

IZBOR HRANJIVIH PODLOGA NA OSNOVI MLIJEKA ZA UZGOJ I ODRŽAVANJE PROIZVODNIH KULTURA BAKTERIJA MLJEČNO-KISELOG VRENJA*

Ljerka KRŠEV

Zagrebačka mljekara, Zagreb

Uvod

Poznato je da infekcija bakterija mlječno-kiselog vrenja bakteriofagima, između ostalog, često uzrokuje zakašnjelo grušanje, a ponekad i potpun izostanak gruša pri proizvodnji proizvodnih kultura i fermentiranih mlječnih proizvoda. Zbog toga je u mljekarskoj industriji uvedeno nekoliko načina rada s mljekarskim kulturama da ih se zaštiti od infekcije i nepoželjnog djelovanja bakteriofagâ. Metoda aseptičnog rukovanja kulturama ili metoda svakodnevne rotacije kulturâ u proizvodnji — često su upotrebljavane metode s manje ili više uspjeha. Kao vrlo uspješno sredstvo s pomoću kojeg se može spriječiti umnožavanje bakteriofagâ pokazali su se specifični anti-fag elementi, što se stavljaju u hranjive podloge za uzgoj mljekarskih kultura. U praksi se sve ove metode mogu primjenjivati odvojeno ili kombinirano.

Nedavno se na francuskom tržištu pojavila specijalna hranjiva podloga »Marstar« za uzgoj mljekarskih kultura (Carlin, Vinay, Francuska), a značajka joj je da istovremeno djeluje inhibitorno na bakteriofage. Prema podacima proizvođača, podloga inhibira rast bakteriofagâ putem fosfatâ koji blokiraju djelovanje kalcija u toku fermentativnog procesa. Podloga je sastavljena od obranog mlijeka u prahu, čistih soli fosfatâ, demineraliziranog mlječnog seruma i dehidratiranog ekstrakta gušterače.

S obzirom da je mogućnost zaštite mljekarskih kultura, a napose onih mezofilnih, od štetnog djelovanja bakteriofaga putem hranjive podloge za uzgoj tih kulturâ veoma interesantna i privlačna metoda, smatrala sam korisnim zadatkom da ispitam djelovanje i mogućnosti takve specijalne podloge.

Eksperimentalni rad

U ispitivanje su uzeti sojevi bakterija mlječno-kiselog vrenja iz Zbirke mljekarskih kultura Zagrebačke mljekare, i to: *Streptococcus lactis*, *Str. cremoris*, *Str. diacetilactis* i *Leuconostoc citrovorum*, izdvojeni iz mješovitih mljekarskih kultura što se upotrebljavaju u redovnoj proizvodnji i oni iz mješovitih mljekarskih kultura nabavljenih iz Fran-

Referat s XIII. naučnog sastanka mikrobiologa i epidemiologa Jugoslavije, održanog 8—12. 6. 1971, Pula.

cuske, Bugarske, Poljske, SR Njemačke i SSSR. Uz njih su ispitani i bakteriofagi iz naše zbirke kao i oni pribavljeni iz Francuske i Bugarske.

Kulture bakterija mlječno-kiselog vrenja uzgajane su paralelno u specijalnoj hranjivoj podlozi »Marstar« (ili, kraće, SHP), odnosno u prirodnoj hranjivoj podlozi (PHP), tj. 10% - tnoj otopini obranog mlijeka u prahu steriliziranoj pri 121° C/45 minuta.

Hranjiva podloga »Marstar« priprema se prema uputi proizvođača na ovaj način: 1 kg podloge otopi se u 7,5 litara mlake vodovodne vode i, kada se podloga posve otopila, naglo ugrije do 88—91° C. Pri toj se temperaturi drži 45 min. i nakon toga se naglo ohladi do temperature cijepjenja, tj. 21—23° C. Tada se aseptički prenese po 100 ml hranjive podloge u tikvice od 250 ml zapremine. Netom pripremljena podloga »Marstar« ima ova svojstva: boje je svijetlo smeđe; kratko vrijeme nakon što je pripremljena (2—3 min.) javlja se na dnu posude neznatan talog što se smatra normalnom pojavom; a kiselost ohlađene podloge kreće se u granicama od 35—40° SH.

