

Fermentirani mliječni proizvodi

Mikrobne kulture

Mikrobne kulture

- **najvažnija komponenta u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda**
- **kulture se sastoje od neškodljivih aktivnih organizama koji svojim rastom i razmnožavanjem u mlijeku osiguravaju željeni okus i teksturu fermentiranom mliječnom proizvodu**

Mikrobne kulture-definicija

- **Medij koji sadrži specifične mikroorganizme koji se inokuliraju u mlijeko. Njihov metabolizam mora osigurati mikrobiološki siguran proizvod s određenim organoleptičkim i strukturalnim svojstvima na učinkovit i ponovljivi način**

Mikrobne kulture

Osobine, svojstva, selekcija

Mikrobne kulture-osobine

- **Prilagodba na različite proizvodne uvjete**
- **Brzo stvaranje kiseline u tanku**
- **Minimalno stvaranje kiseline u vrijeme čuvanja i transporta**

Mikrobne kulture-osobine

- **Osiguranje prisutnosti živih organizama u vremenu održivosti (tzv. shelf-life) proizvoda na policama**
- **Tipični okus, miris i teksturu točno određenog proizvoda**

Mikrobne kulture-svojstva

- **da ne pokazuje patogenu ili toksičku aktivnost**
- **da ima sposobnost željenih promjena**
- **da ima sposobnost dominacije s kompetitivnom mikrobnom populacijom**
- **lagano razmnožavanje i rast u novom mediju**
- **da se može lagano čuvati**

Mikrobne kulture-selekcija

- **Brzinu rasta i broj živih organizama u mediju**
- **Brzinu i količinu stvaranja mliječne kiseline**
- **Sposobnost stvaranja aromatskih tvari i /ili CO₂**
- **rezistentnost na fag.**
- **Sposobnost stvaranja viskoznih komponenti**

Mikrobne kulture

- **Kultura: 1 vrsta i/ili više vrsta (sojeva) BMK/kvasci, plijesni**
- **1 vrsta: soj rezistentan na antibiotik, bakteriofag.**
- **2 ili više vrsta : Kultura aktivna i nakon fag. infekcije**

Mikrobne kulture- oblik

- **Tekuće kulture**
- **Smrznute- osušene kulture**
- **Koncentrirane smrznute kulture**
- **Koncentrirane smrznute osušene kulture**

Mikrobne kulture-tekuća kultura

- Stock $10^8/\text{ml}$ → 1% → matična kultura

(100 ml)

↓ 1-2%

Radna kultura (3-5 Boca/5 litara)

↓ 1-2%

Tehnička 500-1000 l



Procesni tank 10 000 l

Mikrobne kulture-tekuća kultura

- **Prednosti:**
 - a. za proizvodnju specifičnog proizvoda
 - b. kada postoji dostupan izvor
 - c. kada su potrebne male količine kulture

Mikrobne kulture-tekuća kultura

- Nedostaci:
- Stok kultura -1 x tjedno
- Postupak pripreme: skup, vremenski zahtjevan, stručan kadar
- Lagana kontaminacija-brojne inokulacije

Mikrobne kulture

- Tekuća kultura-alternativa

Osim tekuće, može se za pripremu matične kulture koristiti **smrznuta osušena kultura** kao **stock kultura** koja se može čuvati na

-25°C nekoliko mjeseci

Mikrobne kulture

- Način pripreme smrznute osušene kulture:

Stock 10^8 - 10^9 → matična (100 ml) → 1-2% → radna kultura 2-5x → 1-2% tehnička (500-1000L)



PROIZVODNI TANK (10 000 L)

Mikrobne kulture-tekuća kultura- alternativa

- **Prednosti:**

Osiguranje kvalitete duže razdoblje

Nedostaci: kao i kod tekuće kulture

Savjet: pojedini sojevi iz mješovite kulture –zasebno zamrznuti- radi očuvanja ravnoteže u kulturi

Mikrobne kulture-koncentrirana smrznuta kultura

- **1960. g. Uvedena u mljekarsku industriju**
- **Stock - 10^{10} - 10^{11} mL**

Mikrobne kulture-koncentrirana smrznuta kultura

- **Priprema:**

Stock 10^{10} - 10^{11} /ml (70 ml) → 500-1000 g



PROIZVODNI TANK (10 000 l)

Mikrobne kulture-koncentrirana smrznuta kultura

- **Prednosti:**
 - a) Lagana za upotrebu**
 - b) Lakše planiranje proizvodnje/5 dana**
 - c) Aktivnost kulture dobra**
 - d) Smanjena mogućnost kontaminacije**

