

6. DOZET N., STANIŠIĆ M., PARIJEZ S., SUMENIĆ S.: Sastav, kvaliteta i proizvodnja mlijeka na brdsko-planinskom području, Jajce 2—4 X 1974.
7. HALL C. W., HADRICK T. I.: Drying milk and milk products, The Avi publishing company, inc. Westport, Connecticut 1966.
8. INIHOV G. E.: Biohemija mloka i moločnih produkta, Moskva 1962.
9. JEŽIĆ J., ZDANOVSKI N.: Osvrt na proizvodnju i kvalitet mlijeka u NR BiH, **Veterinaria II**, 1953.
10. JACQUET J., THEVENOT R.: Le Lait et le froid, Paris
11. LING E.: Hemija mlijeka i mlečnih proizvoda, Beograd 1948. (149)
12. MLETIĆ S.: Varijacije količine suhe tvari, bjelančevina, pepela, kalcija i fosfora u pasteriziranom mlijeku, IV jugoslavenski kongres o ishrani, Ohrid aprila 1975.
13. NIKOLIĆ D., BILIĆ L.: Kvalitet mlijeka sa brdsko-planinskog područja sarajevskog regiona, **Mljekarstvo 25** (1) 1975.
14. PEJIĆ O., STEFANOVIĆ R., ĐORĐEVIĆ J.: Kretanje suhe materije mleka domaćeg simentalca u toku 3 potpune laktacije, **Zbornik radova Poljoprivrednog fakulteta, III**, sv. 2, Beograd 1955.
15. Službeni list SFRJ, jula 30. 1970.
16. SUMENIĆ S.: Ispitivanje hemijskog kvaliteta mlijeka sarajevskog područja, **Mljekarstvo 22** (7) 1972.
17. VASIĆ J.: Promjene nekih fizičkih i hemijskih osobina mlijeka u toku laktacionog perioda, **Radovi Poljoprivrednog fakulteta 25** pod XXII, XXIII, Sarajevo, 1973—1974. g.

## PROUČAVANJE I IZBOR FAGOREZISTENTNIH ČISTIH KULTURA ZA INDUSTRIJSKU PRERADU MLIJEKA

Slavica ŠVIGAR-VARGA, dipl. ing., mr Ljerka KRŠEV  
ZM Mljekarsko poduzeće »Dukat«, Zagreb

### Uvod

Bakterije su nosioci ili domaćini određene vrste virusa, nazvanih fagima. Bakteriofagi su specifični u odnosu prema domaćinu i svaka bakterija može poslužiti kao nosilac jednog ili više faga. Svaka se bakterija može zaraziti, ako je osjetljiva na fag. Neke su bakterije genetski otporne radi smanjenja receptora na svojoj površini. Djelovanje faga na stanicu se očituje u primjeni njenih morfoloških i biokemijskih osobina, te djelomičnom ili potpunom lizom.

Uspješnu primjenu mikrobioloških kultura u industrijskoj preradi mlijeka, često spriječavaju fagi, koji dolaze u mlijeko kontaminacijom iz prirode. Problem bakteriofagije posebno je aktuelan i učestao kod mezofilnih streptokoka bakterija mlječne kiseline, koji ulaze u sastav kultura za maslac, fermentirano vrhnje i polutvrde sireve. Nisu pošteđene ni termofilne bakterije mlječne kiseline iz sastava kulture za jogurt i za tvrde sireve. Na upoznavanju i rješavanju tog problema u mljekarstvu, radili su mnogi autori kao Cox, Hunter, Meansvell, Nicols, (bakteriofagi mezofilnih streptokoka bakterija mlječne kiseline), Nelson, Whitehland (bakteriofagi termofilnih bakterija), Collins, Czulak, Naylor (1955) Craward, Galoway, (1962), Sandinic (1962), (o

poduzimanju mjera protiv incidenta od bakteriofaga i upotrebe fagorezistentnih kultura), Elliker (1951), Pearce i Lowrie (1971) Patter, Nelson, Reiter (1956) (o održavanju čistih kultura na podlogama koje inhibiraju rast bakteriofaga), Guylecrere (1975) i dr. Po preporuci nekih specijaliziranih laboratorija za proizvodnju čistih kultura (Corlin Marchall, Air Liquide, Institut za mljekarstvo Moskva i Centralna laboratorija Sofija) bitni postupci u poduzimanju mjera u borbi protiv infekcijskih bakteriofaga bakterija mlječne kiseline u laboratorijskim uslovima, kao i uslovima proizvodnje su slijedeći:

