

KVALITET BAKTERIJSKIH KULTURA I USLOVI ZA ODRŽAVANJE NJIHOVE AKTIVNOSTI

prof. dr. Višeslava Miljković, M. Baltić i Vera Katić,
Veterinarski fakultet u Beogradu

SAŽETAK

Rad razmatra upotrebu smrznutih kultura bakterija mlečne kiseline u mlekarskoj industriji. Istraživanje je pokazalo da procenat preživelih bakterija posle smrzavanja zavisi od vrste bakterija, koncentracije u jedinici, zapremine i volumena sredine u kojoj se smrzavaju. Uticaj navedenih činilaca je mnogo manji pri smrzavanju na -196°C nego pri višim temperaturama.

Bakterije mlečne kiseline imaju široku primenu u prehrambenoj industriji, naročito mlekarskoj. Aktivnost, održivost karakterističnih osobina i čistoća u bakteriološkom smislu su osnovni uslovi za njihovu pravilnu upotrebu. Međutim, mnogobrojni uticaji spoljne sredine u svakodnevnoj praksi pripremanja kultura za upotrebu menjaju osobine kultura. U nizu činilaca, koji određuju uticaj spoljne sredine na kvalitet bakterijskih kultura, značajno mesto ima mleko koji je upotrebljeno za presejavanje, održavanje i neposrednu upotrebu. Ono, kao proizvod živog organizma, sadrži razne materije u promenljivom sastavu i količinama. Pod određenim uslovima to se odražava na osobine bakterija mlečne kiseline. Izmenjene osobine bakterija se pri daljem održavanju u laboratorijskim uslovima često još više ispoljavaju, te se u vezi s tim javljaju problemi pri preradi mleka.

Promene osobina bakterija mlečne kiseline koje su nastale mutacijom i degeneracijom i koje su izražene variranjem bioloških karakteristika, nisu jedini problemi što prate pripremu kultura za upotrebu u mlekarskoj industriji. Čistoća kultura, u bakteriološkom smislu, jedan je od problema jer kontaminacija drugim bakterijama, gljivicama i fagima nije redak slučaj. Teškoću u rešavanju tog problema predstavlja i metodika redovne kontrole bakteriološke čistoće koja mora da se sprovodi standardnim postupcima zasejavanja odgovarajućih hranljivih podloga i proveravanjem biohemijskih i drugih osobina bakterija pri takvoj kontroli. U praksi se kontrola kultura najčešće provodi mikroskopskim pregledom razmaza iz kultura, što je nedovoljno.

Prema mnogobrojnim iskustvima, iznetim u literaturi, problemi sa kulturama mikroorganizama mlečne kiseline i drugih koji služe u prehrambenoj industriji mogu se rešiti upotrebom liofiliziranih kultura. U novije vreme se primenjuje smrzavanje kultura, kao metod konzervisanja bakterija, sposobnih za direktnu upotrebu u mlekarskoj industriji, laboratorijskoj tehnici itd. Ispitivanja smrzavanja bakterija mlečne kiseline potvrdila su prednost smrzavanja na -196°C u tečnom azotu, u odnosu na smrzavanje pri višim temperaturama. Radi boljeg razumevanja našeg iskustva i sličnih iskustava drugih autora u vezi sa razlikama u podnošenju niskih temperatura od strane bakterija, izložićemo promene koje se odvijaju pri smrzavanju biološkog materijala.

Mikroorganizmi se smrzavanjem dovode u privremeno stanje anabioze. Smrzavanje je u osnovi složen proces, pri kome dolazi do stvaranja kristala leda, čija veličina i broj varira ovisno o brzini i temperaturi smrzavanja. Smrzavanje vode i rastvora počinje stvaranjem brojnih jedara ili »žarišta«, koja se dalje šire. Pri brzom smrzavanju obrazuju se mnogobrojni fini, sitni kristali, a pri sporom su kristali leda malobrojni, veliki i grubi. Do razlike u veličini kristala dolazi usled stvaranja različitog broja »žarišta« od kojih počinje rast kristala. Pri naglom padu temperature broj »žarišta« je veći, pa je mogućnost širenja kristala manja. Nasuprot tome pri sporom smrzavanju broj stvorenih »žarišta« manji je pa je mogućnost rasta kristala veća. Pri sporom smrzavanju biološke materije stvaraju se kristalna »žarišta« u ekstracelularnoj tečnosti. Rast kristala se odvija na račun ekstracelularne tečnosti, a zatim i vode iz unutrašnjih ćelija, sve dok sva slobodna voda ne bude pretvorena u led. Voda iz unutrašnjosti ćelija prelazi usled manjeg pritiska pare na kristale leda u ekstracelularnom prostoru nego na vodu u unutrašnjosti ćelija.

