

## ANALIZA TEHNOLOGIJE I MIKROFLORE LIČKE BASE TE IZBOR STARTERA ZA INDUSTRIJSKU PROIZVODNJU\*

Dr Ljerka KRŠEV, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb

### 1.5. MLJEKARSKE KULTURE

#### 1.5.1. Fermentacija mlijeka

Mlijeko je veoma dobra podloga za razvoj mikroorganizama. U povoljnim uvjetima mikroorganizmi, uvijek prisutni u mlijeku u manjem ili većem broju, koriste njegove kompleksne sastojke za hranu i razgrađuju ih na jednostavnije. Kod povoljnih temperatura (oko 25—35 °C) razvoj mikroorganizama je veoma brz, generacijsko vrijeme traje oko pola sata (Alais, 1974). Između 1856. do 1875. god. Luis Pasteur je svojim radovima dokazao da fermentacije nastaju radom mikroorganizama i da svakoj vrsti fermentacije odgovara određeni tip mikroorganizama. U mlijeku dolazi najčešće do fermentacije ugljikohidrata i stvaranja mlječne kiseline djelovanjem streptokoka i laktobacila mlječno-kiselog vrenja (Kosikowski, 1966). Fermentacija je proces koji dovodi do ograničenih biokemijskih promjena pomoću enzima proizvedenih od mikroorganizama bez učestvovanja kisika uz oslobađanje energije. Pored mlječno-kisele, u mlijeku se u manjem opsegu odvijaju i propionsko-kisela, alkoholna i koliformno-plinotvorna fermentacija.

#### Mlječno-kisela fermentacija

U mlijeku ima 4,4—5,2% laktoze (Webb and Johnson, 1974). Ostali šećeri, poput glukoze i galaktoze, nalaze se u mlijeku samo u tragovima (Harper i Hall, 1976.). Uz laktozu je vezana proizvodnja fermentiranih mlijeka i sireva. Mlječnu kiselinu stvaraju bakterije mlječno-kiselog vrenja, preko svojih enzima.

Proces fermentacije laktoze u mlječnu kiselinu je veoma složen i odvija se postepenom razgradnjom, uz stvaranje brojnih međuprodukata i energije.

Organizmi ne koriste laktozu izravno, već je najprije cijepaju pomoću enzima laktoze u glukozu i galaktozu.

Mikroorganizmi, koji fermentiraju laktozu, sadrže enzim koji pretvara galaktoze-1-fosfat u glukozu-1-fosfat i tako skreću daljnji proces u pravcu fermentacije glukoze.

Homofermentativni mikroorganizmi mlječno-kiselog vrenja stvaraju u toku mlječno-kisele fermentacije pretežno 75—95% od ukupne kiseline — mlječnu kiselinu, te nešto diacetila, acetoina, acetona, acetaldehida, maslačne, propionske, oacetene i mravlje kiseline.

Heterofermentativne bakterije mlječno-kiselog vrenja proizvode manje mlječne kiseline, a uz to i znatne količine ostalih produkata kao: hlapive kiseline, očetenu kiselinu, alkohol, CO<sub>2</sub>. U toku mlječno-kisele fermentacije stva-

\* Izvodi iz doktorske disertacije mr Lj. Kršev, Zagreb, 1981.

ra se D i L oblik mlječne kiseline ili mješavine ove dvije. *S. lactis* proizvodi pretežno D oblike, a drugi mikroorganizmi, među njima i *L. cremoris* i *L. dextranicum* pretežno L. oblik (Orla-Jensen, 1931; Hammer, 1948; Prevot, 1961; Kosikowski, 1966; Bergey, 1974; Leclerc, 1975; Shahani i sur., 1962). Pojedini mikroorganizmi, uzročnici mlječno-kiselog vrenja podnose različite količine mlječne kiseline. Tako streptokoki, prema Jennessu i Pattonu (1959), prosječno podnose 0,8—1<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, a ponekad i do 1,2<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, laktobacili prema Jennessu i Pattonu 1,5—2<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, a prema Hammeru i Babelu (1948) do 4<sup>0</sup>/<sub>0</sub> mlječne kiseline.

