

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

GLIKOLITIČKA AKTIVNOST – FERMENTACIJA

Prof. dr Radoslava Savić Radovanović

BIOHEMIJSKA AKTIVNOST MIKROORGANIZAMA

- MIKROORGANIZMI / METABOLIŠU OSNOVNE SASTOJKE NAMIRNICA
 - PROTEINI
 - MASTI
 - UGLJENI HIDRATI
 - METABOLIČKI PRODUKTI ZNAČAJNI ZA **ODREĐENA SENZORNA SVOJSTVA** PROIZVODA OD MESA I MLEKA; **KVAR HRANE**; PRODUKTI KOJI MOGU BITI **ŠTETNI PO ZDRAVLJE LJUDI**
-

-
- UKOLIKO SE **MO** NAĐU U POVOLJNIM USLOVIMA (ODGOVARAJUĆA NAMIRNICA) ZA 8h MOGU POPULACIJU UVEĆATI DO **10^7 ĆELIJA /g /ml**
 - PRVENSTVENI ZADATAK MIKROBIOLOGA JESTE DA RAZUMEJU ŠTA UTIČE NA RAST MIKROORGANIZAMA U NAMIRNICAMA I KAKO IH MOŽE MIKROBIOLOŠKI KONTROLISATI ILI SUZBITI
-

USLOVI KOJI DOVODE DO RAZVOJA POPULACIJE MIKROORGANIZAMA

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

UNUTRAŠNJI ČINIOCI (“INTRINZIČ”) KOJI UTIČU NA RAST POPULACIJE

- HRANJIVI SASTOJCI
 - pH i PUFERSKI KAPACITET
 - REDOKS POTENCIJAL
 - AKTIVNOST VODE
 - ANTIMIKROBNI SASTOJCI
 - ANTIMIKROBNE STRUKTURE
-

TRANSPORT I METABOLIZAM LAKTOZE

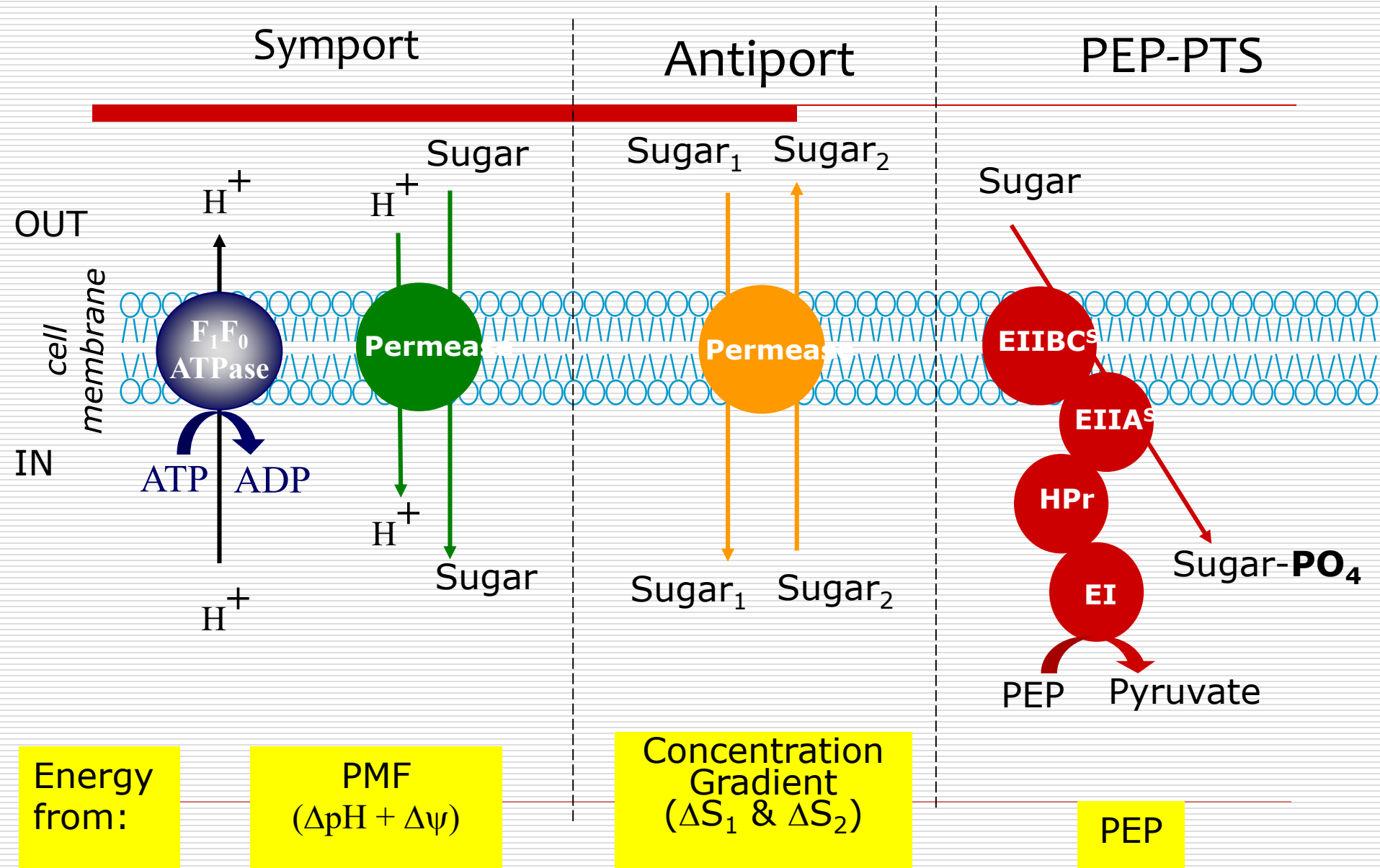
- KATABOLIZAM ŠEĆERA kod BAKTERIJA MLEČNE KISELINE (BMK)- ENERGIJA POTREBNA ZA BIOHEMIJSKE PROCESSE**

