

SIROVO MLEKO KAO IZVOR *BACILLUS* VRSTA ODGOVORNIH ZA KVAR PROIZVODA OD MLEKA

ZORA MIJAČEVIĆ, SNEŽANA BULAJIĆ¹

IZVOD: *Bacillus* spp. su često prisutni kontaminanti sirovog mleka. S obzirom na termorezistent njihovih spora opstaju pri termičkim tretmanima u mlekarskoj industriji. Njihova proteolitička aktivnost dovodi do kvara mleka i time utiče na smanjenu održivost proizvoda od mleka. U radu smo ispitali zastupljenost bacila u sirovom mleku, uticaj temperatura pasterizacije na redukciju bacila u termički obrađenom mleku, kao i proteolitičku aktivnost izolovanih sojeva. Materijal su predstavljala 243 uzorka sirovog mleka, 40 uzoraka pasterizovanog i paralelnih 40 uzoraka sirovog mleka tokom procesa pasterizacije i 60 uzoraka pasterizovanog mleka na kraju perioda održivosti. Proteolitička aktivnost *Bacillus* spp. određivana je na kazeinskom agaru kao "screening" metoda, a analiza proteolitičke aktivnosti celih ćelija *Bacillus* spp. u odnosu na proteinske supstrate je vršena modifikovanom metodom koju su razvili Hill i Gasson (1986). Nivo kontaminacije sirovog mleka sa *Bacillus* spp. je iznosi $2,76 \pm 0,72 \log_{10}$ cfu/ml, pasterizovanog mleka tokom procesa proizvodnje $1,74 \pm 2,52 \log_{10}$ cfu/ml, dok je nivo kontaminacije upakovanog pasterizovanog mleka sa *Bacillus* spp. iznosio $2,38 \pm 0,47 \log_{10}$ cfu/ml. Identifikacijom sojeva *Bacillus* spp. izolovanih iz sirovog mleka ustanovljeno je prisustvo: *B. licheniformis* sa 46,15%, *B. pumilus* sa 15,38%, *B. subtilis* sa 15,38%, *B. brevis* sa 11,54%, *B. sphaericus* sa 7,69 i *B. cereus* sa 3,85%, a u pasterizovanom mleku tokom procesa proizvodnje ustanovljeno je prisustvo *B. subtilis* 71,42%, *B. pumilus* 14,28% i *B. licheniformis* 14,28%. Izolovani sojevi *Bacillus* spp. pokazali su izrazitu proteolitičku aktivnost što za posledicu ima smanjenje održivosti i kvar pasterizovanog mleka.

Ključne reči: bacili, proteolitička aktivnost, kvar proizvoda od mleka

UVOD

Bacili su ubikvitarni mikroorganizmi pa se kontaminacija sirovog mleka ovim mikroorganizmima ne može izbeći, a karakteristika stvaranja termorezistentnih spora čini izvesnim njihov nalaz i u termički tretiranim proizvodima od mleka. Bacili su mikroorganizmi koji imaju značajnu aktivnost proteolitičkih enzima. Proteolitičkom

Originalni naučni rad / *Original scientific paper*

¹ Dr Zora Mijačević, redovni profesor, Mr Snežana Bulajić, asistent, Univerzitet u Beogradu, Fakultet veterinarske medicine

aktivnošću bacila degradira se kazein, i time se narušavaju senzorne karakteristike proizvoda, često dovodeći do pojave gorkog ukusa i slatkog grušanja mleka.

Proteinaze bacila katalizuju hidrolizu peptidnih veza unutar polipeptidnih lanaca. Diferencijacija unutar ove grupe enzima se postiže na osnovu specifičnosti za peptidne veze koje grade određene aminokiseline, kao i na osnovu strukture katalitičkog centra. U odnosu na strukturu katalitičkog centra, odnosno koje bočne grupe aminokiselina sačinjavaju katalitički centar, proteinaze se klasifikuju u četiri tipa: serinske, cisteinske, aspartične i metaloproteinaze. Petu grupu proteinaza čine enzimi čiji mehanizam katalize nije u potpunosti definisan. Proteinaze *Bacillus* spp. većinom pripadaju tipu serinskih i metaloproteinaza (Fira, 1998). U sirovom i termički obrađenom mleku često se dokazuje *B. subtilis*. *Bacillus subtilis* produkuje veliku količinu enzima, koji mogu dovesti do koagulacije mleka (Murray i Kendall, 1969, Puhan, 1966, Puhan i Steffen, 1967, Tsugo i Yamauchi, 1959). Ono što predstavlja interesantnu specifičnost vezanu za ove proteinaze jeste njihov termofilni karakter, aktivne su pri temperaturi ambijenta, ali se njihova optimalna aktivnost uspostavlja pri 65°C. Drugu originalnu karakteristiku ovih proteinaza predstavlja njihov halofilni karakter (El Mayda i sar., 1985).

