

# JEDNOSTAVNA I BRZA METODA ZA USTANOVJAVANJE I DOKAZIVANJE BAKTERIOFAGA KULTURE STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS

Dr Marijana CARIĆ, Dragoljub GAVARIĆ dipl. ing., Spasenija MARIĆ dipl. ing. Tehnološki fakultet, Novi Sad, Jovan ZEC dipl. ing. Mlekara »Odžačanka«, PPK, Odžaci

## Uvod

Za proizvodnju fermentisanih mlečnih napitaka koriste se čiste ili mešane kulture *Streptococcus* i *Lactobacillus*. Navedene bakterije transformišu pod anaerobnim uslovima laktozu u mlečnu kiselinu kao glavni proizvod ovog biohemijskog procesa. Nastala mlečna kiselina reaguje sa kalcijumom iz kalcijum-kazeinatno-kalcijum-fosfatnog kompleksa stvarajući laktate, čime prouzrokuje destabilizaciju kazeina pri  $\text{pH} = 5.3$  i nastajanje gela (pri  $\text{pH} = 2.3-4.6$ ). U svetu postoji veliki broj različitih vrsta fermentisanih mlečnih proizvoda: jogurt, acidofilno mleko, kefir, kumis, Taette, Y-mer, Cultured Buttermilk, Bugarska mlaćenica, leben, macun i drugi. Jogurt se u novije vreme (Puhan et al., 1973) proizvodi i kao trajan proizvod, pasterezovan ili sterilizovan, pri čemu su osnovne razlike u odnosu na klasičan jogurt: aseptični uslovi procesa i dodavanje hidrokoloida u cilju boljeg vezivanja vode.

U našoj zemlji se od svih pomenutih fermentisanih proizvoda najviše proizvodi jogurt, u tečnom ili čvrstom stanju, uz upotrebu mešane kulture bakterija *Lactobacillus bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus* u odnosu 1:1. U mnogim našim mlekarama povremeno, a nekad veoma uporno, dolazi do inhibiranja kiselomlečne fermentacije, što prouzrokuje neželjene gubitke u proizvodnji. Inhibiciju prouzrokuju različite inhibitorne materije bakteriostatskog ili baktericidnog dejstva, koje potiču iz tela životinje (i izlučuju se zajedno sa mlekom) ili iz spoljašnje sredine. Osnovni inhibitori poreklom iz organizma životinje su: prirodni baktericidi, lekovi (antibiotici, sulfopreparati, i dr.) pesticidi, mikotoksini i dr. Inhibitorne materije koje potiču iz spoljne sredine su: deterdženti i dezinficijensi, konzervansi i bakteriofagi (Bach, 1968). U ispitivanom slučaju je eksperimentima navedenim u radu ustanovljena inhibicija bakteriofagom te ćemo posebno razmotriti ovaj vid inhibicije.

Postoje dva osnovna tipa bakteriofaga, virusa koji napada živu bakterijsku ćeliju: litični i lizogeni. U slučaju litičnog odnosa faga i bakterijske ćelije dolazi do brzog umnožavanja faga u napadnutoj ćeliji (zato se naziva virulentni fag) i do oslobađanja velikog broja novih faga prilikom lize bakterijske ćelije. Lizogeni odnos faga i bakterije ne dovodi do lize ćelije, fag živi u ćeliji i prenosi se njenom deobom na nove generacije, te se naziva avirulentni ili umereni fag (Pelczar et al. 1977).

Virulentni fag se umnožava na bakterijama kroz sledeće četiri faze: absorpcija faga na površini bakterijske ćelije, intenzivno umnožavanje, latentni period i liza ćelije (Collins, 1962). Step en adsorpcije zavisi od stanja mikroorganizama, sastava sredine i temperature. Znatno veći broj faga se

adsorbuje na ćelije koje se razmnožavaju, nego na ćelije stare bakterijske kulture. Stvaranje sluzi i kapsula kod nekih vrsta bakterija ometa adsorpciju. Određene koncentracije nekih jona ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Li}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ) i izvesni organski kofaktori (npr: L-triptofan) potpomažu adsorpciju. Adsorpcija i ceo proces umnožavanja faga usporava se sniženjem temperature (Radojčević, 1975). Adsorpcija faga je uslovljena afinitetom receptora u omotaču bakterijske ćelije sastavljenih najčešće iz lipopolisaharida, prema određenim hemijskim grupama smeštenim na kraju repa ili u fibrilama faga. Afinitet bakteriofaga je strogo specifičan: ispoljava se samo za određenu vrstu, ili čak soj bakterija. Neposredno posle adsorpcije u bakterijsku ćeliju fag nestaje kao infektivna čestica (ova pojava se naziva eklipsa). Kratko vreme nakon toga u bakteriji se mogu videti oblici, nezreli prethodnici faga, koji se razlikuju od zrelog faga. Eksperimentalno je ustanovljeno da ovi prethodnici faga nisu infektivni: posle veštačkog oslobađanja iz ćelije ne mogu da se adsorbuju na novu ćeliju. Profagi u bakterijskoj ćeliji dalje sazrevaju, da bi se sa izvršenim hemijskim promenama i pojavom repa završio njihov intracelularni razvoj. Lizom ćelije oslobađaju se zreli fagi, sposobni da napadaju druge bakterijske ćelije.

