

IZBOR KULTURA S ANTIMIKROBNIM SVOJSTVIMA ZA PROIZVODNJU FERMENTISANIH NAPITAKA

Dr. Stojanka MITIĆ, Institut za mlekarstvo, Novi Beograd, dipl. ing.
Stanimirka VIDENOVIC i dipl. ing. Ranko JOVIC, IMPAZ — ZAJEČAR

Za proizvodnju fermentisanih proizvoda upotrebljava se asocijacija sojeva *Lactobacillus bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*, kod kojih nisu dovoljno definisane metaboličke sposobnosti pojedinih sojeva. Danas se koriste čisti sojevi bakterija mlečne kiseline sa poznatim biohemijskim karakteristikama naročito u pogledu brzine stvaranja aciditeta, acetaldehida, viskoziteta, evolucije aciditeta na niskim temperaturama (Boullanne et Desmazeaud, 1980). Pette je (1964) utvrdio da postoje interesantne karakteristike sa tehnološkog aspekta koje variraju u zavisnosti od soja u okviru iste vrste. Novija istraživanja Hemme i sar. (1980) su usmerena u cilju selekcije sojeva sa izraženim enzimatskim osobinama koji proizvodu daje blaži ukus i aromu, te gušću i homogenu konzistenciju.

Međutim, sve se više oseća potreba da se primenjuju čisti sojevi bakterija sa antimikrobnim svojstvima prema patogenim i uslovno patogenim bakterijama. Napredak bakteriologije je omogućio uvid u fenomen antagonizma pojedinih bakterija. Antagonizam o kome je reč zasniva se na sposobnosti određenih bakterija da stvore brojne supstancije biološkog porekla koje ometaju životnu aktivnost drugih bakterija. Ovaj biološki fenomen je nazvan antibioza, a za ove supstancije Waksman je predložio naziv antibiotik. Već je davno poznato da termofilni laktobacili stvaraju antimikrobne metabolite *in vitro* prema većem broju patogenih i saprofitnih bakterija (Vincent i sar. 1959, Deklerk i sar. 1961, Tacquet i sar. 1961, Katrandžiev, 1962, Mitić i sar. 1973, Shahami i sar. 1976, Sing i sar. 1979, Rubin i Venghan 1979, Amster i Jonst 1980. i dr.) i time potvrđeno postojanje antibiotskih materija širokog spektra. Pojedinačno saznanje o elementima biološkog fenomena da pojedini sojevi laktobacila ometaju životnu aktivnost drugih nepoželjenih bakterija postepeno se uobličava u celovito shvatanje o razmerama ovog fenomena i mogućnostima da se veliki biološki prirodni potencijal koristi na nivou praktične industrijske proizvodnje fermentisanih proizvoda. Na osnovu ovih saznanja bilo je od interesa da ispitamo mogućnost dobijanja sinhronizovane kulture *Lactobacillus bulgaricus* sa izraženim antimikrobnim karakteristikama i *Streptococcus thermophilus* i utvrdimo njihovu tehnološku vrednost uz istovremeno praćenje toka tehnoloških operacija i ocenjivanje kvaliteta dobijenog proizvoda.

Materijal i metodika

Tehnološka provera kulture *L. bulgaricus* i *S. thermophilus* za izradu fermentativnih proizvoda vršena je u mlekari IMPAZ u Zaječaru. Sojevi su poticali iz autohtone mikroflore kiselog mleka sa područja Cetinja. Za otkrivanje antimikrobnog spektra *L. bulgaricus* korišten je postupak dilucije u agaru Mueller-Hinton, primenjujući pri tome 50,75 i 100 mcg native aktivne

supstancije filtera kulture gajene u sterilno obrano mleko 48 sati na 44°C. Analizirana je osetljivost in vitro 138 patogenih sojeva izolovanih iz različitog bolesničkog materijala i iz životnih namirnica, (25 sojeva *Staphylococcus aureus*, 75 sojeva vrsta *Escherichia coli*, 17 sojeva vrsta *Pseudomonas*, 10 sojeva vrsta *Proteus*, 5 sojeva *Shigella*, 3 soja *Salmonella* i 3 soja *Klebsiella*). Kao standardni sojevi uključeni su tri soja američke kolekcije bakterijskih kultura: *Staphylococcus aureus* ATCC 2592³, *Escherichia coli* ATCC 25922 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Priprema inokuluma za zasejavanje test bakterija izvodila se u Mueller-Hinton bujonu, prema postupku WHO (RS) 76—1129. Inkubacija zasejanog materijala izvodila se na 37°C u vremenu od 3 sata. Iz zamućenog bujona ezom se prenosio materijal na pripremljen Mueller-Hinton agar sa određenom koncentracijom filtrata laktobacila. Posle 18 časova inkubacije na 37°C vršeno je čitanje baktericidnog delovanja. Interpretacija rezultata je vršena na osnovu određivanja submaksimalne i minimalne inhibitorne koncentracije.

