

# Fermentirani mliječni proizvodi

Fermentacija

# Fermentacija

- Zajednička karakteristika fermentiranih mlijeka:

Razgradnja laktoze u mliječnu kiselinu

# Fermentacija

- Fermentacija nije jednostavna reakcija i zato nije uvijek predvidiva
- Produkti dobiveni fermentacijom ostaju u proizvodu i utječu na prirodu samog proizvoda

# Fermentacija

- Metabolički produkti nastali djelovanjem BMK služe kao izvor E drugim BMK.  
Visoka koncentracija određenog produkta nastalog fermentacijom postaje letalna za određene sojeve BMK.

# Fermentirana mlijeka

- **Fermentirana mlijeka:**  
**BMK, kvasci, plijesni / kombinacije,**  
**fermentiraju laktozu u mliječnu kiselinu**  
**= reski svježiji okus proizvoda**
- **Ostale metaboličke supstance <**  
**mliječne kiseline= identitet proizvoda**

# Fermentirana mlijeka– podjela (vrsta fermentacije)

- I. Fermentirana mlijeka:  
mliječna fermentacija
  - a) mezofilna kultura: vrhnje, kiselo mlijeko, ymer (koncentrirano ferm. mlijeko-Danska)
  - b) termofilna kultura: jogurt, leban\*, zabadi\*
  - c) terapijska kultura: bifido, acidofil, AB kultura, bioaktiv, vivis

# Fermentirana mlijeka– podjela (vrsta fermentacije)

Fermentirana mlijeka:

- II. Kvasci + mliječna fermentacija: kefir, kumis
- III. Plijesni + mliječna fermentacija: viili (*Geotrichum candidum*-Finska)

# Vrste fermentacija

- **Metabolizam laktoze -stvaranje mliječne kiseline**
- **Metabolizam citrata**
- **Metabolizam proteina**
  
- **Alkoholna fermentacija**

# Fermentacija

Stvaranje mliječne kiseline

# Fermentacija

- Homofermentativna fermentacija:  
70-90% mliječna kiseline.
- Heterofermentativna fermentacija:  
50% mliječne kiseline + octena  
+CO<sub>2</sub>+etanol

# Fermentacija

- Temperatura:

25-30°C mezofilne BMK < mliječne kiseline

40-44°C termofilne BMK > mliječne kiseline

# Fermentacija

Biokemijski

Laktoza → mliječna kiselina

Glikolitičkim i fosfoketolaznim putem

# Stvaranje mliječne kiseline

Homofermentativne BMK

# Metabolizam laktoze

- *Lactococcus* spp. + neki sojevi  
*Lb. acidophilus* ≠ BMK  
≠ istovremeni katabolizam glukoze i galaktoze

# Metabolizam laktoze

- Laktoza se u bakterijsku stanicu transportira kao laktoza-P: fosfoenolpiruvat (PEP)- ovisnim fosfotransveraznim sustavom (PTS) (PEP:PTS)

# Metabolizam laktoze

citoplazma bakterijske stanice:

Laktoza - 6P  $\rightarrow$  P- $\beta$ -D-galaktozidaza  $\leftarrow$

galaktoza -6P + glukoza

(istovremena hidroliza)

# Tagatozni i MBP put

- Tagatozni put
- Galatoza -6P
- Galaktoza -6P → tagatoza 6-P (+ATP) → tagatoza 1,6 DP → dihidroksi aceton P ↔ gliceraldehid



Embden-Meyerhof-Parnas put (glikolitički put)

# Embden-Meyerhof-Parnas- (glikolitički put)

**Glukoza** → **glukoza -6P** →  
**fruktoza-6P** → **fruktoza 1,6 P** →  
**gliceraldehid** ↔ **dihidroksiaceton -P**  
**2 trioza 3P** → **2 piruvat (anaerobni uvjeti)**  
↓  
→ **mliječna kiselina**

**piruvat-** toksičan za bakterijsku stanicu

# Metabolizam laktoze

- Neki sojevi *Lactococcus lactis* imaju sposobnost defosforilacije galaktoze -6P

stanica



galaktoza (ne metabolizirana)

