



Ćwiczenie 6, 7 i 8

Temat: Metabolizm drobnoustrojów

Metabolizm obejmuje ogół przemian chemicznych zachodzących w komórce drobnoustrojów, dzięki którym dochodzi do wzrostu komórek oraz ich rozmnażania. Reakcje te są katalizowane przez enzymy, a do ich przeprowadzenia niezbędna jest energia i określone związki chemiczne stanowiące tzw. substancje odżywcze.

Metabolizm obejmuje:

- ✓ anabolizm – reakcje biosyntezy substancji prostych i złożonych,
- ✓ katabolizm – reakcje prowadzące do rozkładu związków nieorganicznych i organicznych, które dostarczają prekursorów do biosyntezy składników oraz niezbędną do przemian energię,
- ✓ amfibolizm – szlaki metaboliczne, w których zachodzą procesy dysymilacyjne dostarczające energii lub produktów pośrednich bezpośrednio włączanych w drogi anaboliczne (np. szlak glikolityczny, cykl Krebsa)

Sposób odżywiania się drobnoustrojów określają trzy elementy: źródła węgla, elektronów i protonów oraz energii.

Drobnoustroje korzystają z dwóch źródeł energii: energii słonecznej – **fototrofy** oraz energii chemicznej – **chemotrofy**.

Ze względu na prowadzony sposób odżywiania drobnoustroje dzielimy na:

- ✓ **autotrofy** – wykorzystują dwutlenek węgla przekształcany w reakcjach redukcji do związków organicznych. Źródłem elektronów i protonów dla tych drobnoustrojów są związki nieorganiczne (**litotrofy**) lub organiczne (**organotrofy**),
- ✓ **heterotrofy** – wykorzystują organiczne formy węgla, dzielą się na **prototrofy**: drobnoustroje zdolne do wzrostu na podłożach zawierających jeden prosty związek organiczny i zestaw soli mineralnych (np. *Escherichia coli*, mikroflora naturalnych środowisk ubogich w substancje odżywcze) oraz **auksotrofy**: wymagają do wzrostu podłoży o bogatym i złożonym składzie substancji odżywczych (np. bakterie fermentacji mlekowej, mikroflora chorobotwórcza)



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 (utlenianie biologiczne, w którym ostatecznym akceptorem elektronów i protonów jest tlen atmosferyczny),
- ✓ oddychanie beztlenowe (utlenianie biologiczne, w którym ostatecznym akceptorem elektronów i protonów jest związek nieorganiczny – np. oddychanie azotanowe; redukcja azotanów; oddychanie siarczanowe; dysymilacyjne redukcja siarczanów),
- ✓ fermentacja (proces utleniania biologicznego zachodzący w warunkach beztlenowych, w którym ostatecznym akceptorem protonów i elektronów jest związek organiczny).

Fermentacje

Głównym substratem oddechowym w procesach fermentacji są węglowodany, które przekształcane są w różnych cyklach (np. glikolitycznym, pentozo-fosforanowym, fruktozo-6-fosforanowym), 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).

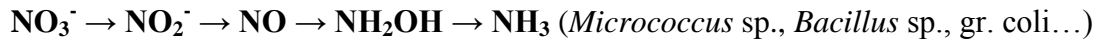
W technologii żywności największe zastosowanie ma proces fermentacji mlekowej (prowadzonej przez paciorkowce oraz pałeczki fermentacji mlekowej); propionowej oraz alkoholowej. Szkodliwymi procesami fermentacyjnymi w przetwórstwie spożywczym są fermentacja mrówkowa – prowadzona przez pałeczki grupy coli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



Redukcja azotanów (oddychanie beztlenowe)

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.

Rozkład białek i aminokwasów

Zdolność wykorzystania przez drobnoustroje białek jako źródła azotu jest bardzo zróżnicowana. Wstępną hydrolizę białka przeprowadzają tylko te drobnoustroje, które wytwarzają enzymy proteolityczne – **proteazy**. Proteazy nie wykazują swoistości substratowej, tzn. są zdolne do hydrolizy różnych białek. Wśród enzymów hydrolizujących białko wyróżnia się: **endopeptydazy/proteinazy** (hydrolizują białko z wytworzeniem poli- i oligopeptydów) i **egzopeptydazy** (odszczepiają pojedyncze aminokwasy od końców łańcucha peptydowego, które następnie są włączane bezpośrednio do biosyntezy białek lub są rozkładane w reakcjach deaminacji, dekarboksylacji lub transaminacji).

