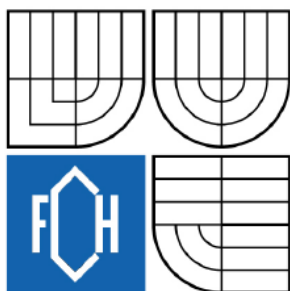


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

OVĚŘENÍ KVALITY KOMERČNÍCH PŮD NA MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR POTRAVIN

VERIFICATION OF THE COMMERCIAL CULTURE MEDIUM QUALITY FOR FOOD MICROBIAL
ANALYSIS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

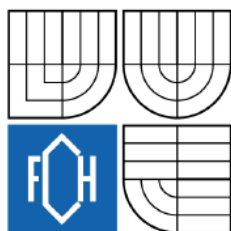
MIROSLAV PETEREK

VEDOUcí PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. JIŘINA OMELKOVÁ, CSc.

BRNO 2010



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0459/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Miroslav Peterek	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí práce	doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Ověření kvality komerčních půd na mikrobiologický rozbor potravin

Zadání bakalářské práce:

- 1) Vypracujte literární přehled k dané problematice
- 2) Popište použité metody hodnocení
- 3) Zpracujte naměřené výsledky z experimentů
- 4) Zhodnoťte získané výsledky formou diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 28.5.2010

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

Miroslav Peterek
Student(ka)

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato práce popisuje ověření kvality komerčních půd používaných pro mikrobiologický rozbor potravin. Zabývá se morfologickými, cytologickými a fyziologickými charakteristikami *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*.

V experimentální části jsou popsány metody použitelné pro klasifikaci tohoto mikroorganismu ve výrobní praxi.

ABSTRACT

This thesis describes verification of the commercial culture medium quality for food microbial analysis. This thesis deals with morphological, cytological and physiological properties of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*.

In experimental part of this thesis are described methods suitable for classification of this microorganism in production use.

KLÍČOVÁ SLOVA

Leuconostoc mesenteroides subsp. *dextranicum*, výroba nealkoholických nápojů, APT Agar, Orange – serum Agar, Plate Count Agar, Dextran, glukosa

KEY WORDS

Leuconostoc mesenteroides subsp. *dextranicum*, production of non – alcoholic drinks, APT Agar, Orange – serum Agar, Plate Count Agar, dextran, glucose

PETEREK, M. *Ověření kvality komerčních půd na mikrobiologický rozbor potravin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 58 s. Vedoucí bakalářské práce doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce, děkana FCH VUT a zástupce firmy [REDACTED]

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych chtěl poděkovat paní doc. Ing. Jiřině Omelkové, CSc. za čas, který mi věnovala, a cenné rady, které byly velmi užitečné při zpracování mé bakalářské práce.

Současně bych chtěl také poděkovat panu RNDr. Petru Pravdovi, který mi umožnil, zpracovat experimentální část bakalářské práce v laboratoři [REDACTED] v Krnově. Chtěl bych také poděkovat celému kolektivu laboratoře za pomoc a ochotu.

OBSAH

Úvod	1
1 Teoretická část	2
1.1 Seznámení s prostředím realizace této bakalářské práce	2
1.2 Výrobní proces firmy [REDACTED]	2
1.2.1 Všeobecná charakterizace výrobního procesu [REDACTED]	2
1.2.2 Suroviny pro výrobu nealkoholických nápojů	3
1.2.2.1 Voda	3
1.2.2.2 Cukry a umělá sladidla	4
1.2.2.3 Aromata, tresti, kyseliny a hořké látky	4
1.2.2.4 Konzervovadla, oxid uhličitý	4
1.2.2.5 Koncentráty a sirupy	4
1.3 Kontrolní proces firmy [REDACTED]	4
1.3.1 Všeobecná charakterizace kontrolního procesu [REDACTED]	4
1.3.2 Zdroje kontaminace ve výrobním procesu	5
1.3.2.1 Voda	5
1.3.2.2 Vzduch	5
1.3.2.3 Sirupy	5
1.3.2.4 Sukusy	5
1.3.2.5 Cukr	5
1.4 Chemické složení buňky bakterií	5
1.5 Morfologie bakterií	6
1.6 Struktura bakteriální buňky a funkce jednotlivých částí	7
1.6.1 Buněčná stěna (základní struktura bakteriálních buněk)	7
1.6.2 Cytoplazmatická membrána	8
1.6.3 Orgány pohybu	9
1.6.4 Slizovitý obal	9
1.7 Klasifikace a identifikace	9

1.7.1	Klasifikace	10
1.7.1.1	Numerická taxonomie.....	10
1.7.1.2	Studium nukleových kyselin.....	10
1.7.1.3	Genotypové metody	10
1.7.1.4	Molekulární typizace a detekce	11
1.7.1.5	Sérologie a chemotaxonomie.....	11
1.7.2	Identifikace	11
1.8	Zařazení mikroorganismu použitého v praktické části do systému podle Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1 – 4 (1984 – 89).....	12
1.8.1	Klasifikace čeledi Leuconostocaceae	12
1.8.2	Klasifikace rodu Leuconostoc	12
1.8.2.1	Výskyt.....	13
1.9	Základy metabolismu mikroorganismů	13
1.9.1	Všeobecná charakteristika	13
1.9.2	Katabolické procesy chemoorganotrofních mikroorganismů a jejich význam	14
1.9.3	Bakterie podle nároku metabolických drah na kyslík.....	14
1.9.4	Pentosový cyklus	14
1.9.4.1	Mechanismus pentosového cyklu	15
1.9.4.2	Celková bilance pentosového cyklu	16
1.9.5	Mléčná fermentace.....	16
1.9.5.1	Mechanismus mléčné fermentace	17
1.9.6	Anabolické procesy.....	17
1.9.6.1	Syntéza extracelulárních produktů.....	17
1.10	Dextran.....	18
1.10.1	Obecná charakterizace	18
1.10.2	Historie a výskyt	18
1.10.3	Struktura dextranu.....	19
1.10.4	Detekce dextranu	20
1.10.5	Fyzikálně – chemické vlastnosti dextranu	20
1.10.6	Fyziologická funkce dextranu.....	20
1.10.7	Biosyntéza dextranu.....	21

1.10.7.1	Charakterizace enzymů.....	21
1.10.7.2	Schéma syntézy	21
1.10.8	Biodegradace dextranu	23
1.10.9	Využití dextranu	24
2	Experimentální část	25
2.1	Seznam použitých přístrojů, pomůcek a chemikálií	25
2.1.1	Použité přístroje a pomůcky	25
2.1.2	Použité chemikálie a živná média.....	25
2.1.3	Použitý materiál na kultivaci	25
2.2	Použitý mikroorganismus	26
2.3	Použitá kultivační média.....	26
2.3.1	Složení a charakterizace Lactobacillus medium	26
2.3.2	Složení a obecná charakteristika APT Agar	26
2.3.3	Složení a obecná charakteristika Orange – serum Agar	27
2.3.4	Složení a obecná charakteristika Plate Count Agar	27
2.4	Oživování kultur ze želatinových disků.....	28
2.5	Pracovní postupy.....	28
2.5.1	Pracovní postup při oživování kultury.....	28
2.5.2	Příprava APT Agar	28
2.5.3	Příprava Plate Count Agar	29
2.5.4	Kultivace čisté kultury	29
2.5.5	Ověření kvality vybraných kultivačních medií na reálných vzorcích (vyšší koncentrace glukosy).....	30
2.5.6	Ověření kvality vybraných kultivačních medií na reálných vzorcích (nižší koncentrace glukosy)	30
2.5.7	Zjištění možného zdroje kontaminace leukonostokem.....	30
3	Cíl práce	31
4	Výsledky a diskuze	31
4.1	Kultivace čisté kultury na vybraných živných médiích.....	31
4.2	Ověření kvality vybraných kultivačních medií na reálných vzorcích (vyšší koncentrace glukosy).....	33
4.3	Ověření kvality vybraných kultivačních medií na reálných vzorcích	

(nižší koncentrace glukosy)	36
4.4 Zjištění možného zdroje kontaminace leukonostokem.....	39
5 Závěr	42
Seznam použité literatury	43
Seznam použitých obrázků	46
Seznam symbolů, veličin a zkratk	47
Seznam příloh	48

ÚVOD

V potravinářských výroбах se může vyskytovat velké množství mikrobiologických kontaminantů, proto bývá součástí veškerých výrob také kontrolní mikrobiologická laboratoř, která se zabývá kontrolou kvality výrobků, produkováných firmou. V mikrobiologické laboratoři se využívá velkého množství postupů a pro tyto je zapotřebí znát některé základní charakteristiky sledovaných mikroorganismů. Základní znalostí pro identifikaci mikroorganismů je znalost jejich morfologických, cytologických a fyziologických znaků.

Každý z velkého množství potenciálně přítomných mikroorganismů má jiné požadavky na kultivační médium, které vyplývají z již zmíněných charakteristik mikroorganismu.

Pro experimentální část byla zvolena fakultativně anaerobní, grampozitivní bakterie *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*. Tento mikroorganismus byl zvolen na základě konzultace s laboratoří firmy Kofola a.s., ve které byla prováděna experimentální část.

Jak již bylo řečeno, znalost morfologických, cytologických a fyziologických znaků, je nezbytná pro spolehlivou práci provozní mikrobiologické laboratoře a umožňuje zvolit vhodnou kultivační techniku a médium, na kterém kultivace probíhá.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Seznámení s prostředím realizace této bakalářské práce

Prvotní setkání s prostředím firmy [redacted] bylo realizováno na základě volby předmětů v zimním semestru 2. ročníku bakalářského studia. Předmět se jmenoval odborná praxe. Jak vyplývá z názvu, seznámil jsem se díky tomuto předmětu, s výrobním prostředím této firmy v Krnově. Jedná se o jeden z mnoha výrobních provozů, které náleží do výrobní sítě firmy.

V rámci předmětu odborná praxe jsem absolvoval praxi v laboratoři, která se zabývala provozní kontrolou výroby v místě závodu. Při práci na bakalářské práci jsem se seznámil také s mikrobiologickou laboratoří, ve které byla realizována celá experimentální část bakalářské práce.

1.2 Výrobní proces firmy [redacted]

1.2.1 Všeobecná charakterizace výrobního procesu [redacted]

Podle platné legislativy jsou nealkoholické nápoje charakterizovány, jako nápoje s obsahem alkoholu nižším, než 0,5 obj. %, které jsou vyrobeny ze stanovených surovin. [1]

Na počátku celého výrobního procesu stojí suroviny. Nejdůležitější surovinou je glukosa, která je dodávána od dodavatele ve formě glukosového sirupu. Další ingredience jednotlivých výrobků jsou závislé na druhu výrobku. Obecně se dá říci, že výrobní proces začíná v sirupárně, kde dochází k namíchání sirupu podle tajných receptur. Sirupy jsou míchány v tancích (Obrázek 1), které jsou následně napojeny na výrobní linky, které zajišťují plnění hotového výrobku do spotřebitelských obalů (Obrázek 2).



Obrázek 1 Sirupárna [1]



Obrázek 2 Plnění linkou [1]

Dalším krokem ve výrobě je uzavírání obalů a popřípadě lepení etiket na lahve. Výroba každého produktu je zakončena tzv. sanitací. Kdy dochází k proplachu linky a její sterilizaci. Na obrázku 3 jsou ukázány zásobníky na sanitační roztoky.



Obrázek 3 Zásobníky se sanitačními roztoky [1]

1.2.2 Suroviny pro výrobu nealkoholických nápojů

1.2.2.1 Voda

Jedná se o nejvýznamnější surovinu při výrobě nealkoholických nápojů. Pro potřeby výroby je používána voda minerální, nebo voda z vodovodní sítě. Technologické vlastnosti vody jsou zpravidla před zavedením do výroby upravovány. [1]

1.2.2.2 Cukry a umělá sladidla

Významnou složkou pro výrobu nealkoholických nápojů jsou vedle vody také cukry a umělá sladidla. Jsou používány nejčastěji ve formě sacharosy, jak tekuté, tak i v pevném stavu, glukosy, popřípadě různé směsi sacharosy, glukosy, fruktosy a maltosy. Pro přípravu nealkoholických nápojů se také používají alkoholické cukry (sorbitol, manitou, xylitol), které jsou používány k výrobě nízkoenergetických nápojů a pro vylepšení chuti nápojů. [1]

1.2.2.3 Aromata, tresti, kyseliny a hořké látky

Aroma je definováno, jako senzorický vjem, zaznamenaný chuťovými pohárky a čichovými orgány. Látky aromatické proto dráždí senzorické orgány (výtažky, destiláty, silice z přírodních rostlinných surovin). Aromata jsou používány ve formě trestí (roztok aromatické látky v etanolu), nebo v podobě aromatických past (např. homogenizované celé plody s dalšími složkami). [1]

Z kyselin bývá nejčastěji používána kyselina citronová, jablečná, fosforečná. K výrobě nápojů jsou používána také barviva a hořké látky (chinin a přirozené látky obsažené v extraktech rostlin. [1]

1.2.2.4 Konzervovadla, oxid uhličitý

Nejčastěji používanými konzervačními látkami jsou kyselina sorbová, askorbová, benzoová. Konzervovadla jsou používány pro zajištění stability nápojů vlivem konzervačních faktorů (snížení pH). [1]

V případě sycených nápojů je jako konzervační prostředek využíván právě oxid uhličitý. [1]

1.2.2.5 Koncentráty a sirupy

Sirupy jsou používány k výrobě ochucených nápojů, mohou být nakupovány jako suroviny, nebo vyráběny různými způsoby. Ovocné šťávy a koncentráty se vyrábějí buď jako tzv. přímé šťávy (vylisování z ovoce), nebo častěji tzv. rekonstitucí z koncentrátu (ředění vodou). Koncentráty musí obsahovat dostatečné množství kyselin, aby byly udržitelné, musí být také správně skladovány, aby nedocházelo k enzymovému hnědnutí. [1]

1.3 Kontrolní proces firmy

1.3.1 Všeobecná charakterizace kontrolního procesu

Kontrolní proces je nedílnou součástí každé potravinářské výroby. Jedná se o kontrolu kvality výrobku. Kontrolují se různé vlastnosti (fyzikální i chemické). Jsou odebírány vzorky, které jsou následně analyzovány a výsledky těchto analýz jsou evidovány a uschovány pro případ nutnosti zpětné kontroly.

Základem kontrolního procesu je refraktometr, který slouží k měření indexu lomu. Další kontrolou, která se standardně provádí, je kontrola pH. V rámci kontroly kvality jsou kontrolovány ještě mnohé další parametry. V procesu kontroly hraje také velkou roli mikrobiologický rozbor jednotlivých odebraných vzorků.

1.3.2 Zdroje kontaminace ve výrobním procesu

1.3.2.1 Voda

Je nutné kontrolovat množství zárodků ve vodě, protože by mohly mít nežádoucí vliv na konečný výrobek. Voda v zařízeních pro výrobu nesmí být kontaminována, proto se tato zařízení pravidelně desinfikují. Pro stanovení kontaminantů ve vodě jsou používány nejrůznější postupy. Základem je však správná technika při odběru vzorků. [2]

1.3.2.2 Vzduch

Vzduch, který obklopuje celou výrobu, obsahuje různé mikroorganismy, bakterie, kvasinky a spory. Tyto kontaminanty se dostávají do vzduchu společně s prachem, který je v něm přítomen. Složení vzduchu je závislé na venkovních poměrech. Vzduch společně s vodou bývají nejčastějšími zdroji kontaminace při výrobě nealkoholických nápojů. Existují různé metody na kontrolu složení ovzduší (z hlediska mikroorganismů). [2]

1.3.2.3 Sirupy

Sirupy by neměly obsahovat žádné mikroorganismy. Aby bylo dosaženo absolutní čistoty sirupu, je nutné věnovat velkou pozornost základním surovinám, ze kterých jsou sirupy připravovány. [2]

1.3.2.4 Sukusy

Jedná se o neslazené a nekonzervované ovocné šťávy, které se používají při výrobě sirupů. Ovocné koncentráty často potlačují samovolně růst mikroorganismů vlivem nízkého pH a malým obsahem vody. Mohou se v nich vyskytnout plísně, nebo kvasinky. [2]

1.3.2.5 Cukr

Cukr, který se používá pro výrobu sirupů, nesmí obsahovat žádné mikroorganismy, které by mohly kontaminovat výrobky. Nejčastějším mikroorganismem, který kontaminuje cukr, je *Leuconostoc mesenteroides*. Cukr je ale díky své koncentraci většinou nevhodným prostředím pro růst mikroorganismů. Vyjimku tvoří ty, které snášejí větší koncentrace cukru v prostředí. [2]

1.4 Chemické složení buňky bakterií

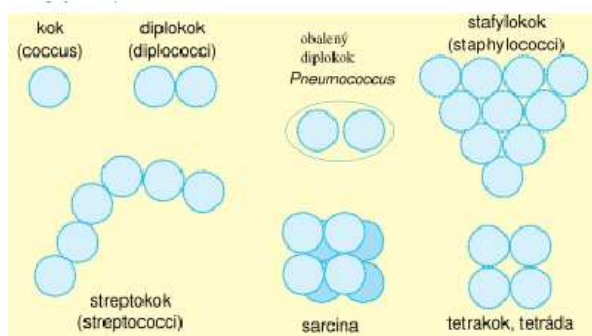
Veškerá živá hmota na zemi se skládá z určitých prvků. Tyto prvky se třídí do několika skupin podle toho, jak často se vyskytují ve složení živých organismů. Buňky jsou základem veškerého života, proto je důležité znát jejich složení. Ve své podstatě je základním stavebním kamenem buněk voda, která tvoří více než 70 % jejího složení. Obsah ostatních sloučenin se vyjadřuje v procentech sušiny buněčné hmoty, kterou lze získat odstraněním veškeré vody z buňky. Hlavním podílem sušiny jsou organické sloučeniny. [3]

Z organických sloučenin jsou nejvýznamnější bílkoviny, jejichž obsah je závislý na druhu buněk, ale ve vší obecnosti se dá říci, že obsah bílkovin se pohybuje od 40 do 80%. Dalším významným stavebním kamenem buněk jsou nukleové kyseliny (DNA a RNA). Posledním druhem sloučenin, které se vyskytují v sušině, ve větším množství jsou sacharidy a lipidy. [3]

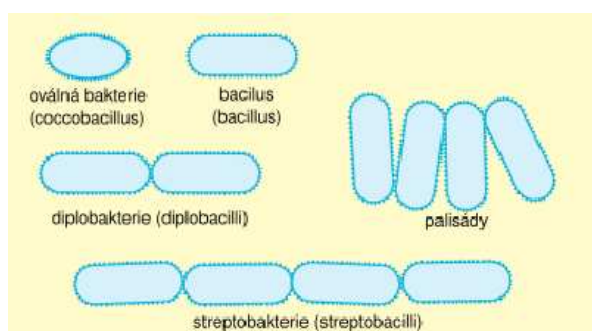
Ostatní sloučeniny jsou přítomny v mnohem menších koncentracích. Jedná se o meziproducty metabolismu, jejich deriváty, barviva. Buňky obsahují kromě vody i mnoho dalších anorganických látek. Druh a množství anorganických látek se dá zjistit zpopelněním suché hmoty buněk. Tímto způsobem vzniká tzv. popel, který představuje 5 až 10 % sušiny buněk. Jeho součástí jsou hlavně fosfáty, sírany a z iontů kovů jsou nejvíce zastoupeny draslík a hořčík. [3]

