

## L'effet de la nisine comparativement à celui du perhydrol sur la prévention du gonflement butyrique et sur la valeur nutritive du fromage Edam

par

I. GONTZEA\*, C. TOMA\*\*, Z. BARDUTA\*, E. MOLDOVAN\*\*,  
S. CALINESCU\*\* et E. MAVROMATI\*\*

L'utilisation des fourrages mal ensilés et des divers sous-produits végétaux dans l'alimentation des vaches laitières, modifie le nombre des germes dans le lait, et surtout l'espèce de la flore microbienne, en faisant augmenter l'incidence des bactéries anaérobies sporulées (*Cl. butyricum*, *Cl. Tyrobutyricum*, *Cl. sporogènes*, etc.). En étant capables de transformer l'acide lactique et l'acide acétique en acide butyrique et en gaz (CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>) ces bactéries provoquent beaucoup de difficultés aux fabriques de fromages à pâte cuite et demi-cuite (Emmental, Gouda, Edam, etc.) à cause de l'apparition de propriétés organoleptiques (odeur, goût), fort désagréables, accompagnées du gonflement de ces produits, ce qui les rend impropres à la consommation.

Dans les échantillons d'Emmental, préparé à partir de lait obtenu d'animaux fourragés exclusivement au foin, on a trouvé de nombreuses bactéries butyriques sans en constater le gonflement ou la modification des qualités sensorielles. Certains chercheurs en ont déduit que les fourrages ensilés, contiennent un facteur inconnu, ou bien une biocénose spéciale qui favorise l'altération alors que d'autres considèrent que celle-ci est provoquée seulement par la présence du *Cl. tyrobutyricum*, les bactéries butyriques habituelles n'étant pas nuisibles ou incomparablement moins nocives [7, 29, 48].

Bien qu'on eût généralisé la pratique du traitement thermique du lait, à cause de la thermo-résistance des spores, la pasteurisation

---

\* Centre de Recherches sur la Nutrition de l'Institut de Médecine et de Pharmacie, Bucarest (Roumanie). Directeur Prof. Dr I. Gontzea (Str. Dorobantilor, nr. 244 Bucarest - Roumanie).

\*\* Section du lait de l'Institut de Recherches Alimentaires, Bucarest (Roumanie). Chef Ing. C. Toma.

habituellement utilisée n'aboutit pas aux résultats technologiques escomptés. Dans le but de prévenir le gonflement du fromage et ses conséquences, on a eu recours à l'utilisation d'antiseptiques (nitrate, perhydrol) ou bien à des souches bactériennes capables de modifier l'équilibre écologique ou d'empêcher, par certains de leurs métabolites, le développement de la flore anaérobie sporulée (par exemple le streptocoque nisinogène) ou bien encore à l'incorporation de certaines substances bactériostatiques naturelles, par exemple le blanc d'œuf ou le lysosyme isolé à partir de celui-ci [37].

Le nitrate de sodium admis dans certains pays d'Europe dans le but de prévenir le gonflement des fromages à pâte cuite ou demi-cuite par son action bactériostatique, surtout après être transformé en nitrite (sous l'influence de la microflore réductrice du produit), peut inhiber la prolifération des *clostridium*. Mais, le nitrite a le désavantage de rendre inactive environ 12 p. 100 de la lysine et lorsque sa concentration dépasse 15-20 mg p. 100, le fromage peut provoquer des troubles surtout chez les enfants et chez les personnes anémiques [12, 28, 47].

Dans le cas du traitement du lait par le perhydrol 30-35 p. 100 (en proportion de 0,05-0,15 p. 100), l'oxygène dit « naissant » détruit la plupart des bactéries nuisibles. Vu que le perhydrol inactive une partie des thioaminoacides et des vitamines sensibles à l'action de l'oxygène (A, B<sub>2</sub>, C, E, etc.), afin de diminuer cet effet et d'éviter l'action irritante pour la muqueuse gastrique, on a recours à la décomposition du perhydrol rémanent (après 10-20 mn) en incorporant de la catalase supplémentaire à celle existante dans le lait.

Ce procédé a constitué l'objet d'un grand nombre de recherches, mais les résultats ne sont pas concordants (7, 10, 21, 36, 38, 40, 42, 45, 51].

Après avoir découvert (1933) parmi les bactéries lactiques certaines souches de streptocoques capables d'inhiber le développement des micro-organismes anaérobies sporogènes, et surtout après avoir isolé la nisine (1945-1947) qui exerce l'effet favorable, on a utilisé cette substance afin de prévenir le gonflement tardif des fromages. En tenant compte, d'une part, que le streptocoque générateur de nisine est très fréquemment trouvé dans le lait cru, dans les produits acido-lactiques, dans les fromages, aussi bien que dans le pharynx et dans les fèces de l'homme ; d'autre part, que la nisine est une protéine à petite molécule (environ 10 000) et qu'elle est hydrolysée par les sucs digestifs, on a conclu qu'elle n'est pas du tout nuisible et son utilisation est admise dans beaucoup de pays (Angleterre, Australie, Belgique, Tchécoslovaquie, France, Allemagne, Israël, Italie, Pologne, U.S.A., etc.) sans limiter la concentration maximale. A l'appui de cette conclusion viennent les résultats des recherches toxicologiques, qui ont constaté que l'administration per os d'une dose jusqu'à 1 400 fois plus grande que celle trouvée dans 500 g de fromage obtenu à

partir du lait traité à la nisine ne provoque aucun trouble [11, 12, 20, 22, 24, 46].

De nombreuses recherches ont confirmé la capacité de la nisine d'inhiber les *clostridium* considérés comme la cause du gonflement tardif des fromages, mais les résultats obtenus en pratique n'ont pas été similaires. Le manque d'efficacité est dû, d'une part au fait que la nisine freine aussi le développement de la flore lactique indispensable à la prématuration au cours de laquelle se réalise l'acidification nécessaire, d'autre part au fait qu'elle n'inhibe pas certaines souches de streptocoques et les coliformes, qui sont capables d'élaborer une enzyme (nisinase) qui peut la décomposer. Vu l'action de ces bactéries, la concentration de la nisine dans le produit diminue, de sorte qu'au bout de 30-45 j, elle représente seulement la moitié de la valeur initiale. Puisque les colibacilles peuvent être détruits dans la plus grande partie par la pasteurisation, l'élimination du plus important des inconvénients (l'inhibition de la flore lactique) a été réalisée par l'obtention des bactéries lactiques nisinorésistantes, qui permettent l'évolution normale du processus de la prématuration et de la maturation des fromages préparés avec du laitensemencé par des souches nisinogènes ou traité par la nisine. Dans ce but on a recommandé la dose de 40-50 Unités Reading par ml de lait et pour la fabrication des fromages fondus certains chercheurs ont utilisé 100 et même 200 U.R./g [1, 2, 3, 5, 13, 15, 16, 23, 25, 26, 30, 31, 32, 35, 41].