 - OSNOVNI PREDUSLOV ZA METABOLIZAM ŠEĆERA I PRODUKCIJU ENERGIJE POTREBNE ZA SINTEZU ĆELIJSKIH KONSTITUENATA ILI FORMIRANJE KRAJNJIH METABOLITA -TRANSPORT ŠEĆERA U UNUTRAŠNJOST ĆELIJE**
-

Katabolizam LA kod BMK

- Transport LA u ćeliju
 - Hidroliza LA
 - Metabolizam monosaharida
 - Efflux mlečne kiseline i protona iz ćelije
 - Nestabilna karakteristika – geni koji kodiraju biohemijsku “mašineriju” locirani na plazmidu
-

Sugar Transport in LAB



Transportni sistem / “species” specifičan

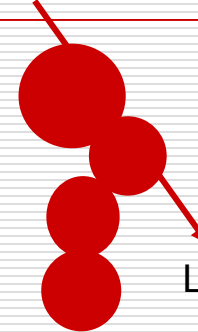
Example: Lactose Transport

PEP-PTS:

Lactococcus sp.

Lactobacillus casei

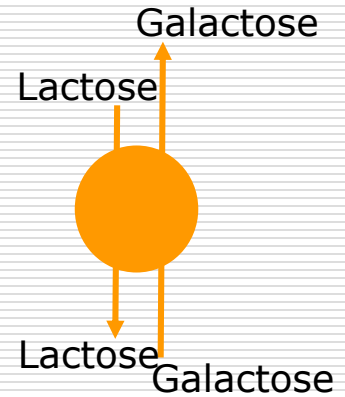
Lactose



Antiport (lactose/galactose):