Prvog dana ispitivanja precijepljene su odabrane čiste kulture bakterija mlječno-kiselog vrenja u količini od 1% u podloge PHP i SHP. Istodobno je jedan niz kultura inficiran poznatom količinom homolognog bakteriofaga. Tako inficirane kao i neinficirane kulture inkubirane su pri 21—23° C/18 sati (za streptokoke), odnosno pri 30° C/48 sati (za *L. citrovorum*), i nakon završene inkubacije ponovno su precijepljene u svježije podloge PHP i SHP. Tom je prilikom određen u svakoj kulturi broj živih bakterija po metodi agar-ploča, a kao podloga za nearomotvorne streptokoke i *L. citrovorum* upotrijebljeno je hidrolizirano mlijeko s 2,5% agara, a za aromotvorne streptokoke ista podloga uz dodatak od 1% kalcijevog citrata. Svakog dana tijekom idućih 11 dana izvršena su, na opisani način, precjepljivanja inficiranih kultura i određivanja broja živih bakterija u njima.

Osim praćenja stupnja rasta inficiranih kultura bakterija mlječno-kiselog vrenja u podlogama PHP i SHP, ispitivan je i razvoj homolognog bakteriofaga u kulturi vrste *Str. cremoris* u odnosu na upotrijebljene hranjive podloge. Broj bakteriofaga u kulturi streptokokâ određen je metodom titracije.

U svrhu ispitivanja održljivosti bakteriofagom inficiranih kulturâ pri niskim temperaturama čuvanja, odabrana su tri soja streptokokâ mlječno-kiselog vrenja, i to: *Str. lactis* 905, *Str. cremoris* SL i *Str. diacetylactis* 22S, i dva soja vrste *L. citrovorum* (SL i 5/12). Nakon završene inkubacije pri 21—23° C/20 sati u PHP i SHP, kulture su odmah prenijete u hladionik pri + 2° C i tamo čuvane 1—3 dana. Pri tome je u njima svakog dana određivan broj živih bakterija metodom agar-ploča na isti način kako je to naprijed navedeno.

Da bi se ispitao utjecaj tvrde vode na rast bakterija mlječno-kiselog vrenja, pripremljena je posebna kalcinirana specijalna hranjiva podloga (KSHP), i to tako da je podloga »Marstar« otopljena u kalciniranoj vodi (500 mg/l) umjesto u običnoj vodovodnoj vodi. Odabrane tri kulture streptokoka mlječno-kiselog vrenja uzgajane su istovremeno u svim trima podlogama, tj. u PHP, SHP i KSHP. Nakon inkubacije pri 21—23° C/18 sati precijepljene su u iste svježije podloge u količini od 1%, inficirane poznatom količinom bakteriofaga i inkubirane pri 21—23° C/18 sati. Nakon toga određen je u njima broj živih bakterija po metodi agar-ploča (21—23° C/48 sati).

Rezultati

Tablica 1

Djelovanje bakteriofaga na čiste kulture streptokoka mlječno-kiselog vrenja različitog porijekla

Bakteriofag	Čiste kulture streptokoka mlječno-kiselog vrenja									
	Str. diacetylactis				Str. cremoris					
	A1	A2	C1	C2	B1	B2	D1	D2	E1	
a1	+	+	—	—	+	—	—	—	+	
a2	+	+	—	—	+	—	—	+	+	
b1	+	+	—	—	+	—	—	—	+	
b2	—	—	—	—	—	+	—	—	—	
c1	+	+	+	—	+	—	—	+	+	
c2	+	—	—	+	+	—	—	—	+	
d1	—	+	—	—	—	—	+	+	—	
d2	+	+	—	—	+	—	+	+	+	
e1	+	+	+	+	+	—	—	+	+	