# Metabolizam laktoze

- laktoza-permeazni sustav - BMK:  
citoplazma bakterijske stanice

laktoza  $\rightarrow$   $\beta$ -galaktozidaza  $\leftarrow$

glukoza

+

galaktoza



Embden-Meyerhof-Parnas put / izlazi iz  
stanice

# Metabolizam laktoze

- *S. thermophilus* i *Lb. acidophilus*:
- razgrađuju galaktozu kada je potrošena sva količina glukoze (Leloir put)
- *S. thermophilus*,  
*Lb. delbruecki subsp. bulgaricus* = ne rastu kada je samo galaktoza prisutna u mediju

# Leloir put

- Leloir put hidrolize galaktoze:

galaktoza → galaktoza -1P →

glukoza -1P → **glukoza-6P**



Embden-Meyehof-Parnas (put)

# Metabolizam laktoze

**Rodovi:**

***Lactococcus*, *Streptococcus*, većina  
*Lactobacillus* spp. i *Pediococcus***

**= homofermentativne BMK**

# Metabolizam laktoze

- Homofermentativne BMK:
  - a) 70-90% mliječna kiselina
  - b) mala količina aromatskih tvari: diacetil, acetoin, acetaldehid, etanol, octena, maslačna, propionska, mravlja

# Stvaranje mliječne kiseline

Heterofermentativne BMK

# Metabolizam laktoze

- Karakteristika:
- laktoza- permeaza (stanicu)
- glukoza se razgrađuje pentozna-fosfatnim putem (fosfoketolazni put) prije MBP-puta

# Metabolizam laktoze

- Fosfoketolazni put:

Glukoza  $\rightarrow$  6-P-glukonat  $\rightarrow$  ribuloza 5-P  $\rightarrow$   
ksiluloza P + CO<sub>2</sub>

Ksiluloza-5P  $\rightarrow$  fosfoketolaza  $\leftarrow$  trioza 3P +  
acetil P--acetat

Trioza 3P  $\rightarrow$  piruvat

Piruvat  $\rightarrow$  mlična kiselina

Acetil P  $\rightarrow$  etanol

# Metabolizam laktoze

- *Bifidobacterium*
- Glukoza → glukoza -6P →  
fruktoza -6P →  
trioza-P → gliceraldehid → piruvat → mliječna  
kiselina  
  
↓  
*octena kiselina*

# Metabolizam laktoze

- Heterofermentativne BMK:
  - 1) jednake ekvimolarne količine CO<sub>2</sub>, laktata i acetata (koristeći 6-P-glukonat ciklus/ *Lactobacillus*)
  - 2) acetat i laktat (bez CO<sub>2</sub>) u molarnim odnosima 3:2 koristeći fruktoza-6-P ciklus ili bifido ciklus/*Bifidobacterium*

# Mliječna kiselina

- a) isključivo L(+) laktat
- b) isključivo D (-) laktat
- c) približno iste količine L(+) i D(-) laktata
- d) veliku količinu jedne i malu ali mjerljivu količinu druge kiseline (laktata)

# Mliječna kiselina

- Oblik laktata ovisi:
- a) prisutnosti specifične **NAD<sup>+</sup> ovisne laktat- dehidrogenaze (nLDH)** i njenoj aktivnosti
- b) dva oblika- dva enzima D-nLDH i L-nLDH

