

Fakultet veterinarske medicine
Univerzitet u Beogradu
Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla

HRANA KAO SREDINA ZA RAZMNOŽAVANJE MIKROORGANIZAMA-MLEKO I PROIZVODI OD MLEKA

Tijana Ledina, docent

ZAŠTO NAM JE BIOHEMIJSKA AKTIVNOST MIKROORGANIZAMA U HRANI VAŽNA?

- MIKROORGANIZMI / METABOLIŠU OSNOVNE SASTOJKE NAMIRNICA (ZGLJENE HIDRATE, MASTI I PROTEINE)
- METABOLIČKI PRODUKTI ZNAČAJNI ZA **ODREĐENA SENZORNA SVOJSTVA** PROIZVODA OD MESA I MLEKA; **KVAR HRANE**; PRODUKTI KOJI MOGU BITI **ŠTETNI PO ZDRAVLJE LJUDI**

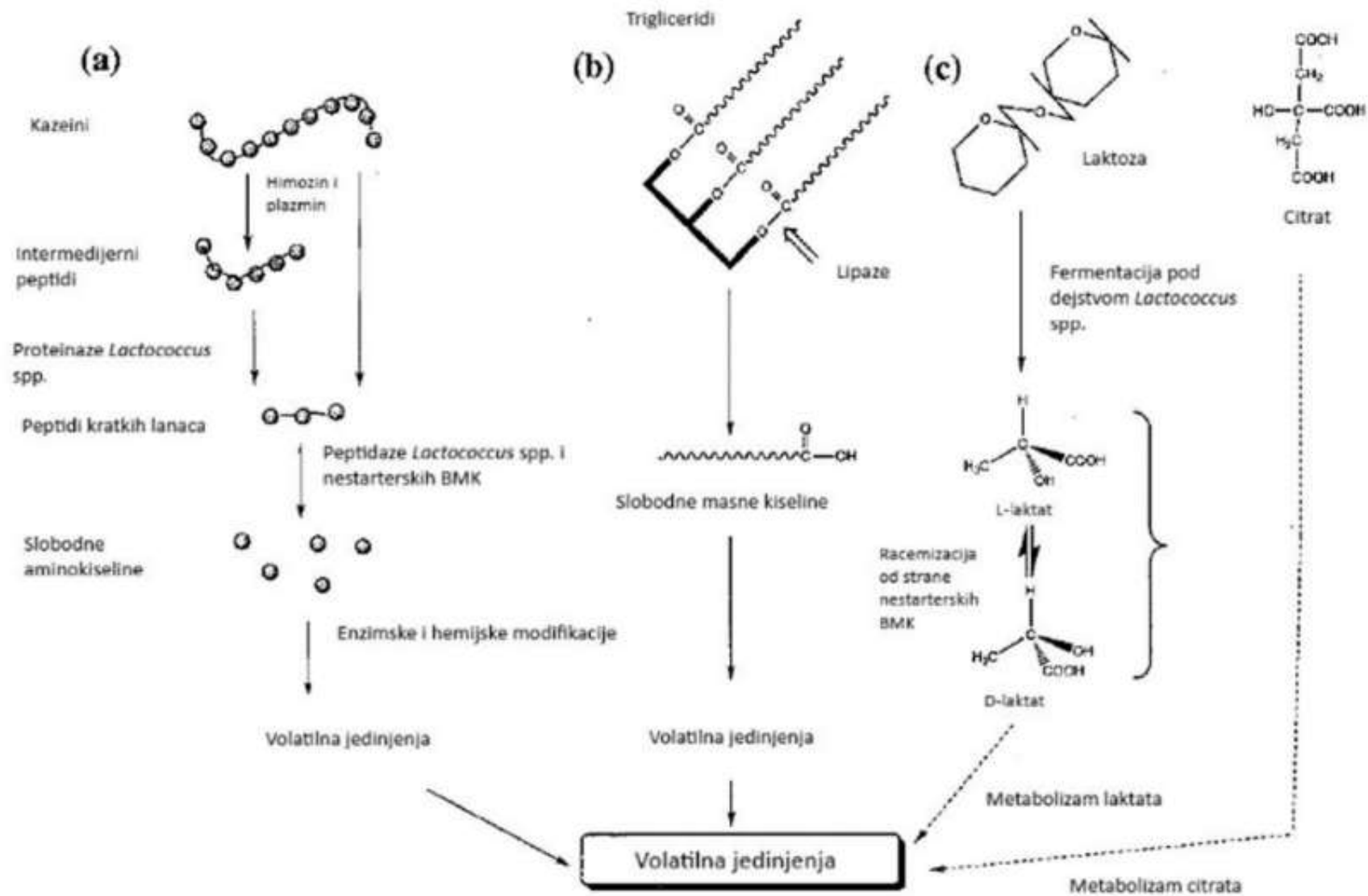


Zadatak mikrobiologa hrane je da razumeju šta utiče na rast mikroorganizama u namirnicama i kako ih može kontrolisati ili suzbiti

USLOVI KOJI UTIČU NA POPULACIJU MIKROORGANIZAMA

- **FIZIČKO HEMIJSKE OSOBINE NAMIRNICE**
- **USLOVI SKLADIŠTENJA**
- **OSOBINE I MEĐUDELOVANJE PRISUTNIH MIKROORGANIZAMA**

