Korištenje bakterija mliječne kiseline u poljoprivrednoj proizvodnji

Pandžić, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of agriculture / Sveučilište Josip Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:668216

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Ivana Pandžić, apsolvent
Diplomski studij, smjer Ekološka poljoprivreda

KORIŠTENJE BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U POLJOPRIVREDNOJ PROIZVODNJI

Diplomski rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET U OSIJEKU

Ivana Pandžić, apsolvent
Diplomski studij, smjer Ekološka poljoprivreda

KORIŠTENJE BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE U POLJOPRIVREDNOJ PROIZVODNJI

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. Doc.dr.sc. Sanda Rašić, predsjednik
2. Prof.dr.sc. Suzana Kristek, mentor
3. Izv.prof.dr.sc. Drago Bešlo, član

Osijek, 2017.

SADRŽAJ

1. UVOD **1**

2. MORFOLOŠKE I FIZIOLOŠKE OSOBINE BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE **3**
2.1. Tipične bakterije mliječno – kisele fermentacije **3**
2.1.1. Okruglaste bakterije **4**
2.1.2. Štapićaste bakterije – laktobacili i mikrobakterije **4**
2.2. Netipične bakterije mliječno – kisele fermentacije **5**
2.3. Proteolitičke bakterije **6**

3. MLJEKARSKE KULTURE MIKROORGANIZAMA U PROIZVODNJI FERMENTIRANOG MLIJEKA **8**
3.1. Homofermentativni put laktoze u mliječnu kiselinu **10**
3.2. Uloga mezofilne kulture bakterija mliječne kiseline **10**
3.3. Uloga termofilne kulture bakterija mliječne kiseline **11**

4. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE U PROIZVODNJI MLIJEČNIH PROIZVODA **12**
4.1. Jogurt **15**
4.2. Kefir **16**
4.3. Kumis **16**
4.4. Acidofilno mlijeko **17**
4.5.Sir **18**

5. ULOGA TERAPIJSKE KULTURE BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE **20**
5.1. Mješovite kulture bakterija mliječne kiseline i kvasaca **21**

6. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE I KVASCI U FERMENTACIJI VINA **23**
6.1. Malolaktična fermentacija **25**

7. ZAKLJUČAK **28**

8. POPIS LITERATURE **29**

9. SAŽETAK **31**

10. SUMMARY **32**

11. POPIS TABLICA **33**

12. POPIS SLIKA **34**

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA **36**

BASIC DOCUMENTATION CARD **37**

1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline su gram-pozitivne bakterije prirodno prisutne na supstratima bogatim hranjivim tvarima poput mlijeka, mesa, razgradnih biljnih materijala te u ljudskom gastrointestinalnom sustavu. Obuhvaćaju 20 rodova; *Lactobacillus, Streptococcus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Enterococcus, Sporolactobacillus, Bifidobacterium, Aerococcus, Carnobacterium, Tetragenococcus, Vagococcus, Weisella, Oenococcus, Alloiococcus, Dolosigranulum, Globicatella, Actinomyces i Atopobium.*

Industrijski su vrlo važni mikroorganizmi koji se upotrebljavaju kao starter kulture za dobivanje raznih fermentiranih proizvoda, te je sve češća primjena bakterija mliječne kiseline kao probiotika ili u kombinaciji s prebioticima (sinbiotički koncept). Velik broj poželjnih svojstava intestinalne mikroflore pripisuje se BMK, odnosno pojedinim vrstama bakterija koje uglavnom pripadaju rodovima *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Poželjno djelovanje BMK na zdravlje domaćina u prvom redu obuhvaća;

- poboljšanje metabolizma laktoze,
- stimulaciju imunološkog sustava,
- suzbijanje urogenitalnih i crijevnih infekcija,
- regulaciju koncentracije kolesterola,
- antitumorno djelovanje,
- suzbijanje alergijskih reakcija, i
- modifikaciju crijevne mikroflore.

Zbog navedenih svojstava, poželjno je primijeniti bakterije mliječne kiseline u prehrani i terapeutici kao probiotike, posebno u slučajevima poremećaja ravnoteže crijevne mikroflore (Kos, 2001.; Sandres i Huis isn't Veld, 1999.; Conway i Henriksson, 1994.).
Probiotici se definiraju kao jedna ili više kultura živih mikroorganizama koji, primijenjeni u životinja ili ljudi, djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore probavnog sustava domaćina (Šušković, 1996.).

Početkom 20. stoljeća kreće učestalije korištenje bakterija mliječne kiseline u proizvodnji sira i kiselog mlijeka u Danskoj i Njemačkoj. Potom slijedi sistematska klasifikacija bakterija mliječne kiseline i standardizacija mikrobnih kultura čime se osiguravaju uvjeti za kontroliranu proizvodnju fermentiranih mlijeka. Krajem 19. i početkom 20. stoljeća jogurt postaje sve popularniji za istraživanje kao jedan od fermentiranih mliječnih proizvoda. Razlog toga su brojna znanstvena otkrića, a neka od

njih su ona znanstvenika Tissiera i Metchinkoffa. Tissier je izolacijom bakterije *Bacillus bifidus communis*/*Bifidobacterium bifidum* iz stolice dojenčadi hranjene majčinim mlijekom otkrio kako bifidobakterije imaju značajnu ulogu u očuvanju zdravlja djece hranjene majčinim mlijekom. Metchinkoff je istraživajući bakteriju *Bulgarian bacillus/Lactobacillus bulgaricus* potaknuo brojne znanstvenike na istraživanje o korisnosti pojedinih mikroorganizama za ljudski probavni sustav.

Najveći uzročnici vrenja u sirovom mlijeku su bakterije mliječne kiseline (*Streptococcus, Lactococcus, Pediococcus*, neki rodovi *Lactobacillus, Leuconostoc*, heterofermentativni *Lactobacillus*). Bakterije mliječne kiseline se koriste za proizvodnju fermentiranih mliječnih proizvoda i neke u proizvodnji sireva te se stoga ubrajaju u korisne bakterije. Također se nalaze i na grožđu, u moštu, vinu te pivu. To su bakterije rodova; *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Oenococcus* i *Weissella.* Tijekom procesa proizvodnje vina u nekim slučajevima je poželjna fermentacija jabučne kiseline pomoću bakterija mliječne kiseline.

2. MORFOLOŠKE I FIZIOLOŠKE OSOBINE BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

Bakterije mliječne kiseline (BMK) imaju nizak sadržaj gvanina i citozina u molekuli DNA. Nesporogene, mezofilne bakterije, kemoorganotrofi, katalaza-negativne, nemaju citokroma, te ne sintetiziraju porfirine. Rod *Lactobacillus* je najbrojniji s oko 80 vrsta, te svi rodovi (osim roda *Bifidobacterium)* imaju niski G+C (gvanin+citozin) sadržaj (<50%). BMK dobivaju energiju fermentacijom ugljikohidrata, a većina saharida i oligosaharida transportira se u stanicu uz pomoć specifičnih permaeaza te se fosforiliraju unutar stanice pomoću ATP-ovisnih kinaza. Za razgradnju heksoza, BMK koriste glikolizu ili Embden-Meyerhof-Parnasov put i 6-fosfoglukonat/fosfoketolazni put. S obzirom na način kojim fermentiraju heksoze, BMK se dijele u tri grupe: obligatno homofermentativne bakterije, obligatno heterofermentativne bakterije i fakultativno heterofermentativne bakterije (Šušković, 1996.).

Bakterije mliječno – kisele fermentacije su najvažnije u mljekarstvu. Gotovo uvijek su prisutne u mlijeku i mliječnim proizvodima te čine normalnu mikrofloru mlijeka. Prema fiziološkim osobinama dijele se na:

a) Tipične – pri fermentaciji mliječnog šećera proizvode prvenstveno mliječnu kiselinu. Fakultativno anaerobne, ne reduciraju nitrate i sadrže katalazu.
b) Netipične – proizvode malo mliječne kiseline, a više drugih proizvoda fermentacije. Aerobne su, sadrže katalazu i reduciraju nitrate.

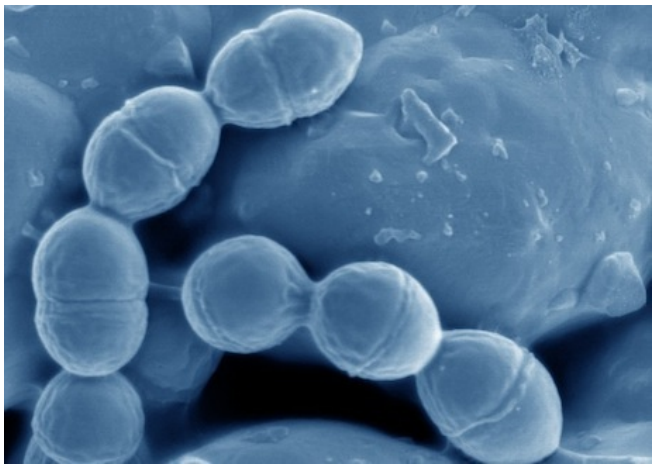
2.1. Tipične bakterije mliječno – kisele fermentacije

U ovu skupinu pripadaju laktokoke i laktobacili. Laktokoke su okrugle ili jajolike, te se nalaze u parovima i lancima. Gram pozitivne bakterije, fakultativno anaerobne. Dok su laktobacili štapići, dugi ili tanki, kraći ili okruglasti. Nalaze se u lancima i pojedinačno, gram pozitivni, te fakultativno anaerobni (neke vrste su striktno anaerobne). Neke vrste ovih mikroorganizama stvaraju pretežno mliječnu kiselinu, dok neke uz nju stvaraju još i octenu, ugljičnu i alkohol.