Mikrobne kulture-koncentrirana smrznuta kultura

- Nedostaci:
 - a) Niske temperature tijekom transporta i skladištenja (-196°C /tekući dušik;
- 40 °C/suhi led
 - b) Promjene temperature slabljenje aktivnosti kulture
 - c) Selekciju kultura radi proizvođač
 - d) **Neke dobre tradicionalne kulture nije moguće koncentrirati- smrznuti**

Mikrobne kulture-koncentrirana smrznuta-osušena kultura

- **1970. g uvedena alternativa koncentriranoj smrznutoj kulturi – koncentrirana smrznuta –osušena kultura**
- **Postupak pripreme- isti kao za koncentriranu-smrznutu kulturu**

Mikrobne kulture-koncentrirana smrznuta-osušena kultura

- **Prednosti: nije potrebno osiguranje niskih temperatura u transportu i skladištenju**
- **Nedostaci: izuzetno duga lag faza**

Mikrobne kulture- DVS

- 1982. g. EUROzyme kompanija (Francuska)
- DVS (direct vat set)= za direktnu upotrebu
- DVS (koncentrirane-zamrznute- osušene)
- Pakiranje alu-pakiranje u atmosferi dušika
- Broj organizama 10 **11** /g/ paketu
- Čuvanje: 4 °C/ 1 godina

Mikrobne kulture- DVS

- **Nedostatak:**
- **dugačka lag faza/30-60 min**
- ***Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* i *Lb helveticus* ne mogu se prirediti metodom smrzavanja i isušivanja**
- **Optimalna temperatura rehidracije za mezofilne i termofilne kulture BMK= 20°C**

Mikrobne kulture

- Tradicionalne: nepotpuno definiranih bakterijskih vrsta i sojeva
- Razlog upotrebe:
 - manja osjetljivost na fag. infekciju
 - stabilnost kulture pripisuje se simbiotskom odnosu

Mikrobne kulture

- Definirana ili selekcionirana kultura koja sadrži:

jedan ili više identificiranih sojeva sa specifičnim, ali poznatim svojstvima

Mikrobne kulture

- Specifičnosti definirane kulture:
- Omjer stvaranja mliječne kiseline
- Kapacitet za produkciju polisaharida
- Limitiranu proteolizu
- Sposobnost stvaranja aromatskih komponenti
- Sposobnost povećanja nutritivne i/ili fiziološke vrijednosti proizvoda

Mikrobne kulture

- Definirana i stabilna kultura:
- točno određena količina mliječne kiseline
- željeni okus
- željenu konzistenciju proizvoda

Mikrobne kulture

- mezofilna kultura:
10- 40°C optimum 30°C
- termofilna kultura:
optimalna temperatura između 40 -50°

Mezofilna kultura

Mezofilna kultura

- Koristi se: kiselo mlijeko, svježi sir, kiselo vrhnje, maslac

Mezofilna kultura

- Sastoji se od:

Lactococcus lactis subsp.*lactis*- mliječna k.

Lactococcus lactis subsp.*cremoris*- mliječna

Lactococcus lactis subsp.*lactis* biovar
diacetylactis - aroma

Leuconostoc lactis -aroma

Leuconostoc cremoris- aroma

Mezofilna kultura

Microbiological and biochemical attributes of typical mesophilic lactic acid bacteria used in fermented milks

Characteristic	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremonis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>
Cell shape and configuration	Cocci, pairs, short chains	Cocci, pairs, short/long chains	Cocci, pairs, short chains	Cocci, pairs, short/long chains	Cocci, pairs, chains
Catalase reaction	—	—	—	—	—
Growth temperature (°C)					
Optimum	28–31	22	28	20–25	20–25
Minimum	8–10	8–10	8–10	4–10	4–10
Maximum	40	37–39	40	37	37
Incubation temperature (°C)	21–30	22–30	22–28	22	22
Heat tolerance (60 °C for 30 min)	±	±	±	—	—
Lactic acid isomers	L(+)	L(+)	L(+)	D(-)	D(-)
Lactic acid produced in milk (%)	0.5–0.7	0.5–0.7	0.5–0.7	0.1–0.2	0.1–0.2
Acetic acid production (%)	—	—	—	0.2–0.4	0.2–0.4
Gas (CO ₂) production	—	—	+	=	=
Proteolytic activity	+	+	+	=	±
Lipolytic activity	±	±	±	=	=
Citrate fermentation	—	—	+	-	-
Flavour/aroma compounds	+	+	+++	---	---
Mucopolysaccharide production	±	±	±	No dextran from sucrose	Dextran from sucrose
Hydrogen peroxide production	+	+	+	=	±
Alcohol production	±	±	±	=	±
Salt tolerance (% max)	4–6.5	4.0	4–6.5	6.5	6.5