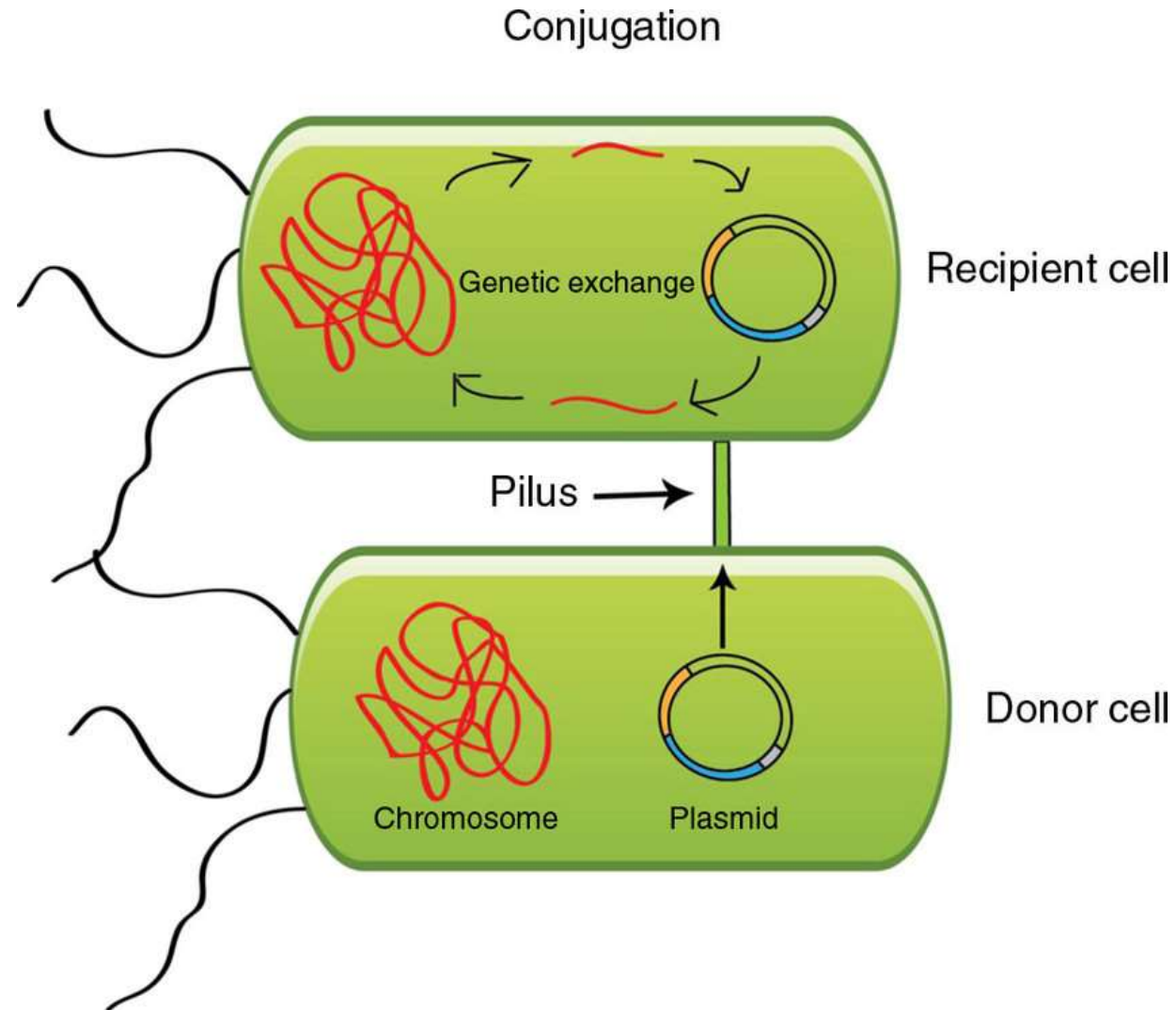
UNUTRAŠNJI ČINIOCI (INTRINZIČ) KOJI UTIČU NA RAST POPULACIJE: HRANLJIVI SASTOJCI pH i PUFERSK KAPACITET
REDOKS POTENCIJAL AKTIVNOST VODE ANTIMIKROBNI SASTOJCI ANTIMIKROBNE STRUKTURE



TRANSPORT I METABOLIZAM LAKTOZE

- **KATABOLIZAM ŠEĆERA kod BAKTERIJA MLEČNE KISELINE (BMK)- ENERGIJA POTREBNA ZA BIOHEMIJSKE PROCESE**
- OSNOVNI PREDUSLOV ZA METABOLIZAM ŠEĆERA I PRODUKCIJU ENERGIJE POTREBNE ZA SINTEZU ĆELIJSKIH KONSTITUENATA ILI FORMIRANJE KRAJNJIH METABOLITA -**TRANSPORT ŠEĆERA U UNUTRAŠNJOST ĆELIJE**
- **Katabolizam laktoze:**
 1. Transport LA u ćeliju
 2. Hidroliza LA
 3. Metabolizam monosaharida
 4. Efflux mlečne kiseline i protona iz ćelije

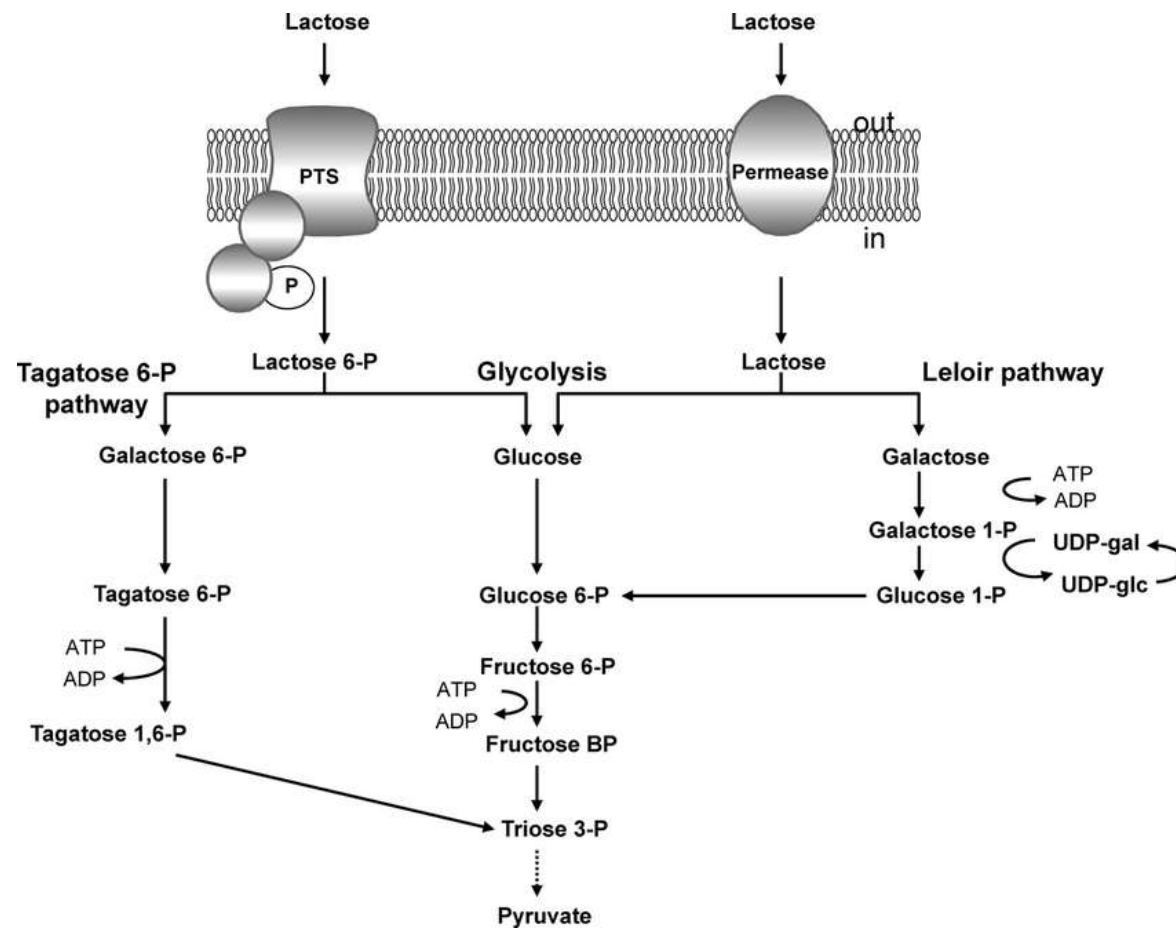
Nestabilna karakteristika – geni koji kodiraju biohemijsku “mašineriju” locirani na plazmidu