2.1.1. Okruglaste bakterije

Rod *Lactococcus*

- *Lactococcus lactis*. ssp. *lactis*, stari naziv *Streptococcus lactis* ssp. *lactis*. Optimalna temperatura je oko 30˚C.
- *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, stari naziv *Streptococcus lactis* spp. *cremoris.* Stvara znatnu količinu mliječne kiseline. Optimalna temperatura je oko 30˚C, ali raste na 10 - 40˚C.



Slika 1. *Lactococcus lactis*

Izvor: http://textbookofbacteriology.net/featured_microbe.html

2.1.2. Štapićaste bakterije – laktobacili i mikrobakterije

Rod *Lactobacillus*

Štapičastog oblika, homofermentativni. Uglavnom proizvode mliječnu kiselinu, a ostale proizvode u tragovima. Optimalna temperatura je 30 - 40˚C, a rastu od 5 - 53˚C. Aerobni ili fakultativno aerobni. U mlijeko dospijevaju iz vanjske sredine.

- *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis*, stari naziv *Lactobacillus lactis,* koriste se u kulturi za proizvodnju tvrdih i polutvrdih sireva. Optimalna temperatura je 40 - 43˚C.

- *Lactobacillus helveticus*

  Sudjeluje u zrenju ementalskog i drugih tipova švicarskog sira. Optimalna temperatura je oko 45˚C.
- *Lactobacillus acidophilus*

  Optimalna temperatura je oko 45˚C. Fermentira acidofilno mlijeko, te se koristi u prizvodnji kefira. Povoljan za mikrofloru probavnog trakta.
- *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, stari naziv *Lactobacillus bulgaricus*. Optimalna temperatura je oko 45˚C. Koristi se u proizvodnji jogurta, kiselog mlijeka i tvrdih sireva.
- *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus*

  Optimalna temperatura je 40 - 45˚C. Nalazi se u mlijeku i mliječnim proizvodima te je značajan u proizvodnji fermentiranih napitaka.



Slika 2. *Lactobacillus helveticus*

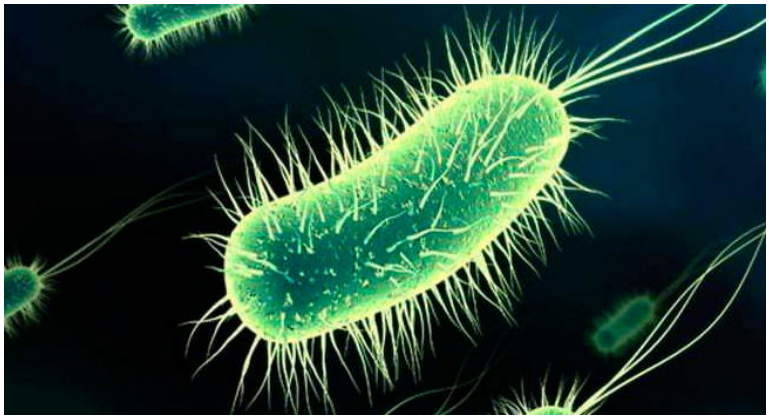
Izvor: https://nootriment.com/lactobacillus-helveticus/

2.2. Netipične bakterije mliječno – kisele fermentacije

Rod *Escherichia*

Potiče sa biljaka i vode, te iz crijeva životinja i čovjeka. Zbog proizvodnje enterotoksina neke vrste uzrokuju crijevne bolesti kod ljudi. Često su prisutne i u mlijeku, gdje uzrokuju velike štete poput sluzavosti mlijeka, nadimanje i rupičasto tijesto kod sireva neugodan

miris i okus. Njihova prisutnost ukazuje na lošu higijenu mužnje te daljnjih postupaka sa mlijekom. U ovu skupinu pripada *Escherichia coli*.



Slika 3. *Escherichia coli*

Izvor: http://poliklinika-sinteza.hr/djelatnosti/escherichia-coli-biorezonanca-lijecenje/

Rod *Propionibacterium*

Fermentiraju mliječnu kiselinu te iz nje nastaje propionska kiselina, manja količina mravlje, octene i jantarne kiseline, te CO_2. Značajne su u proizvodnji tvrdih sireva upravo zbog toga što se stvaranjem CO_2 formiraju karakteristične šupljine ementalskog sira.

2.3. Proteolitičke bakterije

Pod utjecajem bakterija proteoliza može teći do različitog stupnja, uključujući peptide, aminokiseline, amonijak sve do slobodnog dušika. Neke izazivaju slatko grušanje.

a) Proteolitičke bakterije koje ne stvaraju spore;
b) Proteolitičke bakterije koje stvaraju spore.

U ovu grupu pripadaju bakterije koje stvaraju spore otporne na djelovanje visokih temperatura, te preživljavaju pasterizaciju. Zbog toga se mogu pronaći u pasteriziranom mlijeku te njegovim proizvodima. Mogu biti aerobne i anaerobne. Tu spadaju vrste iz rodova *Bacillus* i *Clostridium*.

I. Rod *Bacillus* (aerobne sporogene proteolitičke bakterije)

Kratki štapići, pokretni, pojedinačni ili u lancima. Razlažu proteine te stvaraju amonijak. Značajne vrste:

- *Bacillus cereus;*
- *Bacillus anthracis* (uzrokuje antraks);
- *Bacillus subtilis.*

II. Rod *Clostridium* (anaerobne sporogene proteolitičke bakterije)

Proizvode spore klostridije, kruškastog oblika. Fermentiraju protein i laktozu. Uzrokuju štete u mljekarstvu (kasno nadimanje sireva). Spore se množe pa je pasterizacija ne djelotvorna zaštita protiv njih. Značajne vrste:

- *Clostridium butyricum;*
- *Clostridium tyrobutyricum;*
- *Clostridium botulinum* (uzrokuje botulizam).



Slika 4. *Clostridium botulinum*

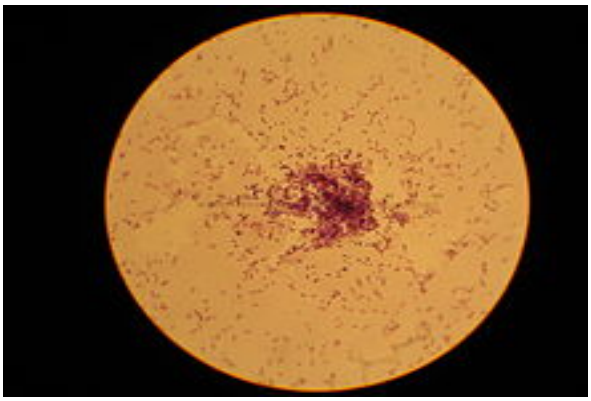
Izvor: https://www.google.hr/search?q=clostridium&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwij9-7x74rTAhUInRoKHYrmDBAQ_AUICCgB&biw=1366&bih=662#imgrc=PW3u1VMZmhobuM:

3. MLJEKARSKE KULTURE MIKROORGANIZAMA U PROIZVODNJI FERMENTIRANOG MLIJEKA

U procesu fermentacije za proizvodnju fermentiranih mlijeka se koriste mljekarske kulture mikroorganizama koje nazivamo starteri sastavljeni od bakterija mliječne kiseline. Fermentacijom laktoze bakterije mliječne kiseline proizvode mliječnu kiselinu te aromatične tvari poput diacetila i acetaldehida. Razlikuju se i po načinu unosa laktoze u stanicu bakterije.

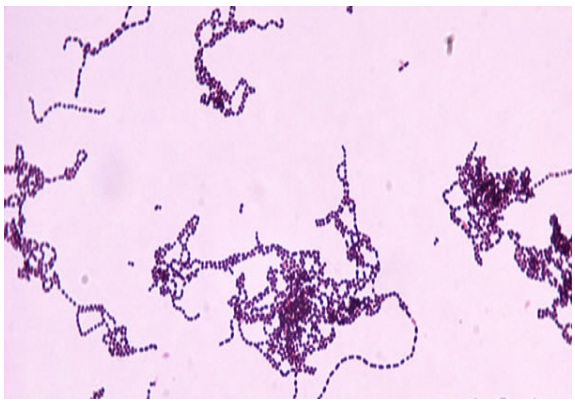
Bakterije mliječne kiseline (BMK) mogu biti:

- homofermentativne (*Streptococcus, Lactococcus, Pediococcus*, neki rodovi *Lactobacillus*), i
- heterofermentativne (*Leuconostoc*, heterofermentativni *Lactobacillusi*).



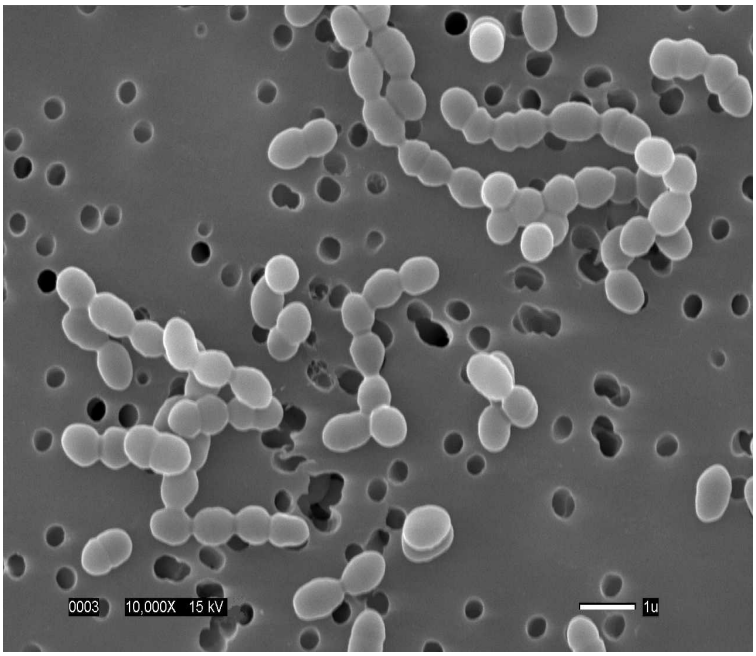
Slika 5. *Lactococcus* spp.

Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Lactococcus



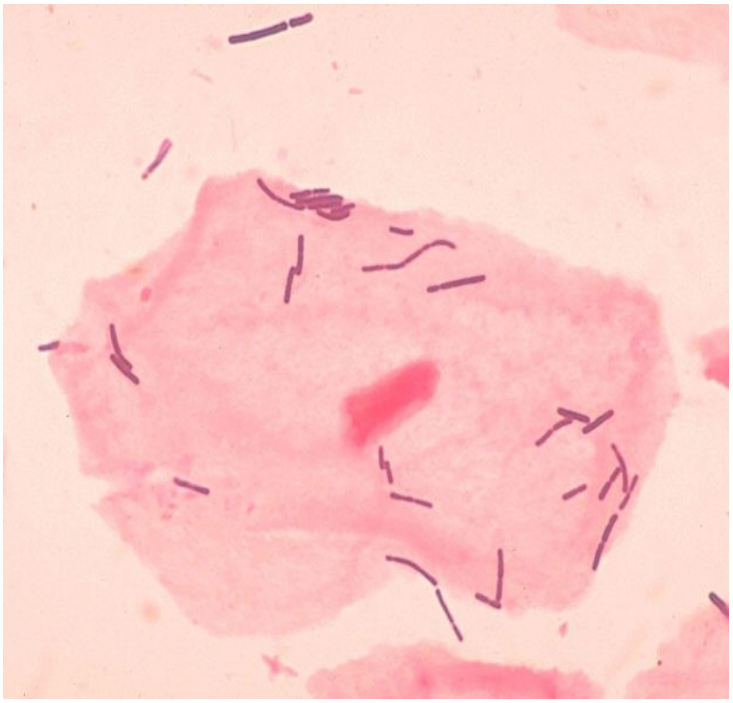
Slika 6. *Streptococcus* spp.

Izvor: http://emedicine.medscape.com/article/225243-overview#a5



Slika 7. *Leuconostoc* spp.

Izvor: http://genome.jgi.doe.gov/leume/leume.home.html



Slika 8. *Lactobacillus* spp.

Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus

Navedene vrste se koriste u sustavu mikrobnih kultura za proizvodnju fermentiranih mliječnih proizvoda i neke od njih u proizvodnji sireva.

3.1. Homofermentativni put laktoze u mliječnu kiselinu

Bakterije mliječne kiseline laktozu mlijeka ne koriste izravno, nego ju provode u svoju stanicu pomoću laktoza-permeaze gdje s pomoću laktaze cijepaju u glukozu i galaktozu. Neke BMK koriste fototransferazni sustav prijenosa laktoze koja tada ulazi u stanicu u obliku laktoza-fosfata gdje se cijepa pomoću enzima fosfo-β-D-galaktozidaze na glukozu i galaktoza-6-fosfat. Glukoza se dalje razgrađuje putem glikolize gdje se preko međuprodukata prevodi u piruvat. Redukcijom piruvata uz aktivnost laktat-dehidrogenaze nastaje mliječna kiselina (laktat). Ovaj put fermentacije laktoze u mliječnu kiselinu naziva se homofermentativni put laktoze u mliječnu kiselinu, a provode ga homofermentativne bakterije mliječne kiseline. Te bakterije proizvode uglavnom mliječnu kiselinu (oko 90%) i vrlo malu količinu ostalih međuprodukata; diacetila, acetoina (acetilmetil karbinol), acetaldehida, etanola, te octene, maslačne, propionske i mravlje kiseline i druge tvari koje utječu na svojstvenu aromu proizvoda.

Heterofermentativne bakterije mliječne kiseline glukozu razgrađuju koristeći pentoza-fosfatni put, te proizvode manje količine mliječne kiseline (oko 50%), a znatnije udjele ostalih proizvoda: hlapljive kiseline (octena), nehlapljive, karbonilne spojeve, etanol i CO_2, određujući više aromu proizvoda.

3.2. Uloga mezofilne kulture bakterija mliječne kiseline

Mezofilna kultura BMK sastavljena je od homofermentativnih vrsta bakterija *Lactococcus* (noviji način za mliječne vrste bakterija *Streptococcus*, osim bakterije *Streptococcus thermophilus* koja je zadržala svoj naziv), te od heterofermentativnih bakterija roda *Leuconostoc*. Mezofilne BMK rastu pri temperaturi od 10 do 40˚C, a optimalna temperatura je od 20 do 30˚C (ovisno o vrsti).

Ova kultura bakterija sudjeluje u:

- koagulaciji proteina – promjena konzistencije;
- vrenju laktoze – nastanak kiselina;
- vrenju limunske kiseline – nastanak tvari arome (diacetil, aldehid i CO_2), te
- proizvodnja sluzavih tvari.

Bakterije *L. lactis* ssp. *lactis* i *L. lactis* ssp. *cremoris* proizvode inhibitorne tvari: mliječnu kiselinu, H_2, O_2, hlapive tvari koje osiguravaju prevlast željenih vrsta bakterija u mješovitoj kulturi, te tvari poput antibiotika – nizin koji ima inhibitorno djelovanje na bakterije roda *Enterococcus, Staphylococcus, Clostridium* i *Listeria*.

3.3. Uloga termofilne kulture bakterija mliječne kiseline

Termofilne kulture BMK se optimalno razmnožavaju pri višim temperaturama (od 37 - 45˚C) i znatno brže proizvode kiselinu nego mezofilne bakterije. Tipična aroma fermentiranih mliječnih napitaka nastala djelovanjem termofilne kulture BMK, odnosno vrenjem mliječnog šećera potječe uglavnom od mješavine mliječne kiseline i karbonilnih spojeva, a najviše od karbonilnih spojeva.

Termofilne kulture su sastavljene od sojeva homofermentativnih vrsta bakterija *Lactobacillus* i *Streptococcus*. Koriste se kao monokulture ili mješovite kulture uglavnom u proizvodnji jogurta i sličnih tipova fermentiranih mliječnih napitaka, a sastavljene su od bakterija „jogurtne kulture“: *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.

4. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE U PROIZVODNJI MLIJEČNIH PROIZVODA

Najveći uzročnici vrenja u sirovom mlijeku su vrste bakterija mliječne kiseline *Streptococcus, Lactococcus, Pediococcus*, neki rodovi *Lactobacillus, Leuconostoc*, kao i heterofermentativne vrste *Lactobacillusi*). Za njih je mlijeko prirodna hranjiva sredina te su stoga najčešći domaćini sirovog mlijeka. Mlijeko sadrži vodu i sve hranjive tvari potrebne za metabolizam većine mikroorganizama. Svježe pomuženo mlijeko je toplo, te ima povoljnu pH vrijednost (6,5-6,7) za rast većine bakterija. Na putu mlijeka (od krave do prerade) čuvanje traje vrlo dugo, čime se omogućava normalna reprodukcija prisutnih bakterija. Brzina reprodukcije bakterija ovisi i o generacijskom vremenu (vrijeme potrebno da od jedne stanice nastanu dvije). Generacijsko vrijeme razmnožavanja je vrlo kratko za većinu bakterija u mlijeku, ako su povoljni uvjeti. Lag – faza (faza sudržanog rasta) je vrijeme potrebno da se bakterije prilagode na hranjivu sredinu i uvjete koji u njoj vladaju. Zahvaljujući imunoaktivnom sustavu mlijeka i lag – fazi bakterija, sirovo mlijeko je zaštićeno neko vrijeme od povećanja broja stanica, a to je „bakteriocidna faza mlijeka“ koja može trajati oko 2 do 5 sati, ovisno u različitim uvjetima. No, određene BMK uključene u fermentaciju mogu i pokvariti tekuće mlijeko. Rodovi koji su odgovorni za kvarenje mlijeka i mliječnih proizvoda su *Lactobacillus, Leuconostoc, Enterococcus, Pediococcus* i *Streptococcus*. Sirovo mlijeko ne smije sadržavati antibiotike ili moguće prispjele bakteriofage, unatoč tome što su oni inhibitorne tvari mlijeka koje sprječavaju rast mikroorganizama. U sirovom mlijeku ili mliječnim proizvodima se mogu pojaviti bakteriofagi. Oni dospjevaju u sirovo mlijeko ako je mljekara onečišćena bakteriofagima, a radi se o bakterijskim virusima koji uzrokuju velike štete u mljekari kočenjem ili zaustavljanjem rasta mikrobnih kultura u proizvodnji fermentiranih mliječnih napitaka ili sira. Za uništenje bakteriofaga nije djelotvorna pasterizacija jer su vrlo termostabilni, te se treba primijeniti osobita higijena uređaja i prostorija.