Mijačević i Bulajić (1998) su ispitujući biohemijske karakteristike sojeva *Bacillus* spp. izolovanih iz sirovog mleka utvrdile da je od 108 ispitivanih sojeva, 86 (79,63%) bilo sposobno da degradira kazein. Isti autori su utvrdili da je od 27 psihrotrofna soja *Bacillus* spp. (sposobni da rastu pri 7°C), 23 (85,18%) imalo karakteristiku razgradnje kazeina. Iz navoda u literaturi jasno se zapaža da nalaz *Bacillus* spp. u sirovom mleku može biti uzrok slabe održivosti termički obrađenog mleka, jer može dovesti do slatke koagulacije mleka ili do pojave gorkog ukusa.

Da bi utvrdili da li postoji problem prisustva bacila u sirovom mleku u radu smo ispitali zastupljenost bacila u sirovom mleku i uticaj temperatura pasterizacije na redukciju bacila u termički obrađenom mleku. Procenu održivosti termički obrađenog mleka uradili smo određivanjem proteolitičke aktivnosti bacila iz mleka.

MATERIJAL I METOD RADA

Materijal su predstavljala 243 uzorka sirovog mleka, koja su uzorkovana u letnjem i zimskom periodu, poreklom sa farme i iz kooperacije i sa tri geografska područja.

Nivo kontaminacije mleka sa *Bacillus* spp. tokom procesa pasterizacije je praćen u vremenu od 90 minuta, pri čemu su paralelno uzimani uzorci sirovog i pasterizovanog mleka u intervalu od 10 minuta. Proizvodni proces je praćen tokom 4 dana. Uzorkovano je 40 uzoraka pasterizovanog i paralelnih 40 uzoraka sirovog mleka. Nivo kontaminacije gotovih proizvoda na kraju perioda čuvanja, praćen je kod 60 uzoraka pasterizovanog mleka

Identifikacija glavnih *Bacillus* spp. morfoloških grupa rađena je prema shemi Parry i sar. (1983) Izolovani sojevi su na osnovu sposobnosti stvaranja lecitinaze, iskorištavanja citrata i sposobnosti anaerobnog rasta raspoređeni u grupe A, B, C, i D. Pored utvrđenih grupa, ostali sojevi su okarakterisani kao *Bacillus firmus* i *Bacillus sphaericus*. Identifikacija je izvršena kod 22 soja *Bacillus* spp. primenom BBL CRYSTAL GP test kita.

Proteolitička aktivnost *Bacillus* spp. određivana je na kazeinskom agaru kao "screening" metoda, a analiza proteolitičke aktivnosti celih ćelija *Bacillus* spp. u odnosu na

proteinske supstrate je vršena modifikovanom metodom koju su razvili Hill i Gasson (1986) Koncentracija produkata hidrolize supstrata, odnosno trihlorsirćetne kiseline (TCA) solubilnih oligopeptida u supernatantu je određivana Lowry-jevom metodom (1951). Za određivanje koncentracija u uzorcima korišćena je standardna kriva napravljena na osnovu merenja vrednosti apsorpcije svetlosti u seriji rastvora goveđeg serum albumina (BSA) poznatih koncentracija. Za arbitrarnu jedinicu (A.U.) proteolitičke aktivnosti uzeta je količina enzima koja u reakciji oslobodi 1 mg TCA solubilnih fragmenata za 1 sat, a proteolitička aktivnost je izračunavana iz razlike koncentracija ovih produkata u uzorku pre i posle završene digestije.

Dobijeni rezultati u ovom radu obrađeni su statističkim metodama (aritmetička srednja vrednost, mere varijacije, statistička značajnost razlike) primenom programa Statgraphics 5.0 (Statistical Graphics Corporation, USA).