1.5 Morfologie bakterií

Veškeré bakterie jsou po fyziologické stránce velmi rozmanité, po morfologické stránce nejsou mezi jednotlivými rody velké rozdíly. Tvary buněk bakterií jsou nejčastěji tyčinkovité, kulovité, nebo vláknité. Ukázky jednotlivých tvarů jsou na obrázcích 4 a 5. [3]



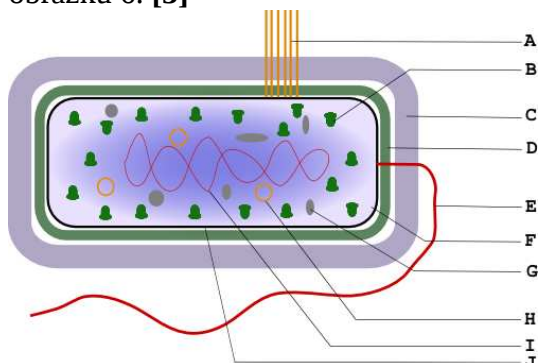
Obrázek 4 Koky [2]



Obrázek 5 Tyčinkovité bakterie [2]

1.6 Struktura bakteriální buňky a funkce jednotlivých částí

Schématicky znázorněná struktura prokaryotické bakteriální buňky je naznačena na obrázku 6. [3]



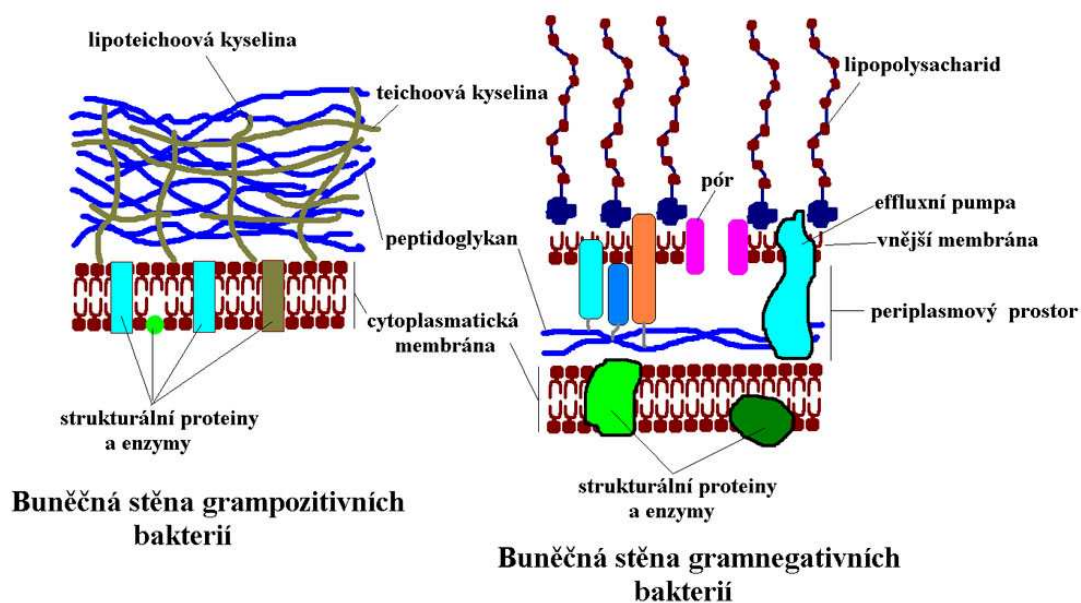
Obrázek 6 Bakteriální buňka [3]

- A – fimbrie
- B – ribozom
- C – slizová vrstva
- D – buněčná stěna
- E – bičík
- F – cytoplazma
- G – vakuola
- H – plazmid
- I – nukleoid
- J – cytoplazmatická membrána

1.6.1 Buněčná stěna (základní struktura bakteriálních buněk)

Každá buňka je od prostředí oddělena velice silnou, většinou rigidní strukturou, která se nazývá buněčná stěna. Buněčná stěna dává mikrobiální buňce tvar a chrání ji před vnějšími vlivy okolí. Pevnost a neohebnost buněčné stěny bakterií je dána přítomností vrstvy peptidoglykanů. Tloušťka peptidoglykanové vrstvy bývá charakteristickým znakem různých rodů bakterií. Nejzákladnějším dělením bakterií je jejich dělení, podle vlastností buněčné stěny, na gramnegativní a grampozitivní bakterie. Rozdíly ve strukturách jednotlivých druhů buněčné stěny jsou uvedeny na obrázku 7. [3]

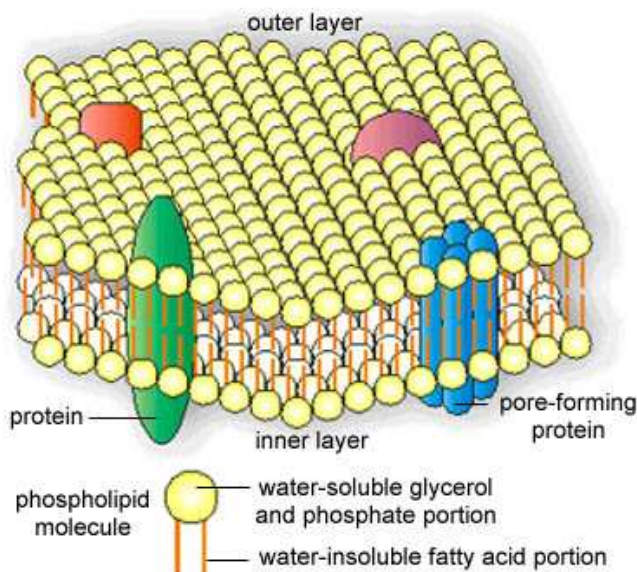
Jako grampozitivní bakterie, se označují takové rody bakterií, které po usmrcení, obarvení Gramovým roztokem a moření jodem, neztrácejí toto barvivo působením rozpouštědel (aceton, etanol). Gramnegativní bakterie působením rozpouštědel barvu ztrácí. [3]



Obrázek 7 Srovnání struktury buněčné stěny grampozitivních a gramnegativních bakterií [4]

1.6.2 Cytoplazmatická membrána

Jedná se o velice jemnou membránu, která je viditelná pouze pod elektronovým mikroskopem. Je složena z lipidů a lipoproteinů. Cytoplazmatická membrána tvoří osmotické rozhraní buňky a vnějšího prostředí. Z cytoplazmatické membrány vybíhají do cytoplazmy bakteriálních buněk vychlípeniny, které jsou rovněž charakteristickým ukazatelem na rod bakterií. Cytoplazmatická membrána je sídlem dýchacích enzymů systému oxidační fosforylace, enzymů syntézy a hydrolýzy fosfolipidů a konečné fáze syntézy složek buněčné stěny a pouzdrových obalů buňky. Zjednodušené schéma cytoplazmatické membrány je uvedeno na obrázku 8. [3]

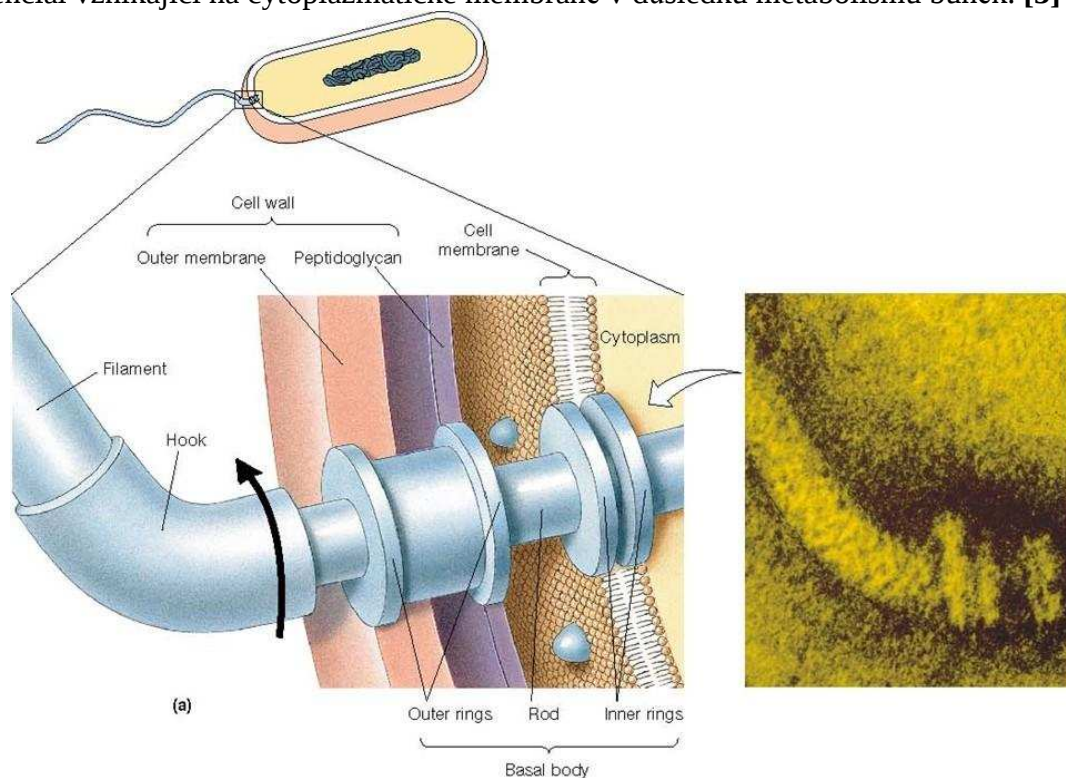


Obrázek 8 Cytoplazmatická membrána [5]

1.6.3 Orgány pohybu

Jsou přítomny pouze u některých druhů bakterií. Orgánem pohybu bakterií jsou bičíky. Jedná se o dlouhá vlákna, která jsou bílkovinné povahy. Bílkovina, která bičíky tvoří, se nazývá flagelin. Na dolní části má bičík háček a dvojici kotoučků, jimiž jsou zakotveny do cytoplazmatické membrány. Způsob uchycení bičíku je uveden na obrázku 9. [3]

Bičíky nejsou pro život buňky nezbytné, umožňují však aktivní pohyb buněk ke zdroji živin a kyslíku. Hnací silou, která pohání rotační pohyb bičíku, je chemický potenciál vznikající na cytoplazmatické membráně v důsledku metabolismu buněk. [3]



Obrázek 9 Uchycení bičíku v obalech buňky [6]

1.6.4 Slizovitý obal

Některé bakterie tvoří kolem svých buněk slizovitý obal polysacharidů, který je nejčastěji tvořen dextrany nebo polypeptidy. Tento obal poskytuje buňkám ochranu proti vysychání, nebo dalším nepříznivým podmínkám. Tvorba slizu je ovládána specifickými geny. Jsou známy případy, kdy bakterie tvoří ze slizu ostře ohraničené vrstvy zvané kapsule, nebo produkují ve velkém množství tzv. volný sliz, který difúzně prochází do růstového prostředí a zředí jej. [3]

1.7 Klasifikace a identifikace

Taxonomie je obecně brána jako synonymum systematiky, nebo biosystematiky. Z praktických důvodů by měla být taxonomie relativně stabilní. V současnosti dochází k neustálému rozvoji poznání díky používání nových klasifikačních kritérií. [4]

1.7.1 Klasifikace

Klasifikace u prokaryot spočívá ve stanovení vlastností a následné zařazování mikroorganismů do skupin na základě analýzy výsledků. Klasifikací se rozumí zařazování mikroorganismů do taxonomických skupin na základě podobnosti a příbuznosti. [4]

Klasifikace obecně vyžaduje znalost morfologických, biochemických, fyziologických, chemických, molekulárně-biologických a genetických charakteristik. Tyto charakteristiky jsou získávány experimentálně i pozorováním. Klasifikace je založena na komplexu dostupných údajů, kde kromě klasických morfologických metod může být také zařazena numerická taxonomie, studium nukleových kyselin a genotypové metody. Další použitelné metody jsou sérologie a chemotaxonomie. [4]

1.7.1.1 Numerická taxonomie

Vyvíjí se s rozvojem počítačů od 60. let. Jejím cílem bylo navržení stabilní sestavy metodik pro klasifikaci organismů. Velké množství údajů v tabulkách, zahrnujících vlastnosti mikroorganismů, nebylo možno analyzovat pouhým pozorováním. Numerická taxonomie umožnila rozlišení jednotlivých kmenů prokaryot do homogenních skupin na základě úspěšné integrace údajů z rozdílných zdrojů. [5]

Postup pro tuto metodu je následující. Nejprve dochází k shromažďování údajů, kdy pro kmeny, které by měly být klasifikovány, zvolíme a následně provedeme za standardních podmínek zjištění požadovaných vlastností. Na základě zvoleného souboru charakteristik jsou dané údaje zakódovány a je vypočítána podobnost mezi kmeny, která je dále analyzována za účelem vytvoření taxonomických struktur. Kultury mikroorganismů jsou řazeny do fenotypových skupin. [5]

1.7.1.2 Studium nukleových kyselin

Studium nukleových kyselin bylo do problematiky aplikováno před více než 40 lety. U prokaryot se jedná stále o jednu z hlavních technik klasifikace. Příkladem těchto metod je např. stanovení složení DNA bází, RNA-DNA hybridizace, katalogizace rRNA nukleotidů, nebo denaturace a denaturace DNA. Požití genetických charakteristik v klasifikaci prokaryot je spojeno s poznáním struktury molekuly DNA a s rozvojem fyzikálně chemických analýz genetického materiálu. [6]

1.7.1.3 Genotypové metody

Genotypové informace jsou odvozeny od nukleových kyselin (DNA a RNA), které jsou přítomny v buňce. Fenotypové informace čerpají svou podstatu z proteinů a jejich funkcí. Genotypovými metodami se rozumí metody, které jsou přímo zaměřeny na studium polymorfizmu DNA, nebo RNA. Mají obrovský vliv na bakteriální klasifikaci, protože ukazují přirozené příbuzenské vztahy kódované DNA. Tyto metody poskytují velmi přesné a objektivní výsledky. Metody jsou zaměřené buď na celkovou analýzu DNA, nebo jen na její určitý úsek. Genotypové metody rovněž umožňují rozdělení druhů do množství odlišných typů, jsou rovněž univerzálně aplikovatelné a mají vysokou rozlišovací schopnost. [7]

Často využívaná metoda srovnávající sestavy sekvencí oligonukleotidů, která je založena na analýze krátkých sekvencí bází vyskytujících se u jedné skupiny organismů, je katalogizace 16 rRNA. [7]

1.7.1.4 Molekulární typizace a detekce

Rozvoj molekulárně-biologických technik umožnil vznik metod molekulární typizace, které jsou založeny na fyzikálních vlastnostech molekul produkovaných prokaryoty. Tyto metody se často provádí společně s konvenční typizační metodou. [5]

Cílem diagnostické molekulární mikrobiologie je pomocí sond nukleových kyselin detekovat a charakterizovat mikroorganismus. SONDY nukleových kyselin jsou segmenty DNA, nebo RNA, které byly označeny (enzymem, antigenním substrátem, chemiluminiscenční látkou, radioizotopem) a mohou se vázat s vysokou specifitou na komplementární sekvence nukleové kyseliny. Jsou do molekuly sondy začleněny enzymatickou cestou a po hybridizaci jsou detekovány. Celý proces hybridizace je založen na schopnosti denaturace molekul DNA a jejich opětovné denaturace. [5]

1.7.1.5 Sérologie a chemotaxonomie

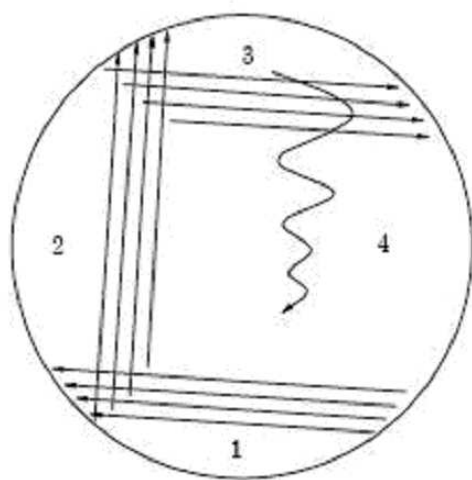
Jedná se o skupinu doplňujících klasifikačních metod. Využívají vlastností chemického složení stěny bakteriálních buněk chovat se jako antigen. Chemotaxonomie reprezentuje klasifikační metody založené na stanovitelných chemických znacích využitelných při taxonomii prokaryot. Využívá především metod analytické chemie (chromatografie, hmotnostní spektrometrie). Orientuje se na složení buněčné stěny, nebo jen na složení její části, třídí mikroorganismy také podle složení jednotlivých struktur. Ke klasifikaci mikroorganismů používá třídění podle chemických znaků v pevné fázi (biomasa buněk), nebo v kapalně fázi (metabolity, supernatant). [5]

1.7.2 Identifikace

Jedná se o proces porovnávání neznámého se známým. Identifikací se rozumí praktická aplikace klasifikace a nomenklatury. Identifikace mikroorganismů původně spočívala na biochemických. Tyto testy postupy byly obecně velmi pracné a výsledky byly dostupné až za několik dní. Identifikační schémata nejsou totožná s klasifikačními schématy. Identifikační schéma pro skupinu lze sestavit až poté, kdy byla skupina klasifikována. Charakteristiky pro identifikační schéma by měly být snadno stanovitelné a měly by obsahovat pouze několik rozlišujících charakteristik. [4]

Bakteriální klasifikace je v současnosti prováděna na základě miniaturizovaných souprav (mikrotestů). Tyto systémy umožňují odečítání výsledků již za 2 až 4 hodiny. Kromě rychlosti má tento typ klasifikace také další výhody, mezi které patří spolehlivost, standardnost, nízká cena a cílená orientace. [4]

Základní technikou pro provádění identifikace je práce s čistou kulturou. Čistou kulturu můžeme získat např. technikou křížového roztěru za pomoci inokulační kličky. (Obrázek 19) Pro konečnou izolaci jsou upřednostňována neselektivní média. [4]



Obrázek 10 Technika křížového roztěru [7]

1.8 Zařazení mikroorganismu použitého v praktické části do systému podle Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1 – 4 (1984 – 89)

Sekce:	12
Název:	Grampozitivní koky
Řád:	Lactobacillales
Čeleď:	Leuconostocaceae
Rod:	Leuconostoc
Druh:	Mesenteroides
Subspecies:	Dextranicum

[3]

1.8.1 Klasifikace čeledi Leuconostocaceae

Jedná se o čeleď grampozitivních bakterií (koky i tyčinky) rodu *Lactobacillales* zahrnující tři rody klasických bakterií mléčného kvašení. Tato čeleď byla vyčleněna na základě sekvencování genu pro 16 rRNA ze skupiny grampozitivních bakterií s nízkým obsahem G + C. [8]