Mezofilna kultura

- Uspjeh fermentacije primarno je ovisan o brzini stvaranja mliječne kiseline:
- Brzi sojevi- obrano mlijeko zgrušaju za <16 h
- Spori sojevi > 16 h

Mezofilna kultura

- bakterije “proizvođači” mliječne kiseline
- aromatske bakterije: diacetil, acetaldehid, acetoin, 2,3-butilen-glikol, CO₂
- Omjer između bakterija: ne više od 20% aromatskih → puna aroma po diacetilu (2-5 mg/kg)

Mezofilna kultura

- Rast aromatskih bakterija ovisan je o količini citrata u mlijeku/ velika varijabilnost:
- Prosječno 0,17-0,2%
- Raspon 0,07-0,4% (najniži zimi)
- Količina citrata: hranidba, *Enterobacter* spp. i *Pseudomonas* spp. (ljetno)

Mezofilna kultura

- Preporuka (diacetil):
 - a) dodatak citrata u mlijeko,
 - b) zamjena *Leuconostoc* spp. s *Lc.lactis* subsp.*lactis* biovar *diaceylactis*

Mezofilna kultura

- Preporuka (acetaldehid):
 - a) za izbalansirani okus < 1mg/l,
 - b) > 1 mg/l –okus po jogurtu
 - c) *Ln. cremoris* umjesto *Lc. lactis* subsp. *lactis*
biovar *diacetylactis*
 - d) diacetil: acetaldehid 4:1 minimalno
 - e) diacetil: acetaldehid 8:1 poželjno

Mezofilna kultura

- Mliječna kiselina najbrže se stvara 21-24°C
- Nutritivna vrijednost veća kada se koriste sojevi *Lactococcus* spp. s L (+) mliječnom kiselinom 93-100% (važno u prehrani djece, smatra se da nema restrikcija u odnosu na jogurt)

Mezofilna kultura

	% kultura	Inkubacija °C	Vrijeme h	Konačni pH	Mliječ na kis. %
raspon	0,3- 4,0	15-32	5-24	4,7-4,4	0,68-0,86
prosjek	1,0-3,0	19-22	15-20	4,7-4,6	0,75-0,85

Mezofilna kultura

- Kada sadrži tri vrste (species) – “O” tip
- Kada sadrži jedino *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *dyacetilactis* kao aromatsku vrstu – “D” tip
- Kada sadrži jedino *Leuconostoc* spp. kao aromatsku vrstu – “B” tip
- Kada sadrži *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *dyacetilactis* i *Leuconostoc* spp.- “BD” (ili LD) tip

Termofilna kultura

Termofilna kultura

- Koristi se: jogurt i probiotička fermentirana mlijeka primarno s intestinalnim laktobacilima i Bifidobakterijama

Termofilna kultura

- *Streptococcus thermophilus*
- *Lb. delbrueckii* subs. *bulgaricus*
- *Lb. acidophilus*
- *Lb. casei* subs. *casei*
- *Bifidobacterium bifidum*

Termofilna kultura

Characteristics of thermophilic starters

Characteristic	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus casei subsp. casei</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
Cell shape and configuration	Spherical to ovoid, pairs to long chains	Rods with round ends, single, short chains, metachromatic granules	Rods with round ends, single, pairs, short chains, no metachromatic granules	Rods with square ends, short/long chains	Curved rods with bifurcated ends (Y shaped); can also be multi-branched
Catalase reaction	—	—	—	—	—
Growth temperature (°C)					
Optimum	40–45	40–45	37	37	37
Minimum	20	22	20–22	15–20	22
Maximum	50	52	45–48	40–45	48
Incubation temperature (°C)	40–45	42	37	37	37
Heat tolerance (60 °C for 30 min)	++	+	—	—	—
Lactic acid isomers	L(+)	D(–)	DL	L(+)	L(+)
Lactic acid produced in milk (%)	0.6–0.8	1.7–1.8	0.3–2.0	1.2–1.5	0.1–1.4
Acetic acid production (%)	Trace	Trace	+	+	+++
Gas (CO ₂) production	—	—	—	—	±
Proteolytic activity	±	+	±	±	+
Lipolytic activity	±	±	±	±	±
Citrate fermentation	—	—	—	—	—
Flavour/aroma compounds	++	++	+	±	++
Mucopolysaccharide production	±	++	—	±	++
Hydrogen peroxide production	±	+	+	+	+
Alcohol production	—	Trace	Trace	Trace	Trace
Salt tolerance (% max.)	2.0	2.0	6.5	2.0	2.0

