobek hodnoty (resp. devítinásobek hodnoty). Vypočítané hodnoty byly vyneseny do Grafů 6, 7, 8, 9 jako závislost absorbance na čase.

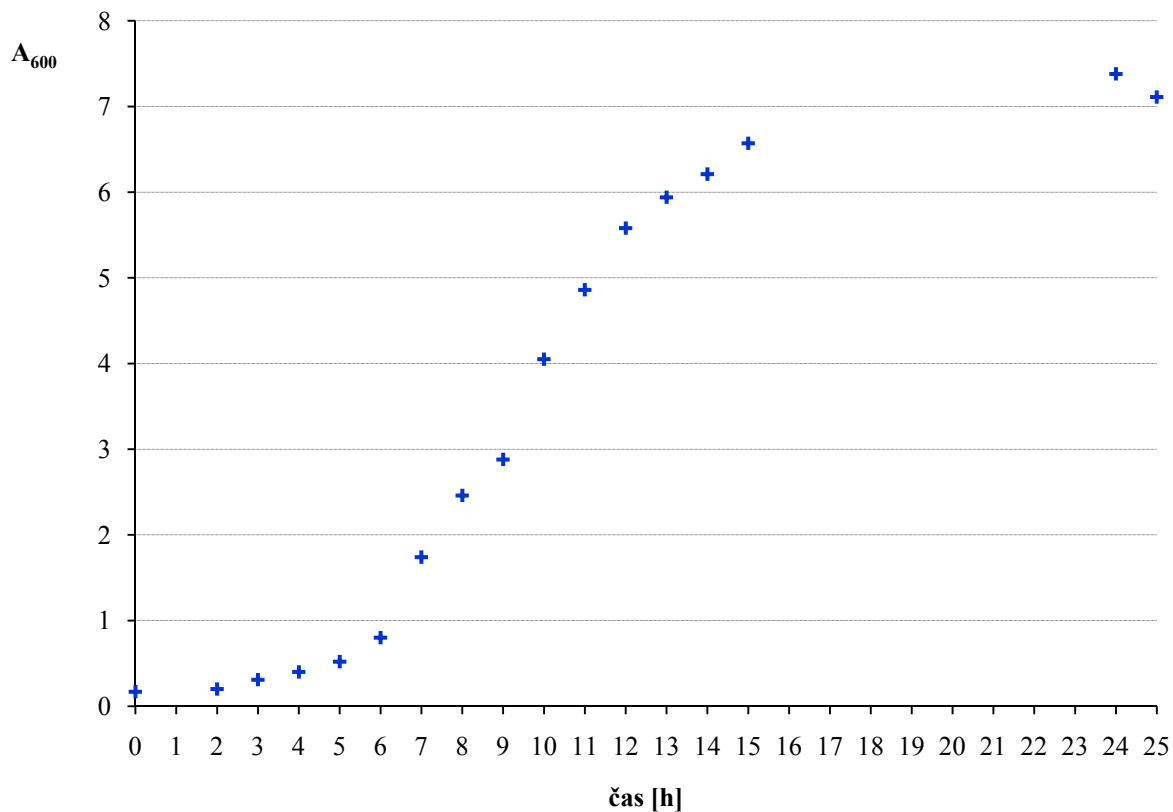
Tabulka 7 Závislost absorpance A_{600} na čase během kultivace

čas [h]	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211	<i>Lbc. paracasei</i> CCDM 212	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 213	<i>Lbc. salivarius</i> CCDM 216	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211	<i>Lbc. paracasei</i> CCDM 212	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 213	<i>Lbc. salivarius</i> CCDM 216
0	0,17	0,11	0,14	0,13				
2	0,20	0,15	0,17	0,17				
3	0,31	0,27	0,27	0,30				
4	0,40	0,41	0,35	0,39				
5	0,52	0,53	0,48	0,54				
6	0,80	0,80	0,74	0,82				
7	1,74	1,65	1,74	1,80	0,58	0,55	0,58	0,60
8	2,46	2,34	2,49	2,58	0,82	0,78	0,83	0,86
9	2,88	3,24	2,97	3,06	0,32	0,36	0,33	0,34
10	4,05	4,50	4,23	4,41	0,45	0,50	0,47	0,49
11	4,86	5,40	4,95	5,04	0,54	0,60	0,55	0,56
12	5,58	6,12	5,85	5,67	0,62	0,68	0,65	0,63
13	5,94	6,21	5,94	6,21	0,66	0,69	0,66	0,69
14	6,21	6,30	6,03	6,48	0,69	0,70	0,67	0,72
15	6,57	6,57	6,30	6,84	0,73	0,73	0,70	0,76
24	7,38	7,29	7,56	7,56	0,82	0,81	0,84	0,84
25	7,11	7,38	7,56	7,65	0,79	0,82	0,84	0,85

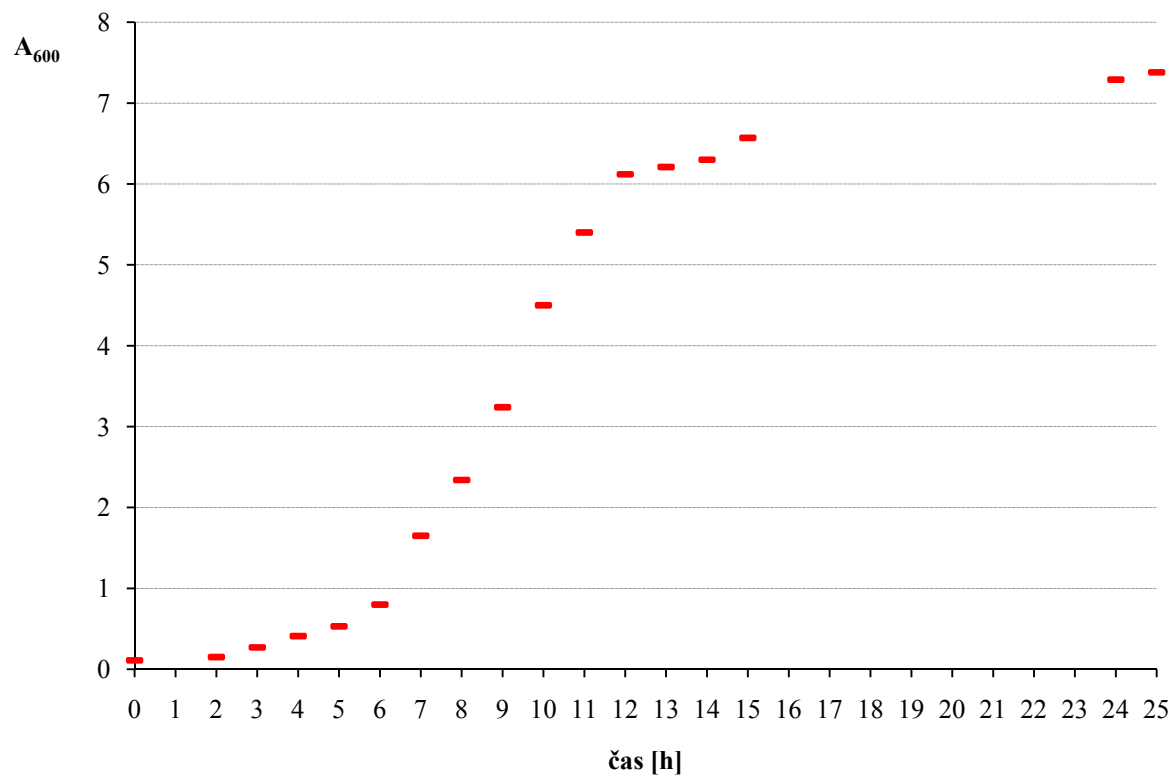
3x
zředěno

9x zředěno

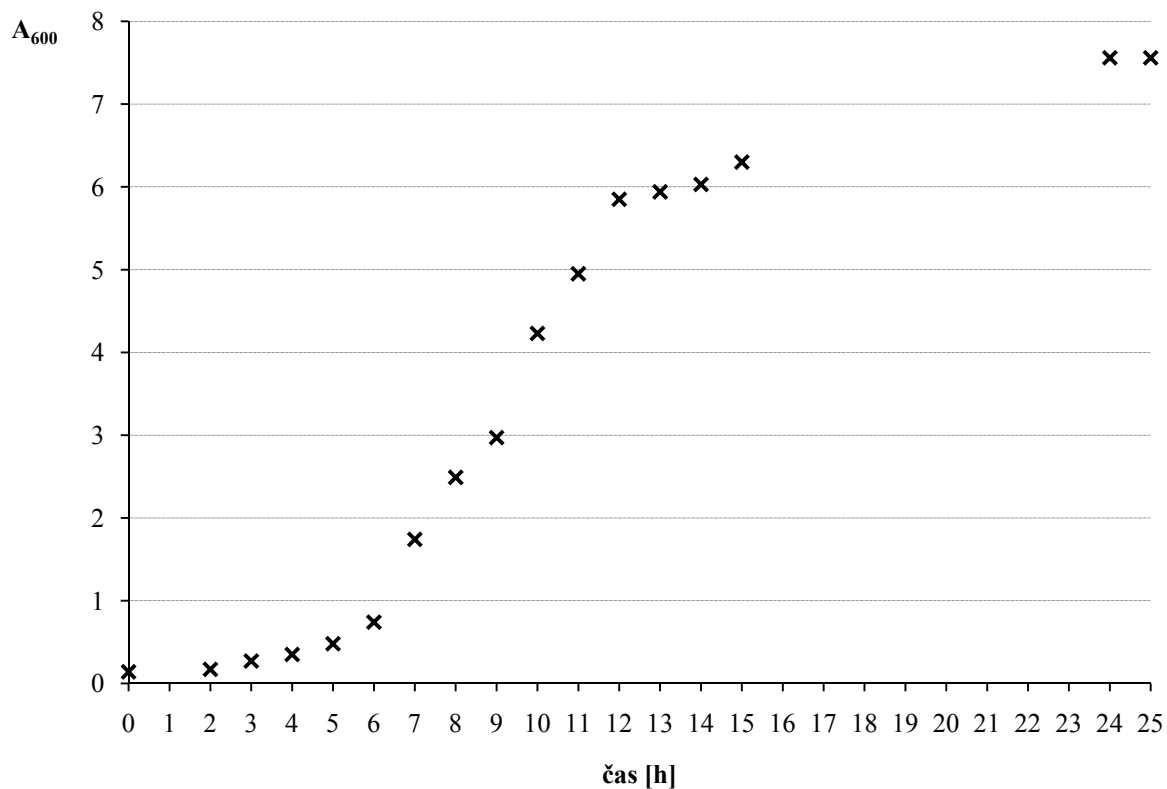
Graf 6 Růstová křivka kultivace *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211 v MRS médiu s laktózou (závislost absorbance na čase při 600 nm)



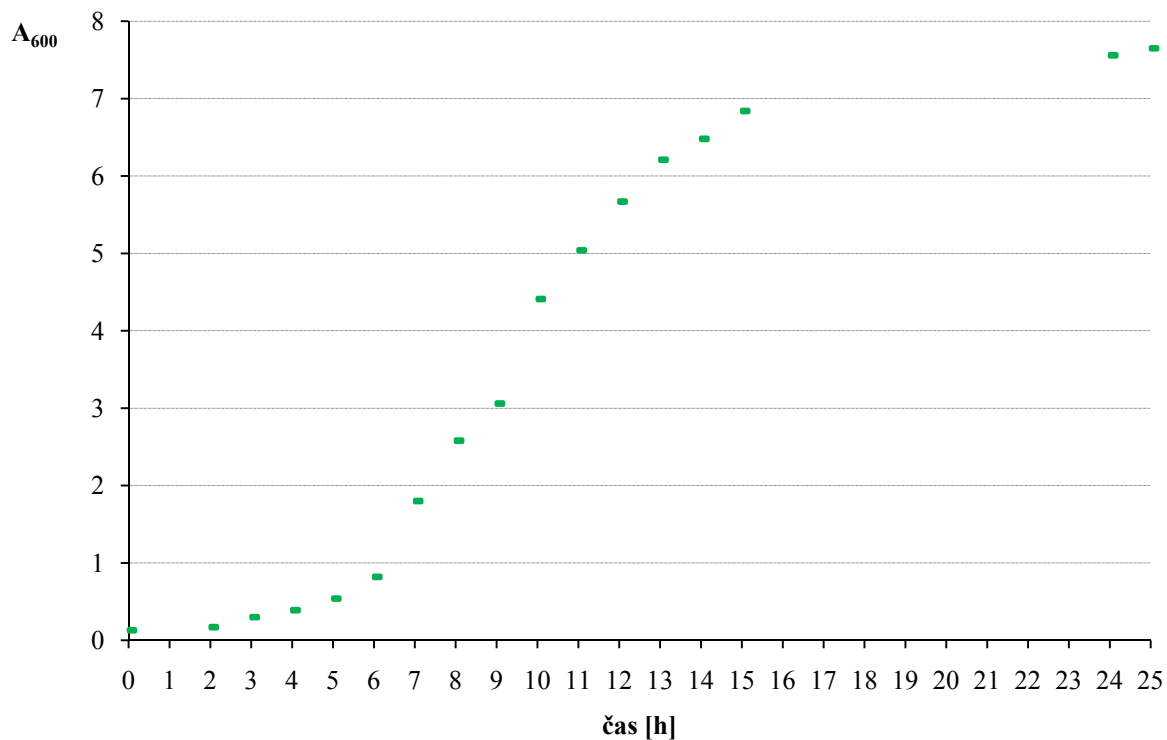
Graf 7 Růstová křivka kultivace *Lbc. paracasei* CCDM 212 v MRS médiu s laktózou (závislost absorbance na čase při 600 nm)



Graf 8 Růstová křivka kultivace *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 213 v MRS médiu s laktózou (závislost absorbance na čase při 600 nm)



Graf 9 Růstová křivka kultivace *Lbc. salivarius* CCDM 216 v MRS médiu s laktózou (závislost absorbance na čase při 600 nm)

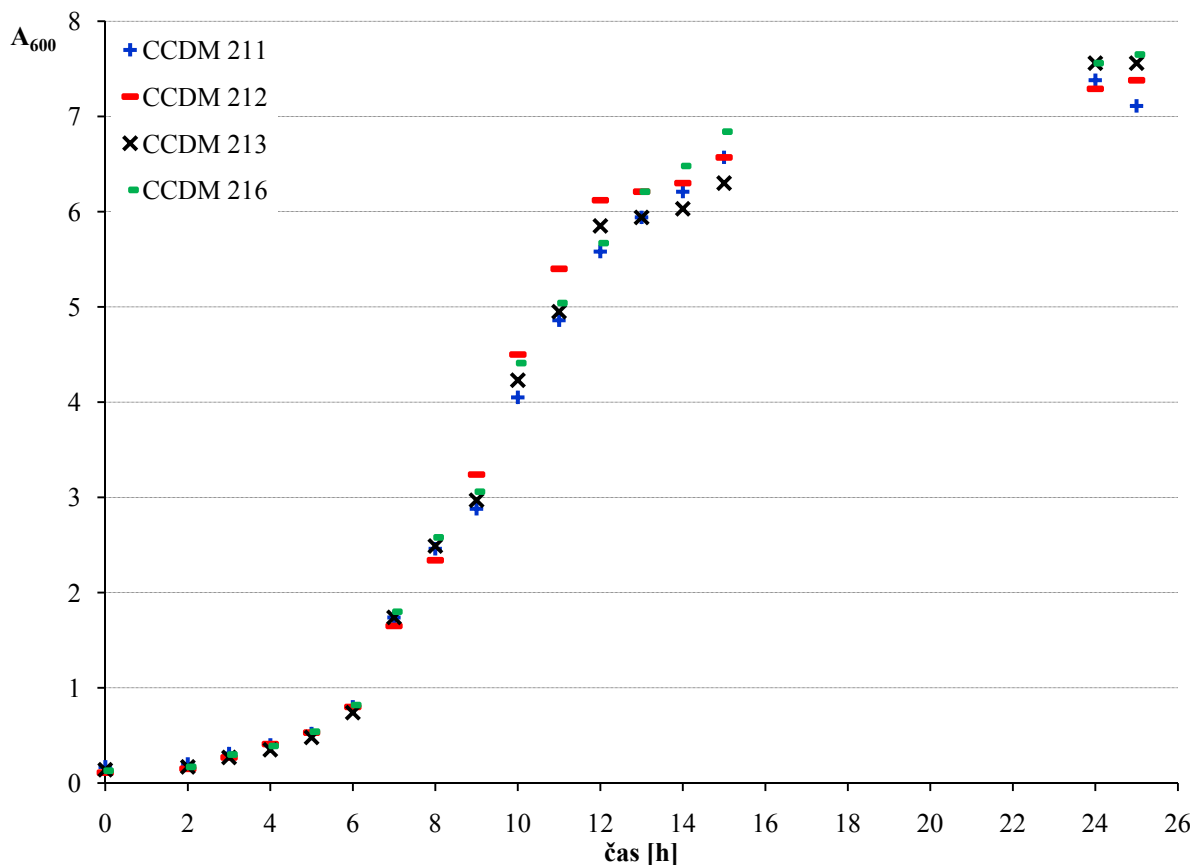


⇒ Ze všech růstových křivek jsou zřejmé všechny fáze růstové křivky. Maximální zjištěná absorbance je do hodnoty 7,7.

3.1.2.1 Porovnání růstu kmenů na MRS médiu s laktózou jako zdrojem uhlíku

Porovnání růstových křivek kmenů *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211, *Lbc. paracasei* CCDM 212, *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 213 a *Lbc. salivarius* CCDM 216 během kultivace v MRS médiu s laktózou je uvedeno na Grafu 10.