Ovako visoki sadržaj mlječne kiseline uglavnom je nepoželjan u mlječnim proizvodima, te se stoga i primjenjuju mješovite mljekarske kulture, ili se podešavaju temperature koje potiču ili usporavaju rast nekih mikroorganizama (Brekeny i sur., 1975; Chazand, 1977; Dutta, 1971).

## 1.5.2. Primjena mljekarskih kultura

Proučavanje i upoznavanje mikrobioloških procesa i njihovo naučno objašnjenje omogućili su da se praksa u mljekarskoj industriji obogati primjenom čistih kultura, bakterija, kvasaca i plijesni. Bakterije mlječno-kiselog vrenja u čiste kulture prvi je izdvojio Lister (1878). Oko 1890. Stöck je primijenio kulture u maslarstvu u Danskoj, a Weigman za kiseljenje vrhnja u Njemačkoj. U Švicarskoj je 1891. Freudenreich počeo primjenjivati kulture u sirarstvu, a Kasé u Francuskoj plijesni kod proizvodnje kamamera. Više je razloga zašto su se u mljekarskoj industriji počele koristiti mljekarske tj. čiste kulture. Zapazilo se da uz mikroorganizme, koje želimo i koji služe stvaranju arome, razgrađuju masti, bjelančevine, te daju željeni okus, miris, boju i konzistenciju mlječnom proizvodu, dolaze i drugi, nepoželjni. Nepoželjni mikroorganizmi izazivaju pljesnivost, nadimanje, kvarenje. Da bismo dobili jednolične karakteristike proizvoda moramo koristiti one, koji su za neki proizvod korisni (Kosikowski, 1966).

### Kvas i čiste kulture

Za proizvodnju fermentiranih proizvoda u domaćinstvu se koristi kvas, a u industrijskoj proizvodnji čiste kulture, koje nazivamo »mljekarske kulture«. »Domaća kultura — kvas« je bakterijska asocijacija koja služi za kiseljenje (mlijeka, krušnog tijesta). Pored bakterija mlječne kiseline-streptokoka i laktobacila-kvas sadrži još i kvasce, plijesni, a ponekad i druge nepoželjne (patogene) mikroorganizme koji su dospjeli iz okoline. Kvas se u domaćinstvu priređuje tako da se čisto, zdravo, sirovo mlijeko, stavlja u čistu posudu i ostavi da se zakiseli na toplom mjestu. Od tako zakiseljenog mlijeka uzima se mala količina i stavlja u prokuhano i ohlađeno mlijeko, koje se drži na toplom mjestu. Višekratnim prenošenjem s mlijeka na mlijeko može se dobiti sve bolji i bolji kvas. Takav kvas služi za kiseljenje većih količina mlijeka u pripravi kiselo-mlječnih proizvoda (Teply, 1962, 1972).

Kako upotreba kvasa ne daje uvijek dobre, već često i loše i neujednačene proizvode, stručnjaci su otkrili da je korisno i moguće mlijeko cijepiti čistim kulturama mikroorganizama koji odgovaraju za pojedine proizvode.

Pod nazivom »starter« obično se razumije kultura bakterija mlječno-kiselog vrenja. Međutim, u praksi, taj se naziv često upotrebljava i za mljekar-

ske kulture koje sadrže i druge mikroorganizme, a ne samo bakterije mlječno-kiselog vrenja (Petričić, 1980).

U Danskoj je 1890. godine Hansenov laboratorij počeo proizvoditi čiste kulture za mljekarsku industriju.

Mljekarske kulture mogu sadržavati samo jednu vrst mikroorganizama; to su pojedinačne ili monokulture. Ako imaju dvije ili više vrsta mikroorganizama, odnosno različite sojeve jedne vrste, to su mješovite ili polivalentne kulture (Kosikowski, 1966).