Mehanizam delovanja faga sastoji se u tome da fagi ubacuju svoju nukleinsku kiselinu kroz centralni cilindar repa zahvaljujući kontrakcijama proteinskih prstenova. Količina bakterijske DNK počinje da se smanjuje, dok se količina DNK faga povećava. Pošto DNK bakterijske ćelije izgubi i svoju funkciju, DNK faga odmah stimuliše sintezu nove RNK (messenger RNK) koja ima informacionu ulogu u sintezi novih belančevina. Ove belančevine, nastale u početku, ne ulaze u sastav faga, nego su uglavnom enzimi koji učestvuju u sintezi nove DNK faga. Kada se završi sinteza nove DNK faga, vrši se sinteza belančevina koje ulaze u sastav faga, a preostaje aktivnost novosintetisanih enzima koji su učestvovali u nastajanju DNK faga (Radojčević, 1975). Sintetisana nukleinska kiselina mnogobrojnih novonastalih faga oslobođenih zatim lizom ćelije vodi poreklo od one koja je dospela u bakterijsku ćeliju kroz rep faga, i u znatno većoj meri od komponenata razgrađenih bakterijskih nukleinskih kiselina. Poslednja etapa u razvoju i delovanju faga je liza ćelije, gde enzim lizocim, sintetisan zahvaljujući genetskoj informaciji faga, razlaže mukopeptide bakterijskog ćelijskog zida.

Pojava da bakterijsku ćeliju napadne dva ili više faga istovremeno, različitih po morfološkim, antigenskim i drugim osobinama, naziva se mešana infekcija. U takvim slučajevima može da dođe do »uzajamnog isključenja«, gde jedan fag potiskuje drugog, ili ako se radi o mešanoj infekciji srodnim fagima može doći do uporednog razvoja obe vrste faga, ili do rekombinacije gena dvaju faga. Bakteriofagi mogu da vrše i kondukciju gena sa jedne bakterijske vrste na drugu ukoliko ih uzastopno napadnu, i druga bakterijska vrsta preživi napad faga.

Delovanje bakteriofaga na jednolančanu kulturu *S. lactis* je upravo drastično: bakterije se umnožavanjem udvostruče po broju za oko 45 min., a fagi se za isti vremenski period 100-struko umnože. Kultura inficirana aktivnim fagom posle 2—3 časa (što zavisi od aktivnosti kulture, količine inokuluma, temperature inkubacije, itd.) podleže masovnoj lizi, te se kiselost više ne povećava. Koagulacija može da se pojavi nastankom mutanata otpornih na fage, što zahteva produženu inkubaciju (15—25h) (Collins, 1962). Delovanje bakteriofaga na kulturu mešanog lanca zavisi pre svega od udela osetljivih

bakterija, tako da kada je broj osetljivih bakterija manji od polovine ukupnog broja uticaj faga će biti jedva primetan (Collins, 1955). Spektar dejstva faga (Evans, 1934) *S. lactis* varira dakle od: bez aktivnosti, preko »nascent« efekta i varijacija koje zavise od domaćina, do pune aktivnosti. Prema najnovijim podacima dimenzije faga kulture *S. lactis* C2 su: prečnik glave 58 nm, dužina repa 225 nm, a širina 10 nm, i vidljivi su u polju elektronskog mikroskopa (Huggins, Sandine, 1977). Bakteriofage su uopšte uzev otpornije na delovanje hemijskih i fizičko-hemijskih agenasa od njihovih domaćina.

Izvori infekcije faga u mlekari mogu biti različiti (Švigir—Kršev, 1977): mleko, lizogena kultura, inficirana kultura, nedezinfikovani uređaji u procesu, vazduh, odelenje za proizvodnju sira, itd. U svrhu zaštite proizvodnje od bakteriofaga preporučuje se preduzimanje strogih sanitarnih mera, kako bi se izbegla kontaminacija, a rotacija kulture i primena fagorezistentnih kultura u slučaju pojave faga.

### Metodika istraživanja

**Snimanje tehnološkog procesa.** Snimljen je tehnološki proces proizvodnje tečnog i čvrstog jogurta u mlekari.

**Ispitivanje inhibicije fermentacije.** Ispitivanje inhibicije fermentacije vršeno je biotestom (Kotterer, Münch, 1972) a kiselost je određivana metodom po Thörner-u (Pejić, Đorđević, 1972).

U ispitivanjima delovanja uzročnika inhibicije korišćene su komercijalne kulture: *S. thermophilus* i *L. bulgaricus*, 1:1 INSTITUT PO MLEČNA PROMIŠLENOST. VIDIN; *S. thermophilus* i *L. bulgaricus*, 1:1, FLORA DANICA, ODENSE; kao i mikrobiološka kultura. *S. thermophilus* *L. bulgaricus*, 1:1 CHR. HANSEN'S LABORATORIUM A/S, koja se u pogonu upotrebljava za industrijsku proizvodnju kiselomlečnih proizvoda.