S. thermophilus

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus*



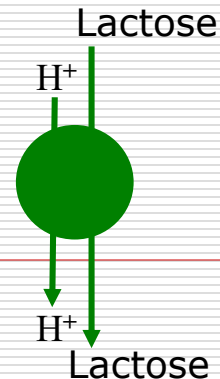
Symport

Lactobacillus helveticus

Lactobacillus acidophilus

Leuconostoc

Pediococcus



DVA SISTEMA ZA TRANSPORT ŠEĆERA kod BMK

UČEŠĆE ENZIMA PERMEAZE

FOSFOENOLPIRUVAT/LAKTOZA ZAVISNI
FOSFOTRANSFERAZNI SISTEM

TRANSPORT LAKTOZE *via* PERMEAZA

- LAKTOZA ULAZI U ĆELIJU NEPROMENJENA;
TRANSPORT se odvija AKTIVNOŠĆU
CITOPLAZMATIČNOG ENZIMA PERMEAZE

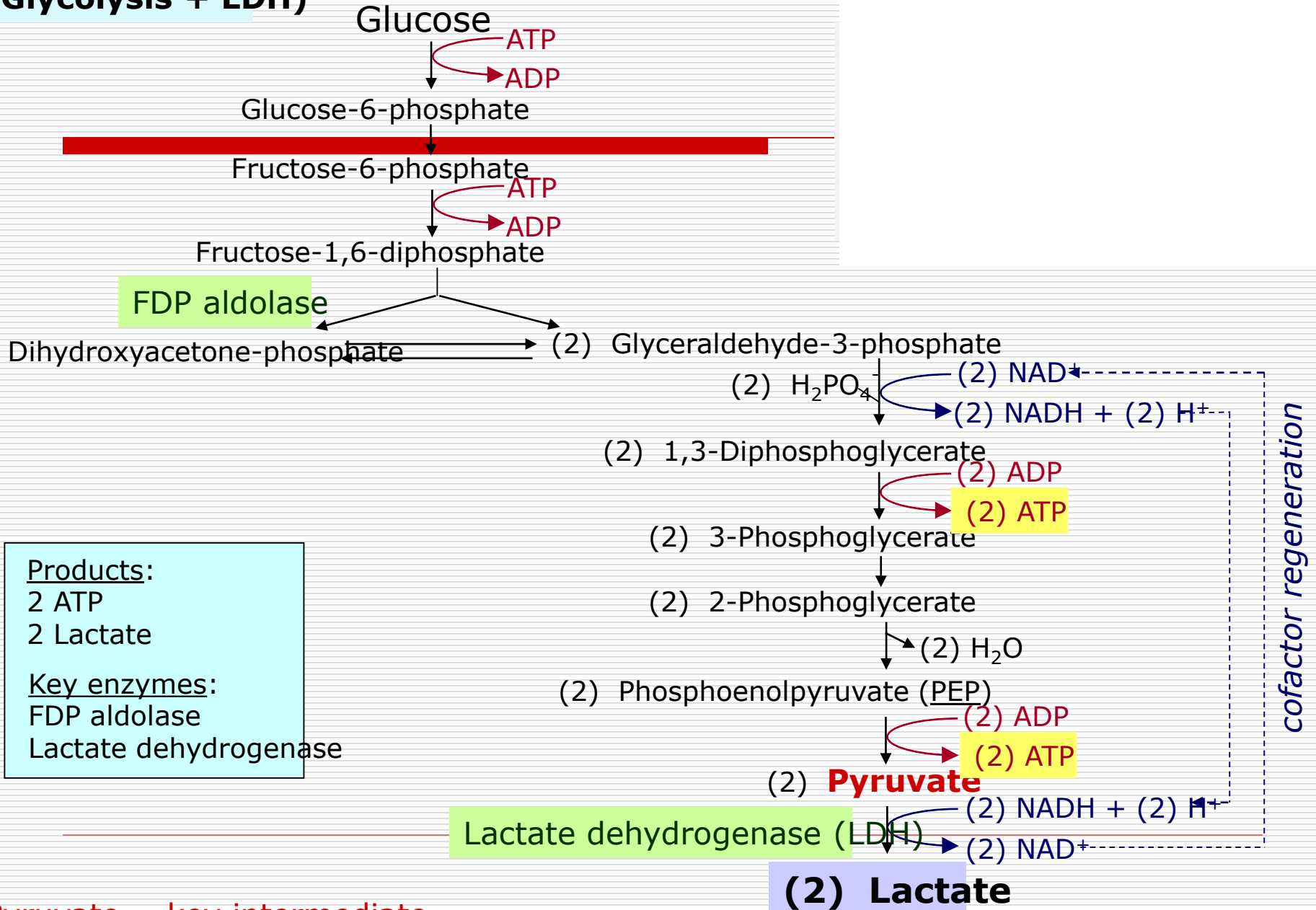
 - RAZLAGANJE OVAKO UNETE LAKTOZE ZAPOČINJE
ENZIM BETA- GALAKTOZIDAZA RAZLAŽUĆI JE NA
GLUKOZU I GALAKTOZU
-