En tenant compte d'une part de l'importance pratique de prévenir la fermentation butyrique dans les fromages à pâte cuite et demi-cuite, d'autre part du caractère contradictoire des résultats obtenus jusqu'à présent et du manque d'une recherche comparative, nous avons considéré utile de contrôler expérimentalement l'effet de la nisine et celui du perhydrol, tant sur les propriétés organoleptiques, physico-chimiques et microbiologiques des fromages type Edam, que sur la valeur nutritive des produits obtenus par ces traitements.

## I. — MATERIEL ET METHODE

Comme matière première on a utilisé le lait de vaches, dont les principales caractéristiques ont été :

— acidité . . . . .	= 17,6 — 19,0°T
— substance sèche . . . . .	= 11,72 — 12,44 g p. 100
— protéines . . . . .	= 3,40 — 3,87 g p. 100
— lipides . . . . .	= 3,80 — 4,20 g p. 100

Afin de saisir l'effet des deux substances (le perhydrol et la nisine), on a considéré nécessaire de préparer un échantillon témoin à partir du lait non traité. Dans le but d'éviter que les différences entre les lots soient déterminées par l'inégalité du nombre et surtout de la nature des bactéries initiales, le lait utilisé pour la préparation

des fromages a été d'abord pasteurisé (30 mn à 63° C) et puisensemencé avec la même quantité de spores (500-1000/ml environ), provenant des cultures pures de *Cl. butyricum*, *Cl. tyrobutyricum* et *Cl. sporogènes*, isolées des fromages gonflés. Après avoir déterminé le nombre des bactéries *Coli* et des spores butyriques, le lait a été divisé en trois parties égales (200 l environ). Dans une de ces parties (N) on a introduit la nisine dissoute dans HCl (0,025 N) à savoir 40 U.R. par ml ; dans la deuxième (P) on a introduit du perhydrol à 35 p. 100 (0,8 g par litre), qui, 10 mn après, a été décomposé par la catalase incorporée (43 ml/1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilisé) ; la troisième partie a constitué le témoin (T) non traité. Pour le lait traité par la nisine (N) on a utilisé comme levain une flore lactique (0,7 p. 100) nisinorésistante (jusqu'à la concentration maximale de 300 U.R./g), dont l'acidité était de 83-99° T ; dans les autres échantillons, on a introduit des cultures Hansen usuelles (0,4 p. 100), dont l'acidité oscillait de 87 à 116° T.

Les produits (17 séries de ces triplés) ont été préparés conformément à la technologie habituelle pour la fabrication des fromages d'Edam. Dans le but de voir l'effet des deux sortes de levain, dans 5 de ces fabrications on a mesuré l'acidité et le pH du fromage 1, 8, 20 et 70 h après être préparés. On y a déterminé le nombre des spores et la concentration de la nisine après 10 et 45 j, et le 45<sup>e</sup> j on a vérifié certaines caractéristiques physico-chimiques (humidité, pH, contenu en protéines, en lipides et en acides aminés libres), ainsi que les propriétés organoleptiques des produits.

Pour connaître le nombre des spores on a utilisé le milieu de Hirsh-Grinsted (Reinforced-Clostridial-Medium\*), et, en ce qui concerne la quantité de nisine on l'a déterminée en suivant la sensibilité de la souche *Str. cremoris* IP<sub>5</sub> pour diverses dilutions dans un milieu contenant du lait en poudre, durant 16-18 h à 30° C, temps nécessaire pour la coagulation de l'échantillon témoin. L'acidité, l'humidité, les lipides et les protéines ont été déterminés par les procédés communs, et les acides aminés libres (indicateurs de maturation) ont été mesurés par chromatographie sur papier dans le fromage dégraissé [6, 14, 53].

Afin d'établir la valeur biologique des trois groupes de produits, on a comparé leur efficacité à promouvoir la croissance de rats après le sevrage. Dans ce but on a utilisé des échantillons qui le 45<sup>e</sup> j (depuis leur préparation) avaient des propriétés organoleptiques adéquates. Après l'examen bactériologique et physico-chimique, les produits ont été inclus dans des régimes complets isocaloriques et isoprotéiques (tab. 1). Du fait que le fromage constitue une importante source de protéines animales et afin de faciliter l'observation de l'effet d'éventuels changements dans la composition en acides aminés

\* Produit américain (Milles), dont l'activité enzymatique est de 46,88 U.K./ml.

TABLEAU 1. — Composition du régime

Composants	Quantité (g p. 100)	Protéines (g)
Fromage (T.N.P.)	32-36 (selon le contenu en azote)	8,75
Amidon	58-62	0,50
Levure de bière séchée	2,5	1,28
Mélange salin (Osborne-Mendel)	1,5	—
Papier filtre	2,0	—
Total	100,0	10,53

due au procédé technologique employé, le contenu en protéines des régimes a été un peu réduit (10,53 g p. 100).

Les recherches ont été effectuées en trois séries ; les deux premières comprenaient chacune 3 lots et la dernière, lorsqu'on a poursuivi l'effet de l'inclusion de nisine dans le régime (45 mg pour 100 g), comprenait seulement 2 lots. Au total on a utilisé 80 animaux comparables au point de vue du sexe, de l'âge et du poids (45-50 g), chaque raton d'un lot ayant son témoin dans les autres lots. Les animaux étaient placés dans des cages individuelles et la nourriture, fournie en quantités égales. Pour connaître la consommation réelle de chaque animal, on a pesé les restes tous les jours. La période d'observation a duré 1 mois, les rats étant pesés après chaque décade. En connaissant la quantité de nourriture ingérée, son contenu en protéine et le gain pondéral, on a calculé *l'indice de consommation* (quantité consommée pour un gain pondéral de 1 g) et *l'efficacité protéique* (gain pondéral pour chaque gramme de protéine consommée).

## II. — RESULTATS

A partir des données trouvées dans les mêmes conditions et phases du processus technologique pour chaque indicateur et chaque produit étudié dans les 17 séries de fabrications, on a calculé les valeurs moyennes avec leurs erreurs standard qui sont présentées dans les tableaux ci-joints. En les interprétant, on n'a tenu compte des différences entre les produits ou entre les diverses phases technologiques que lorsqu'elles ont été garanties par les calculs statistiques (test *t*) avec une certitude de minimum 95 p. 100 ( $p < 0,05$ ).

### 1) Evolution de l'état bactériologique

Les valeurs présentées dans le tableau 2 montrent qu'après la pasteurisation, le nombre total des germes aussi bien que le nombre

des *Coli* se sont maintenus aux niveaux assez élevés ; toutefois, le nombre des anaérobies sporulés avant l'inoculation des *Clostridium* était relativement réduit.

