

Metode mikroskopiranja u proizvodnji sira* (Microscoping Methods in the cheese Production)

Vlastislav BOHAČ, Malšice u T. ČSSR

Stručni rad — Professional Paper
Prispjelo: 20. 11. 1985.

UDK: 637.3.07

Sažetak

Povećana potreba za kvalitetom prehrambenih proizvoda uzrokuje strukturalno ispitivanje konačnih mljekarskih proizvoda i tvari potrebnih za izradu tih proizvoda.

Ovaj rad iznosi mikroskopske metode kojima se strukturalno ispituje proizvodnja sira u Čehoslovačkoj, a to su: makro-metoda, mikro-metoda i elektronska mikroskopija. Neke od ovih metoda je autor razvio ili promijenio.

Summary

Increased demands for food products quality make structurel investigation of the final dairy products, as well as of raw matherials for their production nowadays necessary.

This paper is reviewing microscopic methods used for structural investigations in cheese production in Czechoslovakia, such as: macro method, micro method und electron microscopy. Some of these methods are developed or modified by the author.

Makro metoda

Najmanje zahtjeva, što se tiče opreme, ima makro metoda koja se može primijeniti kod brzog ocjenjivanja strukture sira u toku proizvodnje. Uzorak sira, većinom kvadratast s osnovom od 10 mm i visinom od 20 mm, zaledi se, a da bi se dobila orijentacija sirnih zrna, odreže se od smrznutog sira tanki listić. On se stavi na kap kanadskog balzama na predmetnom stakalcu i poklopi pokrovnim stakalcem veličine 18 × 22 mm. Stakalce se optereti utegom od 20 — 50 g i ostavi do slijedećeg dana.

Ako je neophodno, pretrage se mogu vršiti odmah, ukoliko nas ne smetaju sitni mjehurići zraka koji zaostaju na rubu preparata. Preparat se slika uobičajenim uređajima za reproduciranje: fotoaparatom od 6 × 6 cm i filmom Fomapan N 21, kao što to čini autor. Za kvantitativne pretrage ispod stakalca stavlja se mat staklo. Na njemu olovkom treba nacrtati koordinantni križ koji se nalazi u sredini kvadrata stranice 10 mm.

* Referat je održan na Savjetovanju o topljenim sirevima u Novom Sadu, 8. i 9. 10. 1985.

Prilikom slikanja preparat se stavi u središte križa i osvijetli s donje strane odgovarajućom lampom. Na snimci se vide dodirne površine među pojedinim sirnim zrnima, ponekad veći kristali, pukotine ili nečistoća (slika 1). Za usporedbu karaktera dodirnih površina sirnog zrna služi mikrodenzitometar koji pokazuje ili registrira razlike u propusnosti sirila u izabranim dijelovima preparata. (slika 2).

Neki sirevi nemaju izraženu dodirnu površinu pa tada treba upotrijebiti kosu svjetlost ili uz pomoć TV-kamere povećati kontrast. Tako će se dobiti dodirne površine vrlo izražajne, ali ne onako oštre kao na običnoj makrofotografiji. Većina TV-kamera na objektivu ima spoj izveden po sistemu C-Mond. Za makrosnimke treba dodati odgovarajući međuprsten, kako bi se dobila slika potrebnih razmjera. Prema vrsti TV-kamere, može se slikati neposredno ili preko monitora. Ova metoda omogućava promatranje slike i tako da se na monitor nacrti raster. Nadalje, prikladno pomagalo su i fotografije koje se ispituju na aparatu za analizu slika. Struktura sira može se ocijeniti podjelom strukture u nekoliko grupa i usporedbom sa standardnim fotografijama.

