UPPSALA
UNIVERSITET

Mjölksyrafermenterande bakterier och deras användning inom yoghurtproduktion

Bejan Aresh

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2009
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag

Tillverkningen av yoghurt är bara ett exempel på hur man utnyttjat mikroorganismens naturliga förmåga för att producera en kommersiell produkt. I detta fall använder man sig av en blandning av två grampositiva bakterier *Streptococcus thermophilus* och *Lactobacillus bulgaricus* som har förmågan att fermentera laktos, ett av det mest förekommande sockren i mjölk. Denna fermentering utför bakterierna normalt också i naturen i syrefattiga miljöer, vilket betyder att de förlitar sig på en intern elektronmottagare. Bakterierna har specifika transportsystem som möjliggör intag av laktosen från mjölken varvid den i cellen bryts ner av β-galaktosidas till två mindre beståndsdelar glukos samt galaktos. Galaktosen kan inte cellen tillgodogöra sig men glukosen används för att så småningom utvinna energi via Embden-Meyerhof-Parnas cykeln med pyruvat som slutlig elektronmottagare och mjölksyra som biprodukt.

Dessa två bakterier har en symbiotisk relation i en blandningskultur. *S. thermophilus* verkar huvudsakligen producera syror som pyruvat, myrsyra samt koldioxid som har en positiv inverkan på *L. bulgaricus* tillväxten samtidigt stimuleras den själv av aminosyror som bildas av *L. bulgaricus*. Aminosyra bildningen katalyseras av proteaser som sitter i bakteriens cellvägg och även *S. thermophilus* har liknande proteaser men i en blandningskultur har dessa inte lika stor proteolytisk aktivitet som dem hos *L. bulgaricus*. Strukturen för proteaserna hos båda bakterier är väldigt lika, de består båda av flera domäner (sex till sju) som har olika funktioner.

Yoghurtframställningen kan i princip delas in i fyra steg. I det första steget förändras mjölkens sammansättning samt konsistensen. Därefter sker en temperaturhöjning som eliminerar kontaminationer i form av patogener och mjölken homogeniseras för att ge en jämn konsistens. I det slutgiltiga steget inokuleras mjölken med en blandningskultur av *S. thermophilus* och *L. bulgaricus* under tre till fem timmar tills pH når ungefär 4,5. Det bildade yoghurten kyls sedan ner och paketeras.

Inledning

Mikroorganismer hade under hundra tals år haft en viktig roll i människans vardagliga liv utan att man riktigt förstått, som till exempel tillverkning av alkoholhaltiga drycker till konservering av föda. I dagsläget har man gått från att använda mikroorganismer för just öl och vin tillverkning till att använda dem för tillverkning av bland annat läkemedel, kemikalier och tillsattser för födan. Man har till exempel förstärkt bakteriens naturliga metaboliska process för att producera kommersiella produkter på en storskalig nivå. Det är så hela den industriella mikrobiologin är uppbyggd.

Industriella bakterier är väldigt specifika i sina metaboliska processer, de producerar bara ett fåtal produkter. Med hjälp av olika tekniker väljer man specifikt ut de varianter av den önskade bakterien som ger bäst resultat. Vilket ur ett ekonomiskt perspektiv är väldigt viktigt (Madigan m fl 2009).

En del av denna stora industri som varit väldigt populär är yoghurt produktion samt produktion av andra mejeri produkter. Vid produktion av yoghurtprodukter används huvudsakligen bakterierna *Streptococcus thermophilus* och *Lactobacillus bulgaricus*, men även andra arter inom mjölksyrafermenterande bakterier används och då för specifika yoghurttyper. Konsumtion av yoghurtprodukter har ökat de senaste åren speciellt sedan den lanserades 1917 i Sverige, vilken kanske till största del beror på att utbudet har ökat avsevärt. Idag kan man välja yoghurt med olika frukt- och smaktillsater, vitaminer, procentdel fett och även med en del tarmfrämjande bakterier.

Denna uppsats går djupare in på hur de metaboliska processer som de två bakterierna *S. thermophilus* och *L. bulgaricus* använder sig av fungerar och hur dessa processer används i industrin vid framställning av yoghurt.

Mjölksyrafermenterande bakterier

Bakterier kan i princip utvinna energi på två olika sätt. Det ena är genom membranfosforylering och det andra genom substratnivåfosforylering, vilket är då bakterien använder sig av en intern elektronmottagare. I anaeroba miljöer används fermentation för att generera ATP genom substratnivåfosforylering. Många olika organiska föreningar kan fermenteras beroende på vilken bakterie det är (Campbell m fl 2002). Ett exempel är fermentation av mjölksyra som utförs av bland annat *L. bulgaricus* och *S. thermophilus* som ofta används vid yoghurtproduktion (Leong-Morgenthaler m fl 1991). Båda dessa bakterier är grampositiva, icke-sporulerande och har förmågan att fermentera olika kolhydrater, exempelvis laktos till mjölksyra.

S. thermophilus är sfäriska eller ovala celler som antingen bildar dubbletter eller långa kedjor och de växer bäst vid cirka 45 grader Celsius (Kandler 1983, Auclair m fl 1983).

Strukturen på *L. bulgaricus* varierar beroende på vilken stam det är, stadiet det befinner sig i och kompositionen på mediet. Cellerna trivs bäst i 45 grader Celsius (Auclair m fl 1983) i likhet med *S. thermophilus*.

Mjöksyrafermenterande bakterier har generellt små genom jämfört med andra bakterier och detta beror främst på att dem är metaboliskt väldigt specifika. Storleken på *L. bulgaricus* genom ligger på 2,3 megabaspar (Mb) med en GC andel på 49-51%, vilket är något högre än för andra arter (34-46%) inom samma fylogenetiskt träd (Klaenhammer m fl 2002) .

