

koji je izolovan u svim slučajevima gde smo imali utvrđenu pojavu inhibicije.

Ogledima u laboratoriji pokazali smo da se *A. fumigatus* intenzivno razvija na tečnim podlogama koje sadrže šećer na temperaturi preko 30°C i da može da razvije spore za 24 sata.

U radu je istaknuto da problem ishrane krava sa sirovim rezancem, koji ima plesni *A. fumigatus*, ima ekonomski značaj za proizvodnju mleka, i higijenski u pogledu konzumiranja ovoga mleka i zaštite radnika koji rade sa ovom hranom, jer je *A. fumigatus* patogen za ljude i životinje.

Literatura

1. Blinov, N. i Hohlov, A. (1970): Bumažnaja hromatografija antibiotikov. Moskva.
2. Cestnik, J. (1958): Bronhopulmonalna aspergiloza. **Zdravstveni Vestnik** 27, 123—129.
3. Hajsig, M. i Milaković, Lj. (1972): Izolacija vrste *cryptococcus neoformans* i drugih gljivica iz pluća pilića. II Kongres mikrobiologa.
4. Kolesnik, A., Soloveev, R., Miuskova, G., Reva, N. i Tkačuk, V. (1971): Zbolevanije krupnogo rogatogo skota aspergilozom, **Veterinaria** 8, 81—82.
5. Muntanjola-Cvetković, M. (1964): Some species of aspergillus from Yugoslavia. L'Institut et du Jardin Botaniques de la Université de Beograd 3, 181—212.
6. Parker G. & Jenner C. P. (1968): Distribution of Tripacidin in cultures of *Aspergillus fumigatus*, **J. Dairy Science** 56, 6, 828—30.

MIKROFLORA PLAVIH SIREVA »ZAGREBAČKE MLJEKARE« OOUR »VINDIJA« I LIPOLITIČKA AKTIVNOST IZOLIRANIH SOJEVA PLEMENITIH PLIJESNI

Ljerka KRŠEV

»Zagrebačka mljekara« OOUR T M P »DUKAT«, Zagreb

I U V O D

1. Tehnološki tok industrijske proizvodnje plavih sireva »Zagrebačke mljekare« — OOUR »Vindija«.

Mlijeko (kravlje) pasteurizirali smo na 72—74°C kratkotrajno. Hladili smo ga od 30—31°C te dodali (jedan) 1—1/2% »startera« i sirišni ferment. Sirenje je bilo gotovo u vremenu od pola sata, nakon čega smo sirno zrno sušili pri 30—32°C. Sirnu masu kalupili smo i ocijedili u vremenu do 30 sati u toploj prostoriji (18—20°C), a zatim ostavili u hladnoj. Slijedilo je soljenje u salamuri sa 18°B u toku dva dana. Nakon soljenja sir smo ocijedili u hladnoj prostoriji (9—10°C). Tada je slijedilo »pikiranje« sa sporama plemenitih plijesni *P. Roqueforti*. Ostavili smo ga da zrije uz potrebnu njegu na niskoj temperaturi (9—10°C) i u prostoriji sa visokim postotkom relativne vlage i propisanoj aeraciji oko 45 dana. Sir se smatralo spremnim za prodaju nakon 50-og dana nakon dana podsirivanja, kada smo ga umatali u metalnu foliju i pripremili za prodaju.