TRANSPORT ŠEĆERA PREKO SISTEMA FOSFOENOLPIRUVAT-LAKTOZA ZAVISNOG FOSFOTRANSFERAZNOG SISTEMA

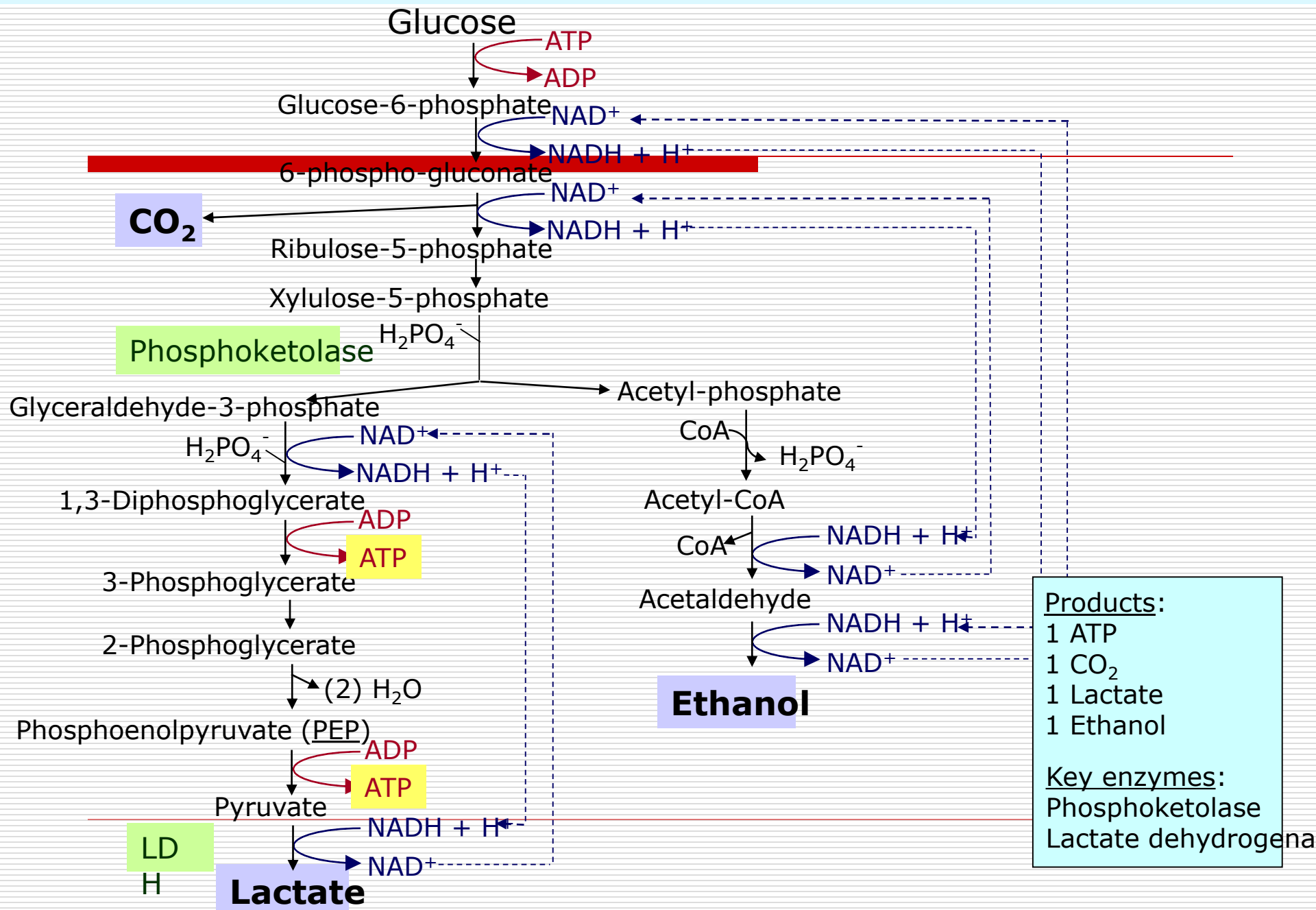
- U OVOM SISTEMU SE **FOSFORILIŠE LAKTOZA**; U ĆELIJU ULAZI KAO LAKTOZA FOSFAT
 - RAZGRADNJU **LAKTOZA-P** VRŠI ENZIM **FOSFO- BETA- GALAKTOZIDAZA** RAZLAŽUĆI JE NA GLUKOZU I GALAKTOZU -6P
-