Bakterien *S. thermophilus* har däremot en genom storlek på 1,8 Mb, vilket är bland de minsta genomen inom de mjölksyrafermenterande bakterierna. Denna bakterie har även en låg GC andel som ligger på 40 % (Klaenhammer m fl 2002, Poolman m fl 1989).

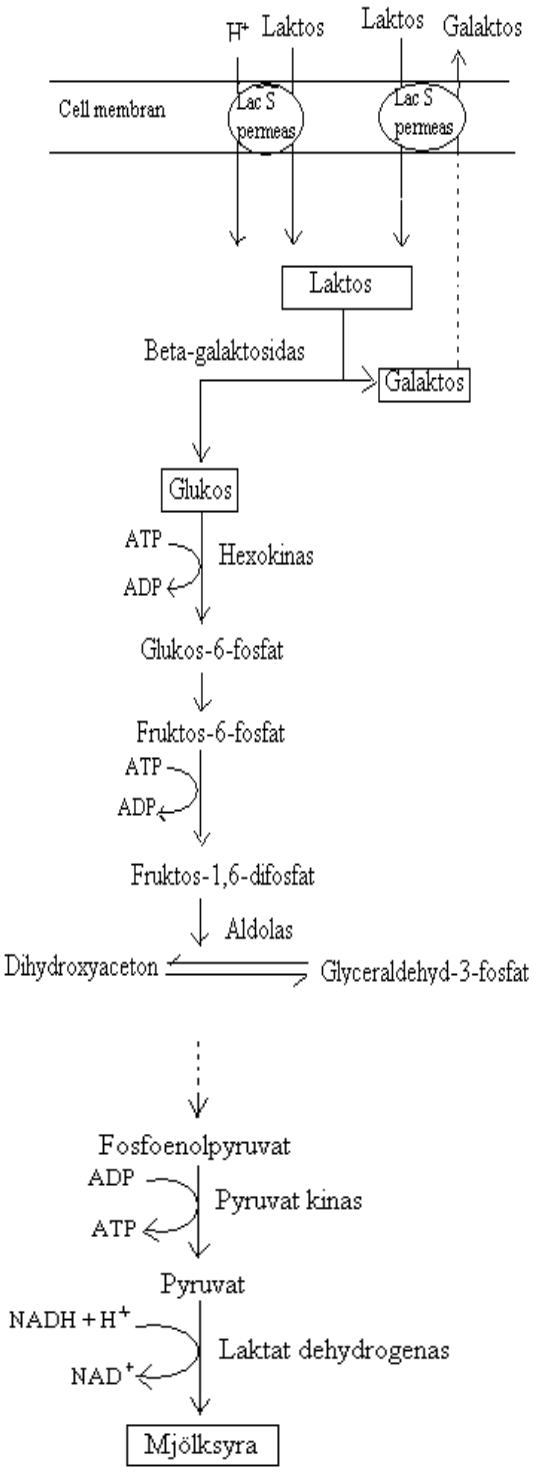
Metabolism

Laktosfermentation

S. thermophilus transporterar in laktos via ett laktostransportprotein kallat LacS, som är membranbundet (Poolman m fl 1989). LacS fungerar som en laktos-galaktos antiport, där laktos transporteras in i cellen medan galaktos transporteras ut till omgivningen (Hutkins & Ponne 1991). Detta stöds av experiment ledda av Thomas och Crow (1984), där man observerade att *S. thermophilus* endast tog tillvara glukosen från laktos, och galaktosen avgavs till mediet.

När laktosen tagits upp hydrolyseras den av β-galaktosidas till glukos och galaktos. Galaktosen utsöndras som tidigare nämnts men glukosen används för att utvinna energi genom Embden-Meyerhof-Parnas cykeln (Tinson m fl 1982). I de tre första stegen i cykeln fosforyleras glukos till fruktos-1,6-difosfat med förbrukning av två ATP. Fruktos-1,6-difosfat klyvs därefter av enzymet aldolas och bildar två molekyler av glyceraldehyd-3-fosfat som i sin tur oxideras och fosforyleras ytterligare för att omvandlas till pyruvat (Kandler 1983). Vid bildning av pyruvat generas två ATP och två stycken NAD^+ reduceras per glukosmolekyl. Den reducerade NAD är inte önskvärd för bakterien eftersom den då inte kan producera fler ATP och det är här som pyruvat är användbart. Pyruvat används som elektronmottagare och reduceras därmed av NADH till laktat som är den joniserade formen av mjölksyra. Alltså utvinns totalt 2 ATP och 2 laktat molekyler för varje molekyl glukos som fermenteras (figur 1), (Campbell m fl 2002, Madigan m fl 2009).

Fermentationsprocessen hos *L. bulgaricus* går till på samma sätt som hos *S. thermophilus* men permeaset och β-galaktosidaset skiljer sig något (Zourari m fl 1992). Dessutom producerar den en annan mjölksyreisomer, D(-) än *S. thermophilus* som har slutprodukten L(+) mjölksyra (Kandler 1983). L(+) mjölksyra är fördelaktigt eftersom människan inte kan hydrolysera stora mängder av D-isomeren (Holzapfel 2002) men detta skapar inte så stora problem inom yoghurtindustrin eftersom det bildas mer av L(+) mjölksyra än D(-). Mer specifikt så är koncentrationen av D(-) mjölksyra i en blandning av *S. thermophilus* och *L. bulgaricus* endast 20 % av vad som produceras i rena kulturer (Béal m fl 1993).



Figur 1. Laktostransport och fermentation hos bakterien *Streptococcus thermophilus*. Laktostransportproteinet LacS fungerar både som laktos-galaktos antiport och som laktos-vätejon symport (omarbetat från Zourari m fl 1992).