Kontrola inhibitora u pogonu sprovedena je uzimanjem briseva (Žakula, Todorović, 1969) sa duplikatora, zida pored duplikatora i ispitivanjem inhibitorynog delovanja otpadne vode sa poda mlekare.

**Dokazivanje prisustva bakteriofaga:** Prisustvo bakteriofaga dokazano je na tri sledeća jednostavna načina:

1) Dodavanje mleka u kome je inhibirana fermentacija. Mleku koje je prethodno provereno biotestom dodato je 1% mleka iz duplikatora kod koga je fermentacija inhibirana, i 2% kulture *S. thermophilus*: *L. bulgaricus* = 1:1 Hansen. Tokom inkubiranja od 4 časa na  $t = 43^{\circ}\text{C}$  praćena je promena kiselosti merenjem po Thörner-u svakog sata (Eksperiment V). U novom eksperimentu (VI) dodato je 1% mleka iz prethodnog eksperimenta (razblaženje  $100 \times 100$  u odnosu na početno inhibitorno mleko), i 2% kulture. *S. thermophilus*: *L. Bulgaricus*, CHR. HANSEN'S LABORATORIUM A/S, COPENHAGEN. Navedena kultura je u daljem tekstu označena slovom D (Danska). Inkubirano je takođe 4 časa na  $t = 43^{\circ}\text{C}$  tokom kog vremena je ispitivana kiselost po Thörner-u svakog časa.

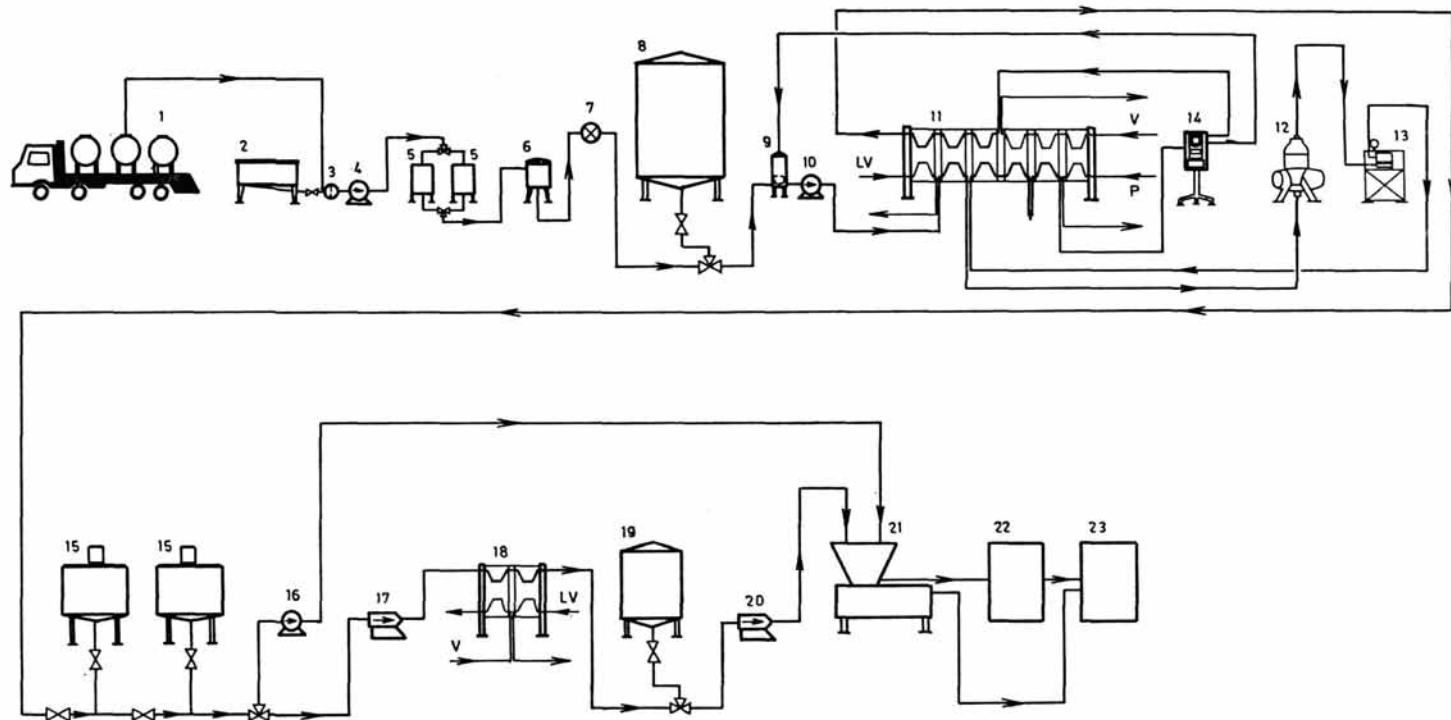
U ogledu VII, mleku koje je prethodno provereno biotestom dodato je 0.0, 0.5, 1.0 i 1.5% mleka kod koga je fermentacija inhibirana iz duplikatora i 2% kulture *S. thermophilus*: *L. bulgaricus* 1:1. D. Zatim je vršeno inkubiranje na temperaturi  $43^{\circ}\text{C}$ , pri čemu je ispitivana kiselost po Thörner-u svakog sata.