Bien que la quantité des spores introduites après la pasteurisation eût été la même (500-1000/ml), leur nombre a augmenté dans tous les produits ; cependant le rythme de l'augmentation a varié avec la nature du traitement et la phase de maturation. Après 10 j et après 1 mois et demi, la prolifération la plus intense a été observée dans le produit témoin (*T*) et la moindre, dans celui obtenu à partir du lait traité au perhydrol et à la catalase, (*P*) le produit à la nisine (*N*) occupant une position intermédiaire.

## **2) Evolution de l'acidité et du pH pendant les 3 premiers jours après la séparation du caillot**

Des données inscrites dans le tableau 3, on voit qu'au cours des premières 8 et même 20 h, le pH du fromage préparé avec du lait traité par la nisine était plus élevé que celui du produit obtenu par le procédé au perhydrol et à la catalase et surtout que celui du témoin ( $p < 0,05$ ).

## **3) Variation de la concentration en nisine**

Les valeurs présentées dans le tableau 4 montrent que pendant la maturation le contenu du fromage en nisine a diminué continuellement. La concentration moyenne trouvée le 10<sup>e</sup> j a été de 32 p. 100 plus réduite que celle trouvée 20 h après la préparation du fromage. Après 45 j, la nisine ne se trouvait plus en quantité dosable que dans la moitié des échantillons examinés.

## **4) Caractéristiques physico-chimiques**

Des résultats exposés dans les tableaux 5 et 6, on constate qu'à l'exception de l'humidité, un peu plus élevée pour les échantillons *N* mais non significativement ( $p = 0,11$ ), aucune des autres propriétés physico-chimiques étudiées n'a différencié, ni d'un produit à l'autre, ni en fonction de l'intervalle (phase de maturation). Après 45 j le contenu en quelques acides aminés libres dans les échantillons de fromage *N* était significativement ( $p < 0,001$ ) plus élevé que dans les autres. A la différence des échantillons *T* et *P*, on a trouvé des quantités appréciables de tyrosine dans ceux préparés au lait avec la nisine. Après 45 j, les différences entre les valeurs moyennes du rapport de maturation ont été très réduites (mais statistiquement significatives) ; le rapport de décomposition dans les échantillons *N* fut plus élevé que dans les autres, mais la différence n'était significative au point de vue statistique ( $p < 0,05$ ) que comparativement à l'échantillon *T*. Ce fait montre une dégradation plus avancée des protéines dans le fromage obtenu au lait traité avec la nisine et le levain nisinorésistant.

TABLEAU 2

Nombre des bactéries du lait après la pasteurisation et après l'ensemencement avec spores et le nombre de ceux-ci dans le fromage à divers intervalles

Produit		Le nombre des bactéries dans le lait après la pasteurisation et après l'introduction des spores					
Symbole	Nombre d'échantillons	Nombre total/ml		Coliformes/ml		Sporogènes anaérobies/ml	
		Valeur moyenne	E.S.	Valeur moyenne	E.S.	Valeur moyenne	E.S.
T	17	127.10 <sup>4</sup>	± 7,94.10 <sup>4</sup>	0,3.10 <sup>4</sup>	± 1,6.10 <sup>4</sup>	10 <sup>8</sup>	± 0,38.10 <sup>8</sup>
N	17	127.10 <sup>4</sup>	± 7,9.10 <sup>4</sup>	0,3.10 <sup>4</sup>	± 1,6.10 <sup>4</sup>	10 <sup>8</sup>	± 0,38.10 <sup>8</sup>
P	17	4,5.10 <sup>4</sup>	± 19,8.10 <sup>4</sup>	3,310 <sup>4</sup>	± 1,7.10 <sup>4</sup>	10 <sup>8</sup>	± 0,38.10 <sup>8</sup>
Signification des différences		Entre T - N p = 0 T - P p < 0,001 N - P p < 0,001		Entre T - N p = 0 T - P p = 0,07 N - P p = 0,07		Entre T - N p = 0 T - P p = 0 N - P p = 0	

		Nombre de spores/g dans le fromage après				Signification des différences entre a - b
		10 jours (a)		45 jours (b)		
		Valeur moyenne	E.S.	Valeur moyenne	E.S.	
T	17	6,3.10 <sup>8</sup>	± 1,4.10 <sup>8</sup>	63.10 <sup>3</sup>	± 13.10 <sup>8</sup>	p < 0,001
N	17	5,5.10 <sup>8</sup>	± 1,3.10 <sup>8</sup>	39.10 <sup>3</sup>	± 12.10 <sup>8</sup>	p < 0,05
P	17	4,6.10 <sup>8</sup>	± 1,3.10 <sup>8</sup>	9,9.10 <sup>3</sup>	± 16.10 <sup>8</sup>	p > 0,05
Signification des différences		Entre T - N p > 0,05 T - P p > 0,05 N - P p > 0,05		Entre T - N p > 0,05 T - P p > 0,01 N - P p > 0,05		



TABLEAU 4. — Le contenu du fromage en nisine

Intervalle du prélèvement de l'échantillon	Nombre d'échantillons	Contenu moyen U.R./g	E.S.	Signification des différences
A (20 h)	14	175	± 9,33	Entre A et B $p = 0,003$ » A et C $p < 0,001$ » B et C $p < 0,001$
B (10 j)	14	119	± 8,66	
C (45 j)	14	9	± 4,58	

TABLEAU 5. — Caractères physico-chimiques après 45 j

Produit		Valeur moyenne	E.S.	Signification des différences
Symbole	Nombre d'échantillons			
pH				
T	17	5,49	± 0,074	Entre T - N p > 0,05 » T - P p > 0,05 » N - P p > 0,05
N	17	5,35	± 0,077	
P	17	5,32	± 0,056	
Substance sèche (g p. 100)				
T	17	57,52	± 1,08	» T - N N » T - P p = 0,11 » N - P p < 0,11
N	17	57,37	± 0,85	
P	17	60,11	± 0,57	
Protéines dans la substance sèche (g p. 100)				
T	17	44,64	± 1,11	» T - N p > 0,05 » T - P p > 0,05 » N - P p > 0,05
N	17	43,56	± 0,78	
P	17	45,75	± 1,38	
Lipides dans la substance sèche (g p. 100)				
T	17	47,01	± 1,12	» T - N p > 0,05 » T - P p > 0,05 » N - P p > 0,05
N	17	46,57	± 0,50	
P	17	47,42	± 0,78	
Chlorure de sodium (g p. 100)				
T	17	2,17	± 0,068	» T - N p > 0,05 » T - P N » N - P p > 0,05
N	17	2,58	± 0,30	
P	17	2,18	± 0,05	
Rapport de maturation				
T	17	0,2318	± 0,000031	» T - N p < 0,001 » T - P p < 0,001 » N - P p < 0,001
N	17	0,2391	± 0,000031	
P	17	0,2438	± 0,000006	
Rapport de décomposition				
T	6	0,031	± 0,004	» T - N p < 0,05 » T - P p > 0,05 » N - P p < 0,05
N	6	0,053	± 0,004	
P	6	0,037	± 0,008	