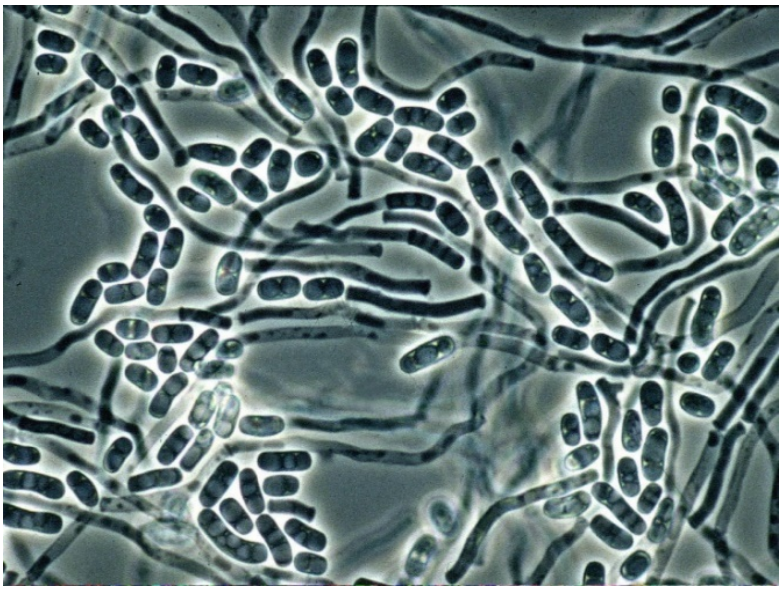
Fermentacija podrazumijeva metaboličke procese razgradnje organskih spojeva uz oslobađanje energije bez kisika. Označava uglavnom sve procese koji ovise o aktivnosti određenih mikroorganizama. Stoga zaključujemo da su mikroorganizmi nužni za stvaranje mliječnih proizvoda takvim procesima.

Vrste mliječne fermentacije ovise o vrsti organizma, da li je aeroban ili anaeroban. Fermentacija mlijeka se sastoji od dva paralelna procesa:

- pretvorba laktoze u mliječnu kiselinu ili druge proizvode, i
- formiranje strukture nastalog proizvoda.

Definiciju fermentiranih mlijeka je postavila Međunarodna mljekarska federacija 1969. godine, uz nadopunu znanstvenika Kosikowskog 1984., a ta definicija se odnosi na fermentirana mlijeka u tekućem i polu – tekućem obliku. Fermentirana mlijeka navodimo kao prehrambene proizvode dobivene preradom sirovog kravljeg, ovčjeg, kozjeg, bivoljeg i devinog mlijeka uz djelovanje mikroorganizama. Definicija ih opisuje kao proizvode nastale od punomasnog, potpuno ili djelomično obranog mlijeka, koncentriranog mlijeka ili mlijeka supstituiranog iz potpuno ili djelomično obranog mlijeka u prahu, nehomogeniziranog ili homogeniziranog, pasteriziranog ili steriliziranog mlijeka uz aktivnost specifičnih mikroorganizama. Na različitost proizvoda utječe količina korištenih bakterija, kvasaca i plijesni za vrijeme proizvodnje. U proizvodnji fermentiranih mlijeka se najčešće koriste bakterije mliječne kiseline. Za vrijeme fermentacije mlijeka se koriste mezofilne i termofilne bakterije. Mezofilne (*Lactococcus* spp., *Leuconostoc* spp. i *Pediococcus* spp.) se koriste pri temperaturama od 20 - 30˚C, a pri višim temperaturama se koriste termofilne bakterije mliječne kiseline (*Lactobacillus* spp. i *Streptococcus* spp.). Pri proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda se koristi i *Bifidobacterium* spp. koja nije bakterija mliječnih kiselina.

Osim djelovanja bakterija u procesu fermentacije mlijeka se koriste i druge mikrobne kulture. Jedni od tih kultura su kvasci *Saccharomyces* spp., *Torula* spp. ili *Candida* spp. za proizvodnju kefira i kumisa. Također se koristi i plijesan *Geotrichum candidium* spp. za stvaranje skandinavskog fermentiranog mlijeka. Plijesni se razvijaju ovisno o određenoj pH vrijedosti i temperaturi, a najbolji razvoj je pri temperaturi između 20 - 30˚C. Aktivnošću plijesni razgrađuju se ugljikohidrati, masti i proteini.



Slika 9. *Geotrichum candidium* spp.

Izvor: https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/handle/10214/6084

Najpoznatiji produkt mliječne fermentacije je jogurt, no vjeruje se da postoji još otprilike 400 proizvoda dobivenih od fermentiranog mlijeka. Svaka vrsta karakterizirana je specifičnim mikroorganizmom.

Podjela fermentiranih proizvoda:

a) prema vrsti sirovine
   - fermentirano mlijeko;
   - fermentirana stepka;
   - fermentirano vrhnje.

b) prema vrsti vrenja (te primjenjenoj mikrobnoj kulturi)
   - mliječno – kiselo vrenje (bakterije mliječne kiseline);
   - mliječno – kiselo / alkoholno vrenje (bakterije mliječne kiseline i kvasci);
   - mliječno – kiselo vrenje / naknadno zrenje plijesni.

c) prema konzistenciji
   - vrlo tekući;
   - pitki;
   - tekući viskozni;
   - ugušćeni;
   - kruti;
   - zamrznuti;
   - u prahu.

d) prema dodacima
    - obični;
    - aromatizirani;
    - voćni;
    - pjenušavi;
    - vitaminizirani, te
    - desertni.

Gotov proizvod koji je spreman za konzumaciju ne smije sadržavati patogene mikroorganizme, tj uzročnike bolesti.

4.1. Jogurt

Najpoznatiji oblik fermentiranog mlijeka koji se dobiva prirodnim procesom fermentacije uz djelovanje termofilnih bakterija. Naziv potječe od turske riječi „*yo-ghurt*“ koja označava kiselo mlijeko. Proizvodnja jogurta odvija se mliječno – kiselim vrenjem mlijeka pomoću čistih kultura bakterija *Lactobacillus delbrueckii II* ssp. i *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*, te je stimulirana aminokiselinama i peptidima oslobođenim iz kazeina. Uglavnom se primjenjuje brza fermentacija (2 – 4 sata, pri temperaturi 40 - 45˚C). Sadrži oko 0,9 – 0,95% kiseline. Nakon fermentacije jogurt se može grijati zbog povećanja trajnosti proizvoda s obzirom da se tako uništavaju nepoželjne bakterije.



Slika 10. Tekući Jogurt

Izvor: http://www.dukat.hr/proizvodi/dukat/fermentirani-proizvodi/tekuci-jogurti

4.2. Kefir

Mliječno – kiseli alkoholni napitak koji se dobiva djelovanjem bakterija mliječne kiseline, kvasaca i bakterija octene kiseline u mlijeku. Podrijetlom je s Kavkaza, a izvorno se proizvodio od ovčjeg mlijeka te kasnije od kravljeg i kozjeg mlijeka. Naziv je turskog podrijetla od riječi „kef – ir“, što u prijevodu znači napitak za uživanje. Kefir nastaje umetanjem kefirne kulture (spoj bakterija, mliječne kiseline, streptokoka, mikrokoka i gljivica) u kravlje, ovčje, kozje mlijeko, te se ostavlja 2 dana dok se odvija fermentacija pri optimalnoj temperaturi oko 10 - 25˚C pomoću kefirnih zrnaca. Kefirna zrnca sadrže različite mikroorganizme (granule promjera 2 – 15 mm), te u svom sastavu mogu sadržavati *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* i *Lactobacillus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus casei*, *Candida kefir*, *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* i *Saccharomyces* te *Saccharomyces cerevisiae*. Kefir je kiselkastog okusa te obogaćen vitaminima.



Slika 11. Kefir

Izvor:

http://www.vindija.hr/Proizvodi/Kefir35mm.html?Y3RpXDE1NCxwXDE0NA%3D%3D

4.3. Kumis

Kumis je fermentirano mlijeko slično kefiru, no razlika je u količini alkohola koja kod kumisa može iznositi i do 2,5 %. Podrijetlom je iz Azije, a najviše se proizvodi u Rusiji. Proizvodi se od punomasnog kravljeg mlijeka uz dodatak šećera ili kobiljeg

mlijeka. U proizvodnji mogu sudjelovati: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, kvasca *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ili var. *lactis*.



Slika 12. Kumis

Izvor: http://etiflex.com.co/wp/dt_portfolio/alpina-kumis/

4.4. Acidofilno mlijeko

Fermentirani mliječni napitak terapijskog učinka jer uništava gotovo sve štetne bakterije. Proizvodi se od punog ili obranog mlijeka, a dodaje mu se čista kultura Lactobacillus acidophillus koja obitava u ljudskom probavnom sustavu. Ima pozitivan učinak na zdravlje probavnog sustava i rad urinarnog trakta te sprječava infekcije mokraćnih putova. Acidofilno mlijeko je blago kiselog okusa te bez karakteristična mirisa.



Slika 13. Acidofilno mlijeko

Izvor:http://www.vindija.hr/Proizvodi/Legenda-z-bregov.html?Y3RnXDEwOCxwXDE0NA%3D%3D

4.5. Sir

Velike količine sira se proizvode mikrobnom fermentacijom. Sir sadrži zgrušano mlijeko koje je bilo odvojeno od tekućeg dijela mlijeka (sirutke). Grušanje mlijeka se postiže uporabom enzima renina i bakterija mliječne kiseline kao starter kulture. Renin se dobiva iz telećeg želuca ili mikrobnom proizvodnjom.