Napomena: 1) Čiste kulture streptokoka mlječno-kiselog vrenja sastavni su dijelovi mješovitih kultura različitih proizvođača, npr. čiste kulture oznake A1 i A2 sastavni su dijelovi dviju različitih mješovitih kultura proizvođača A;

2) znak + znači da jedna kap poznate otopine bakteriofaga kapnuta na razvijenu koloniju kulture streptokokâ na agar-ploči dezintegrira dotičnu koloniju (nestanak jasnih obrisa i prvobitnog izgleda); znak — znači da bakteriofag nije destruktivno djelovao na koloniju nakon ponovljene inkubacije. Kao podloga za uzgoj vrste Str. diacetylactis poslužilo je hidrolizirano mlijeko s 2,5% agara, a za Str. cremoris ista podloga uz dodatak 1% Ca citrata.

U tab. 1 pregledno je prikazano djelovanje bakteriofaga na streptokoke mlječno-kiselog vrenja različitog porijekla. Tako npr. bakteriofag d2, izdvojen iz mješovite mljekarske kulture D2 što je nabavljena od proizvođača D, lizira kulture izdvojene iz mješovitih kultura D1 istog proizvođača. Nadalje, taj bakteriofag lizira i kulture izdvojene iz drugih mješovitih kultura nabavljenih od različitih proizvođača. Na osnovi toga može se zaključiti da mnoge mješovite kulture različitog porijekla imaju u svom sastavu iste sojeve streptokokâ mlječno-kiselog vrenja.

U tab. 2 iznijeti su podaci o razvoju čistih kultura streptokokâ mlječno-kiselog vrenja u dvjema različitim hranjivim podlogama, tj. u PHP i SHP. Vidi se tu da rast streptokokâ varira, odnosno da se neke kulture bolje razvijaju u SHP a druge u PHP. Takav različit stupanj rasta streptokokâ u tim podlogama može se iskoristiti za razlikovanje soja od soja iste čiste kulture. Prateći podatke u tab. 2 nakon trećeg precjepljivanja kultura vidi se da: 4 čiste kulture (60, 70, 7962 i 7963) od ukupno 9 ispitanih kultura vrste Str. lactis, 2 kulture (24V i VT5) od ukupno 12 kultura vrste Str. cremoris i jedna (22S) od ukupno 12 kultura vrste Str. diacetylactis bolje rastu u SHP. Nasuprot tome, 4 kulture (27, 56, 75 i 502) od ukupno 9 ispitanih kultura vrste Str. lactis, 4 kulture (C5, MQ3, SL i VT3) od ukupno 12 vrsta Str. cremoris i 6 kultura (33F, 100-BS, B6, ST3, STD i STD3) od ukupno 12 ispitanih kultura vrste Str. diacetylactis pokazuju bolji rast u PHP.

Tablica 2

Utjecaj sastava hranjivih podloga na uzgoj čistih kultura streptokoka mlječno-kiselog vrenja tijekom 11 precjepljivanja. Kulture su uzgajane u 10⁹/e-tnoj otopini obranog mlijeka u prahu (PHP) i u specijalnoj hranjivoj podlozi »Marstar« (SHP) pri 21–23° C/18 sati, a broj živih bakterija u kulturama određen je metodom agar-ploča nakon inkubacije pri 21–23° C/48 sati.