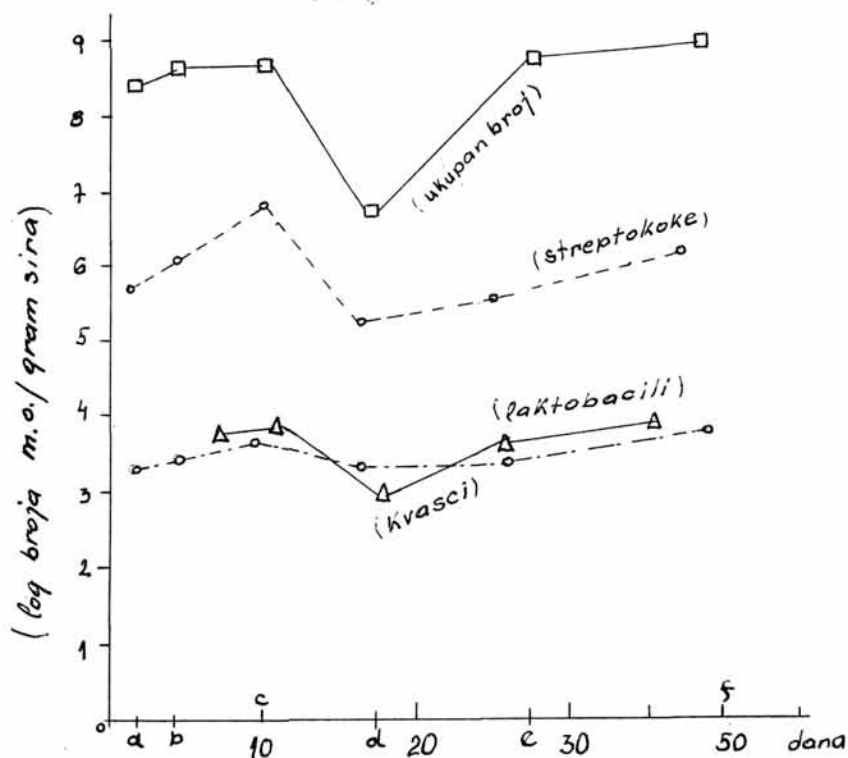
II METODE RADA

2. 1. Podjela tehnološkog toka proizvodnje na više faza i uzimanje uzoraka.

Tehnološki tok proizvodnje podijelili smo u nekoliko faza, te analizirali broj pripadajuće mikroflore, odnosno izolirali i identificirali nađene mikroorganizme.

Faze su bile ove:

- sirna masa stavljena u kalup;
- uzorak uzet nakon 24 sata cijedenja;



Dijagram 1

Razvoj ukupnog broja mikroorganizama, streptokoka mlječno-kiselog vrenja, laktobacila i kvasaca na površini sira.

- uzorak uzet neposredno pred soljenje sira;
- uzorak nakon soljenja sira;
- uzorak uzet dva dana nakon završenog soljenja sira;
50. dan nakon podsirivanja.

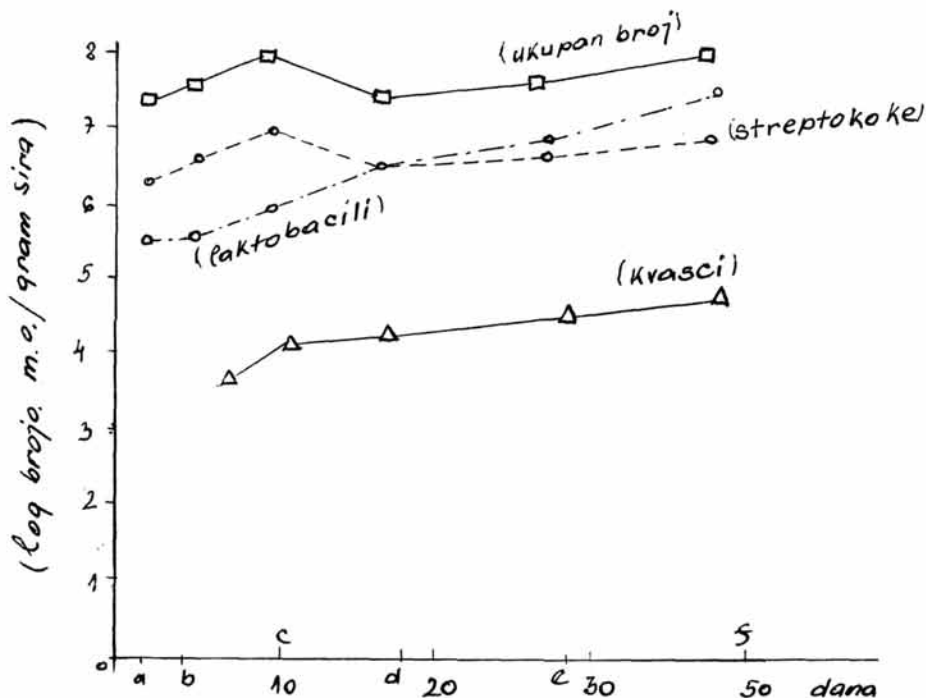
Uzorci su uzimani sondom, dakle u sredini sira, te sa površine sira.

Uvijek smo odvagali jedan gram sira, te dispergirali u 9 mililitara sterilne fiziološke otopine, pa tako dobivali razrjeđenje 10^1 . Daljnja razrjeđenja radili smo također prema propisima za bakteriološke analize.

2. 2. Primijenjene podloge za izolaciju pojedinih grupa mikroorganizama.

U ovom dijelu rada odredili smo:

- ukupan broj organizama;
- broj streptokoka mlječno-kiselog vrenja;
- broj laktobacila;
- broj kvasaca;
- izoliramo sojeve *P. Roqueforti*.