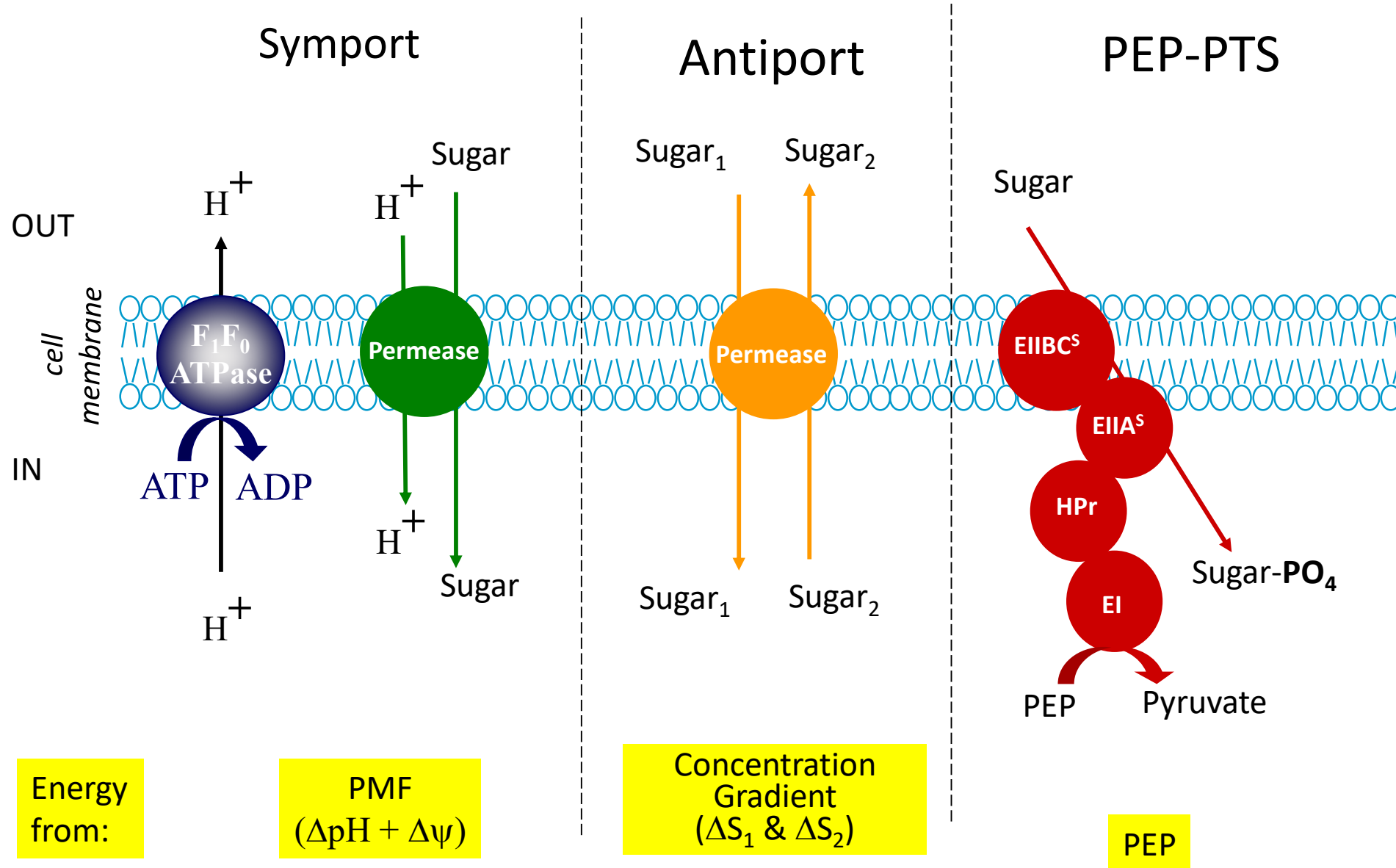
Sistemi transporta laktoze u ćeliju kod BMK

1. UČEŠĆE ENZIMA PERMEAZE

2. FOSFOENOLPIRUVAT/LAKTOZA ZAVISNI FOSFOTRANSFERAZNI SISTEM



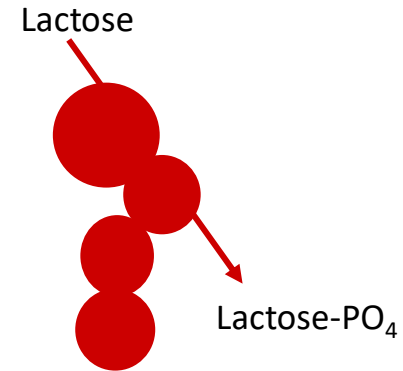
Sugar Transport in LAB



Transportni sistem / "species" specifičan

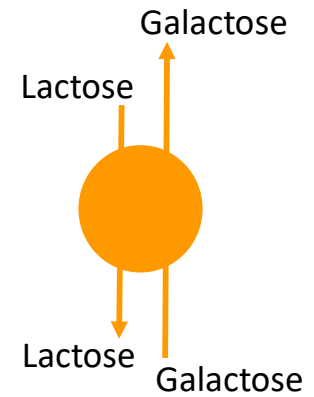
PEP-PTS:

Lactococcus sp.
Lactobacillus casei



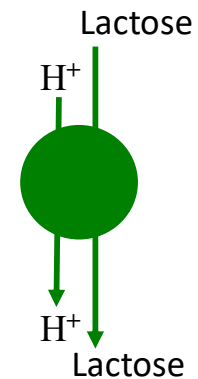
Antiport (lactose/galactose):

S. thermophilus
Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus*



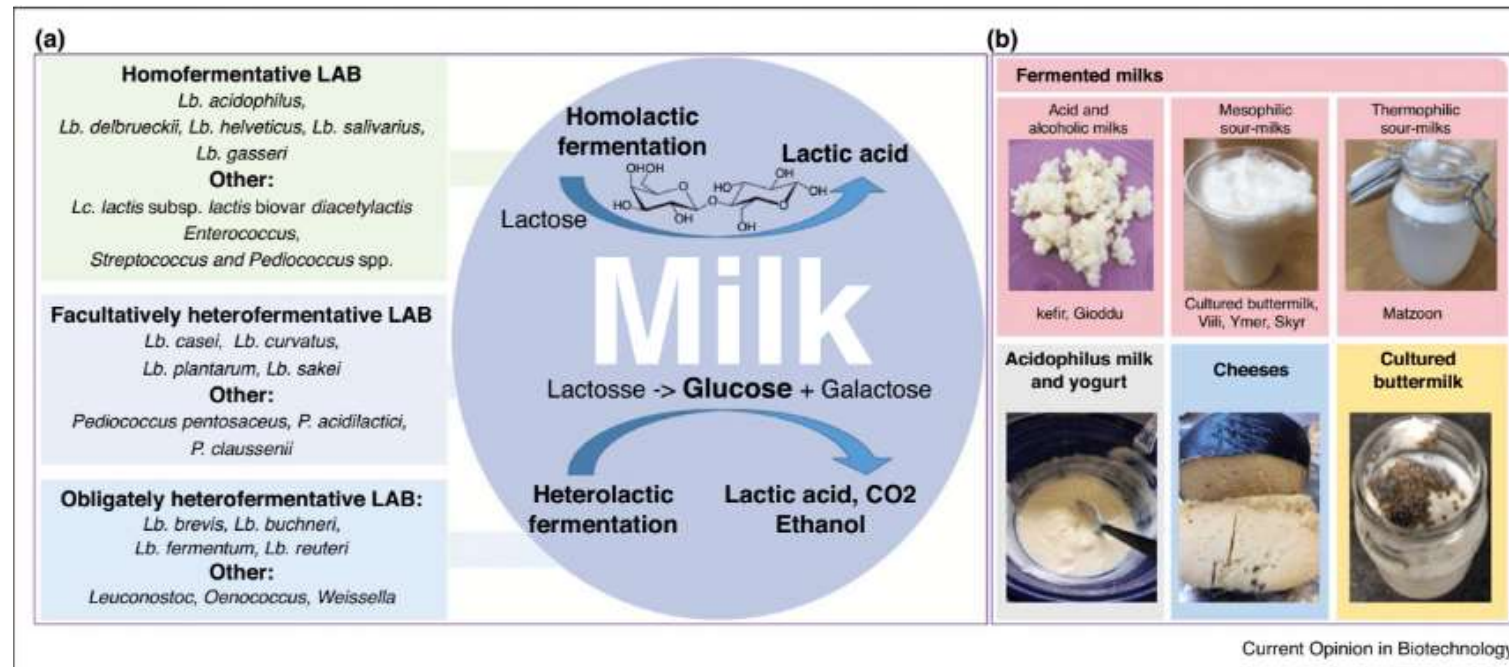
Symport

Lactobacillus helveticus
Lactobacillus acidophilus
Leuconostoc
Pediococcus

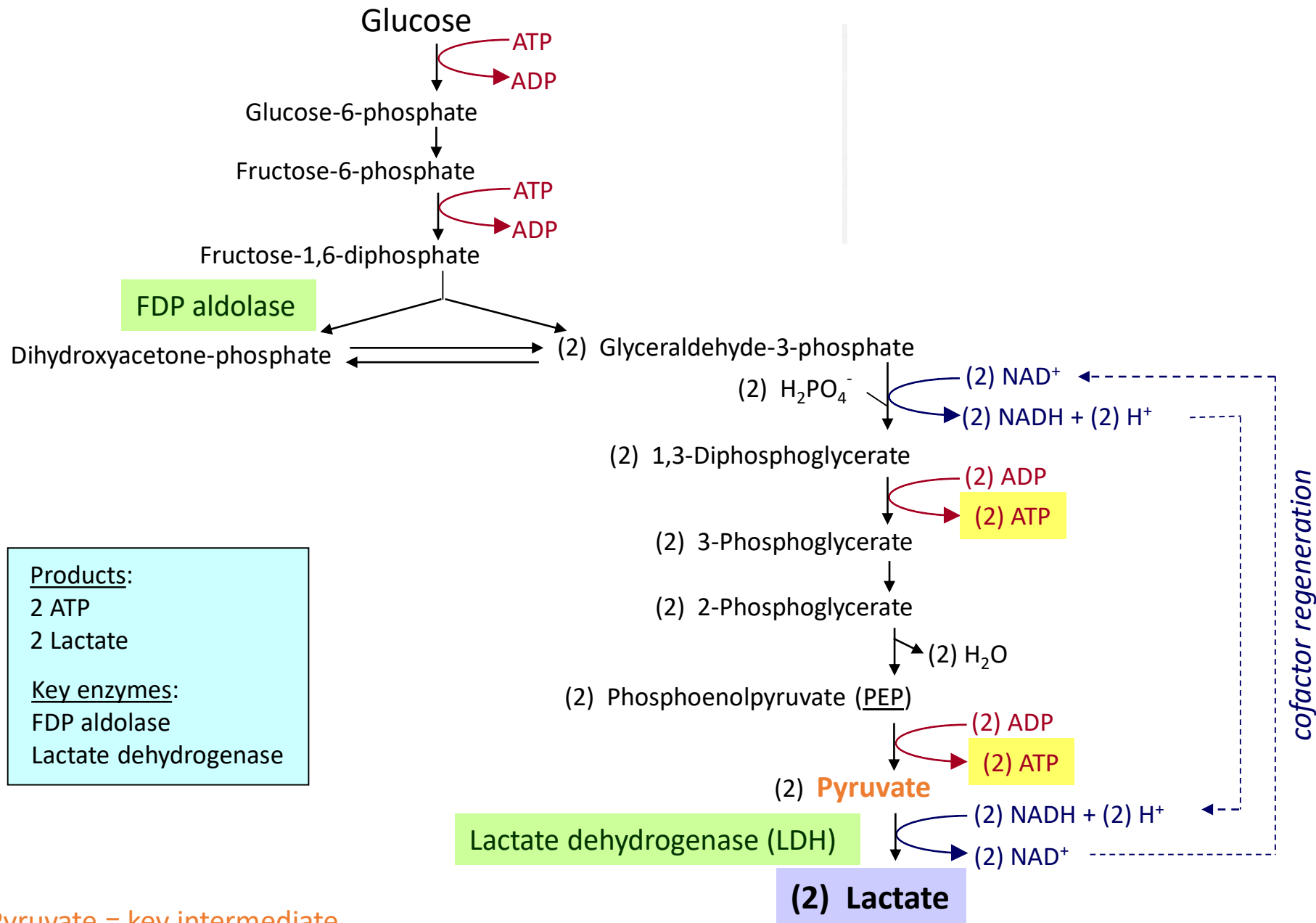


Homofermentativne i heterofermentativne bakterije mlečne kiseline