1.8.2 Klasifikace rodu Leuconostoc

Bakterie rodu *Leuconostoc* mají podobně jako mléčná skupina streptokoků sérologickou skupinu N. Buňky jsou okrouhlé až oválné. Jsou uspořádány v párech a v řetězcích. Jsou grampozitivní a nepohyblivé, netvoří spory. Jsou fakultativně anaerobní, nejsou proteolytické. Na vhodných polotuhých médiích tvoří zpravidla drobné, okrouhlé, hladké, bílé kolonie. V bujónovém médiu způsobují pravidelný zákal a druhy, které tvoří dlouhé řetězky, sedimentují na dně. [9]

Optimální teplota růstu je 20 – 30 °C, v živných půdách vyžadují přítomnost růstových faktorů, aminokyselin a vitamínů skupiny B. [9]

Růst je podmíněný přítomností fermentovatelného sacharidu. Nejčastějším fermentovatelným sacharidem je glukóza, kterou fermentují všechny druhy za pomoci kombinace hexosomonofosfátových fosfoketolázových metabolických drah. Výsledkem metabolismu je tvorba kyseliny mléčné, oxidu uhličitého a etanolu. Některé druhy mají i oxidativní mechanismus, proto produkují místo etanolu kyselinu octovou. [9]

1.8.2.1 Výskyt

Rod *Leuconostoc* se nejčastěji volně vyskytuje jako součást mikroorganismů přítomných v mléce. Samotné mléko je pro růst leuconostoků nevhodným médiem. Mnohé druhy v něm však rostou dobře, za předpokladu, že se samotné mléko obohatí kvasničným autolyzátem a glukózou. *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* takto obohacené mléko okyseluje a sráží za tvorby oxidu uhličitého. Jiné druhy a kmeny, patřící do tohoto kmene mléko zpravidla nesráží, jsou však náročné na obsah volných aminokyselin. Při kultivaci v bujónu se buňky prodlužují a mohou být zaměněny za laktobacily. [9]

Většina leuconostoků disimiluje za přítomnosti fermentovatelného sacharidu citran za tvorby diacetylu, acetiínu a 2,3-butyldnglykolu. Diacetyl je v mlékárenství senzoricky velmi významnou látkou, v pивě a ve víně je nežádoucí. [9]

Leuconostoky se vyskytují ve stejných habitatech, jako laktobacily a mléčné streptokoky. Možným odlišením leuconostoků od ostatních dvou zmiňovaných skupin je jejich tvorba oxidu uhličitého z glukózy. Tento rozlišovací znak je možno použít pouze u aktivně rostoucích kultur. Čisté kultury se mohou rozpoznat od ostatních mléčných bakterií na základě analýzy konfigurace kyseliny mléčné. Leuconostoky produkují D(-), streptokoky L(+) kyselinu mléčnou. [9]

Některé leuconostoky se vyskytují také v prostředí s vysokou koncentrací sacharózy (55 až 60%). Tato modifikace jim umožnila adaptovat se na prostředí cukrovarů, rafinérií a potravinářských provozů s větší spotřebou cukru. To vede k výskytu v limonádách, sirupech a slazených minerálních vodách. Jejich růst způsobuje v cukrovarech významné ztráty sacharózy, korozi zařízení v důsledku produkce kyselin a v neposlední řadě také poruchy v difuzérech, které jsou způsobeny tvorbou dextranových slizů. Dextranové slizy jsou produkovány kmeny leuconostoků, které mají ve své buněčné stěně specifický enzym dextran-sacharázu. [9]

Bakterie rodu *Leuconostoc* se také podílejí na fermentaci zeleniny (např. zelí). Fermentaci iniciují metabolickou přeměnou sacharidů na kyseliny. Tyto bakterie jsou také významnou složkou mikroflóry masa a masných produktů. [9]

1.9 Základy metabolismu mikroorganismů

1.9.1 Všeobecná charakteristika

V bakteriálních buňkách probíhá, podobně jako ve všech živých organismech, přeměna látek, která zajišťuje buňkám dostatečné množství energie a stavebního materiálu pro veškeré životní projevy. Intenzita přeměny látek (metabolismus) je u mikroorganismů snadno ovlivnitelná vnějšími podmínkami, ovlivňují je i podmínky vnitřní. Metabolismus představuje velice organizovaný soubor biochemických reakcí, které jsou na sobě funkčně závislé. [3]

Metabolismus můžeme ve všeobecnosti rozdělit na dvě dráhy, které jsou protichůdné. Jedná se o procesy disimilační (katabolismus), při kterých buňka získává pro další život energii a stavební materiál, a procesy asimilační (anabolismus), který je charakteristický procesy biosyntézy buněčné hmoty. Základní vlastností metabolismů buněk je jejich schopnost se přizpůsobit vnějším podmínkám. Je to způsobeno tím, že enzymové vybavení buněk je ovlivněno složením vnějšího prostředí. [3]

1.9.2 Katabolické procesy chemoorganotrofních mikroorganismů a jejich význam

Z hlediska biotechnologického a potravinářského je právě skupina chemoorganotrofních mikroorganismů asi nejdůležitější. Tyto organismy získávají energii oxidací organických sloučenin, které jsou katalyzovány oxidiredukčními enzymy, jejichž kofaktor funguje tak, že se při oxidaci substrátu redukuje a funguje tudíž jako přenašeč vodíku, nebo elektronů. [3]

Oxidace substrátů prochází mnoha mezistupni. Energie se získává právě z některých mezistupňů metabolických řetězců. Oxidace substrátu v jediném kroku není možná, protože by došlo k masivnímu uvolnění tepla, které by mohlo poškodit samotnou buňku. [3]

1.9.3 Bakterie podle nároku metabolických drah na kyslík

Bakterie se podle jejich nároku na kyslík dělí na:

- Obligátně aerobní
- Obligátně anaerobní
- Fakultativně anaerobní

Fakultativně anaerobní jsou bakterie, které rostou za přítomnosti i nepřítomnosti vzdušného kyslíku. Za nepřítomnosti kyslíku používají fermentace, na kterou jsou schopny změnit svůj původní metabolismus. [3]

Jako modelový organismus byl v praktické části použit *Leuconostoc mesenteroides subsp. dextranicum*. Jedná se o mikroorganismus, který by se dal charakterizovat z hlediska morfologie jako grampozitivní koky, které jsou aerotolerantní. [9]

1.9.4 Pentosový cyklus

Některé mikroorganismy používají při fermentaci jiné metabolické dráhy, než glykolysu, v případě mléčných bakterií se jedná o tzv. heterofermentativní mléčné kvašení, při kterém využívají pentosový cyklus. [10]

Energie získaná při metabolizaci sacharidů v buňce nemusí být uložena pouze v podobě makroergické sloučeniny ATP, ale také i v podobě na energii bohatého redukčního činidla (NADPH), který je používán, jako donor vodíků a elektronů pro biosynthesy redukční povahy. Tato sloučenina vzniká právě za pomoci pentosového cyklu. [10]

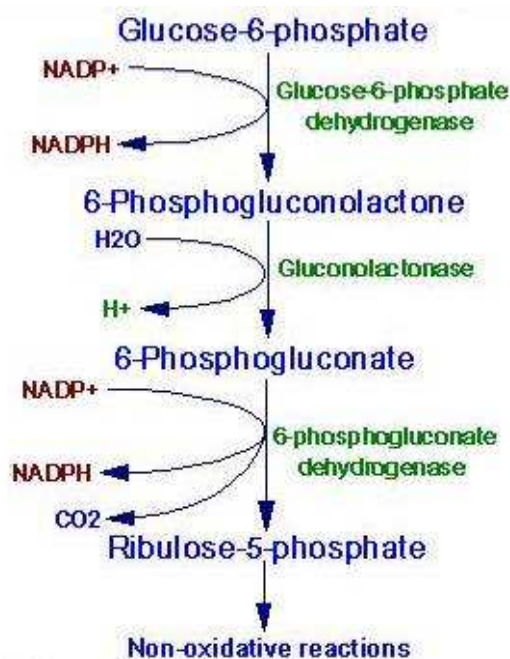
Pentosový cyklus umožňuje úplnou oxidaci hexosy na CO₂ bez zahrnutí citrátového cyklu a dýchacího řetězce. Dalším velmi přínosným významem pentosového cyklu je fakt, že je zdrojem ribosafosfátů pro syntézy nukleových kyselin a nukleotidových faktorů, Produkce již zmíněného NADPH slouží jako redukční síla buněk. Charakteristickým znakem pentosového cyklu je nemožnost výroby ATP. [11]

1.9.4.1 Mechanismus pentosového cyklu

Tento cyklus se sestává ze dvou elementárních fází:

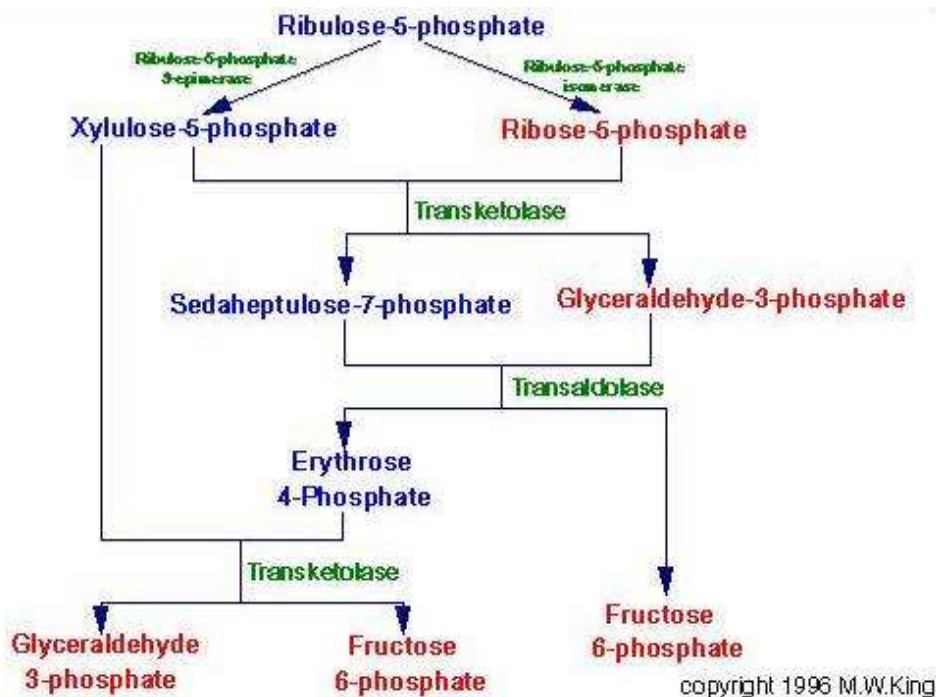
- Oxidační fáze (Obrázek 11)
- Regenerační fáze (Obrázek 12)

Veškeré pochody během oxidační fáze spočívají v odbourávání jednoho uhlíkatého atomu hexosy na CO_2 za vzniku pentosy a 2 NADPH. V podstatě se jedná o dvě dehydrogenace, za kterými následuje proces dekarboxylace. Tyto reakce jsou katalyzovány enzymy (glukosa-6-fosfátdéhydrogenasa, laktonasa a 6-fosfoglukonátdéhydrogenasa). Většina vzniklého ribulosa-5-fosfátu je převedena účinkem dalšího enzymu (ketolisomerasa) na ribosa-5-fosfát. [12]



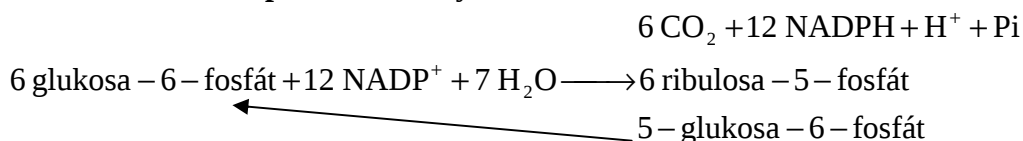
Obrázek 11 Schéma oxidační fáze pentosového cyklu [8]

V regenerační fázi dochází k převedení nevyužitých fosforečných esterů pentos složitým mechanismem zpět na hexosy. Celý proces je opět katalyzován celou řadou enzymů (transferasy, transaldolasy, transketolasy). [12]



Obrázek 12 Schéma regenerační fáze pentosového cyklu [8]

1.9.4.2 Celková bilance pentosového cyklu



Z mechanismu pentosového cyklu vyplývá, že při cyklickém odbourávání šesti molekul hexosy se úplně oxiduje jedna její molekula na 6 CO₂ a zbývajících 5 molekul se regeneruje. Dalšími molekulami, které jsou získány při pentosovém cyklu, jsou 6 H₂O a 12 NADPH, přičemž polovina atomů vodíku, které jsou převedeny na NADP⁺, pochází z hexosy a druhá polovina z molekul vody. Tento počet molekul NADPH by v aerobní fosforylaci odpovídal 36 ATP a je naprosto totožný s množstvím ATP, které je možno získat při kombinaci glykolýzy a respirace. [12]

1.9.5 Mléčná fermentace

Charakteristickým znakem mléčných bakterií je skutečnost, že dávají přednost kvašení před aerobním mechanismem i za aerobních podmínek. Jak již bylo řečeno, nejčastějším substrátem jsou sacharidy a jejich deriváty. Každý druh fermentujících mikroorganismů má k dispozici genetickou informaci pro výrobu specifických fermentačních produktů. Schopnost fermentovat určité substráty je pro mnohé mikroorganismy velmi důležitým rozlišovacím znakem. Složení a spektrum produktů fermentačního procesu je rovněž závislé na podmínkách kultivace, nebo na přítomnosti specifických látek. Při průmyslové produkci fermentačních metabolitů je požadavek na co největší produkci daného produktu, proto je snaha co nejlépe poznat mechanismus produkce a optimalizovat podle něj kultivační podmínky. [12]

1.9.5.1 Mechanismus mléčné fermentace

Nejjednodušším řešením pro nalezení vhodných akceptorů k odstranění vodíkových atomů, které byly získány na cestě od glukosy k pyruvátu, je právě mechanismus mléčné fermentace. Jedná se o nejjednodušší možnost z toho důvodu, protože akceptorem vodíků je pyruvát. [12]

Přeměna pyruvátu na laktát je opět katalyzována enzymaticky (laktátdehydrogenasa). Laktát je nejběžnějším produktem fermentace cukrů v mlékárenství, je rovněž produktem heterofermentačního mléčného kvašení druhu bakterií *Leuconostoc mesenteroides*. Při tomto způsobu fermentace vzniká prakticky jen kyselina mléčná a malé množství etanolu a oxidu uhličitého, z důvodu odbourávání glukosy za použití pentosového cyklu a části glykolytického systému. Tyto bakterie produkují pouze D – formu laktátu. [12]

1.9.6 Anabolické procesy

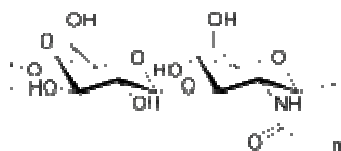
Anabolické procesy syntézy složek buněčné hmoty jsou mnohem rozmanitější, než katabolické procesy. Důvodem této skutečnosti je fakt, že buňka se skládá z různých sloučenin, z nichž každá je syntetizována postupnou řadou reakcí katalyzovaných specifickými enzymy. Kromě těchto sloučenin produkují buňky ještě celou řadu sekundárních metabolitů (barviva, antibiotika, toxiny). Složení veškerých vysokomolekulárních sloučenin je zakódováno v DNA, je zde zašifrováno také složení bílkovinných částí všech enzymů v buňce. [13]

1.9.6.1 Syntéza extracelulárních produktů

Sloučeninami, které se průmyslově připravují za použití metabolismu mikroorganismů, jsou polysacharidy, které tvoří slizový obal buněk. Nejvýznamnějšími polysacharidy jsou:

- Dextran – produkovaný bakterií *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*
- Xanthan – produkovaný bakterií *Xanthomonas campestris*
- Pululan – produkovaný plísní *Aureobasidium pulluans*
- Kyselina hyaluronová – produkce pomocí některých streptokoků (Obrázek 13)

[14]



Obrázek 13 Kyselina hyaluronová [9]

Další významnou skupinou látek, které jsou produkovány mikroorganismy, jsou antibiotika, jejímiž producenty jsou příslušníci rodu *Streptomyces* a někteří z rodu *Aktinomycetes*. [15]

Řada bakterií a plísní vytváří také velmi účinné toxiny. Bakteriální exotoxiny jsou většinou bílkovinné povahy. Nejúčinnějšími jsou botulotoxiny, produkovány bakterií *Clostridium botulinum*. Největší nebezpečnost botulotoxinů spočívá v možnosti jejich tvoření v potravinách, a protože nejsou v trávicím traktu narušeny, jsou často důvodem smrtelných otrav. K inaktivaci botulotoxinů dochází až po delším zahřívání, které vede k jejich inaktivaci v důsledku jejich bílkovinné povahy. [15]

Z potravinářského hlediska mají význam také barviva, které tvoří některé mikroorganismy a uvolňují je do okolí. Největším producentem těchto barviv je bakteriální rod *Pseudomonas* a dále některé aktinomycety. [15]

1.10 Dextran

1.10.1 Obecná charakterizace

Dextrany jsou definovány jako homopolysacharidy složené z glukózy, jejichž hlavní řetězec je tvořen řadou α -(1→6) vazeb. Jedná se o α -D-glukany, které mohou také obsahovat postranní řetězce, které mohou mít charakter α -(1→2), α -(1→3), nebo α -(1→4) vazeb. Přesná struktura dextranu se může lišit v závislosti na druhu mikroorganismu, kterým byl vyprodukován. Dextrany jsou totiž produkovány některými bakteriemi ze zástupců *Streptococcus* a *Leuconostoc mesenteroides*. [16]

Dextrany mají celou řadu uplatnění. Mezi žádoucí uplatnění by mohla být zařazena průmyslová produkce dextranu pomocí *Leuconostoc mesenteroides*. Takto vyprodukovaný dextran se používá v klinickém a farmaceutickém výzkumu, má i celou řadu dalších využití. Z negativních míst výskytu by se dala zmínit přítomnost dextranu, jako složky zubního plaku. [16]

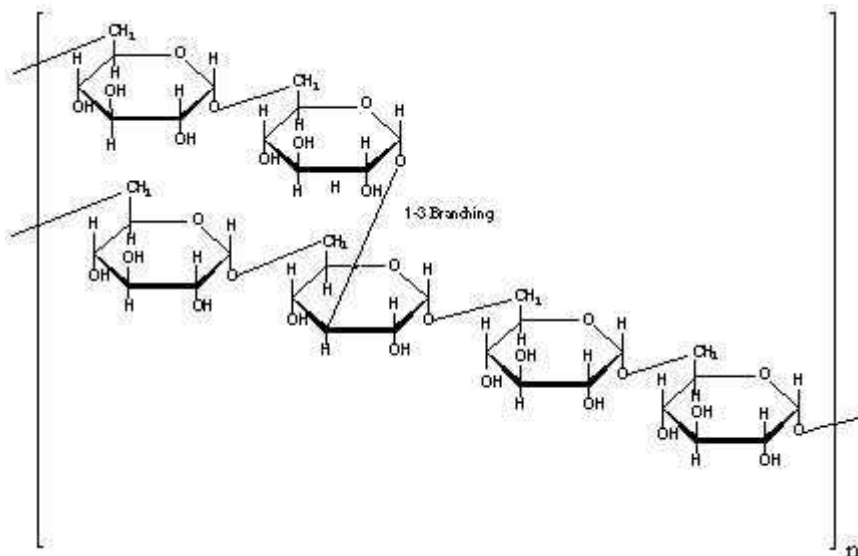
1.10.2 Historie a výskyt

Dextrany jsou metabolicky syntetizovány ze sacharózy, proto jsou již velmi dlouhou dobu známy, jako nežádoucí kontaminant potravinářských produktů. Objevují se také velmi často ve výrobcích s velkým množstvím cukru, mohou se vyskytovat také v cukrovarech. [17]