REZULTATI RADA I DISKUSIJA

Nivo kontaminacije sirovog mleka bacilima

Nivo kontaminacije sirovog mleka *Bacillus* spp. prikazana je u tabeli 1.

Tabela 1. Nivo kontaminacije sirovog mleka *Bacillus* spp.

Table 1. Level of *Bacillus* spp. contamination in raw milk

Poreklo / Source	Statistički parametri / Statistical parameters				
	n	$X \pm s$ (\log_{10})	Cv (%)	Max	Min
Sirovo mleko / Raw milk	243	2,76±0,72	26,11	5,2	1

Pregledom 243 uzoraka sirovog mleka, utvrđeno je da prosečna vrednost nivoa kontaminacije sirovog mleka *Bacillus* spp., iskazana u \log_{10} cfu/ml, iznosi 2,76±0,72, sa maksimalnom vrednosti 5,2 \log_{10} cfu/ml i minimalnom vrednosti 1 \log_{10} cfu/ml, te koeficijentom varijacije 26,11%.

Zastupljenost vrsta roda *Bacillus* u sirovom mleku

Korištenjem BBL CRYSTAL GP identifikacionog test kita identifikovane su vrste bacila zastupljene u sirovom mleku, a dobijeni rezultati dati u tabeli 2.

Od ukupno 26 identifikovanih sojeva poreklom iz uzoraka sirovog mleka, 12 (46,15%) sojeva je potvrđeno kao *Bacillus licheniformis*, 4 (15,38%) soja su identifikovana kao *Bacillus pumilus*. Oznaku vrste *Bacillus subtilis* je ponelo 4 (15,38%) soja, 3 (11,54%) soja su identifikovana kao *Bacillus brevis*, 2 (7,69%) soja su potvrđena kao *Bacillus sphaericus*, a svega 1 (3,85%) soj je identifikovan kao *Bacillus cereus*.

Tabela 2. Zastupljenost vrsta roda *Bacillus* u sirovom mleku

Table 2. Prevalence of *Bacillus* spp. in raw milk

Vrsta / <i>Species</i>	Distribucija vrsta / <i>Species distribution</i>	
	n	%
<i>B. licheniformis</i>	12	46,15
<i>B. pumilus</i>	4	15,38
<i>B. subtilis</i>	4	15,38
<i>B. sphaericus</i>	2	7,69
<i>B. brevis</i>	3	11,54
<i>B. cereus</i>	1	3,85
<i>Ukupno</i>	26	100

Nivo kontaminacije sirovog i pasteurizovanog mleka tokom procesa proizvodnje

Nivo kontaminacije sirovog i pasteurizovanog mleka tokom procesa proizvodnje prikazan je u tabeli 3.

Tabela 3. Nivo kontaminacije sirovog i pasteurizovanog mleka tokom procesa proizvodnje

Table 3. Contamination level of raw and pasteurized milk during production process

Vreme procesa (min) <i>Time of process (min)</i>	Sirovo mleko <i>Raw milk</i>			Pasteurizovano mleko <i>Pasteurized milk</i>		
	X ± s (log ₁₀)	max	min	X ± SD	max	min
0	2,58 ± 0,52	3,19	2,1	2,52 ± 0,53	3,11	2,1
10	2,52 ± 0,34	3,1	2,2	2,05 ± 1,25	3,4	0
20	2,18 ± 1,32	3,3	0	2,41 ± 0,61	3,5	2,1
30	1,70 ± 1,57	3,1	0	2,43 ± 0,38	3,1	2,15
40	2,02 ± 1,18	3,1	0	1,74 ± 1,25	3,3	0
50	1,86 ± 1,05	2,5	0	2,18 ± 0,26	2,6	1,9
60	2,01 ± 1,27	3,54	0	1,79 ± 1,01	2,3	0
70	2,02 ± 1,20	3,2	0	2,50 ± 0,55	3,1	2,1
80	2,53 ± 0,34	3,13	2,26	2,16 ± 0,06	2,21	2,1
90	2,68 ± 0,70	3,7	2,1	2,40 ± 0,40	3,1	2,1

Rezultati prikazani u tabeli jasno pokazuju da termički tretmani koji se primenjuju u pasteurizaciji mleka ne redukuju značajno *Bacillus* spp., a u pojedinim slučajevima zahvaljujući fenomenu temperaturne aktivacije spore broj *Bacillus* spp. je veći u pasteurizovanom nego u sirovom mleku.

