

MLJEKARSTVO

LIST ZA UNAPREĐENJE MLJEKARSTVA

God. XVII

SEPTEMBAR 1967.

BROJ 9

Dipl. inž. Franc Forstnerič, Kranj
Mlekarska šola

MIKROBIOLOGIJA TVRDIH SIREVA*

UVOD

Mogućnost izrađivanja sireva otkrio je čovjek slučajno, kada je mlijeko čuvao u mješinama od telećih želudaca, gdje je bilo izloženo djelovanju sirišnih fermenata. Različite vrste sireva nastale su uslijed različitih temperaturnih uvjeta u proizvodnji, različite sadržine vode i soli, te uvjeta zrenja. Navedeni faktori prvenstveno djeluju na razvoj određenih vrsta mikroorganizama u proizvodu, a time i na biokemijske procese koje oni izazivaju. Iako je izrađivanje sireva bilo poznato mnogo ranije nego što je bila poznata uloga mikroflore, možemo tvrditi, da tek proučavanje aktivnosti različitih mikroorganizama za vrijeme izrade i zrenja sireva daje mogućnost za postizavanje visoke kvalitete proizvoda. Proizvodnja postaje moguća također i tamo, gdje proizvodni uvjeti inače nisu optimalni.

Mlijeko kao sirovina za sir

Pored kemijskog sastava za uspjeh u sirarstvu je mjerodavna mikroflora mlijeka, kako s kvantitativnog, tako i s kvalitativnog gledišta. Razvitak mikroflore je zavisan o uvjetima za život koje im daje mlijeko. To su pored osnovnih hranjivih tvari i drugi faktori kao redoks-potencijal, puferno stanje mlijeka, pH, prisutnost antagonističkih tvari u mlijeku i slično. Te osobine označuju sirar pojmom primarna i sekundarna dispozicija mlijeka za sirenje.

Primarnom dispozicijom se označuje stanje mlijeka, koje uslijed određenog kemijskog sastava omogućuje većem broju mikroorganizama dobar razvoj. Primarna dispozicija zavisi od sastava zemljišta, odnosno kemijskog sastava krme.

Drugačije je sa sekundarnom dispozicijom mlijeka. Ona označuje biološko stanje u mlijeku koje je stvoreno nakon mužnje i utječe na razvoj bakterija mliječne kiseline u njemu. Faktori koji određuju sekundarnu dispoziciju su slijedeći: proizvodi metabolizma neželjenih mikroorganizama, antibiotici, bakteriofagi, ostaci sredstava za čišćenje i dezinfekciju (koji dolaze u mlijeko od slabo opranog posuđa), sredstava za zaštitu bilja i konačno radioaktivne materije od nuklearnih eksperimenata.

* Referat održan na IV seminaru za mljekarsku industriju pri Prehrambeno-tehnološkom institutu u Zagrebu.

Iz navedenog slijedi da svako mlijeko nije sposobno za preradu u sir. Oda-
biranje mlijeka za sireve s obzirom na spomenute činioce je za sirara težak
posao.

Još nemamo zadovoljavajuće metode za brzo ustanovljavanje potrebne
kvalitete mlijeka za sirenje, te se to nameće kao važan zadatak naučno-
istraživačkog rada.

Mikroflora mlijeka za sirenje

Mikroflora mlijeka za sirenje, kako korisna, tako i ona ostala, potječe
uglavnom iz dva izvora:

- iz okoline,
- od dodataka mlijeku za sirenje.

Primarna mikroflora koja potječe iz vimena je uglavnom za sirarstvo
manje značajna. Pa i bakterije tuberkuloze su s tehnološkog, kao i higi-
jenskog gledišta kod tvrdih sireva beznačajne. U zrelim tvrdim sirevima
zbog nepovoljnih za njih uvjeta tokom prerade kao što su visoka temperatura,
nizak pH i dužina zrenja, ne nalazimo te mikroorganizme. Isto važi i za razli-
čite uzročnike mastitisa. Mlijeko takvih životinja nije sposobno za preradu
u sir zbog abnormalnog kemijskog sastava, a ne u tolikoj mjeri zbog prisustva
mikroflore. Iznimku čini *Escherichia coli*, koja je u našim prilikama rijedak
uzročnik mastitisa.