Graf 10 Porovnání růstových křivek během kultivace v MRS médiu s laktózou (závislost absorbance na čase při 600 nm)

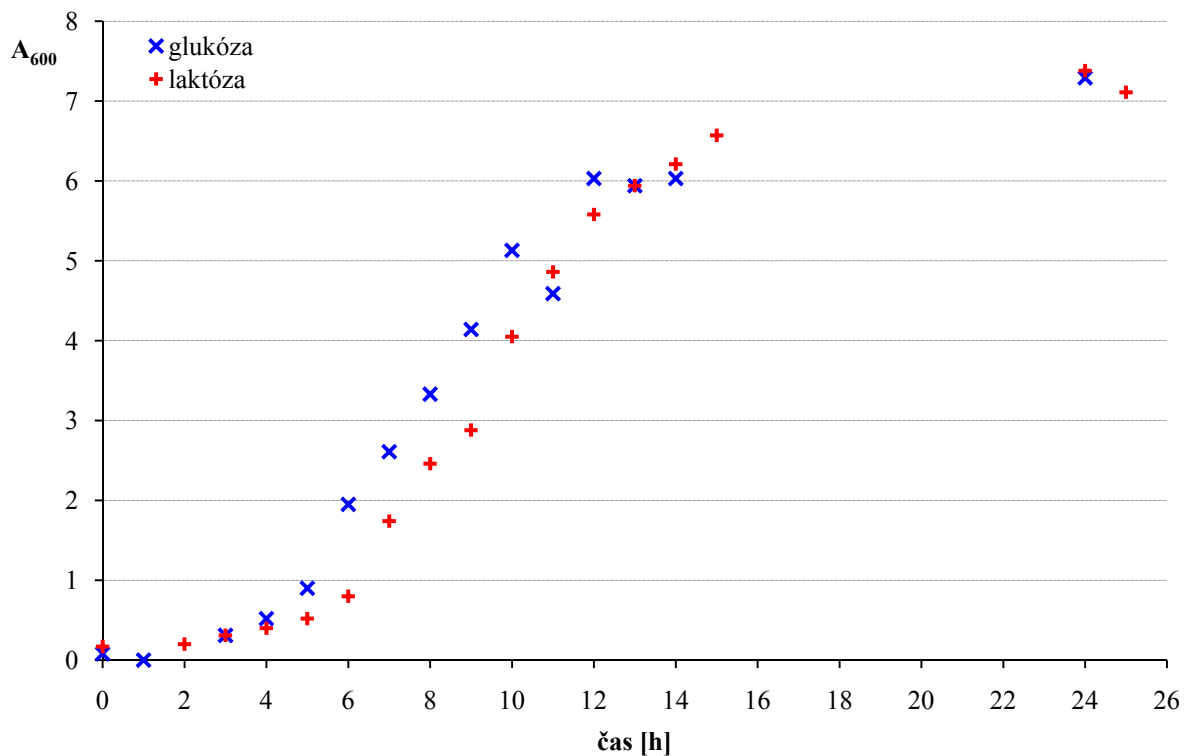


⇒ Při porovnání jednotlivých růstových křivek bylo zjištěno, že do 8. hodiny je růst jednotlivých mikroorganismů téměř shodný. Po 9. hodině růstu se hodnoty již mírně lišily.

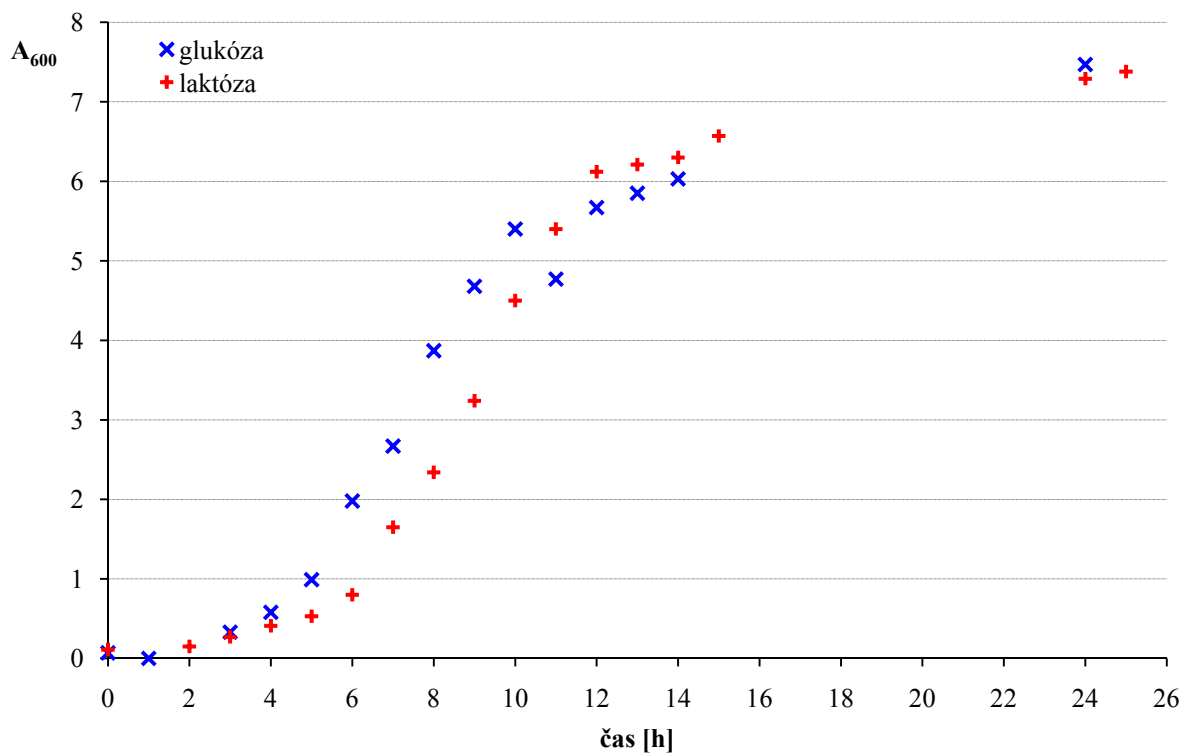
3.1.2.2 Porovnání růstu kmenů na MRS médiu s glukózou a laktózou jako zdrojem uhlíku

Porovnání růstových křivek kmenů *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211, *Lbc. paracasei* CCDM 212, *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 213 a *Lbc. salivarius* CCDM 216 během kultivace v MRS médiu s glukózou a v MRS médiu s laktózou je uvedeno na Grafu 11, 12, 13, 14.

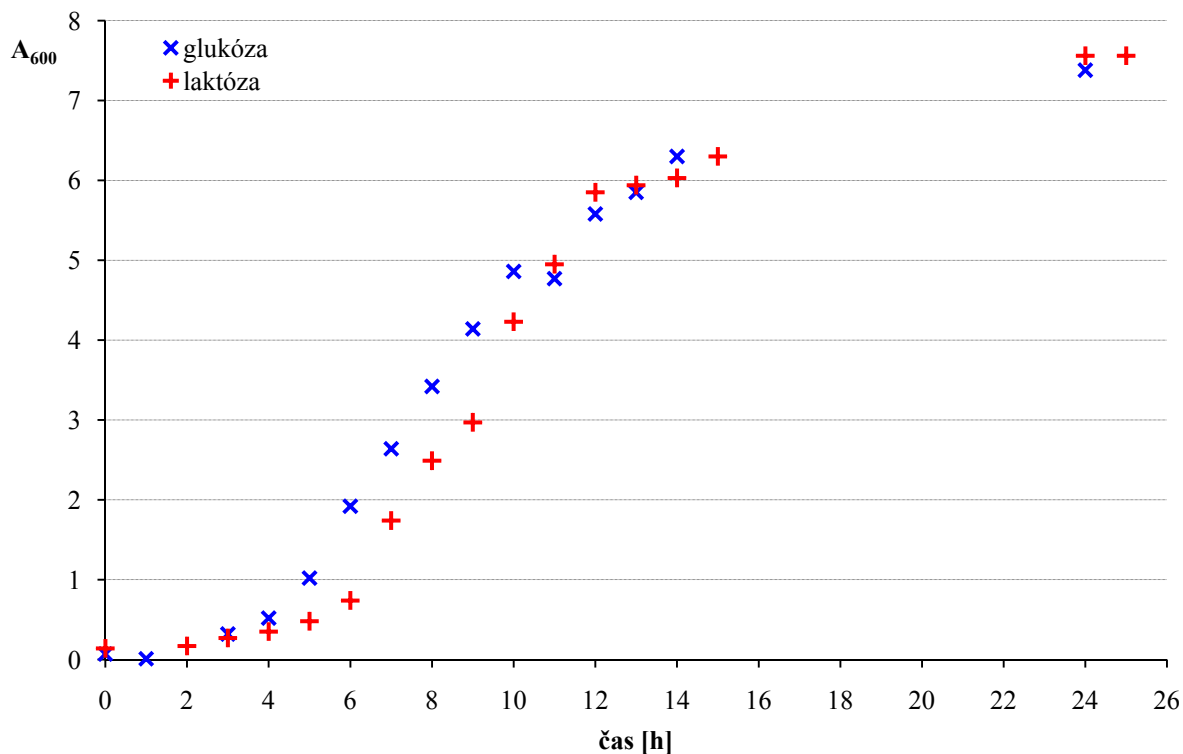
Graf 11 Porovnání růstových křivek kultivace *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211 v MRS médiu s glukózou a v MRS médiu s laktózou (závislost absorbance na čase při 600 nm)



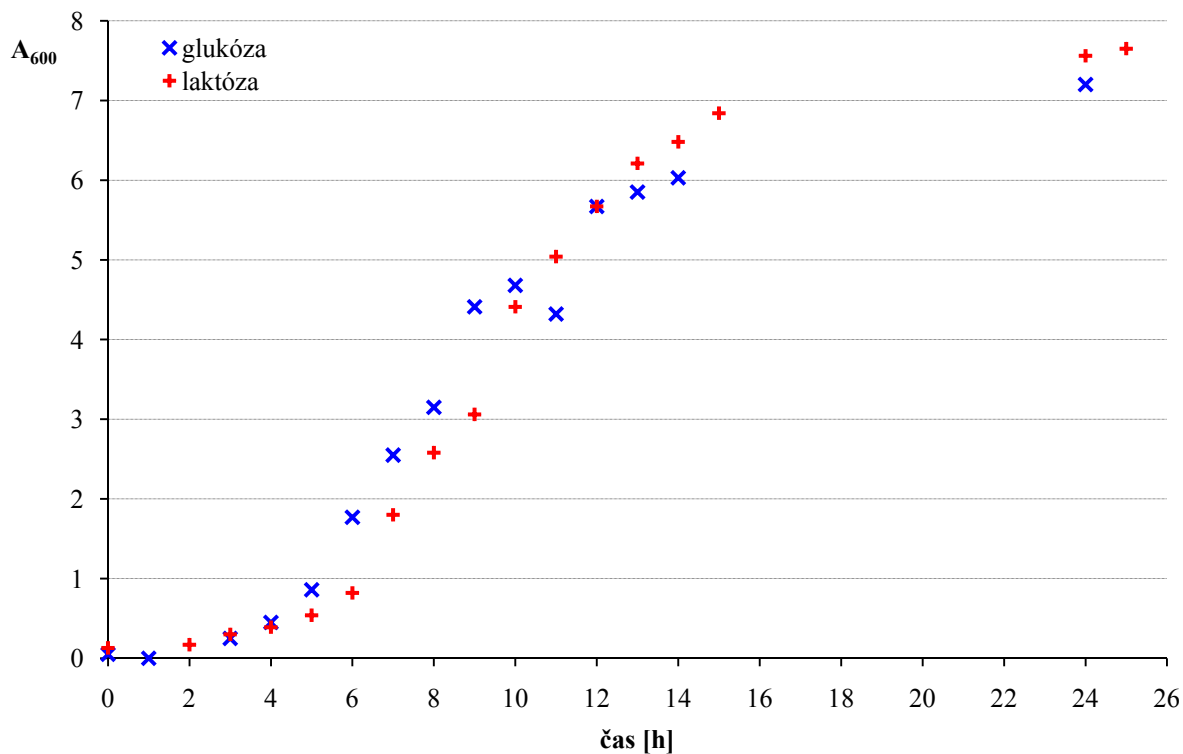
Graf 12 Porovnání růstových křivek kultivace *Lbc. paracasei* CCDM 212 v MRS médiu s glukózou a v MRS médiu s laktózou (závislost absorbance na čase při 600 nm)



Graf 13 Porovnání růstových křivek kultivace *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 213 v MRS médiu s glukózou a v MRS médiu s laktózou (závislost absorbance na čase při 600 nm)



Graf 14 Porovnání růstových křivek kultivace *Lbc. salivarius* CCDM 216 v MRS médiu s glukózou a v MRS médiu s laktózou (závislost absorbance na čase při 600 nm)

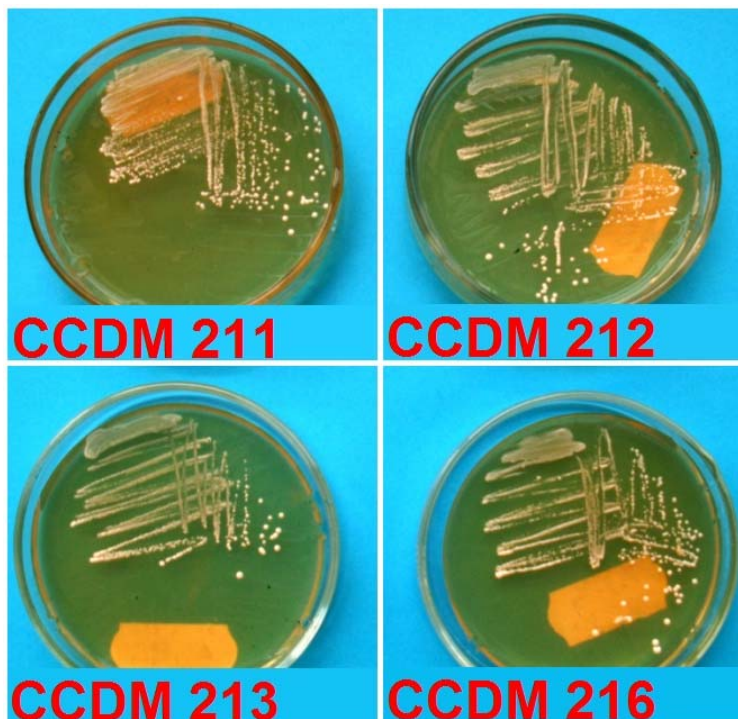


⇒ Na počátku exponenciální fáze růstu jsou zřejmé vyšší hodnoty absorbance při kultivaci v MRS médiu obsahující glukózu. Na konci exponenciální fáze růstu jsou zřejmé vyšší hodnoty absorbance při kultivaci v MRS médiu obsahující laktózu.

3.2 Křížový roztěr

Po kultivaci v MRS médiu s glukózou byl proveden křížový roztěr a kultivace na MRS agaru při 37°C. Hodnocení kolonií po kultivaci bylo následující: tvar okrouhlý, okraje hladké, povrch hladký, profil vypouklý, transparence neprůhledná, barva bílá, okolí kolonie beze změny. Fotografie kolonií bakteriálních kultur kmenů *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211, *Lbc. paracasei* CCDM 212, *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 213 a *Lbc. salivarius* CCDM 216 narostlých na MRS agaru s glukózou jsou na Obr. 17.

Obr. 17 Plotny MRS agaru s narostlými bakteriálními koloniemi po kultivaci v MRS médiu s glukózou



⇒ Jednotlivými křížovými roztěry byla prokázána čistota bakteriálních kultur.

3.3 Kultivace buněk v MRS médiu s různým obsahem syrovátky při stresových podmínkách

Obsah syrovátky v médiu byl v rozsahu 2 - 8% a jako stresové podmínky bylo voleno nízké pH v rozsahu 4,0 - 5,5. Kultivace probíhala při 37°C aerobně bez třepání. Při zvolených podmínkách byl studován pouze kmen *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211.

3.3.1 Obsah syrovátky 2%

Výsledky získané při studiu růstu během kultivace při 2% obsahu syrovátky jsou uvedeny v Tabulce 8. Jelikož bylo již původní médium zakaleno syrovátkou, bylo voleno již na počátku ředění. Při ředění byla hodnota absorbance vypočítána ze změřených hodnot jako desetinásobek hodnoty (resp. dvacetinásobek hodnoty). Vypočítané hodnoty byly vyneseny do Grafu 15, 16 jako závislost absorbance na čase.

Tabulka 8 Závislost absorbance A_{600} na čase během kultivace při stresových podmínkách v MRS médiu obsahujícím 2% syrovátky

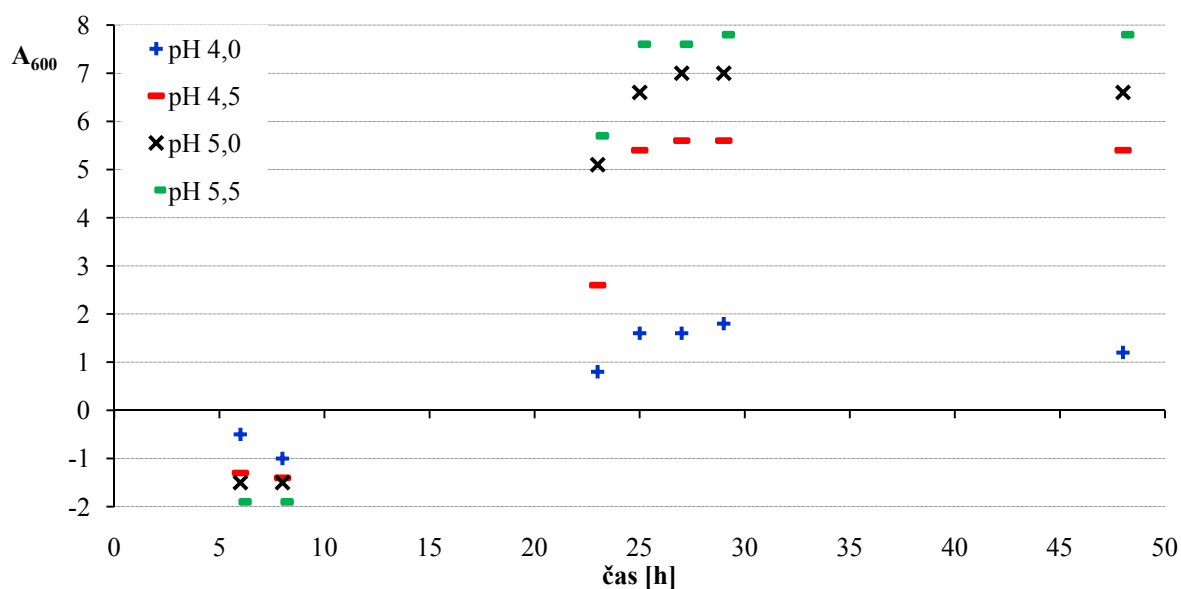
Blank: kultivační médium

čas [h]	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	zředěno
6	-0,50	-1,30	-1,50	-1,90	-0,05	-0,13	-0,15	-0,19	10x
8	-1,00	-1,40	-1,50	-1,90	-0,10	-0,14	-0,15	-0,19	10x
23	0,80	2,60	5,10	5,70	0,08	0,26	0,51	0,57	20x zředěno
25	1,60	5,40	6,60	7,60	0,08	0,27	0,33	0,38	20x zředěno
27	1,60	5,60	7,00	7,60	0,08	0,28	0,35	0,38	20x zředěno
29	1,80	5,60	7,00	7,80	0,09	0,28	0,35	0,39	20x zředěno
48	1,20	5,40	6,60	7,80	0,06	0,27	0,33	0,39	20x zředěno