První výzkumy dextranů se uskutečnily již v 19. stol, kdy byla pozorována jejich přítomnost ve víně, která byla spojena s bakteriální kontaminací. [17] V této době byl rovněž (na základě pokusů s optickou otáčivostí) poprvé zveřejněn jejich obecný vzorec a byl poprvé použit název dextran. [18] Celý výzkum byl završen objevem bakterie, produkující tento produkt, a jejím pojmenováním (*Leuconostoc mesenteroides*). [19]

Výzkum tohoto mikroorganismu byl stimulován možným využitím dextranu. Bylo zjištěno, že díky své povaze by mohly být dextrany použity jako náhrada krevní plasmy. V pozdějším období byly postupně charakterizovány jednotlivé kmeny mikroorganismů, produkující tento polysacharid. Byly vyčleněny a označeny některé pro průmyslovou produkci. Konkrétně se jedná o *Leuconostoc mesenteroides*, který byl označen jako NRRL B-512F, a je používán pro průmyslovou produkci až doposud. [20]

1.10.3 Struktura dextranu



Obrázek 14 Struktura dextranu [10]

Dextran je polysacharid, jehož hlavní řetězec je tvořen monosacharidovými jednotkami, které jsou navzájem spojeny α -(1→6) vazbami. Způsob a místo větvení tohoto řetězce jsou závislé na jednotlivých produkčních mikroorganismech. Komerční dextran je produktem bakterie *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F. Jak je vidět na obrázku 14, je hlavní řetězec tvořen α -(1→6) vazbami s poměrně nízkým množstvím α -(1→3) vazeb. [21] Při bližším zkoumání struktury se ukázalo, že asi 40% postranních řetězců je tvořeno pouze jednou podjednotkou, dalších 45% je tvořeno dvěma podjednotkami a zbylé postranní řetězce jsou složeny z více než 30 podjednotek. Rozložení větvení postranních řetězců na hlavním řetězci je rovnoměrné. [22] [23]

Jak již bylo řečeno, přesná struktura dextranu závisí přímo na mikroorganismu, kterým je produkován. Byly provedeny rovněž studie, které se zabývaly přesnou strukturou dextranu, produkováného různými zástupci leuconostoků a streptokoků. Prokázalo se, že α -(1→6) vazby, tvoří v závislosti na zvoleném producentovi, 50 – 97% celkových vazeb. Zbylé vazby byly tvořeny, jak již bylo zmíněno, různým množstvím α -(1→2), α -(1→3), nebo α -(1→4) vazeb, které bylo opět závislé na daném producentovi. [24]

Některé polysacharidy dextranové povahy jsou natolik odlišné svou strukturou od „pravého“ dextranu, že byly označeny, jako úplně nový typ polysacharidu. V těchto sloučeninách nepřevládá již zmíněná α -(1→6) vazba. Byly objeveny struktury, ve kterých se např. pravidelně opakovaly α -(1→3) a α -(1→6) vazby. Tato konkrétní struktura byla nazvána alternan. [25] [26] Tyto další α -D-glukany jsou nejčastěji produkovány zmutovanými mikroorganismy. Z dalších principiálně podobných polysacharidů by se dal zmínit ještě mutan. [27]

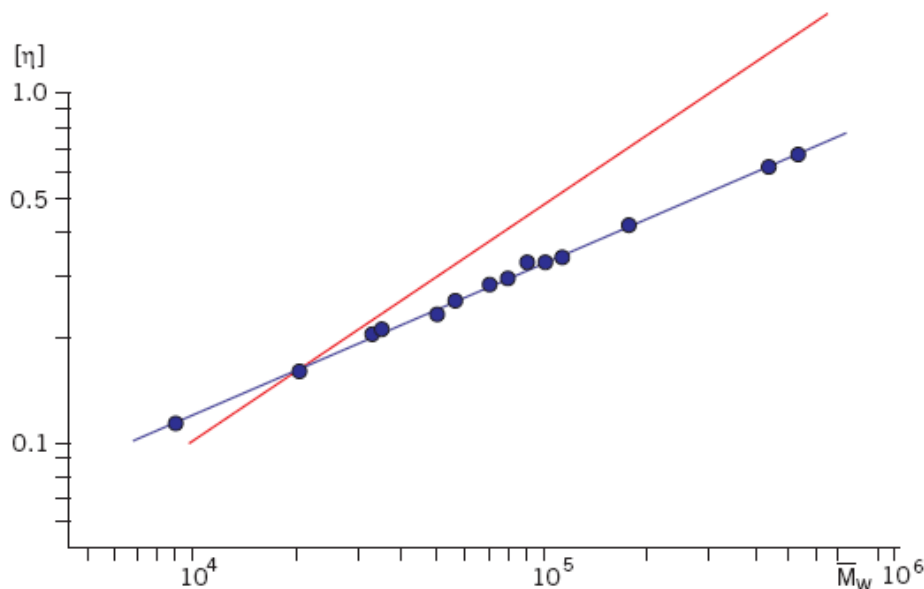
1.10.4 Detekce dextranu

K detekování dextranu mohou být použity obecné metody používané pro polysacharidy. K více specifickému určení se používá spektrofotometrických metod (určení absorpance při různých vlnových délkách vede k přesné charakterizaci dextranu). [24]

1.10.5 Fyzikálně – chemické vlastnosti dextranu

Dextran, který je označován NRRL B-512F a je průmyslově produkován, je lehce rozpustný ve vodě, ethylen glykolu, metyl sulfoxidu, glycerolu, a dalších látkách. Avšak některé dextrany vykazují určitý sklon ke krystalické struktuře, proto mohou být převedeny do roztoku pouze za dostatečného zahřívání. Molekulová hmotnost byla stanovena na základě mnohých měření. Výsledky se liší, v závislosti na producentovi. [28]

Byla dokonce objevena i závislost mezi viskozitou a molekulární hmotností dextranu (Obrázek 15) ve spojitosti s širokým rozmezím molekulárních hmotností a druhem produkčního mikroorganismu. [29]



Obrázek 15 Logaritmická závislost viskozity dextranu NRRL B-512F na molekulové hmotnosti (modrá čára) a pro hypoteticky lineární dextran (červená čára) [11]

Odchylka od linearity při vyšších molekulových hmotnostech je připisována růstu větvení na řetězci. [29]

1.10.6 Fyziologická funkce dextranu

Dextran, produkováný streptokoky, tvoří hmotu dentálního plaku, která poskytuje prostředí pro růst a rozmnožování těchto bakterií. [30] Fyziologická funkce dextranu, který je produkován leukonostoky není dosud známa. Je asi nejpravděpodobnější, že tyto polysacharidy u leukonostoků chrání buňky proti vysychání a pomáhají jim se přichytit na pevné podklady. [31]

1.10.7 Biosyntéza dextranu

Dextrany jsou extracelulárními produkty primárního metabolismu. Jsou produkovány enzymy, které jsou často označovány jako glucansacharasy, nebo více specificky jako dextransacharasy, které katalyzují přenos D-glukopyranosylových podjednotek ze sacharosy za tvorby dextranů.

Fruktosa, která je při tomto procesu uvolněna, může být využita rostoucími buňkami v okolí. K tomuto procesu není nutná žádná energie z ATP, nebo z kofaktorů, protože enzymy zpracovávají energii, která je k dispozici v glykosidických vazbách mezi glukózou a fruktózou. Syntéza glykansacharasy, je v metabolismu divokých kmenů *Leuconostoc mesenteroides*, indukována při jejich růstu na médiu, které obsahuje sacharosu. [32]

1.10.7.1 Charakterizace enzymů

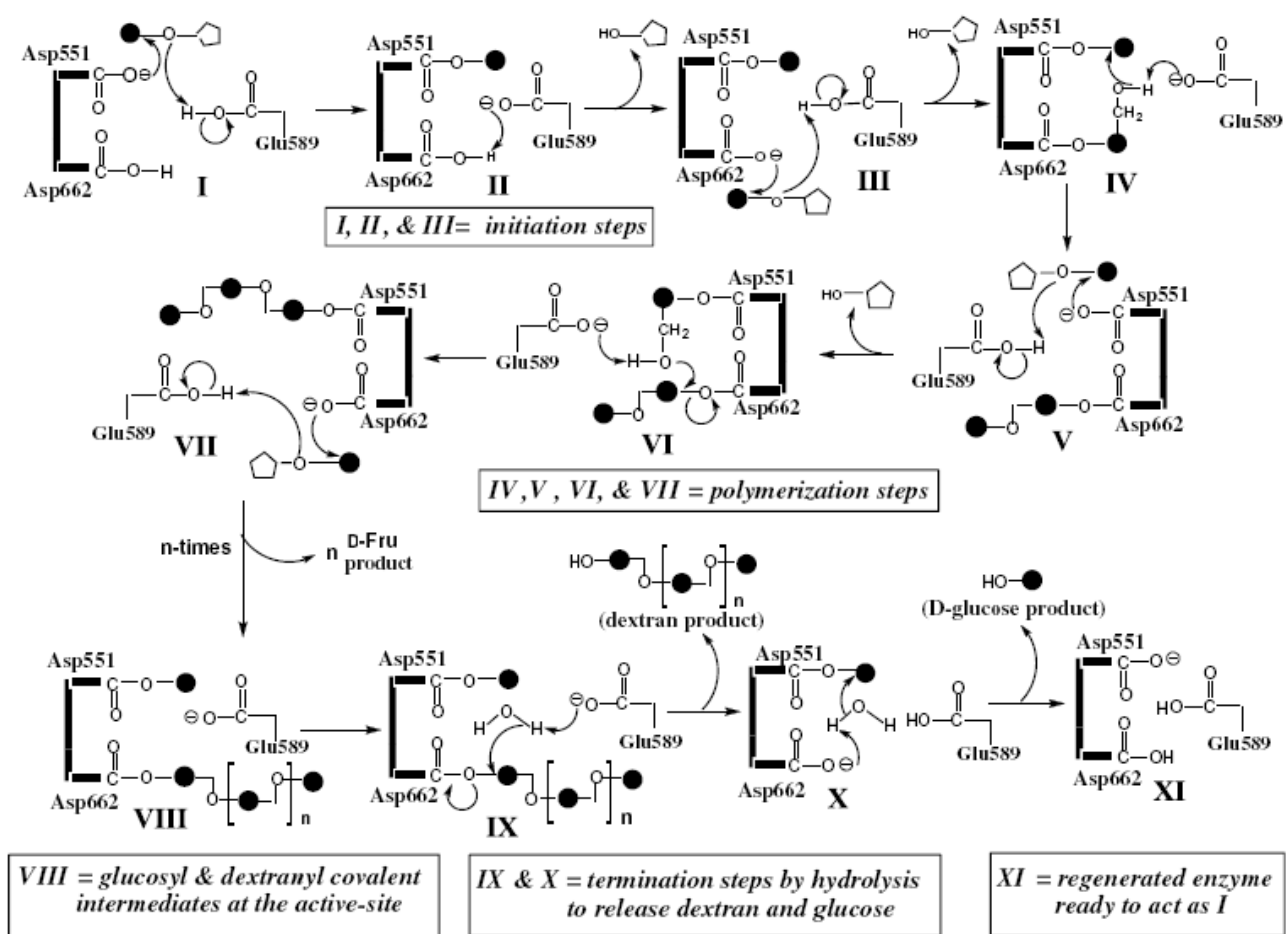
Charakterizace dextransacharasy byla ztížena skutečností, že se vyskytovala u mikroorganismů, kde byla součástí multienzymatického komplexu. Její přesnou charakterizaci ztěžovala přítomnost meziproduktů metabolismu. Později byl pravý důvod existence tohoto enzymu odhalen na základě jeho přítomnosti v organismech, které produkovaly dextran. [33]

Byly rovněž detailně prozkoumány i fyzikálně – chemické vlastnosti enzymu. Bylo zjištěno, že optimální reakční podmínky pro tento enzym jsou pH od 5,0 do 5,5 a teplota 30°C. Pro produkci a aktivitu tohoto enzymu je potřebná velice nízká koncentrace iontů vápníku. Situace s proměnlivostí struktury je zde podobná, jako tomu bylo při samotných dextranech, existuje několik druhů dextransacharasy, které se liší jak svou molekulovou hmotností, teplotním optimem (35 – 45°C), rozmezím pH (5,0 – 6,5). [34]

1.10.7.2 Schéma syntézy

Syntézy dextranu za pomoci glukansacharasy se podle posledních průzkumů účastní tři z aminokyselin, které tvoří strukturu glukansacharasy. Jedná se o aminokyseliny Asp551, Glu589 a Asp662. Principiálně je mechanismus syntézy dextranu charakterizován pomocí mechanismu vložení na základě dvou katalytických míst. (Obrázek 16, 18) [35]

Reakce střídavě pokračuje postupem vpřed a vzad mezi dvěma zmíněnými katalytickými místy karboxylových skupin Asp551 a Asp662. Probíhá tak polymerizace dextranového řetězce na základě dvoustranného inzertního mechanismu. [35]

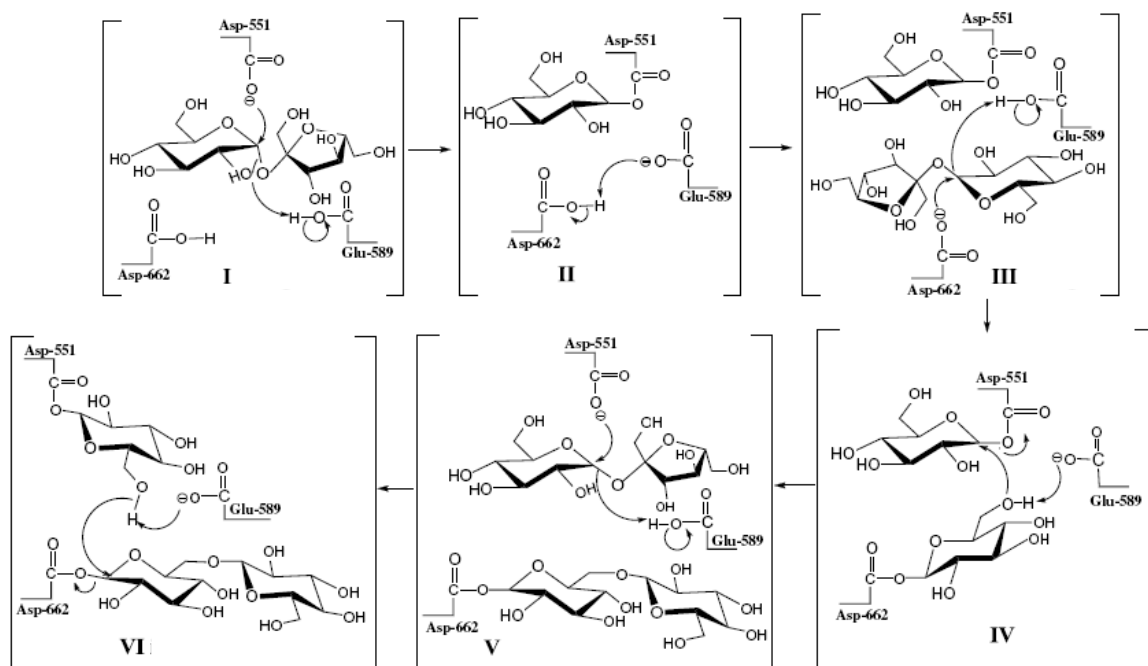


Obrázek 16 Mechanismus biosyntézy dextranu adicí D-glukosy na redukující konec rostoucího dextranového řetězce. Karboxylové skupiny Asp551 a Asp662 vystupují jako nukleofily, které napadají molekulu sacharosy, střídavé připojování D-glukosylu a Glu589, která vystupuje střídavě jako kyselina – zásada katalyzátor. [12]

•● = sacharosa

• = glukosa

Obrázek 17 Vysvětlivky k schématu metabolismu biosyntézy dextranu [12]



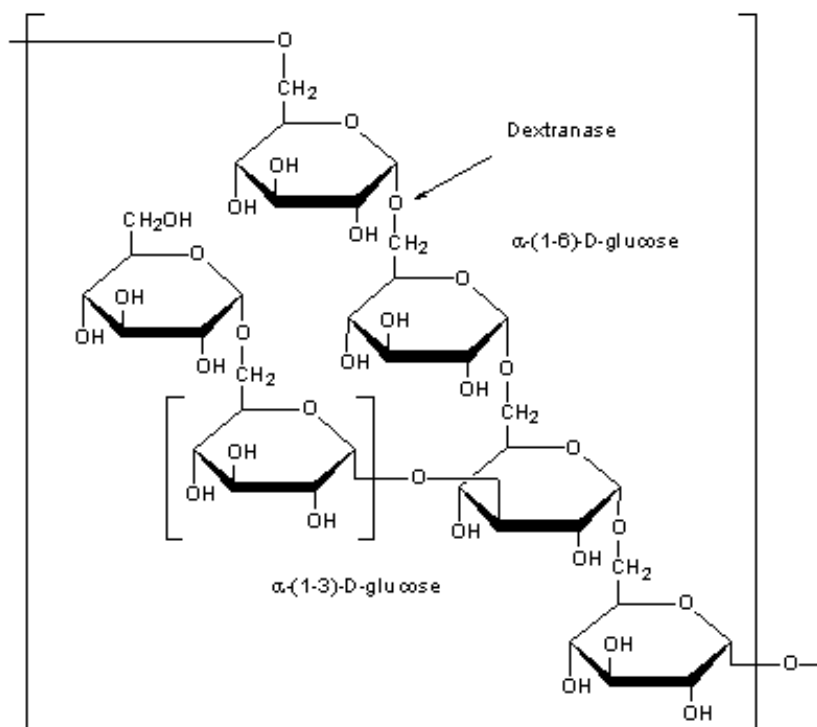
Obrázek 18 Zapojení aminokyselin do enzymatických reakcí mechanismu biosyntézy dextransu v aktivním místě dextransacharosy inzerčním mechanismem adice D-glukosy na redukující konec vznikajícího dextransového řetězce [12]

1.10.8 Biodegradace dextransu

Zpětná degradace dextransu je možná díky existenci další skupiny enzymů. Tato skupina bývá označována jako dextransasy. Jedná se o enzymy, které jsou např. produkovány mnoha plísněmi (*Aspergillus*). [36] Jedná se o enzymy, jejichž specifita spočívá ve štěpení α -(1→6) vazeb. Výsledkem štěpení je hlavně isomaltosa a isomaltotriosa. (Obrázek 19)

Tyto enzymy jsou rovněž průmyslově produkovány a jejich využití spočívá v odstranění kontaminace dextransu ve výrobcích, které se vyznačují vysokou koncentrací cukru. [37] Další možností uplatnění enzymů, které štěpí dextran je pro výrobu frakcí dextransu o specifické molekulové hmotnosti. [38]

Dalšími mikroorganismy, které jsou schopny produkovat tyto enzymy, jsou také bakterie. Tyto bakterie jsou schopny produkovat i více specifické dextransasy, které neštěpí pouze α -(1→6), ale také i α -(1→2), α -(1→3), nebo α -(1→4) vazby. [38]



Obrázek 19 Specifita dextranasy [13]

1.10.9 Využití dextranu

Vzhledem ke svým vlastnostem mají dextrany různé využití. Způsob jejich využití je také spojen s možností jejich degradace na nižší sacharidové podjednotky. [39]

Dextrany prokazují klasické sérologické vlastnosti. Tyto vlastnosti jsou pravděpodobně spojeny s jejich molekulární hmotností a množstvím větvení řetězce. [39]

Volné hydroxylové skupiny, přítomné v dextranech jsou přístupné reakcím, což vede k častým chemickým úpravám dextranů.