Bildning av aromämnen

Bortsett från bildning av mjölksyra producerar *S. thermophilus* och *L. bulgaricus* även många s.k. aromämnen som t ex acetaldehyd, aceton, diacetyl, aldehyder samt alkoholer. Bland dessa

anses dock acetaldehyd vara den som ger den karaktäristiska yoghurtsmaken (Pette & Lolkema 1950c). Det är idag ännu oklart hur acetaldehydsyntesen går till, men tre möjliga vägar har föreslagits. Den första avser bildning av acetaldehyd via Embden-Meyerhof-Parnas cykeln. Därefter pyruvatsyntesen från glukos så katalyseras pyruvat av enzymet α-karboxylas och bildar därmed acetaldehyd. Alternativt bildar pyruvatdehydrogenas, acetyl- CoA från pyruvat som vidare omvandlas till acetaldehyd av enzymet aldehyddehydrogenas (Lees & Jago 1976). Uppmätta enzymaktivitet av α-karboxylas och aldehyddehydrogenas från de två bakterierna visar på olika resultat, Raya m fl (1986) hittade ingen enzymaktivitet i sina stammar men däremot fann Lees och Jago (1976) aldehyddehydrogenas aktivitet i båda stammarna.

I den andra vägen bildas acetaldehyd från aminosyran treonin. Här katalyserar treoninaldolas klyvningen av treonin till acetaldehyd och glycin (Lees & Jago 1978, Wilkins m fl 1986). Treoninaldolas har detekterats i både *S. thermophilus* och *L. bulgaricus* men enzymaktiviteten hos *S. thermophilus* minskar när man ökar tillväxttemperaturen från 30 till 42 ˚C medan enzymaktiviteten hos *L. bulgaricus* förblir densamma. Eftersom inokulering av mjölken med bakterierna sker i ca 45 grader så betyder det att det mesta av acetaldehyden som bildas under yoghurtproduktionen bildas av *L. bulgaricus* (Wilkins m fl 1986).

Den sista vägen innebär att acetaldehyd produceras från 2-deoxyribos-5-fosfat (DNA komponent) med enzymet deoxyriboaldolas som katalysator. Men denna väg bidrar inte så pass mycket till den totala acetaldehyden eftersom DNA sällan bryts ner under den exponentiella fasen (Lees & Jago 1977).

Produktion av extracellulära polysackarider

Det är vanligt i yoghurtindustrin att använda sig av så kallade repstartkulturer av *S. thermophilus* och *L. bulgaricus* (engelska ”ropy” starters) som producerar exopolysackarider (EPS) (Cerning 1995). Beroende på vilken mjölksyrafermenterande bakterie som används kan polysackariderna utsöndras helt till omgivningen (extracellulära polysackarider) eller vara förankrade kring bakterien (kapsulära polysackarider). I naturen fungerar polysackariderna som ett skydd mot diverse hot som t ex. bakteriofager, antibiotika eller fästning till ytor och bildning av biofilmer men vid yoghurtproduktion ger de bättre struktur samt viskositet (Madigan m fl 2009, Duboc & Mollet 2001). De extracellulärar polysackariderna kan i sin tur delas in i två grupper. Dessa är homopolysackarider som består av en typ av monosackarider och heteropolysackarider bestående av en eller flera typer av monosackarider varav dem vanligaste är glukos, galaktos och rhamnos men även t ex fruktos, ribos och glycerol används i mindre mängder. (Faber m fl 2001a, Faber m fl 2001b, Mozzi m fl 2006). Både *S. thermophilus* och *L. bulgaricus* producerar heteropolysackarider. *S. thermophilus* producerar heteropolysackarider bestående av tetra sackarider som upprepas men även hexa- och hepta sackarider förekommer. För *L. bulgaricus* förekommer heterosackariderna vanligen i hepta form. Monosackariderna till dessa bildas i cellen med hjälp av glykosyltransferaser och transporteras därefter över membranet för att polymeriseras extracellulärt (Cerning 1990, Jolly m fl 2002). Beroende på vilken bakteriestam som används varierar EPS i komposition, laddning, rigiditet och dess förmåga att interagera med proteiner (Duboc & Mollet 2001). Generna som kodar för EPS: er förekommer i kluster med specifika regulatoriska, strukturella och transport funktioner. Hos mjölksyrafermenterande bakterier sitter dessa kluster på kromosomer och har en liknande operon system där generna följer en specifik ordning (De Vuyest m fl 2001, Broadbent m fl 2003, van Kranenburg m fl 1999a, 1999b). Både *S. thermophilus* och *L. bulgaricus* har liknande uppbyggnad av genklusteret förutom att *L.*

bulgaricus har en extra gen. Genklusteret börjar med *epsA* (eng exopolysaccharide A) som är den region som är involverad i EPS reglering. Därefter kommer *epsE*, *epsF*, *epsG*, *epsH* och *epsI* som sitter i mitten av klustret och kodar för enzymer som antas vara involverade i tillverkning av de upprepande sekvenserna som bygger upp själva EPS:et. Generna *epsC*, *epsD*, *epsJ* och *epsK* kodar för proteiner som ansvarar för polymerisering och export av EPS (Lamothe m fl 2002, Stingele m fl 1996).

Yoghurtproduktion

Yoghurt är ett slutresultat av fermenterad mjölk som har blandats med en rad olika ingredienser för att få den rätta smaken och konsistensen (Cornell University). Den har funnits i människans basföda sedan tusentals år tillbaks, fast då lämnades mjölken i rumstemperatur och genom de mjölksyrafermenterande bakterier som redan fanns i mjölken bildad mjölksyra. Den resulterande sänkta pH:t lede även till längre hållbarhet för yoghurten (Arla).

