

- duljim čuvanjem i zrenjem sireva patogenih mikroflora ugiba, a broj preostalih mikroorganizama osjetljivo opada.
- radi nutricionno-sanitarne sigurnosti bilo bi nužno utvrditi dinamiku kretanja svih, a napose patogenih mikroorganizama u paškom siru, te na osnovu toga propisati ili normirati trajanje zrenja paškog sira, proizvedenog iz sirovog mlijeka, a u interesu zaštite potrošača i unapređenja proizvodnje ovog poznatog autohtonog sira.

#### Literatura

1. S. Z. S. Statistički godišnjak Jugoslavije 1976.
2. R. Z. S. Narodni dohodak 1975., Dokumentacija: 597.
3. S. Z. S. Broj stoke po opštinama, statistički bilten 704
4. Pravilnik o kvalitetu mleka i proizvoda od mleka (itd) Sl. l. 15/1964, 36/1964, 33/1970 i 33/1972.
5. Pravilnik o najmanjim uvjetima bakteriološke ispravnosti kojima moraju odgovarati živežne namirnice u prometu, Sl. l. SFRJ 55/1973.
6. KLIMOVSKI J.: Biohimičeskije i mikrobiologičeskije osnovi proizvodstva sira, Moskva 1966. Izd. »Piščevaja promišlenost«.
7. Van SLYKE L., PRICE W.: Cheese, New York, 1952., Orange Indd Publ. Co.
8. KLIMMER M., SCHÖNBERG F.: Milchkunde, Berlin 1939, Verl. R. Schoetz.
9. BOGDANOV V. M.: Mikrobiologija moloka i moločnih produktov, Moskva 1957., Piščepromizdat.
10. ZDANOVSKI N.: Ovčje mljekarstvo, Zagreb, 1974, Polj. nakl. zav.
11. BAKOVIĆ D.: Naši glavni otočki sirevi **Mljekarstvo** 6, 7—8/1956.
12. BAKOVIĆ D.: Tipovi dalmatinskih ovčjih sireva, **Mljekarstvo** 9, 11/1959.
13. SABADOŠ D.: Komparacija organoleptičke kvalitete paškog sira, **Mljekarstvo** 25, 11/1975.

## KONZERVISANJE KULTURA MLEČNOKISELINSKIH BAKTERIJA SMRZAVANJEM

Prof. dr MILJKOVIĆ Višeslava i M. BALTIĆ, Veterinarski fakultet, Beograd

Kvalitet kulture je jedan od osnovnih činilaca za pravilan tehnološki proces pri preradi mleka. Kulture koje se koriste u ove svrhe moraju pre svega da budu čiste tj. da ne sadrže mikroorganizme. Tokom pripremanja kulture dešava se da nastane kontaminacija mikroorganizmima iz spoljne sredine. Posebni problem u tome čine bakteriofagi, jer se njihovo prisustvo teže dokazuje nego drugih mikroorganizama tj. bakterija i gljivica.

Teškoće u preradi mleka se umanjuju upotrebom konzervisanja kultura, jer se mogu neposredno pred preradu da dodaju u mleko, grušu ili pavlaku. Konzervisanje kultura se uglavnom obavlja liofilizacijom i smrzavanjem (4,5 i 6). Upotreba takvih kultura zavisi od broja mikroorganizama koji prežive odgovarajući postupak konzervisanja. Procenat preživelih mikroorganizama i njihova aktivnost koja takođe predstavlja značajan činilac za upotrebu konzervisanih kultura, zavisi od tehnologije konzervisanja i načina upotrebe konzervisanih kultura (1, 2, 3).

Ispitivanja u ovom radu se odnose na konzervisanje mlečnokiselinskih bakterija temperaturama mržnjenja. Kao test mikroorganizam odabrali smo *L. acidophilus*, jer se on primjenjuje u medicini za sprečavanje i lečenje različitih obolenja. Zbog toga postoji veliko interesovanje i za proizvodnju acidofilnog mleka. Poznato je da proizvodnja acidofilnog mleka zahteva isključivanje prisustva ostalih mikroorganizama u mleku kome se dodaje kultura *L. acidophilusa*. Zbog toga i priprema kultura za proizvodnju acidofilnog mleka predstavlja problem koji otežava industrijsku proizvodnju acidofilnog mleka

## Materijal i način rada

Kulture *L. acidophilus*-a smo smrzavali u rastvorima različitih materija uzetih kao zaštita od uticaja niskih temperatura. Tako smo upotreabili:

