

**Laboratoře oboru (N352014)**  
**Studenti 1.ročníku MSP, l.s. 2012/2013**

**Mikrobiologie – úloha 12**

**Místo:** Ústav mléka, tuků a kosmetiky

**Studijní materiály:** <http://tresen.vscht.cz/tmt/ESO/LOTP/>

**Téma: Hodnocení bakteriálních, kvasinkových a plísňových kultur používaných při výrobě potravin**

12/A: Miroskopický obraz bakterií, kvasinek a plísní.

12/B: Titrační a aktivní kyselost bakteriální kultury.

12/C: Vliv inhibitorů na růst bakteriální kultury.

12/D: Stanovení vybraných enzymových aktivit plísňových kultur.

**Vyučující:** Ing. Eva Šviráková, Ph.D., Ing. Michaela Kosová, Dr. Ing. Miroslav Čerovský

---

**Úloha 12/A, B**

**Úloha 12/A: Miroskopický obraz bakterií, kvasinek a plísní.**

**Úloha 12/B: Titrační a aktivní kyselost bakteriální kultury**

**BAKTERÁLNÍ ZÁKYSOVÉ KULTURY**

• **Typ bakteriální kultury (Erlenmayerova baňka, přibližně 100 ml)**

Smetanová kultura (polovina studentů).

Jogurtová kultura (polovina studentů).

• **Vybraná zákysová kultura (každý student)**

Titrační kyselost.

Aktivní kyselost, pH metr.

Mikroskopické morfologické pozorování bakteriálních buněk (tepelná fixace, Gramovo barvení, imersní objektiv: zvětšení 100x, celkové zvětšení: 1000x nebo 1500x dle použitého okuláru).

**KVASINKOVÉ ZÁKYSOVÉ KULTURY**

• **Typ kvasinkové kultury (zkumavka se šikmým agarem)**

*Kluyveromyces* sp. (polovina studentů).

*Candida* sp. (polovina studentů).

• **Vybraná kvasinková kultura (každý student)**

Makroskopické morfologické pozorování kvasinkových buněk na agaru GKCH.

Mikroskopické morfologické pozorování kvasinkových buněk (tepelná fixace, barvení methylenovou modří, suché objektivy, celkové zvětšení: 100x/150x nebo 400x/600x nebo 600x/900x).

**PLÍŠŇOVÉ ZÁKYSOVÉ KULTURY**

• **Typ plísňové kultury (zkumavka se šikmým agarem)**

*Penicillium roqueforti* (polovina studentů).

*Penicillium camemberti* (polovina studentů).

• **Vybraná plísňová kultura (každý student)**

## **Makroskopické morfologické pozorování plísni na agaru GKCH.**

**Mikroskopické morfologické pozorování plísni** (nativní preparát v laktofenolu, podložní a krycí sklíčka, suché objektivy, celkové zvětšení: 100x/150x nebo 400x/600x nebo 600x/900x).

### **• Základní charakteristika smetanové zákysové kultury**

Mezofilní smetanová zákysová kultura se v mlékárenském průmyslu používá jako základní kultura. Tato kultura obsahuje homofermentativní laktokoky a aromatické leukonostoky:

- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*
- *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*
- *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*.

Aromatické koky využívají citrát za vzniku oxidu uhličitého a různých aromatických sloučenin (např. acetaldehyd, diacetyl, acetoin, 2, 3 - butandiol). Kultivační podmínky: teplota 20 - 30 °C, doba 16 - 18 h, inokulum 1% (obj.). Titrační kyselost: 36 - 42 [2,5 mmol H<sup>+</sup>.l<sup>-1</sup>], aktivní kyselost: 4,2 až 4,7.

### **• Základní charakteristika jogurtové zákysové kultury**

Tato kultura obsahuje dvě termofilní bakterie *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* žijící v symbióze (protosymbiotická směs). *Streptococcus thermophilus* produkuje kyselinu mravenčí, čímž se sníží oxidačně-redukční potenciál, ke kterému je *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* citlivý. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* díky zvýšené proteolytické aktivitě tvoří esenciální aminokyseliny (např. valin, leucin, histidin, methionin, tryptofan, isoleucin a kyselinu glutamovou). Kultivační podmínky: teplota 42 až 45 °C, doba 3,5 – 4,0 h, inokulum 1 – 2 % (obj.). Titrační kyselost: 40 - 50 [2,5 mmol H<sup>+</sup>.l<sup>-1</sup>], aktivní kyselost: 4,0 - 4,5.