Prilikom rasta kristala leda, čija je zapremina veća od zapremine vode za jednu jedanaestinu, oni dolaze u dodir sa ćelijskom membranom i vrše pritisak na nju. Voda iz ćelija prelazi u ekstracelularni prostor, prema tome, i zbog oštećenja ćelijske membrane.

Ako se smrzavanje izvodi brzo na vrlo niskim temperaturama, stvaranje intracelularnih kristala nastaje manje-više istovremeno sa obrazovanjem ekstracelularnih kristala. Pri veoma naglom smrzavanju (-196°C i -252°C) možemo reći da i ne nastaju kristali leda, već oni prelaze u amorfnu, čvrsto, staklasto stanje (vitifikacija).

Pri smrzavanju mikroorganizama nastaju i promene ćelijske protoplazme, jer se stvaranjem kristala leda oduzima voda od proteina, a povećana koncentracija elektrolita, kao posledica izdvajanja vode iz rastvora, dovodi do strukturnih promena u proteinima. Koncentrisanje sastojaka pri smrzavanju uzrokuje povećanje viskoznosti celularne tečnosti. Smanjuje se pritisak O_2 u citoplazmi, čime se aerobnim ćelijama smanjuje respiratorna aktivnost. Zabeležene su i druge promene ćelijskog sadržaja, kao pH, aktivnost vode itd.

Vitalnost smrznutih kultura zivisi od mnogih činilaca, koji bi se mogli podeliti u tri grupe:

1. Uloga samog mikroorganizma, tj. vrste mikroorganizama, faza rasta, koncentracija ćelija i dr.
2. Uloga temperature smrzavanja, uključujući način smrzavanja i odmrzavanja, vreme čuvanja mikroorganizama pri temperaturi smrzavanja i dr.
3. Uticaj sredine u kojoj su mikroorganizmi rasli pre smrzavanja, tj. pH hemijski sastav sredine i uticaj sredine u kojoj se vrši smrzavanje (prisustvo zaštitnih materija) i utvrđuje rast posle odmrzavanja.

Istražujući značaj smrzavanja za rešavanje problema kultura u mlekarскоj industriji, obavili smo ova ispitivanja:

1. ponašanje različitih bakterijskih vrsta pri istim uslovima smrzavanja,
2. ponašanje različitih sojeva iste bakterijske vrste pri istim uslovima smrzavanja i

3. uticaj koncentracije bakterija i volumena, u kome se vrši smrzavanje, na preživljavanje smrznutih bakterija.

Način rada: Ponašanje različitih vrsta bakterija pri istim uslovima smrzavanja pratili smo na kulturama bakterija *Staphilococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Proteus vulgaris*. Kulture su suspendovane u obranom mleku i kiseloj pavlaci, zamrznuti na -27°C i posle 10 dana odmrznute na sobnoj temperaturi. Preživljavanje je provereno zasejavanjem na Baird-Parkerovu agaru, ljubičastocrvenom agaru i briljantnozelenom laktosnom žučnom agaru.

Ponašanje iste bakterijske vrste pri smrzavanju provereno je na dva soja bakterije *Lactobacillus acidophilus*. Suspenzija bakterija dobijena iz sedimenta kulture u MRS bujonu smrznuta je na -196°C . Posle odmrzavanja ispitivan je procenat preživelih bakterija na osnovu broja bakterija na MRS agaru, pre i nakon smrzavanja, i stepen kiselosti mleka zasejanog istom količinom suspenzije *Lb. acidophilus* pre i posle smrzavanja. Na osnovu stepena kiselosti meka (SH°) izračunat je gubitak aktivnosti pomoću ovog obrasca:

$$\text{Gubitak aktivnosti u \%} = \frac{\text{SH}^{\circ} \text{ pre smrzavanja} - \text{SH}^{\circ} \text{ posle smrzavanja}}{\text{SH}^{\circ} \text{ pre smrzavanja}} \times 100$$

Uticaj koncentracije kultura i volumena ispitivan je zamrzavanjem 1,2 i 5 ml suspenzije *Lb. acidophilus* u 10% rastvoru laktoze. Kultura je dobijena iz sedimenta u MRS bujonu.