1. — Sediment kulture *L. acidophilus*-a iz MRS bujona (2 ml) i 20 ml 10% rastvora laktoze (suspenzija 1)
2. — Suspenziju pod 1. i obrano mleko u odnosu 1:4 (suspenzija 2)
3. — 2,5 ml suspenzije pod 1. i 7,5 ml rastvora 10% laktoze (suspenzija 3)
4. — 10 ml suspenzije pod 1.; 8 ml obranog mleka i 2 ml glicerola (suspenzija 4)

Suspenzije su zamrznute na  $-15^{\circ}\text{C}$ ,  $-27^{\circ}\text{C}$  i  $-196^{\circ}\text{C}$ . Odmrzavanje je izvršeno na  $+4^{\circ}\text{C}$ , na sobnoj temperaturi pri oko  $+20^{\circ}\text{C}$ , i u termostatu na  $37^{\circ}\text{C}$ . Zbog različitih načina odmrzavanja za svaku grupu je pripremljeno po 9 epruveta od kojih je po tri stavljeno na navedene tri temperature smrzavanja ( $-15^{\circ}$ ,  $-27^{\circ}$  i  $-196^{\circ}\text{C}$ ).

Vitalnost kultura posle dejstva niskih temperatura je ispitivana na osnovu rasta na hranljivim podlogama. Usporedivanjem broja kolonija pre smrzavanja i posle smrzavanja izračunat je procent, preživljavanja ćelija *L. acidophilus*-a. Uzet je u obzir i izgled kolonija posle 24, 48 i 72 časa inkubacije zasejanih podloga.

## Rezultati ispitivanja i diskusija

Rezultati ispitivanja održivosti *L. acidophilus*-a pri smrzavanju su prikazani u tablicama od 1 do 4 i grafikonima 1 do 4.

Tablica 1

Održivost *L. acidophilus*-a pri smrzavanju na različitim temperaturama u 10% rastvoru laktoze

Broj bakterija pre smrzavanja	Temperatura odmrzavanja	Temperatura smrzavanja					
		$-15^{\circ}\text{C}$		$-27^{\circ}\text{C}$		$-196^{\circ}\text{C}$	
		a	% preživljavanja	b	% preživljavanja	c	% preživljavanja
$1,465 \times 10^8$	$+37^{\circ}\text{C}$	$1,10 \times 10^4$	0,0075	$0,503 \times 10^8$	34,33	$1,44 \times 10^8$	98,29
$1,465 \times 10^8$	$+20^{\circ}\text{C}$	$1,17 \times 10^4$	0,0079	$0,48216 \times 10^8$	32,91	$1,48 \times 10^8$	100,00
$1,465 \times 10^8$	$+4^{\circ}\text{C}$	$3,90 \times 10^4$	0,026	$0,4725 \times 10^8$	32,25	$1,42 \times 10^8$	96,92

Legenda: a, b, c = broj bakterija posle odmrzavanja (odnosi se na tablice od 1—4)

Tablica 2

Održivost *L. acidophilus*-a pri smrzavanju na različitim temperaturama u obranom mleku sa dodatkom 2,5% laktoze

Broj bakterija pre smrzavanja	Temperatura odmrzavanja	Temperatura smrzavanja					
		$-15^{\circ}\text{C}$		$-27^{\circ}\text{C}$		$-196^{\circ}\text{C}$	
		a	% preživljavanja	b	% preživljavanja	c	% preživljavanja
$0,3435 \times 10^8$	$+37^{\circ}\text{C}$	$0,264 \times 10^8$	76,85	$0,34 \times 10^8$	98,98	$0,35 \times 10^8$	100,00
$0,3435 \times 10^8$	$+20^{\circ}\text{C}$	$0,258 \times 10^8$	75,10	$0,331 \times 10^8$	96,36	$0,341 \times 10^8$	99,27
$0,3435 \times 10^8$	$+4^{\circ}\text{C}$	$0,273 \times 10^8$	79,47	$0,329 \times 10^8$	95,77	$0,338 \times 10^8$	98,39

Tablica 3

Održivost razblažene kulture *L. acidophilus*-a pri smrzavanju na različitim temperaturama u 10% rastvoru laktose