Zastupljenost vrsta roda *Bacillus* tokom procesa proizvodnje

Zastupljenost vrsta roda *Bacillus* u sirovom i pasterizovanom mleku tokom procesa proizvodnje prikazana je u tabeli 4.

Tabela 4. Zastupljenost vrsta roda *Bacillus* u sirovom i pasterizovanom mleku tokom procesa proizvodnje

Table 4. Prevalence of *Bacillus* spp. in raw and pasteurized milk during the production process

Vrsta <i>Species</i>	Distribucija vrsta <i>Species distribution</i>			
	Sirovo mleko <i>Raw milk</i>		Pasterizovano mleko <i>Pasteurized milk</i>	
	n	%	n	%
<i>B.licheniformis</i>	12	92,31	1	7,69
<i>B.pumilus</i>	4	80	1	20
<i>B.subtilis</i>	4	44,44	5	55,56
<i>B.sphaericus</i>	1	100	0	0
<i>B.brevis</i>	3	100	0	0
<i>B.cereus</i>	1	100	0	0

Od ukupno 13 sojeva *Bacillus licheniformis* izolovanih tokom procesa proizvodnje, 12 (92,31%) sojeva je utvrđeno u sirovom mleku, a svega 1 (7,69%) soj u pasterizovanom mleku. Tokom procesa proizvodnje izolovano je i 5 sojeva *Bacillus pumilus*, pri čemu su 4 (80%) soja vodila poreklo iz sirovog, a 1 (20%) soj iz pasterizovanog mleka. *Bacillus subtilis* je tokom procesa proizvodnje bio zastupljen sa 9 sojeva, pri čemu je iz uzoraka sirovog mleka izolovano 4 (44,44%) soja, a iz pasterizovanog mleka 5 (55,56%) sojeva. Rezultati koji su prikazani u tabeli jasno pokazuju da su temperature pasterizacije preživeli sojevi *B. subtilis*, *B. pumilus* i *B. licheniformis*, dok u procesu proizvodnje pasterizovanog mleka nije dokazan *B. sphaericus*, *B. brevis* i *B. cereus*. Nalaz *B. subtilis* u pasterizovanom mleku prema mnogim autorima po pravilu je uzrok kvara jer produkuje veliku količinu enzima, koji razlažu kazein, dovodeći do kvara i time smanjene održivosti pasterizovanog mleka u prometu (Murray i Kendall, 1969, Puhan, 1966b, Puhan i Steffen, 1967, Tsugo i Yamauchi, 1959).

Nivo kontaminacije gotovih proizvoda

Pregledom 60 uzoraka upakovanog pasterizovanog mleka prisustvo *Bacillus* spp. je dokazano kod 45 (75%) uzoraka.

Nivo kontaminacije gotovih proizvoda je analiziran u odnosu na nivo kontaminacije sirovog mleka, koje je poslužilo kao sirovina za dobijanje gotovih proizvoda. Na osnovu ovakve korelacije, moguća kontaminacija gotovih proizvoda se dovodila u vezu ili sa kontaminacijom polazne sirovine, ili sa mogućnošću drugih izvora kontaminacije. Nivo

kontaminacije pasterizovanog mleka u odnosu na nivo kontaminacije sirovog mleka prikazan je u tabeli 5.

Tabela 5. Nivo kontaminacije upakovanog pasterizovanog mleka u odnosu na nivo kontaminacije sirovog mleka

Table. 5. Contamination level of pasteurized milk compared to contamination level of raw milk

Poreklo / Source	Statistički parametri / Statistical parameters				
	n	$\bar{X} \pm s$ (\log_{10})	Cv (%)	Max	Min
Sirovo mleko Raw milk	45	2,57±0,47	18,13	3,7	2,1
Pasterizovano mleko Pasteurized milk	45	2,38±0,47	19,62	3,5	1,1

Pregledom 45 uzoraka sirovog mleka pripremljenog za pasterizaciju, utvrđeno je da je prosečna vrednost nivoa kontaminacije sirovog mleka *Bacillus spp.*, iskazana u \log_{10} cfu/ml vrednosti, iznosi 2,57±0,47, sa maksimalnom vrednosti 3,7 i minimalnom vrednosti 2,1, te koeficijentom varijacije 18,13%. Utvrđeni prosečni nivo kontaminacije pasterizovanog mleka je iznosio 2,38±0,47 \log_{10} cfu/ml, maksimalna vrednost nivoa kontaminacije 3,5 \log_{10} cfu/ml minimalna vrednost 1,1 \log_{10} cfu/ml, a koeficijent varijacije 19,62%.