Mikroflora koja dopijeva u mlijeko iz okoline vrlo je heterogena zbog
različitih higijenskih uvjeta proizvodnje. Možemo tvrditi da su sve vrste
mikroorganizama u mlijeku za sir štetne ukoliko su prisutne u prevelikom
broju. Mnoge vrste mikroorganizama prežive sve faze tehnološkog procesa
i mogu utjecati na kvalitetu sireva.

Iz stajskog gnoja dopijevaju u mlijeko *Escherichia coli*, *Streptococcus*
faecalis i bakterije propionske kiseline. Prve su poznate kao uzročnici ranog
nadimanja sireva, uloga drugih nije još tačno poznata, dok su treće značajan
faktor zrenja i tvorbe željenih oka tijesta nekih vrsta tvrdih sireva. Iz gnoja
dolaze također i bakterije maslačne kiseline, naročito kod hranjenja stoke
silazom, kao *Clostridium tyrobutyricum* koji je jedan od glavnih uzročnika
kasnog nadimanja sireva. Razmjerno mala infekcija mlijeka tom anaerobnom
vrstom (cca 500 bakterija u jednom kg sira) ima za posljedicu nadimanje
sireva. Termizacija mlijeka nema tu većeg značenja, jer su to sporotvorne
bakterije koje lako podnose termizaciju. Ovo je razlog ograničenja hranjenja
stoke silazom u Švicarskoj kao i drugdje, gdje prerađuju mlijeko u sireve
ementalskog tipa. Iz stajskog gnoja potječu vjerojatno još i drugi uzročnici
teških bolesti sira, kao *Bacterium proteolyticum*, uzročnik sive gnjileži i *Clo-*
stridium sporogenes, uzročnik bijele gnjileži. Ovaj posljednji pod normalnim
uvjetima proizvodnje teško dolazi do izražaja izuzev ako je infekcija izvan-
redno jaka.

Mikroflora koja potječe s posuđa, strojeva za mužnju i ostale opreme,
kao i iz zraka, pripada bakterijama mlječne kiseline, alcaligenes grupi, coli-
aerogenes bakterijama, različitim mikrokokima, kvascima i plijesnima. Infek-
cija s bakterijama maslačne kiseline je također česta pojava, posebno u našim
proizvodnim prilikama na većim pogonima zbog nedostatka stelje, kao i loših
higijenskih uvjeta. Posebno želimo podvući negativnu ulogu različitih uzro-
čnika slatkog grušanja mlijeka pretežno mikrokoka i drugih proteolitičkih
bakterija, koje onesposobljavaju mlijeko za preradu u sir. Na razgrađene bje-
lančevine dodano sirilo nema željenog učinka, gruš ostaje mekan, nepovezan,
te se ne može formirati u čvrsto, jedro sirno zrno.

Kvasci i plijesni u mlijeku namijenjenom za tvrđe vrste sireva nemaju posebnog značenja. Kod polutvrdih sireva su kvasci često uzrok nadimanju pod prešom, dok su kod mekanih sireva zajedno s plijesnima inicijatori sekundarnog zrenja.

U dobrom »sirarskom« mlijeku je omjer između bakterija mlječne kiseline i ostalih bakterija 3 : 1. Među bakterijama mlječne kiseline prevladavaju streptokoki.

Drugi izvor mikroorganizama u mlijeku za sirenje predstavljaju različiti dodaci, a u prvom redu sirarske kulture. Bakterije koje nalazimo u tim kulturama su *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus lactis* i druge. Prvom pripada značajna uloga u toku izrade i prešanja sira, jer omogućuju dobro cijedenje sirutke, dok su *Lactobacilli* tvorci enzima zrenja. Kod sireva ementalnog tipa katkada dodajemo mlijeku i bakterije propionske kiseline u čistim kulturama.