### **• Stanovení titrační kyselosti mléka a mlékárenských výrobků**

K 50 ml testovaného vzorku (např. 50 ml mléka nebo 25 ml fermentované zákysové kultury) se do titrační baňky/válce se přidají 2 ml roztoku fenolftaleinu v ethanolu (2% obj. roztok). Titrace vzorku probíhá za pomoci 0,25 mol.l<sup>-1</sup> roztoku NaOH do světle růžového zbarvení, které vydrží 30 s, dle referenčního roztoku pro barvu. Referenční roztok se připraví smícháním 50 ml mléka s 1 ml CoSO<sub>4</sub> (5% obj. roztok).

#### **• Titrační kyselost (TK) může být vyjádřena několika způsoby:**

a) jako 'SH' (dle Soxhlet-Henkela), což představuje počet mililitrů odměrného roztoku NaOH (c = 0,25 mol.l<sup>-1</sup>) (hodnota „a“ v rovnici 1) potřebných pro titraci 100 ml vzorku:

$$\boxed{\text{TK dle Soxhlet-Henkela} = a \cdot 2}$$

(Rovnice 1)

b) jako 'látkový obsah kyselin' v [mmol.l<sup>-1</sup>]:

$$\boxed{\text{TK} = (a \cdot c \cdot 1000) / m}$$

(Rovnice 2)

kde je :

a... spotřeba odměrného roztoku c (NaOH) = 0,25 mol.l<sup>-1</sup> při titraci 50 ml vzorku [ml]

c... koncentrace standardního roztoku NaOH použitého k titraci [mol.l<sup>-1</sup>] (zde 0,25)

m... množství vzorku použitého k titraci [ml].

**c) jako 'gramy kyselin y mléčné':**

Stanovení titrační kyselosti zákysové kultury je v podstatě podobné stanovení titrační kyselosti mléka. Ve srovnání s mlékem, vzorek kultury je navažován (25 g) s přesností na 0,1 g. Výsledky mohou být vyjádřeny dle "SH" nebo jako „látkový obsah kyselin“.

---

### **Charakteristika kvasinkové kultury *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis***

#### **• Morfologie buněk**

Kvasinky jsou oválné nebo kulaté, v průměru 3,0 - 3,5  $\mu\text{m}$ , vyskytující se často jednotlivě nebo v párech. Viditelné vakuoly jsou přítomny v buňkách při delší kultivaci (viz Obr. 1).

#### **• Vzhled kolonií**

Na sladovém agaru jsou kolonie kvasinek homogenní, lesklé, smetanově bílé, bez barevných vad. V tekutinách vytvořit sediment a prstenec, na povrchu obvykle tenkou kožku.



**Obr. 1.** Mikroskopie morfologie buněk kvasinky *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis* pozorovaných optickým mikroskopem při celkové zvětšení 600x.

#### **• Očkování a kultivace**

Kvasinky se očkují na povrch šikmého agaru GKCH s použitím očkovací kličky a jsou kultivovány při pokojové teplotě, po dobu 2 - 4 (3) dnů, aerobně. Po kultivaci se pozorují makroskopické morfologické vlastnosti kvasinek (např. vzhled a barva kolonií na agaru) a rychlost růstu kvasinek. Mikroskopické preparáty jsou barveny methylenovou modří.

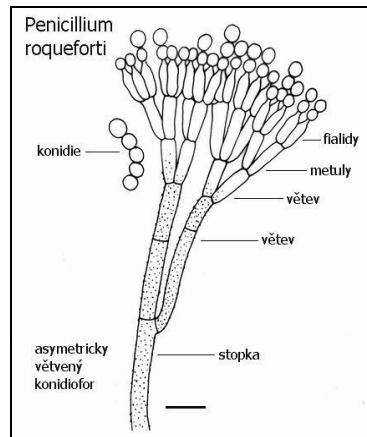
### **Charakteristika plísňové kultury *Penicillium roqueforti***

#### **• Morfologie buněk**

Plíseň tvoří konidiofory o délce asi 100 až 150  $\mu\text{m}$ , o průměru 4 – 6  $\mu\text{m}$ . Konidiofory jsou rozvětvené a asymetrické. Metuly mají velikost 12 - 15 x 3,0 - 4,5  $\mu\text{m}$ . Fialidy mají velikost 8 - 12 x 3,0 - 3,5  $\mu\text{m}$ . Konidie jsou kulaté, hladkého povrchu, tmavě zelené, nebo podlouhlé o velikosti 3,5 až 5,0  $\mu\text{m}$  (viz Obr. 2).