U slijedećoj tabeli na usporednom prikazu date su karakteristike kvasa i mljekarskih kultura.

**Tabela 2.**

**Osnovne karakteristike kvasa i mljekarskih kultura**

Kvas	Mljekarske kulture
Sadrži tipične i netipične, a ponekad patogene mikroorganizme	Sadrži jedan ili više tipičnih mikroorganizama
Temperature inkubacije nisu strogo određene	Za optimalni razvoj traže određenu temperaturu inkubacije
Trajnost ograničena uslijed heterogenosti mikroflora	Može se koristiti uz pravilan rad dulje vrijeme
Kvašen, ali ne uvijek tipičan okus	Daje proizvode karakterističnog okusa, arome, konzistencije
Daje neujednačenu kvalitetu proizvoda	Daje ujednačenu kvalitetu proizvodu
Proizvodnja i primjena jednostavne	Proizvodnja i primjena zahtijevaju stručno znanje

(Petričić, 1980).

Vidljivo je da je za industrijsku proizvodnju autohtonih fermentiranih mlječnih proizvoda moguće koristiti samo mljekarske kulture, što naravno otvara široko polje rada na iznalaženju adekvatnih kultura za razne autohtone proizvode.

## 2. EKSPERIMENTALNI DIO

### 2.1. Područje, materijal i metode rada

#### 2.1.1. Područje ispitivanja

Snimanje tehnološkog procesa i uzorkovanje, u svrhu fizikalno-kemijskih ispitivanja i odvajanje prirodne mikroflora, izvršeno je na dosta velikom području Like, u selima oko Vrhovina, Otočca i Titove Korenice, zatim u Ličkom Osiku, Ribniku, Počitelju, Lovincu, malenom selu Ričica, Štikadi i Vaganu, podno Vaganskog vrha.

Ispitivanje tehnološkog procesa base izvršeno je u 10 domaćinstava. U Otočcu obrađena su dva domaćinstva, a u ostalim mjestima po jedno domaćinstvo. Uzorci su uzimani u veljači i ožujku i to po 2 uzorka po domaćinstvu u veljači, a 3 uzorka po domaćinstvu u ožujku.

## 2.1.2. Materijal

### Uzimanje uzoraka mlijeka

Sa obrađenog područja uzeto je 55 uzoraka miješanog jutarnjeg i večernjeg kravljeg mlijeka. Uzorci mlijeka stavljeni su prije termičke obrade u sterilne boce. Nakon termičke obrade ponovo su sterilno uzeti uzorci mlijeka. Nakon završene fermentacije, uzeti su, sterilno, uzorci kiselog mlijeka, kao međuprodukta base.

### Uzimanje uzoraka ličke base

Nakon proizvodnje base, tj. nakon dodatka soli i skorupa, stavljeni su u sterilne posude uzorci svježe pripremljene base. Uzeto je ukupno 55 uzoraka. Određene su fizikalno-kemijske osobine, te napravljene mikrobiološke pretrage. Isti uzorci base analizirani su nakon 3 i 5 dana čuvanja na temperaturi hladionika (kao i u domaćinstvu).

## 2.1.3. Metode rada

### Kemijska ispitivanja

Gustoća mlijeka određena je na terenu laktodenzimetrom, a kiselog mlijeka, također laktodenzimetrom, ali u laboratoriju.

Kiselost mlijeka i kiselog mlijeka određena je na terenu titrimetrijski, a izražena u °SH, po metodi Soxhlet-Henkel.

Sadržaj masti za mlijeko i kiselo mlijeko određen je u laboratoriju metodom po Gerberu (Šipka i sur., 1975).

Sadržaj suhe tvari određen je računski po Fleischmanovoj formuli, a količina bjelančevina dobivena je približno prema % masti, a prema formuli:

$$\text{količina bjelančevina} = 0,445\% \text{ masti} + 1,72$$

(Pejić i sur. 1963)

Sadržaj vode u basi određen je sušenjem u sušioniku kod 105 °C do konstantne težine.