Makrosnimke su se pokazale dobrima pri usporedbi strukture proizvoda iz više pogona i one iz različitih uređaja za proizvodnju. Prilikom uzorkovanja potrebno je razrezati cijeli kolut sira, a uzorke uzeti sa nekoliko mjesta (neposredno ispod površine, u sredini ili na kraju). Na snimkama se promatra broj zrna u jednom cm^2 , širina i dužina zrna i njihove deformacije. Na mjestima gdje je sir suh ili deformiran zbog prešanja, odnosi su širine i dužine vrlo različiti.

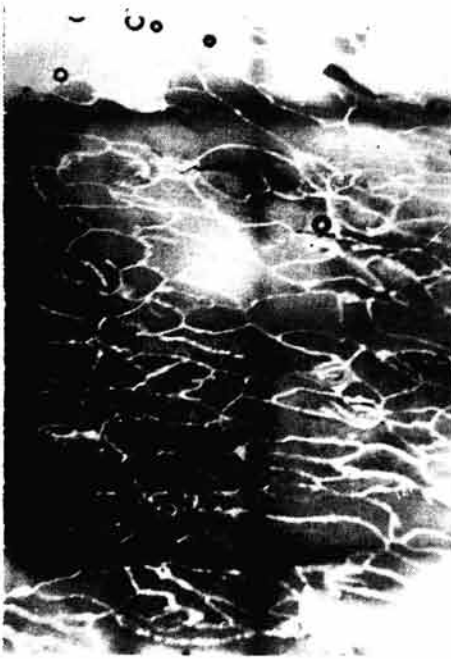
U sredini zrna obično nisu deformirana i njihova dužina i širina nije se promijenila. Tako je moguće odrediti pojedine zone u siru te utjecaj prešanja i solenja. Taj postupak često više govori od podataka o suhoj tvari. Ako se ova metoda dopuni nekom od metoda reoloških ispitivanja, time se može kvalitetno ocijeniti proizvodno postrojenje.

Za temeljito praćenje strukture, posebno s obzirom na raspored masti, pojavu mikrokristala i mikroorganizama, neophodno je upotrijebiti polarizacioni mikroskop. Obično je dovoljno malo uvećanje (oko $100\times$), a preparat se priprema na isti način kao za makrofotografiju. Ako želimo promatrati mikroorganizme, rez sira se mora fiksirati i obojiti. Naravno, uz to je potrebna savršena svjetlost i veliko uvećanje. Ta se metoda rijetko koristi, zato jer se mnogo kvalitetnije i izražajnije fotografije dobivaju na elektronskom mikroskopu.

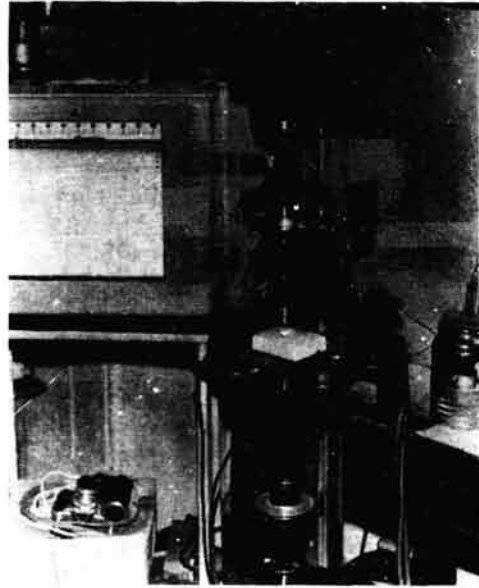
Topljeni sirevi se u toku proizvodnje najjednostavnije mogu kontrolirati tako da se tanko razmažu na predmetno stakalce i prekriju pokrovnim stakalcem 18×18 mm. Pri tom se pritiskom na pokrovno stakalce sloj sira maksimalno stanji. Tako se pronalazi podesna debljina preparata za promatranje oblika masnih kuglica i kristala soli za topljenje sireva u polarizacionom osvjetljenju. Za snimanje mikrosnimaka dovoljna je obična kamera sa Laika filmom. Nju treba pričvrstiti na mikroskop uz pomoć dodatka (npr. proizvod Pentacon-a, Dresden).