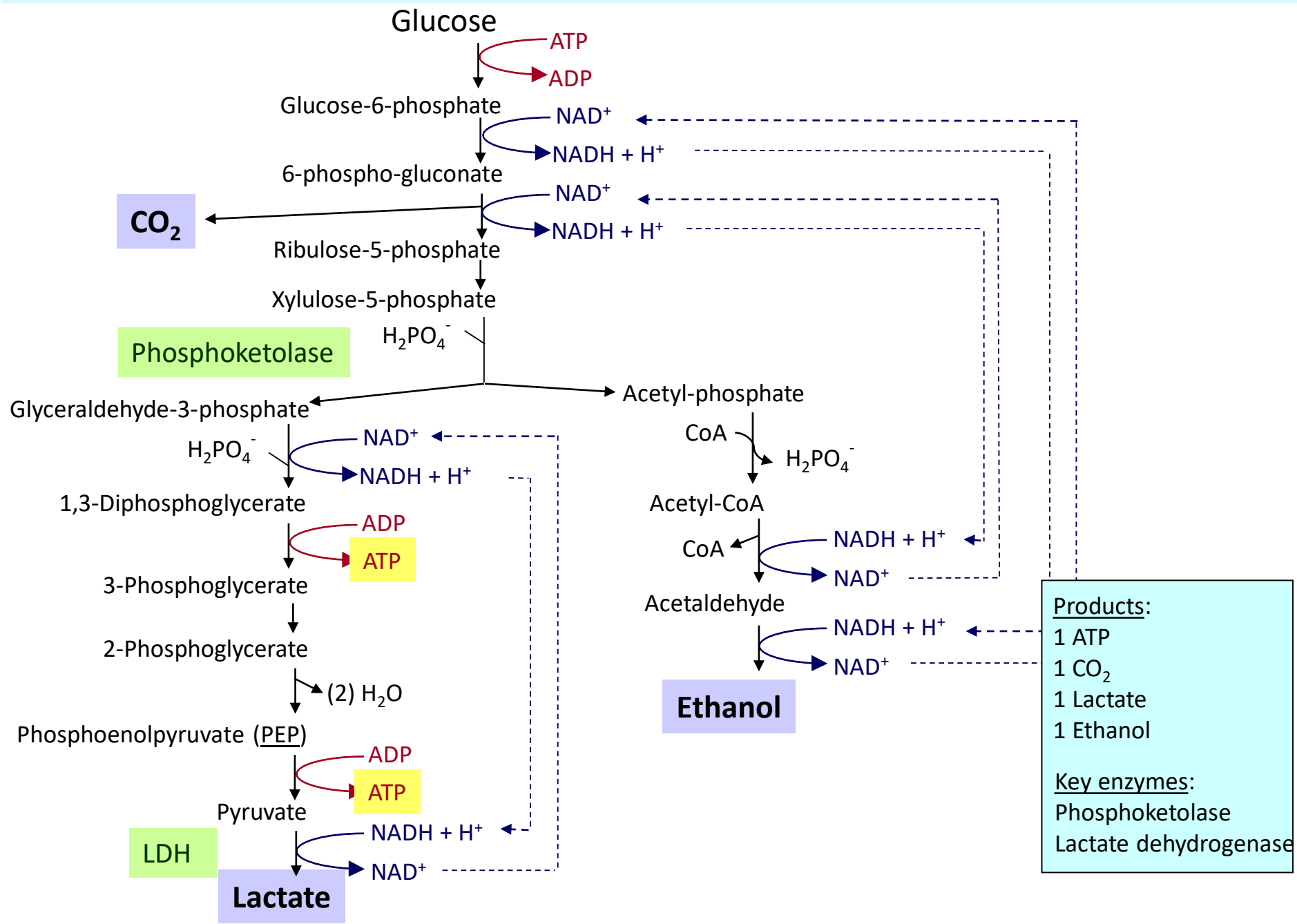
- Kod homofermentativnog razlaganja, mlečna kiselina je glavni proizvod razlaganja šećera - >90% (*Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, grupa I *Lactobacillus* spp.)
- Kod heterofermentativnog razlaganja, postoje i drugi produkti razlaganja: etanol, CO₂, druge organske kiseline (*Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, grupa III *Lactobacillus* spp.)