Homolactic Fermentation of Glucose (Embden-Meyerhof Pathway)

(Glycolysis + LDH)



Heterolactic Fermentation of Glucose --- Anaerobic conditions



Homofermentativni vs heterofermentativni

Homofermentativne BMK:

- *Lactococcus*
- *Enterococcus*
- *Pediococcus*
- Grupa I *Lactobacillus* spp.

Heterofermentativne BMK

- *Leuconostoc*
 - *Oenococcus*
 - *Weisella*
 - grupa III *Lactobacillus* spp.
-

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
 - RAST OVIH SOJEVA I NIVO FERMENTACIJE LAKTOZE ZNAČAJNO NIŽI
-

STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS

- NEMA SISTEM ZA RAZLAGANJE GALAKTOZE – IZLUČIVANJE U SPOLJAŠNJU SREDINU

 - GALAKTOZU FERMENTIŠU **LB. HELVETICUS, LB. ACIDOPHILUS, LB. 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.*

- PERMEAZA
 - LAKTOZA SE HIDROLIZUJE POMOĆU β -GALAKTOZIDAZE DO GLUKOZE I GALAKTOZE – FOSFOKETOLAZA CIKLUS-
GLUKOZA SE METABOLIŠE DO JEDNAKIH
KONCENTRACIJA MLEČNE KISELINE, ETANOLA I CO₂
(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.**
-

Arrangement of the Genus *Lactobacillus*

Character	Group I obligately homofermentative	Group II facultatively heterofermentative	Group III obligately heterofermentative
Pentose fermentation	-	+	+
CO ₂ from glucose	-	-	+
CO ₂ from gluconate	-	+	+
FDP aldolase present	+	+	-
Phosphoketolase present	-	+	+
	<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. brevis</i>
	<i>Lb. delbruckii</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. buchneri</i>
	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. fermentum</i>
	<i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. sake</i>	<i>Lb. reuteri</i>

FERMENTACIJA LAKTOZE JE DETERMINISANA GENIMA KOJI SE NALAZE NA PLAZMIDIMA

- UKOLIKO ĆELIJE IZGUBE SPOSOBNOST ASIMILACIJE LAKTOZE POMOĆU FOSFOENOLPIRUVATA –LAKTOZA ZAVISNOG FOSFOTRANSFERAZNOG SISTEMA (PEP/PTS) ILI PERMEAZNOG SISTEMA (**gubitak plazmida!**) ONE POSTAJU LAKTOZA NEGATIVNE (**Lac-**), ŠTO IMA NEGATIVAN UČINAK U PROIZVODNJI FERMENTISANIH PROIZVODA
-