Klasifikacija sireva:

I. meki – ako sadrže veliku količinu vode (50-80%);
II. polutvrdi – ako sadrže oko 45% vode;
III. tvrdi – ako im je sadržaj vode nizak (manje od 40%).

Također se mogu klasificirati i kao:

I. nedozreli – proizvedeni pomoću fermentacije u jednoj etapi;
II. zreli – tijekom sazrijevanja upotrebljena dodatna mikrobna flora radi postizanja željena okusa, mirisa i strukture.

Prirodna proizvodnja sira uključuje fermentaciju mliječne kiseline s različitom mješovitom kulturom vrsta *Streptococcus* i *Lactobacillus* koje se upotrebljavaju kao starter - kultura fermentacije. Mnogi okusi raznih sireva su rezultat primjene različitih mikrobnih starter - kultura, različite temperature inkubacije i uvjeta te uklanjanja iz fermentacijskog procesa sekundarnih vrsta mikroorganizama mlijeka.

Zrenje sireva uključuje dopunske enzimske pretvorbe, nakon što je stvoren sirni ugrušak primjenom enzima proizvedenih s pomoću bakterija mliječne kiseline ili enzima nekog drugog podrijetla. Nedozreli sirevi ne zahtijevaju dodatne enzimske pretvorbe. Bijeli meki sirevi i vrhnje proizvode se upotrebom starter - kulture koja je nalik onoj za proizvodnju sirutke te takvi sirevi ne zahtijevaju sazrijevanje. Ponekad se sirevi stavljaju u salamuru zbog poticanja rasta odabrane bakterijske i fungalne populacije tijekom sazrijevanja. Soljenje sira u slamuri se obavlja tako da se sirevi odmah nakon tlačenja ili 1 do 2 dana kasnije stave u gotovu zasićenu otopinu kuhinjske soli (20-26%) u kojoj ostaju 2 do 4 dana. Na taj način se proizvodi Limburger (meki sir). Tijekom sazrijevanja ugrušci se omekšavaju s pomoću proteolitičkih i lipolitičkih enzima te sir dobiva svojstven miris i okus. Parmezan se također tijekom proizvodnje stavlja u salamuru.



Slika 14. Limburger, meki sir

Izvor: http://www.eatwisconsincheese.com/cheeses/33/limburger

Proizvodnja švicarskog šupljikavog sira uključuje propinsku – kiselu fermentaciju mlijeka uz sazrijevanje koje se obavlja s pomoću *Propionibacterium shermani* i *Propionibacterium freudenreichii*. Propionskom kiselinom se dobiva karakterističan miris i okus, dok ugljikov dioksid koji se stvara tijekom fermentacije uzrokuje rupe u švicarskom siru. Tijekom sazrijevanja različitih sireva se upotrebljavaju i mnoge vrste plijesni. Nedozreli sir se inokulira sporama plijesni i inkubira u toploj i vlažnoj prostoriji kako bi se potaknuo rast plijesni.



Slika 15. Švicarski sir

Izvor:http://www.zivotistil.rtl.hr/zdravlje/1632246/konacno-otkriveno-evo-zasto-svicarski-sir-ima-rupe/

5. ULOGA TERAPIJSKE KULTURE BAKTERIJA MLIJEČNE KISELINE

Neke BMK su dio mikrobne populacije probavog sustava ljudi i životinja, te sudjeluju u njihovom metabolizmu. Od pojedinih vrsta iz rodova: *Lactobacillus, Bifidobacterium, Streptococcus* i *Propionibacterium*, samo se određene bakterije mliječne kiseline (izolirane iz probavnog sustava ljudi) koriste za proizvodnju fermentiranih mliječnih proizvoda.

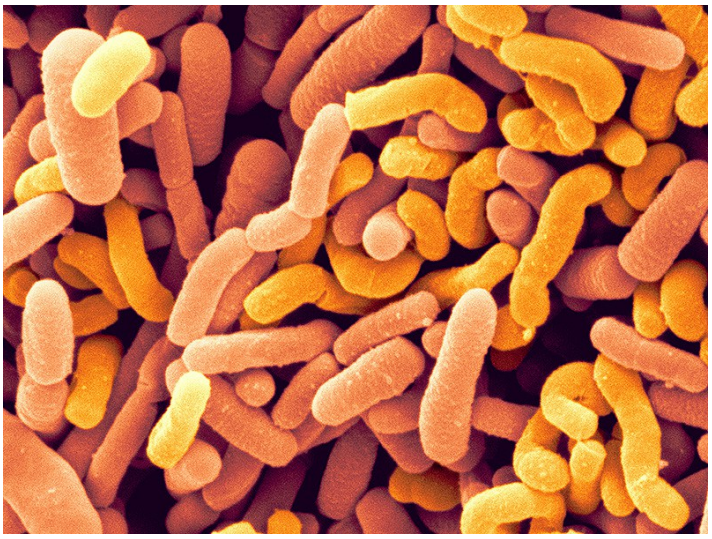
Tablica 1. Uloga pojedinih vrsta (Obradović, 2002/03.).

Vrsta	**Uloga**
Streptococcus salivarius ssp. *thermophilus*	➢ proizvodi mliječnu kiselinu, egzopolisaharide, te acet – aldehid ➢ stimulira rast *Lactobacillus bulgaricus* u jogurtnoj kulturi
Lactobacillus delbrueckii ssp. *bulgaricus*	➢ proizvodi mliječnu kiselinu ➢ stimulira rast *thermophilus* u jogurtnoj kulturi
Lactobacillus delbrueckii ssp. *lactis*	➢ proizvodi mliječnu kiselinu
Lactobacillus acidophilus	➢ proizvodi mliječnu kiselinu ➢ probiotska svojstva
Lactobacillus casei	➢ proizvodi mliječnu kiselinu ➢ probiotska svojstva
Bifidobacterium ssp.	➢ proizvodi mliječnu kiselinu i acetat ➢ probiotska svojstva

Posebno mjesto pripada fermentiranim mliječnim napitcima proizvedenim s odabranim sojevima bakterija *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium bifidum*.

Bitne karakteristike odabranih sojeva bakterija:

- termofilne bakterije;
- osjetljive na kiselinu;
- neki sojevi proizvode sluzave tvari (poboljšanje viskoznosti proizvoda);
- slaba proteolitička aktivnost;
- proizvodnja inhibitornih tvari s bakteriostatskim i baktericidnim djelovanjem.



Slika 16. *Bifidobacterium bifidum*

Izvor: http://www.vibeprobiotics.com/why-you-need-bifidobacterium-bifidum/



Slika 17. *Lactobacillus acidophilus*

Izvor: http://www.mysticalbiotech.com/portfolio/lactobacillus-acidophilus/

5.1. Mješovite kulture bakterija mliječne kiseline i kvasaca

Mješovite kulture su sastavljene od bakterija mliječne kiseline i kvasaca te se koriste za proizvodnju kefira i kumisa kod kojih, zbog sastava kulture dolazi do mliječno – kiselog i alkoholnog vrenja.

U osnovnu mikrofloru kefirnih zrnaca uključene su različite vrste;

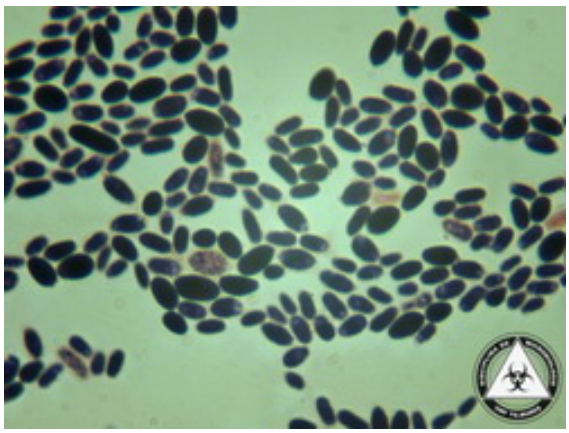
a) vrste BMK:
   - *Lactococcus* spp.: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis, Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*
   - *Lactobacillus* spp.: *Lactobacillus kefir, Lactobacillus kefiranofaciens, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei*
   - *Leuconostoc* spp.: *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides*.

b) kvasci:
   - *Candida kefyr*;
   - *Sacharomyces* spp.;
   - *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*;
   - *Torulospora delbruecki*.



Slika 18. Kefir i kefirna zrnca

Izvor: https://authoritynutrition.com/9-health-benefits-of-kefir/

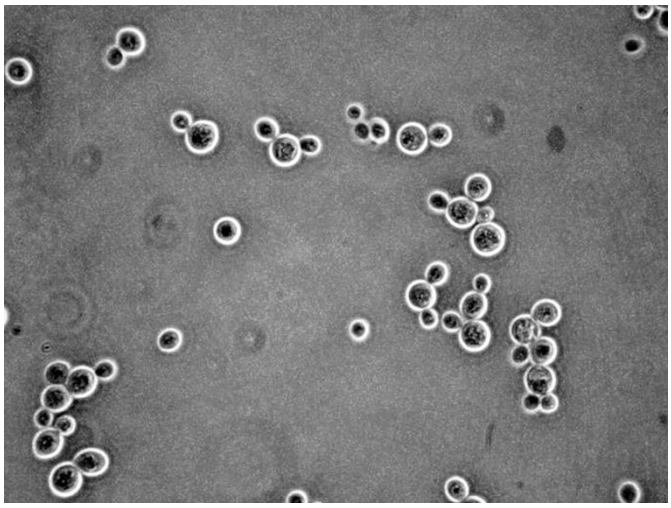


Slika 19. *Candida kefyr*

Izvor: http://atlas.microumftgm.ro/micologie/levuri/ckefyr.php

6. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE I KVASCI U FERMENTACIJI VINA

Kvasci su mikroorganizmi koji sudjeluju u alkoholnoj fermentaciji. Preporuča se kontrolirano alkoholno vrenje uz dodatak selekcioniranih kvasaca, kako bi se spriječile poteškoće u vrenju ili eventualni zastoj vrenja. Selekcionirani kvasci koji provode fermentaciju su roda *Saccharomyces cerevisiae* ili *Saccharomyces bayanus*.



