

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Eva GROHAR

**KEMIJSKE IN MIKROBIOLOŠKE ZNAČILNOSTI
AVTOHTONIH SLOVENSКИH OVČJIH SIROV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Eva GROHAR

**KEMIJSKE IN MIKROBIOLOŠKE ZNAČILNOSTI AVTOHTONIH
SLOVENSКИH OVČJIH SIROV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF
AUTOCHTHONOUS SLOVENIAN SHEEP'S MILK CHEESES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2013

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za mlekarstvo, ki je pod okriljem Inštituta za mlekarstvo in probiotike, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete v Ljubljani, in na Katedri za mlekarstvo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je bila imenovana prof. dr. Irena Rogelj in za recenzentko prof. dr. Barbara Jeršek.

Mentorica: prof. dr. Irena Rogelj

Recenzentka: prof. dr. Barbara Jeršek

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega diplomskega dela v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete v Ljubljani. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Eva Grohar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD	Dn
DK	UDK 637.354:636.3:543.61:579.67(043)=163.6
KG	sir/avtohtoni slovenski ovčji siri/Kraški ovčji sir/Bovški ovčji sir/Dolenjski ovčji sir/kemijska sestava/trdi siri/polnomastni siri/mikrobiota sira/enterokoki/laktobacili/mlečnokislinske bakterije/PCR-DGGE/relativna podobnost sevov
AV	GROHAR, Eva
SA	ROGELJ, Irena (mentorica)/JERŠEK, Barbara (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2013
IN	KEMIJSKE IN MIKROBIOLOŠKE ZNAČILNOSTI AVTOHTONIH SLOVENSkih OVČJIH SIROV
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIV, 81 str., 6 pregl., 19 sl., 6 pril., 123 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Kraški, Bovški in Dolenjski ovčji sir so avtohtoni slovenski ovčji siri, ki predstavljajo del naše prehranske dediščine in s tem tudi del naše nacionalne identitete. S karakterizacijo tehnološkega postopka izdelave ter kemijskih in mikrobioloških lastnosti teh sirov lahko ohranimo njihovo avtentičnost ter zaščitimo njihovo poreklo. V diplomskem delu smo se osredotočili na proučevanje kemijskih in mikrobioloških značilnosti avtohtonih slovenskih ovčjih sirov. Po 0, 30 in 60 dneh zorenja smo na devetih vzorcih ovčjih sirov, iz treh različnih geografskih regij, opravili kemijske in mikrobiološke analize. S kemijskimi analizami, kot so določanje vsebnosti maščobe, beljakovin, suhe snovi in soli, smo opredelili tip sira in primerjali osnovno kemijsko sestavo med analiziranimi siri. Z mikrobiološkimi analizami, ki so vključevale klasično metodo gojenja na ploščah in molekularno metodo PCR v kombinaciji s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v denaturirajočem gradientu (DGGE), pa smo določali velikosti populacij glavnih skupin mlečnokislinskih bakterij (MKB) in opredelili sestavo dominantne mikrobne združbe avtohtonih ovčjih sirov. Analizirani avtohtoni ovčji siri spadajo med trde polnomastne sire, saj v povprečju vsebujejo od 54,11 do 56,57 % vode v nemastni snovi in od 49,17 do 52,92 % maščobe v suhi snovi. Najmanj variabilna sestavina sirov so beljakovine, katerih povprečne vrednosti znašajo od 23,95 do 25,52 %, najbolj pa maščoba s povprečnimi vrednostmi od 30,75 do 32,92 % in sol s povprečnimi vrednostmi od 1,84 do 2,12 %. Veliko variabilnost v sestavi smo opazili tudi med vzorci sirov različnih proizvajalcev iste vrste sira. Poleg razlik v kemijski sestavi so se ovčji siri razlikovali tudi v številu glavnih predstavnikov MKB. Podobnosti med njimi smo našli le v številu mezofilnih MKB, medtem ko so se tako vzorci znotraj posameznega ovčjega sira kot tudi ovčji siri med seboj razlikovali v številu enterokokov, laktobacilov in termofilnih MKB. V vseh analiziranih siri so bile številčno najbolj zastopane mezofilne MBK, sledile pa so jim termofilne MKB, čeprav bi glede na trdi tip sirov pričakovali dominantnost slednjih. V celotni mikrobni populaciji so največjo vlogo med zorenjem sirov odigrali enterokoki in laktobacili, saj se je njihovo število tekom zorenja povečevalo, medtem ko se je skupno število mezofilnih in termofilnih MKB zmanjševalo. Sestavo mikrobne populacije smo analizirali tudi z metodo DGGE. Pri tem smo na osnovi relativne podobnosti sevov ugotovili, da je imel vsak avtohtoni ovčji sir svoj specifični "bakterijski profil".