2) Primena različitih sojeva mikrobioloških kultura. U eksperimentu VIII je uzorcima mleka koje je prethodno provereno biotestom, dodato 1% inhibiranog mleka iz duplikatora i 2.5% komercijalne tehničke kulture raznih sojeva *S. thermophilus* i *L. bulgaricus*: (a) *S. thermophilus*: *L. bulgaricus* = 1:1, CHR. HANSEN'S LABORATORIUM A/S, COPENHAGEN; (b) *S. thermophilus*: *L. bulgaricus* = 1:1; INSTITUT PO MLEČNA PROMIŠLENOST, VIDIN; (c) *S. thermophilus*: *L. bulgaricus* = 1:1, FLORA DANICA, ODENSE. Prvu kulturu označili smo u daljem tekstu slovom D (Danska), drugu slovom B (Bugarska), a treću slovom F (Flora-Dan.). Sva tri uzorka i odgovarajući kontrolni (bez 1% inhibitora) inkubirana su na  $t = 43^{\circ}\text{C}$ , 4 časa, tokom kog vremena je ispitivana kiselost po Thörner-u svakog sata.

3) Eliminacija rastvorljivog kalcijuma dodatkom fosfata. Rastvorljivi kalcijum je eliminisan iz uzoraka mleka prevođenjem u nerastvoran oblik na sledeći način: uzorcima je dodata smesa rastvora primarnog i sekundarnog fosfata ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}:\text{Na}_2\text{HPO}_4 \rightarrow 3:2$ ,  $\text{pH} = 6.5$ ) u koncentracijama od 0.5, 1.0, i 2.0%, posle čega su podvrgnuti delovanju povišene temperature ( $t = 90\text{--}95^{\circ}\text{C}$ ) tokom 20—25 min. Uzorci su inokulisani kulturom osetljivom na bakteriofag: *S. thermophilus*: *L. bulgaricus* 1:1 (D), 2%, i mlekom kod koga je ustanovljena inhibicija (1%) i inkubirani na  $t = 43^{\circ}\text{C}$  tokom 3.5 h. Posle inkubacije pravljene su mikroskopski preparati bojeni metilenskim plavilom (Žakula, Todorović, 1969), koji su snimljeni pod mikroskopom pri uvećanju od 15x100.

### Rezultati i diskusija

Prikaz postrojenja za proizvodnju kiselomlečnih proizvoda nalazi se na Šemi 1. Mleko se dovodi u cisternama (1) na prijemnu rampu, gde se uzima uzorak za određivanje kiselosti, temperature, specifične težine, masti, antibiotika i za biotest. Mleko se pomoću centrifugalne pumpe (4) transportuje preko grubog (3) i finog filtra (5), deaeratora (6) i merača protoka (7) u tank za skladištenje svežeg mleka (8). Ono se zatim pumpom (10) preko balansnog tanka (9) i sekcije za regeneraciju toplote pasterizatora (11), potiskuje u separator (12) gde se vrši standardizacija mlečne masti na 3.2%, i u homogenizator (13), gde se homogenizuje pri pritisku od 180—200 ata. Pasterizacija se izvodi na  $t = 76^{\circ}\text{C}$ , u trajanju od 40 sec, sa hlađenjem na 5—8°C. Pasterizovano mleko se potom transportuje najčešće direktno u duplikator (15), gde se dodaje 1% obranog mleka u prahu, i vrši termička obrada na  $t = 95^{\circ}\text{C}$  tokom 20—30 min. Sledi hlađenje na temperaturu inokulacije (43°C) i inokulacija pripremljenom tehničkom kulturom *S. thermophilus*: *L. bulgaricus* = 1:1 (D) 2.5%. Kod proizvodnje tečnog jogurta inkubacija se izvodi u pomenutom duplikatoru (15) na 43°C do kiselosti od 37—38°SH, transportuje se monopumpom (17) preko hladnjaka (18) gde se ohladi na  $t = 8^{\circ}\text{C}$ , do rezervoara za jogurt (19). Monopumpa (20) potiskuje jogurt u mašinu za punjenje u čaše (21), koje se slažu i skladište (23) na  $t = 2\text{--}5^{\circ}\text{C}$  do distribucije. U proizvodnji čvrstog jogurta, razlivanje u čaše se vrši odmah posle inokulacije (15), tako da se inkubacija obavlja u termokomori (22).