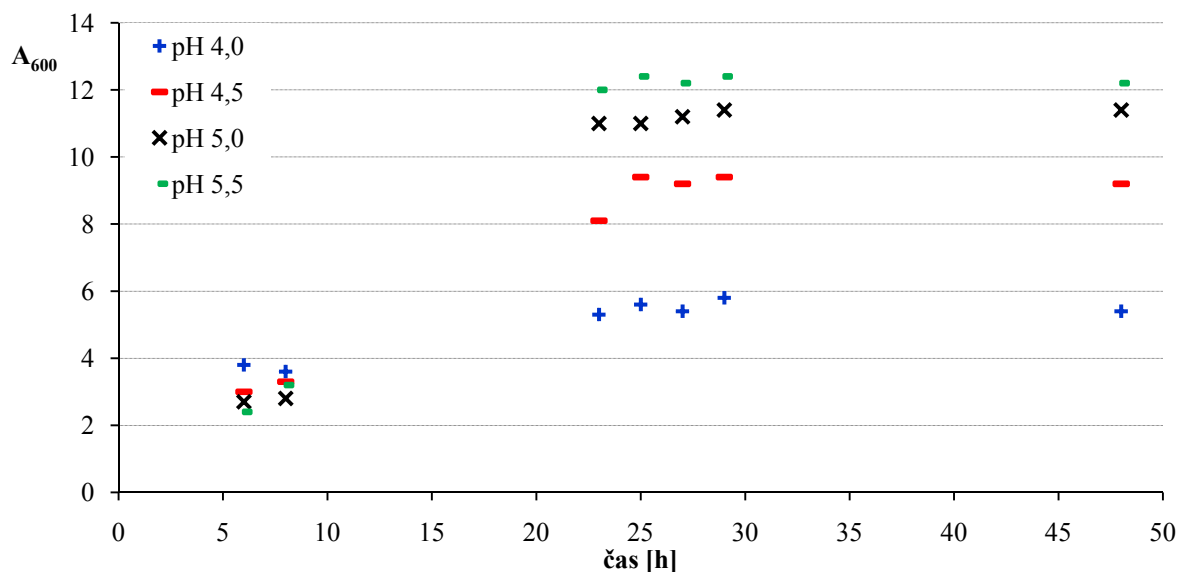
Blank: MRS médium

čas [h]	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	zředěno
6	3,80	3,00	2,70	2,40	0,38	0,30	0,27	0,24	10x
8	3,60	3,30	2,80	3,20	0,36	0,33	0,28	0,32	10x
23	5,30	8,10	11,00	12,00	0,53	0,81	0,55	0,60	20x zředěno
25	5,60	9,40	11,00	12,40	0,28	0,47	0,55	0,62	20x zředěno
27	5,40	9,20	11,20	12,20	0,27	0,46	0,56	0,61	20x zředěno
29	5,80	9,40	11,40	12,40	0,29	0,47	0,57	0,62	20x zředěno
48	5,40	9,20	11,40	12,20	0,27	0,46	0,57	0,61	20x zředěno

Graf 15 Růst *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211 při stresových podmínkách v MRS médiu obsahujícím 2% syrovátky - blank: kultivační médium (závislost absorbance na čase při 600 nm)



Graf 16 Růst *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211 při stresových podmínkách v MRS médiu obsahujícím 2% syrovátky - blank: MRS médium (závislost absorbance na čase při 600 nm)



3.3.2 Obsah syrovátky 4%

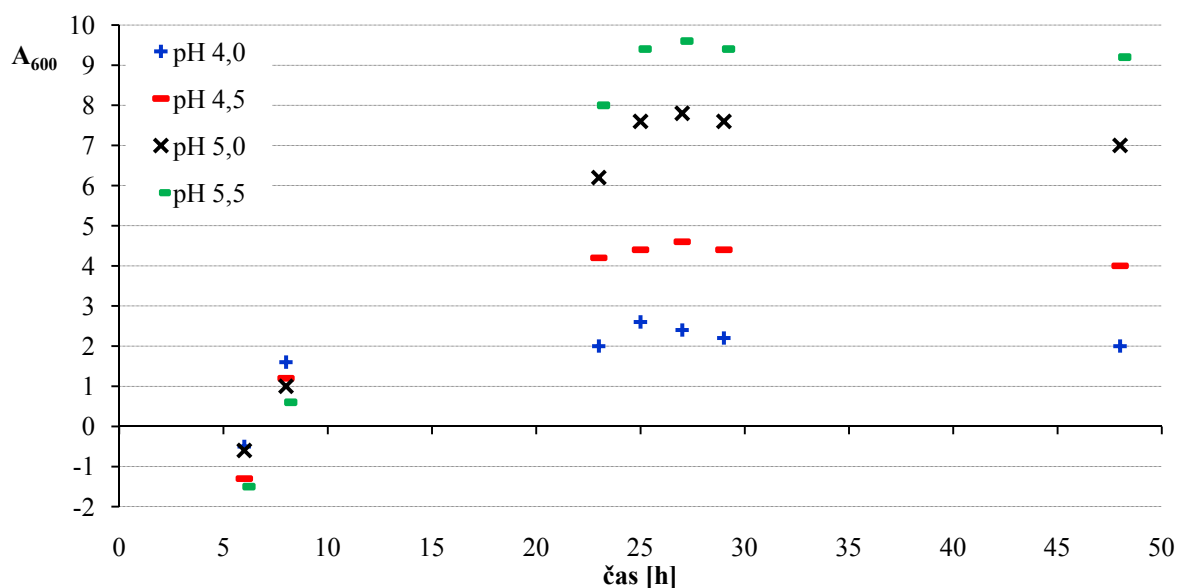
Výsledky získané při studiu růstu během kultivace při 4% obsahu syrovátky jsou uvedeny v Tabulce 9. Jelikož bylo již původní médium zakaleno syrovátkou, bylo voleno již na počátku ředění. Při ředění byla hodnota absorbance vypočítána ze změřených hodnot jako desetinásobek hodnoty (resp. dvacetinásobek hodnoty). Vypočítané hodnoty byly vyneseny do Grafu 17, 18 jako závislost absorbance na čase.

Tabulka 9 Závislost absorbance A_{600} na čase během kultivace při stresových podmínkách v MRS médiu obsahujícím 4% syrovátky

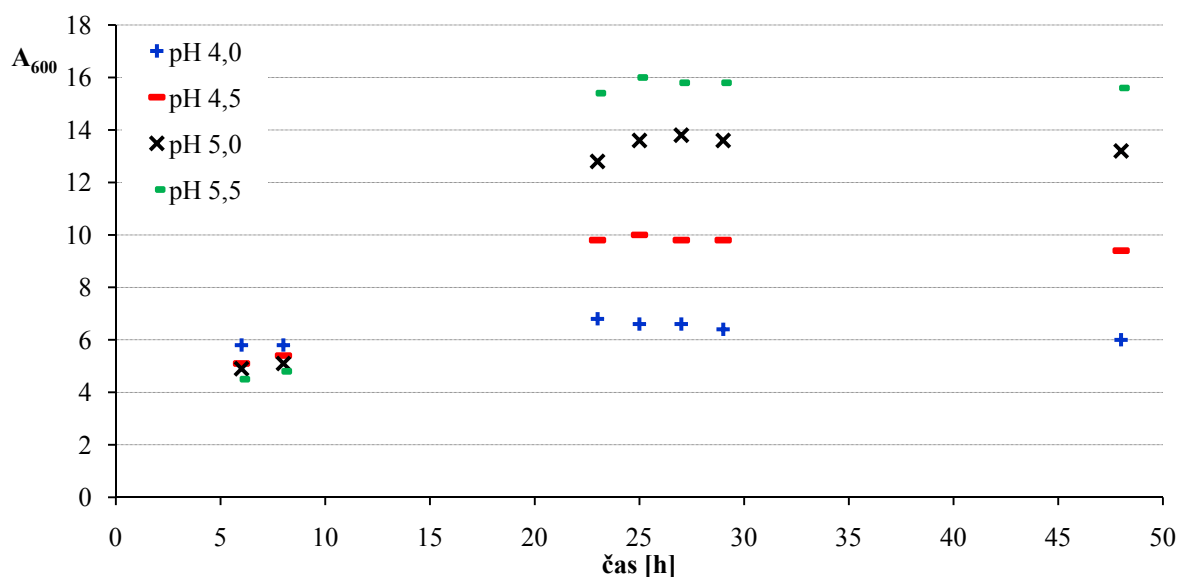
Blank: kultivační médium									
čas [h]	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	zředěno
6	-0,50	-1,30	-0,60	-1,50	-0,05	-0,13	-0,06	-0,15	10x
8	1,60	1,20	1,00	0,60	0,16	0,12	0,10	0,06	
23	2,00	4,20	6,20	8,00	0,10	0,21	0,31	0,40	20x zředěno
25	2,60	4,40	7,60	9,40	0,13	0,22	0,38	0,47	
27	2,40	4,60	7,80	9,60	0,12	0,23	0,39	0,48	
29	2,20	4,40	7,60	9,40	0,11	0,22	0,38	0,47	
48	2,00	4,00	7,00	9,20	0,10	0,20	0,35	0,46	

Blank: MRS médium									
čas [h]	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	zředěno
6	5,80	5,10	4,90	4,50	0,58	0,51	0,49	0,45	10x
8	5,80	5,40	5,10	4,80	0,58	0,54	0,51	0,48	
23	6,80	9,80	12,80	15,40	0,34	0,49	0,64	0,77	20x zředěno
25	6,60	10,00	13,60	16,00	0,33	0,50	0,68	0,80	
27	6,60	9,80	13,80	15,80	0,33	0,49	0,69	0,79	
29	6,40	9,80	13,60	15,80	0,32	0,49	0,68	0,79	
48	6,00	9,40	13,20	15,60	0,30	0,47	0,66	0,78	

Graf 17 Růst *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211 při stresových podmínkách v MRS médiu obsahujícím 4% syrovátky - blank: kultivační médium (závislost absorbance na čase při 600 nm)



Graf 18 Růst *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211 při stresových podmínkách v MRS médiu obsahujícím 4% syrovátky - blank: MRS médium (závislost absorbance na čase při 600 nm)



3.3.3 Obsah syrovátky 6%

Výsledky získané při studiu růstu během kultivace při 6% obsahu syrovátky jsou uvedeny v Tabulce 10. Jelikož bylo již původní médium zakaleno syrovátkou, bylo voleno již na počátku ředění. Při ředění byla hodnota absorbance vypočítána ze změřených hodnot jako desetinásobek hodnoty (resp. dvacetinásobek hodnoty). Vypočítané hodnoty byly vyneseny do Grafu 19, 20 jako závislost absorbance na čase.

Tabulka 10 Závislost absorbance A_{600} na čase během kultivace při stresových podmínkách v MRS médiu obsahujícím 6% syrovátky

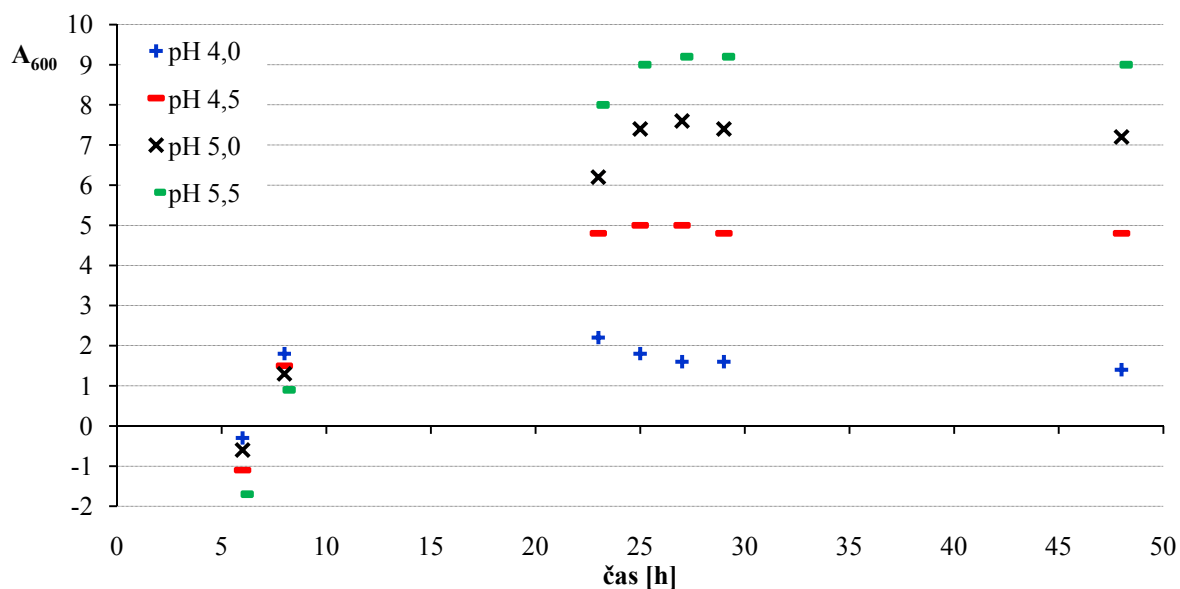
Blank: kultivační médium

čas [h]	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	zředěno
6	-0,30	-1,10	-0,60	-1,70	-0,03	-0,11	-0,06	-0,17	10x
8	1,80	1,50	1,30	0,90	0,18	0,15	0,13	0,09	10x
23	2,20	4,80	6,20	8,00	0,11	0,24	0,31	0,40	20x zředěno
25	1,80	5,00	7,40	9,00	0,09	0,25	0,37	0,45	
27	1,60	5,00	7,60	9,20	0,08	0,25	0,38	0,46	20x zředěno
29	1,60	4,80	7,40	9,20	0,08	0,24	0,37	0,46	
48	1,40	4,80	7,20	9,00	0,07	0,24	0,36	0,45	20x zředěno

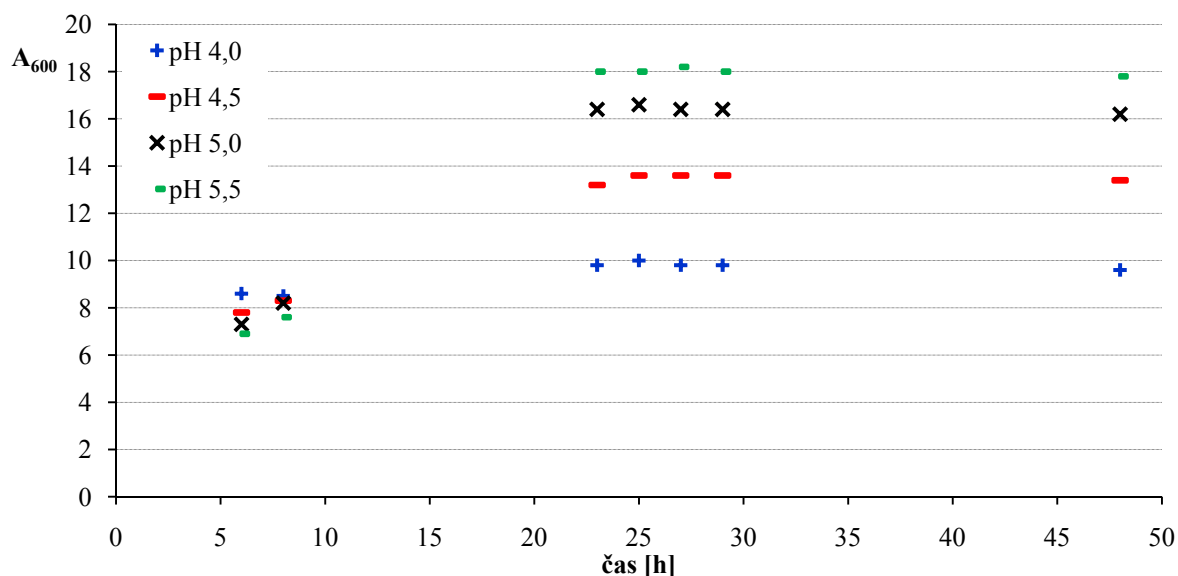
Blank: MRS médium

čas [h]	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	zředěno
6	8,60	7,80	7,30	6,90	0,86	0,78	0,73	0,69	10x
8	8,50	8,30	8,20	7,60	0,85	0,83	0,82	0,76	10x
23	9,80	13,20	16,40	18,00	0,49	0,66	0,82	0,90	20x zředěno
25	10,00	13,60	16,60	18,00	0,50	0,68	0,83	0,90	
27	9,80	13,60	16,40	18,20	0,49	0,68	0,82	0,91	20x zředěno
29	9,80	13,60	16,40	18,00	0,49	0,68	0,82	0,90	
48	9,60	13,40	16,20	17,80	0,48	0,67	0,81	0,89	20x zředěno

Graf 19 Růst *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211 při stresových podmínkách v MRS médiu obsahujícím 6% syrovátky - blank: kultivační médium (závislost absorbance na čase při 600 nm)



Graf 20 Růst *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211 při stresových podmínkách v MRS médiu obsahujícím 6% syrovátky - blank: MRS médium (závislost absorbance na čase při 600 nm)



3.3.4 Obsah syrovátky 8%

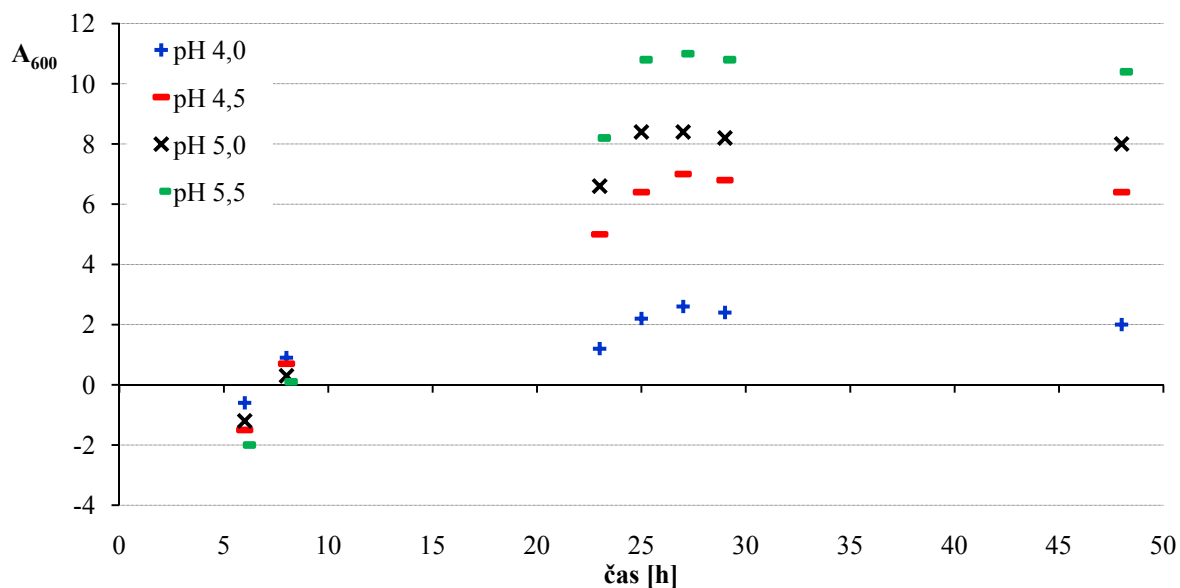
Výsledky získané při studiu růstu během kultivace při 8% obsahu syrovátky jsou uvedeny v Tabulce 11. Jelikož bylo již původní médium zakaleno syrovátkou, bylo voleno již na počátku ředění. Při ředění byla hodnota absorbance vypočítána ze změřených hodnot jako desetinásobek hodnoty (resp. dvacetinásobek či čtyřicetinásobek hodnoty). Vypočítané hodnoty byly vyneseny do Grafu 21, 22 jako závislost absorbance na čase.