Broj bakterija pre smrzavanja	Temperatura odmrzavanja	Temperatura smrzavanja					
		-15°C		-27°C		-196°C	
		a	% preživljavanja	b	% preživljavanja	c	% preživljavanja
$0,383 \times 10^8$	+ 37°C	$0,21 \times 10^5$	0,056	$0,184 \times 10^6$	0,48	$0,338 \times 10^8$	88,25
$0,383 \times 10^8$	+ 20°C	$0,20 \times 10^5$	0,052	$0,458 \times 10^6$	1,19	$0,323 \times 10^8$	84,33
$0,383 \times 10^8$	+ 4°C	$0,22 \times 10^5$	0,057	$0,435 \times 10^6$	1,13	$0,268 \times 10^8$	69,97

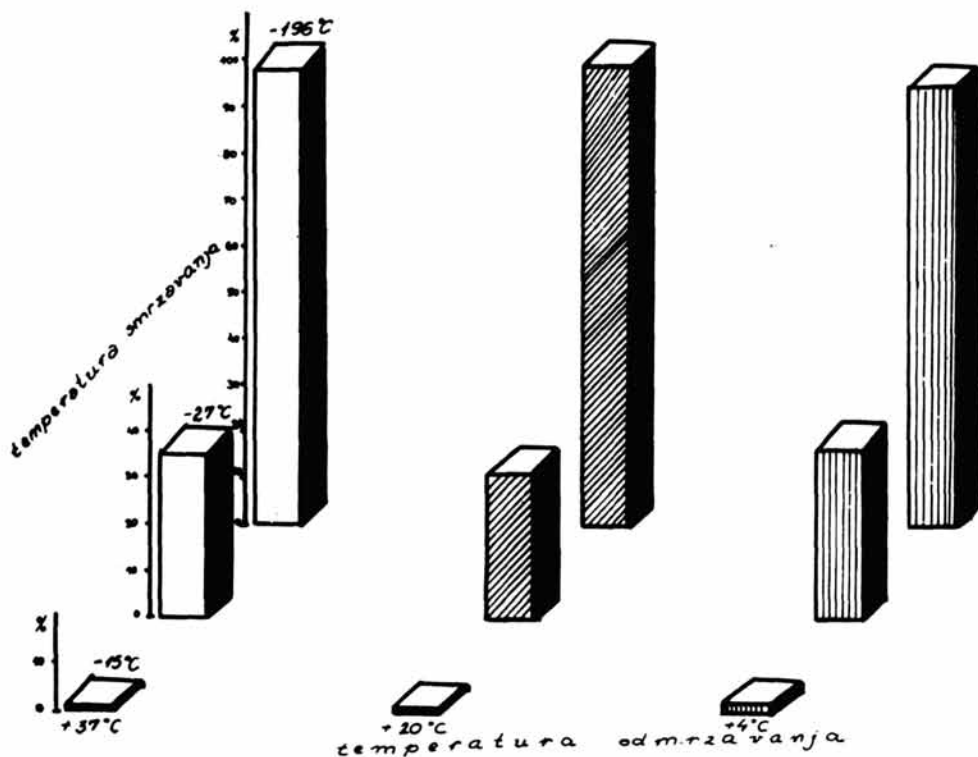
Tablica 4

Održivost *L. acidophilus*-a pri smrzavanju na različitim temperaturama u obranom mleku sa dodatkom glicerola

Broj bakterija pre smrzavanja	Temperatura odmrzavanja	Temperatura smrzavanja					
		-15°C		-27°C		-196°C	
		a	% preživljavanja	b	% preživljavanja	c	% preživljavanja
$0,8335 \times 10^8$	+ 37°C	$0,6445 \times 10^8$	77,32	$0,811 \times 10^8$	97,30	$0,84 \times 10^8$	100,00
$0,8335 \times 10^8$	+ 20°C	$0,601 \times 10^8$	72,10	$0,783 \times 10^8$	94,66	$0,82 \times 10^8$	98,38
$0,8335 \times 10^8$	+ 4°C	$0,613 \times 10^8$	73,54	$0,80 \times 10^8$	95,98	$0,83 \times 10^8$	99,58

