

Postavlja se pitanje kako proizvesti veće količine acidofilnog mleka u industrijskim uslovima, a da se u njemu ne razviju i ne ovladaju oni mikroorganizmi, koji su preživeli termičku obradu ili su naknadno dospeli u mleko i sudove.

Naši ogledi i ispitivanja išla su u pravcu iznalaženja mogućnosti da se proizvede kvalitetno acidofilno mleko u industrijskim uslovima ne samo od sterilnog već i od pasterizovanog mleka. Da se obezbedi, određenim tehnološkim procesom, potreban minimum u pogledu broja acidofilnih štapića, koji obezbeđuju dijetetsko i lekovito svojstvo, a dobijeno pod strožijim higijenskim uslovima (aseptički uslovi) da se može koristiti i kao terapeutsko sredstvo.

Nov tehnološki proces proizvodnje acidofilnog mleka bio bi sledeći:

Mleko se pasterizuje na temperaturi 90—95°C i drži se na toj temperaturi 10 minuta ili se termički obradi u hermetički zatvorenim sudovima na temperaturi do 120°C. Posle hlađenja do temperature cepljenja, mleko se cepi, promeša i razliva u sudove različite zapremine (0,2, 0,25 i 0,50 litara). Napunjeni sudovi nose se u termokomoru gde se drže 3—4 sata do dobijanja grušta potrebnog kvaliteta, a zatim se nose u hladnjaču temperature 3—5°C. Temperatura acidofilnog mleka ne treba da je viša od 8°C. Vodi se računa da se ne ohladi mleko za vreme punjenja.

Da bi se postigli određeni rezultati, koji se odnose na skraćanje vremena inkubacije potrebno je obezbediti — pored određenih tehničko-tehnoloških uslova — i dobru, kvalitetnu, matičnu i radnu čistu kulturu. Radnu (proizvodnu) čistu kulturu treba proizvesti pod specifičnim uslovima koji obezbeđuju sterilnost i povećanu biološku aktivnost ćelica *L. bact. acidophilum*.

Zaključak

Ispitivanja su išla u pravcu skraćanja vremena inkubacije, a što je imalo za cilj da se onemogući razvitak neželjene mikroflore koja bi potisnula acidofilne štapiće.

Primenom određene tehnologije i atkivirane čiste kulture *L. bact. acidophilum* skraćuje se vreme inkubacije na 3 do 4 sata.

U toku procesa inkubacije razmnožavaju se isključivo ćelice *L. bact. acidophilum*.

Skraćanjem vremena inkubacije stvara se mogućnost za industrijsku proizvodnju kvalitetnog acidofilnog mleka.

Literatura

1. Kan. biol. nauk A. K. Maksimova, Intenzifikacija procesa proizvodstva kiselo moločnih produkta — Moločnaja promišlennos, T6, No 9, 1968.
2. Nikola M Nikolov — Panajot Černev, Čisti kulturi i priloženjeto im s mlečnata promišljenost — Tehnika — Sofija — 1967.

STANIČNI ELEMENTI KAO KRITERIJ VALJANOSTI MLIJEKA ZA PROIZVODNJU JOGURTA*

Mr. N. ŽIVIĆ, Mr. D. KUBELKA, Mr. Š. KADIĆ, Mr. B. TABAKOVIĆ
AIPK »Bosanska Krajina«, Banja Luka

Mlijeko dobiveno iz vimena zdravih krava bez sumnje je bitan preduvjet za proizvodnju kvalitetnih mlječno-kiselih fermentiranih proizvoda. Međutim,

* Referat sa XIII Seminara za mlekarsku industriju održanog od 5 do 7. II 1975., na Tehnološkom fakultetu u Zagrebu.

vrlo je teško, ako ne i nemoguće, u sirovini dopremljenoj u mljekaru utvrditi koliki postotak mlijeka u ukupnoj količini potiče od krava oboljelih od mastitisa.

Određivanje broja staničnih elemenata u mlijeku predstavlja vanredno značajan dio kompleksnog, dijagnostičnog postupka u ocjeni poremećene i fiziološke sekrecije vimena, pa je razumljivo da se količini somatskih stanica u mlijeku daje izuzetno dijagnostično značenje.