Razblažena kultura imala je 4 puta manju koncentraciju ćelija *Lb. acidophilus* od koncentrovane.

Rezultati i diskusija

U tablici 1. dati su rezultati ispitivanja održivosti različitih bakterioloških vrsta pri smrzavanju pod istim uslovima. Kod sve tri vrste bakterija procenat preživelih bakterija je veći u mleku nego u kiseloj pavlaci. To pokazuje značaj sredine za otpornost mikroorganizama pri smrzavanju. Ti rezultati su pokazali da je pH sredine verovatno bitni činilac, jer prema nalazima više autora (6,9 i 10) procenat preživljavanja bakterija posle smrzavanja veći je u sredinama sa pH blizu neutralne reakcije.

Tabela 1

Održivost različitih bakterijskih vrsta pri smrzavanju na -27°C u toku 10 dana

| Vrsta mikroorganizama | Obrano mleko | | | Kisela pasterizovana pavlaka | | |
|------------------------------|--|--|------------------------|--|--|------------------------|
| | Broj bakterija pre smrzavanja u 10^6 | Broj bakterija posle smrzavanja u 10^6 | % preživelih bakterija | Broj bakterija pre smrzavanja u 10^6 | Broj bakterija posle smrzavanja u 10^6 | % preživelih bakterija |
| <i>Staphilococcus aureus</i> | 1,45 | 1,34 | 92,41 | 1,35 | 0,895 | 6,62 |
| <i>E. coli</i> | 1,40 | 0,201 | 14,35 | 1,06 | 0,21 | 1,88 |
| <i>Proteus vulgaris</i> | 1,13 | 0,45 | 39,82 | 1,02 | 0,366 | 3,58 |

U tablici 2. prikazani su rezultati ispitivanja otpornosti dva soja *Lb. acidophilus* na -196°C . Procenat preživelih ćelija kod soja označenog sa MI nešto je niži nego kod soja označenog sa PK. Gubitak aktivnosti zabeležen je kod oba soja, što je karakteristično naročito za soj PK, kod kojega su sve ćelije preživele smrzavanje. To pokazuje da kod nekih sojeva dolazi do delimičnog propadanja bakterija i gubljenja aktivnosti kulture, a kod nekih sojeva se samo smanjuje aktivnost. O smanjenju biološke aktivnosti bakterija posle smrzavanja govore i drugi autori (7 i 12). Po izvesnim mišljenjima mikroorganizmi posle odmrzavanja imaju povećane zahteve za nekim hranljivim materijama, a po nekima oštećenje mikroorganizama niskim temperaturama produžuje fazu laganog rasta u reprodukciji mikroorganizama, zbog čega se smanjuje aktivnost odmrznutih mikroorganizama. (4).

Tabela 2

Prikaz preživljavanja i gubitka biološke aktivnosti dva soja *Lb. acidophilus* čuvana 10 dana na -196°C

| Oznaka soja | % preživljavanja | Gubitak aktivnosti % |
|---------------------------|------------------|----------------------|
| <i>Lb. acidophilus</i> MI | 92,50 | 1,31 |
| <i>Lb. acidophilus</i> PK | 100,00 | 0,75 |

Ovi rezultati potvrđuju podatke Smittlea i saradnika (11) iznetih u tablici 3.