#### **• Vzhled kolonií**

Kolonie na Czapek - Doxově agaru mají sametový vzhled, jejich povrch je hladký, jsou modro-zelené nebo hráškově zelené barvy, s jasně bílými, nerovnými, paprskovitými okraji. Většina kmenů nevykazuje gutaci (tzn. že vylučuje přebytečnou vodu ve formě průhledných kapek). Starší kolonie tvoří na spodní části tmavý pigment (viz Obr. 3a).



**Obr. 2.** Mikroskopie morfologie plísně *Penicillium roqueforti*; detail rozvětveného konidioforu.

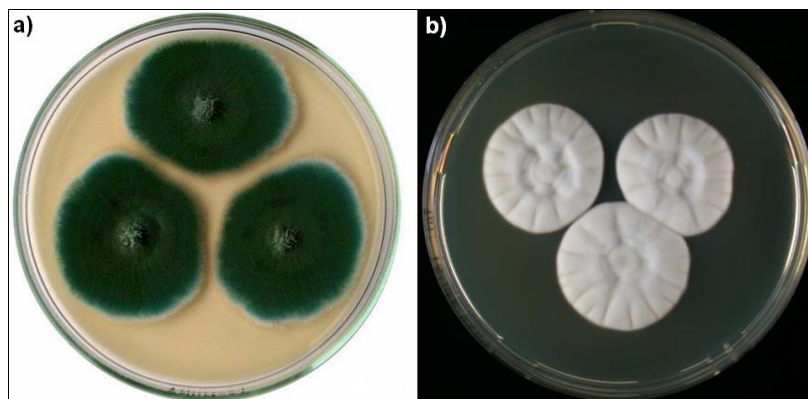
### Charakteristika plísňové kultury *Penicillium camemberti*

#### • Morfologie buněk

Plíseň tvoří konidiofory o různých délkách. U konidioforů vyrostlých ze substrátu, jsou jejich velikosti 250 až 600 x 2,5 - 3,5  $\mu\text{m}$ . U konidioforů vyrostlých ze vzdušných hýf je jejich délka 40 až 200  $\mu\text{m}$ . Větvě dosahují velikostí 12 - 18 x 2,2 - 3,4  $\mu\text{m}$ . Metuly jsou seskupeny po 2 - 3 ve skupině a jejich velikosti jsou 9 - 14 x 2,2 - 3,2  $\mu\text{m}$ . Fialidy jsou seskupeny po 2 - 5 ve skupině a jejich velikosti jsou 9 - 14 x 2,2 - 2,8  $\mu\text{m}$ . Konidie jsou eliptické, později kulovitěho tvaru a jejich velikosti jsou 3,5 - 5,0 x 3,0 - 4,5  $\mu\text{m}$ .

#### • Vzhled kolonií

Kolonie plísně jsou na Czapkově-Doxově agaru řídké, vločkovité, připomínající vatu. Jsou bílé (viz Obr. 3b), později šedo-zelené, voní po houbách.



**Obr. 3.** Kolonie *Penicillium* sp. na Czapkově-Doxově agaru: a) *Penicillium roqueforti*, b) *Penicillium camemberti*.

Kolonie se očkují na povrch agaru GKCH (zkumavka s šikmým agarem) za pomoci očkovací kličky a na povrch agaru GKCH (vpíchnutím do středu Petriho misky) za pomoci očkovací jehly. Kultivace plísni probíhá při pokojové teplotě po dobu 5 - 7 dnů za denního světla, které podporuje sporulaci a vznik kolonií typického zbarvení. Po kultivaci jsou na agaru pozorovány morfologické vlastnosti kolonií (např. vzhled a barva kolonií na agaru) a jejich velikost. Mikroskopické preparáty plísni se připravují s laktofenolem.

---

## Úloha 12/C, D

### Úloha 12/C: Vliv inhibitorů na růst bakteriální kultury

Demonstrační prezentace úlohy za pomoci pedagoga.

#### Princip metody

Odhad minimální inhibiční koncentrace nisinu ( $MIC_{\text{nisinu}}$ ) se provádí za pomoci agarové difúzní biozkoušky. Měří se inhibiční zóny růstu (v mm) testovacího kmene *Lactobacillus helveticus* CH-1. Předinkubace testovacího kmene probíhá na agaru MRS při 4 °C po dobu 6 h (v chladničce) a vlastní inkubace na agaru MRS při 42 °C po dobu 20 h (v termostatu). Kalibrační křivka nisinu se připraví z komerčního nisinového standardu Nisaplinu® (Danisco, DK).