Dijagram 2

Razvoj ukupnog broja mikroorganizama, streptokoka mlječno-kiselog vrenja, laktobacila i kvasaca u središtu sira.

a) Ukupni broj mikroorganizama odredili smo na podlozi Plate Count Agar;

b) streptokoke mlječno-kiselog vrenja izolirali smo na podlozi mlijeko-papain-agar, dok smo sojeve *Leukonostok* izdvojili s pomoću M.R.S. — podloge;

c) laktobacile izolirali smo na M.R.S. — podlozi;

d) kvasce izolirali smo na podlozi — krumpir dextrorse-agar (uz naravnavanje pH 3,5 s vinskom kiselinom);

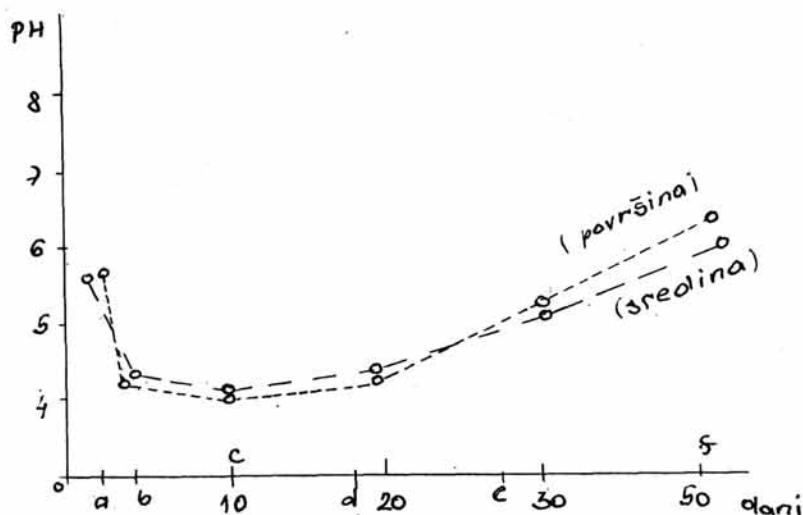
Izolirane sojeve identificirali smo s pomoću pripadajućih biokemijskih nizova.

2. 3. Pripremanje kulture i enzimskog ekstrakta sojeva P. Roqueforti za ispitivanje enzimske aktivnosti.

2. 4. Metoda mjerenja lipolitičke aktivnosti izoliranih sojeva Penicillium Roqueforti.

Dva mililitra pripremljenog enzimskog ekstrakta dodali smo u 5 ml. supstrata i inkubirali pri 40°C kroz dva sata. Supstrat je sastavljen od mlječne masti i polivinil alkohola u fosfatnom puferu (odnosi 3^o:1^o).

Nakon inkubacije oslobođene masne kiseline odvojili smo kromatografski na silika-gel koloni, te istitirali lužinom.



Dijagram 3

Razvoj pH vrijednosti na površini i u središtu sira.

III REZULTATI RADA UZ DISKUSIJU

3. 1. Osvrt na frekvenciju izoliranih grupa mikroorganizama u svim fazama proizvodnje.

U prvih 10 dana od prvog dana podsirivanja frekvencija ukupnog broja mikroorganizama ne varira mnogo ni u središtu, ni na površini sira. U drugom dijelu tog razdoblja, oko 4-og dana, izolirali smo i kvasce, čiji broj do 10-og dana previše uočljivo nije rastao.

U ovom razdoblju je uočljiv jaki razvoj streptokoka mlječno-kiselog vrenja, naročito na površini sira, dok je razvoj laktobacila nešto slabiji, ali također progresivan.

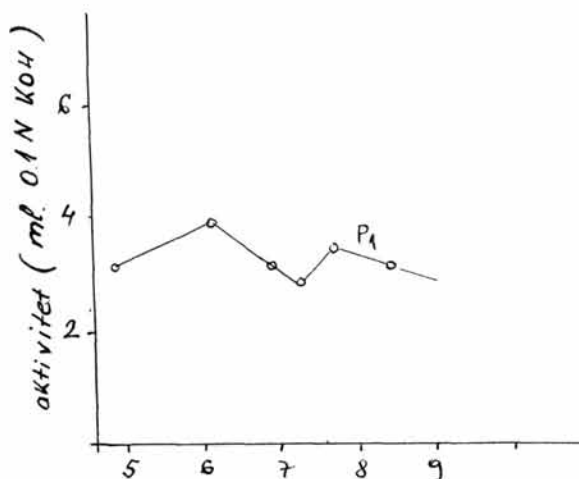
Mikroflora sira je nakon soljenja pretrpjela znatne promjene u broju pojedinih grupa mikroorganizama kao i u njihovim pripadajućim vrstama. Ukupni broj mikroorganizama vidno se smanjio ako pratimo analize sira na njegovoj površini. To se također moglo konstatirati i za broj kvasaca. Broj streptokoka mlječno-kiselog vrenja se znatno smanjio, dok kod laktobacila nije bilo na površini uočljivo smanjenje njihovog broja. Sve promjene koje smo uočili na površini sira odigravaju se i u unutrašnjosti, s tim da nisu toliko oštre i upadljive.