Sadržaj masti u basi određen je metodom po Gerberu.

Kuhinjska sol u basi određena je na slijedeći način: u porculansku zdjelicu za žarenje odvagne se 2—3 g base i pažljivo zagrijava na plameniku do pougljenjenja sira. Kada se zdjelica ohladi naliže se mala količina destilirane vode, pomiješa se i sadržaj filtrira kroz filter papir bez mineralnih tvari. Filtrat se hvata u Erlenmayerovoj tikvici. Pougljenjena masa se ispere još nekoliko puta na filtru toplom destiliranom vodom. Na svakih 50 ml filtrata, doda se 1 ml otopine kalijeveg bikromata kao indikatora, pa se titrira s 0,1 N AgNO<sub>3</sub> do pojave boje cigle. Količina soli u % izračuna se po formuli:

$$x = \frac{b \cdot 0,00585}{a} \cdot 100, \text{ gdje je:}$$

x = postotak NaCl

b = količina utrošenog n/10 AgNO<sub>3</sub> u ml

a = odvagnuta količina base u g

(Šipka, 1975)

Stupanj kiselosti određen je titrimetrijski u °SH

Mast u suhoj tvari za uzorke base dobivena je računski.

Izračunat je randman base, tj. podatak o količini base u kilogramima iz 100 kilograma mlijeka.

#### Mikrobiološka ispitivanja

Mikrobiološke analize svih uzoraka obuhvatile su određivanje ukupnog broja mikroorganizama, prisustva koliformnih mikroorganizama, broja laktobacila i streptokoka mlječno-kiselog vrenja, broja kvasaca i plijesni, zatim broja mikrokoka i stafilokoka u 1 ml sirovog mlijeka, obrađenog mlijeka i kiselog mlijeka, te u 1 gramu svježe base, kao i base stare 3 i 5 dana.

#### Određivanje ukupnog broja mikroorganizama

Ukupni broj mikroorganizama određen je po metodi agar ploča na Plate-Count Agar podlozi pH 7,0 (Oxoid, 1977).

Uzorcima za ispitivanje ukupnog broja mikroorganizama pripremaju se prema propisu u Pravilniku o najmanjim uvjetima bakteriološke ispravnosti, kojima moraju odgovarati živežne namirnice u prometu.

Petrijeve zdjelice sa ispitivanim materijalom inkubiraju se 48 sati na 37 °C.

#### Određivanje prisustva koliformnih mikroorganizama

Za određivanje koliformnih mikroorganizama korištena je hranjiva podloga Endo-agar, gotova podloga iz proizvodnog programa »Torlak«.

#### Određivanje broja laktobacila

Upotrebljena je hranjiva podloga MRS (Oxoid, 1977).

#### Određivanje broja streptokoka

Za određivanje broja streptokoka mlječno-kiselog vrenja upotrebljena je podloga: mlijeko-papain-razgrađeno-agar.

(Mašek, 1960).

#### Određivanje broja kvasaca i plijesni

Primijenjena je hranjiva podloga krumpir-dekstroza agar, pH 5,6, (Oxoid, 1977).

#### Određivanje broja mikrokoka i stafilokoka

Za određivanje broja ovih mikroorganizama upotrebljen je manitol — slani agar, pH 7,5

#### Organoleptička ispitivanja

##### Autohtona lička basa

Organoleptički je ocijenjeno 55 uzoraka autohtone base stare 3 dana, prema osnovnoj tabeli za ocjenu svježih sireva, prilagođenoj za basu (Ljubojević, 1975).