Tabulka 11 Závislost absorbance A_{600} na čase během kultivace při stresových podmínkách v MRS médiu obsahujícím 8% syrovátky

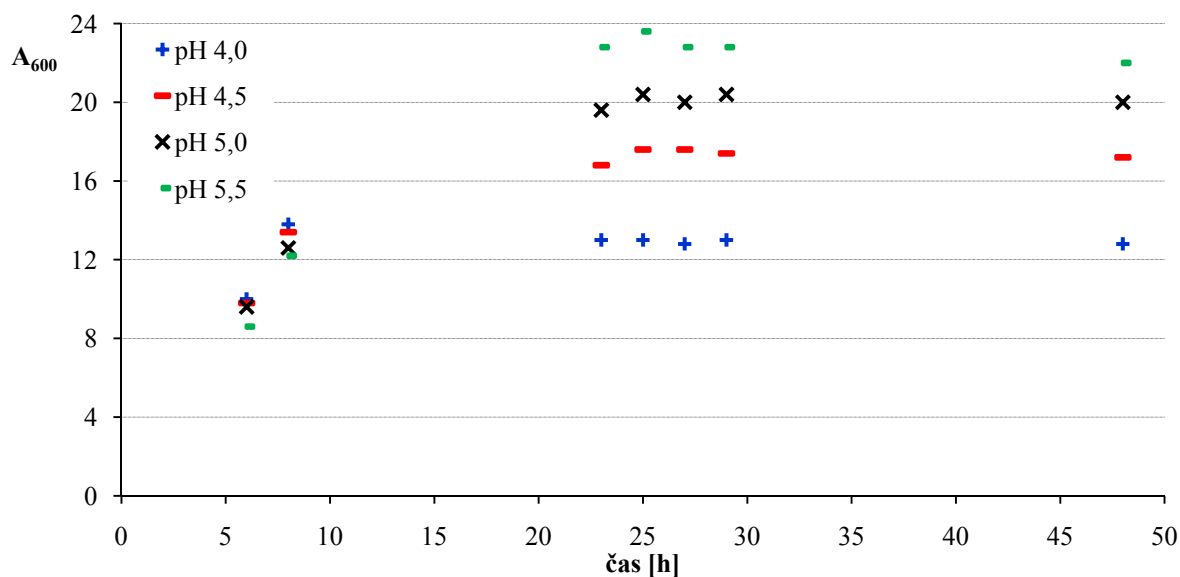
Blank: kultivační médium										
čas [h]	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5		
6	-0,60	-1,50	-1,20	-2,00	-0,06	-0,15	-0,12	-0,20	zředěno 10x	
8	0,90	0,70	0,30	0,10	0,09	0,07	0,03	0,01		
23	1,20	5,00	6,60	8,20	0,06	0,25	0,33	0,41	20x zředěno	
25	2,20	6,40	8,40	10,80	0,11	0,32	0,42	0,54		
27	2,60	7,00	8,40	11,00	0,13	0,35	0,42	0,55		
29	2,40	6,80	8,20	10,80	0,12	0,34	0,41	0,54		
48	2,00	6,40	8,00	10,40	0,10	0,32	0,40	0,52		

Blank: MRS médium										
čas [h]	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5		
6	10,00	9,80	9,60	8,60	0,50	0,49	0,48	0,43	zředěno 20x	
8	13,80	13,40	12,60	12,20	0,69	0,67	0,63	0,61		
23	13,00	16,80	19,60	22,80	0,65	0,84	0,49	0,57	40x zředěno	
25	13,00	17,60	20,40	23,60	0,65	0,88	0,51	0,59		
27	12,80	17,60	20,00	22,80	0,64	0,88	0,50	0,57		
29	13,00	17,40	20,40	22,80	0,65	0,87	0,51	0,57		
48	12,80	17,20	20,00	22,00	0,64	0,86	0,50	0,55		

Graf 21 Růst *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211 při stresových podmínkách v MRS médiu obsahujícím 8% syrovátky - blank: kultivační médium (závislost absorbance na čase při 600 nm)



Graf 22 Růst *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211 při stresových podmínkách v MRS médiu obsahujícím 8% syrovátky - blank: MRS médium (závislost absorbance na čase při 600 nm)

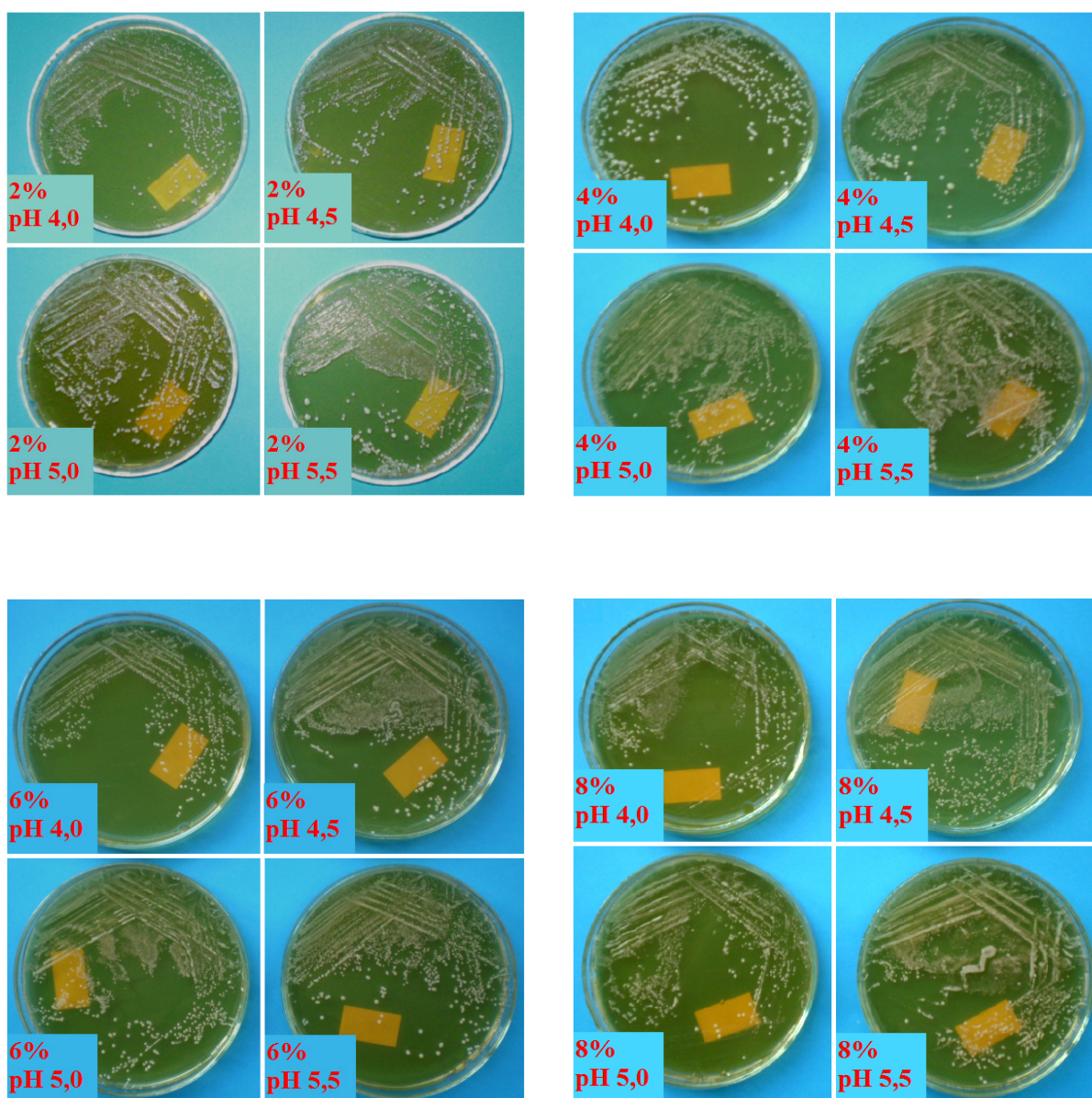


⇒ U všech množství syrovátky je zřejmé, že největší nárůst mikroorganismů byl při pH 5,5 a nejmenší při pH 4,0.

3.3.5 Křížový roztěr

Po kultivaci v MRS médiu se syrovátkou, která nebyla vysterilizována, byl proveden křížový roztěr a kultivace na MRS agaru při 37°C. Hodnocení kolonií po kultivaci bylo následující: tvar okrouhlý, okraje hladké, povrch hladký, profil vypouklý, transparence neprůhledná, barva bílá, okolí kolonie beze změny. Fotografie kolonií bakteriálních kultur kmenů narostlých na MRS agaru s glukózou jsou na Obr. 18.

Obr. 18 Plotny MRS agaru s narostlými bakteriálními koloniemi po kulivaci v MRS se syrovátkou



⇒ Jednotlivými křížovými roztěry byla prokázána čistota bakteriálních kultur. Velikost bakteriálních kolonií se lišila pouze u ploten, na které byly nanášeny bakterie kultivované v MRS médiu s 2% syrovátkou a pH 5,5 a s 4% syrovátkou a pH 4,5. Kolonie z těchto dvou agarů byly zkoumány metodou PCR.

3.4 Analýza růstu bakteriálních kultur při stresových podmínkách

Jako stresové podmínky bylo voleno nízké pH. Kultivace probíhala v MRS médiu s laktózou při 37°C o pH 6,5; 6,0; 5,5; 5,0; 4,5; 4,0; 3,5 a 3,0.

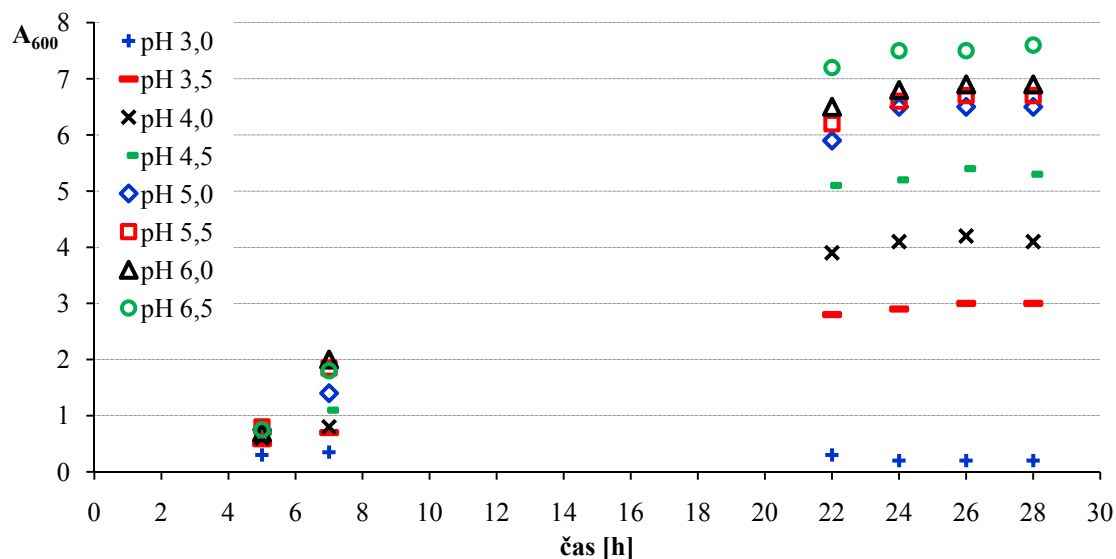
3.4.1 Analýza růstu *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211 při stresových podmínkách

Výsledky získané při studiu růstu během kultivace kmenů *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211 jsou uvedeny v Tabulce 12. Již při prvním měření bylo voleno ředění dle poznatků získaných při studiu růstových křivek. Při ředění byla hodnota absorbance vypočítána ze změřených hodnot jako pětinašobek hodnoty (resp. desetinásobek hodnoty). Vypočítané hodnoty byly vyneseny do Grafu 23 jako závislost absorbance na čase.

Tabulka 12 Závislost absorbance A_{600} na čase během kultivace při stresových podmínkách

čas [h]	pH 3,0	pH 3,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 6,0	pH 6,5	
5	0,30	0,50	0,60	0,70	0,75	0,80	0,70	0,75	
7	0,35	0,70	0,80	1,10	1,40	1,85	2,00	1,80	
22	0,30	2,80	3,90	5,10	5,90	6,20	6,50	7,20	
24	0,20	2,90	4,10	5,20	6,50	6,60	6,80	7,50	
26	0,20	3,00	4,20	5,40	6,50	6,70	6,90	7,50	
28	0,20	3,00	4,10	5,30	6,50	6,70	6,90	7,60	
<hr/>									
5	0,06	0,10	0,12	0,14	0,15	0,16	0,14	0,15	zředěno 5x
7	0,07	0,14	0,16	0,22	0,28	0,37	0,40	0,36	
<hr/>									
22	0,03	0,28	0,39	0,51	0,59	0,62	0,65	0,72	10 x zředěno
24	0,02	0,29	0,41	0,52	0,65	0,66	0,68	0,75	
26	0,02	0,30	0,42	0,54	0,65	0,67	0,69	0,75	
28	0,02	0,30	0,41	0,53	0,65	0,67	0,69	0,76	

Graf 23 Růst *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211 při stresových podmínkách (závislost absorbance na čase při 600 nm)



3.4.2 Analýza růstu *Lbc. paracasei* CCDM 212 při stresových podmínkách

Výsledky získané při studiu růstu během kultivace kmenů *Lbc. paracasei* CCDM 212 jsou uvedeny v Tabulce 13. Již při prvním měření bylo voleno ředění dle poznatků získaných při studiu růstových křivek. Při ředění byla hodnota absorbance vypočítána ze změřených hodnot jako pětinašobek hodnoty (resp. desetinásobek hodnoty). Vypočítané hodnoty byly vyneseny do Grafu 24 jako závislost absorbance na čase.

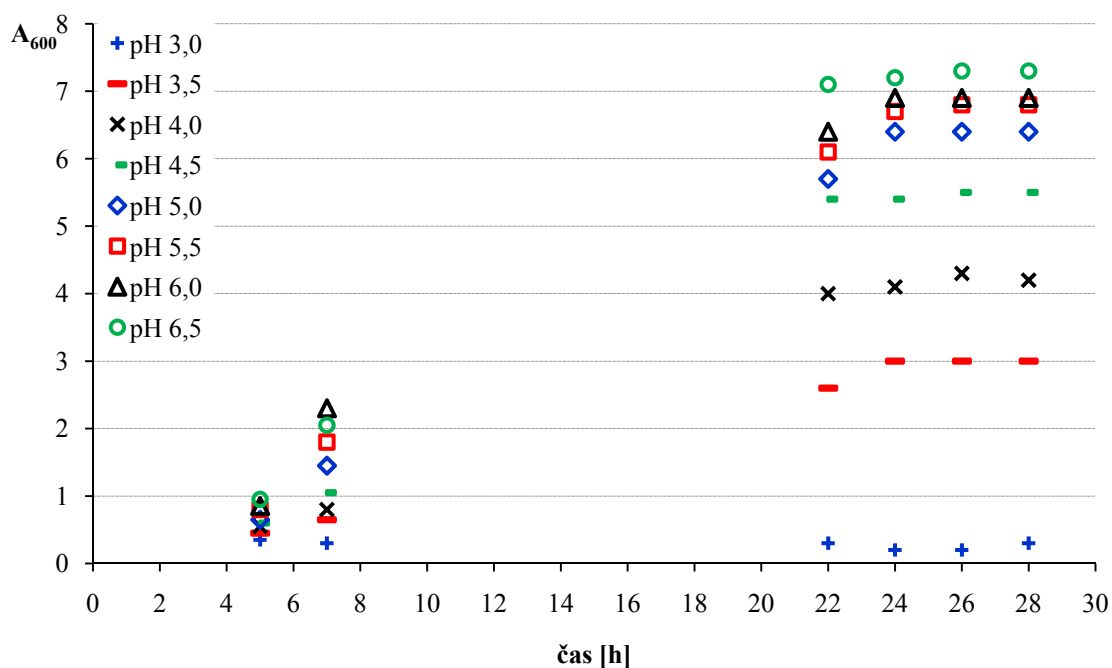
Tabulka 13 Závislost absorbance A_{600} na čase během kultivace při stresových podmínkách

čas [h]	pH 3,0	pH 3,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 6,0	pH 6,5
5	0,35	0,45	0,55	0,60	0,65	0,80	0,85	0,95
7	0,30	0,65	0,80	1,05	1,45	1,80	2,30	2,05
22	0,30	2,60	4,00	5,40	5,70	6,10	6,40	7,10
24	0,20	3,00	4,10	5,40	6,40	6,70	6,90	7,20
26	0,20	3,00	4,30	5,50	6,40	6,80	6,90	7,30
28	0,30	3,00	4,20	5,50	6,40	6,80	6,90	7,30
<hr/>								
5	0,07	0,09	0,11	0,12	0,13	0,16	0,17	0,19
7	0,06	0,13	0,16	0,21	0,29	0,36	0,46	0,41
<hr/>								
22	0,03	0,26	0,40	0,54	0,57	0,61	0,64	0,71
24	0,02	0,30	0,41	0,54	0,64	0,67	0,69	0,72
26	0,02	0,30	0,43	0,55	0,64	0,68	0,69	0,73
28	0,03	0,30	0,42	0,55	0,64	0,68	0,69	0,73

5x
zředěno

10 x zředěno

Graf 24 Růst *Lbc. paracasei* CCDM 212 při stresových podmínkách (závislost absorbance na čase při 600 nm)



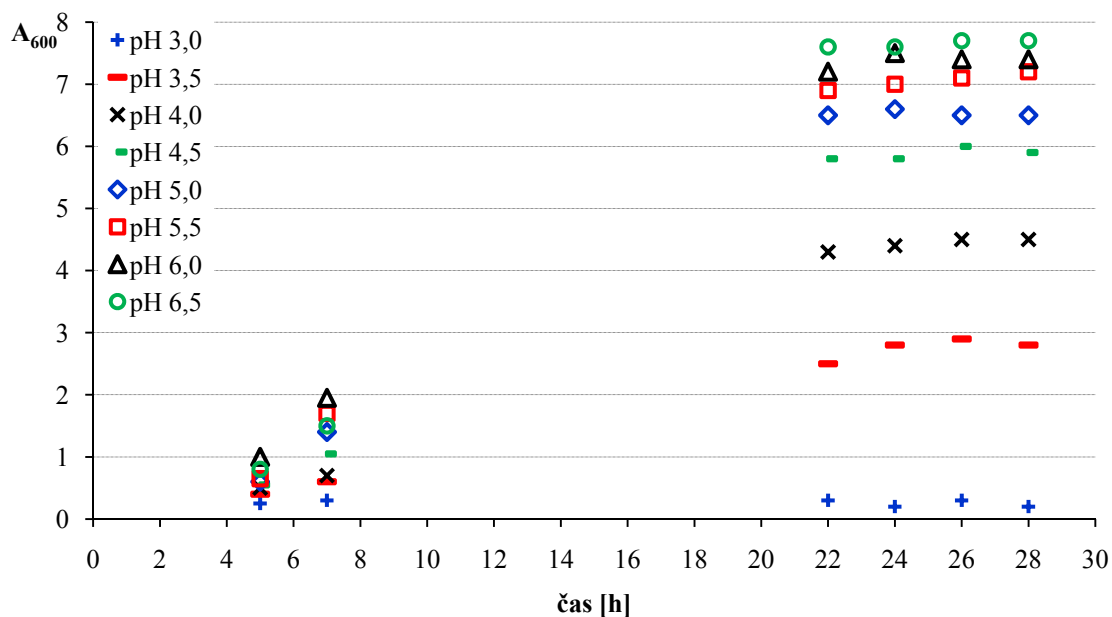
3.4.3 Analýza růstu *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 213 při stresových podmínkách

Výsledky získané při studiu růstu během kultivace kmenů *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 213 jsou uvedeny v Tabulce 14. Již při prvním měření bylo voleno ředění dle poznatků získaných při studiu růstových křivek. Při ředění byla hodnota absorbance vypočítána ze změřených hodnot jako pětinašobek hodnoty (resp. desetinásobek hodnoty). Vypočítané hodnoty byly vyneseny do Grafu 25 jako závislost absorbance na čase.