TABLEAU 6

Le contenu du fromage en quelques-uns des acides aminés libres après 45 j (mg dans 100 g d'extrait sec)

Produit		Contenu moyen	E.S.	Signification des différences
Symbole	Nombre d'échantillons			
Lysine + Histidine + Asparagine				
T	13	377	± 7,87	Entre T - N p < 0,05 » T - P p > 0,05 » P - N p < 0,05
N	13	841	± 15,80	
P	13	393	± 10,60	
Valine + Méthionine				
T	13	169	± 7,30	» T - N p < 0,001 » T - P p > 0,05 » P - N p < 0,001
N	13	257	± 12,49	
P	13	178	± 5,00	
Leucine + Isoleucine				
T	13	211	± 7,80	» T - N p < 0,001 » T - P p < 0,001 » P - N p > 0,05
N	13	352	± 15,97	
P	13	313	± 15,62	
Thréonine + Acide glutamique + Alanine				
T	13	245	± 7,14	» T - N p < 0,001 » T - P p < 0,001 » P - N p < 0,001
N	13	599	± 27,96	
P	13	333	± 10,05	
Proline				
T	13	98	± 2,01	» T - N p = 0,001 » T - P p = 0,03 » P - N p < 0,05
N	13	122	± 4,58	
P	13	109	± 2,82	
Arginine + Glycine				
T	13	212	± 8,30	» T - N p < 0,001 » T - P p > 0,05 » P - N p < 0,001
N	13	336	± 15,40	
P	13	189	± 8,00	
Tyrosine				
T	13	0	± —	» T - N p < 0,001 » T - P p = 0,13 » P - N p < 0,001
N	13	313	± 7,70	
P	13	11,80	± 7,70	

### 5) Propriétés organoleptiques

Au bout de 45 j environ la moitié des échantillons *T* ou *N* n'ont pas obtenu le pointage minimum et les autres ont été de deuxième qualité. A l'opposé, tous les échantillons *P* ont été de première qualité (fig. 1).

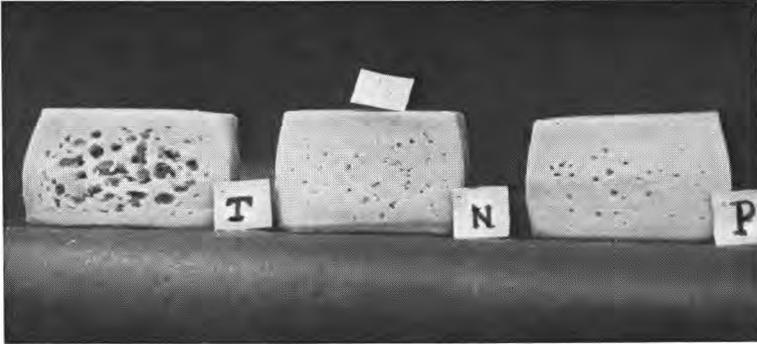


fig. 1

Aspect des 3 échantillons de fromages de la même série (14<sup>e</sup> de fabrication).

(*T* = témoin ; *N* = fromage obtenu au lait avec nisine et *P* = fromage préparé au lait traité au perhydrol et à la catalase)

### 6) Valeur nutritive des produits

Puisque les données individuelles des deux séries d'expériences ont été très semblables et les recherches effectuées sur des animaux du même âge et sexe durant des périodes égales, les valeurs moyennes et leurs erreurs standard ont été calculées après les avoir totalisées, pour chaque indicateur et pour chaque produit.

En comparant les résultats inscrits dans le tableau 7 et en ne retenant que ceux dont les différences sont garanties par le calcul statistique, on constate que l'efficacité nutritionnelle du fromage *N* a été significativement plus élevée que celle des autres. Durant 1 mois, les rats maintenus au régime *N* ont gagné en poids 11,6 p. 100 de plus que les animaux nourris au régime *T* et 13,6 p. 100 de plus que ceux maintenus au fromage *P* (p 0,05). Pour gagner 1 g de poids les rats recevant le fromage *N* ont consommé 14,2 p. 100 moins de nourriture que ceux maintenus au fromage *T* et 19,3 p. 100 moins que les rats recevant le régime au fromage *P* (p 0,001). L'efficacité protéique du régime *N* a été respectivement de 5 p. 100 et 11 p. 100 plus élevée qu'avec les régimes *T* et *P* (p 0,001).

TABLEAU 7

Efficiencce nutritionnelle du fromage préparé à partir du lait traité avec nisine (*N*) ou perhydrol et catalase (*P*), comparativement à celui obtenu du lait non traité (*T*)

Lot	Nombre d'animaux	Fromage (mode de préparation)	Gain pondéral	Indice de consommation	Efficiencce protéique
T	20	Lait non traité	112 ± 2,2	3,44 ± 0,04	2,83 ± 0,04
P	20	Lait traité au perhydrol et catalase	110 ± 4,4	3,60 ± 0,05	2,71 ± 0,04
N	20	Lait traité avec nisine	125 ± 4,1	3,01 ± 0,04	3,01 ± 0,04
Signification des différences					
Entre T - P			N	N	p < 0,05
» T - N			p < 0,05	p < 0,001	p < 0,001
» P - N			p < 0,05	p < 0,001	p < 0,001

### III. — DISCUSSION

En essayant d'intégrer les données obtenues séparément pour chaque indicateur dans un système corrélatif plus complet, un premier fait évident concerne le retard de l'acidification au cours des 20 premières heures dans le fromage *N* par rapport aux deux autres. Partiellement, le retard pourrait être attribué au levain utilisé pour les fromages *T* et *P*, qui a été plus acide que celui résistant à la nisine (87-116° T vis-à-vis de 83-99° T). Toutefois, en tenant compte des quantités incorporées (0,4 vis-à-vis de 0,7 p. 100), il est moins probable que les différences dans l'évolution initiale du pH soient dues aux différences de l'acidité des levains. Vu que les bactéries nisinogènes et la nisine inhibent les « starters » lactobacilles qui produisent les fermentations lactiques des stades initiaux de prématuration des fromages, il paraît plus plausible, bien qu'on eût utilisé le levain résistant à la nisine, que la présence de cet antibiotique (175 U.R./g 20 h après la séparation du caillot) a freiné le début de la prolifération ou l'efficacité de son action fermentative ; cependant, après 70 h de contact avec la nisine, soit que la concentration de celle-ci ait diminué ou que la tolérance des micro-organismes lactiques ait augmenté, les différences avaient disparu. La résistance des bactéries lactiques envers la nisine étant limitée (seulement jusqu'à 300 U.R./g), la concentration de cet antibiotique dans le lait n'a pu dépasser 40 U.R./ml ; mais dans le fromage, 20 h après la séparation du caillot, on n'a trouvé que 175 U.R./g, le reste s'éliminant avec le petit-lait [31].