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN	Dn
DC	UDC 637.354:636.3:543.61:579.67(043)=163.6
CX	cheese/autochthonous Slovenian sheep`s milk cheeses/Karst ewe`s cheese/Bovški ewe`s cheese/Dolenjski ewe`s cheese/chemical composition/hard cheeses/full-fat cheeses/microbial communities/enterococci/lactobacilli/lactic acid bacteria/PCR-DGGE/relative similarity of strains
AU	GROHAR, Eva
AA	ROGELJ, Irena (supervisor)/JERŠEK, Barbara (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY	2013
TI	CHEMICAL AND MICROBIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF AUTOCHTHONOUS SLOVENIAN SHEEP`S MILK CHEESES
DT	Graduation thesis (University studies)
NO	XIV, 81 p., 6 tab., 19 fig., 6 ann., 123 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Karst, Bovški and Dolenjski ewe`s cheese are autochthonous Slovenian sheep`s milk cheeses which represent a part of our food heritage and therefore also a part of our national identity. With the characterization of technological process, chemical and microbiological properties of these cheeses we can preserve their authenticity and protect their origin. Our study was focused on the research of chemical and microbiological characteristics of autochthonous Slovenian ewes` cheeses. After 0, 30 and 60 days of ripening we carried out chemical and microbiological analyses on nine samples of cheeses, which were selected from three different geographical regions. With the chemical analyses, which included the determination of fat, protein, dry matter and salt content, we identified the type of cheese and compared the basic chemical composition between cheeses. The plate count method and PCR-DGGE were used to determine the concentration of major groups of lactic acid bacteria and to identify the structure of dominant microbial community in artisanal ewes` cheeses. Analyzed autochthonous cheeses are full-fat hard cheeses, because on the average they contain between 54.11 and 56.57 % water in non-fatty matter and between 49.17 and 52.92 % fat in dry matter. The least variable component of chesses are proteins, whose average content ranged from 23.95 to 25.52 %. On the other hand the most variable components of chesses are fat with average values between 30.75 and 32.92 % and salt with average values between 1.84 and 2.12 %. We observed a great variability in composition between samples of cheeses from different manufacturers of the same sort of cheese. In addition to differences in chemical composition of analyzed cheeses we also found variability in the number of representatives of lactic acid bacteria (LAB). Although there were some similarities between cheeses in the number of mesophilic LAB, we discovered deviations in the number of enterococci, lactobacilli and thermophilic LAB. This deviations were present between sheep`s milk cheeses and between samples within cheeses. In all cheeses the number of mesophilic LAB was higher than the number of thermophilic LAB, despite the fact that we expected the predominance of thermophilic LAB in hard cheeses. The major role during ripening process belonged to enterococci and lactobacilli, whose number increased during ripening, while the total count of mesophilic and thermophilic LAB decreased. We also analyzed the structure of microbial populations with DGGE method. Based on relative similarity of strains we found that every artisanal Slovenian ewe`s cheese possessed its own "bacterial profile".