Mikro metoda

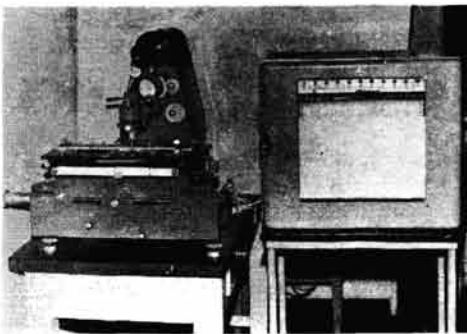
Naravno, brži je i sigurniji rad sa specijalnim mikrokamerama. Ako upotrijebimo starije, ali preuređene tipove polaroid kamera, dobit ćemo snimke



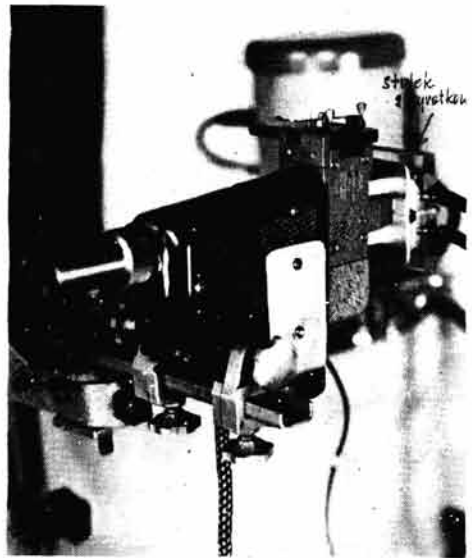
Slika 1. Makrosnimak strukture sira Gouda
Figure 1. Fotomacrogaph of Gouda Cheese



Slika 3. Polarizacioni mikroskop
Figure 3. Polarisaton Microscope



Slika 2. Mikrodenzitometar podešen za praćenje dodirnih površina sirmih zrna
Figure 2. Microdensitometer for studying the connecting surfaces of the Cheese Cells



Slika 4. Interferometar za praćenje procesa soljenja sira
Figure 4. Interferometer for studying the Process of Cheese salting

koje su relativno dobre, ali skupe. Da bismo brzo ocijenili kakvoću sireva za topljenje, možemo se poslužiti i brzom metodom koja omogućava praćenje termičkog toka topljenja, odnosno promjene reoloških osobina i aktivnosti vode u sirovini ili topljenom siru.

U tu svrhu autor je sastavio polarizacioni mikroskop čiji su glavni sastavni dijelovi 2 fotoobjektiva. Jedan od njih služi za promatranje i slikanje, a drugi omogućava osvjetljavanje. Budući da su objektivni međusobno dosta udaljeni, na stolić mikroskopa koso se smjesti uređaj za zagrijavanje, uređaj za hlađenje i komore za reološka mjerenja i za mjerenja aktivnosti vode.

Čitav uređaj je na optičkoj klupi i pričvršćen je okomito na masivnom stalku (slika 3). Stolići mikroskopa mogu se lako mijenjati, a opremljeni su toplinskom komorom za zagrijavanje vrelom vodom ili mikrovalovima. Drugi stolić ima motorički pomak i polugu vezanu vodoravno na tenzometrijski očitavač, što omogućava mjerenje reoloških osobina malih uzoraka prirodnih ili topljenih sireva. Treći stolić ima mikropipete i diferencijalni termopar kojim se, po kriokopskoj metodi, mjeri aktivnost vode. Ovaj stolić grije ili hladi termoelektrična baterija.

Da bi se pratio tok soljenja, izoljavanja ili bubrenja, načinjen je jednostavni interferometar. Uzorak sira stavi se u kivetu, smjesti ispod ogledala i promatra jednostavnim interferometrom u svjetlu koje na njega pada. Prema vrsti tekućine u kojoj se uzorak nalazi, oko njega nastaju promjene koncentracije čiji tok možemo pratiti ako promatramo deformacije interferencijskih pruga i njihovih boja. (slika 4).