- kontrola izoliranih i nabavljenih adaptiranih sojeva bakterija mlječne kiseline iz sastava kombiniranih kultura na njihovu fagorezistentnost i lizogenost u svrhu mogućnosti selekcije odgovarajućih sojeva za pripremu aktivnih otpornih čistih kultura za proizvodnju,
- kontrola fagoosjetljivih sojeva bakterija mlječne kiseline u tehničkoj kulturi u uslovima tvornice,
- izolacija bakteriofaga bakterija mlječne kiseline u mlijeku i mlječnim proizvodima,
- izolacija faga u tvornici u svrhu pronalaženja izvora infekcije (zrak, sirutka, stepka, ambalaža, cijevna armatura, prostorije, paster, separator itd.),
- zaštita i uništavanje bakteriofaga i tehnička obrada, stroga higijena, kemijska dezinfekcija itd.

### **Rad laboratorija Zagrebačke mljekare na problemu borbe protiv bakteriofaga**

U proizvodnji fermentiranih proizvoda »Zagrebačke mljekare« u čijem zrenju učestvuju bakterije mlječne kiseline, sporadično je dolazilo do djelotvornog ili potpunog odsustva fermentacije mlijeka. Materijalne štete u tim slučajevima uvijek su velike i zato se moralo prići sistematskom otkrivanju svih inhibitornih supstanci, koje koče vrenje fermentiranih proizvoda. Konstantno se radilo na ispitivanju rezidua antibiotika, dezinficijensa, neutralizatora itd. u mlijeku. U ovom radu organičavamo se na područje bakteriofagije, jer su i prema našim istraživanjima i iskustvu od svih inhibitornih supstanci koje dolaze u mlijeku i mlječnim proizvodima fagi najopasniji i najmanje proučavani. U laboratoriju su proučavani fagi bakterija mlječne kiseline. Pošto je primjena polivalentnih kultura i konstantna rotacija sojeva u kulturama najuspješniji način borbe protiv faga, potrebno je da raspolažemo što većom zbirkom fagorezistentnih sojeva. U prvoj fazi našeg rada prešli smo na ispitivanje senzibiliteta naših izoliranih sojeva, kao i nabavljenih adaptiranih sojeva na fage mlječne kiseline u svrhu:

- eliminiranja osjetljivih sojeva iz kombinacija kultura,
- priprema kombiniranih kultura sa sojevima koji nemaju međusobnu vezu na fagoosjetljivost,
- pripreme programa rotacije ispitanih sojeva.

## Tipizacija faga

Fagi se međusobno razlikuju morfološki, serološki, po biokemijskoj aktivnosti, liziranju, razmnožavanju, latentnom periodu itd. Tipizacija faga daje mogućnost identifikacije sojeva na njihovu fagoosjetljivost.

### Termorezistentnost sojeva faga *Str. lactis-a*

Većina faga se pasterizacijom od 75—85°C/5' ubija, a neki preživljavaju 90°C/1', što ovisi o broju, sredini, vrsti faga, a preostali su znatno oslabljeni. Ukoliko ti preostali fagi dolaze u optimalne uvjete rasta, a virulentni su, dođe do njihovog djelovanja i do lize sojeva. U 1972—1973. godine u našem pogonu dolazilo je vrlo često u proizvodnji fermentiranog vrhnja do usporenog, neujednačenog ili sasvim prekinutog koaguliranja vrhnja, iako su svi uzorci pasteriziranog vrhnja bakteriološki bili uredni, kulture aktivne i isključeni drugi inhibitorni agensi. Nakon rigorozne kontrole pasterizacije vrhnja i povišenja temperature pasterizacije to se rjeđe događa.

Moguće je da je postojanje termorezistentnih sojeva faga streptokoka mlječne kiseline jedan od tih uzroka kao i mogućnost razmnožavanja preživjelih i oslabljenih faga u optimalnim uvjetima rasta (zrenja vrhnja).