Tabulka 14 Závislost absorbance A_{600} na čase během kultivace při stresových podmínkách

čas [h]	pH 3,0	pH 3,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 6,0	pH 6,5	
5	0,25	0,40	0,50	0,55	0,60	0,65	1,00	0,80	
7	0,30	0,60	0,70	1,05	1,40	1,70	1,95	1,50	
22	0,30	2,50	4,30	5,80	6,50	6,90	7,20	7,60	
24	0,20	2,80	4,40	5,80	6,60	7,00	7,50	7,60	
26	0,30	2,90	4,50	6,00	6,50	7,10	7,40	7,70	
28	0,20	2,80	4,50	5,90	6,50	7,20	7,40	7,70	
<hr/>									
5	0,05	0,08	0,10	0,11	0,12	0,13	0,20	0,16	5x zředěno
7	0,06	0,12	0,14	0,21	0,28	0,34	0,39	0,30	
<hr/>									
22	0,03	0,25	0,43	0,58	0,65	0,69	0,72	0,76	10 x zředěno
24	0,02	0,28	0,44	0,58	0,66	0,70	0,75	0,76	
26	0,03	0,29	0,45	0,60	0,65	0,71	0,74	0,77	
28	0,02	0,28	0,45	0,59	0,65	0,72	0,74	0,77	

Graf 25 Růst *Lbc. paracasei* CCDM 212 při stresových podmínkách (závislost absorbance na čase při 600 nm)



3.4.4 Analýza růstu *Lbc. salivarius* CCDM 216 při stresových podmínkách

Výsledky získané při studiu růstu během kultivace kmenů *Lbc. salivarius* CCDM 216 jsou uvedeny v Tabulce 15. Již při prvním měření bylo voleno ředění dle poznatků získaných při studiu růstových křivek. Při ředění byla hodnota absorbance vypočítána ze změřených hodnot jako pětinašobek hodnoty (resp. desetinásobek hodnoty). Vypočítané hodnoty byly vyneseny do Grafu 26 jako závislost absorbance na čase.

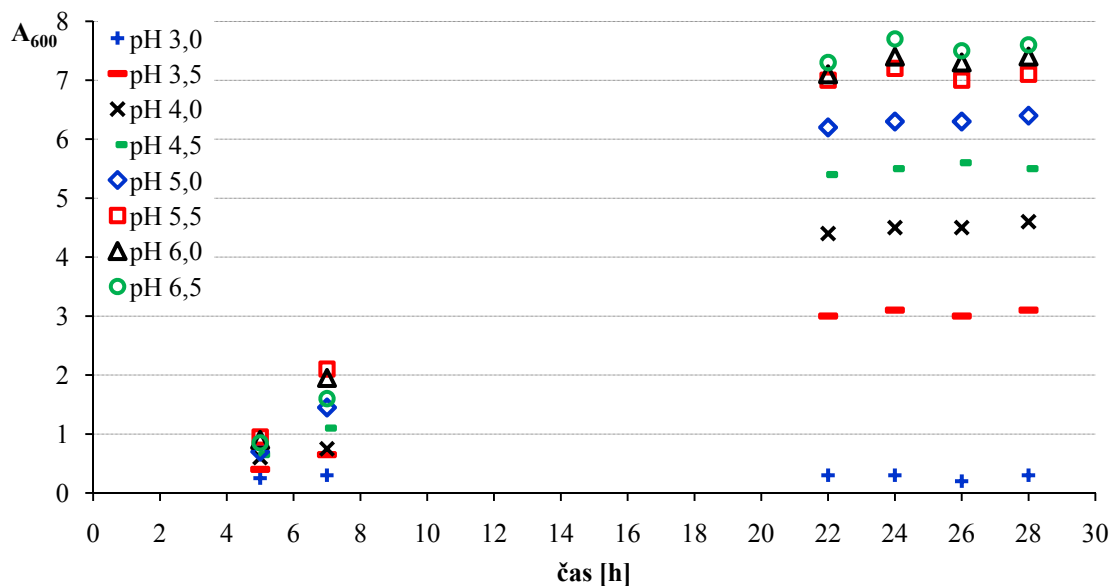
Tabulka 15 Závislost absorbance A_{600} na čase během kultivace při stresových podmínkách

čas [h]	pH 3,0	pH 3,5	pH 4,0	pH 4,5	pH 5,0	pH 5,5	pH 6,0	pH 6,5
5	0,25	0,40	0,60	0,65	0,70	0,95	0,90	0,85
7	0,30	0,65	0,75	1,10	1,45	2,10	1,95	1,60
22	0,30	3,00	4,40	5,40	6,20	7,00	7,10	7,30
24	0,30	3,10	4,50	5,50	6,30	7,20	7,40	7,70
26	0,20	3,00	4,50	5,60	6,30	7,00	7,30	7,50
28	0,30	3,10	4,60	5,50	6,40	7,10	7,40	7,60
<hr/>								
5	0,05	0,08	0,12	0,13	0,14	0,19	0,18	0,17
7	0,06	0,13	0,15	0,22	0,29	0,42	0,39	0,32
<hr/>								
22	0,03	0,30	0,44	0,54	0,62	0,70	0,71	0,73
24	0,03	0,31	0,45	0,55	0,63	0,72	0,74	0,77
26	0,02	0,30	0,45	0,56	0,63	0,70	0,73	0,75
28	0,03	0,31	0,46	0,55	0,64	0,71	0,74	0,76

5x
zředěno

10 x zředěno

Graf 26 Růst *Lbc. salivarius* CCDM 216 při stresových podmínkách (závislost absorbance na čase při 600 nm)

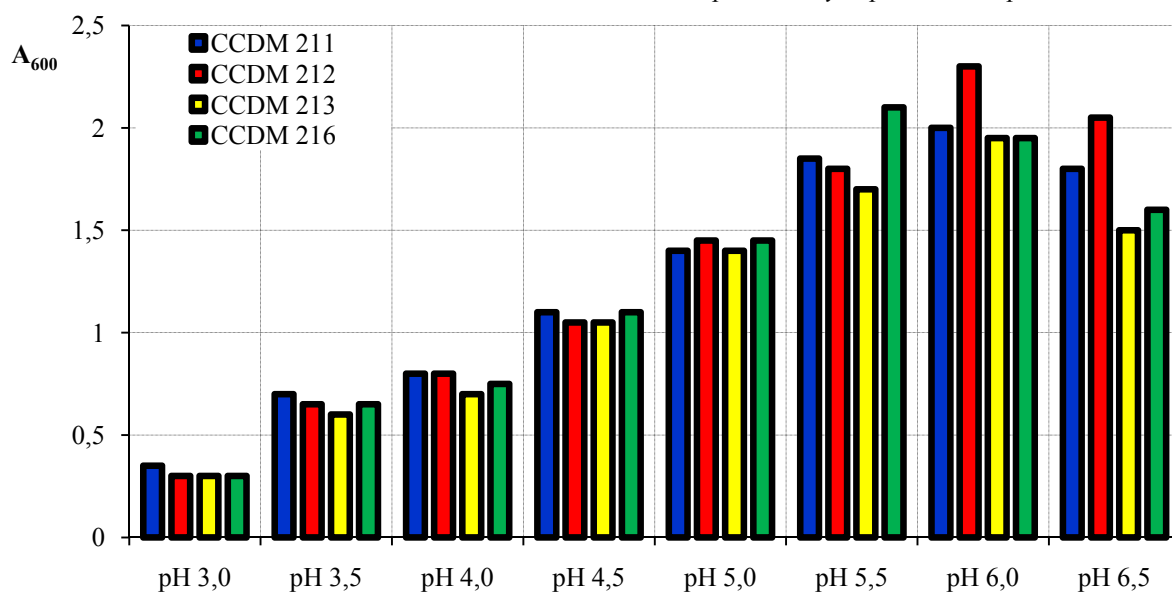


⇒ Při porovnání jednotlivých hodnot absorbance bylo zjištěno, že růst jednotlivých mikroorganismů se zvyšuje se zvyšujícím se pH.

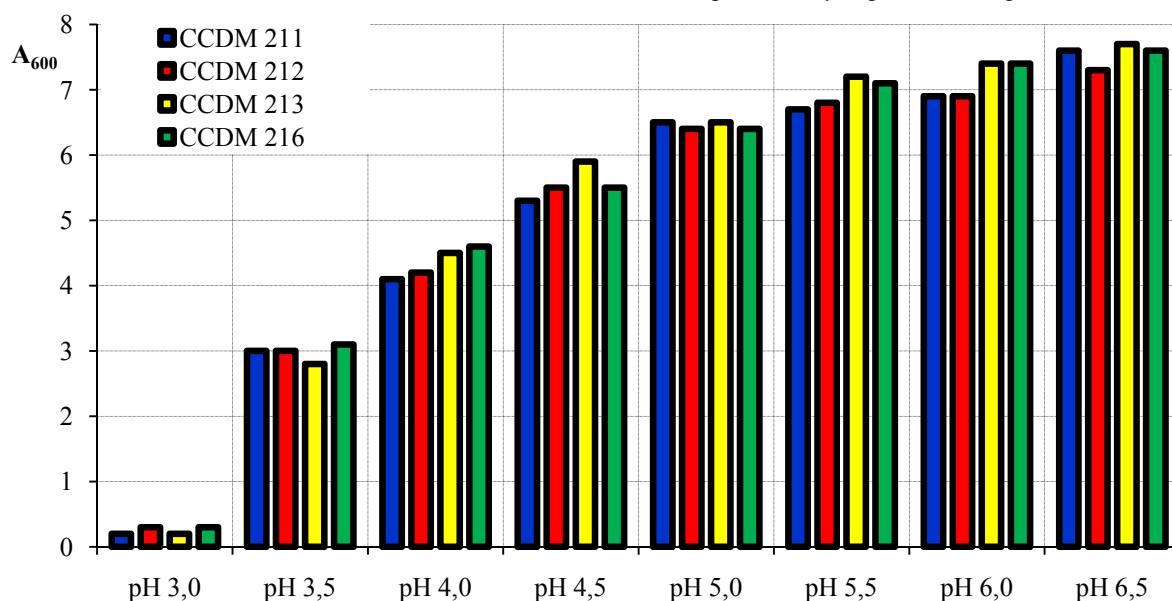
3.4.5 Porovnání růstu kmenů na MRS médiu s laktózou při stresových podmínkách

Porovnání růstu kmenů *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211, *Lbc. paracasei* CCDM 212, *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 213 a *Lbc. salivarius* CCDM 216 během kultivace v MRS médiu s laktózou při stresových podmínkách je uvedeno na Grafu 27 (po 7 hodinách) a Grafu 28 (po 28 hodinách).

Graf 27 Porovnání růstu během kultivace v MRS médiu s laktózou při stresových podmínkách po 7 hodinách



Graf 28 Porovnání růstu během kultivace v MRS médiu s laktózou při stresových podmínkách po 28 hodinách



⇒ Z grafů porovnávajících růst kmenů při různém pH je zřejmé, že v 7. hodině růstu bylo nejvhodnější pH 5,5 - 6. Ve 28. hodině již bylo nejvýhodnější pH 6,5. Růst při stejném pH je u všech kmenů téměř shodný.

3.5 Analýza růstu bakteriálních kultur při různém obsahu laktózy

Byl testován růst bakteriálních kultur v MRS médiu s různým obsahem zdroje uhlíku. Jako zdroj uhlíku byla použita laktóza obsahu 2% a 4% v médiu a kultivace probíhala při 37°C.

3.5.1 Analýza růstu *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211 při různém obsahu laktózy

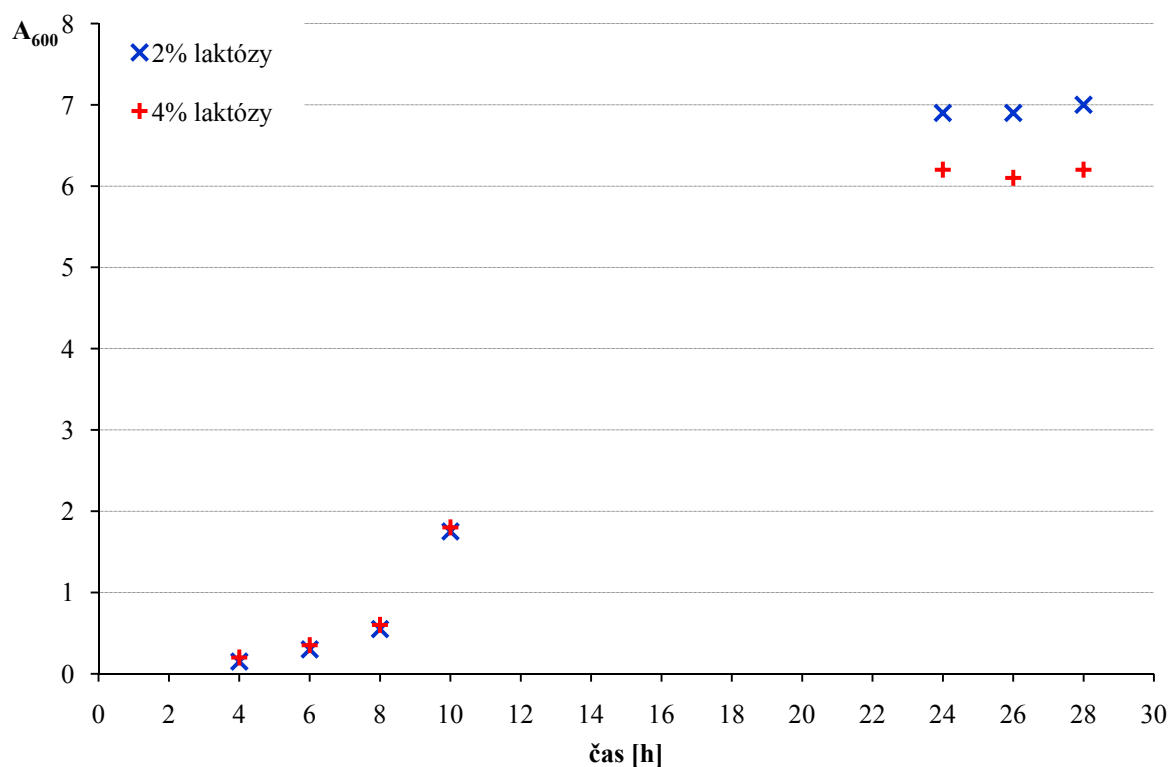
Výsledky získané při studiu růstu během kultivace kmenů *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211 jsou uvedeny v Tabulce 16. Již při prvním měření bylo voleno ředění dle poznatků získaných při studiu růstových křivek. Při ředění byla hodnota absorbance vypočítána ze změřených hodnot jako pětinašobek hodnoty (resp. desetinásobek hodnoty). Vypočítané hodnoty byly vyneseny do Grafu 29 jako závislost absorbance na čase.

Tabulka 16 Závislost absorbance A_{600} na čase během kultivace v MRS médiu s různým obsahem laktózy

čas [h]	2%	4%	2%	4%
4	0,15	0,20	0,03	0,04
6	0,30	0,35	0,06	0,07
8	0,55	0,60	0,11	0,12
10	1,75	1,80	0,35	0,36
24	6,90	6,20	0,69	0,62
26	6,90	6,10	0,69	0,61
28	7,00	6,20	0,70	0,62

5x zředěno
10x zředěno

Graf 29 Růst *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211 v MRS médiu s různým obsahem laktózy (závislost absorbance na čase při 600 nm)



3.5.2 Analýza růstu *Lbc. paracasei* CCDM 212 při různém obsahu laktózy

Výsledky získané při studiu růstu během kultivace kmenů *Lbc. paracasei* CCDM 212 jsou uvedeny v Tabulce 17. Již při prvním měření bylo voleno ředění dle poznatků získaných při studiu růstových křivek. Při ředění byla hodnota absorbance vypočítána ze změřených hodnot jako pětinašobek hodnoty (resp. desetinásobek hodnoty). Vypočítané hodnoty byly vyneseny do Grafu 30 jako závislost absorbance na čase.