Mjölkens beståndsdelar

Mjölk består av ca fett, protein, kolhydrater och 14 stycken vitaminer och mineraler (Arla). Fetter är uppbyggda av alkoholen glycerol som utgör själva grunden med fastbundna fettsyror som i sin tur består av en kolvätekedja och en karboxylgrupp. Den vanligaste fettypen har tre fettsyremolekyler fästa till en glycerol. Det mesta av fettet i mjölken existerar i form av runda kulor som varierar storlek mellan 1 µm och 10 µm.

Proteiner består av aminosyror som är fastbundna till varandra genom peptidbindningar. I mjölk finns i huvudsakligen två kategorier av proteiner, kaseiner som är den dominerande proteintypen och serum proteiner. Skillnaden mellan dem är att kaseiner innehåller fosfat, förekommer som miceller (flera molekyler tillsammans) och har en väldigt enkel struktur vilket gör den mer värme tålig. Serumproteiner däremot innehåller inte fosfat och har en mer kompakt struktur som kan denatureras vid höga temperaturer.

Tillverkningsprocessen

Innan man tillsätter blandningen av *L. bulgaricus* och *S. thermophilus* till mjölken måste den genomgå ett antal modifieringar.

Förberedelse av mjölken

För att få en bättre struktur (ökad tjocklek och fasthet) på yoghurten ökar man vanligtvis torrsubstansen, vilket kan genomföras på ett flertal sätt, t ex genom att tillsätta skummjölkspulver eller skummjölkskoncentrat, eller genom evaporering (Aguilera & Kessler 1989, Skriver m fl 1999). Även andra metoder används för att ändra yoghurt strukturen som till exempel tillsättning av proteiner, socker, enzymer samt stabilisatorer som polysackarider och gelatin för att göra yoghurten tjockare. Man kan även ändra fetthalten på yoghurten beroende på vilken typ som tillverkas (Sodini m fl 2004).

Pastörisering

Mjölken värms upp till ca 95 ºC i 10 minuter. Den höga temperaturen denaturerar serumproteinerna vilket resulterar i att de lättare kan binda till vatten och därav bibehålla den kompakta konsistensen. Pastörisering eliminerar även risken för kontamineringar eftersom många patogena bakterier som *Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter* och *Yersinia* som kan

finnas i mjölk inte överlever det höga temperaturen. Eftersom även lipaser, som bryter ner fett, inaktiveras ökar man även yoghurtens hållbarhet (Cornell University, Livsmedelsverket).

Homogenisering

Homogenisering görs under ett tryck på ca 2000 pascal vid 60 ºC. Detta minskar diametern på fettkulorna vilket förhindrar dem från att klumpa ihop sig under förvaringen. Därefter kyls mjölken ner till ca 45 ºC som är den optimala tillväxttemperaturen för blandningskulturen (Cornell University, livsmedelssverige).

Inokulering med blandningskulturen

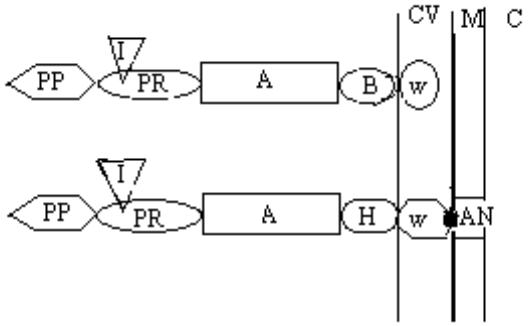
För att få en bättre kontroll över fermentationsprocessen samt de resulterande produkterna används så kallade startkulturer som i princip är material som innehåller de önskade mikroorganismerna (Holzapfel 2002). Bakterierna kan vara koncentrerade, frusna eller frystorkade när de tillsätts till mjölken och beroende på vilken eller vilka mjölksyrabakterier som används i denna startkultur får man olika resultat. Vid yoghurt produktion används ofta en blandning mellan *L. bulgaricus* och *S. thermophilus.* (http://www.livsmedelssverige.org/livsmedel/animalier/mjolk/fil.htm, Auclair & Accolas 1983). I Sverige är det till och med inte tillåtet att kalla en produkt för yoghurt så vida den inte innehåller båda dessa bakterier (Arla).

Det är inte en tillfällighet att man idag använder en blandning av dessa två bakterier och i förhållandet 1:1, redan 1950 visade Pette och Lotkema (1950a) att trots att *S. thermophilus* och *L. bulgaricus* kunde fermentera mjölk individuellt så var tillväxten såväl som syraproduktionen högre i en blandningskultur (stöds även senare av Bautista m fl 1966, Béal m fl 1993). Sedan dess har man klarat upp en hel del av den symbiotiska relationen mellan dessa två bakterier.

I en blandningskultur har bakterierna en karakteristisk tillväxt som överensstämmer med fermenteringsförloppet i mjölken. Först växer *S. thermophilus* exponentiellt medan ingen större tillväxt ses hos *L. bulgaricus*. Därefter avstannar ökningen av *S. thermophilus*, medan *L. bulgaricus* börjar öka i antal och denna ökning forsätter även i den sista fasen där *S. thermophilus* påbörjar ännu en exponentiell tillväxt (Pette & Lotkema 1950c, Courtin m fl 2004). Den första tillväxtfasen förklaras av att *S. thermophilus* tillgodogör sig de näringsämnen som redan finns i mjölken, som till exempel aminosyror, och börjar bilda mjölksyra (även myrsyra och koldioxid) men eftersom *L. bulgaricus* trivs bättre i surare miljö så sker ingen större ökning denna (Pette & Lotkema, 1950c, Driessen m fl 1982, Veringa m fl 1968). Eftersom kvantiteten av fria aminosyror och peptider är begränsade i mjölk avstannar i den andra fasen ökningen av *S. thermophilus*. Vilka aminosyror som är begränsande beror på årstiden samt sammansättningen av mjölken. Men den surare miljön (pga. de syror som bildats av *S. thermophilus*) stimulerar *L. bulgaricus* tillväxt samt initierar uttrycket av proteaser hos denna (Pette & Lotkema 1950b, Thomas & Mills 1981).