Čista kultura streptokoka mlječno-kiselog vrenja	Broj živih bakterija x 10 ⁷ /ml						prosječan rezultat 4.—11. precjepljivanja
	nakon 1-og precjep-ljivanja		nakon 2-og precjep-ljivanja		nakon 3-eg precjep-ljivanja		
	PHP	SHP	PHP	SHP	PHP	SHP	
Str. lactis							
27	118	60	105	41	100	49	—
56	58	43	85	39	72	40	0
60	199	318	210	341	268	435	0
70	123	171	49	195	18	148	+
75	74	55	90	37	99	40	—
502	115	60	87	31	69	29	—
905	268	251	239	375	200	410	+
7962	58	121	129	115	111	130	0
7963	115	28	285	459	226	420	+
Str. cremoris							
54	35	28	52	17	100	19	—
24V	141	13	151	154	50	175	+
44A	112	100	129	75	120	160	0
44B	142	114	108	75	125	99	0
C5	59	9	81	21	53	25	0
LD	31	25	LN	50	69	65	0
MQ	40	21	29	99	15	10	0
MQ3	81	29	79	40	76	34	—
MRD	70	139	170	60	71	17	—
SL	92	35	101	41	81	55	0
VT3	92	55	102	31	65	49	0
VT5	158	141	131	165	171	429	0
Str. diacetylactis							
22S	421	458	320	512	359	392	0
33F	130	66	174	42	175	59	—
100-BS	105	61	158	60	169	56	—
253	99	85	75	63	94	LN	0
299	113	91	91	42	67	45	0
300-BS	140	93	86	63	114	78	0
B1	71	77	82	51	84	56	0
B6	170	68	99	64	119	44	—
F8	131	134	91	128	93	24	—
ST3	125	43	115	52	105	60	0
STD	149	65	112	99	118	59	—
STD3	141	58	82	50	105	60	0

Napomena: 1) Znak + znači da se u SHP razvio približno dvaput veći broj stanica nego u PHP tijekom 4. do 11. precjepljivanja;

2) znak 0 označuje da se broj stanica u SHP kretao približno unutar granica prvih triju precjepljivanja; a znak — znači da je broj živih bakterija u SHP u odnosu na onaj u PHP bio približno upola manji tijekom 4.—11. precjepljivanja kultura, LH = laboratorijska nezgoda (bez rezultata).

Jedna kultura vrste *Str. lactis* (7962), 6 kultura vrste *Str. cremoris* (54, 44A, 44B, LD, MQ i MRD) i 5 kultura vrste *Str. diacetylactis* (253, 299, 300-BS, B1 i F8) ne pokazuju neku vidljivu razliku u stupnju rasta u imenovanim podlogama.

Tablica 3

Utjecaj sastava hranjivih podloga za uzgoj čistih kultura vrste *Leucocostocitrovorum* tijekom 11 precjepljivanja. Kulture su uzgajane u 10⁰/_g-tnoj otopini obranog mlijeka u prahu (PHP) i u specijalnoj hranjivoj podlozi »Marstar« (SHP) pri 30° C/48 sati, a broj živih bakterija u kulturama određen je metodom agar-ploča nakon inkubacije pri 30° C/48 sati.

Čista kultura bakterija mlječno-kiselog vrenja	Broj živih bakterija x 10 ⁵ /ml				prosječan rezultat 3.—11. precjepljivanja
	nakon 1-og precjepljivanja		nakon 2-og precjepljivanja		
	SHP	PHP	SHP	PHP	
<i>L. citrovorum</i> SL	165	475	0,39	368	0
<i>L. citrovorum</i> Da3	109	558	5,80	370	0
<i>L. citrovorum</i> 5/12	22,8	335	0,00017	298	0

Napomena: znak 0 znači da je broj živih bakterija u SHP opadao svakim idućim precjepljivanjem tako, da nakon 11-og precjepljivanja na kontrolnoj agar-ploči nije više porasla nijedna kolonija.

U tab. 3 mogu se vidjeti razlike u rastu sojeva vrste *L. citrovorum* u podlogama PHP i SHP. Ti se sojevi slabo razvijaju u SHP, pa nakon 11-og precjepljivanja u SHP uopće više nisu razvijali kolonije na kontrolnim agar-pločama.

Tablica 4

Utjecaj sastava hranjivih podloga na razvoj homolognog bakteriofaga u kulturi vrste *Str. cremoris* uzgajane u 10⁰/_g-tnoj otopini obranog mlijeka u prahu (PHP) i u specijalnoj hranjivoj podlozi »Marstar« (SHP) tijekom tri precjepljivanja bakteriofagom inficiranih kultura.