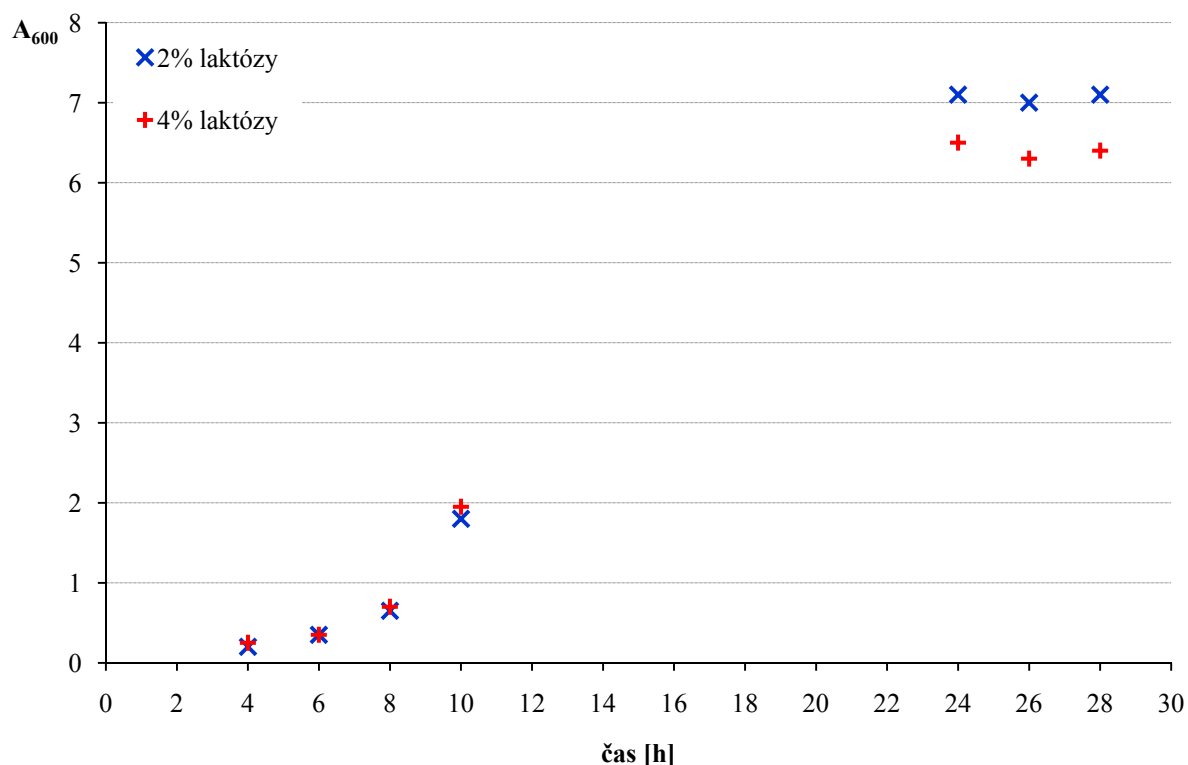
Tabulka 17 Závislost absorbance A_{600} na čase během kultivace v MRS médiu s různým obsahem laktózy

čas [h]	2%	4%	2%	4%
4	0,20	0,25	0,04	0,05
6	0,35	0,35	0,07	0,07
8	0,65	0,70	0,13	0,14
10	1,80	1,95	0,36	0,39
24	7,10	6,50	0,71	0,65
26	7,00	6,30	0,70	0,63
28	7,10	6,40	0,71	0,64

5x zředěno

10x zředěno

Graf 30 Růst *Lbc. paracasei* CCDM 212 v MRS médiu s různým obsahem laktózy (závislost absorbance na čase při 600 nm)



3.5.3 Analýza růstu *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 213 při různém obsahu laktózy

Výsledky získané při studiu růstu během kultivace kmenů *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 213 jsou uvedeny v Tabulce 18. Již při prvním měření bylo voleno ředění dle poznatků získaných při studiu růstových křivek. Při ředění byla hodnota absorbance vypočítána ze změřených hodnot jako pětinašobek hodnoty (resp. desetinásobek hodnoty). Vypočítané hodnoty byly vyneseny do Grafu 31 jako závislost absorbance na čase.

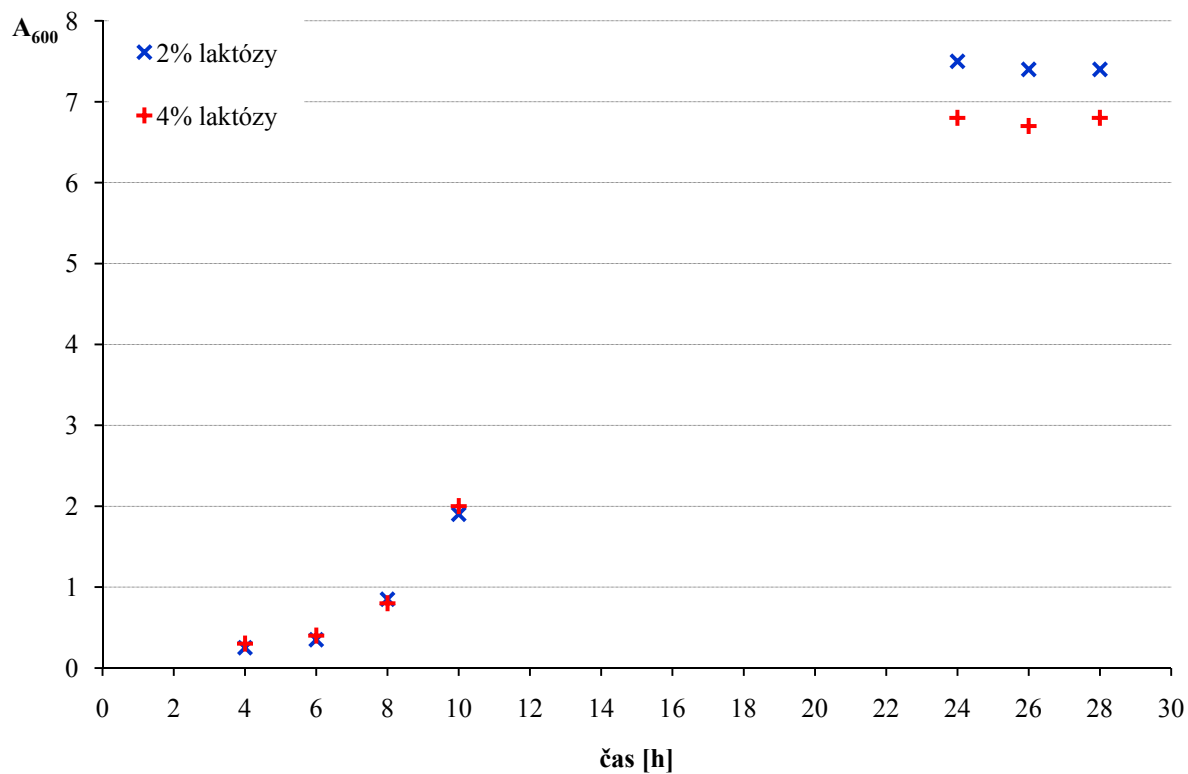
Tabulka 18 Závislost absorbance A_{600} na čase během kultivace v MRS médiu s různým obsahem laktózy

čas [h]	2%	4%	2%	4%
4	0,25	0,30	0,05	0,06
6	0,35	0,40	0,07	0,08
8	0,85	0,80	0,17	0,16
10	1,90	2,00	0,38	0,40
24	7,50	6,80	0,75	0,68
26	7,40	6,70	0,74	0,67
28	7,40	6,80	0,74	0,68

5x zředěno

10x zředěno

Graf 31 Růst *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 213 v MRS médiu s různým obsahem laktózy (závislost absorbance na čase při 600 nm)



3.5.4 Analýza růstu *Lbc. salivarius* CCDM 216 při různém obsahu laktózy

Výsledky získané při studiu růstu během kultivace kmenů *Lbc. salivarius* CCDM 216 jsou uvedeny v Tabulce 19. Již při prvním měření bylo voleno ředění dle poznatků získaných při studiu růstových křivek. Při ředění byla hodnota absorbance vypočítána ze změřených hodnot jako pětinašobek hodnoty (resp. desetinásobek hodnoty). Vypočítané hodnoty byly vyneseny do Grafu 32 jako závislost absorbance na čase.

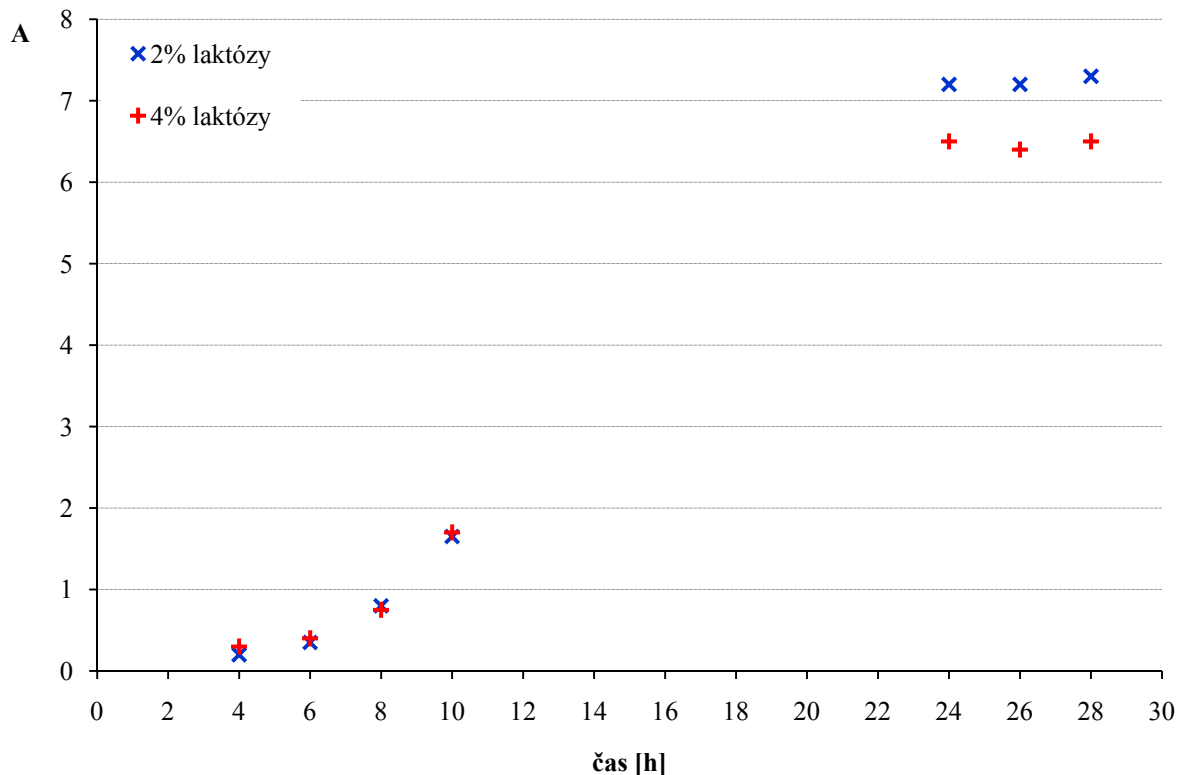
Tabulka 19 Závislost absorbance na čase během kultivace v MRS médiu s různým obsahem laktózy

čas [h]	2%	4%	2%	4%
4	0,25	0,30	0,05	0,06
6	0,35	0,40	0,07	0,08
8	0,85	0,80	0,17	0,16
10	1,90	2,00	0,38	0,40
24	7,50	6,80	0,75	0,68
26	7,40	6,70	0,74	0,67
28	7,40	6,80	0,74	0,68

5x zředěno

10x zředěno

Graf 32 Růst *Lbc. salivarius* CCDM 216 v MRS médiu s různým obsahem laktózy (závislost absorbance na čase při 600 nm)



⇒ Při porovnávání růstu v mediích obsahujících různý obsah laktózy bylo zjištěno, že při prvních 10 hodinách růstu nemá obsah zdroje uhlíku vliv na rychlost růstu. Ve stacionární fázi je zřejmé, že při vyšším obsahu laktózy jsou hodnoty absorbance nižší.

3.6 Izolace DNA a ověření čistoty

Bakteriální DNA byla izolována z bakteriálních kultur, které byly použity pro měření absorbance a z nichž byl proveden křížový roztěr. Izolovaná DNA byla přečištěna fenolovou extrakcí a přesrážena 96% ethanolem. Přítomnost izolované DNA byla ověřena agarózovou gelovou elektroforézou na 0,6% agarózovém gelu. Na gel bylo nanášeno 20 μ l a 30 μ l purifikované DNA. Výsledný gel je zobrazen na Obr. 19. Schéma nanesení vzorků na gel a detekce DNA jsou uvedeny v Tabulce 20.

Obr. 19 Agarózová gelová elektroforéza purifikované DNA z bakteriálních kmenů *Lactobacillus*



Tabulka 20 Detekce purifikované DNA

Běh č.	Vzorek	Množství DNA	Přítomnost DNA
1	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211	20 μ l	+
2	<i>Lbc. paracasei</i> CCDM 212	20 μ l	+
3	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 213	20 μ l	++
4	<i>Lbc. salivarius</i> CCDM 216	20 μ l	++
5	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211	30 μ l	++
6	<i>Lbc. paracasei</i> CCDM 212	30 μ l	++
7	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 213	30 μ l	++
8	<i>Lbc. salivarius</i> CCDM 216	30 μ l	++

++ přítomnost DNA detekována silně

+ přítomnost DNA detekována slabě

⇒ Gelovou elektroforézou bylo dokázáno, že purifikovaná DNA všech vzorků je relativně intaktní. Intenzita detekce byla přibližně úměrná množství DNA nanesené na gel.

3.7 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

Výsledné hodnoty absorbance a koncentrace DNA po spektrofotometrickém stanovení jsou uvedeny v Tabulce 21.

Tabulka 21 Výsledky spektrofotometrického stanovení koncentrace DNA

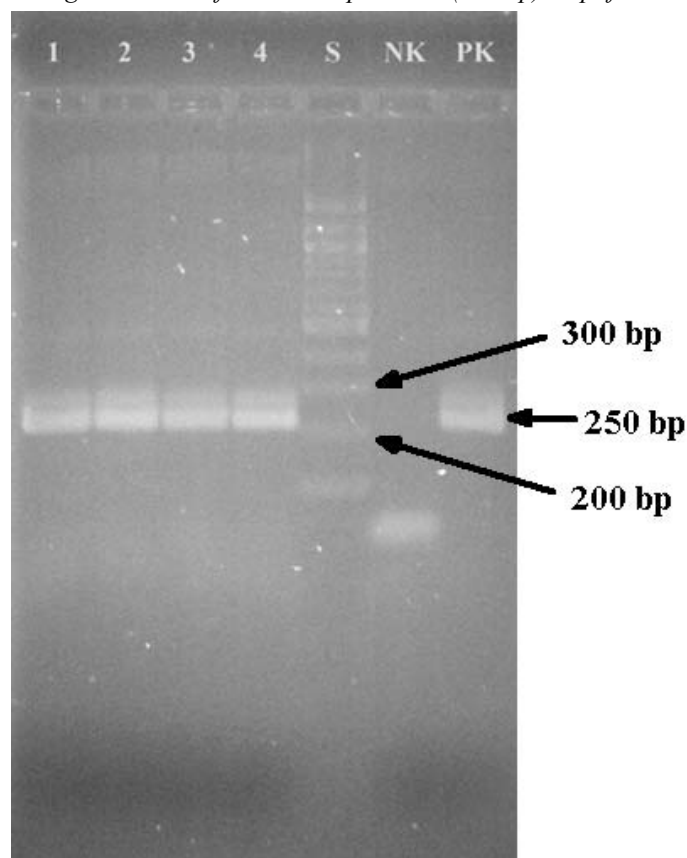
Kmen	Absorbance A_{260}	Koncentrace [ng/ μ l]
<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211	0,258	12,9
<i>Lbc. paracasei</i> CCDM 212	0,328	16,9
<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 213	0,238	11,9
<i>Lbc. salivarius</i> CCDM 216	0,310	15,5

⇒ DNA byla izolována v dostatečném množství pro PCR.

3.8 Rodově specifická PCR s použitím purifikované DNA jako DNA matrice

Purifikovaná bakteriální DNA byla zředěna na koncentraci 10 ng/ μ l a amplifikována pomocí metody PCR. K amplifikaci byly použity specifické primery pro rod *Lactobacillus*. Přítomnost DNA byla ověřena agarózovou gelovou elektroforézou na 1,6% agarózovém gelu. Výsledný gel je zobrazen na Obr. 20. Schéma nanesení vzorků na gel a detekce PCR produktů jsou uvedeny v Tabulce 22.

Obr. 20 Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (250 bp) amplifikované purifikované DNA



Tabulka 22 Detekce PCR produktů amplifikované purifikované DNA

Běh č.	Vzorek	Množství DNA v PCR směsi	Přítomnost PCR produktu
1	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211	10 ng	+
2	<i>Lbc. paracasei</i> CCDM 212	10 ng	+
3	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 213	10 ng	+
4	<i>Lbc. salivarius</i> CCDM 216	10 ng	+
S	Standard		100 bp žebříček
NK	Negativní kontrola		-
PK	Pozitivní kontrola (<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211)	10 ng	+

+ PCR produkt detekován

- PCR produkt nedetekován

⇒ Po amplifikaci purifikované DNA byl detekován specifický PCR produkt

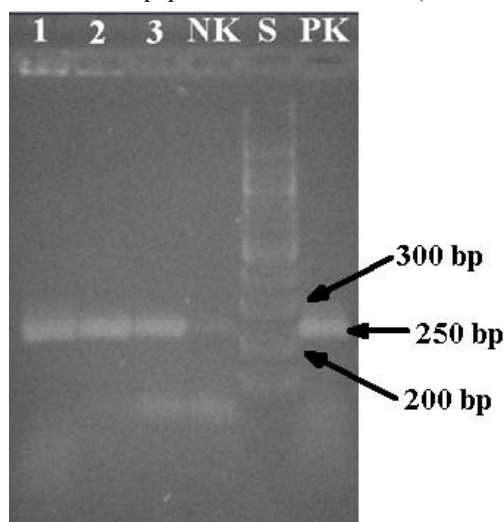
3.9 Rodově specifická PCR s použitím DNA matrice z hrubého lyzátu buněk

3.9.1 Určení citlivosti rodově specifické PCR s použitím DNA matrice z hrubého lyzátu buněk

Byl připraven hrubý lyzát buněk (viz kapitola 2.2.3.13) a DNA byla amplifikována pomocí metody PCR. K amplifikaci byly použity specifické primery pro rod *Lactobacillus*. Přítomnost PCR produktů byla ověřena agarózovou gelovou elektroforézou na 1,6% agarózovém gelu. Výsledný gel je zobrazen na Obr. 21. Schéma nanesení vzorků na gel a detekce PCR produktů jsou uvedeny v Tabulce 23.

Jako nejvýhodnější bylo zvoleno ředění 1000 x, protože při nižším ředění byly zřejmé pozůstatky vzorku v komůrkách gelu.