Kako bi se procenila statistička značajnost nalaza *Bacillus spp.*, u sirovom i termički obrađenom mleku prosečne vrednosti nivoa kontaminacije sirovog i pasterizovanog mleka su statistički obrađene, primenom t-testa. Statistička značajnost nalaza *Bacillus spp.* u sirovom i pasterizovanom mleku je prikazana u tabeli 6.

Tabela 6. Statistička značajnost nalaza *Bacillus spp.* u sirovom i pasterizovanom mleku

Table 6. Statistical significance of *Bacillus spp.* in raw and pasteurized milk

Poreklo / Source	Sirovo mleko / Raw milk
Pasterizovano mleko / Pasteurized milk	1,92

Primenom t-testa utvrđeno je da, s obzirom na nivo kontaminacije *Bacillus spp.*, između uzoraka sirovog i pasterizovanog mleka nema statistički značajne razlike ($p > 0,05$).

Proteolitički potencijal bacila

Potencijal proteolize sojeva *Bacillus spp.* je preliminarno utvrđen testiranjem na agaru sa kazeinom, a proteolitička aktivnost metodom po Lowry-ju i izražena je u arbitrarnim jedinicama (A.U.)

Proteolitička aktivnost pojedinih *Bacillus* vrsta koje su izolovane iz sirovog i pasterizovanog mleka data je u tabeli 7.

Tabela 7. Proteolitička aktivnost *Bacillus* spp. izolovanih iz sirovog i pasterizovanog mleka

Table 7. Proteolytic activity of *Bacillus* spp. isolated from raw and pasteurized milk

Poreklo / Source	Statistički parametri / Statistical parameters			
	n	$\bar{X} \pm s(\log_{10})$	Max	Min
Sirovo Raw milk	14	178,78±34,51	220	98
Pasterizovano Pasteurized milk	9	182,00±35,30	230	118

Procena proteolitičke aktivnosti ispitivanih sojeva bacila rađena je poređenjem sa proteolitičkom aktivnošću referentnih sojeva: *Bacillus subtilis* ATCC6633 čija je proteolitička aktivnost iznosila 100A.U. i *Bacillus* spp BGA 10649 sa proteolitičkom aktivnošću od 112A.U.

Proteolitička aktivnost izolovanih bacila u odnosu na proteolitičku aktivnost referentnih sojeva je izrazito veća. Izolovani bacili pokazuju izrazitu proteolitičku aktivnost. Nalaz proteolitičkih sojeva bacila može uticati na loš ukus pasterizovanog mleka i dovodi do kvara istog u deklarisanom periodu. Polazeći od činjenice da su bacili koji se izoluju iz mleka često proteolitički (Mijačević, Bulajić 1998), a pokazuju i sposobnost rasta na temperaturama <7°C, može se očekivati da utiču na održivost pasterizovanog mleka u prometu.

ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata izvedeni su zaključci:

Nivo kontaminacije sirovog mleka sa *Bacillus* spp. je iznosio 2,76±0,72 log₁₀ cfu/ml, pasterizovanog mleka tokom procesa proizvodnje 1,74-2,52 log₁₀ cfu/ml, dok je nivo kontaminacije upakovanog pasterizovanog mleka sa *Bacillus* spp. iznosio 2,38±0,47 log₁₀ cfu/ml.

t-testom je utvrđeno da nema statistički značajne razlike u broju bacila u sirovom i pasterizovanom mleku.