Šema 1. ŠEMA POSTROJENJA ZA PROIZVODNJU KISELOMLEČNIH PROIZVODA

Fermentacija je u navedenom tehnološkom procesu bila povremeno inhibirana u periodu od februara do juna 1977 g. Imajući u vidu sve uzroke koji mogu inhibirati kiselomlečnu fermentaciju izvršili smo eksperimente koji treba da potvrde ili odbace pojedine uzroke inhibicije u konkretnom slučaju.

Prva grupa eksperimenata imala je za cilj da ustanovi da li se inhibitorna materija nalazi u mleku pri njegovom prijemu u mlekaru. Rezultati jednog od ovih oglada navedeni su u Tabeli 1. (Eksperiment I). Kod oglada iz ove grupe kiselost je u laboratorijskim uslovima rasla prema očekivanju, (od 18—104<sup>o</sup>T) dok u pogonu nije došlo do koagulacije mleka u razumnom vremenskom periodu (>5 h). Na ovaj način su eliminisani svi uzročnici inhibicije koji mogu poticati iz organizma životinje (prirodni baktericidi, antibiotici, sulfopreparati, pesticidi, mikotoksini i drugi inhibitori), odnosno pokazano je da u mleku prilikom ulaska u mlekaru nije bilo inhibitornih materija.

Obzirom da je mleko moglo da se inficira u mlekari za vreme prolaska kroz cevovode, pasterizator, separator, homogenizator i dr. druga grupa eksperimenata izvedena je sa ciljem da se proveri eventualno postojanje izvora infekcije u tehnološkoj liniji pre inokulacije. Rezultati jednog oglada iz ove grupe prikazani su takođe u Tabeli 1. (Eksperiment II.). I ovdje je u laboratorijskim uslovima kiselost rasla prema očekivanju, (20—106<sup>o</sup>T) kako se vidi iz Tabele 1., dok je fermentacija u pogonu bila inhibirana. Ovi rezultati su pokazali da se izvor infekcije inhibitorom ne nalazi u zatvorenom delu tehnološke linije za proizvodnju kiselomlečnih proizvoda.

Imajući u vidu da i tehnička kultura može biti nosilac inhibitorne materije izvedena je sledeća grupa eksperimenata, gde su uzorci mleka proverenog biotestom podvrgnuti delovanju tehničke kulture, koja je u pogonu korištena kada je dolazilo do inhibicije. Rezultati ovih eksperimenata pokazali su da je tehnička kultura u svim ispitivanim slučajevima u laboratorijskim uslovima dala željeni rezultat (Tabela 1. eksperiment III).

Brisevi uzeti sa duplikatora i zidova pogona nisu sadržavali inhibitorne materije.

Da bi ispitali postojanje inhibitornih materija u otpadnoj vodi na podu mlekare u sledećem eksperimentu (IV) uzorku mleka je pored korišćene tehničke kulture, dodato 1% vode sa poda. Rezultati, prikazani u Tabeli 2., ukazuju na intenzivnu inhibiciju kiselomlečne fermentacije otpadnom vodom sa poda, koja u koncentraciji od samo 1% sprečava koagulaciju u očekivanom vremenskom periodu. Iz dobijenih podataka (Tabela 2.) se vidi da je inhibicija naročito izražena posle 2—3 časa, (kiselost iznosi 46<sup>o</sup>T) što ukazuje na mogućnost prisustva aktivnog bakteriofaga, koji prema literaturi u navedenom vremenskom periodu izaziva masovnu lizu bakterijskih ćelija (Collins, 1962), sa zaustavljanjem porasta kiselosti.

Slede rezultati ispitivanja koji su imali za cilj da dokažu prisustvo bakteriofaga, kao inhibitora u mleku.

U eksperimentu V (Tabela 3.) mleku koje je prethodno provereno biotestom dodato je 1% mleka iz duplikatora kod koga je fermentacija inhibirana. Intenzivno inhibitorno dejstvo primećeno je i ovde posle 2—3 časa (maksimalna kiselost 61<sup>o</sup>T). U novom eksperimentu (VI) (Tabela 3.) 1% mleka uzetog iz prethodnog eksperimenta izazvao je ponovo inhibiciju (maksimalna kiselost



je u ovom ogledu čak niža i iznosi 43<sup>o</sup>T). Obzirom da je inhibiciju prouzrokovalo i razblaženje od 10.000 puta u odnosu na izvor inhibitora, na osnovu ovih rezultata može se sa sigurnošću zaključiti da se ne radi o hemijskom agensu kao inhibitoru, nego o živoj materiji koja se veoma brzo umnožava tj. o bakteriofagu.