### Dobivanje fagorezistentnih sekundarno izraslih kultura

Fagorezistentnost nije stalna karakteristika sojeva, a stalnim mijenjanjem raznih faktora, sredina, kao mutacije bakterija i faga, mijenja se to svojstvo. Dolazi do stvaranja novih vrsta faga na koje one više nisu fagorezistentne.

Razlikujemo nekoliko tipova fagorezistentnih sojeva koji se mogu upotrijebiti u sastavu kulture po principu rotacije. Zato je potrebna stalna rotacija različitih vrsta fagorezistentnih sojeva.

Sekundarno izolirane bakterije mogu se dobiti spontano i eksperimentalno nakon kontakta faga i stanice, nakon lize fagoosjetljivih sojeva.

Za naš laboratorij postalo je vrlo interesantno proučavanje i pokušaj upotrebe sekundarno izoliranih sojeva nastalih iz filtrata neuspjele proizvodnje fermentiranih proizvoda, naročito kad je 1975. godine došlo u našem pogonu do četverodnevne totalne inhibicije zrenja fermentiranog vrhnja i tehničke kulture. Kultura je bila nabavljena od jednog vanjskog dobavljača. Dobivanje, svojstva i upotreba sekundarno izoliranih sojeva opisani su u tabelama 7 i 8.

Radili smo po metodi izolacije po Apelmanu (MPA  $\mp$  %L). Istraživali smo sekundarno izolirane sojeve nakon potpune lize streptokoka mlječne kiseline iz proizvodnje vrhnja i neuspjele tehničke kulture. Također smo lizirali fagoosjetljive sojeve iz sastava naših kultura sa test-fagima tipa P, S, DL15A i I. Nakon njihove lize dobili smo 113 izraslih kolonija (sojeva) koji su na testu fagorezistencije bili rezistentni na ispitane fage, ali sa oslabljenom sposobnosti fermentiranja laktoze. Korekcijom tih sojeva sa K.E. i A.K. i vitaminima otklonjen je donekle taj nedostatak. Dosada se njihova

primjena u proizvodnji pokazala uspješnom. U fazi smo ispitivanja o dužini trajanja njihove fagorezistencije.

### Čiste kulture za proizvodnju jogurta

U proizvodnji jogurta u našoj mljekari obično se pojavljuju u proljeće i tokom ljeta nenormalne pojave tokom zrenja kao što su:

- zakašnjela koagulacija mlijeka 4—6—10 h.
- neujednačeno zrenje pojedinih šarži jogurta. Prvih dana ostane po koja šarža, a za par dana skoro sve čaše tekuće.
- nenormalan odnos štapića i streptokoka (dolazi do iščezavanja mezo-filnih streptokoka),
- dinamika razvoja kiseline opada

Kad smo isključili sve faktore koji bi mogli biti uzrokom tih pojava u proizvodnji preostalo je bilo samo još ispitivanje djelovanja faga. Pokušaj smo radili po metodi Braun-Linder. Sa filtratom jogurta, koji nije koagulirao, kroz Seitz filter cijepili smo mlijeko i dodali standardnu jogurtu kulturu. Kontrolni uzorak je bio bez filtrata. Tokom zrenja ispituje se stupanj SH i uzima mikroskopski razmaz da se prati odnos sojeva u kombiniranoj kulturi.

Komparativno praćenje evolucije razvoja sojeva STBB LbVR (iz naše zbirke) iz sastava simbiotične kulture za jogurt iz neuspjele proizvodnje jogurta izneseno je u tabeli 9.

### Metodika rada

Fagorezistentnost smo proučavali kontrolom biokemijske aktivnosti sojeva bez dodatka suspenzije odgovarajućeg test faga i sa dodatkom suspenzije u različitim koncentracijama na tekućim podlogama.

Za ispitivanje sojeva bakterija mlječne kiseline na fagorezistentnost sa test fagima nabavljenim iz stranih izvora, koristili smo materijal kako navodimo.