Dextrany se díky svým vlastnostem využívají v oblastech:

- Zemědělství
- Potravinářství
- Farmaceutický průmysl
- Lékařství

[40]

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Nejdříve byla prováděna kultivace čisté kultury na vybraných médiích. Následovala kultivace na reálných vzorcích, které byly kontaminovány sbírkovou kulturou. Výsledky kultivací byly hodnoceny na základě počítání počtu kolonií na vhodném živném mediu. Pro stanovení počtu MO v ml suspenze byl použit výpočet podle vztahu:

$$x = MO \cdot 10 \cdot z$$

x..... počet MO v 1 ml suspenze

MO..... průměrný počet kolonií

z..... zředění suspenze

2.1 Seznam použitých přístrojů, pomůcek a chemikálií

2.1.1 Použité přístroje a pomůcky

- Laboratorní sklo
- Mikropipety
- Plastové Petriho misky
- Váhy
- UV lampa
- Autokláv
- Sterilizátor
- Temperační nádoba
- Kultivační box s termostatem
- Analyzátor ovzduší (MERCK mas – 100 ECO)
- Digitální fotoaparát – NIKON D90

2.1.2 Použité chemikálie a živná média

- Voda
- APT Agar – produkován firmou MERCK
- Orange – serum Agar – produkován firmou MERCK
- Plate Count Agar – produkován firmou MERCK

2.1.3 Použitý materiál na kultivaci

- Roztok sacharosového sirupu (surovina)
- Roztok sirupu [redacted] multivitamin (produkt)

2.2 Použitý mikroorganismus

V experimentální části bylo pracováno s mikroorganismem *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*.

Na základě tohoto určení akreditovanou laboratoří byl objednáán zmíněný mikroorganismus z České sbírky mikroorganismů (CCM) při Přírodovědecké fakultě Masarykovy university. Byl dodán v podobě želatinových disků.

2.3 Použitá kultivační média

Výběr kultivačních médií byl podřízen zvolenému testovanému mikroorganismu. V laboratoři [REDACTED] která si zvolila, jako svého dodavatele firmu MERCK, bylo vybráno médium z katalogu této firmy, které svým složením odpovídalo složení média, doporučeného v katalogu CCM. CCM doporučuje na kultivaci použitého MO médium Lactobacillus medium. Název médií dodávaných firmou MERCK, odpovídajících složením médiu, doporučeného CCM je uveden v sekci použitých chemikálií a živných médií.

2.3.1 Složení a charakterizace Lactobacillus medium

Složení media je uvedeno v tabulce 1. Jedná se o medium doporučené CCM.

Tabulka 1 Složení Lactobacillus medium

Komponent	Množství (g)	Komponent	Množství (g)
Yeast extract	5	Sodium acetate	5
Beef extract	10	Diamonium citrate	2
Peptone	10	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2
Glucose	20	MnSO ₄ · 4 H ₂ O	0,05
Tween 80	5	Distilled water	1000 (ml)
K ₂ HPO ₄	2		

2.3.2 Složení a obecná charakteristika APT Agar

Jedná se o víceúčelový agar, který obsahuje Tween 80[®]. Složení tohoto média bylo navrženo v roce 1951, pro fermentaci heterofermentativních bakterií, zahrnující rody *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, dále *Lactococcus lactis*, a další mikroorganismy, které pro svou kultivaci a detekci vyžadují vysokou koncentraci thiaminu v masových produktech, konzervovaných pokrmích, ovocných džusech a ostatních potravinářských produktech. [41] Médium vyhovuje požadavkům American Public Health Association (1992). [42] Složení media je uvedeno v tabulce 2.

Tabulka 2 Složení APT Agar

Komponent	Množství (g)	Komponent	Množství (g)
Peptone from casein	12,5	Tween 80	0,2
Yeast extract	7,5	Magnesium sulfate	0,8
D(+)glukose	10	Manganese chloride	0,14
NaCl	5	Iron (II) sulfate	0,04
Tri – sodium citrate	5	Thiaminium dichloride	0,001
Di – potassium hydrogen phosphate	5	Agar – agar	13,5

2.3.3 Složení a obecná charakteristika Orange – serum Agar

Jedná se o médium, které je určeno k izolaci, kultivaci a počítání množství kolonií, bakterií tolerantních ke kyselinám a bakteriím způsobujícím hnilobu ovocných džusů a jejich koncentrátů, speciálně produktů z citrusových plodů. Médium splňuje požadavky Institute for Food Technology and Packaging (1974). [43] Složení media je uvedeno v tabulce 3.

Tabulka 3 Složení Orange - serum Agar

Komponent	Množství (g)
Peptone	10
Yeast extract	3
Orange extract	5
D(+)glukose	4
K ₂ HPO ₄	3
Agar	17

2.3.4 Složení a obecná charakteristika Plate Count Agar

Toto médium neobsahuje žádné komponenty, které by jej dělaly více selektivním pro některé druhy mikroorganismů. Používá se pro stanovení celkového počtu mikroorganismů v mléce, vodě a dalších materiálech. [44]

V laboratoři [REDACTED] je složení tohoto média ještě modifikováno přidávkou cukru. Důvodem je použití takto modifikovaného média pro selektivní detekci bakterií z rodu *Leuconostoc*, kdy se na médiu projeví charakteristická vlastnost tohoto rodu, kterou je produkce extracelulárního dextranu, který obaluje kolonie a tím se ale znemožní počítání kolonií při nepřímém stanovení. Důvodem je vysoký obsah

sacharosy v živném médiu. Médium nemůže být z důvodu produkce dextranu použito pro stanovení počtu mikroorganismů ve vzorku, může být použito pouze pro selektivní určení leukonostoků. Složení media je uvedeno v tabulce 4.

Tabulka 4 Složení Plate Count Agar (modifikovaný)

Komponent	Množství (g)
Peptone from casein	5
Yeast extract	2,5
D(+) glucose	1
Agar	14
Cukr	na 180 ml hotového média 21 g

2.4 Oživování kultur ze želatinových disků

Při přípravě subkultury ze želatinových disků byl dodržován doporučený pracovní postup. Oživení bylo provedeno na šikmém agaru, na médiu, které svým složením odpovídalo ekvivalentu média, doporučeného CCM. [45]

Šikmý agar by se dal charakterizovat, jako metoda kultivace MO, při které se připravené medium nechá ztuhnout ve zkumavce, nakloněné pod vhodným úhlem. [45]

2.5 Pracovní postupy

2.5.1 Pracovní postup při oživování kultury

- Lahvička s želatinovými disky kultury byla vytažena z chladničky, kde byla skladována a ponechána uzavřená volně na vzduchu 10 minut při laboratorní teplotě. Zamezilo se tak kondenzaci vody na chladných stěnách lahvičky.
- Vyžíhanou, ještě teplou očkovací jehlou byl přenesen jeden z disků do kondenzační vody na dně zkumavky se šikmým agarem.
- Takto přenesený disk byl inkubován 4 hodiny při teplotě 25°C, což je optimální teplota pro inkubaci tohoto MO
- Po uplynutí stanovené doby byla zkumavka s agarem nahnuta a suspenze s MO byla rozlita po celém povrchu šikmého agaru
- Další inkubace probíhala 48 hodin a poté bylo s MO dále pracováno

2.5.2 Příprava APT Agar

Celé médium je dodáváno v práškové formě, proto je jeho příprava velmi jednoduchá. Postup přípravy byl následující:

- Bylo naváženo odpovídající množství média (59,5 g/l destilované vody).
- Množství bylo rozpuštěno ve vhodných nádobách k autoklávování.
- Autokláv pro sterilizaci byl nastaven na 121°C a 15 minut.

- Po vysterylizování bylo médium nalito na Petriho misky, nebo do zkumavek určených na přípravu šikmého agaru. Příprava Orange – serum Agar
- Bylo naváženo odpovídající množství média (42,0 g/l destilované vody).
- Množství bylo rozpuštěno ve vhodných nádobách k autoklávování.
- Autokláv pro sterilizaci byl nastaven na 115°C a 15 minut.
- Po vysterylizování bylo médium nalito na Petriho misky, nebo do zkumavek určených na přípravu šikmého agaru.

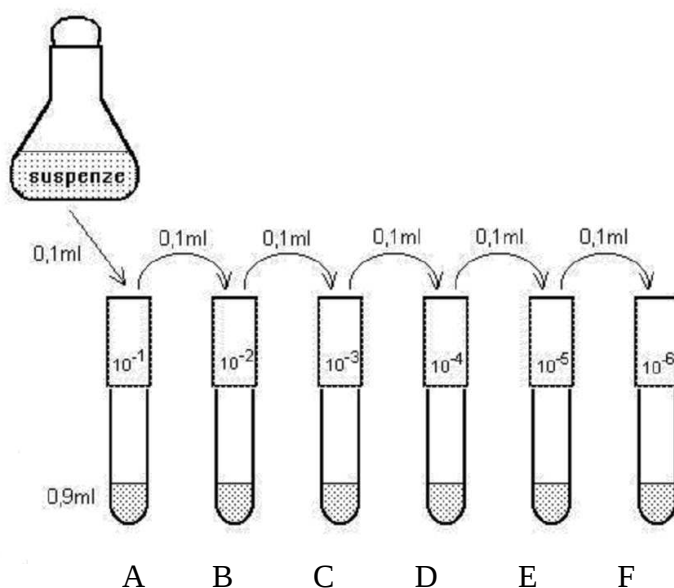
2.5.3 Příprava Plate Count Agar

- Bylo naváženo odpovídající množství média (22,5 g/l destilované vody).
- Bylo přidáno odpovídající množství cukru
- Množství bylo rozpuštěno ve vhodných nádobách k autoklávování.
- Autokláv pro sterilizaci byl nastaven na 121°C a 15 minut.
- Po vysterylizování bylo médium nalito na Petriho misky.

2.5.4 Kultivace čisté kultury

Původní suspenze byla připravena tak, že očkovací kličkou bylo odebráno určité množství MO ze šikmého agaru a přeneseno do 10 ml vody. K ředění byla použita vysterylizovaná destilovaná voda. Příprava suspenze o vhodné koncentraci spočívá v postupném ředění původní suspenze. Postup ředění je znázorněn na obrázku 20 pouze s tím rozdílem, že místo 0,9 ml vody bylo v jednotlivých zkumavkách 9 ml vody a pro ředění byl přenášen 1 ml suspenze do každé další. Po naředění suspenze následovalo naočkování připravených Petriho misek s různými médii, různě zředěnými suspenzemi.

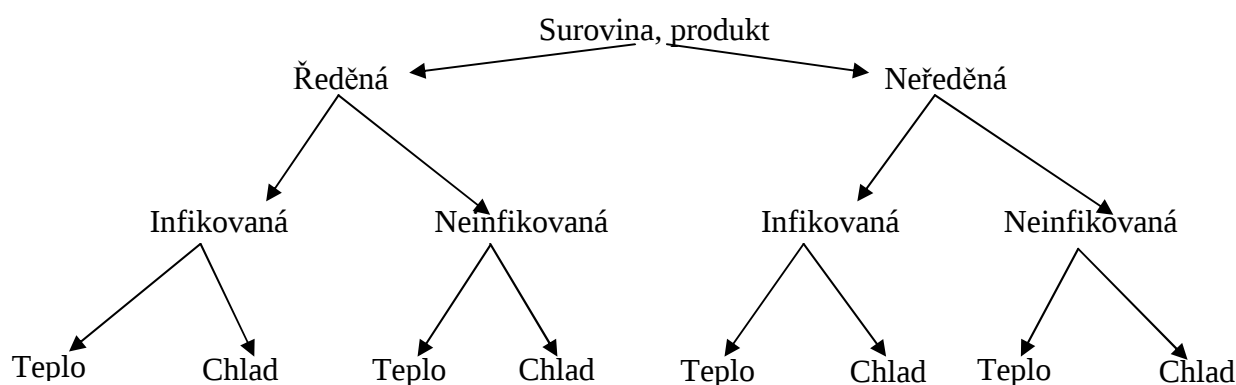
Vzhledem k nutnosti statistického vyhodnocení byly z každé různě zředěné suspenze naočovány 3 misky a miska čtvrtá byla použita jako kontrolní. Kultivace misek trvala vždy 4 dny při teplotě 30°C. Z důvodu počitatelnosti byly vyhodnocovány počty u misek, na kterých bylo přibližně 200 kolonií a méně.



Obrázek 200 Desítkové ředění mikrobiální kultury [14]

2.5.5 Ověření kvality vybraných kultivačních medií na reálných vzorcích (vyšší koncentrace glukosy)

- Byla připravena suspenze o koncentraci MO, která umožňovala počítatelnost kolonií na Petriho misce po uplynutí kultivační doby. Zředění této suspenze bylo stanoveno na základě předchozího bloku praktické části na 10^{-3} .
- Z této suspenze byl odebrán 1 ml a byly s ním kontaminovány různě koncentrované roztoky glukosy a produktu. Byly rovněž vytvořeny kontrolní vzorky glukosy a produktu, které nebyly infikovány a sloužily, jako průkaz sterility práce. Pozorován byl také vliv teploty, proto zástupci obou skupin jak produktů, tak i surovin byly skladovány po dobu experimentu při různých teplotách. Pro lepší orientaci je uvedeno schéma.
- Růst MO v roztocích produktu a suroviny, byl stanovován na základě naočkování Petriho misek s APT Agarem, a modifikovaným Plate Count Agarem, 0,1 ml roztoků produktu a suroviny.
- Kultivace misek byla prováděna 4 dny při teplotě 30°C.



2.5.6 Ověření kvality vybraných kultivačních medií na reálných vzorcích (nižší koncentrace glukosy)

Postup byl analogický postupu při ověření kvality vybraných kultivačních medií na reálných vzorcích při vyšší koncentraci. Rozdíl spočíval pouze v koncentraci glukosy v reálných vzorcích, která byla nižší.

2.5.7 Zjištění možného zdroje kontaminace leukonostokem

- Byla provedena sedimentační analýza ovzduší na zavedených kontrolních místech ve výrobě, za pomoci analyzátoru MERCK MAS – 100 ECO. Analýza byla opět provedena za použití obou již zmiňovaných živných médií.
- Byly provedeny stěry z linky v zavedených kritických bodech z hlediska kontaminace výrobku.
- Kultivace misek byla prováděna 4 dny při teplotě 30°C.

3 CÍL PRÁCE

Praktická část této bakalářské práce byla prováděna v laboratoři firmy [REDACTED]. V rámci procesu kontroly byla jedna z náhodných mikrobiologických kontaminací vyhodnocena specializovanou laboratoří, jako kontaminace mikroorganismem *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*. Tento mikroorganismus byl zvolen pro další práci v experimentální části. Cílem bylo zjištění vhodných podmínek a media pro spolehlivé určení tohoto mikroorganismu v rámci procesu kontroly výroby.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Nejdříve byla prováděna kultivace čisté kultury na vybraných živných mediích. Dále byla ověřena jednotlivá media prakticky na reálných vzorcích, které byly kontaminovány sbírkovou kulturou.

4.1 Kultivace čisté kultury na vybraných živných mediích

Byla otestována dvě živná media na růst a rozmnožování sbírkové kultury *Leuconostoc mesenteroides*. Na stanovení počtu MO byla použita metoda nepřímého stanovení počtu MO. Na základě nárůstu nejvyššího počtu MO bylo vybráno medium pro další experimenty.

Počty kolonií MO, kultivovaných na jednotlivých mediích, v závislosti na ředění suspenze jsou uvedeny v tabulkách 5 a 6. Pro stanovení počtu kolonií mikroorganismů byly použity pouze misky, na kterých počet vyrostlých kolonií nepřesahoval 200, což je uvedeno v tabulkách 5 a 6.

Tabulka 5 Počty kolonií MO v závislosti na ředění suspenze (APT Agar)

APT Agar		Počet kolonií				
Suspenze	Zředění	1	2	3	Průměr	4
A	10	N	N	N	N	0
B	10 ²	N	N	N	N	0
C	10 ³	76	170	200	149	0
D	10 ⁴	20	14	19	18	0
E	10 ⁵	1	1	2	1	0
F	10 ⁶	1	0	0	0	0
		Počet buněk v suspenzi (ml ⁻¹)			1486667	

N = nepočitatelný počet kolonií (více než 200 kolonií)

Tabulka 6 Počty kolonií MO v závislosti na ředění suspenze (Orange - serum Agar)

Orange - serum Agar		Počet kolonií				
Suspenze	Zředění	1	2	3	Průměr	4
A	10	N	N	N	N	0
B	10 ²	N	N	N	N	0
C	10 ³	122	129	122	124	0
D	10 ⁴	16	8	9	11	0
E	10 ⁵	0	2	2	1	0
F	10 ⁶	0	0	0	0	0
		Počet buněk v suspenzi(ml ⁻¹)			1243333	

N = nepočitatelný počet kolonií (více než 200 kolonií)

Pro ověření tvorby dextranu bylo použito modifikované medium Plate Count Agar.

Tabulka 7 Přítomnost kolonií v závislosti na ředění modifikovaný (Plate Count Agar)

Plate Count Agar (modifikovaný)				
Suspenze	1	2	3	4
A	+	+	+	-
B	+	+	+	-
C	+	+	+	-
D	+	+	+	-
E	+	+	+	-
F	+	-	-	-

+ = pozorovaná produkce dextranu

- = bez produkce dextranu

Na základě výše uvedených testů lze říci, že složení obou medií je vhodné pro růst testovaného mikroorganismu. Pro další pokusy byla vybrána media APT Agar a následně bylo otestováno medium modifikovaný Plate Count Agar, pro zjištění přítomnosti leukonostoků. Modifikovaný Plate Count Agar byl dále používán z důvodu produkce dextranu leukonostoky na tomto mediu. Produkce dextranu na tomto mediu byla ověřena a výsledky jsou uvedeny v tabulce 7.