Quoique initialement le nombre des spores des *Clostridium* eût été identique, son augmentation durant la maturation a varié dans de larges limites d'un produit à l'autre. Alors que pour les échantillons *P* le nombre des spores dans l'intervalle de 10 à 45 j n'a augmenté que 2 fois, dans le cas des échantillons *T* la quantité des spores dans le même laps de temps a augmenté de 10 fois et pour les échantillons *N* de 6 fois.

Si l'on tient compte que la nisine n'inactive pas les spores, mais seulement les formes végétatives des bactéries anaérobies et que la concentration de la nisine a été même dès le 10<sup>e</sup> j significativement ( $p = 0,003$ ) plus réduite que la quantité initiale et qu'après 45 j cette substance n'a plus été trouvée que dans la moitié des échantillons examinés, l'augmentation du nombre des spores peut être attribuée à la disparition de l'antibiotique et à la prolifération compensatrice des bactéries anaérobies en l'absence de l'effet inhibiteur exercé par celui-ci.

La concentration de la nisine dans le fromage 20 h après la séparation du caillot était de 175 U.R./g, toutefois on a constaté le gonflement dans 50 p. 100 des échantillons examinés, ce qui concorde plus

ou moins avec les résultats publiés par d'autres auteurs. Dans des recherches sur des fromages fondus on a constaté que même la dose de 200-250 U.R./g n'empêchait pas complètement l'altération ; dans le cas d'un ensemencement avec des spores du *Cl. butyricum* et *Cl. tyrobutyricum* (600-1000/g), la dose de 100 U.R./g ne prévenait pas la fermentation butyrique et le gonflement, mais celle de 150 U.R./g réduisait de 50 p. 100 l'incidence de ce défaut dans les produits maintenus à 16-18° C et faisait obstacle à son apparition durant 3 mois à 8-10° C. D'autre part, la dose de 180-200 U.R./g prévenait durant 2-4 semaines le gonflement des produits maintenus à 18-27° C, tandis que dans les échantillons témoins le défaut apparaissait au cours des 5 premiers jours. La dose de 200 U.R./g ou plus grande, en inhibant même les bactéries lactiques nisinorésistantes, a empiré les propriétés organoleptiques du produit et les doses très réduites (20-50 U.R./g) n'ont pas empêché la fermentation butyrique, et quelquefois au contraire, elles ont même stimulé son apparition [16, 19, 35, 52].

Le contenu bien plus élevé des acides aminés libres et l'apparition de la tyrosine dans le fromage *N* 45 j après préparation, pourraient être interprétés en admettant que le processus de maturation évolue plus rapidement en présence de nisine qu'en son absence. En tenant compte de la croissance continue du nombre des spores anaérobies et de l'évolution des qualités organoleptiques du produit, il est plus probable que la différence concernant le contenu en acides aminés libres est due aux modifications dans l'équilibre bactérien provoquées par la présence de nisine dans la première phase de maturation.

L'interprétation des dissemblances constatées dans la valeur nutritive des produits et surtout leur intégration dans le cadre des modifications survenues dans l'évolution du nombre des spores, de la concentration de la nisine et des qualités organoleptiques, est difficile. Comme le facteur limitant de la valeur nutritive de la caséine est représenté par les thioaminoacides, l'infériorité nutritionnelle du fromage *P* peut être attribuée à la réduction de son contenu en ces acides aminés et en certaines vitamines (A, B<sub>2</sub>, C, E) constatée par d'autres chercheurs [33, 34, 50].

La supériorité nutritionnelle du fromage *N*, trouvée à même ampleur dans deux séries d'expériences, ne peut être mise en doute. Le fait que dans les échantillons testés on n'ait pu doser la nisine montre que l'effet trophodynamique de celle-ci s'est exercé, non par son action directe sur l'organisme animal, mais par l'intermédiaire du produit traité, en le rendant plus facilement utilisable (au point de vue digestif), ou bien en favorisant le développement de certaines bactéries capables d'enrichir le produit en quelques-unes des trophines. Mais, comme le régime comprenait toutes les substances nutritives nécessaires à la croissance des rats en quantités largement suffisantes, cette dernière interprétation est plus difficile à soutenir.

TABLEAU 8

Effet de l'incorporation de 45 mg de nisine pour 100 g de régime isonitrique contenant du fromage obtenu à partir du lait non traité (après 30 j)

Lot	Nombre d'animaux	Poids du corps		Gain pondéral	Indice de consommation	Efficience protéique
		initial	final			
Témoin (T)	10	45	132 ± 4	87 ± 4	3,76 ± 0,06	2,52 ± 0,04
Nisine (N)	10	45	157 ± 6	112 ± 7	3,50 ± 0,07	2,73 ± 0,06
Signification des différences			p = 0,001	p = 0,001	p = 0,003	p = 0,03

Les données consignées dans le tableau 8 montrent que la présence de nisine augmente significativement la valeur nutritive du régime lorsqu'elle lui est directement incorporée (45 mg pour 100 g de régime). La composition du régime et son contenu en azote étant identiques (quantitativement et qualitativement), cet avantage nutritionnel ne peut être attribué qu'à la présence de l'antibiotique. La consommation de nourriture étant de 8-12 g par jour, cela signifie que la dose de nisine ingérée journalièrement était de 4 à 6 mg, ce qui revient à 90-120 mg par kg corporel. Dans des recherches concernant l'effet exercé par les additifs alimentaires sur la santé, on a constaté que des doses de 2-4 mg de nisine par kg corps administrée per os, aussi bien que des teneurs de 40 à 400 mg par kg de nourriture augmentent significativement le gain pondéral des souris [22].

Du fait qu'après administration per os, la nisine est décomposée dans le tube digestif des monogastriques, il est peu probable que l'avantage nutritionnel soit réalisé directement par une action biostimulatrice similaire à celle exercée par certains antibiotiques. Il est plus plausible que, par son action sur certaines bactéries, la nisine modifie l'équilibre de la microflore intestinale dans un sens favorable pour l'organisme hôte.

Lorsqu'on évalue l'efficacité d'un additif chimique à un produit laitier, il faut tenir compte non seulement de sa capacité de prévenir l'altération (les modifications désagréables des qualités organoleptiques) sans diminuer la valeur nutritive de la matière première, mais aussi de son innocuité et de la mesure dans laquelle son utilisation concourt à neutraliser n'importe quel risque de maladie par un agent infectieux existant dans le lait. La nisine est une protéine à toxicité très réduite et dans le tractus digestif elle est hydrolysée sans déterminer des troubles allergiques. Le perhydrol est utilisé en quantité réduite, il est décomposé sous l'influence de la catalase du lait, et l'on peut l'inactiver complètement par adjonction de catalase cristallisée. Dans les concentrations employées, ces substances ne semblent donc pas nuisibles.