### Potreban materijal

- Test bakteriofag oznake Plovdiv 1, fag Str. lactis-a,
- Test soj (senzibilan) oznake L, Str. lactis
- Izvor kulture: Centralna laboratorija Sofija
- Test fag oznake Sliven, fag Str. cremoris-a
- Test soj (senzibilan) oznake, B, Str. cremoris
- Izvor kulture: C. I. Sofija
- Test fag oznake DL 15A, fag Str. diacetilactis
- Test soj (senzibilan), oznake 15A, Str. diacetilactis
- Izvor kulture: Carlin Marchall

### Podloge

- Tekuće podloge: HMB, APB,  $\mp$  1% L, LM i B Air Liquide (za obogaćivanje suspenzije faga, izolacija, ispitivanje fagorezistentnosti, određivanje titra)
  - Krute podloge: HMA, MPA  $\mp$  1% L, Lac kayagar sa 1,5 i 0,7% (izolacija, pročišćavanje faga i broj plakova)
- Metodika se sastoji iz slijedećih faza:

**Prethodna kontrola test faga** (liofiliziran ili u tekućoj podlozi) sa odgovarajućim test sojem na titar i broj plakova tj. faga.

**Određivanje titra.** Razređenja ispitivanog faga do  $10^{-6}$  zasiju se na gustu populaciju osjetljivog soja u tekućoj podlozi za razvoj faga (HMB, B). Inkubacija 16 h na  $30^{\circ}\text{C}$ .

Pozitivan fag — bistre epruvete — negativan fag — mutne epruvete. Titar pokazuje do kojeg razređenja je fag aktivan.

**Određivanje broja faga — plakovi:** Bistre epruvete iz razređenja zasiju se na gustu populaciju fagoosjetljivih bakterija na čvrstoj podlozi Mas-kay sa dvoslojnim agarom. Bistre zone koje nastaju zbog lize osjetljivih bakterija, nazvane plakovi, broje se, pomnože s razređenjem, te daju broj faga u jednom mililitru suspenzije.

Svaka čestica faga uzrokuje pojavu jednog plaka.

**Obogaćivanje test faga (suspenzije).** Često se fag nalazi u malim koncentracijama, zato ga je potrebno razmnožiti.

#### **Postupak:**

Sterilno mlijeko se cijepi sa suspenzijom test faga i senzibilnim sojem 16 h na  $32^{\circ}\text{C}$ . Zatim se obaraju bjelančevine sa 10% mlječne kiseline, naravna  $\text{pH} = 4,2$ , centrifugira (3000/10 min) i supernatant filtrira kroz Seitz filter (0,22). Određuje se titar i broj plakova na gore opisani način.

#### **Ispitivanje sojeva na fagorezistentnost**

Postupak: Ispitivani sojevi zasiju se na HMB  $\mp 1\%$  L i B podlogom s dodatkom obogaćene suspenzije faga u razređenju. Određuje se titar fagoosjetljivih sojeva, koji pokazuje do kojeg su razređenja fagi osjetljivi. Usporedo se ispituje stvaranje kiseline.

#### **Očitavanje rezultata**

Bistre epruvete — fagoosjetljivi sojevi

Mutne epruvete — fagorezistentni sojevi

Kod ispitivanja pod A i B test faga titar se kretao od  $10^{-6}$  do  $10^{-10}$ .

#### **Isolacija faga**

Sastoji se iz slijedećih postupaka:

- dokaz prisutnosti infekcije s fagima,
- obogaćivanje suspenzije faga,
- dobivanje i pohranjivanje faga,
- tipizacija.

Filtrat sumnjivog uzorka inokulira se u tekuću podlogu sa senzibilnim sojem i nakon inkubacije komparira zamućenje i bistrenje uzoraka s kontrolnim uzorkom bez filtrata.

Zamućenje — fag negativan

Bistra podloga — vjerojatno prisutan fag

Dobivena suspenzija faga iz bistrog uzorka gdje je zasijan sumnjiv filtrat mora se razmnožiti i pročistiti od staničnog materijala domaćina (centrifugiranje i filtriranje kroz Seitz filter višekratno). Što je veći broj čestica faga u 1 ml to je lakše njegovo otkrivanje. Dobivena suspenzija faga mora se ispitati na titar i broj plakova.