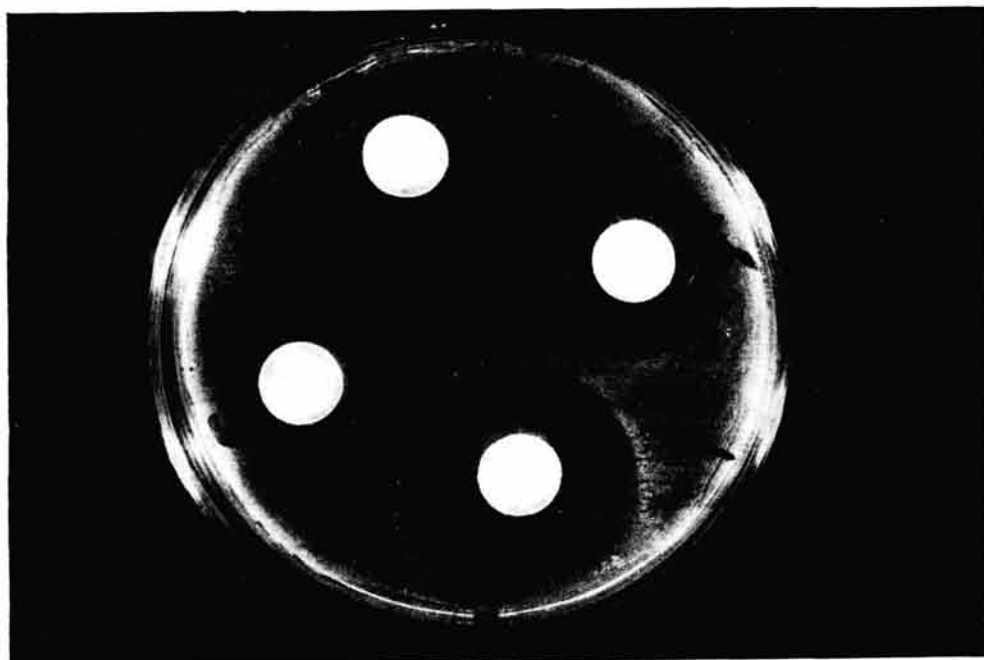
Soj sa izraženim antimikrobnim karakteristikama poslužio je u asocijaciji sa *S. thermophilus* za dobijanje laboratorijske kulture.

Pošto je u prethodnim ispitivanjima laboratorijska kultura pokazala dobre rezultate, proučili smo je u proizvodnim uslovima. U ovim istraživanjima korišćeno je mleko tipizirano na 3,2% masti i pasterezirano na 90—95°C — 30 minuta. Obogaćenje mleka je vršeno obranim mlečnim prahom i to sa 1%. Kiselinski stepen je bio 7,0 °SH, a procenat suve materije bez masti je iznosio 8,6. Mleko je poticalo od individualnih proizvođača u kome se broj somatskih ćelija kretao ispod 500.000/ml. Za oglede korišćeno je mleko bez prisustva rezidua antibiotika, koji su detektovani metodom Delvo-testa. Svežim kulturama, u kojima je odnos pojedinih sojeva iznosio oko 1:1, vršeno je inokulisanje mleka temperiranog na 44°C. Inokulum je iznosio 2%. Tokom inkubacije fermentacija mleka je praćena promenom stepena kiselosti, da bi se u datom momentu mogla prekinuti fermentacija i dobiti napitak željenog kvaliteta. Posle završene inkubacije koagulum je homogenizovan, ohlađen do +12°C, punjen u plastične čašice, a zatim držan u hladnjači pri temperaturnom režimu od 4°C.

Kod gotovog proizvoda ispitali smo pojedine elemente prema Pravilniku o kvalitetu mleka i Pravilniku mikrobiološke ispravnosti kao i proizvode od mleka. Mikroskopskim putem je utvrđen odnos laktobacila i streptokoka, kao važnog parametra međusobnog uticaja sojeva. Prosuđivanje organoleptičkih svojstava vršeno je na bazi izgleda koagulata, konzistencije po »filmu«, ukusa i mirisa. Ocena kvaliteta svih karakterističnih svojstava industrijskog napitka vršena je komisijskim putem na sajmu Maribor 80.