Zrenje »sirarskog« mlijeka

Zrenje je biološka priprema mlijeka pod utjecajem mikroorganizama koji su dospjeli u mlijeko iz okoline ili smo ih dodali u obliku čistih sirarskih kultura. Mikroflora koja se u mlijeku razmnoži dovodi svojom biokemijskom aktivnošću bjelančevine, a možda i druge sastojke mlijeka u takvo kemijsko-fizikalno stanje, da ih sirar može preraditi u dobar sir. O kakovim promjenama bjelančevina se konkretno radi još nije dovoljno razjašnjeno. U toku zrenja mlijeka vrši se priprema za buduće zrenje sira. Kao mjerilo za zrelost mlijeka služi nam određena kiselost mlijeka. To je relativna mjera jer boljeg načina još nemamo. U kojem je opsegu postignuta poželjna zrelost mlijeka ovisi o vrstama bakterija i njihovom broju. Ukoliko bakterije mlječne kiseline ne dominiraju, ili ne nađu u mlijeku povoljne uvjete taj pothvat neće postići željeni cilj. Zrenje mlijeka vrši se obično preko noći kod povoljnih temperatura. U industrijskoj preradi mlijeka u tvrde sireve, kad sabiremo mlijeko jednom na dan, i prerađujemo termizirano mlijeko s dodatkom kultura prije podsirivanja, zrenje traje samo kratko vrijeme (tokom podsirivanja). U tako kratkom vremenu bakterije ne mogu izvršiti svoju ulogu. U tom slučaju se preporuča, da dodamo kulture u razmjeru s količinom prisutnih bakterija u mlijeku čim počnemo kotlove ili sirarske kade puniti mlijekom. Pravilno doziranje sirarskih kultura predstavlja za sirara težak problem. Ravnamo se prema količini prisutne mikroflore mlijeka, njegovoj dispoziciji, vremenu i temperaturi zrenja, te osebina aktivnosti čiste kulture.

Mikrobiološki procesi u času izrade i tiještenja sira

Nakon podsirivanja mikroorganizmi su uklopljeni u sirnu grudu, osim razmjerno manjeg broja kojeg je otplavila sirutka. Zbog povoljne temperature u toku podsirivanja razvijaju se predstavnici mezofilnih bakterija mlječne kiseline: *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris*, *Lactobacillus casei* i drugi. Početkom dozrijevanja njihov broj se naglo smanjuje. U to vrijeme počinju se razmnožavati termofilne bakterije mlječne kiseline u prvom redu *Streptococcus thermophilus*. Za vrijeme sušenja kod temperature 50—56° C vrši se selekcija i uništavanje mezofilne mikroflore. Sušenjem, ako traje duže vremena, uništavaju se također okrugli oblici bakterija propionske kiseline, a često i štapičasti oblici tih bakterija. U tom slučaju ementalni sir ostaje bez rupa. Sir »grana« i slične sireve za ribanje iz tih razloga zagrijavamo duže vremena.

Pod prešom se održava temperatura od 40—45° C oko 12 sati, a do završetka prešanja snizi se na oko 30—38° C. Za to vrijeme, posebno u toku prvih 12 sati, intenzivno se razvija *Streptococcus thermophilus*, a kasnije *lactobacili*, koji podnose niži pH.

Streptococcus thermophilus je u prvom razdoblju prešanja jedina bakterijska vrsta koja se brzo razmnaža i stvara mlječnu kiselinu (0,5—0,9‰), koja potpomaže skupljanje odnosno sinerezu sirnog zrna i cijedenje sirutke. Slab razvitak tog mikroorganizma, a isto tako prebrzi porast kiselosti, ima za posljedicu slabo cijedenje sirutke. U prvom slučaju sinereza polako napreduje dok u drugom dolazi do većih promjena parakazeina, koji se pretvara u parakazein-laktat, te se time gubi mogućnost sinereze i sirutka (kapilarna vlaga) zaostaje u sirnom zrnu. Sirevi s previsokim postotkom vode postaju kiseli, s kratkim, grubim, neelastičnim i raspucanim tijestom. Prema novijim podacima razvoj termofilnih streptokoka može ometati octena kiselina dok mala infekcija bakterija octene kiseline podupire njihov razvoj, jer one konzumiraju dio mlječne kiseline. Tada možemo zaključiti o uspjehu sirenja.