Tok topljenja sira može se promatrati na grijanom stoliću mikroskopa (npr. Boetijus THMK, proizvod Veb — Analytic Drezden). Ovaj uređaj radi vrlo precizno, ali ima relativno malo vidno polje, zbog čega je svestranije promatranje toka topljenja usporeno. Stručna literatura navodi čitav niz specijalnih komora za termizaciju uzoraka, ali većina njih ne odgovara kontroli proizvodnje sira.

Elektronska mikroskopija

Za temeljno praćenje strukture sira u zadnje vrijeme je pronađeno nekoliko specijalnih metoda elektronske mikroskopije. Većinom su to teške i dugotrajne metode, ali su rezultati vrlo dobri i nadoknađuju uloženi trud. Ultrastruktura prirodnih i topljenih sireva u Čehoslovačkoj se prati »rastermikroskopom« te Tesla BS-300. Postupak je slijedeći: mali kvadratići uzoraka sira fiksiraju se formaldehidom, a zatim se prepariraju u alkoholu kojemu se povećava koncentracija, obezmašćuju se u acetonu, a isušuju metodom kritične točke. Slijedi vakuum-metalizacija uz pomoć zlata i promatranje sa snimanjem, pri čemu je dobar film Fomapan N 21 6×6 cm. Za ocjenu sirovine za topljenje, pripreme se režnjevi sira debljine 15 — 20 mm. Oni se postepeno zagrijavaju na stoliću spomenutog polarizacionog mikroskopa uz pomoć vrele vode ili termobaterijom i to takvom brzinom, da se za 8 — 10 minuta dostigne temperatura od 85 — 95 °C. Pri tom se promatraju rubovi sira u otopini soli za topljenje. Obično se događaju ove osnovne pojave:

a) Oko sira se stvara difuzna zona koja sadrži bjelančevine i koja je i oslobođena kuglica masti. Prema broju i obliku kuglica masti i prema temperaturi

kod koje se oslobađaju, osobine sirovina se mogu relativno dobro okarakterizirati. Slijedeći faktor je temperatura pri kojoj se reznjevi sira deformiraju i sir se topi. To se vidi po tome, što prvobitno jasniji rez postaje mutan i neproziran. Kraj termopara koji dotiče uzorak, registrirat će temperaturu topljenja.

b) Rjeđe nastaje brza difuzija u otopini soli za topljenje, kada režanj sira nastaje i prije postignute temperature topljenja, što je uobičajeno kod većine tvrdih sireva. Ova je pojava česta kod zrelih ili prezrelih sireva, u pravilu onih sa plijesnima.

c) Režanj se kod 60 — 70 °C naglo skuplja i ostaje bez promjene do temperature od 95 — 98 °C, a tek onda se počinje topiti.

d) Nakon postignutih 70 °C uzorak naglo puca po dodirnim površinama pojedinih zrna, a zatim slijedi pojava kao pod točkom a.

Na istom uređaju može se promatrati i kako razne vrste otopina soli za topljenje prodiru u sir.

Tok otapanja može se snimati odgovarajućom kamerom. Nastaju slijedeće pojave:

a) Sitne staklaste čestice postepeno se duže vrijeme otapaju ili se skupljaju u veće cjeline, što usporava otapanje.

b) Iskristalizirane soli stvaraju sitne kuglice koje se brzo otope.

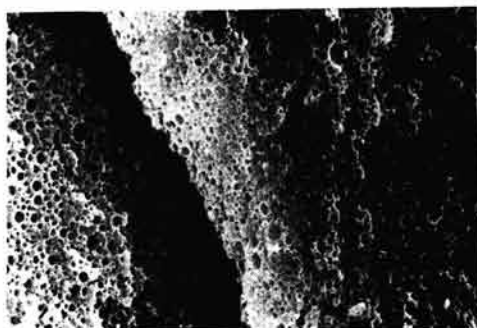
c) Instantizirane soli prilikom otapanja stvaraju sitne mjehuriće CO₂ koji doprinosi disperziji soli za topljenje u masi sirovine.