Dessa bakterier har proteaser (figur 2) som sitter i cellväggen hos bakterien och katalyserar nedbrytningen av mjölkproteiner (kasein) till peptider. (http://www.thefreedictionary.com/proteinase, Thomas & Mills 1981). Hos *S. thermophilus* betecknas proteaset PrtS och hos *L. bulgaricus* PrtB (Courtin m fl 2002). De består av cirka 2000 aminosyror som är ordnade i flera domäner med olika funktioner. Från proteasets N-terminal ligger pre-pro domänen som har en signalsekvens som behövs för transport över cellmembranet samt en pro-sekvens som avlägsnas via självkatalys. Därefter följer proteasdomänen som har den katalytiska aktiviteten och i den sitter insättningsdomänen (I)

(Eng insert) vars funktion tros ha med substratspecificiteten att göra. Man har ännu inte lyckat lista ut vad A och B domänerna har för funktion men troligen har de någon slags funktion i proteasaktivitet eller substratspecificitet. Helix (H) domänen (bara hos *S. thermophilus*) placerar A domänen i rätt position utanför cellen och cellvägg (W) domänen fyller cellväggen. Slutligen har man förankringsdomänen (AN) som förankrar proteaset i cellmembranet och saknas i *L. bulgaricus* (Fernandez-Espla m fl 2000, Siezen 1999).



Figur 2. Cellbundna proteaser. Den översta är *L. bulgaricus* PrtB och den nedersta *S. thermophilus* PrtS. PP = pre-pro domän, PR = proteas domän, I = insättningsdomän, A = A-domän, B = B-domän, H = Helix domän, W = cellväggs domän, AN = ankringsdomän, CV = cellvägg, M = cellmembran och C = cytoplasman. (Omarbetad från Siezen 1999).

Peptiderna som genereras av proteaserna bryts ned ytterligare till aminosyror av peptidaser som sitter i cellmembranet och i cytoplasman (Thomas & Mills 1981). Proteaset hos *S. thermophilus* är väldigt viktig i rena kulturer men till skillnad från *L. bulgaricus* proteaset så påverkar de varken det slutliga pH:t eller den totala populationen i en blandkultur. Alltså är proteaser hos *L. bulgaricus* mycket mer aktiva och därmed mer effektiva i proteinnedbrytningen (Courtin m fl 2002). I en blandkultur producerar *L. bulgaricus* merparten av alla aminosyror förutom glutamin, asparagin och cystein. I den sista fasen nyttjar S. *thermophilus* de peptider som bildats av *L. bulgaricus* och genomgår ännu en tillväxtfas (Courtin m fl 2004). S. *thermophilus* har inte lika stort näringsbehov, vilket kan förklara varför antalet av denna bakterie är större i en blandkultur medan antalet *L. bulgaricus* är densamma vare sig den befinner sig i blandkultur eller en ren kultur (Pette & Lotkema 1950a, Courtin m fl 2004).

När pH når 4,5 efter ett par timmar kyls den nu bildade yoghurten ner och sedan är den färdig att förpackas (Cornell University, Livsmedelssverige).

Risker

Även om fermentation är i allmänhet en säker och beprövad metod så kan fel uppstå som leder till försämrad kvalitet på varan samt medför kontamination i form av patogener. En kontamination kan ske vid alla de steg som beskrivits men är mindre trolig under pastöriseringen samt under syrningsprocessen som ger sådana låga pH att de flesta mikroorganismer inte kan överleva. Typen av nedsmittning kan antingen vara bakterier och bakteriofager som inte påverkas av pastöriseringen eller smaktillsatser, bekämpningsmedelsrester och färgämnen (Livsmedelsverket). Men den mest vanliga typen är i form av jäst och mögel, som inte påverkas på samma sätt av syrahalten. Mögel som kan påträffas i ytan på yoghurten kan använda den producerade mjölksyran som energikälla och därmed minska koncentrationen av syra, vilket leder till en mer gynnsam miljö för patogena

bakterier. För att påvisa mögel eller jäst i bland annat startkulturer är det vanligt att man antingen luktar på den eller att man använder sig av mikroskopi eller odling på platta. Kontaktytor kontrolleras också, innan produktionen med olika odlingstekniker samt desinfekteras efter hela processen (Vedamuthu 1991). Andra förebyggande åtgärden brukar vara i form av praktisering av god hygien, strikta temperatur, pH och tidkontroller (Livsmedelsverket).

Bakteriofager

Bakteriofag kontaminationer påverkar som sagt produkternas kvalitet, men orsakar även sekundärt förseningar vid tillverkningen och kan också få stora ekonomiska konsekvenser (Stadhouders m fl 1988).

Bakteriofager är unika, de liknar varken bakterier, jäst eller mögel. De är parasiter som inte kan föröka sig utan en värd och på grund av detta så kan de inte klassificeras baserade på det klassiska systemet. Som till exempel om de är aeroba eller anaeroba eller vilken metabolisk process som används. Man brukar därför klassifiera bakteriofager baserat till exempel på deras morfologi, serologi och värdpreferens. Men även DNA och genomanalyser används för att klassificera bakteriofager (McGrath m fl 2004).