Praćenje intenzivnosti procesa sinereze odnosno cijedenje sirutke ocjenjuje sirar mjerenjem porasta kiselosti u čitavom tehnološkom procesu, a pogotovo u sirutki za vrijeme prešanja. Najpovoljnije vrijednosti za kiselost nakon dva sata prešanja su 9—12° SH, nakon 4 sata 15—22° SH i 18—20° SH nakon 5 sati. Kretanje odnosa termofilnih streptokoka i *lactobacila* možemo kontrolirati prema najnovijim podacima Mljekarske škole Rütli u Švicarskoj, komparacijom porasta kiselosti u sirutki iz sira za vrijeme prešanja i u sirutki iz kotla koju istovremeno (u toku prešanja) inkubiramo kod 38° C. Razvoj kiselosti se mora kretati paralelno. Veće razlike su indikator abnormalnog razvoja mikroflora. Provjeravanje mogućnosti primjene ove metode kod nas ispituje se u Zavodu za mlekarstvo Kmetijskog instituta Slovenije.

Poslije 24 sata iznosi broj bakterija kod ementalskog sira oko 2 milijarde u 1 gramu. Taj broj se poslije nekoliko dana smanji na cca 5‰ od početnog broja. Od uginulih bakterija preostaju njihovi enzimi koji vode zrenje sira.

Zrenje tvrdih sireva

S tehnološkog gledišta zrenje sireva možemo smatrati kao aktiviranje faktora za razgradnju mlječnih sastojaka sa ciljem formiranja karakterističnih svojstava određene vrste sira. Zrenje tvrdih sireva je u cjelini rad mikroorganizama odnosno njihovih enzima. Obim i dalekosežnost degradacije mlječnih sastojaka zavisi o kiselosti, temperaturi, vlažnosti, redoksi potencijalu i trajanju zrenja. Kiselinska reakcija je najznačajniji faktor koji određuje proces zrenja. U slabo kiseloj sredini — pH 5,7 do 6 — proteolitički enzimi najbolje djeluju. Kiselina određuje također razvoj *lactobacila* i bakterija propionske kiseline. *Lactobacili* postižu maksimalni broj krajem razdoblja prešanja ako im kiselost odgovara (pH 5,16 do 5,25). U procesu zrenja sudjeluju također enzimi *Lactobacillus casei* koji doprinose okusu i aromi sira. Mlječna kiselina pretvara oduzimanjem molekule kalcija dikalcium-parakazeinat u monokalcium-parakazeinat i dalje u parakazein. Nastali produkti bolje bubre i zbog toga su dostupniji za kemijske procese. Takvo tijesto postaje plastično, gipko, te su tako ostvareni uvjeti za razvoj bakterija propionske kiseline. Mlječna kiselina u svim fazama tehnološkog procesa zaustavlja razvoj štetne mikroflora i doprinosi bakteriološkoj stabilnosti sira.

Bjelančevine pored laktoze dožive u procesu zrenja najveću preobrazbu. U zrelom siru nalazimo razgradne proizvode kao serije peptida s rastućom

molekularnom težinom od 75 za najmanju aminokiselinu do 48 000 za nerazgrađeni beta-kazein. Stupanj zrelosti mjerimo po količini topljivog dušika; u tvrdim sirevima ga ima 20—25%, a u mekanim čak do 80%.