Homologni bakteriofag	Broj bakteriofagâ u 1 ml bakterijske kulture			
	nakon 1-og precjepljivanja		nakon 3-eg precjepljivanja	
	PHP	SHP	PHP	SHP*
6	60 x 10 ⁷	100 x 10 ⁸	100 x 10 ⁸	0
10	100 x 10 ⁷	40 x 10 ⁸	50 x 10 ⁴	0
27	120 x 10 ⁷	62 x 10 ⁴	250 x 10 ⁴	0
40	40 x 10 ⁷	26 x 10 ⁸	40 x 10 ⁸	0

* bakteriofagi odsutni u 0,1 ml bakterijske kulture

Tablica 4 sadrži podatke o razvoju homolognog bakteriofaga za vrstu *Str. cremoris* uzgajanu u PHP i SHP. Umnožavanje bakteriofagâ je znatno slabije već poslije prvog precjepljivanja bakterijske kulture u SHP, a poslije trećeg precjepljivanja bakteriofagi su se nalazili još samo ponekad. Inhibitorne sposobnosti SHP »Marstar« u sprečavanju razvoja bakteriofagâ ne mijenjaju se ni u podlozi pripremljenoj s kalciniranom vodom (500 mg/l).

Utjecaj sastava hranjive podloge na održavanje kultura bakterije mlječno-kiselog vrenja inficiranih homolognim bakteriofagima i čuvanih pri + 2° C. Broj živih bakterija određen je metodom agar-ploča nakon inkubacije pri 21—23° C/48 sati za streptokoke, a pri 30°/48 sati za *L. citrovorum*.

Čista kultura bakterija mlječno-kiselog vrenja	Hranjiva podloga	Broj živih bakterija x 10 ⁷ /ml		
		nakon 1-og dana čuvanja	nakon 2-og dana čuvanja	nakon 3-eg dana čuvanja
Str. lactis 905	SHP	330,00	450,00	58,00
	PHP	280,00	250,00	14,00
Str. cremoris SL	SHP	120,00	95,00	0,20
	PHP	150,00	120,00	0,00189
Str. diaceti-lactis 22S	SHP	57,00	0,014	0,00159
	PHP	120,00	59,00	0,0107
L. citrovorum SL	SHP	0,68	0,27	0,65
	PHP	3,30	3,10	3,50
L. citrovorum 5/12	SHP	0,63	1,10	1,21
	PHP	3,90	5,10	3,90

Napomena: SHP označuje specijalnu hranjivu podlogu »Marstar«; a PHP prirodnu hranjivu podlogu, tj. 10⁰/_o-tnu otopinu obranog mlijeka u prahu.

U tab. 5 može se pratiti utjecaj podloga na održavanje kultura čuvanih pri + 2° C. Kulture bakteriofagom inficiranih sojeva vrste *L. citrovorum* dobro se održavaju u SHP, a kulture streptokokâ mlječno-kiselog vrenja ubrzano propadaju.

Diskusija

Na osnovi provedenih pokusa može se razabrati da SHP »Marstar« sprečava razvoj bakteriofagâ u kulturama bakterija mlječno-kiselog vrenja. Oda-beremo li SHP kao podlogu za uzgoj matičnih kultura streptokokâ mlječno-kiselog vrenja, tada smo osigurali rast streptokoka u hranjivoj sredini stalnog sastava i s anti-fagnim svojstvom. Primjena takve podloge pruža znatnu pomoć u održavanju ovih veoma osjetljivih vrsta proizvodnih bakterija, odnosno njih-ovih sojeva. Rezultati ispitivanja pokazuju znatno variranje rasta streptokokâ mlječno-kiselog vrenja među pojedinim sojevima, što ujedno ukazuje na već dobro poznatu složenost prehrane tih bakterija. Pojava da se neke kulture sojeva vrste *Str. diacetylactis* slabije razvijaju u SHP znači da SHP ne pogoduje fermentaciji citrata. Očigledan dokaz za ovu pretpostavku nazire se u činjenici da se većina kultura vrste *L. citrovorum* ne razvija u SHP.