Termofilna kultura –jogurtna kultura

- *Streptococcus thermophilus* +
Lb. delbrueckii subs. *bulgaricus*
(sinergistički rast u mlijeku)

Optimalna temperatura: 42° C (40-43°C)

Omjer koki : štapići 1:1 do 2:1

Jogurt -kultura

- Sastav i učinak:

S. thermophilus + *L. delbrueckii* subsp.
bulgaricus : omjer 1:1-2:1

*Omjer se odnosi na organizme u kulturi i u konačnom proizvodu, tijekom fermentacije nekoliko puta omjer se promjeni → simbiotski odnos između bakterija

Jogurt-kultura

- *S. thermophilus* inicira stvaranje mliječne kiseline i raste brzo do pH 5,5. Rastom stvara povoljne uvjete za *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* → smanjuje se količina kisika, stvara se mravlja kiselina

Jogurt-kultura

- *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* → stimulira rast *S. thermophilus* proteolit. djelovanjem: treonin, metionin, valin



- Acetaldehid + lipoliliza



Okus



Okus

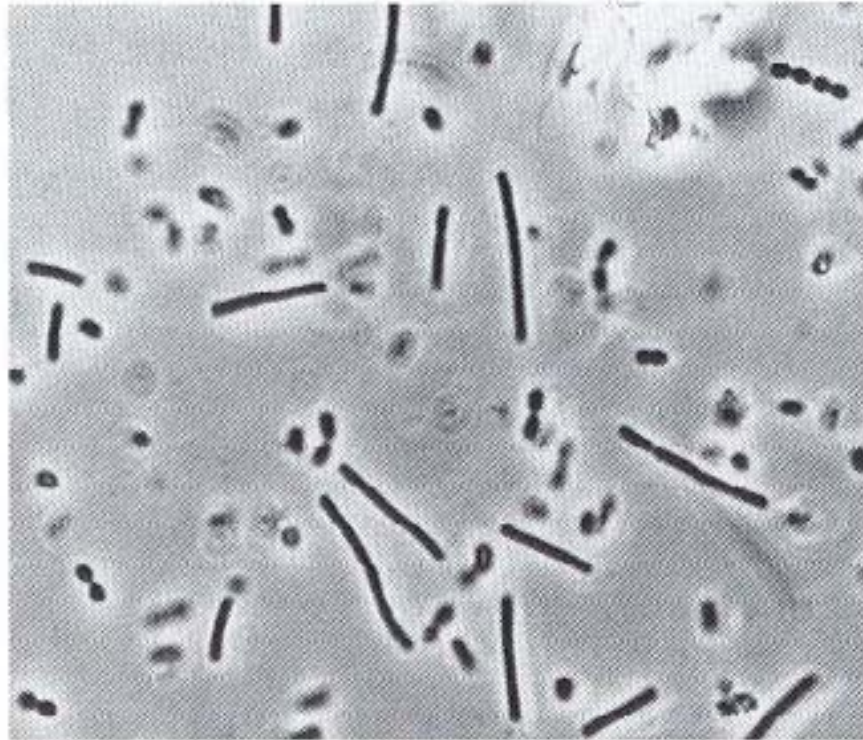
Termofilna kultura –jogurtna kultura

- *Lb. delbrueckii* subs. *bulgaricus* stimulira rast *S.thermophilus* razgradnjom kazeina do AK
- *S.thermophilus* →povećanje broja = rastu brže u prvoj fazi inkubacije (3-4: 1/prvi sat)
- zbog stvorene mliječne kiseline *S.thermophilus* usporava rast i broj počinje rasti *Lb. delbrueckii* subs. *bulgaricus*

Termofilna kultura –jogurtna kultura

- U drugoj fazi fermentacije omjer bakterija se izjednačuje
- Mikroskopiranje: Lanac/nakupina streptokoka mora biti vidljiva za svaki lanac / nakupinu laktobacila

jogurtna kultura



The culture of yoghurt.
(Chr. Hansen Laboratory, Copenhagen, Denmark)