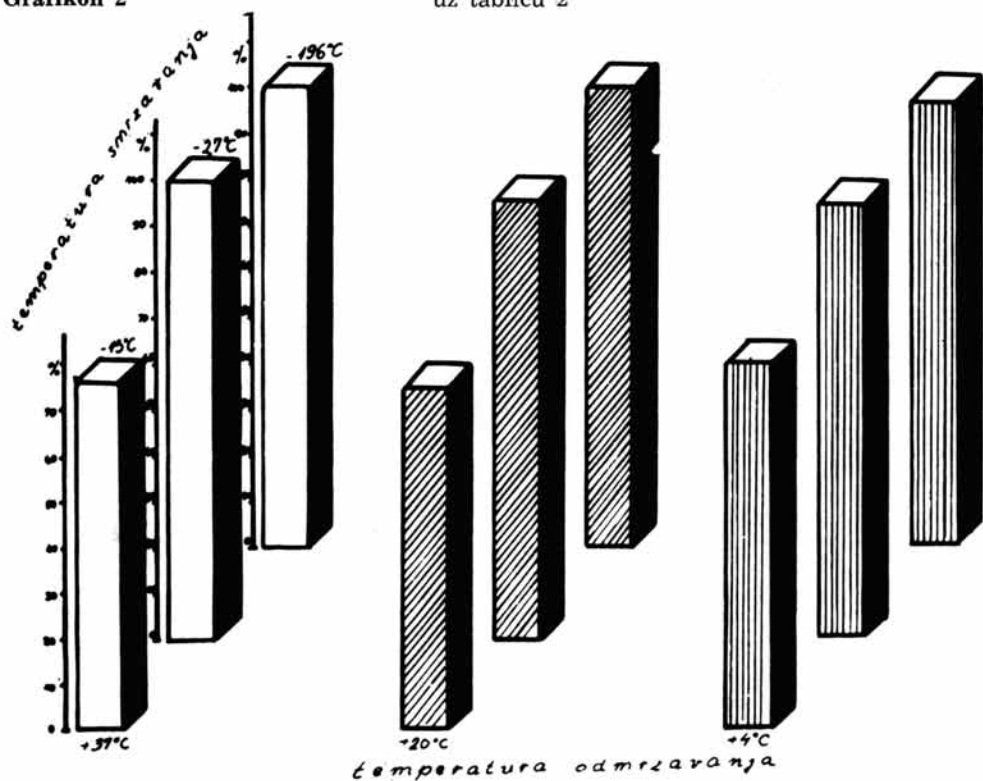
Grafikon 1

uz tablicu 1



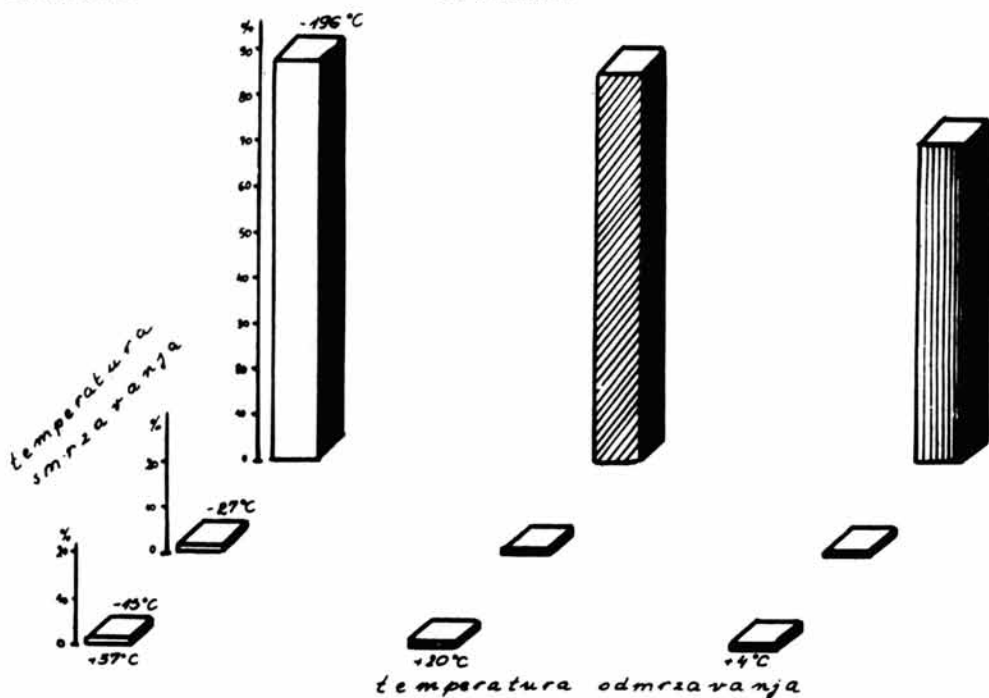
Grafikon 2

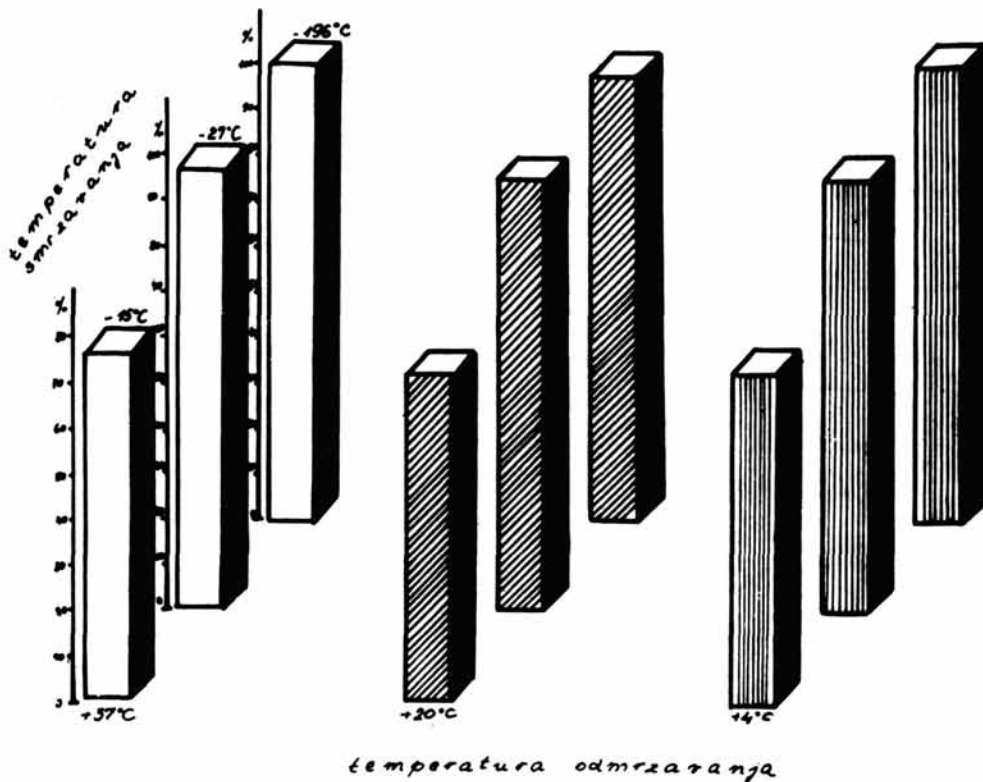
uz tablicu 2



Grafikon 3

uz tablicu 3





Iz dobijenih rezultata se vidi da je pri smrzavanju *L. acidophilus*-a na  $-196^{\circ}\text{C}$  postignuta najbolja održivost. Temperatura odmrzavanja u ovom slučaju uglavnom nije imala bitni uticaj na broj preživelih ćelija. Izuzetak čini smrzavanje razblažene kulture *L. acidophilus*-a u 10% rastvoru laktoze, gdje je najniži procenat preživelih ćelija dobijen posle odmrzavanja na  $+4^{\circ}\text{C}$ . Zavisnost sredine smrzavanja i održivosti *L. acidophilus*-a pri smrzavanju na  $-196^{\circ}\text{C}$  nije zapažena. Međutim pri smrzavanju na  $-15^{\circ}\text{C}$  i  $-27^{\circ}\text{C}$  utvrđene su velike razlike u procentu preživelih ćelija zavisno od sredine. Najviši procenat preživelih ćelija je zapažen pri korišćenju obranog mleka i rastvora laktoze (suspenzija 2) i obranog mleka i glicerola (supenzija 4). Upoređivanjem uticaja temperature  $-15^{\circ}\text{C}$  i  $-27^{\circ}\text{C}$  vidi se da je veći broj preživelih ćelija zapažen pri smrzavanju na  $-27^{\circ}\text{C}$ , nego na  $-15^{\circ}\text{C}$ . Izrazito nepovoljan uticaj smrzavanja kultura *L. acidophilus*-a utvrđen je na  $-15^{\circ}\text{C}$  u 10% rastvoru laktoze.