Kao rezultat djelovanja mikroorganizama u tvrdim sirevima su također prisutni različiti razgradni proizvodi masti. Iz masnih kiselina nastaju putem oksidacije ketonske kiseline koje se dalje pretvaraju u aromatske spojeve kao na primjer diacetil, koji doprinosi okusu i aromi sireva. U siru cheddar je ustanovljeno 0,016 do 0,335 miligrama diacetila u 100 g sira.

Karakterističan okus i aroma tvrdih sireva zavisi o niskomolekularnim spojevima u siru. Okus i aroma nisu ovisni o nekim određenim aminokiselinama nego o prisutnosti većeg broja razgradnih proizvoda. Aroma u sirevima potječe prije svega od masnih kiselina, aldehida, ketona, alkohola, estera, sumporovodika i drugih spojeva, a okus pak od mlječne kiseline, aminokiseline, ketonske kiseline i soli. Stvaranje aromatskih tvari počinje kod ementalnog sira u početku zrenja. Sladak okus toga sira uzrokuje prolin i još neke aminokiseline, te kalcijev propionat. Zreo okus tvrdih sireva je ovisan o količini tirozina. Karakterističan okus starijeg ementalca i drugih tvrdih sireva pripisujemo degradaciji leucina i izoleucina.

Posebna karakteristika nekih tvrdih sireva je stvaranje oka. Rasprostranjenost i oblik oka je pokazatelj uspjelosti sira. Oka uzrokuju CO₂ i vodik a stvaraju ih bakterije propionske kiseline, coli-aerogenes grupa, kvasci i bakterije maslačne kiseline. Željena oka su djelo bakterija propionske kiseline dok drugi mikrobi mogu uzrokovati jaka nadimanja odnosno bolesti sireva. Razvoj bakterija propionske kiseline je ovisan o prisustvu soli mlječne kiseline-laktata. Te bakterije razvijaju se poslije 2 do 3 tjedna zrenja i postižu maksimalan broj krajem trećeg mjeseca zrenja.

Previsoka sadržina kiseline, niska temperatura i visoka koncentracija soli onemogućavaju razvoj tih bakterija. Bakterije propionske kiseline uzrokuju također razgradnju aminokiselina sa slabim okusom, kao na primjer arginin, i doprinose aromatičnosti sira zbog akumulacije propionata u siru. Oblik i raspoređenost oka zavisi također o stanju tijesta sira. Grubo neelastično tijesto daje veliki otpor i onemogućava prodiranje plina CO₂, koji se zbog toga ne može koncentrirati. Umjesto većih, pravilno formiranih oka stvaraju se manje i mnogobrojne rupice (rupičavost).

Anaerobni uvjeti i prisutnost laktata u siru pružaju pak pogodnu podlogu za bakterije maslačne kiseline koje nastupaju istovremeno kad i bakterije propionske kiseline i uzrokuju nadimanje sireva. Njihov razvoj zavisi o početnom broju tih bakterija i povoljnim uvjetima. Glavni uzročnik nadimanja je *Clostridium tyrobutyricum*, koji zahtijeva neutralnu reakciju podloge. Rupičavost koju izazivaju bakterije maslačne kiseline je gusta, a oka su velika, jer je sir neprijatnog mirisa po maslačnoj kiselini. *Clostridium saccharobutyricum* uzrokuje rano nadimanje sira već pod prešom, ako su povoljni uvjeti za njegov razvoj. Upotreba čistih kultura s antibiotskim svojstvima (nisin) do danas, smatra se, nije dala pozitivnih rezultata. Neki laktobacili čak stimuliraju razvoj clostridia s tvorbom posebnih bjelančevinastih reakcija niske molekularne težine.

Pogreške i bolesti tvrdih sireva

Ovakove promjene su uglavnom mikrobiološkog porijekla. Pod pojmom pogreške sireva označujemo takvo stanje sira koje kvari njegov izgled i time vrijednost, dok bolesti smanjuju održivost sira ili ga čine uopće neprikladnim za uživanje.