Ocjenjivanje je izvršeno komisijski, a svrstavanje base u kvalitetne klase urađeno je prema tablici:

Kvalitetna klasa	Broj bodova
ekstra	18,1—20,0
I	16,1—18,0
II	13,0—16,0
III	10,0—12,9
ostalo	ispod 10

(Sabadoš, 1979)

Tabela za ocjenjivanje base

Svojestvo	Karakteristika	Broj bodova	Najviše postignut broj točaka	Opaska	
VANJSKI IZGLED	1.) Površina sira jednolično bijele do svjetložućkaste boje i posve čista	3			
	Na površini sira jedva primjetna nečistoća	2			
	Primjetna nečistoća i pojava plijesni na površini sira	1			
	Greške u jakoj mjeri vidljive	0			
UNUTARNJI IZGLED	BOJA TIJESTA	2.a) U presjeku posve jednolično do svjetložućkaste boje i bez nečistoća	1		
		Ne potpuno jednolične bijele do svjetložućkaste boje i primjetne nečistoće	0		
	KONZISTENCIJA TIJESTA	2.b) Tijesto bez grudica	4		
		Tijesto s vrlo malo grudica	3		
		Tijesto s malo grudica	2		
		Tijesto s više grudica	1		
		Tijesto s mnogo grudica razne veličine	0		
	MAZIVOST	2.c) Tijesto dobro mazivo	2		
		Tijesto manje mazivo	1		
		Tijesto mrvičasto	0		
MIRIS	3.a) Bez stranih mirisa	2			
	Sa stranim mirisima (po krmi, staji)	1			
	Greške u jačoj mjeri izražene	0			
OKUS	3.b) Ugodno kiselkastog okusa	8			
	Nešto oštar kiselkast okus	7			
	Kiseo i nešto nečist, preslan i neodređeni priokusi	6—5			
	Nagorak, po kvascima, po loju, po staji, krmi	4—5			
	Gorak, metalan, po suđu i plijesni	3—2			
	Greške u jačoj mjeri vidne	1—0			

Sir tipa lička basa proizveden poluindustrijski s predloženim starterima

Uzorci sira tipa lička basa proizvedeni poluindustrijski sa predloženim starterima, kemijski ispitani, ocijenjeni su i svrstani u kvalitetne klase na isti način i po istim tabelama, kao i autohtoni proizvod.

#### Proizvod tipa lička basa iz UF mlijeka

Uzorci sira tipa lička basa proizvedeni su poluindustrijski iz UF mlijeka sa predloženim starterima, kemijski ispitani i ocijenjeni, te svrstani u kvalitetne klase na isti način i po istim tabelama kao i uzorci autohtonog proizvoda i proizvoda kod kojeg nije korišteno UF mlijeko za proizvodnju.

Svi poluindustrijski proizvedeni uzorci sira tipa lička basa ocjenjivala je komisija od tri člana (suradnici u R. O. Dukat).

#### Metoda izolacije mikroorganizama

Za izolaciju sojeva laktobacila i streptokoka mlječno-kiselog vrenja primijenjena je metoda po Knezu i sur. (1960), koja se modificirala prema potrebama rada za koji je korištena.

Metoda uključuje slijedeći redoslijed rada:

- a) izbor mlječno-kiselog proizvoda: basa
- b) izbor temperatura inkubacije, radi favoriziranja rasta grupe mikroorganizama, koji se žele izolirati, te izbor hranjivih podloga i red veličine razređenja
- c) tehnika izolacije
- d) identifikacija
- e) vrijednost identificiranih sojeva za sastavljanje startera.

#### a) Izbor mlječno-kiselog proizvoda — base

Uzorci ličke base koji su se kod praćenja tehnološkog procesa jako razlikovali od osnovnog tehnološkog procesa, ili su bili proizvedeni u lošim higijenskim uvjetima, ili iz mlijeka koje je bilo ocijenjeno kao loša sirovina, nisu analizirani. Od 70 uzoraka analizirano je 55.

- b) Izbor temperatura inkubacije, radi favoriziranja rasta grupe mikroorganizama, koji želimo izolirati, te izbor hranjivih podloga i reda veličine razređenja

1. Za izolaciju laktobacila primijenjena je temperatura 43 °C, a podloga MRS-agar. Razrađenja: 1: 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>.
2. Za izolaciju streptokoka primijenjena je temperatura 20, 30, 40 °C, a podloga papain — razgrađeno mlijeko-agar. Razrađenja: 1: 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>.