En ce qui concerne leur capacité de rendre inactifs les micro-organismes pathogènes pour l'homme, nos recherches n'abordent pas cet aspect. Toutefois en se basant sur la littérature, on peut affirmer que ces substances ne représentent pas des moyens pour prévenir ce risque. On a établi que l'action antibiotique de la nisine pour les bactéries pathogènes est très réduite, et que le perhydrol ne détruit ces micro-organismes (surtout *Myco. tuberculosis*) que pour des concentrations de 10 à 15 fois plus élevées que celles utilisées pour prévenir les modifications déterminées par la microflore saprophyte. De ce fait, ces substances ne peuvent se substituer à la pasteurisation, mais associées avec celle-ci, elles peuvent corriger presque entièrement le manque relatif d'efficacité de la pasteurisation basse [4, 9, 27, 42, 44].

#### IV. — CONCLUSIONS

Le traitement au perhydrol 35 p. 100 (0,08 ml p. 100) et catalase (200 U.K./100 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) du lait ensemencé après la pasteurisation basse avec 500-1000 spores de *Clostridium (butyricum, tyrobutyricum et sporogenes)* a freiné la prolifération de ces bactéries et prévenu la fermentation butyrique et le gonflement tardif du fromage type Edam d'une manière significativement plus efficace que l'incorporation de nisine (40 U.R./ml) et l'utilisation du levain nisinorésistant.

— La valeur nutritionnelle du fromage préparé à partir du lait traité par la nisine s'avère nettement plus élevée ( $p < 0,05$ ) que celle du fromage obtenu du lait non traité et surtout que celle du lait traité au perhydrol et catalase, dont la valeur nutritive est la plus réduite ( $p < 0,001$ ). Bien que ce procédé soit le plus convenable en ce qui concerne la prévention du gonflement tardif, il est seulement à employer lorsque les exigences hygiénico-bactériologiques et la pasteurisation efficaces ne peuvent être assurées.

#### Résumé

En utilisant des échantillons de 200 l de lait pasteurisé (durant 30 mn à 63° C) auquel — après examen bactériologique — on a incorporé la même quantité de spores (500-1000/ml), provenant des cultures pures de *Clostridium (butyricum, tyrobutyricum et sporogenes)* isolés des fromages gonflés, on a préparé (par le procédé habituel) 17 séries, à 3 lots égaux de fromage d'Edam. Dans chaque série, un lot (*N*) était obtenu du lait auquel on avait incorporé de la nisine (40 U.R./ml) et du levain nisinorésistant (jusqu'à la concentration maxima de 300 U.R./g) ; le deuxième lot (*P*) provenant du lait traité au perhydrol 35 p. 100 (0,8 par l) et 10 mn après avec de la catalase (2 000 U.K./1 000 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et le troisième lot (*T*) du lait non traité. Pour les deux derniers lots, le levain a été représenté par des cultures Hansen habituelles.

Les premières 70 h on a suivi l'acidité et le pH du fromage et après 10 et 45 j on a déterminé le nombre des spores dans les produits et le contenu en nisine. Le 45<sup>e</sup> j on a évalué quelques-unes des caractéristiques physico-chimiques, les propriétés organoleptiques et on a prélevé des échantillons pour tester la valeur biologique des 3 produits, ce qu'on a fait sur 3 lots de 20 rats chacun, ayant le même âge et le même poids. Après le sevrage, les animaux ont été maintenus et nourris dans des cages individuelles durant 30 j avec des régimes complets, isocaloriques et isoprotéiques (10,53 g p. 100), dont le matériel azoté provenait des fromages *N*, *P* ou *T*. Dans une autre série d'expériences sur 2 lots comparables de 10 rats chacun,

on a testé l'effet du régime au fromage *T* supplémenté par la nisine (45 mg p. 100). Journallement on a enregistré la consommation du régime et hebdomadairement le poids corporel.

Les premières 8-20 h le pH du fromage *N* a été plus élevé que celui des produits *P* et *T*. Entre le 10<sup>e</sup> et le 45<sup>e</sup> j, le nombre des spores dans le fromage *T* a augmenté 10 fois, dans le fromage *N* 6 fois et dans le fromage *P* seulement 2 fois. Le contenu en nisine du fromage *N* a diminué de 175 U.R./g (valeur trouvée 20 h après la séparation du caillot), à 119 U.R./g le 10<sup>e</sup> j et à 9 U.R./g après 45 j (dans 50 p. 100 des échantillons, l'antibiotique étant pratiquement absent). Après 1,5 mois, la moitié des échantillons des fromages *N* et *T* n'ont pas obtenu le pointage minimum à l'examen organoleptique, tandis que les échantillons du fromage *P* ont été de première qualité. A l'exception du contenu en acides aminés libres et surtout en tyrosine, plus élevé dans les échantillons *N* que dans les autres ( $p < 0,001$ ), aucune des autres caractéristiques physico-chimiques n'a été significativement différente d'un produit à l'autre. Le rapport de maturation, aussi bien que celui de décomposition ont été plus élevés dans les échantillons *N* que dans les autres ( $p < 0,05$ ). L'efficacité nutritionnelle du fromage *N* a été significativement ( $p < 0,05$ ) plus élevée que celle de l'échantillon témoin et surtout que celle du fromage *P*, dont la valeur nutritive a été la plus réduite. L'incorporation de la nisine au fromage *T* a significativement augmenté sa valeur nutritive. Les différences sont interprétées d'une manière corrélative, et on conclut que le perhydrol prévient le gonflement nettement mieux que la nisine, mais, du fait qu'il diminue la valeur nutritive du produit, il est indiqué seulement lorsque les exigences hygiénico-bactériologiques et la pasteurisation efficace ne peuvent être garanties.

### Bibliographie

- [1] BARTUSKOVA-CERNIKOVA (M.) (1962). — Pouziti nisinu jako prostredku proti durení tavených syru. (The use of nisin for controlling the blowing of processed cheese). *Sborn. Vysoké Skoly Chem. tech. v Praze, Potravin Tech.*, 6 330-337.
- [2] BERRIDGE (N. J.) (1956). — The antibiotic nisin and its use in the making and processing of cheese. *Chem. Ind.*, 44, 1158-1161.
- [3] BOTTAZZI (V.) (1958). — Sulla nisina nella tecnologia casearia. *Il Latte*, 32, 17-19.
- [4] BRUHN (P. A.), MÖLLER-MADSEN (A.), PEDERSEN (A. H.), JENSEN (H.) (1960). — Nogle patogene bakteriers thermoresistens ved pasteurisering af ostemaalk og disse bakteriers resistens ved fremstilling og lagring af dansk ost. (The thermoresistance of some pathogenic bacteria during the pasteurization of cheese milk, and their survival during the manufacture and storage of Danish cheese). *Beretn. Forsøgsm. Kbh.*, 124, 1-85.
- [5] CARINI (S.), BALDINI (R.) (1969). — Presence of nisin-producing streptococci in milk for Grana cheese manufacture and their influence on the milk's microflora. *Annali Microbiol.*, 19 (2), 9-17.