Prilikom promatranja snimaka s elektronskog mikroskopa javlja se niz specifičnih oblika čiji broj i oblik mogu biti karakteristika tehnološkog postupka. Najizražajnija je konfiguracija bjelančevinastog matriksa; kod nekih sireva vidljiva je njegova jednosmjerna orijentacija, a u drugim slučajevima struktura je homogena. Prema primarnom postupku sa mlijekom i prema uređajima za proizvodnju, oblik i raspored masnih kuglica variraju (slika 5). Pukotine izazvane nepodesnim tehnološkim postupkom obično su velike u vidnom polju elektronskog mikroskopa, a njihova identifikacija je oštra i izričita. U nekim slučajevima se, međutim, teško razlikuju šupljine nastale ekstrakcijom masti od onih koje ostaju iza isušene vode.

Vrlo su zanimljivi kristali soli i aminokiselina na kojima se mogu vidjeti tragovi otapanja ili korozije. Najvažnija je struktura sitnih spojeva s kalcijem (slika 6 i 7). Karakterističnu strukturu ima sirno tijesto koje je termički obrađeno ili dimljeno (parenica). Kod ovih proizvoda nastaju istosmjerne niti koje prožimaju kristali kuhinjske soli, laktoze i aminokiselina. Prema vrsti upotrebljenog mlijeka, mijenja se oblik i dužina pojedinih niti. Visok postotak kraljieg mlijeka u »oštepku« izaziva kraću, čak pahuljastu strukturu.

Naprotiv, sirevi tipa »Jadel« se sastoje od vrlo nježnih niti (vlakana) sa šupljinama u kojima je prvobitno bila sirutka. (slika 7).

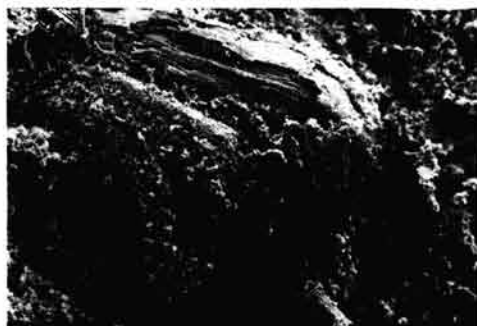
Zanimljivi podaci dobivaju se i prilikom promatranja sirnih očiju. Tijesto sira je na ovim mjestima vrlo zgusnuto, a na površini se nalaze kristalići fosfor-nh spojeva. Mikroorganizmi se nalaze većinom u međuprostorima ili na mjestima gdje struktura sira nije jako kompaktna. Pojedine vrste bakterija nisu za sada identificirane. Snimke dobivene uz pomoć elektronskog mikroskopa



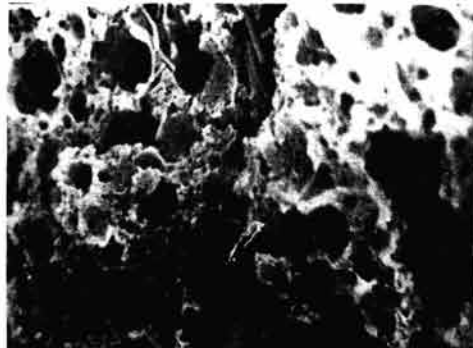
Slika 5. Struktura sira Goude, pov. 3000×
Figure 5. Structure of Gouda Cheese