# Mliječna kiselina

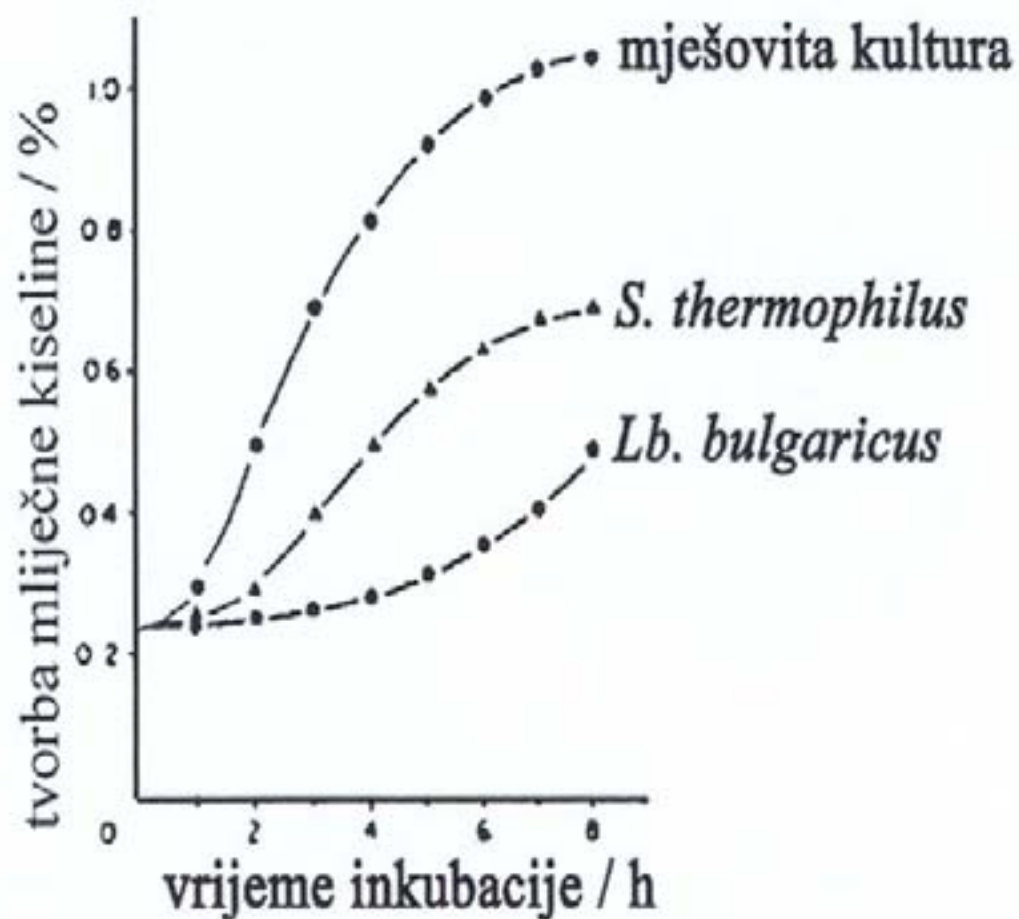
- Enzim **recemaza** → L u D-laktat ( nekoliko vrsta BMK)
- L- laktat aktivira recemazu = postojanje L i D laktata
- Općenito: L –laktat- rana faza rasta, a D- laktat u stacionarnoj fazi rasta
- Koncentracija piruvata i pH sredine djeluju na aktivnost laktat- dehidrogenaze i na odnos izomera u različitim fazama rasta.

# Mliječne kiseline

- Mliječna kiselina:
- 10-50°C
- Bez mirisa, bezbojna blago viskozna tekućina
- Pikantan, reski okus

# Mliječna kiselina

- Mliječna kiselina gruša kazein pH 4,6  
= gel struktura – fermentirana mlijeka
- Mliječna kiselina + enzim- pH >5-  
parakazeinska gruševina - sir



**NASTAJANJE MLIJEČNE KISELINE U MLIJEKU (40°C) UZ DODATAK 2% INOKULUMA  
POJEDINAČNIH BAKTERIJA I JOGURTNE KULTURE**

## KARAKTERISTIKE TERMOFILNE KULTURE BMK

Termofilne bakterije	Optimalni rast	Tip vrenja	Mliječna kiselina	Proteolitički enzimi	Potiče tvorbu
<i>Streptococcus thermophilus</i>	40-45 °C	homofermentativni	0,6-1,0%	+	laktata (L+) (tvori aromu)
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	40-50 °C	homofermentativni	1,5-2,0%	+	laktata (D-)

## KARAKTERISTIKE MEZOFILNE KULTURE BMK

Mezofilne bakterije	Optimalni rast	Tip vrenja	Mliječna kiselina	Vrenje citrata	Potiče tvorbu
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	oko 30 °C	homofermentativni	L(+) 0,5-0,8%	+/-	kiselina (+ sluzave tvari)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	25-30 °C	homofermentativni	L(+) 0,5-0,8%	-	kiselina (+ sluzave tvari)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>	oko 30 °C	homofermentativni	L(+) 0,3-0,6%	+	kiselina + tvari arome, CO <sub>2</sub>
<i>Leuconostoc</i> spp.	20-25 °C	heterofermentativni	D (-) 0,1-0,2%	+	tvari arome, CO <sub>2</sub>

# Metabolizam citrata- BMK

*Lc.lactis* subsp.*lactis* biovar diacetylactis

*Leuconostoc* spp.:

Citrat permeaza → stanica

Citrat ← citrat liaza → oksalacetat + acetat  
oksalacetat + CO<sub>2</sub> → piruvat + CO<sub>2</sub>

↓  
α acetolaktat + CO<sub>2</sub> ( ne enzimatska reakcija)

↓

diacetil + acetoin + 2,3 butilenglikol, octena kiselina (Krebsov ciklus)

- Piruvat se u stanici razgrađuje u prisutnosti Mg<sup>+2</sup> i Na<sup>+2</sup> i tiaminpirofosfat

stanica se rješava piruvata

# Metabolizam citrata- BMK

- diacetil -male koncentracije- aroma
- acetoin, 2,3 butilenglikol, octena kiselina  
>koncentracije od diacetila- ne utječu na aromu

Aromatska komponenta: kiselo mlijeko, svježi sirevi, vrhnje, maslac

# Stvaranje acetaldehida -BMK

- Treonin (amino kiselina)



treonin aldolaza

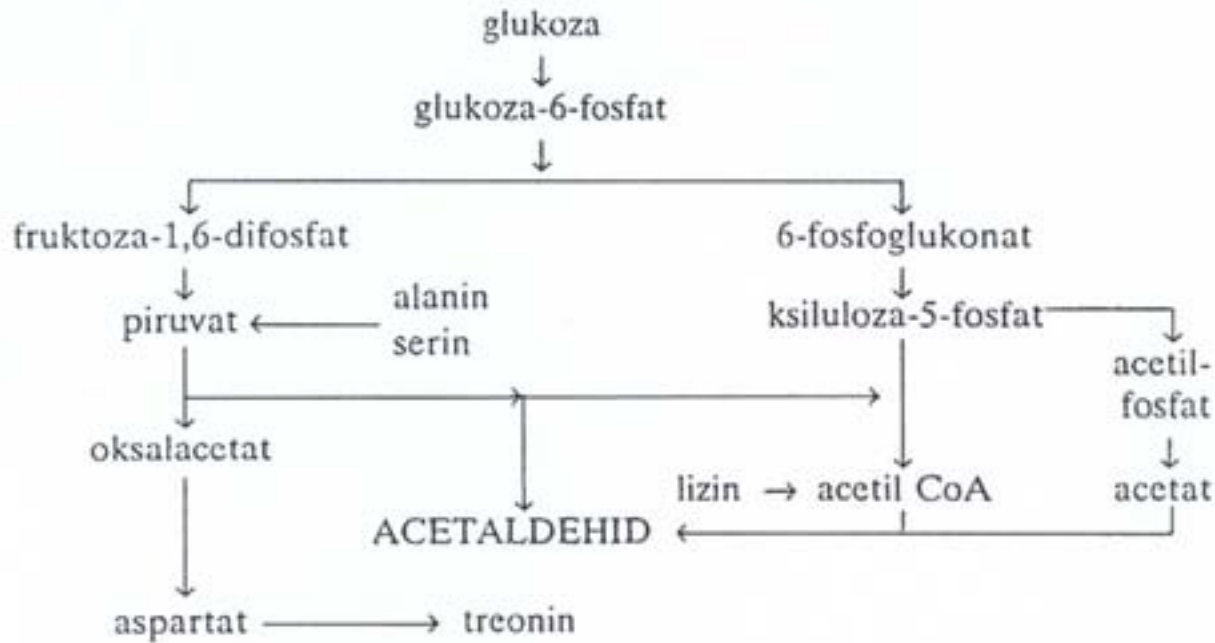


acetaldehid

- *Lactobacillus delbreukii* subsp. *bulgaricus*

JOGURT

# Stvaranje acetaldehida -BMK



PUTOVI NASTAJANJA ACETALDEHIDA

## NASTAJANJE KARBONILNIH SPOJEVA (PPM) VRENJEM MLIJEKA BAKTERIJAMA JOGURTNE KULTURE

Kulture	Acetaldehid	Aceton	Acetoin	Diacetil
<i>Streptococcus thermophilus</i>	1,0-8,3	0,2-5,2	1,5-7,0	0,1-13,0
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>	1,4-12,2	0,3-3,2	tragovi-2,0	0,5-13,0
Mješovita kultura	2,0-41,0	1,3-4,0	2,2-5,7	0,4-0,9