Bakteriofager indelas morfologiskt i tre grupper, dessa är myoviridae (grupp A), siphoviridae (grupp B) och podoviridae (grupp C) (Bradley 1967, Matthews 1982). De bakteriefager som infekterar mjölksyrafermenterande bakterier tillhör grupp B och dessa har ungefär samma struktur (McGrath m fl 2004). Medlemmar i grupp B har en lång svans som är förbunden med ett huvud som kan vara litet och isometriskt, elliptiskt eller ha en utdragen struktur. I huvudet finns DNA:et eller RNA:et som injekteras in i värden via svansfibrerna och därefter kan infektionen ske via två vägar. I den ena vägen så infekterar bakteriofagen värden, replikerar och lyserar cellen varpå nya bakteriofager frisläpps (kallat lytiskt stadium). Vid den lysogenetiska vägen så inkorporerar bakteriofagen sitt genom in i värdgenomets och varje gång värdgenomet replikeras sker även en replikation av bakteriofagens genom. De kan efter detta inaktiva stadium återgå till ett lytiskt stadium (Bradley 1967, Matthews 1982, McGrath m fl 2004).

Diskussion

Yoghurt är lika nyttigt som mjölk eftersom den innehåller ungefär lika mycket av alla näringsämnen som fett, kolhydrater och protein. För laktosintoleranta kan yoghurt till och med vara ett bättre alternativ eftersom den innehåller ungefär 40 % mindre laktos än mjölk. Vilket medför mindre besvär för de drabbade (Kolars m fl 1984).

Dem senaste åren har mycket mer fokus sätts på att undersöka den hälsosamma effekten av yoghurt. Ute på marknaden finns hundratals olika yoghurt som sägs ha positiva effekter. Dessa produkter har fått namnet probiotika, vilket enligt Världshälsoorganisationen definieras som ”levande organismer som vid administration i flytande form medför en förbättrad hälsa på värden”. De vanligaste bakterierna som används vid framställning av probiotisk yoghurt tillhör *Lactobacillus* och *Bifidobacterium*. Dessa bakterier tros konkurera ut skadliga bakterier i tarmen genom att antingen konkurera om näring eller genom att sänka pH:et. De positiva hälsoeffekterna av probiotika sägs bland annat vara en förbättrad tolerans mot laktos, ökad intag av magnesium, kalcium och järn, och slutligen den hjälper till att skydda mot infektioner (Fuller 1989, Världshälsoorganisationen, Arla).

En forskargrupp i Finland har nyligen bevisat att probiotika även kan motverka eksem. Mödrar som var mer benägna att få eksem, allergi eller astma av olika anledningar fick kosttillskott innehållande bakterie av släktet *Lactobacillus* eller placebo fyra veckor innan födseln tills sex månader efter födseln. Barnen följdes upp efter två år och fyra år och det visade sig att hos de barn vars mödrar hade tagit probiotika var risken 40 % mindre att få eksem (Kalliomäki m fl 2001, 2003a, 2003b).

En annan del av denna industri som är intressant är applikationen av molekylärbiologi för att förbättra startkulturer. Det i dagsläget enkelt att modifiera en startkulturs fenotyp genom att antingen introducera nytt DNA eller att öka uttrycket eller inaktivera specifika gener. Dessa genmodifierade bakterier skulle då kunna producera yoghurt med förbättrad smak, konsistens, näringsvärde och hållbarhet. Genom genmodifiering skulle man även kunna erhålla bakterier som är resistenta mot bakteriofager, tolerera lägre temperaturer och är mindre känslig för osmotiska förhållanden. Trots att det är väldigt lätt att konstruera sådana bakterier finns det väldigt få ute på marknaden. Detta beror främst på att man har olika regleringar runt om i världen. En genmodifierad bakterie som har blivit godkänd i USA kommer nödvändigtvis inte bli accepterad i Europa som har hårdare reglering (Kondo m fl 2002, Perdersen m fl 2005).

Molekylärbiologi används inte bara till att modifiera DNA utan den används även för att erhålla information om en specifik bakterie. Man har till exempel används sig av komparativ genomik för att jämföra S. *thermophilus* genomet med andra i samma släkte som är patogener. Man kan fråga sig hur det kommer sig att S. *thermophilus* är helt ofarlig medan många andra i släktet som till exempel *S. pyogenes* och *S. pneumonae* är skadliga. S. *thermophilus* saknar antibiotika resistenta gener och många virulenta Streptococcus relaterade gener saknas eller finns som pseudogener. Orsaken tros vara att S. *thermophilus* har förlorat dessa gener efter anpassning till miljön den lever i idag. Vilket betyder att S. *thermophilus* en gång i tiden också var en patogen (Bolotin m fl 2004).

Referenser

Aguilera JM, Kessler HG. 1989. Properties of mixed and filled-type dairy gels. Journal of Food Science **54**: 1213–1217.

Arla. Mjölksyrabakterier- en naturlig ingrediens. www-dokument: http://www.arlafoods.se/narmare-naturen/naturlig-evolution/vart-business-intent/ingredienser/http://www5.arla.se/Default____17665.aspx. Hämtad 2010-05-06.

Arla. Mjölk. www-dokument. Vad är vad i yoghurten? Protein.www-dokument: http://www5.arla.se/Default____17662.aspx. Hämtad 2010-05-06.

Arla. Vad är vad i yoghurten? Kolhydrater. www-dokument: http://www5.arla.se/Default____17657.aspx. Hämtad 2010-05-06.

Arla. Vad är vad i yoghurten? Fett. www-dokument: http://www5.arla.se/Default____17652.aspx. Hämtad 2010-05-06.

Arla. Vad är vad i yoghurten? 14 av 18 viktiga vitaminer och mineraler. www-dokument: http://www5.arla.se/Default____17649.aspx. Hämtad 2010-05-06.