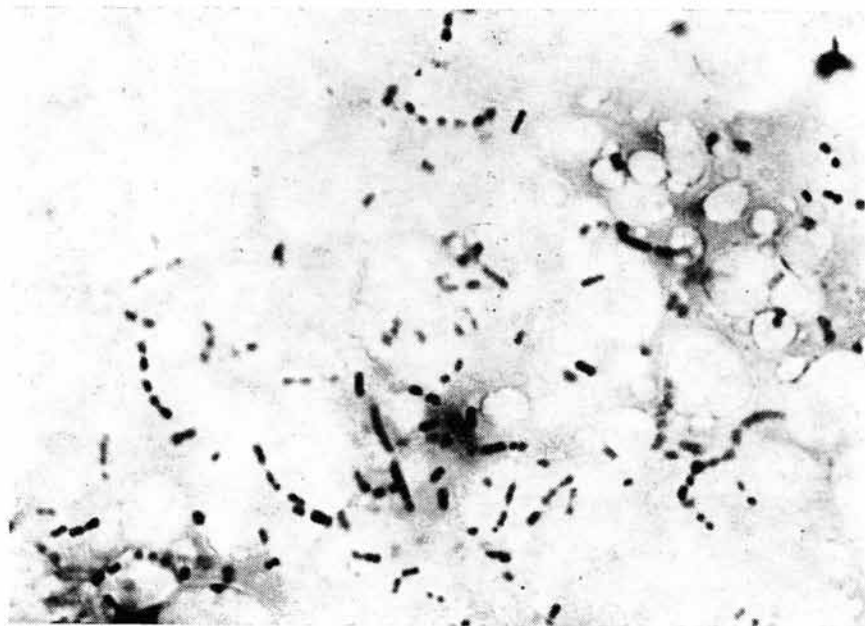
Sledeći ogledi, (VII) izvršeni uz dodatak 0.0, 0.5, 1.0 i 1.5% inhibiranog mleka iz duplikatora dali su iste rezultate: jednostruka, dvostruka i trostruka koncentracija inhibitora dovela je do približno iste inhibicije tokom 4 časa: 55—57<sup>o</sup>T (Tabela 4).

Pošto bakteriofag može da bude specifičan ne samo za određene vrste, nego i za sojeve mikroorganizama, u sledećoj grupi eksperimenata je kiselomlečna fermentacija izazivana raznim sojevima tehničke kulture *S. thermophilus* i *L. bulgaricus* u prisustvu inhibitora. Rezultati ovih eksperimenata (VIII) prikazani su u Tabeli 5. i pokazuju da se inhibitorno dejstvo ispoljava samo u slučaju primene *S. thermophilus*: *L. bulgaricus*, 1:1, D, koja se do sada upotrebljavala u mlekari za proizvodnju kiselomlečnih proizvoda. Činjenica



Slika br. 1

**Mikroskopski snimak uzorka inokulisanog kulturom osjetljivom na bakteriofag: *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* 1:1, D (2%) i mlekom kod koga je ustanovljena inhibicija (1%), inkubiranog bez fosfata na 43<sup>o</sup>C, 3.5 h (uvećanje je 15x100)**



Slika br. 2

**Mikroskopski snimak uzorka inokulisanog kulturom osjetljivom na bakteriofag: *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* 1:1, D (2%) i mlekom kod koga je ustanovljena inhibicija (1%), inkubiranog sa 0,5% fosfata na 43°C, 3,5 h (uvećanje je 15x100)**

da na druge ispitivane sojeve iste kulture inhibitor ne deluje, takođe potvrđuje pretpostavku da je u pitanju inhibicija bakteriofagom.

U sledećoj grupi eksperimenata (IX) dokazali smo na još jedan jednostavan način prisustvo bakteriofaga, koristeći literaturni podatak (Hargrove et al., 1961) da je fagu za umnožavanje neophodno prisustvo kalcijuma, u takvom obliku da ga može koristiti. Način kako je kalcijum iz mleka pomoću fosfata (0.0, 0.5 i 1.0%) preveden u nerastvoran oblik, objašnjen je u metodici rada. Mikroskopski preparati navedene serije uzoraka, koji su napravljeni i fotografisani posle inkubacije (Slika 1, 2 i 3.) očigledno predstavljaju streptokoke u poznatim fazama razvoja bakteriofaga. U uzorcima u kojima je kalcijum eliminisan (Sl. 2 i Sl. 3) vezivanjem u nerastvornu so sa fosfatima streptokoke su se nesmetano razvijale i ostale očuvane. Koncentracija fosfata od 0.5% izgleda nije dovoljna da potpuno ukloni kalcijum i onemogući delovanje faga obzirom da se primećuje izvestan broj deformisanih streptokoka (Sl. 2). Uzorak bez fosfata sadrži tipične oblike koji nastaju delovanjem lizozima faga: posle bubrenja i transformacije u loptaste oblike ćelije streptokoka bivaju lizirane i gube vidljive konture (Sl. 1.).





Slika br. 3

**Mikroskopski snimak uzorka inokulisanog kulturom osjetljivom na bakteriofag: *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* 1:1, D (2%) i mlekom kod koga je ustanovljena inhibicija (1%), inkubiranog sa 1% fosfata, na 43°C, 3.5 h (uvećanje je 15x100)**

### Z a k j u č a k

Na osnovu konkretnog slučaja koji je u ovom radu tretiran, posle eliminacije drugih uzročnika inhibicije kiselomlečne fermentacije došlo se do tri jednostavna načina za dokazivanje prisustva bakteriofaga u mleku:

— Dodavanje mleka u kome je inhibirana kiselomlečna fermentacija (u količini od 1%) mleku proverenom biotestom, i praćenje fermentacije posle inokulacije kulturom. Ponavljanje ovog postupka pri čemu je razblaženje u odnosu na izvor inhibicije 10.000 puta.