# Stvaranje egzopolisaharida -BMK

- Egzopolisaharid (EPS)
- Forma EPS:
  - a) Kapsula priljubljena uz bakteriju
  - b) Labavo povezana uz bakterijsku stanicu
  - c) sluz

# Stvaranje egzopolisaharida -BMK

- Polisaharidi:
- Ramnoza, glukoza, galaktoza i glicerol – mezofilni organizmi.
- Glukoza, galaktoza + male količine fruktoze, manoze, arabinoze, ramnoze, ksiloze, N-acetilgalaktozamin (Pojedinačno ili u kombinaciji)- termofilni organizmi

# Stvaranje egzopolisaharida -BMK

- Primjer –viili-viskozno fermentirano mlijeko-Finska
- Kultura:
  - a) Mezofilni laktokoki- sluz
  - b) Laktokoki + leukonostok- aroma

# Stvaranje egzopolisaharida -BMK

- **80. godine / termofilne viskozne jogurtne kulture**
- **Uloga:**
  - a) poboljšanje reoloških svojstava**
  - b) sprečavanje sinereze**
  - c) zamjena za stabilizatore u nekim vrstama jogurta**

# Stvaranje egzopolisaharida -BMK

- Egzopolisaharide (EPS) stvaraju sojevi:  
*Sc. thermophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. sake*,  
*Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*.  
*Bifidobacterium bifidum*, *Bif. longum*, *Bif. infantis*
- *Lc.lactis subsp. cremoris*

# Stvaranje egzopolisaharida -BMK

- Polisaharidi čine mrežu na način da je bakterijska stanica filamentima povezana za proteine.

# Stvaranje egzopolisaharida -BMK

- Primjer: Jogurt

Tekstura jogurta proizvedenog s EPS kulturom = kompleksna interakcija između proteina, mliječne kiseline i EPS → = povoljan utjecaj na čvrstoću, glatkoću, viskozitet, stabilnost gela