- [6] CHEVALIER (R.), MOCOQUOT (G.) (1959). — Dosage de la nisine par mesure du temps de coagulation du lait par la présure. *XV<sup>e</sup> Congr. Internat. Laiterie*, 3, 1437-1441.
- [7] CURRAN (H. R.), EVANS (F. R.), LEVITON (A.) (1940). — The sporicidal action of hydrogen peroxide and the use of crystalline catalase to dissipate residual peroxide. *J. Bacteriol.*, 40, 423-434.
- [8] DEMETER (K.) (1962). — Grundsätzliche Betrachtungen über die künftige Arbeitsrichtung zur Klärung der Ursachen, die für die schlechte Käseerzeugtauglichkeit der Silomilch letztlich verantwortlich sind. *Dtsche. Molkerei Zeitung*, 83, 481.
- [9] DEMETER (K. J.), KUNDRAT (W.), FABER (A.), SCHELLNER (H.), HAHN (H.) (1959). — Zur Keimabtötung in nach dem Wasserstoffsperoxyd-Katalaseverfahren behandelter Käseeremilch. I. Saprophytische Bakterien. II. Pathogene Bakterien. *XV. Internat. Milchwiss. Kongress*, 2, 538-546.
- [10] DOLEZALEK (J.), ZAVODSKY (K.) (1962). — Peroxydkatalazovy zpusob osetrovani mléka a jeho pouziti při vyrobe tvrdých syru. (Hydrogen peroxide treatment of milk and its application in hard cheese production). *Prumysl Potravin*, 13, 200-204.
- [11] FRAZER (A. C.), SHARRATT (M.), HICKMAN (J. R.) (1962). — The biological effects of food additives. I. Nisin. *J. Sci. Food. Agric.*, 13, 32-42.
- [12] FURIA (T. E.) (1968). — Handbook of food additives. *Chem. Rubler Co.*, Cleveland, 172-176, 185-190.
- [13] GALESLOOT (Th. E.), HASSING (F.) (1964). — The stability of the nisin content of Edam and Gouda cheese made from pasteurized milk with a nisin-producing starter. *Neth. Milk Dairy J.*, 18, 177-181.
- [14] GALESLOOT (Th. E.), PETTE (J. W.) (1957). — La valutazione del contenuto di nisina di starters antibiotici, di colture e di fromaggi fatto mediante starters antibiotici. *Il Latte*, 31, 553-554.
- [15] GARCIA (F. R.) (1959). — Contribucion al estudio de algunos factores que influncian a la nisina en la prevencion de la hinchazon butirica de los quesos. *An. Fac. Vet. Leon*, 5, 171-185.
- [16] GÖRNER (F.), KABATOVA (L.) (1963). — Vplyv nisinu na zabranenie mikrobiálnych zmien tavených syrov v prevádzkových podmienkach. (Effect of nisin on the preventive of microbiological changes in processed cheese made under manufacturing conditions). *Prumysl Potravin*, 14, 549-551.
- [17] GREGORY (M. E.), HENRY (K. M.), KON (S. K.) (1964). — Nutritive properties of freshly prepared and stored evaporated milks manufactured by a normal commercial procedure or by reduced thermal processes in the presence of nisin. *J. Dairy Res.*, 31, 113-119.
- [18] GREGORY (M. E.), HENRY (K. M.), KON (S. K.), PORTER (J. W. C.), THOMPSON (S. Y.), BENJAMIN (M. I. W.) (1961). — The effect of hydrogen peroxide on the nutritive value of milk. *J. Dairy Res.*, 28, 177-182.
- [19] GUDKOV (A. V.), KOSTRITSKAYA (N. P.), KUDRYASHOVA (M. M.), RAMAZANOVA (O. P.) (1968). — Vlianie nizina, vlazhi i povareonnoi soli na maslianokisloe brozhenie v plavlenom síre. (Effect of nisin, moisture and salt on butyric acid fermentation in processed cheese). *Moloch. Prom.*, 29 (8), 34-37.
- [20] HAWLEY (H. B.) (1958). — The permissibility and acceptability of nisin as a food additive. *Milchwiss.*, 13, 253-257.
- [21] HEIDRICH (P.) (1956). — Beitrag zur Käseherstellung aus mit Wasserstoff superoxyd vorbehandelter Milch. *XIV Internat. Milchwiss. Kongress*, 2, 231-237.