— Primena raznih sojeva mikrobioloških kultura za kiselomlečnu fermentaciju u prisustvu izvora inhibicije (1% mleka u kome je inhibirana fermentacija) i praćenje fermentacije.

— Eliminacija rastvorljivog kalcijuma dodatkom fosfata i praćenje kiselomlečne fermentacije u prisustvu izvora inhibicije (1% mleka u kome je inhibirana fermentacija).

Tabela 1.

**Promena kiselosti mleka u zavisnosti od vremena inkubacije sa kulturom *S. thermophilus* i *L. bulgaricus*, 1:1, D, 2<sup>o</sup>o.**

I. uzorak mleka uzet na prijemnoj rampi; II. uzorak termički tretiranog mleka uzet iz duplikatora pre inokulacije; III. uzorak mleka proverenog biotestom i tehnička kultura *S. thermophilus*: *L. bulgaricus*, 1:1, D, Mleko iz eksperimenta I. nije podleglo fermentaciji u pogonu.

Eksperiment (N <sup>o</sup> )	Kiselost (°T)				
	0	Vreme inkubacije (h)			4
		1	2	3	
I	18	31	58	88	104
II	20	29	63	87	106
III	19	24	50	75	94

Tabela 2.

**Promena kiselosti mleka u zavisnosti od vremena inkubacije sa kulturom *S. thermophilus* i *L. bulgaricus* 1:1, D, 2<sup>o</sup>o, sa 1<sup>o</sup>o otpadne vode sa poda mlekare. K-kontrola (bez 1<sup>o</sup>o otpadne vode).**

Eksperiment (N <sup>o</sup> )	Kiselost (°T)				
	0	Vreme inkubacije (h)			4
		1	2	3	
IV	19	24	34	41	46
K	19	25	50	83	92

Tabela 3.

**Promena kiselosti mleka u zavisnosti od vremena inkubacije sa kulturom *S. thermophilus*: *L. bulgaricus* 1:1, D, 2<sup>o</sup>o. V. sa 1<sup>o</sup>o inhibitornog mleka; VI. sa 1<sup>o</sup>o uzorka iz prethodne probe; K-kontrola.**

Eksperiment (N <sup>o</sup> )	Kiselost (°T)				
	0	Vreme inkubacije (h)			4
		1	2	3	
V	19	26	35	61	61
K	19	27	44	68	97
VI	18	23	27	30	43
K	18	25	34	77	91

Tabela 4.

**Promena kiselosti u zavisnosti od vremena inkubacije sa kulturom *S. thermophilus* i *L. bulgaricus* 1:1, D, 2<sup>o</sup>o, u prisustvu različitih koncentracija izvora inhibicije. (Eksperiment VII).**

Koncentracija izvora inhibicije (%)	Kiselost (°T)				
	0	Vreme inkubacije (h)			4
		1	2	3	
0.0	18	25	34	77	91
0.5	18	25	33	47	57
1.0	18	26	31	36	55
1.5	18	27	30	35	56

Tabela 5.

Promena kiselosti mleka u zavisnosti od vremena inkubacije raznim sojevima u prisustvu 1<sup>0</sup>/<sub>0</sub> inhibitora: *S. thermophilus*: *L. bulgaricus* 1:1, D, 2.5<sup>0</sup>/<sub>0</sub>; *S. thermophilus*: *L. bulgaricus* 1:1, B, 2.5<sup>0</sup>/<sub>0</sub>; *S. thermophilus*: *L. bulgaricus* 1:1, F, 2.5<sup>0</sup>/<sub>0</sub>; K — odgovarajući kontrolni uzorci. (Eksperimentat VIII).

Kultura	Kiselost (°T)				
	Vreme inkubacije (h)				
	0	1	2	3	4
<i>S. thermophilus</i> ,					
<i>L. bulgaricus</i> (D)	18	28	34	37	39
K	18	31	58	88	104
<i>S. thermophilus</i> ,					
<i>L. bulgaricus</i> (B)	18	30	55	89	107
K	18	29	55	89	106
<i>S. thermophilus</i> ,					
<i>L. bulgaricus</i> (F)	19	25	43	72	90
K	19	25	44	76	92