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	IX
KAZALO SLIK	X
KAZALO PRILOG	XI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XII
SLOVARČEK.....	XIV
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI NALOGE	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZAŠČITA KAKOVOSTI POSEBNIH KMETIJSKIH PRIDELKOV OZIROMA ŽIVIL	3
2.1.1 Nacionalne in evropske sheme kakovosti	3
2.1.1.1 Zaščitena označba porekla (ZOP)	5
2.1.1.2 Zaščitena geografska označba (ZGO)	6
2.1.1.3 Zajamčena tradicionalna posebnost (ZTP).....	7
2.2 TRADICIONALNI OVČJI SIRI.....	8
2.2.1 Francoski tradicionalni ovčji siri	8
2.2.1.1 Roquefort.....	9
2.2.1.2 Ossau-Iraty	9
2.2.1.3 Broccio	9

2.2.2	Grški tradicionalni ovčji siri.....	9
2.2.2.1	Feta	10
2.2.2.2	Graviera	10
2.2.2.3	Kefalotyri, Ladotyri in Kefalograviera.....	11
2.2.2.4	Kasseri in Formaella.....	11
2.2.2.5	Galotyri, Kopanisti in Pichtogalo Chanion	11
2.2.2.6	Manouri in Xynomyzithra	12
2.2.3	Italijanski tradicionalni ovčji siri.....	12
2.2.3.1	Pecorino Romano, Pecorino Sardo in Pecorino Siciliano	12
2.2.3.2	Fiore Sardo in Canestrato Pugliese	13
2.2.3.3	Pecorino Toscano, Caciotta D`Urbino in Murazzano	13
2.2.3.4	Ricotta Romana	14
2.2.4	Španski tradicionalni ovčji siri.....	14
2.2.4.1	Manchego, Idiazábal, Roncal in Zamorano.....	14
2.2.4.2	La Serena in Torta del Casar	15
2.2.5	Portugalski tradicionalni ovčji siri.....	15
2.2.5.1	Evora in Nisa	16
2.2.5.2	Azeitao in Castelo Branco	16
2.2.5.3	Terrincho	16
2.2.5.4	Serpa in Serra da Estrela	17
2.2.6	Slovenski tradicionalni ovčji siri	17
2.2.6.1	Kraški ovčji sir	18
2.2.6.2	Dolenjski ovčji sir	18
2.2.6.3	Bovški ovčji sir.....	19
2.3	MOLEKULARNE METODE ZA PROUČEVANJE MIKROBNIH POPULACIJ V SIRIH	19
2.3.1	Metode, ki zahtevajo predhodno gojenje mikrobnih populacij	20
2.3.2	Metode, neodvisne od gojenja mikrobnih populacij	21
2.3.2.1	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajočem gradientu	22

3	MATERIAL IN METODE	24
3.1	POTEK DELA	24
3.2	MATERIAL	25
3.2.1	Vzorci avtohtonih slovenskih ovčjih sirov	25
3.2.2	Gojišča, raztopine in kemikalije	25
3.2.2.1	Trdno gojišče ROGOSA	25
3.2.2.2	Trdno gojišče KAA	25
3.2.2.3	Trdno gojišče M17	26
3.2.2.4	Raztopina dikalijevega hidrogenfosfata (K_2HPO_4)	26
3.2.2.5	Ringerjeva raztopina ¼ jakosti	26
3.2.2.6	Kemikalije	26
3.2.3	Reagenti in encimi za izolacijo DNA ter za metodi PCR in DGGE	28
3.2.4	Referenčni bakterijski sevi	29
3.2.5	Laboratorijska oprema	30
3.2.6	Laboratorijski material	31
3.2.7	Računalniški programi	32
3.3	METODE	33
3.3.1	Kemijske analize	33
3.3.1.1	Določanje vsebnosti maščobe v siru	33
3.3.1.2	Določanje vsebnosti beljakovin v siru	33
3.3.1.3	Določanje vsebnosti suhe snovi v siru	35
3.3.1.4	Izračun vsebnosti vode v siru in vsebnosti vode v nemastni snovi sira	35
3.3.1.5	Izračun vsebnosti maščobe v suhi snovi sira	36
3.3.1.6	Določanje vsebnosti soli kot NaCl v siru	37
3.3.2	Mikrobiološke analize	38
3.3.2.1	Priprava reprezentativnih vzorcev sira	38
3.3.2.2	Določanje števila bakterij z metodo štetja kolonij na različnih selektivnih trdnih gojiščih	38
3.3.2.3	Priprava konzorcijev bakterij	41