Jogurt-kultura

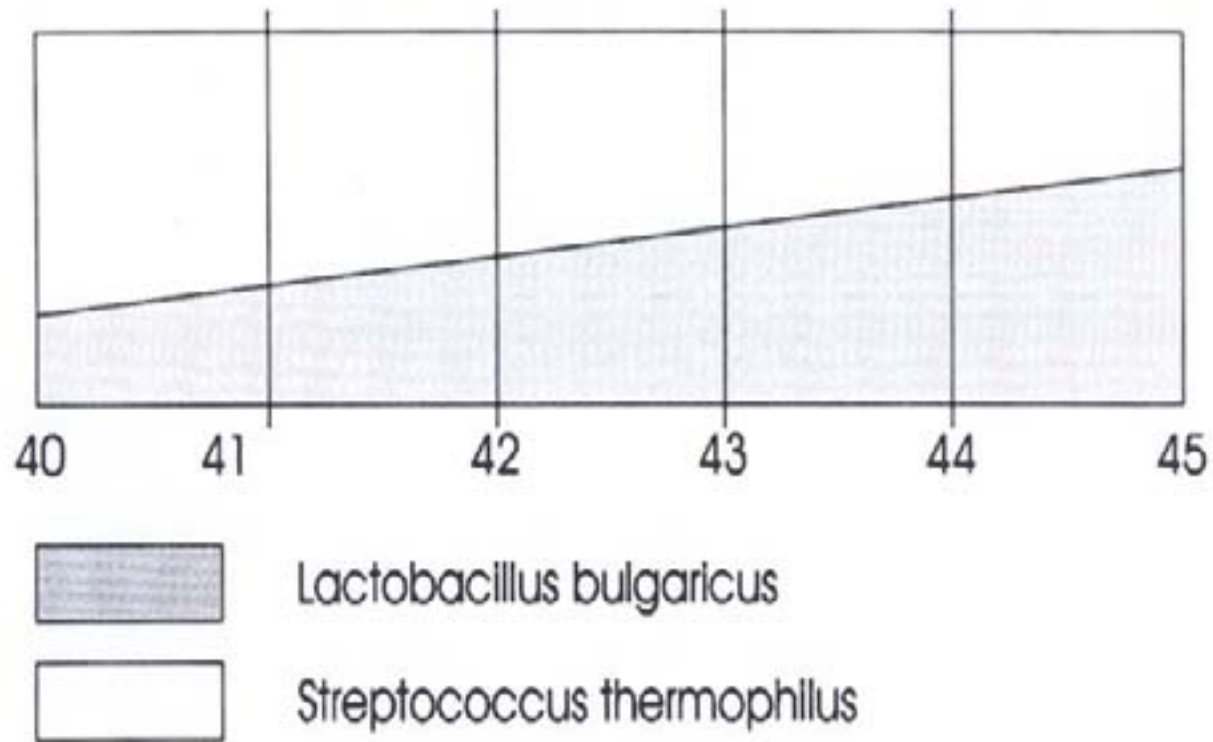
- Streptokoki → L(+) mliječnu kis. (ljudi, životinje)
- Laktobacili → D (-) i /ili oba izomera (ovisno o soju)
- Primjer: dobar jogurt; tepm. 42° C
45-60% L(+) i 40-55% D(-)
omjer koka : štapići 1:1

Jogurt-kultura

- Temp. Inkubacije $< 40^{\circ}\text{C}$ prevladavaju koki
- Temp. $> 45^{\circ}\text{C}$ prevladavaju štapići
- Rezultat: mijenja se omjer L(+) i D(-) mliječne kiseline; slabo kiseli ili prekisali jogurt

Jogurtna kultura

Utjecaj temperature inkubacije na broj koka i štapića u mješovitoj kulturi za jogurt



Jogurt-kultura

- Tipična aroma jogurta:
- a) mliječna kiselina + **karbonilni spojevi**
- b) nehlapive kiseline: piruvat, oksalna, jantarna
- c) hlapive kiseline: mravlja, octena, propionska
- d) udio slobodnih AK (1:1-70 μ g; 2:1-40 μ g)
- e) lipoliza

Termofilna kultura –jogurtna kultura

- Aromatske tvari:
- acetaldehid, aceton, acetoin, diacetil,
- Hlapive kiseline: mravlja, octena, propionska
- Nehlapive kiseline: piruvat, oksalna, jantarna
- Proizvode ih obje vrste/različite koncentracije

Termofilna kultura –jogurtna kultura

- acetaldehid - *Lb. delbrueckii* subs. *bulgaricus*
- *acetoin i diacetil*- *S.thermophilus*

Termofilna kultura – bio –jogurt

- *S.thermophilus* + *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (jogurtna kultura)

+

Lactobacillus, Bifidobacterium,
Enterococcus, Pediococcus