### Literatura

- BACH I, (1968): Pojavljivanje i otkrivanje inhibitornih tvari u mlijeku, **Mljekarstvo**, 20, 106—115.
- COLLINS, E. B. (1962): Behaviour and use of Lactic Streptococci and Their Bacteriophages, **J. Dairy Sci.**, 45, 552—558.
- COLLINS, E. B. (1955): Action of Bacteriophage on Mixed Strain Cultures; III. Strain Dominance Due to the Action of Bacteriophage and Variations in the Acid Production of Secondary Growth Bacteria; IV. Domination Among Strains of a Whey Activity Test for Culture Selection and Rotation; **Appl. Microbiology**, 3, 137—148.
- EVANS, A. C. (1934): Streptococcus Bacteriophages: A study of Four Serological Types, **U. S. Public Health Rept.**, 49, 1386.
- HARGROVE, R. E., McDONOUGH, F. E., TITSLER, R. P. (1961): Phosphate Heat Treatment of Milk to Prevent Bacteriophage Proliferation in Lactic Cultures, **J. Dairy Sci.**, 44, 1799.
- HUGGINS, A. R., SANDINE, W. E. (1977): Incidence and Properties of Temperate Bacteriophages Induced from Lactic Streptococci, **Appl. Microbiology**, 24, 184—191.
- KOTTERER, R., MÜNCH, S. (1972). **Untersuchungsverfahren für das milchwirtschaftliche Laboratorium**, Volkswirtschafts, Verlag GmbH., Kempten.
- PELCZAR, M. J. (1977): **Microbiology**, Mc Graw—Hill Book Company, New York.
- PUHAN, Z., BACHMAN, M., BLANC, B., CLAVADETSCHER, R. J., FRÖLICH, M., GLATTLI, H., WASSERFALL, F. (1973): Sauer Milchprodukte, Milchtechnisches Institut der Edig. Technischen Hochschule, Zürich.
- RADOJČEVIĆ, M., TRBIĆ, B., MIHAJLOVIĆ, B. (1975): **Mikrobiologija**, Zavod za izdavanje udžbenika SR Srbije, Beograd.
- ŠVIGIR—VARGA, S., KRŠEV, LJ. (1977): Proučavanje i izbor fagorezistentnih čistih kultura za industrijsku preradu mlijeka, **Mljekarstvo**, 27, 109—116, 126—132.
- ŽAKULA, R., TODORVIĆ, M., (1969): **Praktikum za vežbe iz mikrobiologije hrane sa higijenom proizvodnje**. Tehnološki fakultet, Novi Sad.

### SUMMARY

In the investigated case the lactic acid fermentation was inhibited in fermented milks production. After the experiments which have eliminated other possible reasons, it was proved in three simple ways that the bacteriophages caused the inhibition:

1) By adding milk where the lactic acid fermentation was inhibited (1%) to the milk first checked using bio-test, and controlling its fermentation after inoculation with the culture. This procedure was repeated, so that dilution of the inhibitory source was 10.000 times.

2) By using the three different strains of mixed microbiological culture (*S. thermophilus* and *L. bulgaricus*) for the lactic acid fermentation in the presence of the inhibitory source (1% milk where the fermentation was inhibited) and controlling the fermentation.

3) By elimination of  $\text{Ca}^{2+}$  from the solution bounding it with added phosphate and controlling the lactic acid fermentation in the presence of the inhibitory source (1% milk where the fermentation was inhibited).

## VARIJACIJE ENERGETSKE VRIJEDNOSTI PASTERIZIRANOG MLIJEKA

Prof. Silvija MILETIĆ, Poljoprivredni fakultet, Zagreb

Biološka, hranjiva i energetska vrijednost mlijeka osiguravaju tom specifičnom proizvodu mlječne žlijezde izuzetan položaj u prehrani ljudi, naročito djece.

Naša stručna literatura ne obiluje podacima o energetske vrijednosti mlijeka, posebno o energetske vrijednosti sastojaka mlijeka — bjelančevina i šećera.

Nastojeći da doprinesemo poznavanju energetske vrijednosti pasteriziranog mlijeka kojim se snabdijeva zagrebačko tržište izračunavali smo te vrijednosti na temelju naših podataka o sastavu pasteriziranog mlijeka iz godine 1974., 1975. i 1976. Osim toga izračunali smo i energetske vrijednosti uzoraka sirovog mlijeka koje se proizvodilo u PIK Đakovo godine 1974/75.

Istraživanja pasteriziranog mlijeka financiraju Savjet za naučni rad, odnosno SIZ-IV za znanstvena istraživanja SR Hrvatske i Sveučilište u Zagrebu.

### Metode rada

Količine bjelančevina u mlijeku određivali smo metodom Kjeldahl (Milchwissenschaft, 1963), količine masti metodom Gerber, i količine laktoze metodom Marier Boulet (Inihov i Brio, 1971), a energetske vrijednosti pojedinih sastojaka pomoću faktora koje su predložili Atwater i Bryant (Lampert, 1975), te faktora koje su za kravlje mlijeko predložili Southgate i Barrett (1966).

### Rezultati analiza

Rezultate analiza i izračunavanja energetske vrijednosti mlijeka prikazuju tabele 1. i 2.

### Diskusija i zaključak

Podaci koje navode autori za energetske vrijednosti mlijeka kreću se unutar granica 61,2 do 68,3 cal/100 ml mlijeka. Kao vrijednosti (energetske) bje-