3.3.2.4	Izolacija genomske DNA iz konzorcijev bakterijskih populacij.	42
3.3.2.5	Pomnoževanje tarčne sekvence DNA z metodo PCR za analizo DGGE.....	43
3.3.2.6	Poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajočem gradientu (DGGE)	44
3.3.3	Statistična obdelava podatkov	46
3.3.3.1	Aritmetična sredina (povprečje) in standardni odklon	46
3.3.3.2	Minimum, maksimum, kvartili in mediana	47
4	REZULTATI.....	49
4.1	KEMIJSKA SESTAVA OVČJIH SIROV	49
4.2	MIKROBIOLOŠKE ZNAČILNOSTI OVČJIH SIROV	54
4.2.1	Osnovna mikrobiološka slika dominantne bakterijske populacije v avtohtonih slovenskih ovčjih sirih.....	54
4.2.2	Analiza produktov PCR z metodo DGGE.....	57
5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	60
5.1	RAZPRAVA.....	60
5.1.1	Kemijska sestava avtohtonih slovenskih ovčjih sirov	60
5.1.2	Mikrobiološka sestava avtohtonih slovenskih ovčjih sirov.....	62
5.1.2.1	Podobnosti in razlike v mikrobni združbi avtohtonih slovenskih ovčjih sirov (analiza DGGE).....	65
5.2	SKLEPI.....	68
6	POVZETEK.....	69
7	VIRI	71

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Začetna oligonukleotida, uporabljena pri metodi PCR.....	29
Preglednica 2: Imena in izvor referenčnih bakterijskih sevov	29
Preglednica 3: Razredčitve, atmosferski pogoji, čas in temperatura inkubacije za posamezna gojišča	40
Preglednica 4: Začetna oligonukleotida, ki pomnožujeta tarčno regijo 16S rDNA.....	43
Preglednica 5: Program PCR za pomnoževanje regije V2 – V3 na genu 16S rDNA.....	44
Preglednica 6: Izračunani statistični parametri za posamezne vrste sira in za vse analizirane ovčje sire skupaj, po 0, 30 in 60 dneh zorenja	52

KAZALO SLIK

Slika 1: Nacionalni znak za zaščiteno označbo porekla (MKGP, 2012c)	5
Slika 2: Znak Skupnosti za zaščiteno označbo porekla (MKGP, 2012c)	6
Slika 3: Nacionalni znak za zaščiteno geografsko označbo (MKGP, 2012c).....	6
Slika 4: Znak Skupnosti za zaščiteno geografsko označbo (MKGP, 2012c)	7
Slika 5: Nacionalni znak za zajamčeno tradicionalno posebnost (MKGP, 2012c)	7
Slika 6: Znak Skupnosti za zajamčeno tradicionalno posebnost (MKGP, 2012c)	8
Slika 7: Shema poteka metode PCR-DGGE (Ercolini, 2004: 300)	23
Slika 8: Shematski prikaz poteka kemijskih in mikrobioloških analiz ovčjih sirov	24
Slika 9: Shematski prikaz razredčevanja po Koch-u za paralelko A in paralelko B	39
Slika 10: Shematski prikaz cepitve trdnih gojišč z vzorci iz posameznih razredčitev	40
Slika 11: Kemijska sestava ovčjih sirov, po 0 dneh zorenja.....	49
Slika 12: Kemijska sestava ovčjih sirov, po 30 dneh zorenja.....	50
Slika 13: Kemijska sestava ovčjih sirov, po 60 dneh zorenja.....	50
Slika 14: Vsebnost soli kot NaCl v ovčjih sirih, med zorenjem	51
Slika 15: Zastopanost in variabilnost glavnih bakterijskih populacij v avtohtonih ovčjih sirih, po 0 dneh zorenja.....	54
Slika 16: Zastopanost in variabilnost glavnih bakterijskih populacij v avtohtonih ovčjih sirih, po 30 dneh zorenja.....	55
Slika 17: Zastopanost in variabilnost glavnih bakterijskih populacij v avtohtonih ovčjih sirih, po 60 dneh zorenja.....	55
Slika 18: Število predstavnikov glavnih skupin bakterijske populacije v posameznih vzorcih ovčjih sirov, tekom zorenja.....	56
Slika 19: Dendrogramski prikaz profilov DGGE konzorcijev bakterijskih populacij.....	59