#### c) Tehnika izolacije

Materijal u razrađenju 1: 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup>, nacijepi se na izabrane krute podloge na Petrijeve zdjelice, inkubira kod izabrane temperature. Sa svake Petrijeve zdjelice izdvoji se do 10 karakterističnih kolonija za pojedinu grupu mikroorganizama. Svaka kolonija precijepi se na obrano sterilno mlijeko (10 ml) i inkubira na odgovarajućoj temperaturi.

Prvi koagulum svake kolonije ako se koagulirao najduže za 48 sati precjepljuje se na 100 ml sterilnog obranog mlijeka (1% cjeviva) i ponovo inkubira uz uvjet da je gruš ocijenjen kao dobar. Nakon koagulacije bilježi se vrijeme potrebno za koagulaciju, ispita kiselost gruša ( $^{\circ}\text{SH}$ ) i vrši mikroskopski pregled.

U daljnjem postupku, gruš se precjepljuje na sterilno obrano mlijeko (1% cjeviva), prati se vrijeme grušanja, kiselost i mikroskopska slika, sve do konstantne kiselosti, konstantnog vremena koagulacije i zadovoljavajuće mikroskopske slike. Precjepljuje se najviše do 60-te generacije.

Nakon toga gruš u razređenju 1:  $10^9$  nacijepimo na krute podloge, inkubiramo na temperaturi optimalnoj za sojeve, koje izoliramo. Sa krute podloge uzimamo do 3 kolonije za identifikaciju.

#### d) Identifikacija

Sojevi laktobacila i streptokoka mlječno-kiselog vrenja identificirani su pomoću API — sistema po uputama proizvođača Vioxlab; La Balme les grotes, Francuska.

Sojevi laktobacila precijepljeni su tri puta uzastopno na MRS tekuću podlogu. Zadnje precjepljivanje vrši se na kivete za centrifugiranje. Nakon centrifugiranja talog se ispere fiziološkom otopinom, a centrifugat se prenese u MRS tekuću podlogu za identifikaciju (bez glukoze i mesnog ekstrakta). Sojevi streptokoka precjepljuju se na isti način na tekućoj podlozi papain-razgrađeno mlijeko.

Inokulacija se vrši Pasterovom pipetom. Interpretacija rezultata identifikacije sojeva vrši se prema profilima karakterističnim za pojedine sojeve, koji su uz potrebne tabele priloženi.

#### e) Vrijednost identificiranih sojeva za sastavljanje startera

Identificirani sojevi precjepljuju se kroz 10 generacija u obrano sterilno mlijeko (1% cjeviva) te se prati njihova stabilnost na mlijeku. Prati se vrijeme koagulacije, kiselost koaguluma, mikroskopska slika i ocjenjuje kvalitet koaguluma organoleptički: izgled gruša, miris i okus.

#### Sastavljanje startera

Kod sastavljanja startera potrebno je bilo prethodno provjeriti postoje li antagonistički odnosi sojeva koji se kombiniraju.

Za to ispitivanje primijenjena je metoda uzgoja soja na mlijeku uz dodatak filtrata soja, koji bi mogao biti antagonist (Devoyd, 1969). Nakon inkubacije na optimalnoj temperaturi kontrolira se zakiseljavanje ( $^{\circ}\text{SH}$ ) i rast mikroorganizama mikroskopski.

Kod sastavljanja kombiniranih kultura važno je bilo odrediti optimalne temperature, već prema tome, koje mikroorganizme želimo potaknuti u rastu u kombiniranoj kulturi. Za to je potrebno odrediti optimalne temperature rasta za svaki mikroorganizam koji se želi uvrstiti u kombinaciju.

Primijenjena je metoda: u 100 ml sterilnog obranog mlijeka cijepi se soj i inkubira na različitim temperaturama, te se prati brzina zakiseljavanja (Knez i sur., 1960).

Nastavak u broju 6/83.