Identifikacijom sojeva *Bacillus* spp. izolovanih iz sirovog mleka ustanovljeno je prisustvo : *B. licheniformis* sa 46,15%, *B. pumilus* sa 15,38%, *B. subtilis* sa 15,38%, *B. brevis* sa 11,54%, *B. sphaericus* sa 7,69 i *B. cereus* sa 3,85%, a u pasterizovanom mleku tokom procesa proizvodnje ustanovljeno je prisustvo *B. subtilis* 71,42%, *B. pumilus* 14,28% i *B. licheniformis* 14,28%.

Izolovani sojevi *Bacillus* spp. pokazali su izrazitu proteolitičku aktivnost što za posledicu ima smanjenje održivosti i kvar pasterizovanog mleka.

LITERATURA

EL MAYDA, E., PAQUET, D., RAMET J. P., LINDEN G.: Enzymatic proteolysis of milk proteins in a salt environment with a *Bacillus subtilis* neutral protease preparation. J. Food Sci. 50:745 (1985).

- FIRA, Đ.: Karakterizacija ekstracelularnih proteinaza bakterija iz rodova *Staphylococcus* i *Lactobacillus*. Doktorska disertacija, Beograd (1998).
- HILL, S. H. A., GASSON, M. J. A qualitative screening procedure for the detection of casein hydrolysis by bacteria using sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *J.Dairy Res.* 53: 625-629 (1986).
- LOWRY, O. H., ROSEBOUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R.J.: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275 (1951).
- MIJAČEVIĆ, Z., BULAJIĆ, S.: Examination of biochemical characteristics of bacilli isolated from raw milk. *Acta Veterinaria*, 48 (1):59-68 (1998).
- MURRAY, E. D., KENDALL, M. S.: Making cheese using a modified bacterial enzyme complex from the genus *Bacillus*. U.S. Patent 3:997 (1969).
- PARRY, J. M., TURNBULL, P. C. B., GIBSON, J. R.: A colour atlas of *Bacillus* species. Wolfe Medical Publication Ltd., London (1983).
- PUHAN, Z.: Die Anwendung einer *Bacillus subtilis*-Protease als Labersatzstoff. Disertacija N. 3861 ETH Zurich, (1966).
- PUHAN, Z., STEFFEN, C.: Studie Ueber die Proteolytische Wirkung einiger mikrobieller Labersatzstoffe auf die Proteine der Milch von Moment des Einlaben bis zum reifen Kaese. *Schweiz. Milchztg.*, 93 (56),m WB 114:937 (1967).
- TSUGO, T., YAMAUCHI, K.: Comparison of clotting action of various milk coagulating enzymes. I. Comparison of factors affecting clotting time of milk. *XVth Int. Dairy Congr.*, 2:636 (1959).

RAW MILK AS A SOURCE OF *BACILLUS* SPP. RESPONSIBLE FOR THE SPOILAGE OF MILK PRODUCTS

ZORA MIJAČEVIĆ, SNEŽANA BULAJIĆ

Summary

Bacillus spp. are often present as contaminants in raw milk. Due to thermo resistance of their spores, bacilli survive after the heat treatment in milk industry. The proteolytic activity of bacilli leads to spoilage of milk and milk products and according to that influenced the durability of milk product. The material of investigation consisted of 243 samples of raw milk, 40 samples of pasteurized milk and corresponding 40 samples of raw milk during the milk pasteurization and 60 samples of pasteurized milk on expiry date. The proteolytic activity of bacilli was determined according to modified method that is established by Hill and Gasson (1986). The level of *Bacillus* spp. contamination of raw milk was $2,76 \pm 0,72 \log_{10}$ cfu/ml, $1,74 \pm 2,52 \log_{10}$ cfu/ml for pasteurized during production process, and level of *Bacillus* spp. contamination of final product-pasteurized milk was $2,38 \pm 0,47 \log_{10}$ cfu/ml. It was determined the presence of following species: *B. licheniformis* 46,15%, *B. pumilus* 15,38%, *B. subtilis* 15,38%, *B. brevis* 11,54%, *B. sphaericus* 7,69%, *B. cereus* 3,85% in raw milk and *B. subtilis* 71,42%, *B. pumilus* 14,28% i *B. licheniformis* 14,28% in pasteurized milk during the production process. Isolated strains of *Bacillus* spp. showed significant proteolytic activity which have influenced the durability of pasteurized milk.

Key words: bacilli, proteolytic activity, spoilage of milk products.