

Ćwiczenie 6, 7 i 8

Temat: Metabolizm drobnoustrojów

Metabolizm obejmuje ogół przemian zachodzących w komórce drobnoustrojów i poza nią, dzięki którym dochodzi do wzrostu komórek oraz ich rozmnażania. Do przeprowadzenia tych przemian niezbędna jest energia i określone związki chemiczne stanowiące tzw. substancje odżywcze.

Sposób odżywiania się drobnoustrojów określają trzy elementy: źródła węgla, elektronów oraz energii. Ze względu na pochodzenie tych źródeł drobnoustroje dzielimy na **autotrofy** i **heterotrofy** (ze względu na źródła węgla i elektronów) oraz **fotolitotrofy/fotoorganotrofy** i **chemolitotrofy/chemoorganotrofy** (ze względu na źródło energii).

Na metabolizm składają się dwa typy reakcji biochemicznych:

- anabolizm – biosynteza wszystkich składników komórki,
- katabolizm – przemiany dostarczające prekursorów do biosyntezy składników (oddychanie i odżywianie).

Oddychanie

Proces biologicznego utleniania substratu oddechowego, polegający na odłączeniu od niego protonów i elektronów, które przenoszone są na akceptor. W czasie procesu wyzwala się energia, którą komórka może magazynować w postaci ATP. Przenośnikami protonów i elektronów są enzymy i koenzymy, a szereg kolejnych przenośników elektronów nazywa się **łańcuchem oddechowym**.

Drobnoustroje różnią się długością łańcucha oddechowego, a związane z tym są różne typy oddychania:

- oddychanie tlenowe,
- oddychanie beztlenowe,
- fermentacja (oddychanie beztlenowe, w którym akceptorem protonów i elektronów jest związek organiczny).

Fermentacje

Głównym substratem oddechowym w procesach fermentacji są węglowodany, które przekształcane są w różnych cyklach (glikolitycznym, PP, F-6-P...), z wydzielaniem różnych produktów końcowych.

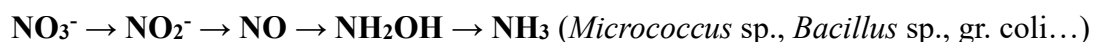
Niektóre drobnoustroje prowadzą niepełne utlenianie substratu oddechowego w warunkach tlenowych w cyklu kw. glukonowego, którego produktem końcowym są kwasy organiczne. Przemiany te nazywane są **tzw. fermentacjami** (octowa, cytrynowa).

W technologii żywności największe zastosowanie ma proces fermentacji mlekowej (prowadzonej przez paciorkowce oraz pałeczki fermentacji mlekowej); propionowej oraz alkoholowej. Szkodliwymi procesami fermentacyjnymi w przetwórstwie spożywczym są fermentacja mrówkowa – prowadzona przez pałeczki grupy coli oraz fermentacja masłowa, którą przeprowadzają beztlenowe laseczki przetrwalnikujące *Clostridium* sp. (z tzw. grupy sacharolitycznej).

Redukcja azotanów

W procesie tym azotany wykorzystywane są przez drobnoustroje jako akceptory protonów i elektronów. Redukcja azotanów przebiega w dwóch szlakach wg poniższych schematów:

Szlak asymilacyjny (odżywianie)



Przemiana ta (zbiałczanie azotanów) wykorzystywana jest przez drobnoustroje do budowy własnych białek komórkowych.