#### Stanovení produkce nisinu u kmenů *Lactococcus lactis*

Stanovení produkce nisinu za pomoci agarové difúzní biozkoušky je založeno na inhibici růstu vybraného testovacího grampozitivního mikroorganismu nisinem, produkovaného některými kmeny *Lactococcus lactis*, s finálním měřením inhibičních zón růstu.

#### Chemikálie a roztoky

**Sterilní ředící roztok pro Nisaplin®:** 0,2 mol.l<sup>-1</sup> HCl s 0,75 % (hm.) NaCl (např. příprava 500 ml roztoku: 764 μl 36% HCl se doplní destilovanou vodou, ke které se přidá 3,78 g NaCl, a směs se doplní destilovanou vodou na konečný objem 500 ml).

**Zásobní roztok Nisaplinu® (10 000 IU nisinu.ml<sup>-1</sup> = 250 mg nisinu.l<sup>-1</sup>) pro kalibrační křivku Nisaplinu®:** navážít 0,1 g Nisaplinu® a přidat 10 ml sterilního ředícího roztoku pro Nisaplin® (zásobní roztok Nisaplinu® by měl být uchováván při teplotě 2 - 8 °C maximálně po dobu 1 měsíce).

#### Seznam použitých kmenů

##### Testovací kmen *Lactobacillus helveticus* CH-1

Původ: Christian Hansen Laboratories A/S, Kodaň, DK.

Speciální vlastnosti: citlivost k nisinu, použití jako testovací kmen pro modifikovanou agarovou difúzní biozkoušku pro stanovení produkce nisinu (Dodd et al, 1992, 1996.).

##### Laktokoky produkující nisin

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO R5

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 2054

*Lactococcus lactis* FI 5876

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LCC 731

*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LTM 32

##### Kalibrační křivka nisinu

Kalibrační roztoky se připravují ředěním zásobního roztoku Nisaplinu® (10 000 IU nisinu.ml<sup>-1</sup> = 250 mg nisinu.l<sup>-1</sup>). Například, roztok o koncentraci 25 mg nisinu.l<sup>-1</sup> se připraví smícháním 1 ml zásobního roztoku Nisaplinu® s 9 ml sterilního ředícího roztoku pro Nisaplin®. Například, roztok o koncentraci 12,5 mg nisinu.l<sup>-1</sup> se připraví smícháním 0,5 ml zásobního roztoku Nisaplinu® s 9,5 ml sterilního ředícího roztoku pro Nisaplin®. Další roztoky pro kalibrační křivku se připraví desítkovým ředěním předchozích roztoků.

Suspenze buněk (1 ml) testovacího kmene *Lbc. helveticus* CH-1 narostlého v bujónu MRS se ředí na absorbanci  $A_{615} = 0,35$ . Na Petriho misce se suspenze buněk (1 ml) převrství soft agarem MRS (20 ml). Otvory v agaru se vytvoří za použití sterilního korkovrtu (o průměru 9.0 mm). Do vytvořených otvorů se pipetuje (50 ml) daná koncentrace (50, 100, 500 a 1000 IU nisinu.ml<sup>-1</sup>) standardního roztoku Nisaplinu<sup>®</sup>. Petriho misky se podrobí předinkubaci při 4 °C po dobu 6 h (v chladničce) a vlastní inkubaci při 42 °C po dobu 20 h (v termostatu). Po kultivaci se provede měření mezikruží inhibičních zón růstu testovacího kmene *Lbc. helveticus* CH-1. Kalibrační přímka Nisaplinu<sup>®</sup> (která je představuje závislost šířky mezikruží inhibiční zóny růstu testovacího kmene na log koncentrace produkovaného nisinu) a vypočtená rovnice přímky (viz Obr. 4):