Prošlo je 60 godina otkako su Prescott i Bred (1910) opisali metodu za brojenje stanica direktno pomoću mikroskopa. Ovaj test (ili njegova modifikacija) još se i danas koriste. Usprkos razvoju brojnih direktnih i indirektnih testova istom se nedavno došlo do spoznaje da se rezultati ovih metoda moraju podudarati s rezultatima dobivenim po originalnoj metodi Prescottta i Breda. Pojavile su se mnoge varijacije mikroskopske tehnike, a znatni doprinos tomu dali su Levowitz i Weber 1956, te Paape, Hafe i Snyder 1963; o tehnici bojadisanja Newbould i Phipps 1967, a Schneider i Jasper 1965. i 1966. o važnosti radnih faktora (cit. Pearson i sar. 1970.).

Glavna diskusija u radovima mnogih istraživača vodi se o ulozi stanica u mlijeku vezano za njihovo mjesto u problemu mastitisa. To su, popularno nazvane, somatske stanice, i do sada nije bilo pokušaja njihove diferencijacije. Jedan dio stanica su leukociti, a većina direktnih ili indirektnih metoda brojanja stanica, isto će tako otkriti epitelne stanice koje su obično povezane s fiziološkim promjenama u vimenu, naročito kod kasne laktacije. Bez obzira na njihovo porijeklo, njihovo prisustvo u velikim brojevima kod izmuženog mlijeka, mora se onemogućavati iz tri glavna razloga:

1. Kvalitet mlijeka se sa stanovišta potrošača reducira, naročito u SMF vrijednosti: Asworth, Forster i Luedecke 1967, Daniel, Biggs i Barnum 1966.; King 1967.; O'Donovan, Dodd i Neave 1960.; Waite i Blackburn 1957.

2. Mlijeko s visokim sadržajem stanica može biti zapreka u mljekarskoj industriji, u proizvodnji mlječnih produkata; kao rezultat može proizaći sir loše kvalitete, a postoji i veliki riziko kontaminacije sa zabranjenim supstancijama, Sorokina 1944.; Kiswa i Rotkiewicz 1967.; Kiswa, Kruk i Rotkiewicz 1967.; Rotazzi 1967.; Waes i van Belleghem 1969. i Pearson 1969.

3. Što je najvažnije, konstantni visoki brojevi stanica u izmuženom mlijeku znače postojanje ozbiljnog problema mastitisa (cit. Pearson i sar. 1970.).

Materijal i metoda rada

Radi utvrđivanja broja somatskih stanica u mlijeku leukocita paralelno smo upotrijebili elektronski brojač Celloscope 401 proizvodnje Linson Inst. AB Stockholm i Fuchs-Rosenthalovu komoru, koja se inače koristi za određivanje broja leukocita u cerebrospinalnom likvoru.

Uzorke mlijeka uzimali smo od krava kod kojih nikad nije registriran mastitis, koje nisu imale bilo kakve promjene na papilama i parenhimu, odnosno od krava s pravilno oblikovanim vimenom. Krave su bile u prvoj polovini laktacionog perioda. Paralelno s uzimanjem uzoraka indirektnom metodom, MR utvrđivali smo da se radi o vimenu s normalnom sekrecijom, pri čemu smo i bakteriološki pretražili svaki uzorak. Samo ona mlijeka, koja su MR-testom dala negativan rezultat i koja su bakteriološki bila negativna, koristili smo kao kontrolne uzorke, odnosno uzorke kojima smo dodavali mlijeko krava oboljelih od mastitisa u određenim procentima.

U toku rada izvršili smo 10 pokusa, odnosno u 10 serija po 10 mlijeka od zdravih krava dodavali smo u određenim postocima mlijeko krava oboljelih od mastitisa s organoleptičkim umjereno izmijenjenih sekretom.