Szlak dysymilacyjny (oddychanie)



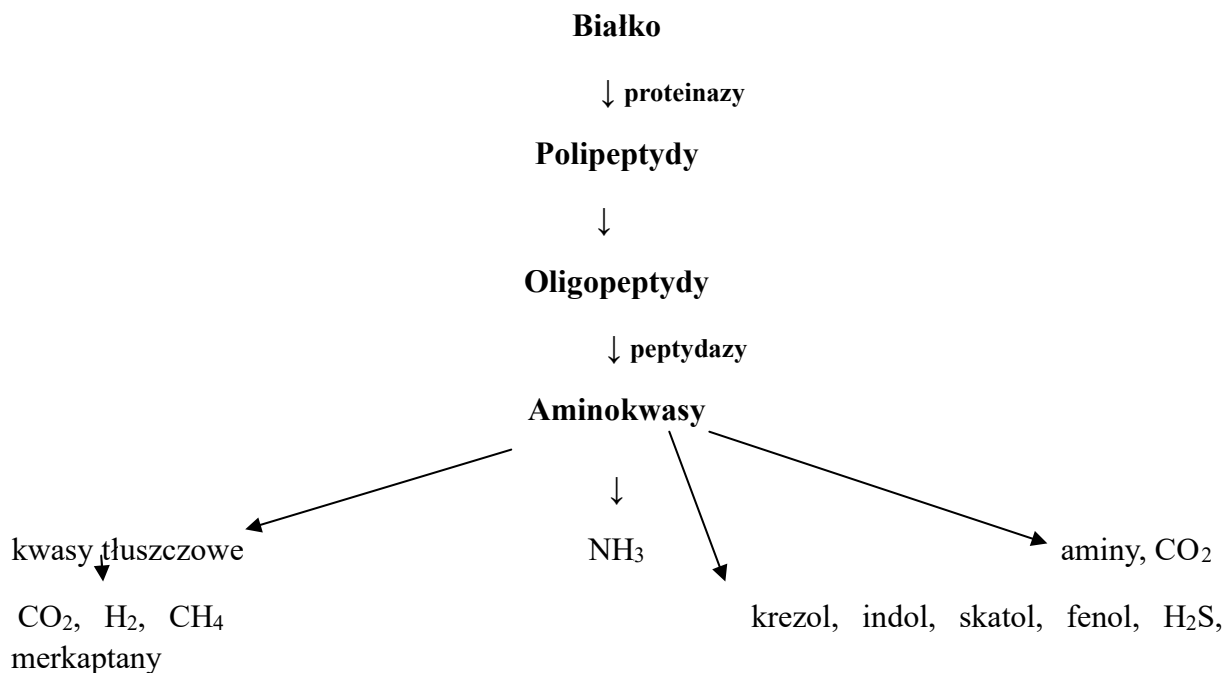
Ten proces w środowisku naturalnym prowadzi do strat azotu w glebie, a w żywności może być przyczyną wad produktów.

Pierwszy etap redukcji azotanów (denitryfikacja częściowa) wykorzystywany jest w przemyśle mięsnym, w procesie peklowania.

Proteoliza – rozkład białek

Zdolność wykorzystania przez drobnoustroje białek jako źródła azotu jest bardzo zróżnicowana. Wstępną hydrolizę białka przeprowadzają tylko te drobnoustroje, które wytwarzają zewnątrzkomórkowe proteinazy. Nie wszystkie z tych mikroorganizmów (hydrolizujących białka do peptydów) prowadzą kolejne etapy proteolizy, aż do powstania produktów końcowych (tzw. gnilny rozkład białek). Aminokwasy, w zależności od mikroorganizmów oraz warunków rozkładane są w procesie deaminacji i dekarboksylacji lub samej deaminacji.

Mikroflora prowadząca przemiany białek nazywana jest mikroflorą proteolityczną, a należą do niej m.in. Gram-ujemne pałeczki *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp.; Gram-dodatnie laseczki tlenowe: *Bacillus subtilis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus licheniformis* oraz beztlenowe *Clostridium sporogenes*, *Clostridium putrefaciens*, *Clostridium histolyticum* (tzw. klostridia grupy proteolitycznej).



Wstępna hydroliza białek (tzw. nadtrawienie białka) w produkcji żywności jest procesem korzystnym, wpływającym pozytywnie na smak i zapach produktu, a także jego przyswajalność. Gnilny rozkład białek (rozkład białek do produktów końcowych) w żywności jest niepożądany ze względu na występowanie nieprzyjemnego zapachu, a także ze względu na bezpieczeństwo spożycia (możliwość kumulacji amin).