Rezultati i diskusija

Analizom podataka antimikrobnog spektra postupkom metode disk-difuzije u agaru izvršena je selekcija sojeva roda *Lactobacillus* prema stepenu baktericidnog dejstva na patogene bakterije. Jasne zone inhibicije selekcioniranih sojeva *L. bulgaricus* vide se na priloženom fotosu 1. Interpretacija se zasnivala na poređenju jasnih i oštih zona inhibicije. U radu je prikazano delovanje in vitro *L. bulgaricus* sa oznakom C. Uočava se velika efikasnost delovanja laktobacila na *Salmonellae*.



Slika 1. Zone inhibicije kod selekcioniranog soja vrste *Lactobacillus bulgaricus*

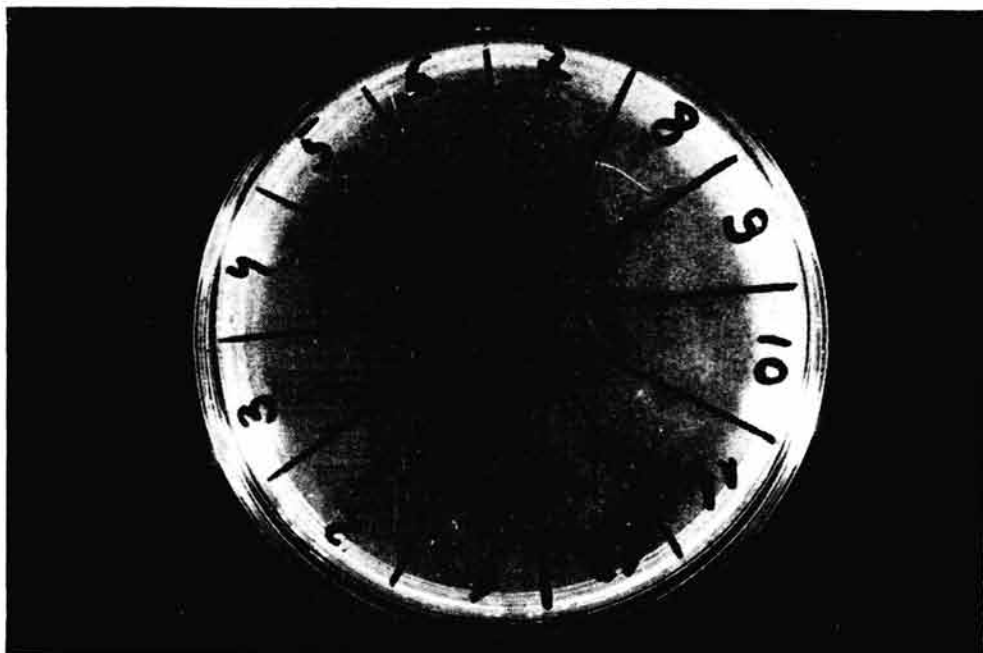
Nakon ove prve selekcije soj *L. bulgaricus* (c) retestirali smo na osetljivost 138 sojeva patogenih bakterija. Da bi se dobio celovit uvid inhibitornog delovanja nativnih metabolita *L. bulgaricus* dajemo pregled stupnja osetljivosti pojedinih vrsta patogenih i uslovno patogenih bakterija (tab. 1.)

Tabela 1

Osetljivost grupnih bakterijskih populacija u koncentracijama kultura *L. bulgaricus*

Test organizam	Broj sojeva	<i>L. bulgaricus</i> koncentracije u mcg	
		100	75
<i>Staphylococcus aureus</i>			
STCC 25923	1	1	—
<i>Staphylococcus aureus</i>	24	24	—
<i>Shigella flexneri</i>	5	5	5
<i>Proteus</i> vrste	10	10	5
<i>Salmonella</i> vrste	3	3	—
<i>Klebsiella</i> vrste	3	3	—
<i>Pseudomonas</i> ATCC 27853	1	1	1
<i>Pseudomonas</i> vrste	16	16	6
<i>Escherichia coli</i>			
ATCC 25922	1	1	—
<i>Escherichia coli</i> (iz mleka i proizvoda od mleka)	66	66	6
UKUPNO:	138	138	23
		100 ^{0/0}	16,6 ^{0/0}

Iz tabele je veoma vidljivo da su native biološke komponente *L. bulgaricus* inhibirale 100% sojeva pri koncentraciji od 100 mcg, a 16,6% pri koncentraciji od 75 mcg. Antimikrobna komponenta je izrazito superiornija kad se radi o gram-negativnim bakterijama nego kad se radi o gram-pozitivnim bakterijama *Staphylococcus aureus*. Izgleda da su sojevi *Shigella*, *Proteus* i *Pseudomonas* pokazali najveći stupanj osetljivosti. Zapaženo je da ne postoji rezistencija bez obzira na poreklo sojeva patogenih bakterija, ali je osetljivost varirala u zavisnosti od sojeva u okviru vrste.