Auclair J, Accolas JP. 1983. Use of thermophilic lactis starters in the dairy industry. Antoine van Leewenhoek **49**: 313-326.

Bautista ES, Dahiya RS, Speck ML. 1966. Identification of compounds causing symbiotic growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk. Journal of Dairy Research **33**: 299-307.

Béal C, Spinnler HE, Corrieu G. 1993. Comparison of growth, acidification and productivity of pure and mixed cultures of *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* 404 and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* 398. Applied Microbiology and Biotechnology **41**: 95-98.

Bolotin A, Quinquis B m fl. (och 21 andra författare). 2004. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. Nature Biotechnology **22**: 1554-1558.

Bradley DE. 1967. A review: ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. Bacteriology review **33**: 230-314.

Broadbent JR, McMahon DJ, Welker DL, Oberg CJ, Moineau S. 2003. Biochemistry, genetics and applications of exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus*: a review. Journal of Dairy Science **86**: 407-423.

Campbell NA, Reece JB. 2002. Biology. 6: e uppl. Pearson Education Inc, San Francisco.

Cerning J. 1990. Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews **87**: 113-130.

Cornell University. Milk fat. www-dokument 2007-03-01: http://www.milkfacts.info/Milk%20Composition/Fat.htm: Hämtad 2010-05-06.

Courtin P, Monnet V, Rul F. 2002. Cell-wall proteinases PrtS and PrtB have a different role in *Streptococcus thermophilus*/*Lactobacillus bulgaricus* mixed cultures in milk. Microbiology **148**: 3413-3421.

Courtin P, Rul F. 2004. Interactions between microorganisms in a simple ecosystem: yogurt bacteria as a study model. Lait **84**: 125-134.

De Vuyest L, Vaningelgem F, Degeest B. 2001. Recent developments in the biosynthesis and applications of heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. International Dairy Journal **11**: 687-707.

Driessen FM, Kingma F, Stadhouders J. 1982. Evidence that Lactobacillus bulgaricus in yoghurt is stimulated by carbon dioxide produced by Streptococcus thermophilus. Netherlands Milk Dairy Journal **36**: 135-144.

Duboc P, Mollet B. 2001. Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. International Dairy Journal **11**: 759-768.
Faber EJ, Kamerling JP, Vliengenthart JFG. 2001a. Structure of the extracellular polysaccharide produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 291. Carbohydrate Research **331**: 183-194.
Faber EJ, van den Haak MJ, Kamerling JP, Vliengenthart JFG. 2001b. Structure of the extracellular polysaccharide produced by *Streptococcus thermophilus* S3. Carbohydrate Research **331**: 173-182.
Fernandez-Espla MD, Garault P, Monnet V, Francoise R. 2000. Streptococcus thermophilus cell-wall-anchored proteinse: release, and biochemical and genetic characterization. Applied and Environmental Microbiology **66**: 4772-4778.
Fuller R.1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology **66**: 365-378.
Holzapfel WH. 2002. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. International Journal of Food Microbiology **75**: 197-212.
Hutkins RW, Poone C. 1991. Lactose uptake driven by Galactose efflux in *Streptococcus thermophilus*: Evidence for Galactose-Lactose Antiporter. Applied and Environmental Microbiology **57**: 941-944.
Jonsson E. Mjölk. www-dokument 2003-02-03: http://www.livsmedelssverige.org/livsmedel/animalier/mjolk/fil.htm: Hämtad 2010-05-06.
Kandler O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. Antoine van Leeuwenhoek **49**: 209-224.
Klaenhammer T, Altermann E. m fl (35 andra författare). 2002. Discovering lactic acid bacteria by genomics. Antonie van Leeuwenhoek **82**: 29-58.
Kolars JC, Levitt MD, Aouji M, Savaiano DA. 1984. Yogurt -an autodigesting source of lactose. New England Journal of Medicine **310**: 1-3.
Kondo JK, Johansen E. 2002. Product development strategies for foods in the era of molecular biotechnology. Antonie van Leeuwenhoek **82**: 291-302.
Kalliomäki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. 2001. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled trial. The Lancet **357**: 1076-1079.
Kalliomäki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. 2003a. Probiotics for prevention of atopic disease? The Lancet **362**: 496.
Kalliomäki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. 2003b. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. The Lancet **361**: 1869-1871.
Lamothe GT, Jolly L, Mollet B, Stingele F. 2002. Genetic and biochemical characterization of exopolysaccharide biosynthesis by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Archives of Microbiology **178**: 218-228.
Lees GJ, Jago GR 1976. Acetaldehyde: an intermediate in the formation of ethanol from glucose by lactic acid bacteria. Journal of Dairy Research **43**: 63-73.
Lees GJ, Jago GR. 1977. Formation of acetaldehyde from 2-deoxy-D-ribose-5-phosphate in lactic acid. Journal of Dairy Research **44**: 139-144.
Lees GJ, Jago GR. 1978. Role of acetaldehyde in metabolism: A review 1. Enzymes catalyzing reactions involving acetaldehyde. Journal of Dairy Science **61**: 1205-1215.
Leong-Morgenthaler P, Zwanhlen MC, Hottinger H. 1991. Lactose Metabolism in *Lactobacillus bulgaricus*: Analysis of the primary structure and expression of the genes involved. Journal of Bacteriology **173**: 1951-1957.