Część praktyczna – ćwiczenie 6

Zdolność drobnoustrojów do prowadzenia poszczególnych przemian związków węgla i azotu jest cechą diagnostyczną.

Celem ćwiczeń z tego zakresu tematycznego jest określenie zdolności wybranych szczepów pochodzących z kolekcji kultur Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności do prowadzenia: fermentacji różnych substratów, redukcji azotanów oraz gnilnego rozkładu białek.

1. Określenie sposobu metabolizowania glukozy

Obserwacja hodowli prowadzonych w warunkach tlenowych i beztlenowych na pożywce Hugh-Leifsona następujących szczepów:

- *Acetobacter aceti*,
- *Escherichia coli*,
- *Clostridium butyricum*

Na podstawie wzrostu i objawów rozkładu substratu (zmiana barwy – zakwaszenie, produkcja CO₂) podać sposób metabolizowania glukozy (utlenianie, fermentacja) przez badane szczepy.

Szczep	Wygląd hodowli – warunki tlenowe	Wygląd hodowli – warunki beztlenowe	Sposób metabolizowania glukozy
<i>Acetobacter aceti</i>			
<i>Escherichia coli</i>			
<i>Clostridium butyricum</i>			

2. Określenie zdolności szczepów do wykorzystywania różnych substratów w procesie fermentacji: alkoholowej, mlekowej i propionowej

Obserwacja hodowli szczepów:

- *Saccharomyces cerevisiae*
- *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*
- *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*
- *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*
- *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii*;

w pożywce peptonowej z purpurą bromokrezolową i rurką Dürhama oraz substratami: glukozą (G), galaktozą (GAL), sacharozą (S), laktozą (L) i mleczanem wapnia (ML). Na podstawie

wzrostu i objawów fermentacji (zmiana barwy – zakwaszenie, produkcja CO₂) ocenić zdolność badanych szczepów do rozkładu poszczególnych substratów.

Rozkład substratu

Szczep	(kwas/gaz)					Rodzaj prowadzonej fermentacji
	G	GAL	S	L	ML	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>						
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>						
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>						
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>						
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> ssp. <i>shermanii</i>						

4. Określenie ilości produkowanego kwasu mlekowego z laktozy przez wybrane szczepy bakterii fermentacji mlekowej oraz określenie ich zdolności do tworzenia diacetylu

- a. Oznaczyć kwasowość miareczkową w °SH 24-ogodzinnych hodowli na mleku szczepów fermentacji mlekowej.

W tym celu 20cm³ hodowli przenieść do suchej kolbki stożkowej i wobec fenoloftaleiny zobojętniać 0,25M roztworem NaOH. Ilość zużytej do zobojętnienia 100cm³ roztworu/produktu zasady sodowej to kwasowość wyrażona w °SH. Następnie obliczyć ilość produkowanego przez szczepy kwasu mlekowego, korzystając z przelicznika:

$$1^{\circ}\text{SH} = 0,0225 \text{ \% kwasu mlekowego}$$

- b. Przeprowadzić próbę Voges-Proskauera (V-P) celem stwierdzenia obecności substancji aromatyzujących

Do małej probówki wprowadzić 1 cm³ hodowli, dodać 1 cm³ 40% roztworu KOH, 2-5 kropli nasyconego roztworu kreatyny. Wynik odczytać po 10 min. Powstanie różowej obrączki na powierzchni wskazuje na obecność związków aromatyzujących (diacetylu).

Szczep	Kwasowość w °SH	Ilość kwasu mlekowego w %	Próba V-P
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>			
<i>Lactobacillus acidophilus</i>			
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>			
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>			
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>			
<i>Limosilactobacillus fermentum</i>			

5. Określenie synergistycznego oddziaływania *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* oraz *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*

Wykonać próbę V-P z hodowli wspólnej szczepów na mleku – wyjaśnić na czym polega synergistyczne oddziaływanie w tym przypadku.