HOMOFERMENTATIVNI PUT RAZLAGANJA LAKTOZE

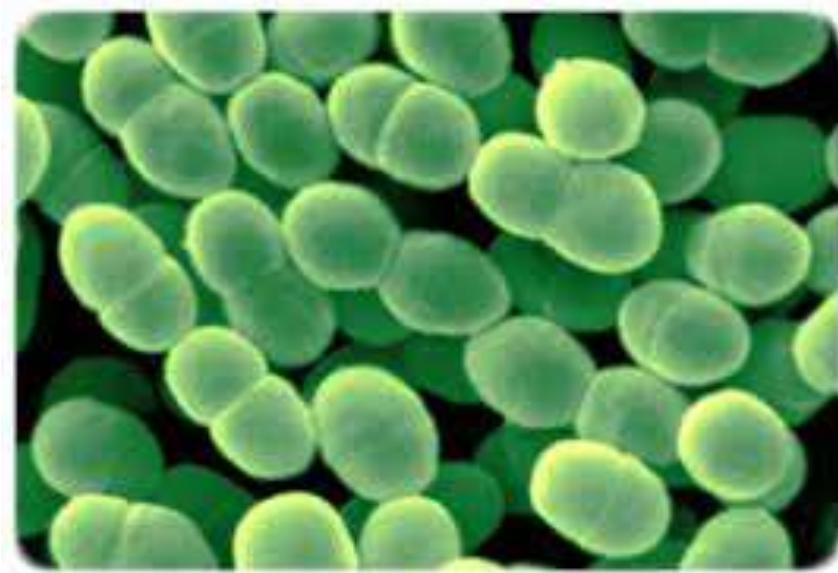


Heterofermentativni put razlaganja laktoze



TRANSPORT I METABOLIZAM LAKTOZE KOD *Lactococcus* spp.

- **PRISUSTVO PEP-LAKTOZA ZAVISNOG PTS SISTEMA I P- β GALAKTOZIDAZE SU PREDUSLOV ZA BRZO HOMOFERMENTATIVNO RAZLAGANJE LAKTOZE I ZAJEDNO SA PARALELNIM PUTEVIMA RAZLAGANJA GLUKOZA-6P I GALAKTOZA-6P PREDSTAVLJA NAJEFIKASNIJI PUT RAZLAGANJA LAKTOZE KOD LAKTOKOKA**



Permeaza i β -galaktozidaza kod laktokoka funkcionišu samo kod sojeva kojima nedostaje pep/pts sistem i kod njih je stepen fermentacije laktoze značajno niži

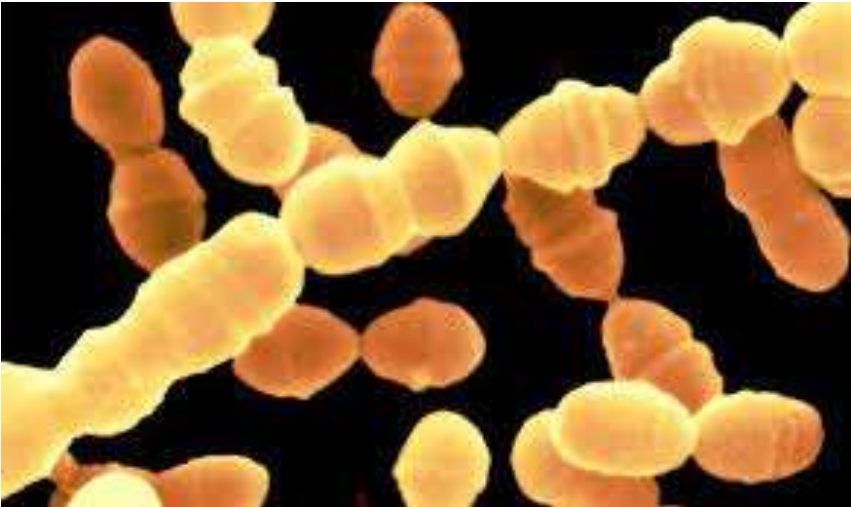
Streptococcus thermophilus

- nema sistem za razlaganje galaktoze (izlučuje je u spoljašnju sredinu u spoljašnju sredinu)
- galaktozu fermentišu *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* i oni idu u mešovitoj kulturi sa *Streptococcus thermophilus* kako bi se metabolisao zaostali šećer



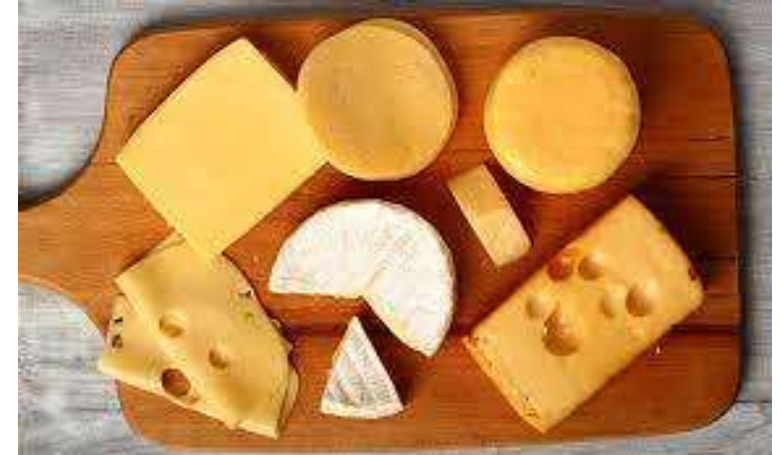
TRANSPORT I METABOLIZAM LAKTOZE KOD *Leuconostoc* spp.

- Laktoza u ćeliju ulazi uz pomoć permeaze
- Laktoza se hidrolizuje pomoću β -galaktozidaze do glukoze i galaktoze – fosfoketolaza ciklus- glukoza se metabolizuje do jednakih koncentracija mlečne kiseline, etanola i CO_2 (**HETEROFERMENTATIVNI PUT**)



TRANSPORT I METABOLIZAM LAKTOZE KOD *Lactobacillus* spp.