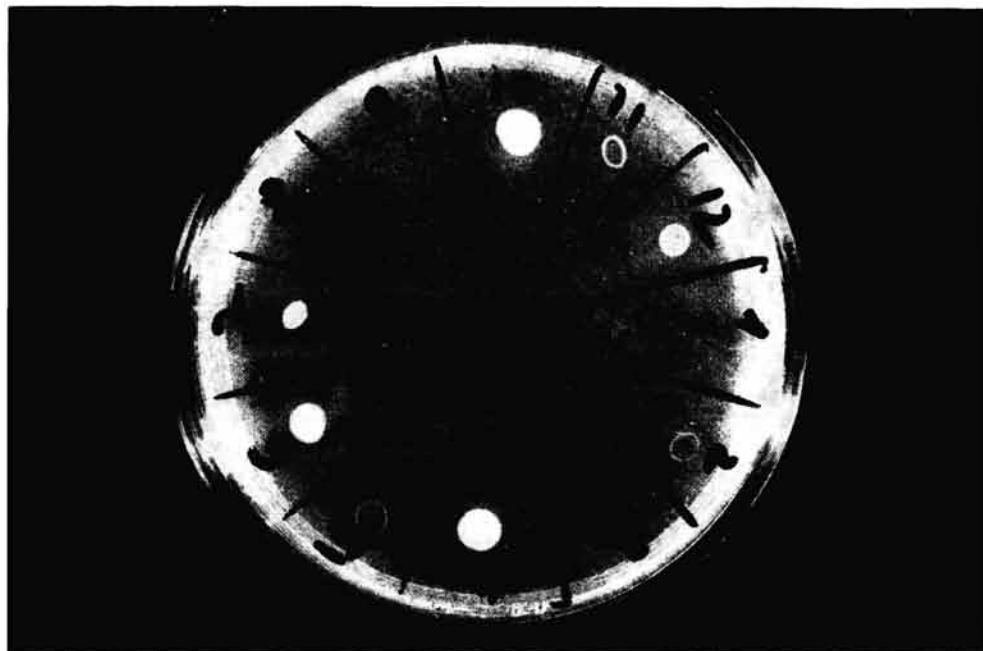


Slika 2. Kompletna inhibicija gram-negativnih bakterija

Na priloženom fotosu br. 2 zapaža se kompletna inhibicija gram-negativnih bakterija (12 sojeva), kada su filtrati kultura *L. bulgaricus* sadržavali 100 mcg. prirodnih antibiotičkih materija. Na fotosu br. 3 pri korišćenju 75 mcg dolazilo je do slabog porasta nekih patogenih bakterija, što tumačimo različitom osetljivošću pojedinih sojeva, čak i u okviru iste vrste.

Ova naša ispitivanja su u skladu sa rezultatima Shahania i sar. (1976) koji zaključuju da *L. acidophilus* i *L. bulgaricus* proizvode antibiotičke materije inhibitornog delovanja na veliki broj patogenih bakterija. Međutim, ove osobine su bile ispoljene kad su laktobacili kultivisani u mleku, dok u sintetičkim i semi-sintetičkim podlogama nisu konstatovane antibiotičke supstance.

Dobijena realna slika ukupne osetljivosti gram-negativnih bakterija uzročnika raznih infekcija i oboljenja, dozvoljava da se učine veliki napori za dobijanje novih nativnih antibiotika biohemijskom transformacijom lakto-



Slika 3. Slab porast nekih patogenih bakterija

bacila. Ovo tim pre što je rasprostranjena upotreba antibiotika, ambulantno i u bolničkim ustanovama često neracionalna, pa su mnoge bakterije postale rezistentne prema antibioticima.