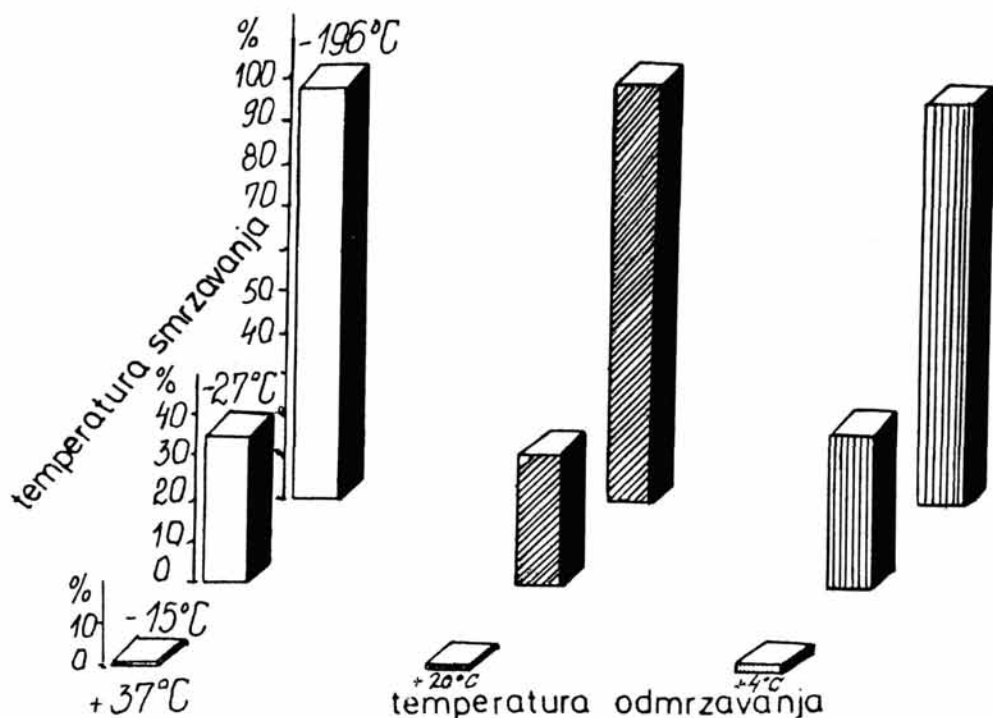
Tabela 3

Prikaz preživljavanja i biološke aktivnosti triju sojeva *Lb. bulgaricus* čuvana na -196°C

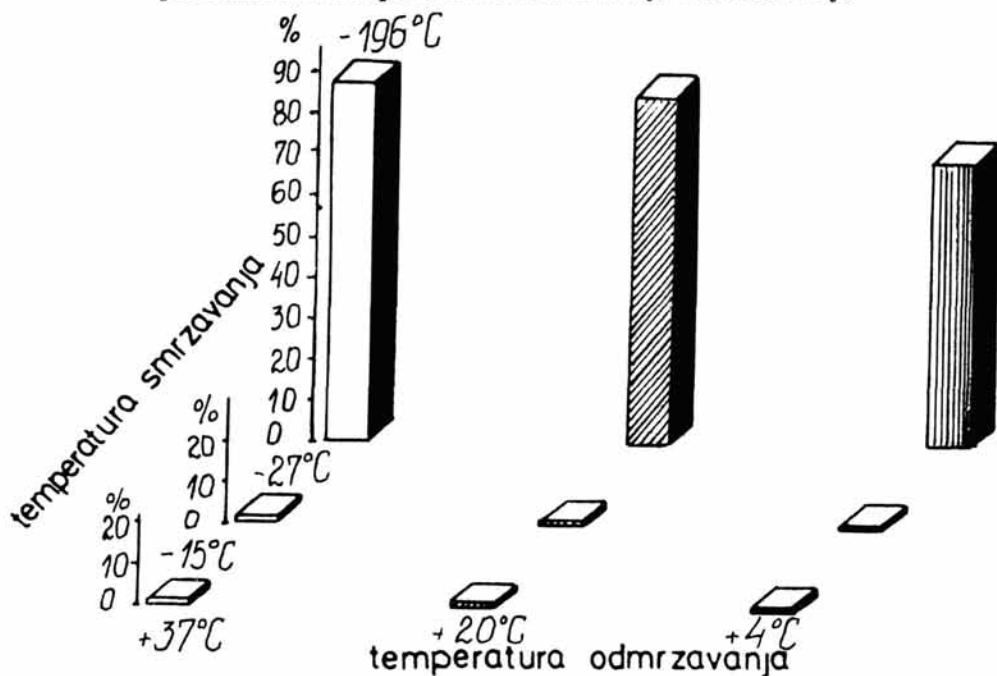
| Oznaka soja | Vreme čuvanja | | | |
|-----------------------------|---------------|------------------------|--------------|------------------------|
| | 1 dan | | 2 dana | |
| | % preživelih | gubitak aktivnosti u % | % preživelih | gubitak aktivnosti u % |
| <i>Lb. bulgaricus</i> NCS 1 | 5 | 73 | 1 | 69 |
| <i>Lb. bulgaricus</i> NCS 3 | 46 | 31 | 28 | 32 |
| <i>Lb. bulgaricus</i> NCS 4 | 100 | 8 | 100 | 8 |

Uticaj koncentracije bakterija na procenat preživelih ćelija prikazan na grafikonu 1. i 2.