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Vsebnost maščobe, beljakovin, suhe snovi, vode v nemastni snovi, maščobe v suhi snovi in soli v 100 gramih vzorcev avtohtonih slovenskih ovčjih sirov, tekom zorenja
- Priloga B1: Število enterokokov, laktobacilov, mezofilnih in termofilnih MKB v vzorcih Kraškega, Dolenjskega in Bovškega ovčjega sira, z izračunano mediano in kvartili, po 0 dneh zorenja
- Priloga B2: Število enterokokov, laktobacilov, mezofilnih in termofilnih MKB v vzorcih Kraškega, Dolenjskega in Bovškega ovčjega sira, z izračunano mediano in kvartili, po 30 dneh zorenja
- Priloga B3: Število enterokokov, laktobacilov, mezofilnih in termofilnih MKB v vzorcih Kraškega, Dolenjskega in Bovškega ovčjega sira, z izračunano mediano in kvartili, po 60 dneh zorenja
- Priloga C1: Prvi gel DGGE, na katerem je prikazana elektroforetska ločitev pomnožkov z metodo DGGE
- Priloga C2: Drugi gel DGGE, na katerem je prikazana elektroforetska ločitev pomnožkov z metodo DGGE

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AFLP	polimorfizem dolžin pomnoženih fragmentov (angl. Amplified Fragment Length Polymorphism)
APS	amonijev persulfat
ATCC	Ameriška zbirka tipskih kultur (angl. American Type Culture Collection) – Manassas, Virginia, ZDA
bp	bazni par
CSR Vremščica	Center za sonaravno rekultiviranje Vremščica
DGGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajočem gradientu (angl. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
dNTP	deoksinukleotid trifosfat (mešanica deoksiribonukleotidov)
dsDNA	dvoverižna DNA (angl. double-stranded DNA)
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina (angl. Ethylenediaminetetraacetic acid)
<i>Ent.</i>	<i>Enterococcus</i>
EU	Evropska Unija
g	gram
IM	Mikrobna zbirka Katedre za mlekarstvo, Biotehniška fakulteta, Ljubljana
KAA	gojišče za enterokoke (angl. Kanamycin Aesculin Azid)
ke	kolonijska enota
<i>Lac.</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Leuc.</i>	<i>Leuconostoc</i>
LMG	Belgijska zbirka bakterijskih kultur (nizoz. Laboratorium voor Microbiologie) – Universiteit Gent, Belgium
M	molarnost (mol/l)
M17	gojišče za mlečnokislinske koke
M _e	mediana
MK koki	mlečnokislinski koki
MKB	mlečnokislinske bakterije
n	število vzorcev
NCBI	angl. National Center for Biotechnology Information
NCDO	Nacionalna zbirka mlekarskih organizmov (angl. National Collection of Dairy Organisms)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)

PDO	zaščiten oznaka porekla (angl. Protected Designation of Origin)
PFGE	gelska elektroforeza v pulzirajočem električnem polju (angl. Pulsed-Field Gel Electrophoresis)
PGI	zaščiten geografska oznaka (angl. Protected Geographical Indication)
RAPD	naključno pomnožena polimorfna DNA (angl. Randomly Amplified Polymorphic DNA)
rDNA	ribosomalna DNA (angl. ribosomal DNA)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. ribonucleic acid)
rRNA	ribosomalna RNA (angl. ribosomal RNA)
RT	encim reverzna transkriptaza
RT-PCR	PCR z reverno transkriptazo (angl. Reverse Transcriptase PCR)
SDS	natrijev dodecil sulfat (angl. Sodium Dodecyl Sulphate)
SDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom (angl. Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
spp.	vrsta (angl. species)
SSCP	enoverižni konformacijski polimorfizem (angl. Single-Strand Conformation Polymorphism)
ssDNA	enoverižna DNA (angl. single-stranded DNA)
<i>Str.</i>	<i>Streptococcus</i>
subsp.	podvrsta (angl. subspecies)
TAE	mešanica TRIS baze, ledocetne kisline in EDTA
TEMED	N,N,N',N'- tetrametiletildiamin
TGGE	gelska elektroforeza s temperaturnim gradientom (angl. Temperature Gradient Gel Electrophoresis)
T _m	temperatura tališča (angl. melting temperature)
T-RFLP	terminalni polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (angl. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)
TRIS baza	2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol
TSG	zajamčena tradicionalna posebnost (angl. Traditional Specialty Guaranteed)
UPGMA	neutežna metoda parnih skupin z aritmetično sredino (angl. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean)
<i>W.</i>	<i>Weissella</i>
z.o.	začetni oligonukleotid
ZGO	zaščiten geografska oznaka
ZOP	zaščiten oznaka porekla
ZTP	zajamčena tradicionalna posebnost