- [22] IGNATIEV (A. D.) (1965). — Eksperimental'nye materialy k gigieniceskoj harakteristike kombinirovannogo dejstvija nekotoryh himiceskih piscevyh honservantov. (Experimental materials contributive to hygienic characterization of combined effects produced by some chemical food preservatives). *Vop. Pitan.*, 24 (3), 61-68.
- [23] JARVIS (B.) (1967). — Resistance to nisin and production of nisin-inactivating enzymes by several *Bacillus* species. *J. gen. Microbiol.*, 47 (1), 33-48.
- [24] JARVIS (B.), MAHONEY (R. R.) (1969). — Inactivation of nisin by alpha-chymotrypsin. *J. Dairy Sci.*, 52, 1448-1450.
- [25] KARGER (S.) (1958). — Zur Frage der Verwendung von Nisin oder nisin-bildenden Kulturen für die Herstellung von Emmentalerkäse. *Milchwiss.*, 13, 288-289.
- [26] KARLIKANOVA (S. N.), GUDKOV (A. V.), TROFIMOVA (T. I.) (1970). — Svoistva nizinoobrazuivšich i nizinooustoicivih zakvasok. (Properties of nisin-producing and nisin-resistant starters). *Moloch. Prom.*, 31 (6), 6-11.
- [27] KEOGH (B. P.) (1964). — Comment on the hydrogen peroxide-catalase treatment of milk for cheese manufacture. *Aust. J. Dairy Tech.*, 19 (2), 86-87.
- [28] KNOTEK (Z.), SCHMIDT (P.) (1964). — Pathogenesis, incidence and possibilities of preventing alimentary nitrate methemoglobinemia in infants. *Pediatrics*, 34, 78-83.
- [29] KUTZNER (H. J.) (1966). — Untersuchungen über die Buttersäuregärung in Schnitt und Hartkäse. *XVII. Internat. Milchwiss. Kongress, München, D*, 647-658.
- [30] LIPINSKA (E.) (1961). — Badania przebiegu fermentacji cukrow w serach Edamskich wyprodukowanych na zakwasach nizynotworczych i nizinoopornych. (Studies on sugar fermentation in Edam cheese made with nisin-producing and nisin-resistant starters). *Prace Inst. Przem. Mlecz.*, 8 (1), 1-44.
- [31] LIPINSKA (E.), ROSLON (E.), TOMASZEWSKA (J.), SWIATEK (A.) (1966). — Versuche zur Anwendung eines Nisinpräparates und eines nisinresistenten Säureweckers zur Hemmung der Buttersäure-Blähung im Tilsiterkäse. *XVII. Internat. Milchwirtsch. Kongress, München, D*, 633-640.
- [32] LIPINSKA (E.), STRZALOWSKA (M.), GOETTLICH (W), SOLTYS (W.) (1962). — Utilisation des levains accoutumés à la nisine dans la production du fromage d'Edam. *XVI<sup>e</sup> Congr. Internat. Laiterie, B*, 849-860.
- [33] LÜCK (H.), JOUBERT (F. J.) (1955). — Untersuchungen zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Behandlung der Milch. I. Einfluss auf Milchproteine. *Milchwiss.*, 10, 160-165.
- [34] LÜCK (H.), SCHILLINGER (A.) (1958). — Untersuchungen zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Behandlung der Milch. I. Einfluss auf Bestandteile der wässrigeren Phase. *Zschr. Lebensmittel-Untersuch.-Forsch.*, 107, 512-520.  
II. Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf Butterfett und einige fettlösliche Vitamine. *Ibid.*, 108, 341-346.
- [35] MAXA (V.), TEPLY (M.). — a) Pouziti nisin k potlacení maselného kvasení při výrobě tavených syru. (Use of nisin for suppressing butyric acid fermentation in processed cheese). *Prumysl Potravin*, 1964, 15, 469-474.  
b) Pouziti nisinu k potlacení clostridii maselného kvasení při výrobě tvrdých syru. (Use of nisin for the suppression of butyric acid bacteria in hard cheese manufacture). *Ibid.*, 1965, 16, 206-208.
- [36] MORRIS (H. A.), JEZESKI (J. J.) (1964). — Influence of the hydrogen peroxide-catalase milk treatment on Cheddar cheese hardness. *J. Dairy Sci.*, 47, 681.
- [37] PULAY (G.) (1966). — Bekämpfung von Buttersäuregärung in Käsen durch Hühnereiweiss. *XVII. Internat. Milchwirtsch. Kongress, München, D*, 641-646.

- [38] PULAY (G.), EGYED (I.) (1968). — A hidrogénperoxid-katalázos eljárás használhatóságáról a sajtok vajsavas puffadása elleni védekezésben. (Applicability of the hydrogen peroxide-catalase process in the protection against butyric acid blowing of cheese). *Tejipari Kut. Közl.*, 17 (2), 25-31.
- [39] PULAY (G.), KRASZ (A.) (1968). — A nizin és a natriumklorid kombinatio hatása ömlesztettsajtban a vajsavas puffadást okozó klostridiumok ellen. (Combined effect of nisin and NaCl in processed cheese on clostridia causing butyric acid blowing). *Tejipari Kut. Közl.*, 11 (1), 3-10.
- [40] PULAY (G.), TOTH (S. N.) (1964). — Adatok a hidrogenperoxid csiraölő hatasahoz, különös tekintettel a sajttej csiratlanítására. (The germicidal effect of hydrogen peroxide with special reference to the sterilization of cheese milk). *Tejipari Kut. Közl.*, 7 (1), 3-16.
- [41] RAMSEIER (H. R.) (1960). — Die Wirkung von Nisin auf *Clostridium butyricum* Prazm. *Arch. Mikrobiol.*, 37 (1), 57-94.
- [42] ROSELL (J. M.) (1957). — Die Peroxydkatalase-Behandlung der Milch. *Milchwiss.*, 12, 343-348.
- [43] ROUNDY (Z. D.) (1958). — Treatment of milk for cheese with hydrogen peroxide. *J. Dairy Sci.*, 41, 1460-1468.
- [44] SADILEK (J.), STEPANEK (M.) (1962). — The influence of peroxide-catalase. treatment of milk on some pathogens. *XVIth Int. Dairy Congr.*, C, 1029-1033.
- [45] SIEGENTHALER (E. J.) (1965). — Das Wasserstoffperoxyd-Katalase-Verfahren als Mittel zur Bereitstellung keimarmer Rohmilch für Käisungsversuche. *Juris Druck-Verlag*, Zürich, 1-97.
- [46] SILLINGER (Yu. J.), BOGORODITSKAYA (V. P.), OSIPOVA (I. N.) (1969). — Gigieniceskaia harakteristika otecestvennovo preparata nizina-antibiotika dlia konservirovania piscevih produktov. (Hygienic characteristics of a soviet-made preparation nisin an antibiotic employed for preservation of food products). *Vop. Pitan.*, 28 (2), 44-48.
- [47] SOUCI (S. W.), MERGENTHALER (E.) (1958). — Fremdstoffe in Lebensmitteln mit besonderer Berücksichtigung der Konservierung. *J. F. Bergmann*, München, 34-35, 38-41.
- [48] STÜBER (O.), LIEBSCHER (F.) (1962). — Versuche über die Verarbeitung von Silomilch zu Käsen. II. Studie über die Beeinflussung der bakteriologischen Beschaffenheit der Milch bei der Verfütterung von Rauh- und Gärfutter. *Deutsche Molkerei Zeitung*, 83, 479-481.
- [49] SUBRAMANIAN (C. S.), OLSON (N. F.) (1958). — Effect of hydrogen peroxide on activity of lactic cultures in milk. *J. Dairy Sci.*, 51, 517-519.
- [50] TEPLY (L. J.), DERSE (P. H.), PRICE (W. V.) (1958). — Composition and nutritive value of cheese produced from milk treated with hydrogen peroxide and catalase. *J. Dairy Sci.*, 41, 593-607.
- [51] TOMA (C.), MELEGI (A.), CONSTANTINESCU (A.), JORDACHESCU (A.) (1968). — Beiträge zum Problem der Behandlung von Trinkmilch und der für industrielle Verarbeitung bestimmten Milch mit Perhydrol. II. Die Verwendung von mit Perhydrol konservierter Kuhmilch bei der Herstellung von Telemeakäse. *Milchwiss.*, 23, 497-499.
- [52] TSUGO (T.), IWAIDA (M.), NAGAO (A.), KOBAYASHI (Y.), TSURUMOTO (K.), HIRAI (K.) (1962). — Improving the keeping quality of processed cheese by use of nisin produced by a strain of *Streptococcus lactis*. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 3, 356-364.
- [53] WINKLER (S.), FRÖHLICH (H.) (1958). — Prüfung des Einflusses von Nisin auf die wichtigsten Reifungserreger beim Emmentalerkäse. *Milchwiss.*, 13, 99.