Obr. 21 Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (250 bp) amplifikované DNA z hrubého lyzátu *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211 (kultivace při pH 6,5)



Tabulka 23 Detekce PCR produktů amplifikované DNA z hrubého lyzátu *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211 (kultivace při pH 6,5)

Běh č.	Ředění	Množství DNA matrice v PCR směsi	Přítomnost PCR produktu
1	10 x	2 µl	+
2	100 x	2 µl	+
3	1000 x	2 µl	+
NK	Negativní kontrola		(+)*
S	Standard		100 bp žebříček
PK	Pozitivní kontrola (<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211)	2 µl	+

+ PCR produkt detekován

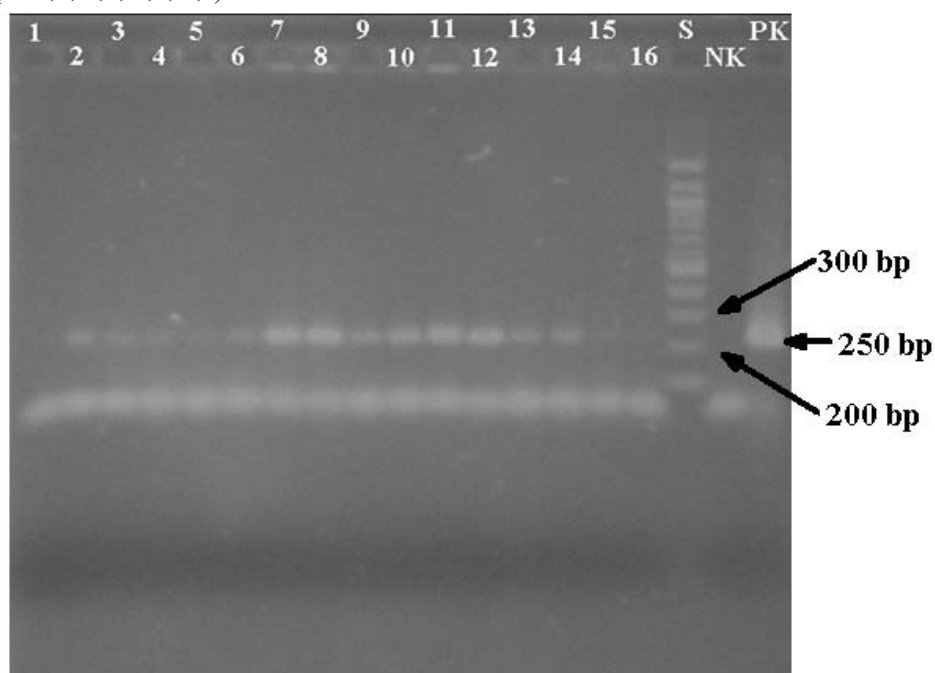
(+)* došlo k přelití vzorku ze sousední komůrky, při dalších opakováních nebyl PCR produkt v NK detekován

⇒ Po amplifikaci DNA z 10x až 1000x zředěných hrubých lyzátů byl detekován specifický PCR produkt

3.9.2 Rodově specifická PCR s použitím DNA matrice z hrubého lyzátu buněk

Dále byl testován 1000x zředěný hrubý lyzát buněk. DNA byla amplifikována pomocí metody PCR. K amplifikaci byly použity specifické primery pro rod *Lactobacillus*. Přítomnost DNA byla ověřena agarózovou gelovou elektroforézou na 1,6% agarózovém gelu. Výsledný gel je zobrazen na Obr. 22. Schéma nanesení vzorků na gel a detekce PCR produktů jsou uvedeny v Tabulce 24.

Obr. 22 Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (250 bp) amplifikované DNA z hrubého lyzátu (kultivace při pH 6,5; 6,0; 5,5; 5,0)



Tabulka 24 Detekce PCR produktů amplifikované DNA z hrubého lyzátu (kultivace při pH 6,5; 6,0; 5,5; 5,0)

Běh č.	Vzorek	pH média	Množství DNA matrice v PCR směsi	Přítomnost PCR produktu
1	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211	6,5	2 µl	(+)
2	<i>Lbc. paracasei</i> CCDM 212	6,5	2 µl	++
3	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 213	6,5	2 µl	++
4	<i>Lbc. salivarius</i> CCDM 216	6,5	2 µl	+
5	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211	6,0	2 µl	+
6	<i>Lbc. paracasei</i> CCDM 212	6,0	2 µl	++
7	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 213	6,0	2 µl	+++
8	<i>Lbc. salivarius</i> CCDM 216	6,0	2 µl	+++
9	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211	5,5	2 µl	++
10	<i>Lbc. paracasei</i> CCDM 212	5,5	2 µl	++
11	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 213	5,5	2 µl	++
12	<i>Lbc. salivarius</i> CCDM 216	5,5	2 µl	++
13	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211	5,0	2 µl	++
14	<i>Lbc. paracasei</i> CCDM 212	5,0	2 µl	++
15	<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 213	5,0	2 µl	(+)
16	<i>Lbc. salivarius</i> CCDM 216	5,0	2 µl	(+)
S	Standard			100 bp žebříček
NK	Negativní kontrola			-
PK	Pozitivní kontrola (<i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211)		2 µl	+

+++ , ++ , + , (+) různé intenzity detekce PCR produktu

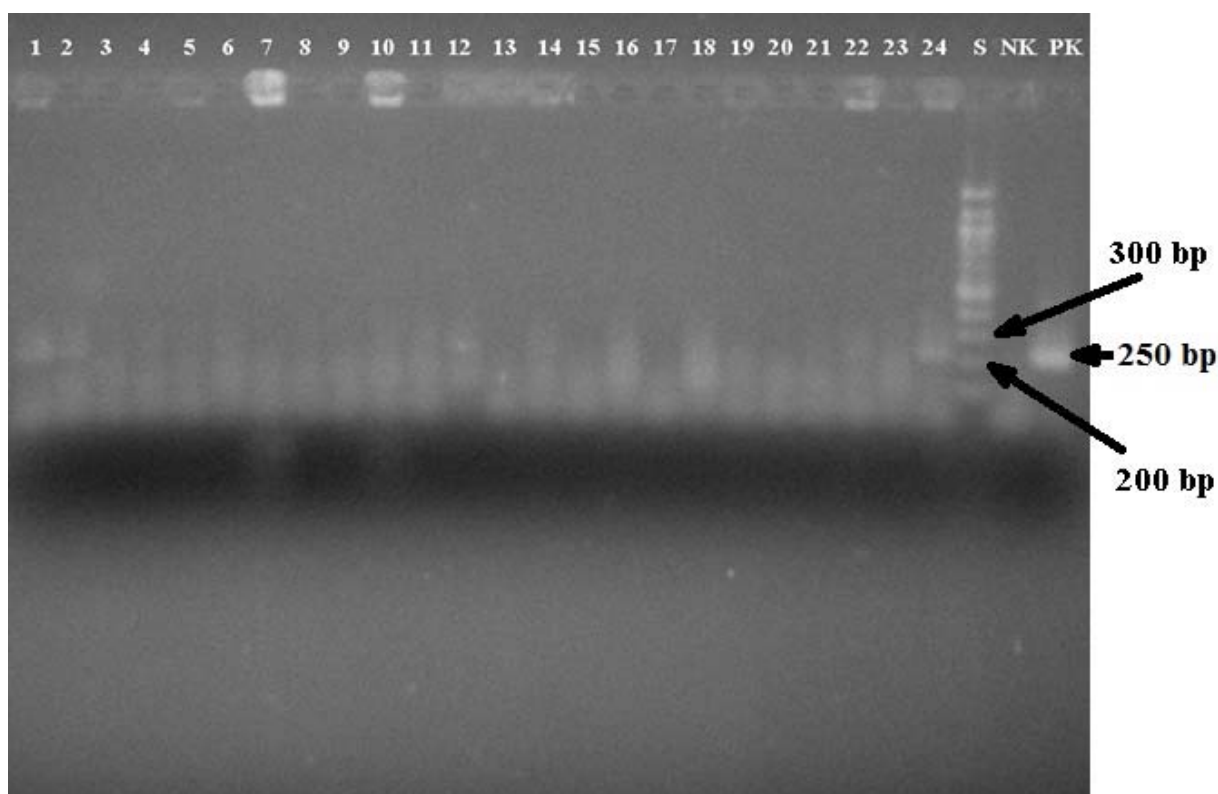
- PCR produkt nedetekován

⇒ Byly detekovány PCR produkty různé intenzity, která odráží různá množství buněk v hrubých lyzátech.

3.9.3 Rodově specifická PCR s použitím DNA matrice z hrubého lyzátu kolonií

Příslušnost bakteriálních kolonií po kultivaci v MRS médiu se syrovátkou byla potvrzena metodou PCR. Jako DNA matrice byl použit 10x zředěný hrubý lyzát, který byl připraven povařením z kolonií kultivovaných na plotnách MRS agaru. DNA byla amplifikována pomocí metody PCR. K amplifikaci byly použity specifické primery pro rod *Lactobacillus*. Přítomnost DNA byla ověřena agarózovou gelovou elektroforézou na 1,6% agarózovém gelu. Výsledný gel je zobrazen na Obr. 23. Schéma nanesení vzorků na gel a detekce PCR produktů jsou uvedeny v Tabulce 25.

Obr. 23 Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (250 bp) amplifikované DNA z hrubého lyzátu bakteriálních kolonií



Tabulka 25 Detekce PCR produktů amplifikované DNA z hrubého lyzátu bakteriálních kolonií

Běh č.	Množství na PCR produkt	Množství DNA matrice v PCR směsi	Běh č.	Množství na PCR produkt	Množství DNA matrice v PCR směsi
1	2 µl	++	7	2 µl	(+)
2	2 µl	++	8	2 µl	(+)
3	2 µl	(+)	9	2 µl	-
4	2 µl	-	10	2 µl	(+)
5	2 µl	-	11	2 µl	(+)
6	2 µl	(+)	12	2 µl	+

Běh č.	Množství na PCR produkt	Množství DNA matrice v PCR směsi
13	2 μ l	-
14	2 μ l	(+)
15	2 μ l	+
16	2 μ l	(+)
17	2 μ l	-
18	2 μ l	(+)
19	2 μ l	-
20	2 μ l	-

Běh č.	Množství na PCR produkt	Množství DNA matrice v PCR směsi
21	2 μ l	-
22	2 μ l	+
23	2 μ l	(+)
24	2 μ l	++
S		100 bp žebříček
NK		-
PK	2 μ l	+

++, +, (+) různé intenzity detekce PCR produktu

- PCR produkt nedetekován

⇒ Byly detekovány PCR produkty různé intenzity, mohou být zapříčiněny přítomností inhibitorů PCR (zdroj inhibitorů syrovátka).

4 DISKUZE

Bakterie rodu *Lactobacillus* se nejčastěji kultivují na MRS médiu. [3] Mohou růst aerobně i anaerobně a jako hlavní produkt tvoří kyselinu mléčnou. [4] Při studiu růstu nově izolovaných kmenů *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211, *Lbc. paracasei* CCDM 212, *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 213 a *Lbc. salivarius* CCDM 216 při námi zvolených podmínkách bylo nejprve provedeno měření optické hustoty v průběhu kultivace v MRS médiu, které obsahovalo glukózu jako zdroj uhlíku. Kultivace byla prováděna za aerobních podmínek při 37°C.

Všechny růstové křivky bakterií kultivovaných v MRS médiu s glukózou mají sigmoidní tvar a jsou zřejmé všechny fáze růstu ve shodě s výsledky zkoumání jednotlivých fází růstu. [18] Po 11 hodinách růstu nastal u všech studovaných kmenů pokles absorbance. Tento pokles mohl být způsoben tepelným šokem. Ve stacionární fázi růstu (po 24 hodinách růstu) byly dosaženy maximální hodnoty absorbance v rozsahu 7,20 - 7,47.

Porovnáním růstových křivek jednotlivých kmenů rodu *Lactobacillus* bylo zjištěno, že prvních 7 hodin růstu jsou hodnoty absorbance, tedy i množství buněk, téměř shodné. Ke konci exponenciální fáze růstu se hodnoty absorbance již mírně lišily, i když rozdíl nebyl velmi výrazný.

Dále byl studován růst kmenů *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211, *Lbc. paracasei* CCDM 212, *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 213 a *Lbc. salivarius* CCDM 216 v MRS médiu v němž byla glukóza nahrazena laktózou. Růst byl studován za aerobních podmínek při teplotě 37°C. Některé bakterie mohou využívat nejen glukózu, ale také laktózu jako zdroj uhlíku. [4] I zde mají křivky sigmoidní tvar a jsou zřejmé všechny fáze růstu. [18] Ve stacionární fázi růstu (po 24 hodinách růstu) byly dosaženy maximální hodnoty absorbance v rozsahu 7,11 - 7,65.

Při porovnání růstových křivek jednotlivých kmenů rodu *Lactobacillus* na MRS médiu s laktózou bylo zjištěno, že na rozdíl od růstu v MRS médiu s glukózou byl téměř shodný růst po dobu 8 hodin. I v tomto případě se hodnoty absorbance ke konci exponenciální fáze růstu mírně lišily, i když rozdíl nebyl velmi výrazný.

U všech kmenů jsou rozdíly růstu velmi podobné. Až do počátku exponenciální fáze růstu jsou zřejmé vyšší hodnoty absorbance po kultivaci v MRS médiu s glukózou, z čehož vyplývá, že bakterie mají kratší lag-fázi, když je jako zdroj uhlíku použita glukóza. Ovšem od konce exponenciální fáze růstu se situace mění. Vyšší hodnoty absorbance a tudíž i vyšší koncentrace buněk je dosažena při kultivaci v MRS médiu s laktózou.

Pro kontrolu čistoty bakteriální kultury byl proveden křížový roztěr. [1] Kultivace byla provedena na MRS agaru. Hodnocení kolonií po kultivaci bylo následující: tvar okrouhlý, okraje hladké, povrch hladký, profil vypouklý, transparence neprůhledná, barva bílá, okolí kolonie beze změny. V místech hustšího nárůstu rostly vedle větších kolonií i kolonie menší. Jelikož všechny kolonie byly přibližně stejného vzhledu, jednalo se o čistou bakteriální kulturu. Čistota kultury taktéž potvrzuje práci za sterilních podmínek.

Růst bakterií byl zkoumán také v průběhu kultivace za aerobních podmínek při 37°C v MRS médiu se syrovátkou jako zdrojem uhlíku. Samotné kultivační médium bylo zakaleno syrovátkou, a v průběhu růstu mikroorganismů se zákal snižoval. Z tohoto důvodu bylo jako blank použito i MRS médium bez cukru. Na počátku exponenciální fáze byly nejnižší hodnoty absorbance dosahovány při pH 5,5, ovšem na konci exponenciální fáze růstu

a ve stacionární fázi byly při tomto pH hodnoty absorbance nejvyšší. Tyto výsledky dokazují největší nárůst bakterií při tomto pH.

Jelikož při přípravě kultivačního média byla použita nesterilní syrovátka, bylo potřeba provést kontrolu čistoty kultury, a to křížovým roztěrem a kultivací na MRS agaru. Zjištěné vlastnosti kolonií narostlých na MRS agaru odpovídají vlastnostem rodu *Lactobacillus* a údajům v literatuře. [30]. Zjištěné vlastnosti jsou následující: tvar okrouhlý, okraje hladké, povrch hladký, profil vypouklý, transparence neprůhledná, barva bílá, okolí kolonie beze změny. Velikost kolonií se lišila v místech hustšího nárůstu, vedle kolonií větších rostly i menší kolonie. Ze zjištěných vlastností kolonií lze vyvozovat, že byla kultivována čistá bakteriální kultura.

Jako stresové podmínky růstu bylo zvoleno nižší pH média, vůči kterému jsou bakterie mléčného kvašení odolné. [1] Při studiu růstu bylo dokázáno, že se snižujícím se pH se snižuje růst bakterií. Ještě při pH 3,5 je zřejmý růst bakterií. Při nejvyšším měřeném pH (6,5) dosahovala absorbance hodnot v rozsahu 7,3 - 7,7. Při pH 3,5 se hodnoty absorbance pohybovaly v rozsahu 3,0 - 3,1. Při pH 3,0 nebyl růst bakterií pozorován.

Při stresových podmínkách byl porovnáván růst jednotlivých kmenů na počátku exponenciální fáze růstu a ve stacionární fázi růstu. Po 7 hodinách růstu (počátek exponenciální fáze růstu) je na Grafu 19 zřejmé, že nejvýhodnější pro růst *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 211, *Lbc. paracasei* CCDM 212 a *Lbc. paracasei* subsp. *paracasei* CCDM 213 je pH 6 a pro *Lbc. salivarius* CCDM 216 je hodnota pH 5,5. Pro praktické využití jsou dle mého názoru důležitější výsledky porovnávající růst po 28 hodinách (stacionární fáze růstu). Na Grafu 20 je zřejmé, že nejvyšší hodnoty absorbance jsou dosaženy při kultivaci v médiu o pH 6,5. Při porovnání růstu jednotlivých kmenů při určitém pH je růst přibližně shodný. Při pH v rozsahu 5,0 - 6,5 je možné docílit dostatečného nárůstu bakterií rodu *Lactobacillus*. Růst, i když omezený, byl sledován dokonce při pH 3,5.

Dále byl studován růst bakterií v průběhu kultivace v MRS médiu, které obsahovalo různá množství laktózy jako zdroje uhlíku. Výsledky porovnávají růst jednotlivých kmenů rodu *Lactobacillus* kultivovaných v médiu obsahujícím 2% a 4% laktózy. Růst v prvních deseti hodinách (počátek exponenciální fáze růstu) byl u všech kmenů téměř shodný v obou kultivačních médiích. Ve stacionární fázi růstu jsou již zřejmé rozdíly. Při vyšším obsahu laktózy byly naměřeny nižší hodnoty absorbance, což značí nižší počet bakteriálních buněk narostlých v průběhu kultivace.

Po izolaci bakteriální DNA fenolovou extrakcí byla tato DNA detekována pomocí metody PCR. Výsledky po gelové elektroforéze [24] prokázaly, že purifikovaná DNA je relativně intaktní. Ve vzorcích byla detekována RNA. Množství DNA nanášené na gel bylo přibližně úměrné intenzitě detekce. Množství izolované DNA je dostatečné pro použití v metodě PCR. Obvykle u metody PCR je potřeba menších množství DNA díky skutečnosti, že je možno touto metodou získat z 1 molekuly DNA až 1 µg PCR produktu. [28]

Skutečnost, že množství izolované DNA je dostatečné pro PCR, byla potvrzena také spektrofotometrickým stanovením koncentrace [20, 21]. Koncentrace se pohybovala mezi hodnotami 11,9 - 16,9 ng/µl.

Pro potvrzení příslušnosti vzorků k rodu *Lactobacillus* byla použita pro PCR s rodově specifickými primery LbLMA 1 a R16-1 (Dubernet a spol., 2001) s využitím purifikované DNA jako DNA matrice. Použitá koncentrace DNA v DNA matrici byla 10 ng/µl. Při agarózové gelové elektroforéze byl detekován u všech vzorků specifický PCR produkt

o velikosti 250 bp. Detekce tohoto PCR produktu potvrzuje příslušnost všech vzorků k rodu *Lactobacillus*.

Při amplifikaci DNA z hrubých lyzátů byla nejprve stanovena citlivost metody PCR. Hrubé lyzáty byly zředěny desetkrát, stokrát a tisíckrát. Po amplifikaci rodově specifickými primery LbLMA 1 a R16-1 (Dubernet a spol., 2001) byl detekován intenzivní PCR produkt. Pro potvrzení příslušnosti hrubých lyzátů buněk kultivovaných při stresových podmínkách k rodu *Lactobacillus* bylo voleno tisícinásobné ředění lyzátů. Detekce PCR produktů po amplifikaci DNA z hrubých lyzátů bakteriálních buněk byla různě intenzivní. Různá intenzita PCR produktu pravděpodobně odráží různá množství buněk v hrubých lyzátech. I přes odlišnou intenzitu byly PCR produkty detekovány u všech vzorků, což potvrzuje, že při každém pH se v médiu při kultivaci nacházely studované kmeny rodu *Lactobacillus*.