Slika 20. *Saccharomyces cerevisiae*

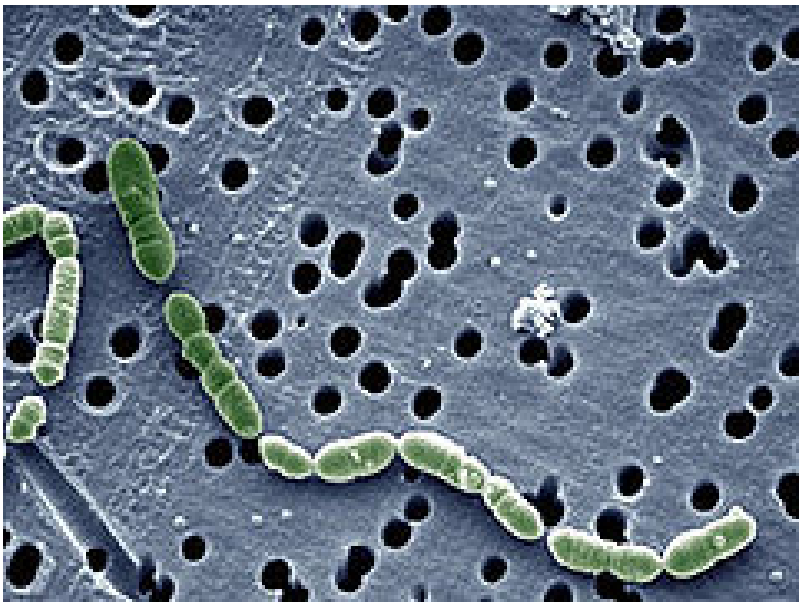
Izvor: https://bissonlab.wordpress.com/2012/10/02/saccharomyces-cerevisiae-1000x/

Odabir kvasca ovisi o tipu vina koji se nastoji proizvesti, pa stoga razlikujemo one koji su selekcionirani za dobivanje snažnih, te izražajnih tipova vina ili za dobivanje svježih, živahnih, voćnih vina. Suhi kvasac je potrebno rehidrirati prije dodavanja u masulj ili mošt, te je važno dodati i hranu za kvasce (sadrži inaktivne stanice kvasaca, asimilativni dušik i vitamin B1). Time se sprječava prespora fermentacija i poboljšavaju se uvjeti fermentacije, a smanjuje se rizik nastanka nepoželjnih nusprodukata vrenja poput pojave sumporovodika (H_2S).

Bakterije mliječne kiseline imaju ulogu u fermentaciji i očuvanju hrane, te mogu rasti u pivu, vinu te grožđanom moštu s obzirom tolerancije na etanol i kiselu sredinu.
Bakterije mliječnih kiselina koje su izolirane iz vina;

- *Lactobacillus – L. brevis, L. buchneri, L. casei, L. cellobiosus, L. curvatus, L. delbrueckii, L. diolivorans, L. fermentum, L. fructivorans, L. heterohiochii, L. hilgardii, L. jensenii, L. kunkeei, L. leichmannii, L. mali, L. nagelli, L. paracasei, L. plantarum, L. trichodes, L. vermiforme, L. vini, L. yamanashiensis;*

- *Leuconostoc – L. mesenteroides;*
- *Pediococcus – P. damnosus, P. inopinatus, P. parvulus, P. pentosaceus;*
- *Oenococcus – O. oeni* i
- *Weissella – W. paramesenteroides.*



Slika 21. *Oenococcus oeni*

Izvor: https://en.wikipedia.org/wiki/Oenococcus_oeni

Nalaze se u svim fazama procesa proizvodnje vina;

- na bobicama grožđa;
- u moštu tijekom fermentacije, te
- u vinu.

Uglavnom rastu u sredinama gdje je koncentracija etanola veća od 8 vol%, iako *Oenococcus oeni* tolerira i 14 vol%, dok u zrelim vinima gdje je koncentracija etanola i do 20 vol% pronalazimo *Lactobacillus brevis, Lactobacillus fructivorans,* te *Lactobacillus hilgardii*. Bakterije mliječne kiseline izolirane iz vina rastu na temperaturama od 15 - 45˚C u laboratorijskim uvjetima, a optimalni rast pri opsegu od 20 - 37˚C. Tijekom fermentacije jabučne kiseline najbolji rast se postiže na oko 20˚C. BMK energiju dobivaju iz fermentacije šećera, a kao izvore koriste glukozu i fruktozu iz vina. Također iz vina metaboliziraju tartarnu, jabučnu te limunsku kiselinu. Utječu na ukus vina.

6.1. Malolaktična fermentacija

Vina koja sadrže visoku koncentraciju jabučne kiseline imaju grubi, neharmonični te previše kiseli okus. Kako bi se postigao mekši, blaži i zaobljeniji okus provodi se malolaktična fermentacija. Malolaktična fermentacija (MLF) je biološki proces u kojem se jabučna kiselina pretvara u mliječnu kiselinu. Koristi se tradicionalno u proizvodnji bijelih i crnih vina. Provodi se dodatkom malolaktičnih bakterija koje tijekom malolaktične fermentacije prevode jabučnu kiselinu u nešto blažu mliječnu kiselinu. Može se provoditi tijekom ili nakon procesa alkoholnog vrenja. Razgradnju jabučne kiseline provode mliječne bakterije, pri čemu osim mliječne kiseline sintetiziraju brojne hlapive spojeve koji su pozitivnog ili negativnog učinka na kakvoću vina. Kako bi se postigao pozitivan učinak na kakvoću vina tijek procesa mora biti kontroliran i usmjeravan poput alkoholne fermentacije. U gotovo svim hrvatskim vinarijama malolaktičnoj fermentaciji se ne pridaje posebno značenje pa stoga u vinima često protječe spontano i nekontrolirano ili se sprječava jakim sumporenjem. Malolaktičnu fermentaciju bi se trebalo uvažavati i primjenjivati kao proces koji nam daje mogućnost znatnog utjecaja na stil vina.

Oslanjanje na autohtone sojeve bakterija da na vrijeme dovrše poželjnu MLF može biti nepouzdano, čak i kod niskih pH vrijednosti u moštu i vinu. Bez obzira na prisutnost poželjnih bakterija jabučne kiseline u vinarijama, za početak MLF može biti potrebno i nekoliko mjeseci, a može se pojaviti samo u nekim buradima i tankovima dok u drugima ne. Zbog navedenog razloga se preferira primjena odabranih starter kultura bakterija za pokretanje MLF. Bakterija izbora za MLF je *Oenococcus oeni*, no nisu svi sojevi te bakterije dobri kandidati za primjenu kao starteri. Odabir soja *Oenococcus oeni*, koji je najbolji u pogledu učinka i proizvodnje najinteresantnijeg ukusa, je višestruk i složen zadatak (Bou i Powell, 2005.). Važna je izolacija i kultivacija samo prirodnih sojeva malolaktičnih bakterija. Kao izvor izolata malolaktičnih bakterija koriste se vina koja imaju:

- prirodno selektivni niski pH;
- nisku temperaturu podruma, te
- visoku koncentraciju alkohola i SO_2.

Malolaktična fermentacija je dio tehnologije crnih vina, no kod tehnologije bijelih vina postoji dvojba o njezinom provođenju. Bijela vina iz hladnijih krajeva sadrže veću količinu kiselina od onih iz toplijih krajeva. S obzirom da se danas u svijetu traže voćna

bijela vina umjerenih i ugodnih kiselina, reduciranje ukupne kiselosti vina je postalo vrlo važan dio tehnologije vinifikacije bijelih vina hladnijih vinogradarskih zona.

Odluka o provođenju malolaktične fermentacije se donosi u vrlo ranoj fazi vinifikacijskog procesa kako bi se odabrala prava metoda i vrijeme inokulacije. Tretmani koji limitiraju MLF su bistrenje, dodavanje SO_2 i snižavanje temperature. Također, novi proizvod lysosym (estrahiran iz bjelanjka jajeta) može spriječiti MLF i kada se koriste manje količine SO_2 zbog specifičnog djelovanja na gram pozitivne bakterije, a posebno na mliječno kisele bakterije. Ukupna količina SO_2 viša od 50 mg/l i slobodnog SO_2 više od 15 – 20 mg/l može usporiti ili spriječiti MLF. Anti – mikrobiološki učinak slobodnog SO_2 je veći kod vina sa nižim pH. Kod spontane MLF grožđe mora biti zdravo. Broj živih stanica divljih bakterija mliječne kiseline, osobito vrsta *Lactobacillus* ili *Pediococcus*, može negativno utjecati na kvalitetu vina. Spontana MLF započne dosta rano u alkoholnoj fermentaciji te često rezultira sa povećanom količinom hlapljive kiseline, reduktivnih aroma te kod povećane količine bakterija vrste *Pediococcus* biogenim aminima. Kod vina sa visokim pH se preporuča rana inokulacija selekcioniranim starter kulturama kako bi se nadvladale nepoželjne bakterije. U optimalnim uvjetima za razvoj bakterija (visoki pH, vrlo zrelo grožđe, pljesnivo grožđe ili temperatura oko 22˚C) vrlo rani dodatak lysosyma će reducirati broj nepoželjnih bakterija mliječne kiseline te pridonjeti kraju alkoholne fermentacije.