SLOVARČEK

Appellation d'Origine Contrôlée	zaščiteni označba porekla
DNA fingerprint	ali prstni odtis DNA je edinstveno zaporedje baznih parov DNA, ki ga določimo s sodobnimi molekularnimi metodami.
DOOR	podatkovna baza Evropske komisije, kjer najdemo živila, ki imajo bodisi predloženo, objavljeno ali registrirano eno od evropskih shem kakovosti. Med slednje sodijo zaščiteni označba porekla, zaščiteni geografska označba in zajamčena tradicionalna posebnost.
FAOSTAT	statistična podatkovna baza Organizacije za prehrano in kmetijstvo pri Združenih narodih (FAO).
ledocetna kislina	čista kislina, ki zamrzne pri temperaturi 17 °C. Pri tem nastanejo kristali podobni kot pri ledu.
sekvenciranje	metoda za ugotavljanje zaporedja nukleotidov v pomnožkih DNA.

1 UVOD

Ovčjereja in sirarstvo imata na Slovenskem bogato dediščino zlasti na Krasu, na Bovškem in v Beli krajini (Bogataj, 1999), zato iz teh krajev izvirajo Kraški ovčji sir, Bovški ovčji sir in Dolenjski ovčji sir, ki so predstavniki avtohtonih slovenskih ovčjih sirov. Ti tradicionalni ovčji siri so povečini izdelani iz surovega ovčjega mleka, katerega kemijska in mikrobiološka sestava sta rezultat prepletenosti specifičnih klimatskih razmer in floristične raznovrstnosti. Na prepoznavnost in avtentičnost sirov, poleg tradicionalnega tehnološkega sirarskega postopka, vpliva tudi avtohtona mikroflora, ki se nahaja v surovem mleku in na sirarski opremi. Le-ta izdelku določi značilne karakteristične lastnosti, kot so vonj, okus in tekstura, zaradi katerih tradicionalni siri izstopajo med množico ostalih sirov (Renčelj in Perko, 2008).

Avtohtoni slovenski ovčji siri predstavljajo v obširni evropski ponudbi ovčjih sirov skoraj neznan del, ki pa kljub svoji majhnosti priča o bogati slovenski tradiciji in dediščini sirarstva. Zato je še toliko bolj pomembno, da v današnjih časih, ko novejša tehnologije vse bolj vplivajo na razvoj sirarstva in na tradicionalne postopke izdelave, zaščitimo svojo kulturno dediščino in s tem nacionalno identiteto. Pri tem nam je v veliko pomoč politika ohranjanja tradicionalnih živil in označbe njihovega porekla, ki se je začela z nacionalno in evropsko uvedbo pravilnikov o zaščiti geografskih označb in označb porekla za kmetijske proizvode in živila (Uredba Sveta (ES) št. 510/2006 o zaščiti geografskih označb in označb porekla za kmetijske proizvode in živila, 2006) ter pravilnikov o zajamčenih tradicionalnih posebnostih kmetijskih proizvodov in živil (Uredba Sveta (ES) št. 509/2006 o zajamčenih tradicionalnih posebnostih kmetijskih proizvodov in živil, 2006). Tako sta do danes na nacionalni ravni že zaščitena Bovški ovčji sir (Pravilnik o označbi geografskega porekla Bovški sir, 2004) in Kraški ovčji sir (Pravilnik o Kraškem ovčjem siru z zaščiteno označbo porekla, 2008). Upamo le lahko, da nam bo v bližnji prihodnosti tudi na evropski ravni uspelo zaščititi vse tri avtohtone slovenske ovčje sire ter s pomočjo zaščitene označbe porekla ponesti njihovo prepoznavnost v Evropo in druge predele sveta.