4.2 Ověření kvality vybraných kultivačních medií na reálných vzorcích (vyšší koncentrace glukosy)

K analýze možnosti a testování výskytu daného leukonostoka, jako kontaminujícího MO byly podrobeny jak suroviny, tak i produkty. Jako zástupce surovin byl zvolen glukosový sirup, který tvoří základ veškerých slazených nápojů, jako zástupce produktů byl zvolen jeden z mnoha, které jsou v tomto výrobním procesu produkovány, a to XXXXXXXXXX multivitamin. Koncentrace glukosy v těchto vzorcích, se shodovaly s koncentracemi glukosy v průběhu výroby.

Na základě počitatelnosti kolonií při kultivaci čisté kultury byla pro kontaminaci reálných vzorků vybrána suspenze s ředěním 10^3 . V tabulce 8 je uvedeno množství MO v 1 ml suspenze připravené ze sbírkového mikroorganismu, kterou byly kontaminovány reálné vzorky. Počty byly stanoveny nepřímou metodou.

V tabulkách 9, 10, 11 přílohy (strany 49 – 52), jsou shrnuty počty MO v reálných vzorcích po 1, 2, 3 dnech od kontaminace reálných vzorků. Počty byly stanoveny rovněž nepřímou metodou.

Tabulka 8 Stanovení počtu MO v suspenzi, kterou byly infikovány reálné vzorky (počáteční množství MO v 1 ml suspenze)

10^3						
Miska	1	2	3	Průměr	4	Počet
APT	1796	1925	1876	1866	0	18656667
LEU	+	+	+		-	

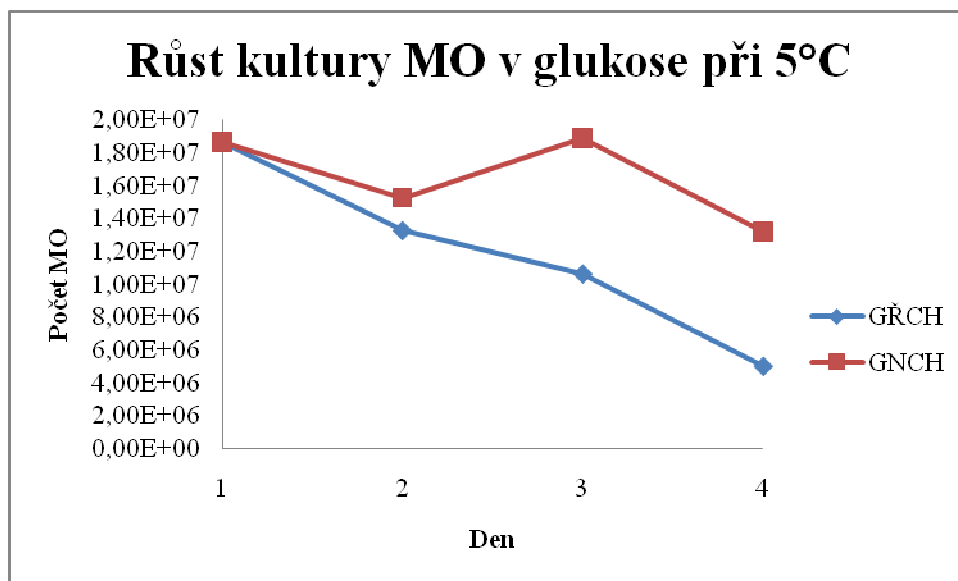
APT = APT Agar

LEU = modifikovaný Plate Count Agar

+ = produkce dextranu

- = bez produkce dextranu

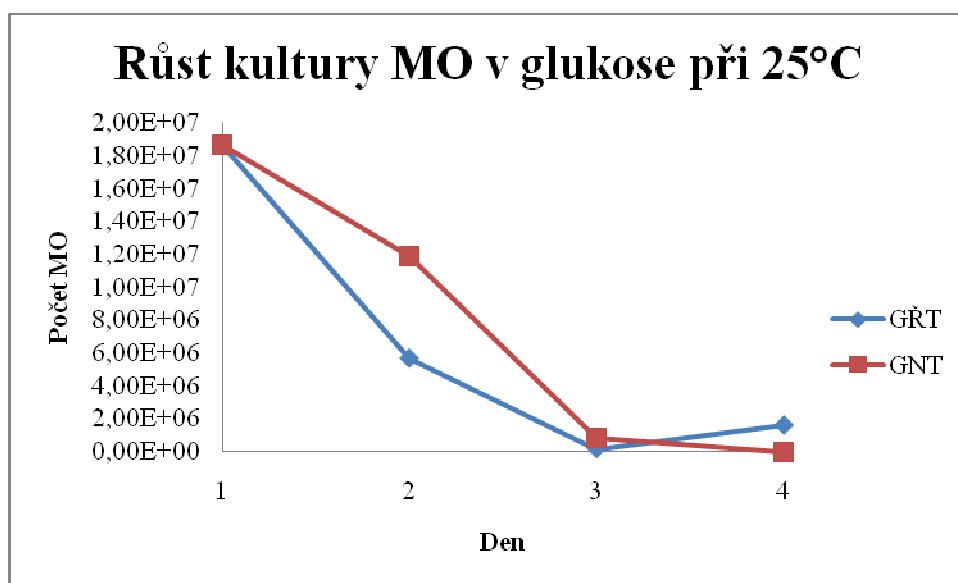
Vybrané reálné vzorky byly kontaminovány výše uvedenou suspenzí (Tabulka 8) a následně skladovány v průběhu čtyř dnů při teplotě 5°C a 25°C. Z každého kontaminovaného vzorku byl pak v pravidelných časových intervalech odebrán 0,1 ml vzorku a nepřímou metodou byl stanoven počet živých buněk MO. Výsledky jsou uvedeny v příloze v tabulkách 9 – 11. Na základě hodnot uvedených v tabulkách byly zpracovány grafické závislosti. Výsledky počtů MO po kontaminaci reálných vzorků v závislosti na podmínkách a čase jsou uvedeny v grafech 1 – 4.



GRCH = koncentrace glukosy v sirupu 70%

GNCH = koncentrace glukosy v sirupu 51%

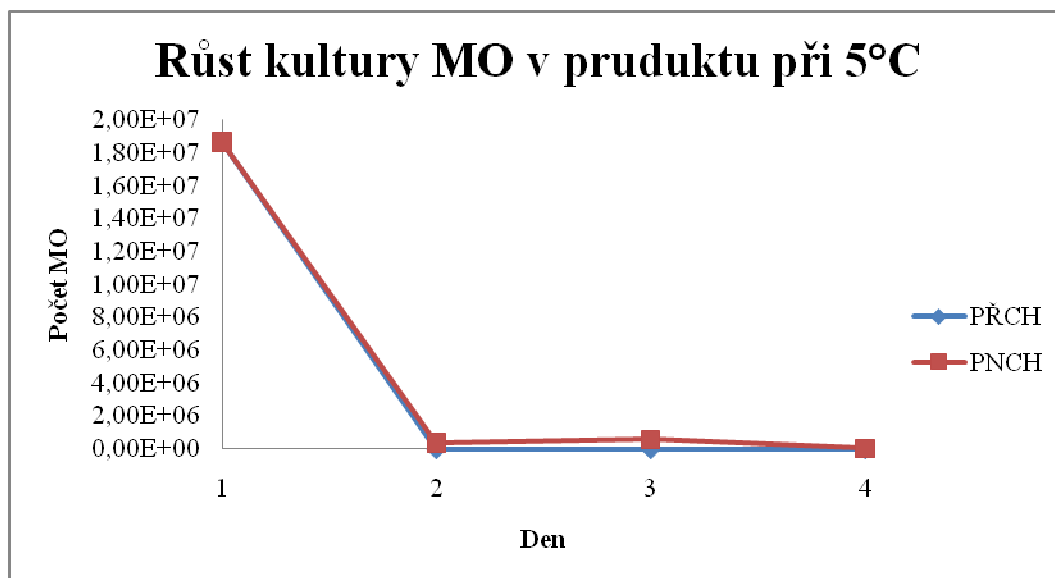
Graf 1 Grafické znázornění počtu MO v surovině v závislosti na čase při 5°C



GRT = koncentrace glukosy v sirupu 70%

GNT = koncentrace glukosy v sirupu 51%

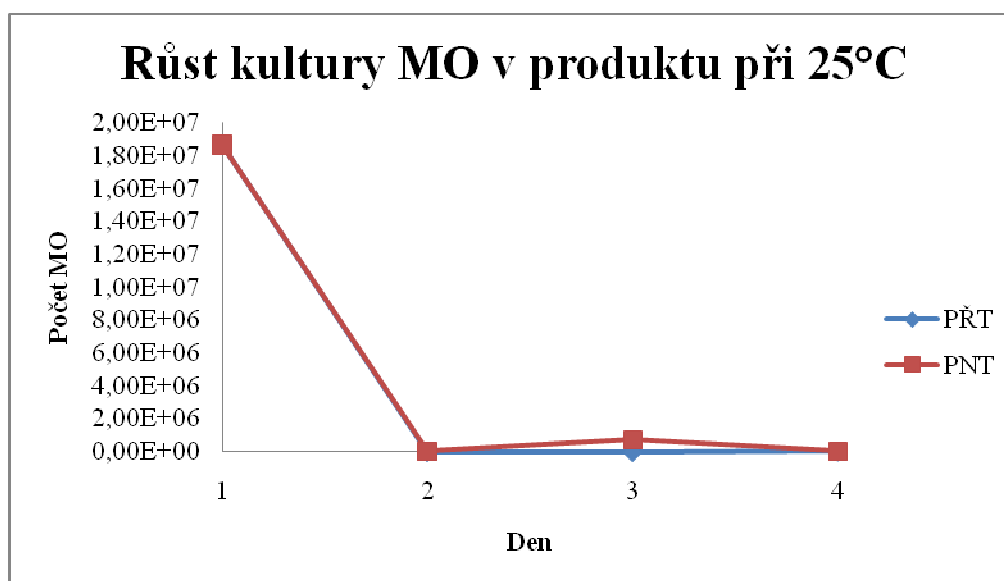
Graf 2 Grafické znázornění počtu MO v surovině v závislosti na čase při 25°C



PŘCH = koncentrace glukosy v produktu 51%

PNCH = koncentrace glukosy v produktu 12%

Graf 3 Grafické znázornění počtu MO v produktu v závislosti na čase při 5°C



PŘT = koncentrace glukosy v produktu 51%

PNT = koncentrace glukosy v produktu 12%

Graf 4 Grafické znázornění počtu MO v produktu v závislosti na čase při 25°C

Teplota vnějšího prostředí je sice jedním z hlavních faktorů, které ovlivňují rychlost rozmnožování mikroorganismů, ale i složení media je jedním z limitujících faktorů růstu MO. [1] Z grafů 1 a 2 je patrné, že v průběhu skladování kontaminovaných vzorků nedocházelo k pomnožení MO. I když množství MO ve vzorcích bylo na začátku experimentu shodné, projevil se na přežívání MO v glukosovém sirupu vliv teploty.

Při teplotě 5°C (Graf 1) po 4 dnech přežívalo ještě $1,32 \cdot 10^7$ MO, což je v porovnání s počátečním počtem 71%. V případě nižší koncentrace glukosy přežívalo 4. den ještě $5,03 \cdot 10^6$ MO. Když provedeme stejné porovnání s počátečním počtem MO, tak je to 27% počátečního počtu MO. Při teplotě 25°C (Graf 2) se ochranný efekt teploty neprojevil. Již třetí den přežívalo v sirupu o koncentraci 70% glukosy 5% a v sirupu o koncentraci 51% glukosy přežívalo již jen 1% z původní populace.

Z pokusů vyplývá, že když dojde ke kontaminaci suroviny, je růst MO vlivem vysoké koncentrace glukosy inhibován. Bylo zjištěno, že při nižší skladovací teplotě (5°C) přežívá po 4 dnech uchovávání vyšší počet životaschopných MO, než při uchovávání při vyšší teplotě (25°C).

V případě produktu [REDACTED] multivitamin (Graf 3 a 4), který obsahoval nejen cukr, ale také i další příměsi (konzervanty), bylo zjištěno, že již druhý den od kontaminace vzorku je v něm přítomno 0% životaschopných MO. I když byla třetí den zaznamenána přítomnost minimálního počtu MO, čtvrtý den byl počet opět nulový. Vliv teploty úchovy se tak výrazně neprojevil, jako v případě úchovy glukosového sirupu bez přídavku konzervantů.

Z pokusů vyplývá, že když surovina nebo produkt neobsahují konzervační látku, a dojde k jejich kontaminaci zmíněným mikroorganismem, musí mít takovou koncentraci glukosy, která inhibuje jeho růst a rozmnožování. Na množství přežívající kontaminační mikroflory má také vliv teplota úchovy.

Z grafických závislostí (Graf 1 – 4) je patrné, že růst mikroorganismu *Leuconostoc mesenteroides* je silně ovlivněn jak teplotou, tak i koncentrací substrátu. Oba tyto faktory působí na jeho růst inhibičně, proto počty MO v průběhu času klesají. Růst je ovlivněn také přítomností konzervačních prostředků (benzoan sodný), což se projevilo strmějším poklesem křivky grafické závislosti počtu MO, která charakterizovala tento stav v produktu.

4.3 Ověření kvality vybraných kultivačních medií na reálných vzorcích (nižší koncentrace glukosy)

Byla zkoumána možnost růstu a rozmnožování *Leuconostoc mesenteroides* v prostředích produktu a substrátu s nižšími koncentracemi glukosy. Koncentrace glukosy byla snížena na 5%, což je hodnota uváděná v literatuře, jako optimální koncentrace glukosy v mediu pro růst *Leuconostoc mesenteroides*.^[45]

V tabulce 12 je charakterizováno množství MO v 1 ml suspenze připravené ze sbírkového MO, kterou byly kontaminovány reálné vzorky. Ředění suspenze 10^3 bylo vybráno z hlediska počitatelnosti na základě výsledků při kultivaci čisté kultury. V příloze v tabulkách 13, 14, 15 jsou shrnuty počty MO v reálných vzorcích po 1, 2, 3 dnech od kontaminace reálných vzorků (suroviny a produktu) čistou kulturou. Počty životaschopných MO byly stanoveny nepřímou metodou.

Tabulka 9 Stanovení počtu MO v suspenzi, kterou byly infikovány reálné vzorky (počáteční množství MO v 1 ml suspenze)

10 (-3)						
Miska	1	2	3	Průměr	4	Počet
APT	6	13	19	13	0	126667
LEU	+	+	+		-	

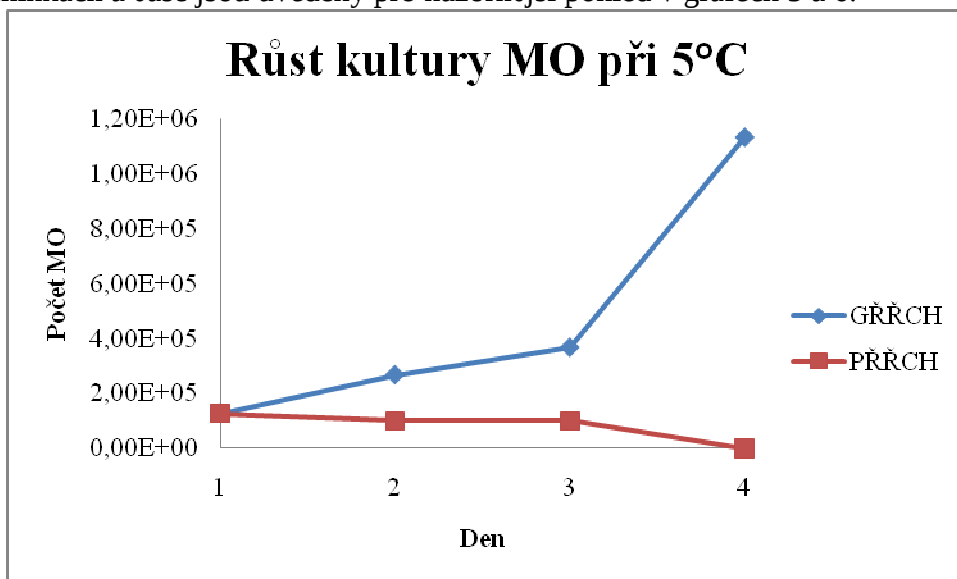
APT = APT Agar

LEU = modifikovaný Plate Count Agar

+ = produkce dextranu

- = bez produkce dextranu

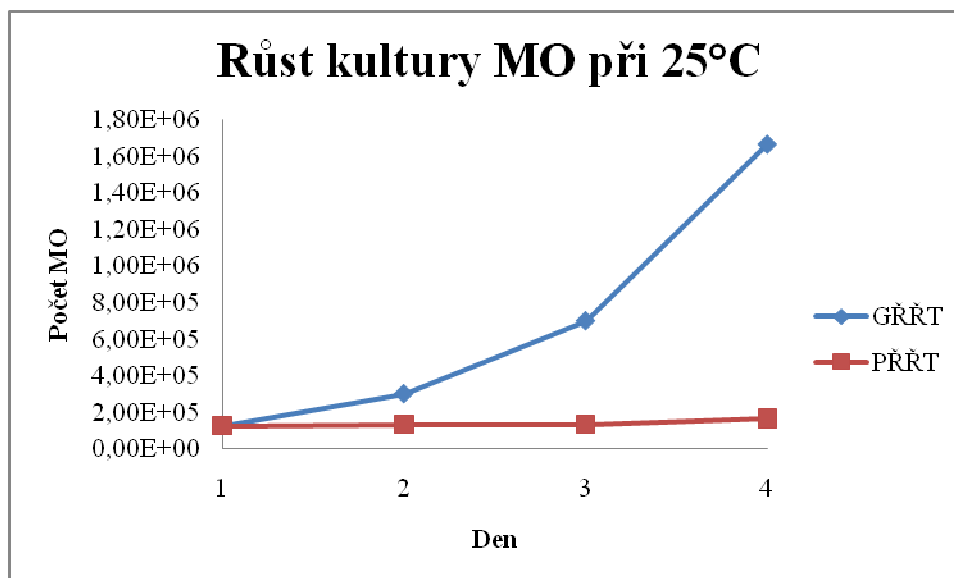
Vybrané reálné vzorky byly kontaminovány výše uvedenou suspenzí (Tabulka 12) a následně skladovány v průběhu čtyř dnů při teplotě 5°C a 25°C. Z každého kontaminovaného vzorku byl pak v pravidelných časových intervalech odebrán 0,1 ml vzorku a nepřímou metodou byl stanoven počet živých buněk MO. Na základě hodnot uvedených v tabulkách 13 – 15 přílohy (strany 53 a 54), byly zpracovány grafické závislosti. Výsledky počtů MO po kontaminaci reálných vzorků v závislosti na podmínkách a čase jsou uvedeny pro názornější pohled v grafech 5 a 6.