U plastične čašice, zapremine 200 ml, koje se uobičajeno koriste u mljekarama za punjenje jogurta, stavljali smo mlijeko potpuno zdravih krava tako da smo u prvu čašicu usuli 200 ml, u drugu 199 ml, u treću 198 ml itd. a u desetu 182 ml. Prva čašica služila nam je kao kontrola, a u slijedeće smo dodavali mlijeko krava oboljelih od mastitisa, tako da je ukupna količina u svim čašama iznosila 200 ml. Na taj način dobili smo uzorke kod kojih se procent mastitičnog mlijeka kretao od 0,5 do 9⁰/₁₀₀.

Nakon toga smo sve uzorke pasterizirali 5 minuta na temperaturi od 95⁰C. Ohlađenom mlijeku na 45⁰C dodali smo 1,5⁰/₁₀₀ jogurtove mije (S. thermophilus, L. bulgaricus 3:1). Zatim smo ovako pripremljene uzorke inkubirali u termostatu kod temperature od 45⁰C. Pratili smo brzinu fermentacije mlijeka i kvalitetet gruša.

Pripremu uzoraka za određivanje staničnih elemenata u mlijeku izvršili smo kombiniranjem metoda koje su opisali Klein i Thomas (1968.) i Pearson i sar. (1970.).

Prije pasterizacije od gornjih uzoraka, od svakog posebno, uzeli smo po 10 ml mlijeka i stavili u epruvete 130 × 10 u koje smo prethodno dodali po 0,5 ml 4⁰/₁₀₀ formalina. Uzroke smo ostavili na sobnoj temperaturi 24 sata.

Nakon ovog postupka fiksacije epruvete s uzorcima smo snažno mučkali 5—6 sekundi da bi došlo do disperzije odvojene masti. Zatim su uzorci ostavljeni oko 2 minuta kako bi nestalo pjene. Neposredno prije uzimanja 0,1 ml mlijeka za testiranje, epruvete s uzorcima nježno smo okrenuli 3 do 4 puta radi ravnomjernijeg raspoređivanja stanica u osnovnom uzorku. Volumen od 0,1 ml uzorka mlijeka za testiranje uzimali smo pomoću DILUTER tip D III, proizvodnje Scientific Instrument Service New Addington, England koji uzeti volumen uzorka automatski razređuje s 9,9 ml filtriranog sredstva za razređivanje. Razređivač smo dobili kada smo na 85,5⁰/₁₀₀ volumena elektrolita (sastav: NaCl 0,9⁰/₁₀₀ težine, rastvor formaldehida 1⁰/₁₀₀ volumena i dest. vode ad 100) dodali 12,5⁰/₁₀₀ volumena etanola i 2,0⁰/₁₀₀ volumena Triton X-100 (ISO-oktylfenoxipoly-etoxietanol) proizvodnje KEBO AB Stockholm. Pomoću Tris-a (2-amino -2- (hydroxymethy) propan-1, 3-diol (Tris) proizvodnje BDH Chemicals LTD Poole, England, podešavali smo pH vrijednost na 7,0.

Razređivač smo filtrirali uređajima proizvodnje Sartorius Membranfilter Göttingen, oznake 16621 na slijedeći način: posudu od 12 litara, koja izdržava pritisak od 10 atm, napunili smo razređivačem. Posuda je vezana s 2 teflonska crijeva na pumpu proizvodnje Kurt Neuberger K. T. Maschinenfabrick 78 Freiburg I. BRG. Typ NK 25 i uređaja za filtraciju SM 165 06 Sartorius Membranfiler G.m.b.H, Göttingen u kojem se nalazio filter prečnika 142 mm s porama veličine 0,45 mikrona proizvodnje također Sartorius Membranfilter (SM 11 306).

Uzorak razrijeđen filtriranim razređivačem 1:100 inkubirali smo za 15 minuta u vodenoj kupki pri temperaturi od 80⁰C. Da bismo postigli određenu konstantnost temperature, u kupku smo ugradili mješač kako bi voda neprekidno cirkulirala. Nakon inkubiranja uzorci su postali potpuno bistri, a brojenje smo izvodili 1 do 1,5 sata nakon zagrijavanja.