Ispitivanja održivosti posle odmrzavanja su pokazala veliki uticaj sredine u kojoj je smrzavanje izvršeno na broj preživelih ćelija. Iz podataka ovih oglada koji su prikazani u tablici 5 se vidi da se broj preživelih ćelija posle odmrzavanja i držanja 15 dana pri temperaturi  $+4^{\circ}\text{C}$  nije bitno promenio u kulturi suspendovanoj u obranom mleku i obranom mleku sa dodatkom glicerola, dok je u rastvoru laktoze znatno opao. Potpuno propadanje *L. acidophilus*-a je utvrđeno u odmrznutim kulturama koje su prethodno bile razblažene rastvorom laktoze (suspenzija 3).

**Tablica 5**

**Održivost smrznutih kultura na  $-196^{\circ}\text{C}$  posle odmrzavanja i čuvanja na  $+4^{\circ}\text{C}$**

Suspenzija	Broj bakterija		
	pre zamrzavanja	posle odmrzavanja	posle 15 dana odmrzavanja
suspenzija 1	120.000.000	120.000.000	2.610.000
suspenzija 2	47.200.000	46.100.000	45.000.000
suspenzija 3	21.900.000	20.200.000	—
suspenzija 4	25.900.000	24.800.000	23.000.000

Iz dobijenih rezultata proizlazi da obrano mleko pruža dobru zaštitu *L. acidophilus*-u pri smrzavanju.

Karakterističan podatak dobijen u ovom radu je da procenat *L. acidophilus*-a koji prežive smrzavanje zavisi od koncentracije bakterija u suspenziji. O značaju koncentracije bakterija pri smrzavanju kultura govore i drugi istraživači. Tako Accolas i Auclair (1967) opisuju metode dobijanja kultura sa visokim koncentracijama bakterija kojima je postignuto smanjivanje oštećenja mlečnokiselinskih bakterija pri smrzavanju. Pored činilaca za koje je u ovom radu utvrđeno da utiču na održivost kultura pri smrzavanju, ima i drugih koji ovde nisu obuhvaćeni. Prema Bergèreu (1968) bakterije su u eksponencijalnoj fazi razvoja osetljivije na smrzavanje nego u stacionarnoj. Naši rezultati su pokazali da se uticaj svih ispitivanih činilaca najmanje ispoljio pri smrzavanju kultura na  $-196^{\circ}\text{C}$ . Ovo potvrđuje opravdanost sve češćih preporuka takvog načina konzervisanja kultura za mlekarsku industriju. Reddy i saradnici (1974) ističu prednost ovog postupka uopšte, a posebno pri smrzavanju mešanih kultura, navodeći da za izbor metode konzervisanja kultura za mlekarsku tehnologiju nije važna samo vitalnost kultura i mlečnokiselinska aktivnost već i održavanje međusobnog odnosa pojedinih vrsta mikroorganizama u mešanoj kulturi. Ovo se, navode isti autori, daleko bolje postiže smrzavanjem na  $-196^{\circ}\text{C}$  nego liofilizacijom ili smrzavanjem na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Zaključak

1. Upoređivanjem uticaja smrzavanja na kulturu *L. acidophilus*-a utvrđeno je da najveći procenat bakterija preživi smrzavanje na  $-196^{\circ}\text{C}$ . Procenat preživelih *L. acidophilus*-a se kretao od 69,97% do 100% u zavisnosti od sredine, (krioprotektivnog sredstva) koncentracije bakterija i načina odmrzavanja. Pri smrzavanju na  $-27^{\circ}\text{C}$  procenat preživelih se kretao od 0,48% do 98,98% a pri smrzavanju na  $-15^{\circ}\text{C}$  od 0,0075 do 79,74%.

2. Od svih ispitivanih činilaca (sredina, koncentracija bakterija i način odmrzavanja) najnepovoljniji uticaj na *L. acidophilus* pri smrzavanju je imalo sniženje koncentracije bakterija u suspenziji.

3. Posle odmrzavanja kultura *L. acidophilus*-a smrznutih na  $-196^{\circ}\text{C}$  najduža održivost je dokazana u obranom mleku sa dodatkom laktoze ili glicerola, a najslabija kod kultura u niskim koncentracijama suspendovanih u 10% rastvoru laktoze.

### Literatura

1. ACCOLAS, J. P. i AUCLAIR J.: Conservation a l'état congelé de suspensions de bactéries lactiques concentrées sous faible volume. *Le lait* 47, 253—260 1967.
2. BAUMANN, D. P., REINBOLD, G. W.: Freezing of Lactic Cultures. *Journal of Dairy Sci.* 49, 259, 1966.