GŘŘCH = koncentrace glukosy v sirupu 5%

PŘŘCH = koncentrace glukosy v produktu 5%

Graf 5 Grafické znázornění počtu MO v produktu v závislosti na čase při 5°C



GŘŘT = koncentrace glukosy v sirupu 5%

PŘŘT = koncentrace glukosy v produktu 5%

Graf 6 Grafické znázornění počtu MO v produktu v závislosti na čase při 25°C

Při teplotě 5°C (Graf 5) se po 4 dnech zvýšil počet přežívajících MO v glukosovém sirupu o koncentraci glukosy 5% v porovnání s počátečním počtem devítinásobně. V případě produktu o stejné koncentraci glukosy (Graf 5) počet přežívajících MO, stanovených nepřímou metodou neustále klesal až do jeho úplné nepřítomnosti po 4 dnech od kontaminace produktu. Při teplotě 25°C (Graf 6) se projevil vliv teploty na růst MO, která jej stimulovala. Počet životaschopných MO stanovených nepřímou metodou v glukosovém sirupu byl po uplynutí 4 dnů od kontaminace dokonce třináctinásobný. Počet MO v produktu, uchovávaného při 25°C (Graf 6), se příliš nezměnil. Jeho počet vzrostl o 10%.

Z pokusů vyplývá, že při koncentraci glukosy 5% surovině dochází ke zvýšení počtu buněk MO.

V případě produktu [redacted] multivitamin, který obsahoval nejen cukr, ale také i další příměsi (konzervanty), bylo zjištěno, že teplota 25°C částečně stimuluje růst počtu kontaminačního MO i přes přítomnost konzervantů. V případě uchovávání vzorku při teplotě 5°C nebyla po 4 dnech zjištěna přítomnost leukonostoka. Na zvýšení počtu MO nemá výrazný vliv teplota, zatímco u produktu teplota tento vliv má.

Z pokusů vyplývá, že pokud dojde ke kontaminaci zmíněným mikroorganismem, zvýší se počet MO v surovině při koncentraci 5% glukosy při skladování za obou uvedených teplot. Počet životaschopných MO v produktu, který obsahuje konzervační látky, je závislý na teplotě. Při teplotě 5°C dojde k jeho úhynu, při teplotě 25°C může dojít k jeho mírnému pomnožení v produktu o koncentraci glukosy 5%.

Z grafických závislostí je patrné, že růst mikroorganismu *Leuconostoc mesenteroides* je ovlivněn jak teplotou, tak i koncentrací substrátu, což bylo zmíněno již ve zhodnocení výsledků předchozích pokusů (kapitola 4.2 na straně 33). Z grafů 5 a 6 je patrné, že nižší koncentrace glukosy v prostředí umožňuje růst MO. Vliv konzervačních prostředků na inhibici růstu MO není příliš závislý na teplotě. Z grafů 5 a 6 vyplývá, že konzervační prostředky inhibují růst MO nezávisle na teplotě.

4.4 Zjištění možného zdroje kontaminace leukonostokem

Potravinářské suroviny jsou ve většině případů neudržitelné materiály, které podléhají nežádoucím změnám. Významné jsou zejména takové změny potravin, které vedou ke vzniku zdravotních nebezpečí z potravin. O znalosti změn probíhajících v potravinách se opírá část systému kritických bodů HACCP. Která analyzuje nebezpečí kontaminace. [1]

Vzhledem k předchozím výsledkům, které potvrdily možnost výskytu leukonostoka, byly zkontrolovány všechny předpokládané zdroje možné kontaminace produktu. Byla proto provedena na všech vybraných místech analýza ovzduší a byly provedeny rovněž stěry z linky. Kontrolovaná místa byla v souladu se systémem HACCP.

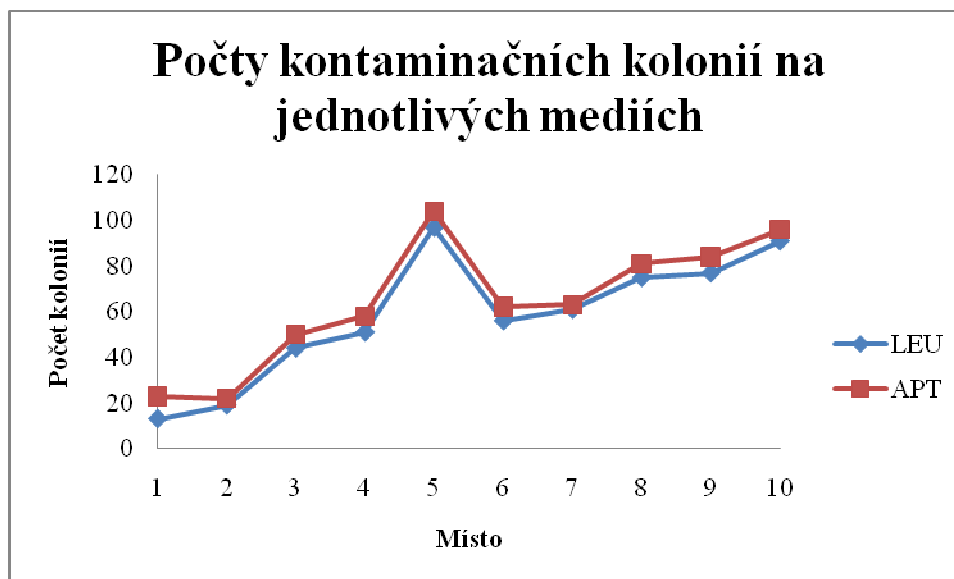
V Tabulce 16 jsou shrnuta místa a označení jednotlivých míst pro zdroj možné kontaminace leukonostokem ve výrobě. Tabulka 17 udává počty MO z jednotlivých odběrů. Jednotlivé MO, které byly přítomny ve vzduchu, nebo ve stěrech nebyly přesně určeny, byla pouze sledována přítomnost *Leuconostoc mesenteroides*, která nebyla prokázána. Graf 7 znázorňuje počty MO zjištěných na jednotlivých místech výrobního procesu, které byly v souladu s HACCP při kultivaci na APT Agar a modifikovaném Plate Count Agar.

Tabulka 10 Označení míst a druhu analýzy zdroje možné kontaminace produktu

Druh analýzy	Místnost	Označení vzorku	Druh analýzy	Místo	Označení vzorku
Sedimentační analýza vzduchu	MIBI	1	Stěry	Plnicí jehly	1S
	Sirupárna ST	2		Dráha vršku	2S
	SID I plnič	3		Šnek	3S
	Mezi SID I a SID II	4		Plocha	4S
	SID II plnič	5		Zás. vršků	5S
	Krones plnič	6			
	Krones myčka	7			
	Sir. Hala	8			
	Gs hala	9			
	Venku	10			

Tabulka 11 Počty kolonií na jednotlivých místech odběru vzorku

Označení vzorku	Počet kolonií LEU (modifikovaný Plate Count Agar)	Počet kolonií APT (APT Agar)	Označení vzorku	Počet kolonií LEU	Počet kolonií APT
1	13	23	1S	0	0
2	19	22	2S	7	1
3	44	50	3S	N	N
4	51	58	4S	N	N
5	97	104	5S	N	N
6	56	62			
7	61	63			
8	75	81			
9	77	84			
10	91	96			



APT = APT Agar

LEU = modifikovaný Plate Count Agar

Graf 7 Počty kolonií v závislosti na kultivačním mediu a místu odběru

Mikroorganismy, které byly přítomny ve vzduchu, nebo ve stěrech nebyly přesně určeny, byla pouze sledována přítomnost *Leuconostoc mesenteroides* na základě selektivního znaku produkce dextranového slizu, která nebyla prokázána.

Při vyhodnocení počtů narostlých kolonií na mediu LEU, nebyly pozorovány kolonie produkující extracelulární polysacharid. Na základě vizuálního posouzení lze říci, že ani analýzou vzduchu a ani stěrů, nebyl zjištěn přítomný *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*.

Z grafu vyplývá, že nejvíce kolonií MO bylo přítomno ve vzduchu v místě SID II, nejméně pak v místnosti mikrobiologické laboratoře. Ani v jednom případě nebylo překročeno povolené limitní množství kolonií.

5 ZÁVĚR

V praktické části byly otestovány komerční živná media používaná pro mikrobiologický rozbor potravin, vliv koncentrace glukosy, teploty a přítomnosti konzervačních prostředků, na růst *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*.

Byla provedena kultivace čisté kultury na různých mediích a na základě výše diskutovaných výsledků byla vybrána media pro další práci na experimentální části.

Bylo zjištěno, že největší vliv na růst *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, má koncentrace glukosy v prostředí. Koncentrace 12%, 51% a 70% glukosy inhibovala růst a po čtyřech dnech nebyl stanoven žádný MO v prostředí. Velkou roli hraje při růstu tohoto mikroorganismu také přítomnost konzervačních prostředků (benzoan sodný). Podle uvedených výsledků ovlivňuje růst také teplota, ale její vliv není tak zásadní, jako v případě vlivu koncentrace glukosy a konzervačních prostředků.

Sledována byla rovněž možnost výskytu *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, jako možného kontaminantu ve výrobním prostředí [REDACTED] která se nepotvrdila.

Z hlediska výrobní praxe je závěr celé experimentální části následující:

Leuconostoc mesenteroides subsp. *dextranicum*, se běžně ve výrobních prostorách nevyskytoval. Jeho přítomnost v hotových produktech, nebo v surovinách je možná pouze při nedodržení správných výrobních postupů (nejvíce je závislá na koncentraci glukosy), potom by se mohl případný náhodný *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, který by se vyskytnul v prostředí, stát možným zdrojem mikrobiologické kontaminace.

Pro detekci *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* je vhodné používat mikrobiologický rozbor založený na použité kultivační metodě v této bakalářské práci. Jako médium je vhodné použít APT Agar, dodávaný firmou MERCK a Plate Count Agar, modifikovaný podle instrukcí v experimentální části, dodávaný rovněž firmou MERCK.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Voldřich, Michal. *Technologie potravin I*. Praha: Vysoká škola chemicko - technologická v Praze, 2002. Výroba nealkoholických nápojů, s. 228 - 235. ISBN 80-7080-509-9.
- [2] Kocková - Kratochvílová, Anna; Tomášek, Karol; Ondříšková, Margita. *Biologická kontrola výroby piva a nealkoholických nápojov*. Bratislava: ALFA, 1980. Zdroje kontaminace ve výrobním procesu, s. 267 - 283
- [3] Šilhánková, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Praha: Victoria publishing, 1995. Základní struktura mikrobiálních buněk, s. 27-56. ISBN 80-85605-71-6.
- [4] Busse, H-J., Denner, E. B. M., Lubitz, W. 1996. *Classification and identification of bacteria: current approaches to an old problem*. Overview of methods used in bacterial systematics. J. Biotechnol. 47:3-38
- [5] Persing, D. H., Smith T. F., Tenover, F. C., White, T. J. (editors). 1993. *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. ASM, Washington, D.C.
- [6] Stackebrandt, E. (Ed.) 2006. *Molecular Identification, Systematics, and Population structure of Prokaryotes*. Springer, Germany.
- [7] Stackebrandt, E., Goebel, B. M. 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. Int. J. Syst. Bacteriol. 44:846-849.
- [8] Sedláček, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova universita, 2007. Kmen firmicutes, s. 250. ISBN 80-210-4207-9.
- [9] Görner, Fridrych ; Valík, Ľubomír. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. 1. vydání. Bratislava: Malé centrum, 2004. Úlohy a význam mikroorganismů v potravinářství, s. 144 - 148. ISBN 80-967064-9-7.
- [10] Dostupné z: <<http://www.biology.estranky.cz/clanky/biochemie/metabolismus-sacharidu>>
- [11] Vodrážka, Zdeněk. *Biochemie pro studenty středních škol: a všechny, které láká tajemství živé přírody*. 1. vydání. Praha: Scienta, 1998. Od objevu genu ke genovému inženýrství, s. 127 - 136. ISBN 80-7183-083-6.
- [12] Vodrážka, Zdeněk. *Biochemie*. 1 st edition. Praha : Academia, 2002. Živý systém jako chemický stroj, s. 57 – 59; 116 - 118.
- [13] Mathews, C. K., van Holde, K. E.: *Biochemistry*. Benjamin/Cummings, Redwood City 1990.
- [14] Fasman, G. D.: *Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*. CRC Press, London 1989.
- [15] Bu'lock, J. D., Nisbet, L. J., Winstanley, D. J. (Eds): *Bioactive Microbial Products: Search and Discovery*. Academic Press, London 1982

- [16] Neely, W. B. (1960) Dextran: structure and synthesis, in: *Adv. Carbohydr. Chem.*(Wolform, M. L.,Tipson, R. S., Eds.), New York: Academic Press, 341 – 369, Vol. 15.
- [17] Pasteur, L. (1861) On the viscous fermentation and the butyrous fermentation, *Bull. Soc. Chim. Paris*, 30 – 31
- [18] Scheibler, C. (1874) Investigation on the nature of the gelatinous excretion (so-called frog's spawn) which is observed in production of beet-sugar juices, *Z. Ver. Dtsch. Zucker-Ind.* 24, 309 – 335
- [19] Van Tieghem, P. (1878) On sugar-mill gum, *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.* 7, 180 – 203
- [20] Gromwall, A., Ingelman, B. (1945) Dextran as a substitute for plasma, *Nature* 155, 45
- [21] Van Cleve, J. W., Schaefer, W. C., Rist, C. E. (1956) The structure of NRRL B-512 dextran, Methylation studies, *J. Amer. Chem. Soc.* 78, 4435 – 4438
- [22] Larm, O., Lindberg, B., Svensson, S. (1971) Studies on the lenit of the side chaos of the dextran elaborated by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-12, *Carbohydr. Res.* 20, 39 – 48
- [23] Kuge, T., Kobayashi, K., Kitamura, S., Tanahashi, H. (1987) Degrees on long.chain branching in dextrans, *Carbohydr. Res.* 160, 205 – 214
- [24] Jeanes, A. (1977) Dextran, in: *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, (Mark, H. F.;Bikales, N. M.; Overberger, C. G.;Menges, G.;Kroschwitz, J. I., Eds.). New York: John Wiley and Sons, 752 – 767, Vol. 4.
- [25] Côté, G. L., Robyt, J. F. (1982) Isolation and partial characterization of an extracellular glucansucrase from *L. mesenteroides* NRRL B-1355 that synthesizes and alternativ (1 – 6), (1 – 3) α -D-glucan, *Carbohydr. Res.* 101, 57 – 74
- [26] Misaki, A., Torii, M., Sawai, T., Goldstein, I. J. (1980) Structure of the dextran of *Leuconostoc mesenteroides* B:1355, *Carbohydr. Res.* 84, 273 – 285
- [27] Côté, G. L., Ahlgren, J. A., Smith, M. R. (1999) Some structural feature sof an insolube α -D-glucan from *L. mesenteroides* NRRL B-1355, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 23, 656 – 660
- [28] Antonini, E. et al. Biopolymers, 2, 27 (1964)
- [29] Senti, F. R. etal. *J. Polym. Sci.* 17, 527 (1955)
- [30] Loesche, W. J. (1986) Role of Streptococcus mutant in human dental decay, *Microbiol Rev.* 50, 353 - 380
- [31] Shimamura, A., Tsumori, H., Mukasa, H. (1982) Purification and properties of *Streptococcus mutant* extracellular glycosyltranferase, *Biochim. Biophys. Acta* 702, 72 – 80
- [32] Quirasco, M., Lopez-Munguira, A., Remaud-Simeon, M., Monsan, P., Farres, A. (1999) Introduction and trancriptional studie sof the dextransucrase gene in *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F, *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5504 – 5509
- [33] Kim, H., Kim, D., Ryu, W-H., Robyt, J. F. (2000) Cloning and sequencing of α (1 – 6) dextransucrase gene from *Leuconostoc mesenteroides* B-742CB, *J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 559 - 563

- [34] Dols, M., Remaud-Simeon, M., Willemot, R.-M., Vignon, M., Monsan, P. F. (1997) Characterization of dextransucrases from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 62, 47 – 59
- [35] J. F. Roby et. Al. Carbohydrate Research 343 (2008) 3039 – 3048
- [36] Hiraoka, N., Fukumoto, J., Tsuru, D. (1972) Studies on mold dextranases:III Purification and some enzymatic properties of *Aspergillus carneus* dextranase, *J. Biochem.* 71, 57 - 64
- [37] Godfrey, T. (1983) Dextranase and sugar processing, in:*Industrial Enzymology. The application of enzymes in industry* (Godfrey, T., Reichelt, T., Eds.), New York: Nature Press 433 – 424
- [38] Day, D. F., Kim, D. (1992) Process for the production of dextran polymer of controlled molecular size and molecular size distributions. U.S. Patent 5, 229, 277
- [39] Jeanes, A. (1986) Immunochemical and related interactions with dextrans reviewed in terms of improved structural information. *Mol. Immun.* 23, 999 – 1028
- [40] Vandamme, E. J.; De Baets, S.; Steinbuchel, A. *Biopolymers : Polysaccharides I*. Volume 5. Weinheim: Wiley-vch verlag GmbH, 2002. Dextran, s. 299-313. ISBN 3-527-30226-3.
- [41] Evans, J. B., a. Niven, C. F.: Nutrition of the Heterofermentative Lactobacilli that cause greening of cured meat products. – *J. Bact.*, 62; 599-603 (1951).
- [42] American Health Public Association: Compendium of the Methods for the Microbiological Examination of Foods – 3rd ed., 1992.
- [43] Murdock, D. I., Follinazo, J. F., a. Troy, V. S.: Evaluation of plating media for citrus concentrates. – *Food Technol.*, 6; 181 – 185
- [44] Katalog MERCK
- [45] Dostupné z: <<http://www.sci.muni.cz/ccm/>>

SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

- [1] Foto výrobních prostor Kofola a.s.
- [2] Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Kategorie:Tvary_bakteri%C3%AD>
- [3] Dostupné z: <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Bakterie>>
- [4] Dostupné z:
<http://www.betalaktamazy.cz/file.php/1/Bunecnastena/bunecna_stena.jpg>
- [5] Dostupné z:
<http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://www.sci.muni.cz/ptacek/CYTOLOGIE6_soubory/image033.jpg&imgrefurl=http://www.sci.muni.cz/ptacek/CYTOLOGIE6.htm&usq=__txl55t1FNCJPCF4J4RpsjbUH5uc=&h=347&w=380&sz=59&hl=cs&start=2&um=1&itbs=1&tbnid=yqNf5sMNBm9RJM:&tbnh=112&tbnw=123&prev=/images%3Fq%3Dcytoplazmatick%25C3%25A1%2Bmembr%25C3%25A1na%26um%3D1%26hl%3Dcs%26lr%3D%26tbs%3Disch:1>
- [6] Dostupné z: <http://nd01.blog.cz/494/051/faa2096a0f_41337526_o2.jpg>
- [7] Veselá, Mária; Drdák, Milan. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. Brno : [s.n.], 1998. Očkování a kultivace mikroorganismů, s. 20 - 22.
- [8] Dostupné z:
<http://images.google.cz/imgres?imgurl=http://www.biology.estranky.cz/archiv/io_brazek/70&imgrefurl=http://www.biology.estranky.cz/clanky/biochemie/metabolismus-sacharidu&usq=__FbKJWdubeQFB3efG0sDGn8r6tFY=&h=384&w=490&sz=32&hl=cs&start=1&um=1&itbs=1&tbnid=zHHYrm5s6u-RXM:&tbnh=102&tbnw=130&prev=/images%3Fq%3Dpentosov%25C3%25BD%2Bcyklus%26um%3D1%26hl%3Dcs%26lr%3D%26tbs%3Disch:1>
- [9] Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Kyselina_hyaluronov%C3%A1>
- [10] Dostupné z:
<http://www.bombayharbor.com/productImage/11194191612187919759dextran-Fig/Dextran_10.jpg>
- [11] Senti, F. R. et al. *J. Polym. Sci.* 17, 527 (1955)
- [12] J. F. Roby et. Al. *Carbohydrate Research* 343 (2008) 3039 – 3048
- [13] Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/life-science/biochemicals/migrationbiochemicals1/dextranase_dextrans.Par.0001.Image.391.gif>
- [14] Veselá, Mária; Drdák, Milan. *Praktikum z obecné mikrobiologie*. Brno : [s.n.], 1998. Stanovení počtu buněk, s. 36 - 40.
- [15] Fotodokumentace výsledků experimentální části