Stanične elemente paralelno smo brojali u Fuchs-Rosenthalovoj komori, a izbrojane stanice podijelili smo s 3,2, koliko iznosi zapremina ove komore.

Broj somatskih stanica paralelnog uzorka brojali smo elektronskim brojačem Celloscope 401 proizvodnje Linson Instrument AB Stockholm.

Rezultati

Kontrolni uzorci, koji potječu od krava s potpuno zdravim vimenima imali su broj somatskih stanica od 130 do 180.000, a broj staničnih elemenata u mlijeku krava s mastitisom kretao se od 4 do 8 miliona. U pravilu broj staničnih elemenata u uzorcima mlijeka, kojima je dodano od 0,5 do 9% mlijeka iz oboljelog vimena, povećavao se srazmjerno količini dodanog izmijenjenog mlijeka, tako da je broj somatskih stanica u uzorku, kome je dodano 0,5% izmijenjenog mlijeka, iznosio od 160.000, a u uzorku, kome je dodano 9% izmijenjenog mlijeka broj staničnih elemenata iznosio je 1,2 miliona.

Rezultati paralelnog brojanja stanica u ispitivanom mlijeku pomoću elektronskog brojača i pomoću Fuchs-Rosenthalove komore, nisu imali većih odstupanja s obzirom da je maksimalno izbrojana razlika iznosila 50.000.

Proces fermentacije kontrolnog uzorka, u kome je bilo od 130 do 180.000 stanica, trajao je 2 sata i 15 minuta, a gruš je bio čvrst i imao specifičan miris i prijatan, umjereno kiseo, ukus bez izdvajanja sirutke. Uzorcima mlijeka, kojima je dodano od 0,5 do 4% izmijenjenog mlijeka, a koji su u 1 ml imali od 160 do 500.000 stanica, proces fermentacije bio je produžen i trajao je 3 sata i 15 minuta, a gruš je bio mekan i nježan sa blagim, nedovoljno kiselim okusom uz izrazito odvajanje sirutke. Uzorcima mlijeka kojima je dodano od 5 do 9% izmijenjenog mlijeka, a koji su u 1 ml imali više od 500.000 do 1,2 miliona stanica, proces fermentacije bio je znatno produžen i trajao je 4 sata i 15 minuta, a gruš je također bio meke konzistencije i nježne strukture sa blagim i nedovoljnim kiselim okusom uz veoma izrazito izdvajanje sirutke.

Razmatranje i zaključak

Rezultati naših početnih ispitivanja ukazuju da broj stanica u mlijeku ne može biti vrijedan kriterij za ocjenu podobnosti sirovine za dobivanje mlječno fermentativnih proizvoda. Naime, mlijeko koje sadrži ispod 200.000 stanica u 1 ml, kakvog npr. prema nalazima Kleinschrotha i sar. (1968.) ima u Bavarskoj samo 21,7% smatra se gotovo krajnjim dometom higijenske kvalitete mlijeka. Pa ipak, mlijeko s takvim, gotovo idealnim brojem stanica, pokazalo se u našim ispitivanjima neprikladnim za proizvodnju jogurta, kad mu je bilo dodano i mlijeko krava oboljelih od mastitisa. Mlijeko s većim brojem stanica dobiveno od krava sa zdravim vimenom pokazalo je sve osobine kvalitetne sirovine za proizvodnju jogurta, ali, moramo podvući, njemu nije pridodano mlijeko oboljele krave, nego je veći broj stanica normalno fiziološko stanje za tu životinju. Međutim, to ne umanjuje značaj broja stanica u kompleksnom dijagnostičkom postupku utvrđivanja poremećene i fiziološke sekrecije vimena, pa je razumljivo da se količini somatskih stanica u mlijeku daje izuzetno dijagnostičko značenje.

Literatura

1. Klein H, Thomas H. I: *Milohwissenschaft* 23, 3, 153—156, 1968.
2. Kleinschrot E, Richter O, Schumann H: *Mitteilungen des Rindergesundheitsdienstes* 20, 2-9, 1968.