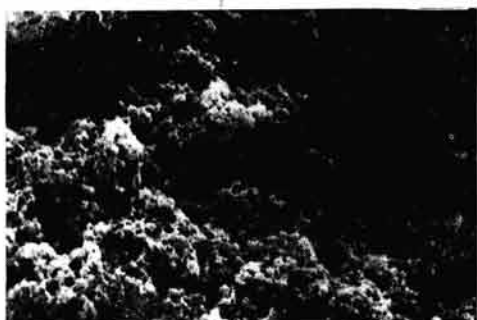
Slika 6. Kristal u topljenom siru, pov. 500×
Figure 6. Crystal in the melted Cheese



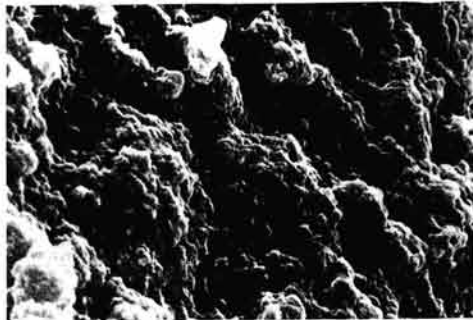
Slika 7. Topljeni sir sa mesom, pov. 500×
Figure 7. Melted Cheese with Meat



Slika 8. Mikroorganizmi u topljenom siru, pov. 5000×
Figure 8. Microorganisms in the melted Cheese



Slika 9. Mikrostruktura topljenog sira proizvedenog u topioniku Stephan pov. 5000×
Figure 9. Microstructure of the melted Cheese produced in the Smellery Stephan



Slika 10. Mikrostruktura topljenog sira proizvedenog u klasičnom topioniku, pov. 5000×
Figure 10. Microstructure of the melted Cheese produced in the classical Smellery

pokazale su se dobrima i u ocjeni različitih vrsta topionika. Ultrastruktura ekstramasnog sira proizvedenog na klasičnom topioniku je izrazito korpuskularna. Pri tome su pojedine čestice svrstane u trake ili pravilno, što je vjerovatno izazvano hlađenjem sirne mase u stroju za pakiranje. Struktura iste vrste sira proizvedenog na topioniku »Stephan combicut« znatno je nježnija i više pjenasta pri čemu nisu prisutne niti ni pramenovi. Najveća razlika primjećuje se kod topljenog bloka. Sirevi proizvedeni na principu klasičnog tipa imaju strukturu više lamelarnu, dok je ista u »combicutu« nježna i pjenasta. Karakteristična su kratka i vrlo nježna vlakna među pojedinim česticama. Ova vrsta sira sadrži najviše bjelančevina zbog čega je potreban velik broj obrtaja noževa.

Većina masti je dispergirana u nepravilne oblike i preostaje sasvim malo pravilnih masnih kuglica (slike 9 i 10). Za korištenje elektronskog mikroskopa po sirarskim pogonima nužno je uspostaviti dobru organizaciju uzorkovanja, osigurati preparaciju uzoraka u samom pogonu i mikroskopiranje u najbližem specijalnom laboratoriju. To se ostvaruje u južnoj Češkoj.

Izabrana literatura

1. EMONS H. H., KEUNE H., SEYFARTH H. H.: Chemische mikroskopi VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 1973.
2. BLACK J. T.: The scanning microscope, Van Nostrand Reinhold Co., New York 1974.
3. COHEN A. L. (1979): **Scanning Electron Microsc.** 303—323.
4. EINE, M. F., BIGGS D. A. and STANLEY D. V. (1976): **J. Dairy Res.** 43, 109—111.
5. HALL D. M., and CREAMER L. K. (1972): **N. Z. J. Dairy Sci. Technol.** 7, 95—102.
6. KALAB M. (1977): **Milchwissenschaft** 32, 449—458.
7. SCHMIDT D. G., HENSTRA S. and THIEL E. (1979): **Mikroskopie** (Vienna) 35, 50—55.
8. TARANTO M. V., WAN P. J., CHEN S. L. and RHEE K. C. (1979): **Scanning Electron Microsc.** 273—278.
9. RAYAN A. A., KALAB M. and ERNSTROM C. A. (1980): **Scanning Electron Microsc.** 635—643.