Po kultivaci na MRS médiu se syrovátkou byla kontrolována čistota kultury křížovým roztěrem. Aby bylo možno s bezpečností říct, že kolonie kultivované na MRS agaru jsou kmeny rodu *Lactobacillus*, musela být provedena amplifikace DNA z hrubých lyzátů kolonií. Byly detekovány PCR produkty různé intenzity. V pěti vzorcích byl PCR produkt stanoven bez problémů. Různé intenzity mohou být zapříčiněny přítomností inhibitorů PCR. Zdrojem inhibitorů (minerály - hlavně Ca^{2+}) PCR je syrovátka. [28] Další možná příčina je nižší množství DNA v hrubých lyzátech a nebo přítomnost jiných bakterií než rodu *Lactobacillus*.

Všechny uvedené výsledky by bylo vhodné prokázat statisticky. Tato diplomová práce byla zaměřena na získání prvotních výsledků. Experimenty budou dále optimalizovány a upravovány pro získání přesných a jasných výsledků, které bude možno prokázat také statisticky.

ZÁVĚR

Diplomová práce byla zaměřena na studium růstu čtyř kmenů rodu *Lactobacillus* v médiích s různými zdroji uhlíku. Růst v médiích obsahujících glukózu nebo laktózu nebyl rozdílný. Z výsledků vyplývá, že buňky jsou schopné růstu na médiu s různým množstvím laktózy.

Dalším kritériem ovlivňujícím růst bakterií je pH. Stresové podmínky růstu byly dosaženy okyselením kultivačního média na hodnoty pH 3,0 - 6,5. Při pH v rozsahu 5,0 - 6,5 dosahovala absorbance u všech studovaných kmenů velmi podobné hodnoty, z čehož lze vyvodit, že lze v tomto rozsahu pH docílit dostatečného nárůstu bakterií rodu *Lactobacillus*. Růst, i když omezený, byl sledován dokonce při pH 3,5.

Kromě glukózy a laktózy byla také syrovátka zkoumána jako možný zdroj uhlíku. Využití syrovátky je velmi ekonomicky výhodné. Surovátka je odpadní produkt mlékárenských výrob. Růst bakterií byl studován nejen při různém množství syrovátky v médiu, ale také při různém pH v rozsahu 4,0 - 5,5. Při nejnižším pH byl růst bakterií nejmenší a naopak.

Při kultivaci výše uvedených kmenů je možno nahradit glukózu laktózou nebo přímo syrovátkou, která obsahuje ze sacharidů převážně laktózu, a snížit pH kultivačního média. Snížení pH umožní zamezení růstu nežádoucích mikroorganismů, protože většina bakterií není schopná růstu při kyselém pH, zatímco studované kmeny rodu *Lactobacillus* jsou schopny růstu i při pH 3,5.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VESELÁ, Mária. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2004. 99 s. ISBN 80-214-2567-9.
- [2] HOFVENDAHL, Karin, HAHN-HÄGERDAL, Bärbel. *Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources*. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2000, vol. 26, is. 2-4 [cit. 2009-01-20], s. 87-107. Dostupný z WWW: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6TG1-3YMW4HK-1/2/7df455f8d2fa8727bf0cafea20177ed5>>. ISSN 0141-0229.
- [3] NĚMEC, Miroslav. *Průvodce světem bakterií* [online]. [2006] [cit. 2009-03-11]. Dostupný z WWW: <<http://svp.muni.cz/ukazat.php?docId=589>>.
- [4] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Praha : Academia, 2002. 3. oprav. a dopl. vyd., 363 s. ISBN 80-200-1024-6.
- [5] Kolektiv autorů z Ústavu technologie mléka a tuků pod vedením Dr.ing. Jany Chumchalové. *Mlékařské kultury* [online]. 2000 [cit. 2009-02-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.vscht.cz/kch/galerie/mleko.htm>>.
- [6] *Encyklopedie organických látek* [online]. 2003 [cit. 2009-02-25]. Dostupný z WWW: <http://mujweb.atlas.cz/veda/che/enc_3.htm>.
- [7] *Background information The lactic acid bacteria* [online]. 2008 [cit. 2009-02-25]. Dostupný z WWW: <<http://www.lactospore.com/images/formula3.gif>>.
- [8] FRIČ, Přemysl. *Probiotika a prebiotika v praxi* [online]. 2007 [cit. 2009-03-05]. Dostupný z WWW: <<http://www.tribune.cz/archiv/mpp/186/4800>>.
- [9] *I. I. Mečnikov* [online]. Dostupný z WWW: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/b/bc/Illya_Mechnikov.JPG>
- [10] *Melasa* [online]. Dostupný z WWW: <<http://www.venusanka.cz/clanky/1747.jpg>>
- [11] *E. coli Nissle* [online]. Dostupný z WWW: <<http://portal.sochipe.cl/subidos/noticias/fotos/GP2144.jpg>>
- [12] ŠTERN, P. *Současné možnosti turbidimetrie a nefelometrie*. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2006, roč. 14, no. 3 [cit. 2009-03-05], s. 146-151. Dostupný z WWW: <<http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/kbm0603-146.pdf>>.
- [13] *Schéma turbidimetru* [online]. Dostupný z WWW: <http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/spektrab_soubory/image016.jpg>
- [14] *Seniors Dophilus – myslíme i na seniory* [online]. 2009 [cit. 2009-03-05]. Dostupný z WWW: <<http://www.dophilus.cz/senior.php>>.
- [15] *Nejdůležitější komerčně používané kmeny bakterií s probiotickým účinkem* [online]. 2005 [cit. 2009-03-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/mikrofloraGIT/funkcenipotrav/odk4.htm>>.
- [16] POSPÍŠILOVÁ, Marta. *Význam a použití bakteriocinů*. *Dtsch. Lebensmittel-Rdsch.* [online]. 2007, roč. 103, č. 11 [cit. 2009-03-15], s. 505-511. Dostupný z WWW: <<http://www.bezpecnostpotravin.cz/Index.aspx?ch=0&typ=1&val=68206&ids=3474>>.

- [17] *Montreal-Biotech-CO 8000 Biowave Personal Cell Density Meter* [online]. c1993-2009 [cit. 2009-03-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.montreal-biotech.com/Products/?link=CO+8000+Biowave+Personal+Cell+Density+Meter>>.
- [18] *Dynamika růstu a množení mikroorganismů* [online]. 2007 [cit. 2009-03-17]. Dostupný z WWW: <<http://mikrobiologie.webzdarma.cz/5.pdf>>.
- [19] *Fáze růstové křivky* [online]. Dostupný z WWW: <home.icpf.cas.cz/gavlasova/Mikrobiologie/06%5B1%5D.ppt>
- [20] ŠÍMA, Jan. *Molekulová absorpční spektrometrie v UV/VIS oblasti* [online], akt. 13. listopadu 2008 [cit. 2009-03-20]. Dostupný z WWW: <http://tomcat.prf.jcu.cz/sima/analyticka_chemie/spektrab.htm>.
- [21] KARTHA, Reena, et al. *Spectrophotometric Quantification of Nano- and Standard-Volume Samples*. American Biotechnology Laboratory [online]. 2008 [cit. 2009-03-22]. Dostupný z WWW: <<http://www.implen.de/pdfs/ABL-Kartha-Reprint.pdf>>.
- [22] *Způsob nanosení vzorku a průchod světelného paprsku LabelGuard Cell* [online]. Dostupný z WWW: <http://www.implen.de/img/Micro_big.jpg>
- [23] *Optická dráha v nanofotometru* [online]. Dostupný z WWW: <http://www.implen.de/img/nano_funct_E.jpg>
- [24] *Agarose gel electrophoresis* [online]. 2002 [cit. 2009-03-23]. Dostupný z WWW: <<http://askabiologist.asu.edu/expstuff/mamajis/agarose/agarose.html>>.
- [25] *Struktura agarózy* [online]. Dostupný z WWW: <http://www.siumed.edu/~bbartholomew/images/protein_methods/struct_repeating_unit_agaro.gif>
- [26] *Struktura agarózového gelu* [online]. Dostupný z WWW: <http://www.siumed.edu/~bbartholomew/images/protein_methods/gel_structure_of_agarose.gif>
- [27] *Struktura DNA se záporně nabitou fosfátovou skupinou* [online]. Dostupný z WWW: <<https://www.msu.edu/course/isb/202/tsao/images/nucleotide.jpg>>
- [28] KRULOVÁ, Blanka. *Molekulární typizace bakterií mléčného kvašení rodu Bifidobacterium*. Brno, 2007. 85 s. Fakulta přírodovědecká. Masarykova univerzita Brno. Vedoucí diplomové práce Doc. RNDr. Alena Španová, CSc. Dostupný z WWW: <http://is.muni.cz/th/67625/prif_m/Diplomovaprace.pdf>.
- [29] *Schéma metody PCR* [online]. Dostupný z WWW: <http://www.agris.cz/_images/32/110017/Image3.jpg>
- [30] CHUMCHALOVÁ, Jana. *Miniatlas mikroorganismů* [online]. 2006 [cit. 2009-05-09]. Dostupný z WWW: <<http://www.sci.muni.cz/mikrob/Miniatlas/mikr.htm>>.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

bp	páry bází
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
FAO	Organizace spojených národů pro výživu a zemědělství
GRAS	obecně považované za bezpečné
<i>Lbc.</i>	<i>Lactobacillus</i>
LDH	laktát dehydrogenáza
MRS	Man Rogosa Sharpe medium
NK	negativní kontrola
OD	optická hustota
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDH	pyruvát dehydrogenáza
PFL	pyruvát-formiát lyáza
PK	pozitivní kontrola
PLA	polymléčná kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsulfát sodný
TBE	tris-borát-etylendiamintetraoctová kyselina
TE	tris-etylendiamintetraoctová kyselina
Tris-HCl	tris-hydroxymethyl-aminomethan hydrochlorid

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Katabolické dráhy bakterií mléčného kvašení	13
Obr. 2 Stereoizomery kyseliny mléčné.....	15
Obr. 3 Taxonomické zařazení rodu <i>Lactobacillus</i>	15
Obr. 4 Melasa	16
Obr. 5 Ilja Iljič Mečnikov	20
Obr. 6 <i>E. coli</i> Nissle	22
Obr. 7 Schéma turbidimetrie	24
Obr. 8 Cell density meter biowave WPA CO 8000.....	25
Obr. 9 Fáze růstové křivky	27
Obr. 10 Křížový roztěr.....	27
Obr. 11 Způsob nanesení vzorku a průchod světelného paprsku LabelGuard Cell.....	28
Obr. 12 Optická dráha v nanofotometru	29
Obr. 14 Struktura DNA se záporně nabitou fosfátovou skupinou	29
Obr. 13 Struktura agarózy.....	29
Obr. 15 Struktura agarózového gelu	30
Obr. 16 Schéma metody PCR.....	31
Obr. 17 Plotny MRS agaru s narostlými bakteriálními koloniemi po kultivaci v MRS médiu s glukózou.....	49
Obr. 18 Plotny MRS agaru s narostlými bakteriálními koloniemi po kulivaci v MRS se syrovátkou	56
Obr. 19 Agarózová gelová elektroforéza purifikované DNA z bakteriálních kmenů <i>Lactobacillus</i>	66
Obr. 20 Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (250 bp) amplifikované purifikované DNA	67
Obr. 21 Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (250 bp) amplifikované DNA z hrubého lyzátu <i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211 (kultivace při pH 6,5)...	68
Obr. 22 Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (250 bp) amplifikované DNA z hrubého lyzátu (kultivace při pH 6,5; 6,0; 5,5; 5,0)	69
Obr. 23 Agarózová gelová elektroforéza PCR produktů (250 bp) amplifikované DNA z hrubého lyzátu bakteriálních kolonií	71

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 <i>Charakteristické vlastnosti Sekce 14 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology</i>	16
Tabulka 2 <i>Složení doporučených kultivačních médií [5]</i>	20
Tabulka 3 <i>Nejdůležitější komerčně používané kmeny bakterií s probiotickým účinkem [15]</i>	21
Tabulka 4 <i>Přehled mléčných bakterií, produkováných bakteriocinů a potlačovaných bakterií [16]</i>	23
Tabulka 5 <i>Specifikace přístroje Cell density meter biowave WPA CO 8000 [17]</i>	25
Tabulka 6 <i>Závislost absorbance A_{600} na čase během kultivace</i>	39
Tabulka 7 <i>Závislost absorbance A_{600} na čase během kultivace</i>	43
Tabulka 8 <i>Závislost absorbance A_{600} na čase během kultivace při stresových podmínkách v MRS médiu obsahujícím 2% syrovátky</i>	50
Tabulka 9 <i>Závislost absorbance A_{600} na čase během kultivace při stresových podmínkách v MRS médiu obsahujícím 4% syrovátky</i>	51
Tabulka 10 <i>Závislost absorbance A_{600} na čase během kultivace při stresových podmínkách v MRS médiu obsahujícím 6% syrovátky</i>	53
Tabulka 11 <i>Závislost absorbance A_{600} na čase během kultivace při stresových podmínkách v MRS médiu obsahujícím 8% syrovátky</i>	54
Tabulka 12 <i>Závislost absorbance A_{600} na čase během kultivace při stresových podmínkách</i> ...57	
Tabulka 13 <i>Závislost absorbance A_{600} na čase během kultivace při stresových podmínkách</i> ...58	
Tabulka 14 <i>Závislost absorbance A_{600} na čase během kultivace při stresových podmínkách</i> ...59	
Tabulka 15 <i>Závislost absorbance A_{600} na čase během kultivace při stresových podmínkách</i> ...60	
Tabulka 16 <i>Závislost absorbance A_{600} na čase během kultivace v MRS médiu s různým obsahem laktózy</i>	62
Tabulka 17 <i>Závislost absorbance A_{600} na čase během kultivace v MRS médiu s různým obsahem laktózy</i>	63
Tabulka 18 <i>Závislost absorbance A_{600} na čase během kultivace v MRS médiu s různým obsahem laktózy</i>	64
Tabulka 19 <i>Závislost absorbance na čase během kultivace v MRS médiu s různým obsahem laktózy</i>	65
Tabulka 20 <i>Detekce purifikované DNA</i>	66
Tabulka 21 <i>Výsledky spektrofotometrického stanovení koncentrace DNA</i>	67
Tabulka 22 <i>Detekce PCR produktů amplifikované purifikované DNA</i>	68
Tabulka 23 <i>Detekce PCR produktů amplifikované DNA z hrubého lyzátu <i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211 (kultivace při pH 6,5)</i>	69
Tabulka 24 <i>Detekce PCR produktů amplifikované DNA z hrubého lyzátu (kultivace při pH 6,5; 6,0; 5,5; 5,0)</i>	70
Tabulka 25 <i>Detekce PCR produktů amplifikované DNA z hrubého lyzátu bakteriálních kolonií</i>	71

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Růstová křivka kultivace <i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211 v MRS médiu s glukózou	40
Graf 2 Růstová křivka kultivace <i>Lbc. paracasei</i> CCDM 212 v MRS médiu s glukózou	40
Graf 3 Růstová křivka kultivace <i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 213 v MRS médiu s glukózou	41
Graf 4 Růstová křivka kultivace <i>Lbc. salivarius</i> CCDM 216 v MRS médiu s glukózou	41
Graf 5 Porovnání růstových křivek během kultivace v MRS médiu s glukózou	42
Graf 6 Růstová křivka kultivace <i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211 v MRS médiu s laktózou	44
Graf 7 Růstová křivka kultivace <i>Lbc. paracasei</i> CCDM 212 v MRS médiu s laktózou	44
Graf 8 Růstová křivka kultivace <i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 213 v MRS médiu s laktózou	45
Graf 9 Růstová křivka kultivace <i>Lbc. salivarius</i> CCDM 216 v MRS médiu s laktózou	45
Graf 10 Porovnání růstových křivek během kultivace v MRS médiu s laktózou	46
Graf 11 Porovnání růstových křivek kultivace <i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211 v MRS médiu s glukózou a v MRS médiu s laktózou.....	47
Graf 12 Porovnání růstových křivek kultivace <i>Lbc. paracasei</i> CCDM 212 v MRS médiu s glukózou a v MRS médiu s laktózou.....	47
Graf 13 Porovnání růstových křivek kultivace <i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 213 v MRS médiu s glukózou a v MRS médiu s laktózou.....	48
Graf 14 Porovnání růstových křivek kultivace <i>Lbc. salivarius</i> CCDM 216 v MRS médiu s glukózou a v MRS médiu s laktózou.....	48
Graf 15 Růst <i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211 při stresových podmínkách v MRS médiu obsahujícím 2% syrovátky - blank: kultivační médium.....	50
Graf 16 Růst <i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211 při stresových podmínkách v MRS médiu obsahujícím 2% syrovátky - blank: MRS médium.....	51
Graf 17 Růst <i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211 při stresových podmínkách v MRS médiu obsahujícím 4% syrovátky - blank: kultivační médium.....	52
Graf 18 Růst <i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211 při stresových podmínkách v MRS médiu obsahujícím 4% syrovátky - blank: MRS médium.....	52
Graf 19 Růst <i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211 při stresových podmínkách v MRS médiu obsahujícím 6% syrovátky - blank: kultivační médium.....	53
Graf 20 Růst <i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211 při stresových podmínkách v MRS médiu obsahujícím 6% syrovátky - blank: MRS médium.....	54
Graf 21 Růst <i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211 při stresových podmínkách v MRS médiu obsahujícím 8% syrovátky - blank: kultivační médium.....	55
Graf 22 Růst <i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211 při stresových podmínkách v MRS médiu obsahujícím 8% syrovátky - blank: MRS médium.....	55
Graf 23 Růst <i>Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211 při stresových podmínkách	57

Graf 24 <i>Růst Lbc. paracasei</i> CCDM 212 při stresových podmínkách.....	58
Graf 25 <i>Růst Lbc. paracasei</i> CCDM 212 při stresových podmínkách.....	59
Graf 26 <i>Růst Lbc. salivarius</i> CCDM 216 při stresových podmínkách.....	60
Graf 27 Porovnání růstu během kultivace v MRS médiu s laktózou při stresových podmínkách po 7 hodinách.....	61
Graf 28 Porovnání růstu během kultivace v MRS médiu s laktózou při stresových podmínkách po 28 hodinách.....	61
Graf 29 <i>Růst Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 211 v MRS médiu s různým obsahem laktózy.....	62
Graf 30 <i>Růst Lbc. paracasei</i> CCDM 212 v MRS médiu s různým obsahem laktózy.....	63
Graf 31 <i>Růst Lbc. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> CCDM 213 v MRS médiu s různým obsahem laktózy.....	64
Graf 32 <i>Růst Lbc. salivarius</i> CCDM 216 v MRS médiu s různým obsahem laktózy.....	65