Livsmedelsverket. Varför pastöriseras mjölk och vilka metoder finns det? www-dokument 2009-04-01: http://slv.se/templates/SLV_Page.aspx?id=14131&epslanguage=SV. Hämtad 2010-05-06.
Livsmedelsverket. Branschriktlinjer för hygienisk produktion av mjölkprodukter. www-dokument 2006-06-12: http://www.slv.se/upload/dokument/livsmedelskontroll/branschriktlinjer/Branschriktlinje%20mejeri%20version%202006-06-12.pdf. Hämtad 2010-05-06.
Livsmedelsverket. Syrade mjölkprodukter arbetsblad A. www-dokument 2010-03 http://www.slv.se/upload/dokument/livsmedelskontroll/branschriktlinjer/4A_Syrade_mjo%C2%A6%C3%AAlkprod.pdf. Hämtad 2010-05-06.
Livsmedelssverige. 2009. www-dokument http://www.livsmedelssverige.org/livsmedel/animalier/mjolk/fil.htm. Hämtad 2010-05-06.
Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. 2009. Biology of microorganisms. 12: e uppl. Pearson Education Inc, San Francisco.
McGrath S, Fitzgerald GF, van Sinderen D. 2004. Starter cultures: bacteriophages. 3: de uppl. Elsevier Ltd, London
Medical Dictionary. www-dokument: http://www.thefreedictionary.com/proteinase: Hämtad 2010-05-06.
Mjölkfrämjandet. www-dokument. http://www.mjolkframjandet.se/faktabank/fakta_om_mjolkprodukter/grundfakta/filmjolk_och_yoghurt_-_grundfakta#001: Hämtad 2011-03-14.
Mozzi F, Vaningelgem F, Herbert EM, Van der Meulen R, Morenio MRF, de Valdez GF, De Vuyust L. 2006. Diversity of heteropolysaccharide-producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. Applied and Environmental Microbiology **72**: 4431-4435.
Pedersen NB, Iversen SL, Sorensen KI, Johansen E. 2005. The long and winding road from the research laboratory to industrial applications of lactic acid bacteria. FEMS Microbiology review **29**: 611-624.
Pette JW, Lolkema H. 1950a. Yoghurt. Symbiosis and antisymbiosis in mixed cultures *Lb. bulgaricus* and *S. thermophilus*. Netherlands Milk Dairy Journal **4**: 197-208.
Pette JW, Lolkema H. 1950b. Yoghurt. Growth stimulating factors for Streptococcus thermophilus. Netherlands Milk Dairy Journal **4**: 209-224.
Pette JW, Lolkema H. 1950c. Yoghurt. Acid formation and aroma formation in yoghurt. Netherlands Milk Dairy Journal **4**: 261-273.
Poolman B, Royer TJ, Mainzer SE, Schmidt BF. 1989. Lactose transport system of *Streptococcus thermophilus*: a hybrid protein with homology to the melibiose carrier and enzyme III of phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase systems. Journal of Bacteriology **171**: 244-253.
Raya RR, Manca de Nadra MC, Pesce de Ruiz Holgado A, Oliver G. 1986. Acetaldehyde metabolism in lactic acid bacteria. Milchwissenschaft **41**: 397-399.
Siezen JR. 1999. Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. Antonie van Leewenhoek **76**: 139-155.
Skriver A, Holstborg J, Qvist KB. 1999. Relation between sensory texture analysis and rheological properties of stirred yoghurt. Journal of Dairy Research **66**: 609-618.
Sodini I, Remeuf F, Haddad S, Corrieu G. 2004. The relative effect of milk base, starter, and process on yogurt texture: A review. Critical reviews in Food Science and Nutrition **43**: 113-137.
Stingele E, Neeser JR, Mollet B. 1996. Identification and characterization of the *eps* (exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6. The Journal of Bacteriology **178**: 1680-1690.

Thomas TD, Crow VL. 1984. Selection of galactose-fermenting *Streptococcus thermophilus* in lactose-limited chemostatic cultures. Applied and Environmental Microbiology **48**: 168-191.

Thomas TD, Mills OE. 1981. Proteolytic enzymes of starter bacteria. Netherlands Milk and Dairy Journal **35**: 255-273.

Tinson W, Hillier AJ, Jago GR. 1982. Metabolism of *Streptococcus thermophilus* 1. Utilization of lactose, glucose and galactose. Australian Journal of Dairy Technology **37**: 8-13.

Todar K. 2008. Diversity of metabolism in prokaryotes. www-dokument: http://www.textbookofbacteriology.net/metabolism.html. Hämtad 2009-04-02.

van Kranenburg R, van Swan II, Marugg JD, Kleerebezem M, de Vos W.M. 1999a. Exopolysaccharide biosynthesis in *Lactococcus lactis* NIZO B40: functional analysis of the glycosytransferase genes involved in synthesis of the polysaccharide backbone. The Journal of Bacteriology **181**: 338-340.

van Kranenburg R, Vos HR, van Swan II, Kleerebezem M, de Vos WM. 1999b. Functional analysis of the glycosytransferase genes from *Lactococcus lactis* and other gram-positive cocci: complementation, expression and diversity. The journal of Bacteriology **181**: 6347-6353.

Vedamuthu R. Ebenezer. 1991. The yogurt story- past, present and future part VI. Dairy Food and Environmental Sanitation **11**: 513-514.

Veringa HA, Galesloot ThE, Davelaar H. 1968. Symbiosis in yoghurt. Isolation and identification of a growth factor for Lactobacillus bulgaricus produced by *Streptococcus thermophilus*. Netherlans Milk Dairy Journal **22**: 114.

Wilkins DW, Schmidt RH, Shireman RB, Smith KL, Jezeski JJ. 1986. Evaluating acetaldehyde synthesis from L-[^{14}C(U)] threonine by *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. Journal of Dairy Science **69**: 1219-1224.

Zourari A, Accolas JP, Desmazeaud M.J. 1992. Metabolism and biochemical characteristics of yoghurt bacteria. A review. Lait **72**: 1-34.