Želimo li uzgajati neku mješovitu kulturu bakterija mlječno-kiselog vrenja u SHP, potrebno je eksperimentalno odrediti kako se koji od članova kulture razvija u SHP, pa tek tada odlučiti o uzgoju mješovite kulture u toj podlozi. Mješovite kulture uzgajane u PHP ili u steriliziranom obranom mlijeku neće zadržati iste odnose ako se uzgajaju u SHP pa se, tako, nameće vrlo zanimljiv rad oko kombiniranja mješovitih kultura od čistih kultura što su sposobne da se barem približno podjednako razvijaju u SHP. Samo takvim kombinira-njem možemo uz poželjni sastav proizvodne kulture zadržati njen sastav stal-nim ako je želimo održavati u SHP »Marstar«.

Zaključak

Specijalna hranjiva podloga (SHP) »Marstar« za uzgoj bakterija mlječno-kiselog vrenja, koja ima prema navodima proizvođača inhibitorna svojstva prema bakteriofagima, ispitana je na njene mogućnosti inhibicije bakteriofagâ u različitim uvjetima. Također je ispitan i njen utjecaj na sposobnost održavanja kulturâ kada se one čuvaju u hladioniku pri temp. od + 2° C.

Ispitivanja su pokazala da SHP, pripremljena prema uputama proizvođača, koči razvoj bakteriofaga i može posve ukloniti infekciju proizvodnih mljekarskih kultura bakteriofagom već nakon trećeg precjepljivanja. Ako se podloga pripremi s kalciniranom vodom (500 mg/l), ni tada ne mijenja svoja inhibitorna svojstva prema bakteriofagima.

Čiste kulture vrsta *Str. lactis*, *Str. cremoris* i *Str. diacetylactis* dobro se razvijaju u SHP, uz razlike u stupnju rasta što se javljaju od soja do soja. Kulture sojeva vrste *L. citrovorum* ne rastu dobro u toj specijalnoj podlozi.

Održljivost kultura u SHP u toku čuvanja u hladioniku pri + 2° C znatno varira unutar pojedinih čistih kultura bakterija mlječno-kiselog vrenja.

Literatura

- ADAMS, M. H.: Bacteriophages. Interscience Publishers, Inc., New York, 1959.
COLLINS, E. B. (1952). *J. Dairy Sci.* **35** 552.
ELLIKER, P. R., ANDERSON, A. W. & HANNESON, G. (1956). *J. Dairy Sci.* **39** 1611.
ELLIKER, P. R., SANDINE, W. E., HAUSER, B. A. & MOSELEY, W. K. (1964). *J. Dairy Sci.* **47** 680.
Federal Register U. S. National Archive (1956). **21** (182) 7020.
GEORGINSON & DAUME (1962). *Food Engineering* **34** 88.
HARGROVE, McDONOUGH & TITSLER (1964). *J. Dairy Res.* **32** 95.
MATHER & BABEL (1959). *J. Dairy Sci.* **42** 1045
POTTER & NELSON (1953). *J. Bact.* **66** 608
REITER (1956). *Dairy Ind.* **21** 877.
WHITEHEAD & HUNTER (1946). *J. Dairy Res.* **14** 64.

MOGUĆNOSTI PRIMJENE REVERZNE OSMOZE U MLJEKARSKOJ INDUSTRIJI*

Petar BRNETIĆ

»PLIVA« tvornica farmaceutskih i kem. proizvoda, Zagreb

Kad se dvije otopine različitih koncentracija, a koje se nalaze pod istim tlakom, odijele semipermeabilnom membranom, otapalo će kroz semipermeabilnu membranu prodirati iz dijela s nižom koncentracijom u dio u kojoj je koncentracija otopljene tvari viša. Takav proces nazivamo osmozom.

Zbog prisutnosti otopljenih molekula snižuje se energetska potencijal otapala, te je on niži u dijelu s višom koncentracijom. Ta smanjena aktivnost uvjetovana je brojem otopljenih molekula.

Referat sa IX. Seminara za mljekarsku industriju, februar 1971, Tehnološki fakultet, Zagreb.