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Bovški ovčji sir, Dolenjski ovčji sir in Kraški ovčji sir spadajo med avtohtone slovenske ovčje sire, ki so bili vključeni v evropski projekt, ki je potekal pod okriljem usklajevalnega in podpornega postopka SEE-ERA.NET PLUS, sofinanciranega v okviru programa Evropske skupnosti za mednarodno sodelovanje. Cilja projekta sta bila karakterizacija in označba porekla tradicionalnih ovčjih sirov s področja Zahodnega Balkana, in sicer na evropski ravni. S tem bi se tradicionalni slovenski ovčji siri, od katerih Bovški sir in Kraški ovčji sir že nosita slovensko zaščiteno označbo porekla, približali evropski zaščiti porekla in hkrati pridobili večjo prepoznavnost v svetu.

1.2 CILJI NALOGE

V diplomskem delu smo se osredotočili na proučevanje kemijskih in mikrobioloških značilnosti tradicionalnih slovenskih ovčjih sirov, in sicer Bovškega ovčjega sira, Kraškega ovčjega sira in Dolenjskega ovčjega sira, ki jih proizvajajo na treh različnih geografskih področjih. Iz vsake regije smo izbrali sire treh proizvajalcev, in tako skupaj analizirali devet sirov. Določali smo kemijske parametre, potrebne za opredelitev tipa in značilnosti sira, kamor sodi določanje vsebnosti maščobe, beljakovin, suhe snovi, vode v nemastni snovi, maščobe v suhi snovi in soli, ter ugotavljali razvoj in pestrost dominantne bakterijske populacije, prisotne v ovčjih siri. Poleg osnovne mikrobiološke analize, ki vključuje klasično metodo gojenja na ploščah, smo ugotavljali pestrost mikrobne populacije s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v denaturirajočem gradientu (DGGE).

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- ❖ Ker vsi trije tradicionalni slovenski ovčji siri spadajo v trdi tip sira, pričakujemo, da bodo imeli podobno osnovno kemijsko sestavo, verjetno pa se bodo razlikovali v vsebnosti soli.
- ❖ Analizirani tradicionalni slovenski ovčji siri izvirajo iz različnih geografskih regij, z različno klimo in vegetacijo, zato predvidevamo, da bodo imeli različno in za posamezno področje značilno prevladujočo mikrobno populacijo.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZAŠČITA KAKOVOSTI POSEBNIH KMETIJSKIH PRIDELKOV OZIROMA ŽIVIL

Ideja o zaščiti in ohranitvi tradicionalne pestrosti jedi se je porodila na Pariški konvenciji leta 1883, kjer je bil uveden termin »Appellation d'Origine Contrôlée«, s katerim se je, z namenom zagotavljanja avtentičnosti izdelka, priznala določena dediščina živilom iz posameznih regij (Gobbetti, 2007). Koncept o zaščiti kakovosti živil je po Evropi dobil veliko privržencev, zato je Evropska unija (EU) leta 1993 sprejela zakonodajo, ki zagotavlja zaščito kmetijskih pridelkov oziroma živil, pridelanih ali predelanih znotraj določenih geografskih območij ali narejenih po tradicionalnem receptu ali tradicionalne sestave. Z letom 2006 je bila v EU uvedena nova, izpopolnjena zakonodaja na področju zaščite kmetijskih pridelkov oz. živil, ki jo mora kot članica EU upoštevati tudi Slovenija. Izdani sta bili Uredba Sveta (ES) št. 510/2006 o zaščiti geografskih označb in označb porekla za kmetijske proizvode in živila ter Uredba Sveta (ES) št. 509/2006 o zajamčenih tradicionalnih posebnostih kmetijskih proizvodov in živil. Z omenjenima uredbama je proizvodom, ki pridobijo označbo porekla, geografsko označbo ali označbo zajamčena tradicionalna posebnost, zagotovljena avtentičnost, ime pa je zaščiteno pred zlorabami. Poleg tega imajo proizvodi z označbo porekla ali geografsko označbo tudi jamstvo, da proizvod oz. vsaj ena od faz proizvodnje resnično izvira iz navedenega območja (MKGP, 2012a).