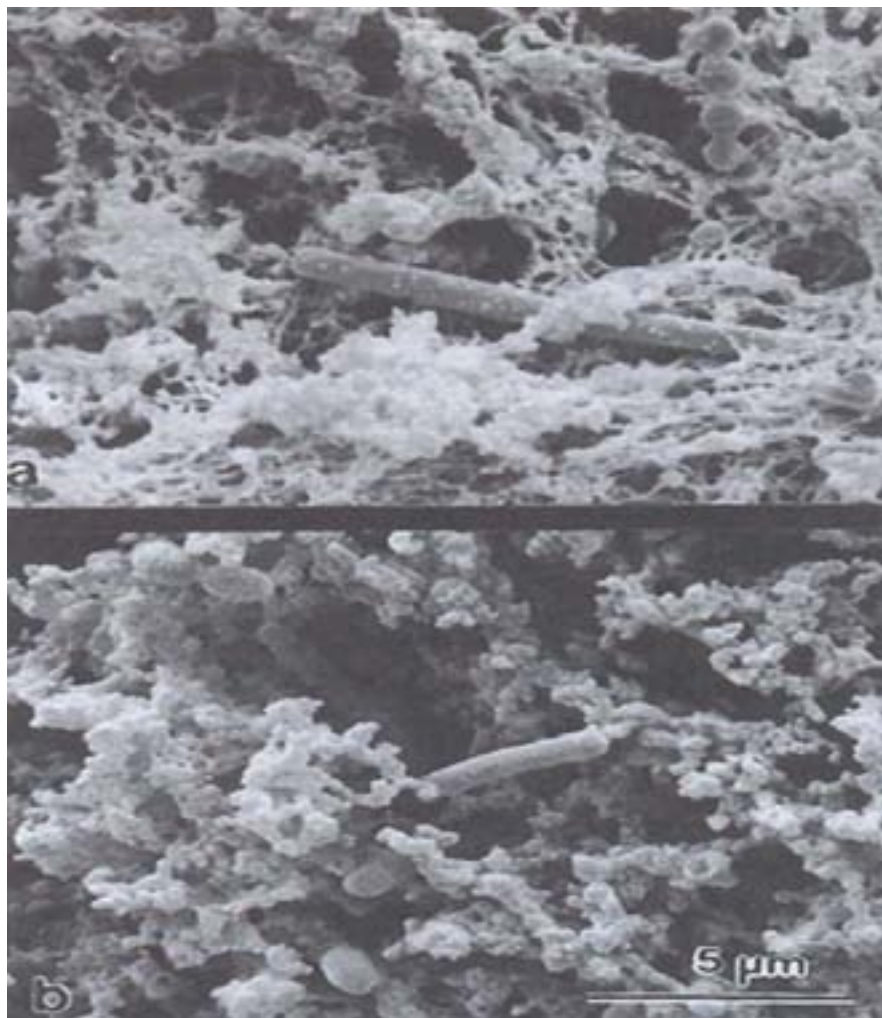
# Stvaranje egzopolisaharida -BMK

- Primjer. Tekući jogurt

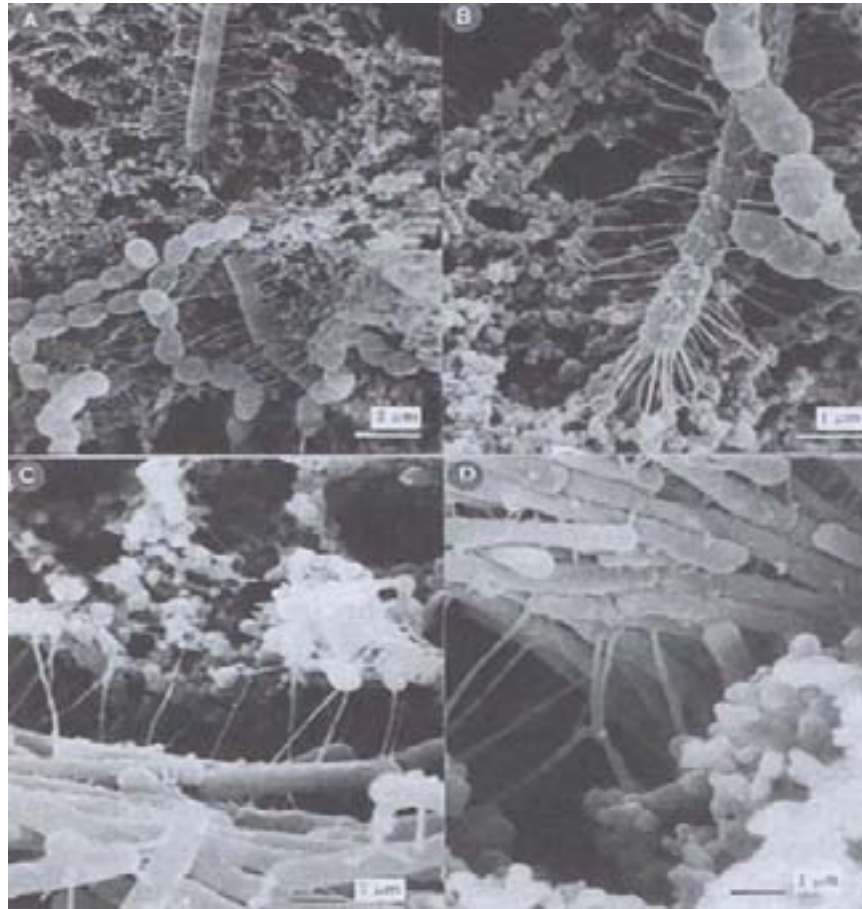
sposobnost stvaranja sluzi = glatka  
tekstura, veća viskoznost, smanjena  
sinereza, veća tolerantnost na mehaničku  
trešnju

Okus u ustima pun, ugodan

# Stvaranje egzopolisaharida –BMK -tekući jogurt a)sa, b) bez ESP



# Stvaranje egzopolisaharida –BMK –jogurt *L. delbrueckii* subsp.*bulgaricus*



# Stvaranje egzopolisaharida -BMK

Sojevi s tzv. kapsulom(EPS) usporavaju difuziju mliječne kiseline iz stanice→ smanjeno stvaranje prekomjerne kiselosti fermentiranih mlijeka

# Stvaranje egzopolisaharida -BMK

- Sojevi BMK+ EPS
- POVOLJAN FIZIOLOŠKI UČINAK NA ZDRAVLJE
- Nespecifično povećanje imuniteta domaćina
- Proizvodi: jogurt, kefir, viili

# Alkoholna fermentacija

# Alkoholna fermentacija

- BMK +kvasci
- Glukoza → etilni alkohol + CO<sub>2</sub>
- Kvasci: Torula i/ili Candida
- Karakteristika: fermentacija laktoze
- Proizvodi: Kefir, Kumis