## Termorezistentnost faga

Ispitivali smo termorezistentnost izoliranih faga u našem pogonu u laboratorijskim uslovima tako da smo u sterilno mlijeko cijepili test fag i termički obradili u vodenoj kupelji na raznim temperaturama i trajanju. Rezultati su u tabeli 6.

## Tipizacija faga

Mi smo, vjerojatno, izolirali dva tipa faga iz sirutke nađene u cijevnoj armaturi sirane, jer se po svojim morfološkim osobinama i brzini razlikuju. Djelovanje tih faga dokazali smo u njihovoj sposobnosti liziranja jednog soja iz naše kolekcije sojeva i stvaranje plakova na tvrdoj podlozi, test soja i ispitivanog soja. Karakteristike izoliranih bakteriofaga opisane su u tabeli 5.

## Rezultati istraživanja

Tabela 1.

**Fagorezistencija mezofilnih streptokoka iz polivalentnih kultura za fermentaciju kiselog vrhnja protiv test — faga Plovdiv 1 u HMB + 1% laktose (16h/32°C)**

Ispitivani sojevi	Vrsta	Temp. i trajanje inkub.	Kontrola zrenja fag	Kulture + test bakteriofag Plovdiv 1 u razr.					
				10-1	10-2	10-3	10-4	10-5	10-6
90 <sub>5</sub>	St. l.		+	+	+	+	+	+	+
Z <sub>3</sub>	St. l.		+	+	+	+	+	+	+
SB <sub>6</sub>	St. l.		+	+	+	+	+	+	+
404	St. l.		+	—	+	+	+	+	+
ST(M)	St. l.	15—16h	+	—	+	+	+	+	+
399	St. l.	30°C	+	—	—	—	—	—	+
314 <sub>1</sub>	St. l.		+	+	+	+	+	+	+
313	St. l.		+	—	+	+	+	+	+
70c	St. l.		+	—	—	—	—	—	+
S22	Str. diacet.	25°C	+	—	—	—	—	+	+

u β — tekućoj podlozi

90 <sub>5</sub>			+	+	+	+	+	+	+
Z <sub>3</sub>			+	+	+	+	+	+	+
SB <sub>6</sub>			+	+	+	+	+	+	+
404		15—16h	+	—	—	+	+	+	—
ST(M)		30°C	+	—	+	+	+	+	+
399			+	—	—	—	—	—	—
314 <sub>1</sub>			+	+	+	+	+	+	+
313			+	—	+	+	+	+	+
70c			+	—	—	—	—	—	—
S22		25°C	+	—	—	—	—	—	+

Tabela 2.

Bakteriofag titar i dinamika stvaranja kiseline u mlijeku cijepjenom sa test sojevima + test-fagom Plovdiv 1, i kontrolnih uzoraka

Ispitivani soj	Titar u HMB	Mlijeko + test soj + test fag	Mlijeko + test soj + test fag	Titar u $\beta$ -podlozi	Mlijeko + test soj + test fag	Mlijeko + test soj
		SH <sup>0</sup>	SH <sup>0</sup>		SH <sup>0</sup>	SH <sup>0</sup>
90 <sub>s</sub>	∅	37	38,5	∅	36,8	38,5
Z <sub>3</sub>	∅	38	39,0	∅	38,0	39,0
SB <sub>6</sub>	∅	35,5	36,4	∅	35,5	36,4
404	10 <sup>-1</sup>	38,5	40,0	10 <sup>-2</sup>	37,5	40,0
ST(M)	10 <sup>-1</sup>	34,5	36,0	10 <sup>-1</sup>	33,2	36,0
399	10 <sup>-5</sup>	27,3	37,0	10 <sup>-6</sup>	26,5	37,0
314 <sub>i</sub>	∅	40,5	41,5	∅	40,0	41,5
313	10 <sup>-1</sup>	36,2	38,8	10 <sup>-2</sup>	36,5	38,8
70c	10 <sup>-5</sup>	26,4	34,0	10 <sup>-6</sup>	25,0	34
S <sub>22</sub>	10 <sup>-4</sup>	20,5	28,0	10 <sup>-5</sup>	19,5	28
	16			12		

Ukupno 10 sojeva:

3 soja fagoosjetljiva  
7 sojeva fagorezistentnih

Tabela 3.