BIOHEMIJSKA AKTIVNOST MIKROORGANIZAMA

PROTEOLITIČKA AKTIVNOST

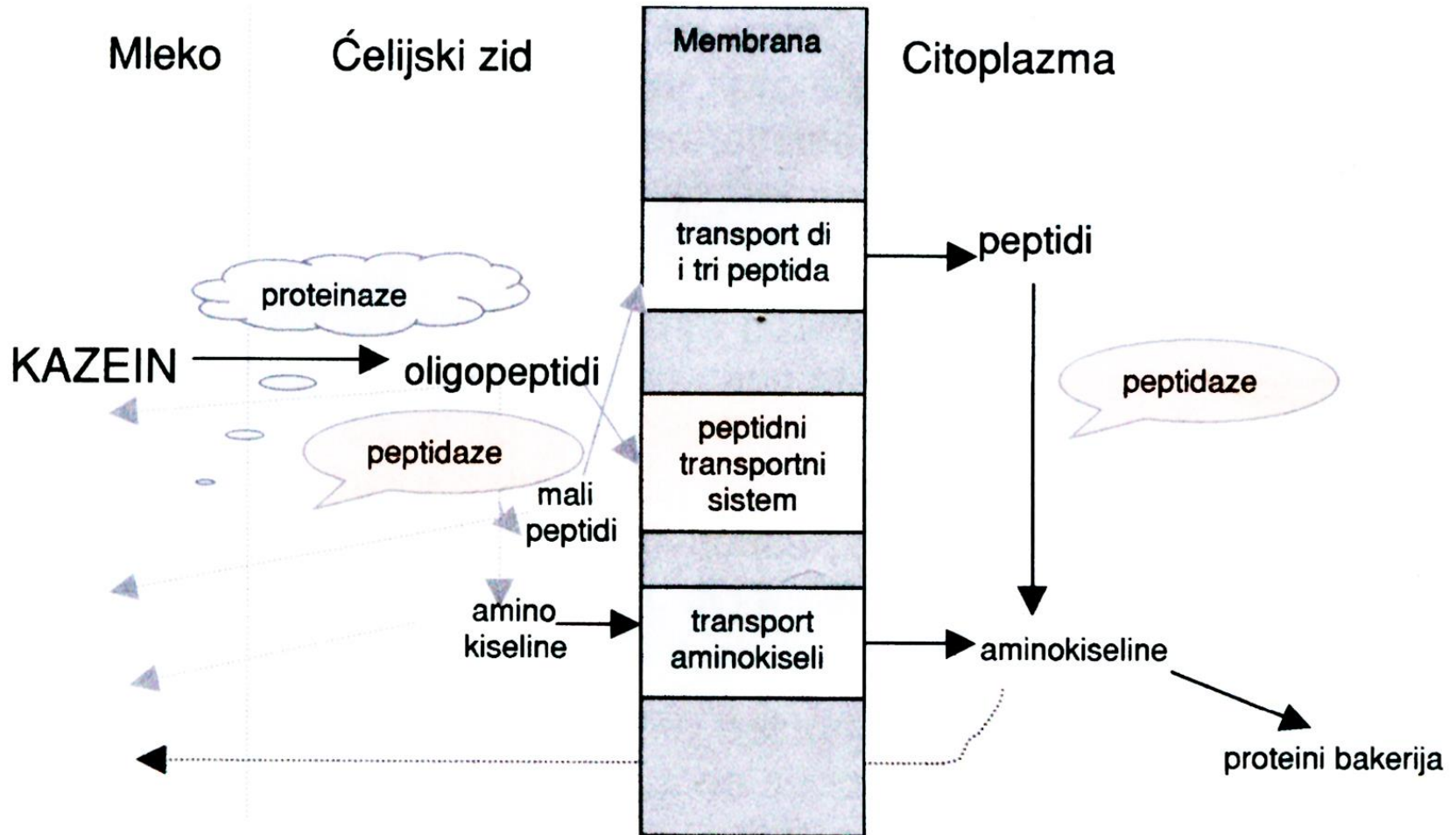
ZASTUPLJENOST POJEDINIH PROTEINA U MLEKU

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

-
- 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**
-

□ PROTEOLITIČKI SISTEM BAKTERIJA MLEČNE KISELINE
ČINE:

- a) EKSTRACELULARNO LOCIRANE **PROTEINAZE** SERINSKOG TIPA,
 - b) **TRANSPORTNI SISTEM** SPECIFIČAN ZA DI TRI I OLIGOPEPTIDE,
 - c) MNOŠTVO **INTRACELULARNIH PEPTIDAZA I ENZIMA KOJI PREVODE AMINOKISELINE** DO JEDINJENJA ZNAČAJNIH ZA UKUS I MIRIS KRAJNJIH PROIZVODA
-



Slika 4: Proteolitički sistem bakterija mlečne kiseline

-
- **PROTEINAZE HIDROLIZUJU NATIVNE ILI DENATURISANE PROTEINE MLEKA DO**
 - **OLIGOPEPTIDA SA 7-16 AMINO KISELINA - DALJA RAZGRADNJA PUTEM ENDO I EGZOPEPTIDAZA LOCIRANIH SA SPOLJNE ILI UNUTRAŠNJE STRANE ĆELIJSKE MEMBRANE**
-

PEPTIDAZE RAZGRAĐUJU DALJE PEPTIDE DO

- JEDINICA KOJE JE MOGUĆE TRANSPORTOVATI KROZ ĆELIJSKU MEMBRANU (**OLIGOPEPTIDI SA 4-6 AMINO KISELINA**)

 - OLIGOPEPTIDI SE DALJE HIDROLIZUJU RAZLIČITIM CITOPLAZMATIČNIM ENZIMIMA DO AMINOKISELINA NEOPHODNIH ZA RAST BAKTERIJA
-

-
- **PROTEINAZE BAKTERIJA** SE SINTETIŠU TOKOM RASTA ISTIH I KATALIZUJU HIDROLIZU PEPTIDNIH VEZA UNUTAR POLIPEPTIDNIH LANACA
 - DO SADA OKARAKTERISANE PROTEINAZE MEĐUSOBNO SE RAZLIKUJU PO STRUKTURI **KATALITIČKIH CENTARA** I PO SPECIFIČNOSTI DA HIDROLIZUJU PEPTIDNE VEZE IZMEDJU ODREĐENIH AMINOKISELINA
-

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
-

-
- KOD VEĆINE VRSTA **BMK** PROTEINAZE SU VEZANE ZA ČELIJSKI ZID
 - IZUZETAK JE SOJ *Lactococcus lactis ssp. cremoris* ML1 KOD KOGA JE UOČENA DOBRA AKTIVNOST U MLEKU I PORED TOGA ŠTO OVOM SOJU NEDOSTAJE PROTEINAZA VEZANA ZA ČELIJSKI ZID
-

-
- 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: **αs_1 , β i κ – KAZEIN**

AKTIVNOST PROTEINAZA U ZAVISNOSTI OD TEMPERATURE

- PROTEINAZE PIII TIPA** IMAJU OPTIMUM AKTIVNOSTI PRI 30°C
 - PROTEINAZE PI TIPA** PRI 40°C
-

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 HIDROFOBNIH PEPTIDIMA I OMOGUĆAVAJU TRANSPORT OLIGOPEPTIDA KROZ CITOPLAZMATIČNU MEMBRANU
 - ❑ **OppD i OppF** - DVA **ATP** VEZUJUĆA PROTEINA
-