- **PERMEAZA** tip **SISTEM**
- Aktivnost **β -galaktozidaze**
- Tip fermentacije: **obligatno homo, fakultativno i obligatno heterofermentativni**
***Lactobacillus* spp.**



PROTEOLITIČKA AKTIVNOST BAKTERIJA MLEČNE KISELINE

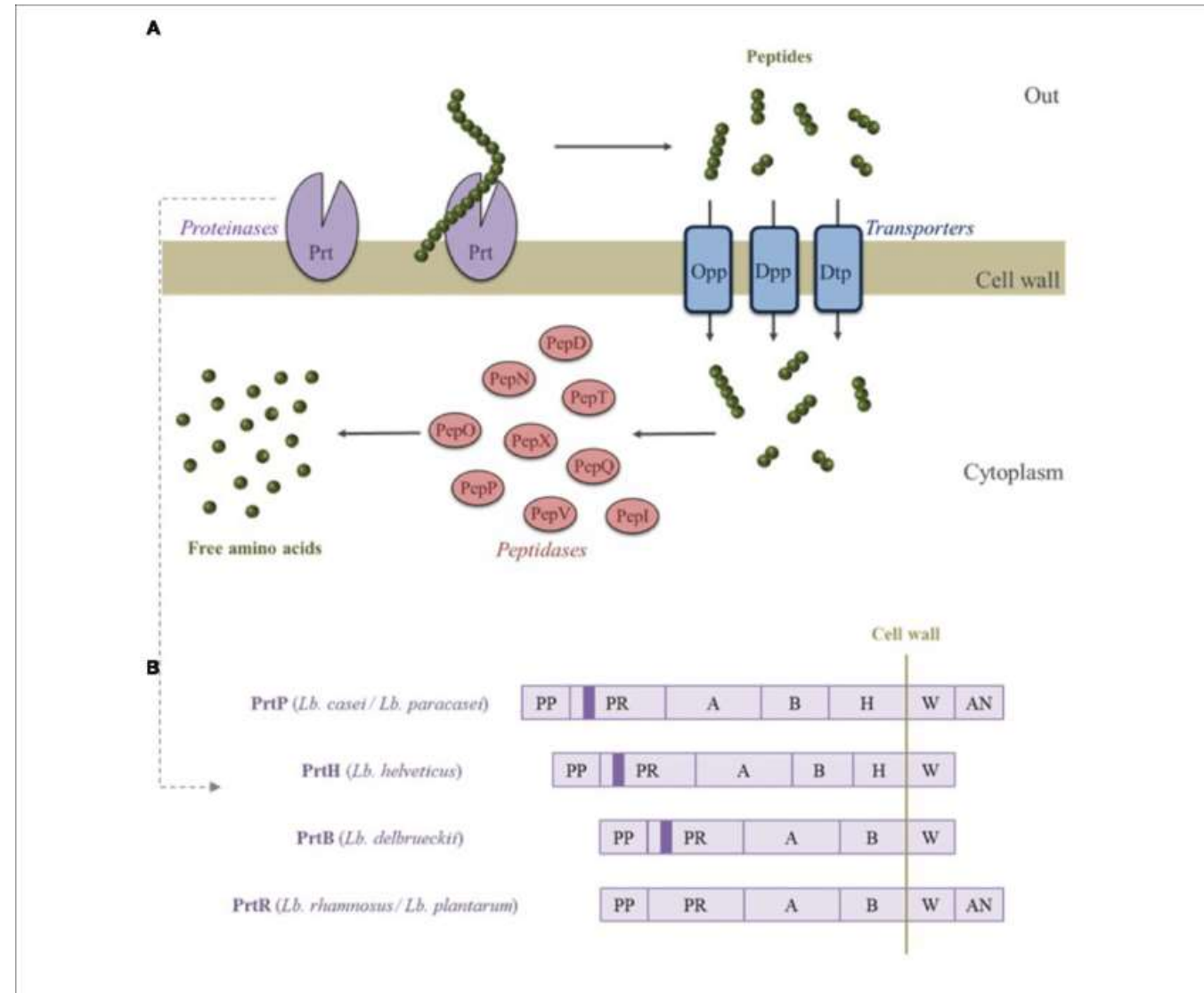
- Bmk za svoj rast zahtevaju medijume bogate aminokiselinama i vitaminima
- Mleko sadrži **0,1%** slobodnih amino kiselina i peptida što je nedovoljno za rast bmk
- Da bi obezbedile potrebne amino kiseline i peptide, BMK su razvile veoma složen proteolitički sistem lociran u samom ćelijskom zidu

ZASTUPLJENOST POJEDINIH PROTEINA U MLEKU

Proteini mleka	Gram/litar %	% od ukupnih proteina
Ukupni proteini	33	100
Ukupni kazein	26	79,5
α - kazein s1	10	30,6
α - kazein s2	2,6	8,0
β -kazein	9,3	28,4
κ -kazein	3,3	10,1
Proteini surutke	6,3	19,3
α -laktoalbumin	1,2	3,7
β -laktoglobulin	3,2	9,8
BSA	0,4	1,2
Imunoglobulini	0,7	2,1
Proteaza pepton	0,8	2,4

PROTEOLITIČKI SISTEM BAKTERIJA MLEČNE KISELINE ČINE:

1. Ekstracelularno locirane **proteinaze** serinskog tipa (hidrolizuju native ili denaturisane proteine mleka do **oligopeptida sa 7-16 amino kiselina**)
2. **Transportni sistem** specifičan za di tri i oligopeptide (dalja razgradnja putem **endo i egzopeptidaza** lociranih sa spoljne ili unutrašnje strane ćelijske membrane - **oligopeptidi sa 4-6 amino kiselina**)
3. Mnoštvo **intracelularnih peptidaza i enzima koji prevode aminokiseline** do jedinjenja značajnih za ukus i miris krajnjih proizvoda