Nie wszystkie mikroorganizmy, których enzymy hydrolizują białka do peptydów prowadzą kolejne etapy rozkładu, aż do powstania produktów końcowych (tzw. gnilny rozkład białek). Niektóre mikroorganizmy natomiast prowadzą rozkład poszczególnych aminokwasów, nie posiadając zdolności do hydrolizy białek.

Deaminacja jest procesem odłączenia grupy NH_2 odbywającym się w różnych warunkach (np. deaminacja oksydacyjna, redukcyjna, typu Sticklanda – typowa dla *Clostridium* sp.),



a produktami końcowymi są m. in. ketokwasy, kwasy nasycone i nienasycone, amoniak, dwutlenek węgla.

Dekarboksylacja zachodzi w warunkach beztlenowych i prowadzi do powstania amin biogennych (histamina, serotonina, kadaweryna, putrescyna, alanina) i dwutlenku węgla.

Transaminacja polega na przeniesieniu grupy aminowej z aminokwasu na ketokwas, w wyniku czego powstaje nowy aminokwas i nowy ketokwas. Niektóre drobnoustroje mogą przekształcać aminokwasy zarówno na drodze deaminacji, jak i dekarboksylacji – np. *Escherichia coli* przekształcająca indol w skatol lub indol.

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 prowadzona przez wyselekcjonowane drobnoustroje lub ich enzymy (tzw. nadtrawienie białka) w produkcji żywności jest procesem korzystnym, wpływającym pozytywnie na smak, zapach oraz konsystencję produktu, a także zwiększającym strawność i 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 biogennych).

Tłuszcze jako substrat oddechowy

Tłuszcze (estry glicerolu i kwasów tłuszczowych) mogą być hydrolizowane przez enzymy zewnątrzkomórkowe drobnoustrojów (lipazy) do glicerolu i wolnych kwasów tłuszczowych. Glicerol jest następnie metabolizowany na drodze glikolizy, a kwasy tłuszczowe są rozkładane np. w procesie β -oksydacji. Produkty obu przemian są kolejno włączane do cyklu Krebsa. Produkty przemian tłuszczów często są przyczyną wad smaku produktów spożywczych (posmak estrowy, posmak mydlasty, posmak jełki) oraz zapachu. Mikroorganizmy wykorzystujące tłuszcze jako substrat oddechowy nazywane są lipolitycznymi i należą do nich m. in. niektóre gatunki *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. i *Clostridium* sp.



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:

- *Bacillus cereus*,
- *Escherichia coli*,
- *Clostridium tyrobutyricum*

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

Szczep	Wygląd hodowli warunki tlenowe	Wygląd hodowli warunki beztlenowe	Sposób metabolizowania glukozy
<i>Bacillus cereus</i>			
<i>Escherichia coli</i>			
<i>Clostridium tyrobutyricum</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.

Szczep	Rozkład substratu (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>						

3. 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-godzinnych hodowli na mleku szczepów fermentacji mlekowej.

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

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



- b. Wykonać próbę Voges-Proskauera (V-P) celem stwierdzenia obecności substancji aromatotwórczych

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>Lactobacillus plantarum</i>			
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>			
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>			
<i>Lactobacillus fermentum</i>			

4. 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 tyrobutyricum*

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 (kwas/gaz)					Hodowla na mleku	Rodzaj prowadzonej fermentacji
	G	GAL	S	L	ML		
<i>Escherichia coli</i>							
<i>Clostridium tyrobutyricum</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*
- *Lactobacillus 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>Lactobacillus casei</i>					

4. Obserwacje mikroskopowe wybranych kultur przemysłowych stosowanych w przemyśle spożywczym

Wykonać preparaty barwione metodą Grama i określić jakie formy drobnoustrojów występują w poszczególnych kulturach. Podać jakie przemiany prowadzą komponenty kultur (np. paciorkowce – fermentację mlekową, drożdże – fermentację alkoholową, gronkowce – rozkład azotanów)

5. Kolokwium III – powodzenia! 😊