Pogreške koje se pojavljuju na površini sira uzrokuju u prvom redu plijesni. Plijesni *Penicillium* i *Aspergillus* su uzročnici sirnog raka. Plijesni razgrađuju bjelančevine, neutralizaciju podloge, te se na tim mjestima pojavljuje gnjilež. Tamne mrlje na siru uzrokuje *Monilia nigra* i *Cladosporium herbarum*. Suhu gnjilež uzrokuje *Oospora casevorans*, brašnatu koru kod sira gruyera *Penicillium brevicaulae* (ražena plijesan). Žute mrlje koje se pojavljuju na mladim sirevima poslije soljenja uzrokuju *Aspergillus casei* i *Penicillium casei*. Najuspješnija borba protiv plijesni je higijena u prostorijama za zrenje, pravilan klimatski režim u njima, redovno čišćenje sireva i po potrebi soljenje. Na siru možemo spriječiti razvoj plijesni upotrebom raznih kemijskih sredstava, kao što su 0,5%-tna otopina Na-sorbata ili 5%-tna otopina Ca-propionata.

Pogreške i bolesti u tijestu sira su pretežno u vezi sa slabim cijedenjem sirutke iz sira. U takvim slučajevima sirevi su kiseli, s tvrdim, grubim neelastičnim i često slijepim tijestom ili su raspucani. Najvažnije bolesti su:

- Rano nadimanje sira koje uzrokuju coli-aerogene bakterije, kvasci i ponekad bakterije maslačne kiseline. Ove pojave su u vezi s nedovoljnom higijenom proizvodnje mlijeka i tehnološkim postupkom. Coli-aerogenes bakterije su glavni uzročnici ranog nadimanja. Ti mikroorganizmi imaju tim bolje uvjete za razvoj čim se slabije razvijaju bakterije mlječne kiseline jer im tako ostaje mnogo hrane — laktoze. Djelomično sprečavamo njihov razvoj dodavanjem kalijeveg nitrata u količini 20 grama na 100 litara mlijeka (što po našim propisima nije dozvoljeno). Kvasci ne prežive temperaturu sušenja u kotlu, te mogu biti uzročnici nadimanja samo prilikom reinfekcije sira, od opreme i sirarskog pribora. *Clostridium saccharobutyricum* rijetko dolazi do izražaja u mladom siru zbog visoke kiselosti.
- Kasno nadimanje sireva je jedna od najtežih bolesti koju uzrokuju bakterije maslačne kiseline, a o čemu je bilo već ranije govora.
- Bijelu gnjilež sira uzrokuje *Clostridium sporogenes* — bolest je rijetka i može nastupiti samo ako je mlijeko jako inficirano tim uzročnikom, i zbog previsoke temperature sušenja, koja bi onesposobila *Streptococcus thermophilus*. Uzročnik zahtijeva neutralnu reakciju podloge.
- Siva gnjilež je češća pojava, a uzročnik je *Bacterium proteolyticum*. Izvor tog mikroorganizma nije tačno utvrđen. Najbolje uspijeva kod temperature od 30° C i pH 7. Bolest nastupa poslije 3 mjeseca zrenja. U siru se povisi alkalitet, sir je neprijatnog mirisa zbog tvorbe indola, skatola i drugih spojeva. Tijesto sira postaje sivo i raspucano. S obzirom da izvor uzročnika još nije dovoljno proučen (vjerojatno iz fekalija) ostaje kao jedina i sigurna preventivna mjera higijena kod proizvodnje mlijeka i dobar razvoj bakterija mlječne kiseline u toku cijelog tehnološkog procesa.

L I T E R A T U R A

1. B. W. H a m m e r, Dairy Bacteriology (1948).
2. W. D o r n e r, Allgemeine und milchwirtschaftliche Mikrobiologie (1955).
3. W. S t o c k e r, Allgemeine Grundlage der Käsereitechnik (1957).
4. Revije, Schweizerische Milchzeitung (Wissenschaftliche Beilage) 1962/83, 1959/66, 1961/77, 1960/71, 1963/91.