Otpornost novih starter kultura za direktnu inokulaciju na niže temperature (13 – 14˚C) je zanimljiva u vinifikaciji kako crnih tako i bijelih vina. Razlog tome je ušteda koja se postiže jer vino ne treba zagrijavati i održavati na optimalnoj temperaturi 18 – 22˚C. MLF će biti sporija kod nižih temperatura, te se time povećava proizvodnja diacetila, a proizvodnja octene kiseline raste sa brzinom MLF. Bolje očuvanje boje crnih vina se postiže upravo sporijom razgradnjom jabučne kiseline.

Kako bi vinar imao kontrolu nad razvojem aromatskog profila vina potrebno je izabrati pogodan soj malolaktične bakterije sa dobro poznatim svojstvima te koristiti određene enološke metode vinifikacije. Fiziologija i genetski profil novih sojeva određuju se u laboratoriju i pilot vinarijama.

Tablica 2. Kriteriji za selekciju malolaktičnih bakterija za proizvodnju vina (Bou i Powell, 2005.).

POŽELJNI	NEPOŽELJNI
✓ Otpornost na stres tijekom proizvodnje	
✓ Otpornost na liofilizaciju	× Formiranje velikih količina egzopolisaharida
✓ Otpornost na niski pH	× Domaćini pro – faga
✓ Visoka tolerancija na alkohol	× Previsoka tolerancija na SO_2
✓ Visoka tolerancija na SO_2	× Prebrza degradacija jabučne kiseline
✓ Dobar učinak na niskim temperaturama	
✓ Kratka lag – faza	
✓ Brza razgradnja jabučne kiseline	
✓ Dobra tolerancija na kisik	
✓ Tolerancija na pesticide	
✓ Povećana rezistencija na lizozime	
✓ Proizvodnja bakteriocina	

Jedan od prvih kriterija za izolat odabranih bakterija je sposobnost da podnese rigorozni stres kojem se izlaže tokom proizvodnje vina (Bou i Powell, 2005.) kao i korak liofilizacije (freeze – drying). Pored visoke otpornosti na limitirajuće uslove poput pH, alkohola, SO_2 i temperature, bakterije se biraju i na temelju željenih metaboličkih aktivnosti i odsutnosti neželjenih osobina.

7. ZAKLJUČAK

Bakterije mliječne kiseline su bakterijske vrste koje proizvode mliječnu kiselinu. Obuhvaćaju vrste rodova *Lactobacillus, Streptococcus, Pediococcus, Lactococcus, Leuconostoc, Bifidobacterium, Carnobacterium, Enterococcus,* te *Sporolactobacillus* (Sneath i sur., 1986., Wood, 1992.). Primjenjuju se u pripravi fermentirane hrane i napitaka, silaže i probiotičkih pripravaka (Brkić, 1995., Šušković, 1996.) te u proizvodnji vina. BMK su također dio populacije mikroorganizama u probavnom traktu zdravih ljudi i životinja te su uključene u njihov metabolizam.

Najpopularniji industrijski proizvodi su fermentirani mliječni proizvodi (jogurt, kefir, kumis te acidofilno mlijeko) koji nastaju tako da se standardni mliječni proizvodi (mlijeko, sir, vrhnje) nacijepe odgovarajućim bakterijama mliječne kiseline. Pod utjecajem bakterija koje uzrokuju mliječno – kiselo vrenje nastaju mliječna i druge kiseline koje konzerviraju proizvod, povećavaju njegovu trajnost, te mu daju karakteristična organoleptička svojstva. Fermentirani mliječni proizvodi su zdrave namirnice jer su obogaćene vitaminima B2 i B12. Primjenom različitih sojeva BMK kao starter kultura u mliječno kiseloj fermentaciji se dobivaju različiti produkti. Na primjer; kod proizvodnje kiselog vrhnja za tvorbu mliječne kiseline se koristi bakterija *Streptococcus cremosis*, a za dobivanje karakterističnih komponenata okusa se koristi *Leuconostoc cremosis* i *Streptococcus lactis*. Osim zbog mirisa i okusa popularnost raste i zbog njihovog zdravstvenog učinka (štite sluznicu želuca te jačaju imunološki sustav).

U vinskoj industriji se kao starter - kulture koriste kulture bakterija mliječne kiseline *Oenococcus oeni*, dok se od kvasaca uglavnom koriste kulture *Saccharomyces cerevisiae*. Vrlo je važno znati parametre vina i osobine starter kultura kako bi se odabrala odgovarajuća vrsta kvasca, bakterije te način ishrane s ciljem pogađanja grožđa i fermentacijskih uvjeta. Kako bi se postigao mekši i blaži okus vina primjenjuje se malolaktična fermentacija gdje se jabučna kiselina pretvara u mliječnu kiselinu. Razgradnju jabučne kiseline provode bakterije mliječne kiseline koje osim mliječne kiseline sintetiziraju brojne hlapive spojeve negativnog ili pozitivnog učinka na kvalitetu vina. MLF je proces koji omogućuje utjecaj na stil vina.

8. POPIS LITERATURE

1. Tratnik, Lj. (1998.): Mlijeko – tehnologija, biokemija i mikrobiologija, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb, 16. - 20. str, 51. – 63. str.

2. Sabadoš, D. (1996.): Kontrola i ocjenjivanje kakvoće mlijeka i mliječnih proizvoda, Zagreb, 1996.

3. Šušković J. i sur. (1997.): Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline, Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Zagreb 1997.; Mljekarstvo 47. (1) 57. – 73. str.; Dostupno na url: https://www.google.hr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjP4fCJm5DSAhXBBSwKHUNyAsIQFggaMAA&url=http%3A%2F%2Fhrcak.srce.hr%2Ffile%2F139731&usg=AFQjCNGzh7qrFt94MiZAaRXvLF87gg4_cQ&sig2=6AJRgotfcDegfzPjYFun9g

4. Samaržija, D. i sur. (2000.): Karakteristike i uloga mezofilne kulture bakterija mliječne kiseline, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2000.

5. Grgurek i sur. (1997.): Mljekarske kulture mikroorganizama, Mljekarstvo, 47 (2), 103 – 113. str.

6. Vinko, I. i sur. (2011.): Fermentacija mlijeka različitim mikrobnim kulturama. Mljekarstvo 61 (2): 161. – 167. str., 2011.

7. Zlatan Sarić: Tehnologija mlijeka i mliječnih proizvoda, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Sarajevu, 2007.

8. Obradović, D. (2002/03.): Tehnološka mikrobiologija, 2002/03. Dostupno na url: http://www.sirikajmak.rs/documents/predavanja-tehn-mikorbiologija.pdf

9. Marina Rajič: Seminarski rad – Starter kulture bakterija i kvasaca u proizvodnji vina (2014.). Dostupno na url: https://www.scribd.com/document/244524116/Starter-kulture-bakterija-i-kvasaca-u-proizvodnji-vina#

10. Marina Rajič: Seminarski rad – Bakterije mliječne kiseline, plijesni i fagi iz grožđa i vina (2014.). Dostupno na url: https://www.scribd.com/document/239651222/Bakterije-Mle%C4%8Dne-Kiseline-Plesni-i-Fagi-Iz-Gro%C5%BE%C4%91a-i-Vina

11. Sandra Horvat: Završni rad – Industrijska proizvodnja probiotičkih mliječnih napitaka (2014.) Dostupno na url: https://www.google.hr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjZpd2cnJDSAhUiQZoKHWj2BogQFggaMAA&url=https%3A%2F%2Fzir.nsk.hr%2Fislandora%2Fobject%2Fptfos%3A70%2Fdatastream%2FPDF%2Fdownload&usg=AFQjCNGTVzktmfH4V091Ux1L2aP9V7IRAA&sig2=8hHf5NqKeufmzYMMd_VHhA

Web stranice:

12. http://www.agroklub.com/vinogradarstvo/malolakticna-fermentacija/2517/

13. https://www.google.hr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjP4fCJm5DSAhXBBSwKHUNyAsIQFggaMAA&url=http%3A%2F%2Fhrcak.srce.hr%2Ffile%2F139731&usg=AFQjCNGzh7qrFt94MiZAaRXvLF87gg4_cQ&sig2=6AJRgotfcDegfzPjYFun9g

14. http://www.sirikajmak.rs/documents/predavanja-tehn-mikorbiologija.pdf

15. https://www.scribd.com/document/244524116/Starter-kulture-bakterija-i-kvasaca-u-proizvodnji-vina#

16. https://www.google.hr/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjZpd2cnJDSAhUiQZoKHWj2BogQFggaMAA&url=https%3A%2F%2Fzir.nsk.hr%2Fislandora%2Fobject%2Fptfos%3A70%2Fdatastream%2FPDF%2Fdownload&usg=AFQjCNGTVzktmfH4V091Ux1L2aP9V7IRAA&sig2=8hHf5NqKeufmzYMMd_VHhA

9. SAŽETAK

Bakterije mliječne kiseline uglavnom rastu u nutritivno bogatim sredinama. Pronalazimo ih u mliječnim proizvodima, fermentiranom mesu i ribi, grožđu, grožđanom moštu, vinu te pivu, a također u tjelesnim šupljinama ljudi i životinja. Imaju ulogu u očuvanju te fermentaciji hrane. Upotrebljavaju se kao starter kulture za dobivanje različitih fermentiranih proizvoda.