Iz grafikona 1. i 2. vidi se da je procenat preživelih ćelija bakterije *Lb. acidophilus* veći u koncentrovanim kulturama. Te razlike su više ispoljene pri temperaturama smrzavanja od -15°C i -27°C nego pri -196°C , što potvrđuje prednost smrzavanja na -196°C , utvrđenu ranijim ispitivanjem (8). Iz grafikona se takođe vidi da temperatura odmrzavanja ima izvesni uticaj, te da pri sporom odmrzavanju ($+4^{\circ}\text{C}$) propada veći broj bakterija.



Grafikon 1. Grafički prikaz održivosti koncentrovane kulture *Lb. acidophilus* pri različitim temperaturama smrzavanja i odmrzavanja



Grafikon 2. Grafički prikaz održivosti razblažene kulture *Lb. acidophilus* pri različitim temperaturama smrzavanja i odmrzavanja

Smrzavanjem kultura u različitom volumenu utvrđeno je da veći procenat bakterija propada pri smrzavanju volumena većih od 1 ml. Taj podatak je veoma značajan za praksu, jer obavezuje na pripremu malih zapremina smrznutih kultura.

Podaci iz literature i naši rezultati pokazuju da pri smrzavanju kultura ima nekih problema. Međutim, rad na tome svrsishodan je jer se postiže upotreba kultura sa tačno utvrđenim osobinama, što omogućava bolje planiranje proizvodnje i sigurniji ishod te proizvodnje. Sama priprema takvih kultura u razrađenom sistemu manje je teška i može da se odvija bez nepredviđenih problema koji su u uobičajenim uslovima priprema kultura uvek mogući.

Zaključak

1. Upotreba smrznutih kultura bakterija mlečne kiseline za mlekarsku industriju omogućava proizvodnju sa biološki aktivnim starterima.

2. Procenat preživelih bakterija posle smrzavanja zavisi od vrste bakterija, koncentracije bakterija u jedinici zapremine i volumena sredine u kojoj se bakterije smrzavaju. Uticaj navedenih činilaca mnogo se manje ispoljava pri smrzavanju na -196°C nego pri smrzavanju na višim temperaturama.

3. Smrzavanje kultura mora da se zasniva na prethodno utvrđenim osobinama bakterija i uslovima smrzavanja.

THE QUALITY OF BACTERIAL CULTURES AND CONDITIONS OF PRESERVING THEIR ACTIVITY SUMMARY

Data indicate that the quality of lactic acid bacteria is an important factor in the production of yoghurt and other fermenting products. It was proved that the quality of the culture can be preserved when frozen at -196°C . The concentration of bacteria, the volume of bacterial suspension, individual resistance of the strain and other factors, affect the activity of the cultures after freezing. Therefore all these factors must be considered before freezing. Frozen cultures can be used directly in the production. Their use ensures the standardization of production as well as its planning, which is of great importance for the dairy industry.

L i t e r a t u r a

1. Accolas, J. P., Auclair, J.: XIII Int. Congress of refrigeration, Washington, DC 971—974, Vol. 3, 1971.
2. Accolas, J. P., Auclair, J.: *Le Lait* 47 (253—260), 1967.
3. Cowman R. A., Speck M. L.: *J. Dairy Sci.* 48, 1531—1532, 1965.
4. Epstein, I., Cogan, U., Calmenovic, B.: XX Int. Congr. Paris, 1018, 1978.
5. Georgala, D. L., Hurst, A.: *J. Appl. Bact.* 26 346—358, 1963.
6. Gilliland, S. E.: *Journal of Dairy Sci.* 60 (5) 805—809, 1977.
7. Jansen, D. W., Busta, F. S.: *Appl. Microbiol.*, 26 (5) 725—732, 1978.
8. Miljković Višeslava, Baltić, M.: *Mljekarstvo*, 29 30—36, 1979.
9. Pettersson, M. E.: *Appl. Microbiol.* 133—140, 1975.
10. Smittle, R. B., Gilliland, S. E., Speck, M. L.: Walter, W. M. *Appl. Microbiol.* 738—743, 1974.
11. Smittle, R. B., Gilliland, S. E., Speck, M. L.: *Appl. Microbiol.* 551—554, 1972.
12. Ray, B., Speck, M. L.: *Appl. Microbiol.* 25 (4), 449—503, 1973.