Tehnološka provera kultura za fermentativni proizvod pokazala je dobre rezultate. Gotov proizvod je odgovarao kriterijumima Pravilnika. Mikroskopska slika je pokazala, da ne postoji antagonizam odnosno negativni međusobni uticaj između združenih kombinacija identifikovanih sojeva termofilnih bakterija. Za praksu je veoma važno da se stvorene asocijacije u određenom odnosu ne poremete kod finalnog proizvoda, što bi se negativno odrazilo na brzinu stvaranja koagulizma i kiselosti, konzistenciju, aromu, a verovatno i na antibiotski efekat. Organoleptička ocena je pokazala da je dobijen proizvod koji je zadovoljavao u pogledu izgleda koagulata, konzistencije po »filmu« kulture, ukusa i mirisa. Maksimalna kvaliteta svih karakterističnih svojstava ovog fermentivnog proizvoda je potvrđena od strane stručne komisije u Mariboru — Mleko 80., kada je ocenjen kao ekstra kvalitet.

Zaključak

Ova naša saznanja ukazuju na kratak zaključak da se u industrijskim uslovima za proizvodnju fermentovanih proizvoda koriste odgovarajući sojevi bakterija mlečne kiseline sa poznatim antimikrobnim karakteristikama. Na taj način bi se hranljiva vrednost ovih proizvoda povezala sa inhibitornim delovanjem prema patogenim i uslovno patogenim bakterijama u organima za varenje.

Literatura

1. BOULLANNE, C. et DESMAZEAND, M. (1980): — Étude de quelques de souches de *Str. thermophilus* utilisées en fabrication de yoghourt. *Le lait*, 60, 458—473.
2. DEKLERK, M. and COETREE, J. (1961): — Antibiosis among lactobacilli. *Nature* 192:340.
3. HEMME, D., VALLAL, L. (1979): — Effect de l'addition de lactose au lait, sur le developpement des lactobacillus et des streptocoques. *Le lait*, 52, 597—614.
4. KATRANĐZIEV, K. (1962): — Comparative microbiological and dietetic studies of yoghurt and acid. milk *Dairy, Sc. Abs.* 24.
5. MITIĆ, S. i OTENHAJMER, I. (1973): — Proučavanje baktericidnog antagonizma sojeva *L. acidophilus* prema nekim testorganizmima. *Acta veterinaria* 3, 141—147
6. RUBIN, H. and YOUGHAN, F. (1979): — Elucidation of the inhibitory factors of yoghurt against *Salmonella*. *J. Dairy Science*, 62, 1873—1879.
7. SHAHAMI, K. and VAKIL, J. (1976): — Natural antibiotic Activity of *L. acidophilus* and *L. bulgaricus*. *Dairy Products Journal*, 14—19.
8. SING, J., and KHANNA, A. (1979): — Antibacterial Activity of Yoghurt Starter in Cow and Buffalo Milk, vol. 42, 664—665.
9. PETTE, J. (1964): — Les laits fermentés. Federation Intern. Laitiere, Bulletin annuel. Partic III, 78—93.
10. TACQUET, A. et al. (1961): — Ann. de l'Inst. Pasteur, 100—581.

MLJEKARSKI SEMINAR

U Institutu za mljekarstvo u Beogradu održan je 4. i 5. lipnja 1981. godine mljekarski seminar na kojemu je učestvovalo šezdesetak učesnika iz jugoslavenskih mljekara. Seminarom su rukovodili direktor instituta dr. Stojanka Mitić i vodeći suradnik instituta dipl. ing. Velimir Jovanović.

Seminar je obrađivao područje kontrole kvalitete kod prijema mlijeka. Dr. J. Buchberger iz Južnonjemačkog pokusnog i istraživačkog zavoda za mljekarstvo u Weihenstephanu održao je referat pod naslovom: »Problemi uzimanja uzoraka i određivanje količine mlijeka kod prijema mlijeka pomoću sabirnih tankova«. O istoj temi govorio je i Alfred Weigt iz Wiesbadena. V. Jovanović je referirao o rezultatima ispitivanja jednog uređaja za određivanje pH vrijednosti i temperature mlijeka, poznatog pod nazivom MAK 2001, a koji je predviđen za postavljanje na sabirni kamion ili stacionarno preuzimanje mlijeka u mljekarama ili sabiralištima. Opsežna ispitivanja pod raznim uvjetima pokazala su da ovaj aparat odgovara namjeni. Ing. S. Schubert, predstavnik firme Ultrakust, Ruhmannsfelden, koja proizvodi ove aparate, prikazao je njegovu praktičnu upotrebu.

Na završetku seminara učesnici su razgledali prijem i kontrolu mlijeka pomoću aparata MAK 2001 u mljekari Padinska Skela.

M. M.