Koriste se u proizvodnji mliječnih proizvoda i nekih sireva (*Streptococcus, Lactococcus, Pediococcus*, neki rodovi *Lactobacillus, Leuconostoc*, heterofermentativni *Lactobacillus*). Djelovanjem BMK se odvija proces mliječno – kisele fermentacije laktoze u mliječnu kiselinu te nastaju brojni međuprodukti i energija. Najpoznatiji fermentirani mliječni proizvodi su jogurt, kefir, kumis, acidofilno mlijeko i sir.

Bakterije mliječne kiseline također sudjeluju u alkoholnoj fermentaciji (rodovi *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Oenococcus* i *Weissella*). Za dobivanje lakšeg i mekšeg okusa vina se vrši razgradnja jabučne kiseline u mliječnu kiselinu koju vrše BMK. Time utječu na kvalitetu vina.

10. SUMMARY

Lactic acid bacteria mostly grow in the nutritionally rich environments. They are found in dairy products, fermented meat and fish, grapes, the grape must, wine and beer, also in body cavities of people and animals. They play a role in the preserving and fermentation of food. Are used as starter cultures for getting different fermented products.

LAB are used in the manufacture of certain dairy products and some cheese (*Streptococcus, Lactococcus, Pediococcus*, some genus of *Lactobacillus, Leuconostoc*, heterofermentative *Lactobacillus*). With activity of LAB is happening the process of lactic acid fermentation lactose in lactic acid and generated numerous intermediates and energy. The most important fermented dairy products are yogurt, kefir, kumiss, acidophilus milk and cheese.

Lactic acid bacteria also participate in alcoholic fermentation (genus of *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Oenococcus* and *Weissella*). To obtain easier and smoother taste of wine is made degradation of malic acid into lactic acid which is performed by LAB. Thereby affecting the quality of the wine.

11. POPIS TABLICA

1. Uloga pojedinih vrsta (Obradović, 2002/03.). 20

2. Kriteriji za selekciju malolaktičnih bakterija za proizvodnju vina (Bou i Powell, 2005.) 27

12. POPIS SLIKA

Slika 1. *Lactococcus lactis,* preuzeto sa http://textbookofbacteriology.net/featured_microbe.html 4

Slika 2. *Lactobacillus helveticus*, preuzeto sa https://nootriment.com/lactobacillus-helveticus/ 5

Slika 3. *Escherichia coli,* preuzeto sa http://poliklinika-sinteza.hr/djelatnosti/escherichia-coli-biorezonanca-lijecenje/ 6

Slika 4. *Clostridium botulinum*, preuzeto sa https://www.google.hr/search?q=clostridium&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwij9-7x74rTAhUInRoKHYrmDBAQ_AUICCgB&biw=1366&bih=662#imgrc=PW3u1VMZmhobuM: 7

Slika 5. *Lactococcus,* preuzeto sa https://en.wikipedia.org/wiki/Lactococcus 8

Slika 6. *Streptococcus,* preuzeto sa http://emedicine.medscape.com/article/225243-overview#a5 8

Slika 7. *Leuconostoc,* preuzeto sa http://genome.jgi.doe.gov/leume/leume.home.html 9

Slika 8. *Lactobacillus,* preuzeto sa https://en.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus 9

Slika 9. *Geotrichum candidium* spp., preuzeto sa https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/handle/10214/6084 14

Slika 10. Tekući Jogurt, preuzeto sa http://www.dukat.hr/proizvodi/dukat/fermentirani-proizvodi/tekuci-jogurti 15

Slika 11. Kefir, preuzeto sa 16
http://www.vindija.hr/Proizvodi/Kefir35mm.html?Y3RpXDE1NCxwXDE0NA%3D%3D

Slika 12. Kumis, preuzeto sa
http://etiflex.com.co/wp/dt_portfolio/alpina-kumis/ 17

Slika 13. Acidofilno mlijeko, preuzeto sa
http://www.vindija.hr/Proizvodi/Legenda-z-bregov.html?Y3RnXDEwOCxwXDE0NA%3D%3D 17

Slika 14. Limburger, meki sir, preuzeto sa
http://www.eatwisconsincheese.com/cheeses/33/limburger 19

Slika 15. Švicarski sir, preuzeto sa
http://www.zivotistil.rtl.hr/zdravlje/1632246/konacno-otkriveno-evo-zasto-svicarski-sir-ima-rupe/ 19

Slika 16. *Bifidobacterium bifidum,* preuzeto sa
http://www.vibeprobiotics.com/why-you-need-bifidobacterium-bifidum/ 21

Slika 17. *Lactobacillus acidophilus,* preuzeto sa
http://www.mysticalbiotech.com/portfolio/lactobacillus-acidophilus/ 21

Slika 18. Kefir i kefirna zrnca, preuzeto sa
https://authoritynutrition.com/9-health-benefits-of-kefir/ 22

Slika 19. *Candida kefyr,* preuzeto sa
http://atlas.microumftgm.ro/micologie/levuri/ckefyr.php 22

Slika 20. *Saccharomyces cerevisiae,* preuzeto sa
https://bissonlab.wordpress.com/2012/10/02/saccharomyces-cerevisiae-1000x/ 23

Slika 21. *Oenococcus oeni,* preuzeto sa
https://en.wikipedia.org/wiki/Oenococcus_oeni 24

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Diplomski studij, smjer Ekološka poljoprivreda

Korištenje bakterija mliječne kiseline u poljoprivrednoj proizvodnji

Ivana Pandžić

Sažetak: Bakterije mliječne kiseline uglavnom rastu u nutritivno bogatim sredinama. Pronalazimo ih u mliječnim proizvodima, fermentiranom mesu i ribi, grožđu, grožđanom moštu, vinu te pivu, a također u tjelesnim šupljinama ljudi i životinja. Imaju ulogu u očuvanju te fermentaciji hrane. Upotrebljavaju se kao starter kulture za dobivanje različitih fermentiranih proizvoda. Koriste se u proizvodnji mliječnih proizvoda i nekih sireva (*Streptococcus, Lactococcus, Pediococcus*, neki rodovi *Lactobacillus, Leuconostoc*, heterofermentativni *Lactobacillus*). Djelovanjem BMK se odvija proces mliječno – kisele fermentacije laktoze u mliječnu kiselinu te nastaju brojni međuprodukti i energija. Najpoznatiji fermentirani mliječni proizvodi su jogurt, kefir, kumis, acidofilno mlijeko i sir. Bakterije mliječne kiseline također sudjeluju u alkoholnoj fermentaciji (rodovi *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Oenococcus* i *Weissella*). Za dobivanje lakšeg i mekšeg okusa vina se vrši razgradnja jabučne kiseline u mliječnu kiselinu koju vrše BMK. Time utječu na kvalitetu vina.

Rad je izrađen pri: Poljoprivredni fakultet u Osijeku

Mentor: Doc. dr. sc. Suzana Kristek

Broj stranica: 37

Broj tablica: 2

Broj slika: 21

Broj literaturnih navoda: 16

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: bakterije mliječne kiseline, fermentirani mliječni proizvodi, alkoholna fermentacija

Datum obrane:

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. Doc.dr.sc. Sanda Rašić, predsjednik

2. Prof.dr.sc. Suzana Kristek, mentor

3. Izv.prof.dr.sc. Drago Bešlo, član

4. Dr.sc. Dejan Agić, zamjenski član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, Sveučilište u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate thesis

J. J. Strossmayer University of Osijek

Faculty of Agriculture

University Graduate Studies, Organic Agriculture

Use of lactic acid bacteria in agricultural production

Ivana Pandžić

Summary: Lactic acid bacteria mostly grow in the nutritionally rich environments. They are found in dairy products, fermented meat and fish, grapes, the grape must, wine and beer, also in body cavities of people and animals. They play a role in the preserving and fermentation of food. Are used as starter cultures for getting different fermented products. LAB are used in the manufacture of certain dairy products and some cheese (*Streptococcus, Lactococcus, Pediococcus*, some genus of *Lactobacillus, Leuconostoc*, heterofermentative *Lactobacillus*). With activity of LAB is happening the process of lactic acid fermentation lactose in lactic acid and generated numerous intermediates and energy. The most important fermented dairy products are yogurt, kefir, kumiss, acidophilus milk and cheese. Lactic acid bacteria also participate in alcoholic fermentation (genus of *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus, Oenococcus* and *Weissella*). To obtain easier and smoother taste of wine is made degradation of malic acid into lactic acid which is performed by LAB. Thereby affecting the quality of the wine.

The work was created at: Faculty of Agriculture in Osijek

Mentor: PhD. Suzana Kristek

Number of pages: 37

Number of tables: 2

Number of photos: 21

Number of references: 16

Original in: Croatian

Keywords: lactic acid bacteria, fermented dairy products, alcoholic fermentation

Date of defense:

Commission for evaluation and defense of thesis:

1. PhD. Sanda Rašić, president

2. PhD. Suzana Kristek, mentor

3. PhD. Drago Bešlo, member

4. PhD. Dejan Agić, a replacement member

Thesis deposited at: Library, Faculty of Agriculture in Osijek, University of Osijek, Kralja Petra Svačića 1d.