SEZNAM SYMBOLŮ, VELIČIN A ZKRATEK

DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
ATP	Adenosintrifosfát
GTP	Guanosintrifosfát
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfát
Glu	Kyselina glutamová
Asp	Kyselina asparágová
G	Glycin
C	Cytosin
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
MO	Mikroorganismus (<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>)
(g)	gramů

SEZNAM PŘÍLOH

A	Tabulky	49
A.1	Tabulka 9 Shrnutí počtů MO v různých prostředích po 1 dni od kontaminace reálných vzorků	49
A.2	Tabulka 10 Shrnutí počtů MO v různých prostředích po 2 dnech od kontaminace reálných vzorků	51
A.3	Tabulka 11 Shrnutí počtů MO v různých prostředích po 3 dnech od kontaminace reálných vzorků	52
A.4	Tabulka 13 Shrnutí počtů MO v různých prostředích po 1 dni od kontaminace reálných vzorků	53
A.5	Tabulka 14 Shrnutí počtů MO v různých prostředích po 2 dnech od kontaminace reálných vzorků	53
A.6	Tabulka 15 Shrnutí počtů MO v různých prostředích po 3 dnech od kontaminace reálných vzorků	54
B	Obrázková příloha	54
B.1	Pracovní suspenze	54
B.2	Výsledky sedimentační analýzy vzduchu a stěrů z linky	56

A TABULKY

A.1 Tabulka 9 Shrnutí počtů MO v různých prostředích po 1 dni od kontaminace reálných vzorků

Druhý den po infekci							
APT	Miska	1	2	3	Průměr	4	Počet
	GŘCH	120	128	150	133	0	13266667
	GNCH	157	173	128	153	0	15266667
	GČCH	0	0	0	0	0	0
	GŘT	41	60	69	57	0	5666667
	GNT	97	137	123	119	0	11900000
	GČT	0	0	0	0	0	0
	PŘCH	0	0	0	0	0	0
	PNCH	1	8	2	4	0	366666
	PČCH	0	0	0	0	0	0
	PNT	1	0	0	0	0	33333
	PŘT	0	0	0	0	0	0
	PČT	0	0	0	0	0	0
LEU	GŘCH	+	+	+		-	
	GNCH	+	+	+		-	
	GČCH	-	-	-		-	
	GŘT	+	+	+		-	
	GNT	+	+	+		-	
	GČT	-	-	-		-	
	PŘCH	-	-	-		-	
	PNCH	+	+	+		-	
	PČCH	-	-	-		-	
	PNT	-	-	+		-	
	PŘT	-	-	-		-	
	PČT	-	-	-		-	

GNT	Roztok glukosového sirupu (kontaminovaný MO) o konc. glukosy 70%, skladovaný při 25°C
GŘT	Roztok glukosového sirupu (kontaminovaný MO) o konc. glukosy 51%, skladovaný při 25°C
GČT	Roztok glukosového sirupu (bez kontaminace MO) o konc. glukosy 70%, skladovaný při 25°C
GNCH	Roztok glukosového sirupu (kontaminovaný MO) o konc. glukosy 70%, skladovaný při 5°C
GŘCH	Roztok glukosového sirupu (kontaminovaný MO) o konc. glukosy 51%, skladovaný při 5°C
GČCH	Roztok glukosového sirupu (bez kontaminace MO) o konc. glukosy 70%, skladovaný při 5°C
PNT	Roztok produktu (kontaminovaný MO) o konc. glukosy 51%, skladovaný při 25°C
PŘT	Roztok produktu (kontaminovaný MO) o konc. glukosy 12%, skladovaný při 25°C
PČT	Roztok produktu (bez kontaminace MO) o konc. glukosy 51%, skladovaný při 25°C
PNCH	Roztok produktu (kontaminovaný MO) o konc. glukosy 51%, skladovaný při 5°C
PŘCH	Roztok produktu (kontaminovaný MO) o konc. glukosy 12%, skladovaný při 5°C
PČCH	Roztok produktu (bez kontaminace MO) o konc. glukosy 51%, skladovaný při 5°C
LEU	Modifikovaný (podle instrukcí v praktické části) Plate Count agar, dodávaný firmou MERCK
APT	APT Agar dodávaný běžně firmou MERCK

A.2 Tabulka 10 Shrnutí počtů MO v různých prostředích po 2 dnech od kontaminace reálných vzorků

	Třetí den po infekci						
APT	Miska	1	2	3	Průměr	4	Počet
	GŘCH	100	101	118	106	0	10633333
	GNCH	190	180	197	189	0	18900000
	GČCH	0	0	0	0	0	0
	GŘT	2	0	3	2	0	166666
	GNT	7	13	5	8	0	833333
	GČT	0	0	0	0	0	0
	PŘCH	0	0	0	0	0	0
	PNCH	0	16	1	6	0	566666
	PČCH	0	0	0	0	0	0
	PNT	21	1	0	7	0	733333
	PŘT	0	0	0	0	0	0
	PČT	0	0	0	0	0	0
LEU	GŘCH	+	+	+		-	
	GNCH	+	+	+		-	
	GČCH	-	-	-		-	
	GŘT	+	+	+		-	
	GNT	+	+	+		-	
	GČT	-	-	-		-	
	PŘCH	+	-	-		-	
	PNCH	+	-	+		-	
	PČCH	-	-	-		-	
	PNT	-	-	+		-	
	PŘT	-	-	-		-	
	PČT	-	-	-		-	

A.3 Tabulka 11 Shrnutí počtů MO v různých prostředích po 3 dnech od kontaminace reálných vzorků

	Čtvrtý den po infekci						
APT	Miska	1	2	3	Průměr	4	Počet
	GŘCH	56	42	53	50	0	5033333
	GNCH	159	121	117	132	0	13233333
	GČCH	0	0	0	0	0	0
	GŘT	48	0	0	16	0	1600000
	GNT	0	0	0	0	0	0
	GČT	0	0	0	0	0	0
	PŘCH	0	0	0	0	0	0
	PNCH	0	0	1	0	0	33333,33
	PČCH	0	0	0	0	0	0
	PNT	1	0	0	0	0	33333,33
	PŘT	0	1	0	0	0	33333,33
	PČT	0	0	0	0	0	0
LEU	GŘCH	+	+	+		-	
	GNCH	+	+	+		-	
	GČCH	-	-	-		-	
	GŘT	-	-	+		-	
	GNT	-	-	-		-	
	GČT	-	-	-		-	
	PŘCH	-	-	-		-	
	PNCH	-	-	+		-	
	PČCH	-	-	-		-	
	PNT	+	-	-		-	
	PŘT	+	-	-		-	
	PČT	-	-	-		-	

A.4 Tabulka 13 Shrnutí počtů MO v různých prostředích po 1 dni od kontaminace reálných vzorků

	První den po infekci						
APT	Miska	1	2	3	Průměr	4	Počet
	GŘŘCH	2	3	3	3	0	266667
	GŘŘT	3	4	2	3	0	300000
	PŘŘCH	1	0	2	1	0	100000
	PŘŘT	1	1	2	1	0	133333
LEU	GŘŘCH	+	+	+		-	
	GŘŘT	+	+	+		-	
	PŘŘCH	+	+	+		-	
	PŘŘT	+	+	+		-	

GŘŘCH Roztok glukosového sirupu (kontaminovaný MO) o konc. glukosy 5%, skladovaný při 5°C

GŘŘT Roztok glukosového sirupu (kontaminovaný MO) o konc. glukosy 5%, skladovaný při 25°C

PŘŘCH Roztok produktu (kontaminovaný MO) o konc. glukosy 5%, skladovaný při 5°C

PŘŘT Roztok produktu (kontaminovaný MO) o konc. glukosy 5%, skladovaný při 25°C

A.5 Tabulka 14 Shrnutí počtů MO v různých prostředích po 2 dnech od kontaminace reálných vzorků

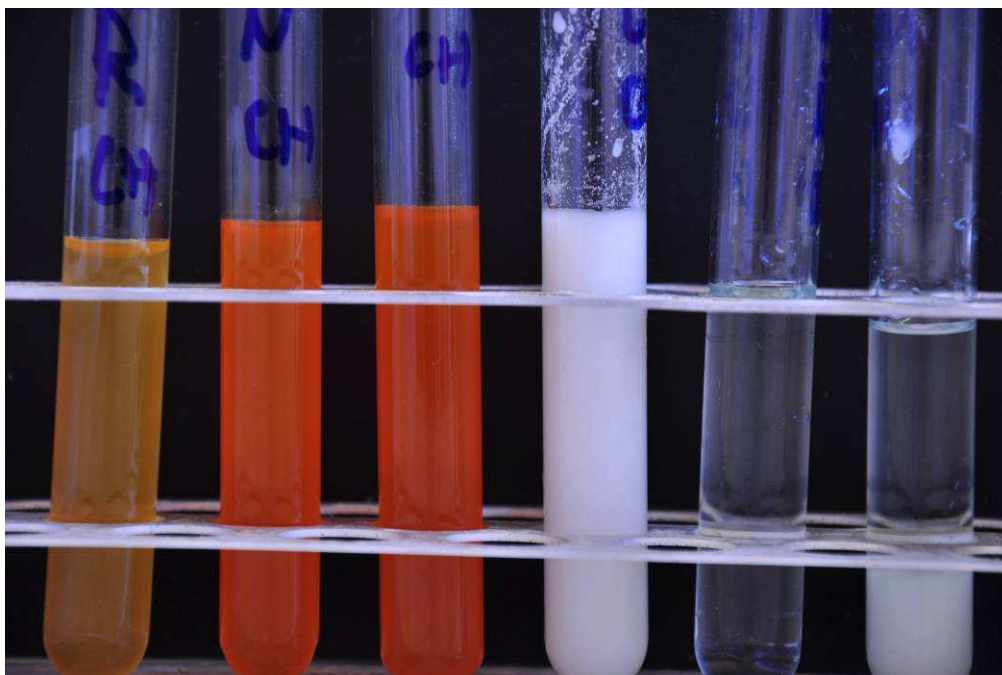
	Druhý den po infekci						
APT	Miska	1	2	3	Průměr	4	Počet
	GŘŘCH	2	4	5	4	0	366667
	GŘŘT	5	9	7	7	0	700000
	PŘŘCH	1	1	1	1	0	100000
	PŘŘT	1	2	1	1	0	133333
LEU	GŘŘCH	+	+	+		-	
	GŘŘT	+	+	+		-	
	PŘŘCH	+	+	+		-	
	PŘŘT	+	+	+		-	

A.6 Tabulka 15 Shrnutí počtů MO v různých prostředích po 3 dnech od kontaminace reálných vzorků

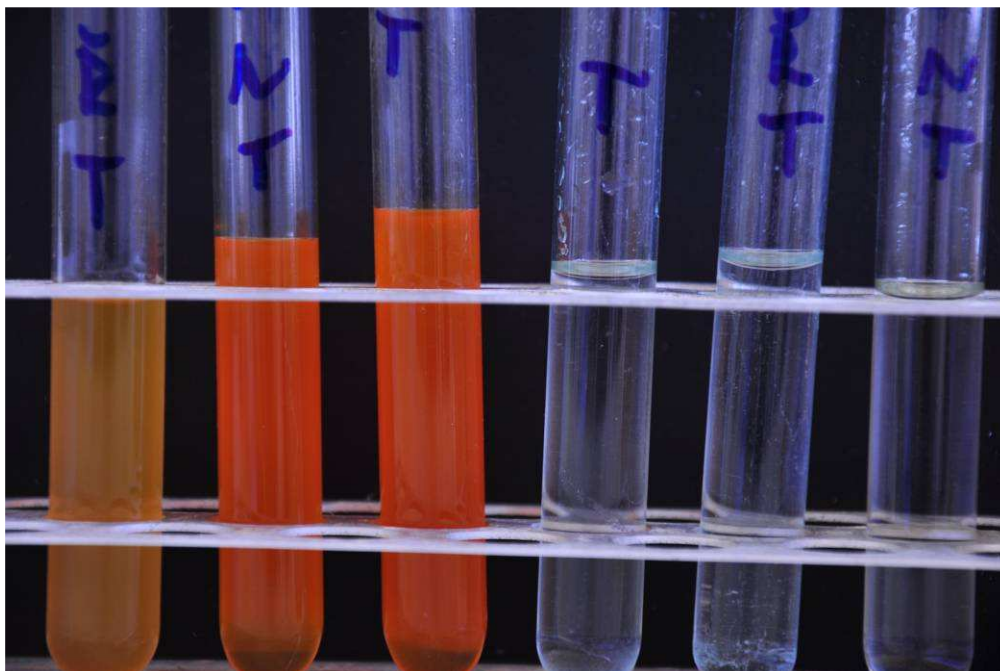
Třetí den po infekci							
APT	Miska	1	2	3	Průměr	4	Počet
	GŘŘCH	13	10	11	11	0	11333333
	GŘŘT	15	17	18	17	0	1666667
	PŘŘCH	0	0	0	0	0	0
	PŘŘT	2	1	2	2	0	166667
LEU	GŘŘCH	+	+	+		-	
	GŘŘT	+	+	+		-	
	PŘŘCH	-	-	-		-	
	PŘŘT	+	-	+		-	

B OBRÁZKOVÁ PŘÍLOHA

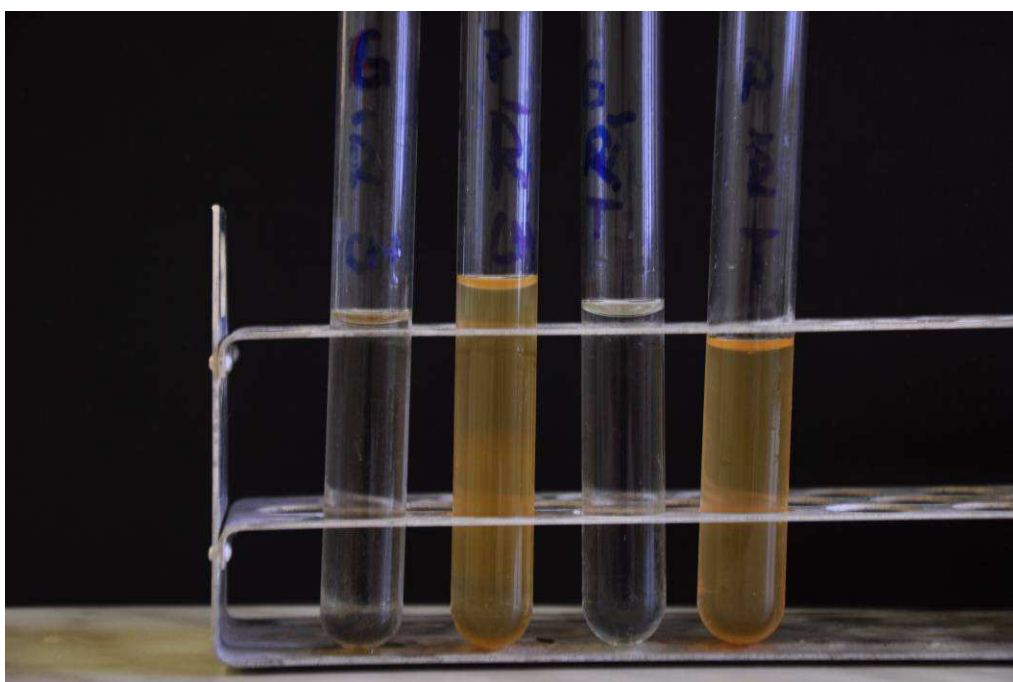
B.1 Pracovní suspenze



Obrázek 21 Kontaminované a kontrolní suspenze pro stanovení počtu MO při teplotě 5°C (vyšší koncentrace glukosy) [15]



Obrázek 22 Kontaminované a kontrolní suspenze pro stanovení počtu MO při teplotě 25°C (vyšší koncentrace glukosy) [15]



Obrázek 23 Kontaminované a kontrolní suspenze pro stanovení počtu MO při teplotě 5 a 25°C (nižší koncentrace glukosy) [15]

B.2 Výsledky sedimentační analýzy vzduchu a stěrů z linky



Obrázek 24 Místo 1, 2, 3 (médiu APT Agar) [15]



Obrázek 25 Místo 4, 5, 6 (médiu APT Agar) [15]



Obrázek 26 Místo 7, 8, 9 (médiu APT Agar) [15]



Obrázek 27 Místo 10 (médium APT Agar), Místo 1, 2 (médium modifik. Plate Count Agar) [15]



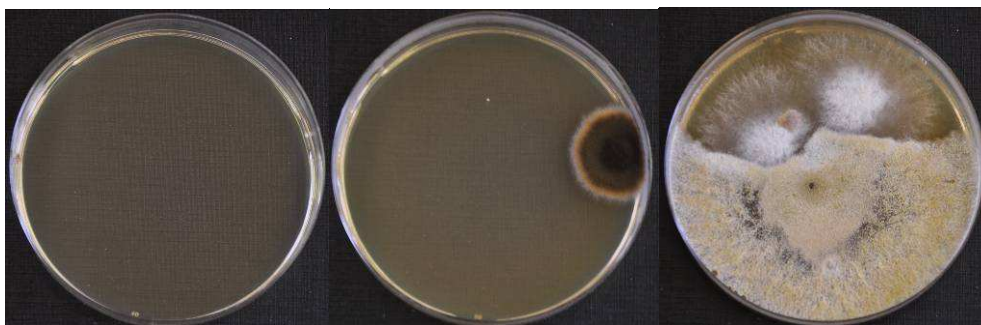
Obrázek 28 Místo 3, 4, 5 (médium modifik. Plate Count Agar) [15]



Obrázek 29 Místo 6, 7, 8 (médium modifik. Plate Count Agar) [15]



Obrázek 30 Místo 9, 10 (médium modifik. Plate Count Agar) [15]



Obrázek 31 Místo 1S, 2S, 3S (médium APT Agar) [15]



Obrázek 32 Místo 4S, 5S (médium APT Agar) [15]



Obrázek 33 Místo 1S, 2S, 3S (médium modifik. Plate Count Agar)



Obrázek 34 Místo 4S, 5S (médium modifik. Plate Count Agar) [15]