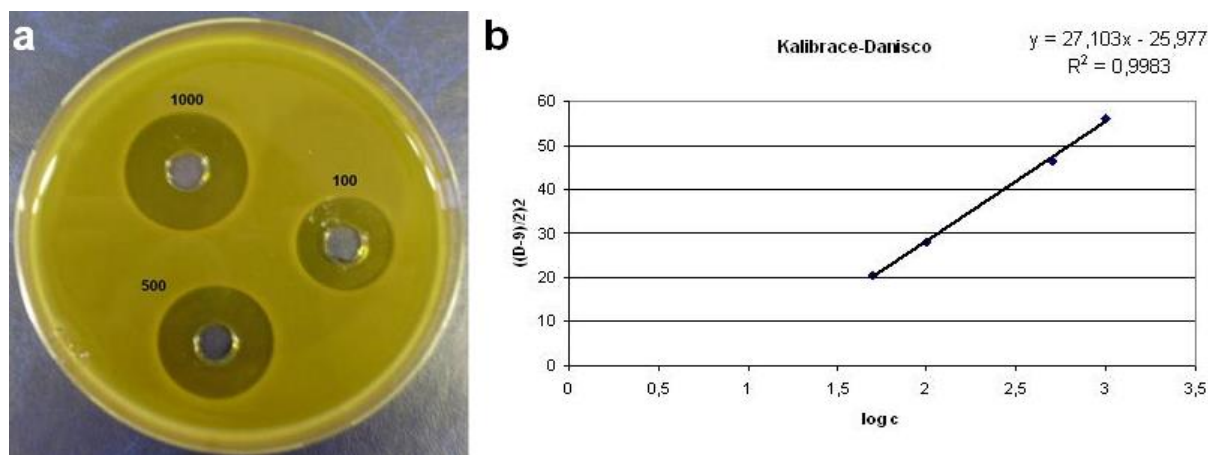
$$y = A + Bx \quad (\text{Rovnice 4})$$

Kde je:

y ..... [(průměr inhibiční zóny – průměr otvoru korkovrtu)/2]<sup>2</sup> [mm<sup>2</sup>],

x ..... sledovaná (vypočítávaná) koncentrace nisinu [IU nisinu.ml<sup>-1</sup> resp. mg nisinu.l<sup>-1</sup>],

A, B ..... číselné konstanty získané po sestavení rovnice přímky [1] (viz Obr. 4).



**Obr. 4.** Agarová difúzní biozkouška: a) kalibrační přímka Nisaplinu<sup>®</sup>: pozice 100, 500 a 1000 IU nisinu.ml<sup>-1</sup>, b) rovnice kalibrační přímky Nisaplinu<sup>®</sup>.

### Stanovení produkce nisinu

Suspenze buněk (1 ml) testovacího kmene *Lbc. helveticus* CH-1 narostlého v bujónu MRS se ředí na absorbanci  $A_{615} = 0,35$ . Na Petriho misce se suspenze buněk (1 ml) převrství soft agarem MRS (20 ml). Otvory v agaru se vytvoří za použití sterilního korkovrtu (o průměru 9.0 mm). Do vytvořených otvorů se pipetují supernatanty (50 ml) získané z kmenů *Lactococcus lactis*.

Supernatant (1 ml), získaný ze suspenze kmene *Lactococcus lactis* (kultivovaného v bujónu GM17 nebo LM1, při teplotě 30 °C po dobu 16 h, aerobně), se následně okyselí (35 μl) HCl (ředěná 1:1) na výsledné pH směsi mezi 2 a 3. Směs se povaří (98 °C, 5 min) a následně se odstředí (21030 g, 5 min, 4 °C).

Petriho misky se podrobí předinkubaci při 4 °C po dobu 6 h (v chladničce) a vlastní inkubaci při 30 °C po dobu 20 h (v termostatu). Po kultivaci se provede měření mezikruží inhibičních zón růstu. Koncentrace nisinu produkovaná kmeny *Lactococcus lactis* se vypočítá z kalibrační přímky pro Nisaplin<sup>®</sup>.

## Úloha/D: Stanovení enzymové aktivity vybrané plísňové kultury

- **Typ plísňové kultury (zkumavka se šikmým agarem)**

*Penicillium roqueforti* (polovina studentů).

*Penicillium camemberti* (polovina studentů).

- **Princip metody**

U testované plísně se za pomoci plotnové agarové metody provede stanovení proteolytických zón. Stanovení se uskuteční na Petriho misce s agarem PCA (plotnový agar) a odtučněným mlékem. Do středu Petriho misky se sterilně naočkuje kousek mycelia plísně. Podmínky kultivace plísně: 25 °C, 5 (7) dnů, aerobně, za přítomnosti denního světla. Kvalitativní pozorování jasných proteolytických zón kolem kolonie plísně s potvrzením přítomnosti proteolytických enzymů.

---

### **Literatura**

Dodd H., et al. A lactococcal expression system for engineering nisin: Appl. Environ. Microbiol. 136, 555 - 556 (1992).

Dodd, H., et al. A gene replacement strategy for engineering nisin. Microbiology 142, 47 - 55 (1996).

Kučerová K.: Návody pro laboratorní cvičení z mikrobiologie mléka a tuků. Ústav technologie mléka, tuků a kosmetiky, VŠCHT Praha, Praha 2009.