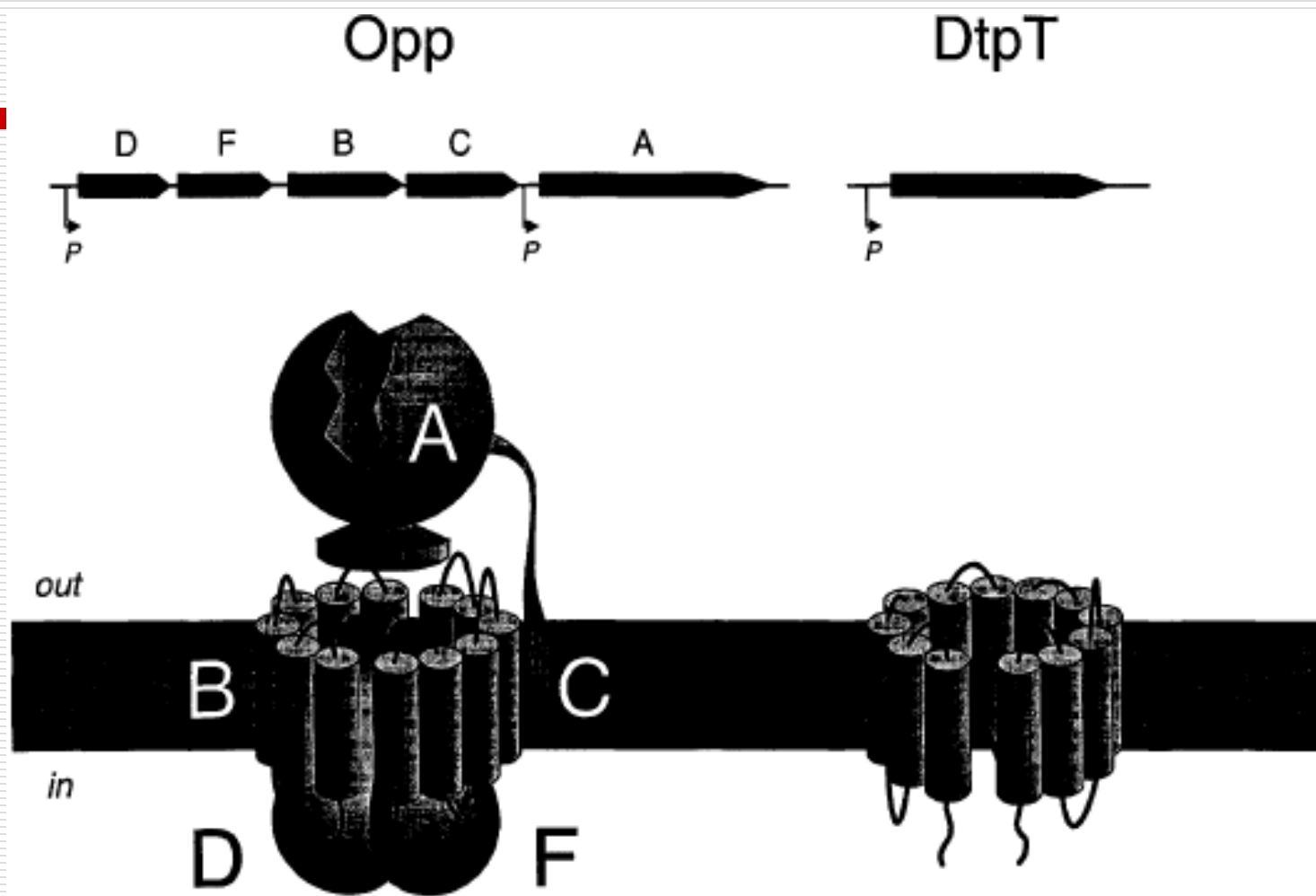


Figure 2. Model and gene organization of the oligopeptide transport system (Opp) and di/tripeptide transporter (DtpT) of *Lactococcus lactis*. (Data from Tynkkynen et al., 1993; Hagting et al., 1994.)

-
- **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
-

TRANSPORT AMINOKISELINA KROZ ĆELIJSKU MEMBRANU

- ❑ **TRANSPORTNI SISTEMI ZA TRANSPORT AMINOKISELINA POKAZUJU VELIKU SPECIFIČNOST KA ODREĐENIM I NJIMA SLIČNIM AMINOKISELINAMA (Val, Ser/ Arg/Orn)**
 - ❑ **ZA TRANSPORT AMINOKISELINA KROZ ĆELIJSKU MEMBRANU ENERGIJA SE OBEZBEĐUJE HIDROLIZOM ATP-a ILI PREKO VODONIČNE PUMPE**
 - ❑ **Arg/Orn ULAZE U ĆELIJU KAO REZULTAT RAZLIKE U KONCENTRACIJAMA**
-

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