U daljnjem razdoblju zrenja sira (od 20. dana pa nadalje) na površini sira naglo je rastao ukupni broj mikroorganizama. Kvasci su također naglo povećali svoj broj, dok se broj laktobacila i streptokoka mlječno-kiselog vrenja samo lagano povećavao. U središtu sira se ukupni broj također povećavao, dok je broj laktobacila rastao nešto brže.

3. 2. Osvrt na prisutne grupe mikroorganizama u toku tehnološkog procesa dobivanja plavih sireva i njihova uloga u toku zrenja.

a) Streptokok mlječno-kiselog vrenja

U toj grupi izolirani su sojevi *Str. lactis* i *Str. cremoris*. Iako ovi mikroorganizmi ne podnose visoke koncentracije soli, ipak su izolirani i nakon soljenja sira. Prema istraživanju više autora čini se, da se u toku zrenja sira stvaraju takovi uvjeti koji favoriziraju razvoj ovih sojeva. U pravilu su svi izolirani sojevi stvarali male količine mlječne kiseline i to veoma sporo. Takova »garnitura« streptokoka mlječno-kiselog vrenja je u pravilu veoma poželjna za razvoj *P. Roqueforti*, jer se cijedenje sira odvija sporo i ne dobiva »tvrdo« tijesto sira već rahlo što pogoduje razvoju plijesni.



Soj *P. Roqueforti* 1

Od petero fermentativnih streptokoka mlječno-kiselog vrenja izoliran je *Leukonostok* i to uglavnom *L. dextransicum*, dok *L. lactis* nismo našli. Uloga *Leukonostoka* je veoma važna, jer stvara tzv. »otvoreno« tijesto s obzirom

da je dosta jak stvaralac plina. Takovo tijesto vrlo pogoduje rastu *P. Roqueforti*. Važno je stoga proučiti uvjete u kojima *Leukonostok* stvara najveće količine plina. Tako je npr. važno da homofermentativni streptokoki s kojima dolazi u »garnituri« u ovoj proizvodnji, budu slabi stvaraoči kiseline. Također je prema nekim autorima važno da populacija *Leukonostoka* ne bude i suviše velika, jer i tada sojevi stvaraju manje plina. Također je poznato da u prisustvu kvasaca, kao što je *Saccharomyces lactis*, stvara više plina.

b) Laktobacili

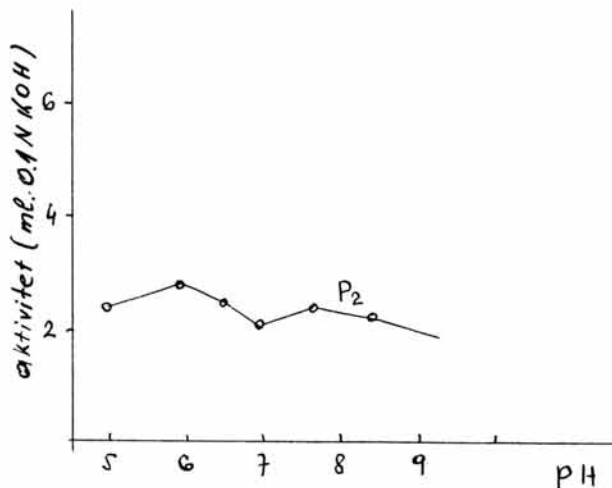
U prvim fazama tehnološkog toka uglavnom je zastupljen *L. casei*, dok je nakon soljenja nađen *L. plantarum*, koji je otporan na veći postotak soli.

c) Kvasci

Prije soljenja iz središta sira izolirali smo kvasce koji previru laktozu kao što je npr. *Saccharomyces lactis*, dok nakon soljenja kvasce koji pripadaju rodu *Torulopsis*, koji također previru laktozu. Prema nekim radovima kvasci iz roda *Torulopsis* igraju veoma važnu ulogu u stvaranju arome plavih sireva.

Općenito se za kvasce treba reći da je njihova akcija i akcija plijesni komplementarna u stvaranju aromatskih proizvoda plavog sira.