# Alkoholna fermentacija

- Alkoholna fermentacija- ostala fermentirana mlijeka- **nepoželjna fermentacija**
- Pogreške:
  - a) Okus –voćni
  - b) Konzistencija -plinovita

# Fermentacija djelovanjem plijesni

# Fermentacija- plijesni

- *Geotrichum candidum* –skandinavska fermentirana mlijeka (Finska-viili)

# Fermentacija- plijesni

- Nema dovoljno podataka
- Zna se:
- Lipoliza i metabolizam triacilglicerida
- Proteoliza kazeina
- Oksidacija mliječne kiseline

# Fermentacija- plijesni

- Rezultat/posljedice u fermentiranom mlijeku:
- De-acidifikacijski učinak
- nastajanje kratko- lančanih MK → hidroliza → metil-ketoni = hlapivi spojevi-okus
- Nastajanje MK srednjeg lanca (C5-C12)
- Slaba proteoliza- tekstura, okus
- Zaštitna – patogeni mo.

# Metabolizam proteina

BMK

# Metabolizam proteina

- Malo slobodnih AK u mlijeku ~1 mg/L
- Slabi proteoliti ~1%
- Vlastiti proteolitički sustav enzima

# Metabolizam proteina

- Peptidi različitih veličina, slobodne AK i njihove promjene tijekom fermentacije =fizikalna struktura fermentiranih mlijeka
- Oslobađanje AK- esencijalno za rast i razmnožavanje sojeva BMK
- Prekursori arome
- Nutritivno značenje

# Metabolizam proteina

- Omjer proteolitičkih spojeva:
  - a) Proteinskim frakcijama u mlijeku
  - b) vrsti proteolitičkih enzima / karakteristika soja BMK
  - c) endopeptidaze i ekzopeptidaze / karakteristika soja

# Metabolizam proteina

- Protein – endopeptidaze - (1 stupanj)→
- Polipeptidi – egzopolipeptidaze –  
(2 stupanj)→amino kiseline

# Metabolizam proteina-BMK

- Laktokoki:
- Stanično vezana:
  - **Proteinaza P** → kazein → oligopeptidi
- **Di- i tri peptidne permeaze** ( transportni sustav)
- **Oligopeptidna permeaza**
- **Intracelularne peptidaze** → AK

# Metabolizam proteina

- Laktobacili
- *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ← endopeptidaza  
→ kazein → polipeptidi → *S. thermophilus*  
← ekzopeptidaza → AK

*L. acidophilus*, *L. helveticus*

= Kazeolitičko djelovanje na određene kazeinske frakcije

- Gorki peptidi u jogurtu- *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

# Metabolizam masti

BMK

# Metabolizam masti

- Lipoliza – limitirana
- trigliceridi → lipaze → di- → lipaze → mono- → lipaze → masne kiseline + glicerol

# Metabolizam masti

- Lipoliza:
- % masti- > kada je viši % masti
- Homogenizacija- > veća lipoliza
- Smanjenje ili povećanje MK u proizvodu ovisi o soju BMK/vrsti mlijeka

# Metabolizam masti

- Primjer:
- *S. thermophilus* + *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* + *L. acidophilus*; punomasni jogurt:
  - a) povećanje zasićenih MK i oleinske kiseline,
  - b) smanjenje linolne i linolenske MK
  - c) povećanje slobodnih MK

# Metabolizam masti

- d) povećanje stearinske i oleinske kiseline u slobodnoj formi
- e) monogliceridi potpuno nestaju nakon fermentacije
- f) promjene kolesterola nisu statistički značajne
- g) visoka korelacija između ° kiselosti i razine slobodnih MK

# Metabolizam masti

- Hlapive MK
- Povećanje razine:
  - a) soj BMK
  - b) vrsta mlijeka
  - c) trajanje/temp. inkubacije
  - d) temp. pasterizacije
  - e) starosti jogurta
  - f) količini citrata u mlijeku < citrata < HMK

# Metabolizam masti

- Smatra se da su HMK posljedica djelovanja proteolitičkih enzima, a ne lipaza
- BMK nemaju “pravih” esteraza
- HMK = oksidativnom deaminacijom i dekarboksilacijom AK se razgrađuju u odgovarajuću HMK