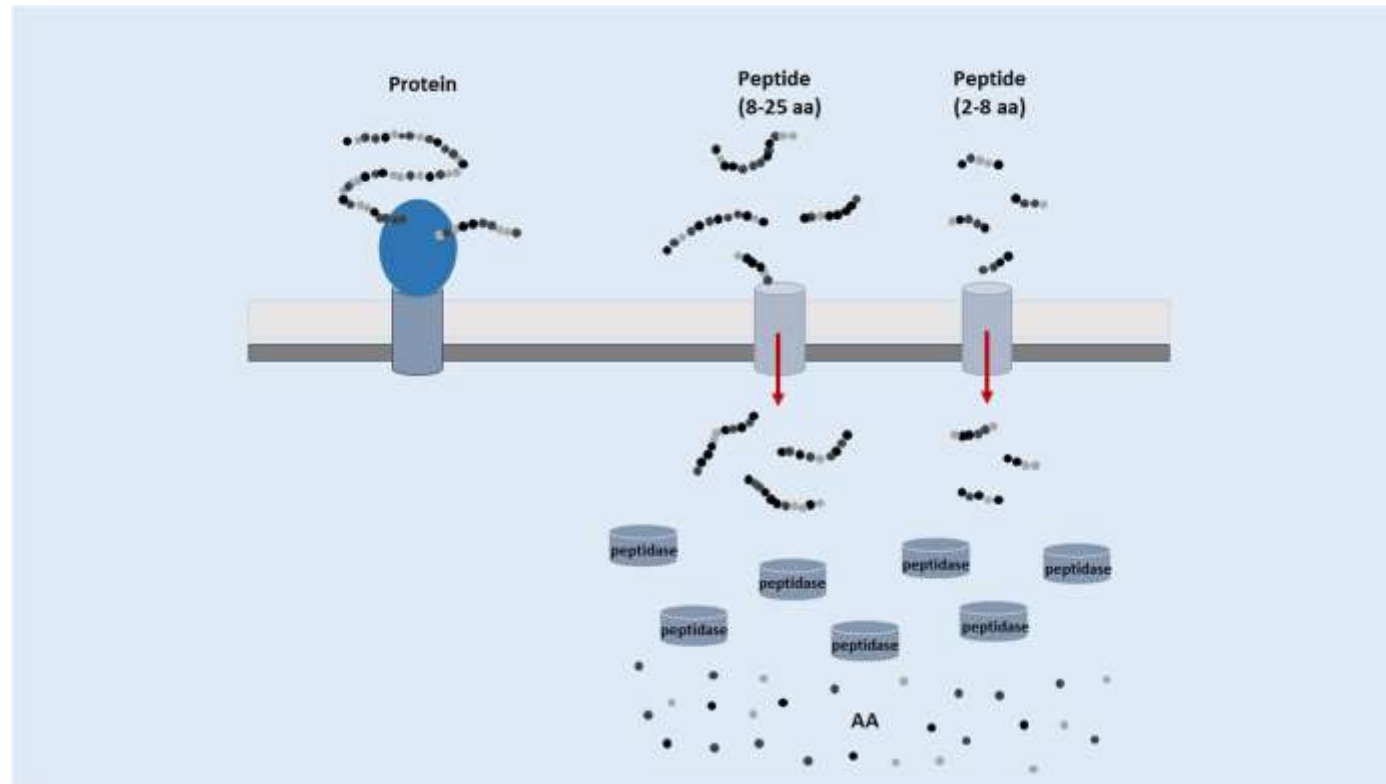


U ZAVISNOSTI KOJE BOČNE GRUPE AMINO KISELINA SAČINJAVAJU KATALITIČKI CENTAR, PROTEINAZE SE KLASIFIKUJU

- Serinske
- Cisteinske
- Aspartične
- Metaloproteinaze
- Grupa proteina koju čine svi oni enzimi čiji mehanizam katalize još uvek nije u potpunosti izučen

TRANSPORT kroz ćelijsku membranu

- **Opp sistemom** mogu se transportovati peptidi koji sadrže do **8 aminokiselinskih ostataka**
- **Energija** neophodna za transport oligopeptida dobija se pre **hidrolizom ATP** nego preko **vodonične pumpe**



OLIGOPEPTIDNI TRANSPORTNI SISTEM ČINE

- **PET PROTEINA** preko kojih se obavlja vezivanje i transport kroz citoplazmatičnu membranu
- **PROTEIN OppA** –vezuje peptide za transportne sisteme koje se nalaze u citoplazmatičnoj membrani
- **OppB i OppC** pripadaju hidrofobnim peptidima i omogućavaju transport oligopeptida kroz citoplazmatičnu membranu
- **OppD i OppF** - dva **ATP** vezujuća proteina
- hidrofilni di i tri peptidi (DtpT) neophodnu energiju za transport dobijaju preko vodonične pumpe
- Kod mutanata kod kojih nedostaju Opp I DtpT transportni sistem otkriven je transportni sistem gde se neophodna energija dobija hidrolizom ATP-a

- Proteinaze **BMK** pokazuju različitu specifičnost prema pojedinim frakcijama **kazeina**
- Analize koje su izvedene na *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* pokazuju dva različita tipa proteinaza: **PI i PIII**
- Osnovni supstrat **proteinaza pi tipa** je **β -kazein**
- **PIII TIP PROTEINAZA** hidrolizuje sve tri frakcije kazeina: **$\alpha s1$, β i κ – kazein**
- **Proteinaze PIII tipa** imaju optimum aktivnosti pri **30°C**
- **Proteinaze pi tipa** pri **40°C**

UKUS NEKIH AMINOKISELINA I PEPTIDA

KOMPONENTE	UKUS
L-Gly, L-Ala, L-Pro	sladak
L-Val, L-Lys, L-Met	gorak ili sladak
L-Leu, L-Ile, L-Phe, L-Trp	gorak
L-Asp	kiseo
L-Glu	na kuvano meso
Glu-Glu, Glu-Asp, Glu-Ser	na kuvano meso
Glu-Val-Leu-Asp	gorak
Val-Pro-Pro_Phe-Leu-Gin	gorak

Aromogene komponente nastale u procesu fermentacije BМК

Једињење	Опис сензорних карактеристика	Врста БМК које продукују једињење
Сирћетна киселина	На сирће, оштар и кисео мирис	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus casei</i>
Етанол	„Сув“ укус	<i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
1-пропанол	Сладак укус	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>
1-пентанол	Сладак укус	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus casei</i>
1-хексанол	Мирис на зелене биљке	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
2,3-бутандиол	Воћкаст укус	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i>
Ацеталдехид	Мирис на зелене биљке, свеж мирис	<i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus crispatus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>
Метил-ацетат	Воћкаст, на ананас	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> ,
Етил-ацетат	Воћкаст, на ананас	<i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Бутил-ацетат	Мирис на зелене биљке, воћкаст	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Етил-бутаноат	Сладак укус, воћкаст, на јабуку	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Етил-хексаноат	Воћкаст, на дињу	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Етил-октаноат	Мирис на зелене биљке, воћкаст	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lactobacillus casei</i>
Етил-3-метилбутаноат	Мирис на свежи сир	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
3-метилбутил-ацетат	Мирис на банану, воћкаст	<i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>