Zorno se mogu vidjeti u dijagramima 1—3:



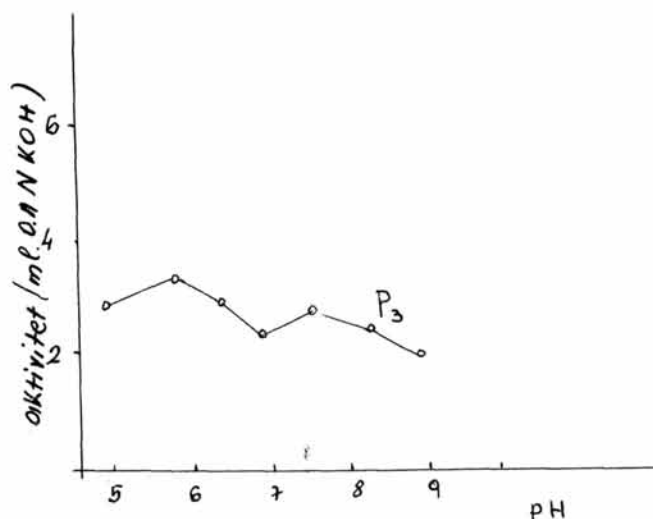
Soj *P. Roqueforti* 2

3. 3. Lipolitička aktivnost izoliranih sojeva *P. Roqueforti* iz plavih sireva »Zagrebačke mljekare« — OOUR »Vindija«.

U toku pokusa izolirali smo tri soja *P. Roqueforti* čiju smo lipolitičku aktivnost ispitili.

Lipolitička aktivnost je sposobnost nekih mikroba da s pomoću enzima lipaze kataliziraju hidrolizu mlječne masti u glicerin i masne kiseline, a koje su odgovorne za stvaranje specifičnih okusa plavih sireva. Kod stvaranja ketonskih aromatskih spojeva naročitu ulogu igraju: razgradnja maslačne kiseline i visokomolekularnih masnih kiselina čijom razgradnjom nastaje aromatski keton:

- C¹ — maslačna kiselina
- C⁶ — kapronska kiselina
- C₃ — kapriona kiselina
- C¹⁰ — kaprinska kiselina
- C¹² — laurinska kiselina



Soj Roqueforti 3

- aceton
- methyl-n-propylketon
- methyl-n-amylketon
- methyl-n-heptylketon
- methyl-n-nonylketon

P. Roqueforti ima jaku lipolitičku aktivnost, ali taj aktivitet varira ovisno o sojevima P. Roqueforti i ona se kreće od slabe, srednje do jake lipolitičke aktivnosti.

Važno je proučavati lipolitičku aktivnost sojeva P. Roqueforti-a, jer nam to daje mogućnost kombinacije sojeva u procesu zrenja sira. Kod proučavanja proteolitičke i lipolitičke aktivnosti uočena je korelacija kod izoliranih sojeva.

Kod izoliranih sojeva P¹, P² i P³ izmjerili smo lipolitičke aktivnosti, koje smo unijeli u dijagrame u odnosu na pH vrijednosti.

Uočeno je da je optimum pH vrijednosti na mlječnoj masti za lipazu kod pH 6,0 i 7,5.

Tablice 1 i 2 prikazuju za svaki od izoliranih sojeva lipolitičku aktivnost za razne početne vrijednosti pH supstrata za uzgoj mikroorganizama.

TABLICA 1

**Djelovanje početne pH vrijednosti sirutkine podloge na stvaranje lipaze
P. Roqueforti P 1.**

pH sirutkina podloga	aktivnost lipaze	
	ml 01-N NaOH kod pH 6,0	kod pH 7,5
3,5	0,50	0,85
4,0	3,16	2,48
5,0	3,25	3,08
6,0	3,71	3,57
7,0	7,42	10,00
8,0	9,11	15,85

TABLICA 2

**Djelovanje početne pH vrijednosti sirutkine podloge na stvaranje lipaze
P. Roqueforti P 2.**

pH sirutkina podloga	aktivnost lipaze	
	ml 0,1 — N NaOH kod pH 6,0	kod pH 7,5
3,5	0,32	0,70
4,0	2,87	2,1
5,0	3,0	2,81
6,0	3,10	3,0
7,0	6,75	9,58
8,0	8,11	14,12

IV ZAKLJUČAK

Vidljivo je, da kompletno ispitivanje mikroflore i njenih osobina, te njenog međusobnog djelovanja u plavim sirevima, može omogućiti proizvođaču da upotrebom najbolje odabranog startera i dobre kombinacije sojeva *P. Roqueforti* dobije veoma dobar plavi sir à la »Roquefort«.