Fagorezistencija sojeva bakt. mlječne kiseline iz polivalentnih kultura za fermentaciju kiselog vrhnja. Test fag Sliven u HMB + 1% L

Oznake ispitivanih sojeva	Vrste	Temp. i trajanja inkubac.	Kontrola rasta soja (-) FAG	Kultura + test — Fag Sliven u razređenju					
				10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
70c	Str.		+	—	—	—	—	—	+
24 v 18	crem.	15—16h	+	+	+	+	+	+	+
F <sub>6</sub>	Str.	30°C	+	+	+	+	+	+	+
S <sub>22</sub>	diacet.	25°C	+	—	—	—	+	+	+
399	Str. l.	30°C	+	—	—	—	+	+	+
					12,3				
u $\beta$ podlozi									
70c				—	—	—	—	—	—
24 v 18				+	+	+	+	+	+
F <sub>6</sub>				+	+	+	+	+	+
S <sub>22</sub>				—	—	—	—	+	+
399				—	—	—	—	+	+

Tabela 3a

Bakteriofag titar ispitivanih kultura postignuti °SH nastalih fermentacijom mlijeka + test soj, sa i bez faga Sliven

Oznaka ispitivanog soja	Titar u HMB	Mlijeko + test soj + test fag °SH	Kontrola	Titar u $\beta$ -podlozi	Mlijeko + test soj + test fag °SH	Kontrola °SH
70c	10 <sup>-5</sup>	16,0 <sup>0</sup>	34 <sup>0</sup>	10 <sup>-6</sup>	15,0 <sup>0</sup>	34 <sup>0</sup>
24 v 18	∅	35,5 <sup>0</sup>	36 <sup>0</sup>	∅	35,5 <sup>0</sup>	36 <sup>0</sup>
F <sub>6</sub>	∅	38,0 <sup>0</sup>	39 <sup>0</sup>	∅	38,0 <sup>0</sup>	39 <sup>0</sup>
S <sub>22</sub>	10 <sup>-3</sup>	22,4 <sup>0</sup>	28 <sup>0</sup>	10 <sup>-4</sup>	21,2 <sup>0</sup>	28 <sup>0</sup>
399	10 <sup>-3</sup>	28,0 <sup>0</sup>	37, <sup>0</sup>	10 <sup>-4</sup>	27,5 <sup>0</sup>	37 <sup>0</sup>
	16			11,5		

Tabela 4.

## Izražena multisenzibilnost sojeva bakterija mlječne kiseline

Oznake sojeva	Vrsta	Temp. i trajanje inkub.	Kontrola rasta soja — fag	Ispitivani sojevi + test fagi Plovdiv 1. Sliven DL15 u razređenju podloga																	
				10 <sup>-1</sup>			10 <sup>-2</sup>			10 <sup>-3</sup>			10 <sup>-4</sup>			10 <sup>-5</sup>			10 <sup>-6</sup>		
				Bakteriof.			Bakteriof.			Bakteriof.			Bakteriof.			Bakteriof.			Bakteriof.		
				P	S	D	P	S	D	P	S	D	P	S	D	P	S	D	P	S	D
70c			+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+
24 18	Str.	15—16h	+	+	—	—	+	+	—	+	+	—	+	+	—	+	+	—	+	+	—
F <sub>6</sub>	crem.	30°C	+	+	+	—	+	+	—	+	+	—	+	+	—	+	+	—	+	+	—
S <sub>22</sub>	Str. diac.	25°C	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	+	+	—
399			+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	+	—
404	Str.	30°C	+	—	—	—	—	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+	—	+	+	—
313	l.		+	—	—	—	—	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+	—	+	+	—

## Zbirni rezultati ispitivanja fagorezistentnih i fagoosjetljivih sojeva mezofilnih streptokoka bakt. mlječne kiseline 12 sastava kombiniranih kultura za vrhnje

Broj ispitivanih sojeva	Broj fago-rez.	%	Broj fago-osjet.	%	Broj fago-osjet. na 1 fag	%	Broj fago-osjet. na više faga	%
12	9	75	3	25	Ø	Ø	3	100

(nastavit će se)