Część praktyczna – ćwiczenie 7

1. Określenie zdolności szczepów do wykorzystywania różnych substratów w procesie fermentacji: mrówkowej i masłowej

Obserwacja hodowli szczepów:

- *Escherichia coli*
- *Clostridium butyricum* w pożywce peptonowej z purpurą bromokrezolową i rurką Dürhama oraz substratami: glukozą (G), galaktozą (GAL), sacharozą (S), laktozą (L) i mleczanem wapnia (ML) oraz na mleku.

Na podstawie wzrostu i objawów fermentacji (zmiana barwy – zakwaszenie, produkcja CO₂, skrzep) ocenić zdolność badanych szczepów do rozkładu poszczególnych substratów.

Szczep	Rozkład substratu					Hodowla na mleku	Rodzaj prowadzonej fermentacji
	(kwas/gaz)						
	G	GAL	S	L	ML		
<i>Escherichia coli</i>							
<i>Clostridium butyricum</i>							

2. Określenie zdolności wybranych szczepów do metabolizowania związków azotowych

Materiał stanowią hodowle następujących szczepów (każde stanowisko bada 1 szczep):

- *Bacillus subtilis*
- *Escherichia coli*
- *Micrococcus roseus*
- *Pseudomonas fluorescens*
- *Proteus vulgaris*
- *Candida lipolytica*
- *Lactocaseibacillus casei*

Wykonać posiewy badanego szczepu do następujących podłoży:

- pożywka z KNO₃ i rurką Dürhama – celem określenia zdolności do metabolizowania azotanów (V), posiew za pomocą ezy;
- podłoże z mlekiem odtłuszczonym – celem określenia zdolności do hydrolizy kazeiny, posiew izolacyjny;
- słupek żelatynowy – celem określenia zdolności do hydrolizy (upłynniania) żelatyny, posiew metodą kłutą;
- pożywka peptonowa z tryptofanem – celem określenia zdolności rozkładu tryptofanu do indolu, posiew za pomocą ezy.

Inkubację prowadzić w warunkach tlenowych w temperaturze 30°C.

Część praktyczna – ćwiczenie 8

1. Zdolność szczepu do metabolizowania azotanu (V) ocenić na podstawie:

- obecności azotanu (III) – do wgłębienia płytki porcelanowej wprowadzić 2-3 krople odczynnika Griessa (roztwór kwasu sulfanilowego i α -naftyloaminy w kwasie octowym) i jałową pipetą dodać 2-3 krople hodowli badanego szczepu; w obecności azotanu (III) mieszanina zabarwi się na kolor różowy, czerwony lub bordowy,
- obecność produktów gazowych – produkty te zbierają się w rurce Dürhama.

2. Zdolność szczepu do hydrolizy białek ocenić na podstawie:

- wystąpienia stref przejaśnienia wokół kolonii na agarze z mlekiem,
- rozrzedzenia żelatyny.

3. Zdolność szczepu do rozkładu tryptofanu ocenić na podstawie obecności indolu:

- do hodowli na pożywce z tryptofanem dodać kilka kropli odczynnika Kovačsa – czerwona obrączka na powierzchni świadczy o obecności indolu.

Szczep	Metabolizowanie NO ₃ ⁻		Hydroliza kazeiny	Hydroliza żelatyny	Rozkład tryptofanu
	obecność NO ₂ ⁻	obecność produktów gazowych			
<i>Bacillus subtilis</i>					
<i>Escherichia coli</i>					
<i>Micrococcus roseus</i>					
<i>Pseudomonas fluorescens</i>					
<i>Proteus vulgaris</i>					
<i>Candida lipolytica</i>					
<i>Lactocaseibacillus casei</i>					