Namen zaščite posebnih kmetijskih pridelkov oz. živil je dati pridelovalcem in predelovalcem možnost konkurenčnosti glede kakovosti, ki jim omogoča ekonomsko prisotnost na trgu, ter zadovoljiti želje kupcev, da dobijo proizvode, ki so izvirni in kakovostnejši. Politika zaščite posebnih kmetijskih pridelkov oziroma živil ščiti tudi območja proizvodnje, izboljšuje življenjski standard na teh območjih, oblikuje pridelovalne in predelovalne poti ter vrednoti človeško znanje in delo (MKGP, 2003).

Kmetijski pridelki oz. živila, ki pridobijo uradni zaščitni znak za kakovost, se od sorodnih proizvodov razlikujejo po določenih značilnostih glede proizvodnje ali sestave, upoštevati se morajo predpisana pravila proizvodnje, hkrati pa so zaščiteni proizvodi podvrženi strogi kontroli neodvisnega certifikacijskega organa, ki ga na osnovi Zakona o kmetijstvu z javnim razpisom določi Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (MKGP, 2003).

2.1.1 Nacionalne in evropske sheme kakovosti

Shema kakovosti pomeni opredelitev posebnih meril in zahtev glede značilnosti, postopkov pridelave ali predelave kmetijskih pridelkov ali živil, ki presega predpisano kakovost, ali pogoje glede varstva zdravja ljudi, živali ali rastlin, dobrega počutja živali ali

zaščite okolja, in je pomembna za pospeševanje proizvodnje višje ali posebne kakovosti, ki je tržno zanimiva in prepoznavna za potrošnika (Zakon o kmetijstvu, 2008).

V Sloveniji poznamo dve vrsti zaščit kakovosti kmetijskih pridelkov in živil, in sicer nacionalno in evropsko zaščito. Med nacionalne sheme kakovosti sodijo »dobrote z naših kmetij«, »ekološki«, »integrirani«, »višja kakovost«, »zajamčena tradicionalna posebnost«, »označba porekla« in »geografska označba« (Zakon o kmetijstvu, 2008), ureja pa jih nacionalna zakonodaja zapisana v obliki (MKGP, 2012b):

- Zakona o kmetijstvu (2008);
- Pravilnika o postopkih zaščite kmetijskih pridelkov oziroma živil (2008);
- Pravilnika o zaščitnem znaku za označevanje kmetijskih pridelkov oziroma živil (2011);
- Pravilnika o priznanju skupin proizvajalcev posebnih kmetijskih pridelkov oziroma živil (2009).

Evropske sheme kakovosti, ki omogočajo zaščito kmetijskih pridelkov in živil na trgu Evropske unije, pa so (Grašek in sod., 2010):

- ◆ zaščiteni označba porekla (ZOP) oziroma Protected Designation of Origin (PDO),
- ◆ zaščiteni geografska označba (ZGO) oziroma Protected Geographical Indication (PGI),
- ◆ zajamčena tradicionalna posebnost (ZTP) oziroma Traditional Specialty Guaranteed (TSG).

Pogoje in zahteve za navedene sheme kakovosti opredeljuje evropska zakonodaja, in sicer z (MKGP, 2012b):

- Uredbo Sveta (ES) št. 510/2006 o zaščiti geografskih označb in označb porekla za kmetijske proizvode in živila (2006);
- Uredbo Sveta (ES) št. 509/2006 o zajamčenih tradicionalnih posebnostih kmetijskih proizvodov in živil (2006);
- Uredbo Komisije (ES) št. 1898/2006 o podrobnih pravilih za izvajanje Uredbe Sveta (ES) št. 510/2006 o zaščiti geografskih označb in označb porekla za kmetijske proizvode in živila (2006);
- Uredbo Komisije (ES) št. 1216/2007 o določitvi podrobnih pravil za izvajanje Uredbe Sveta (ES) št. 509/2006 o zajamčenih tradicionalnih posebnostih kmetijskih proizvodov in živil (2007).

Slovenski proizvajalci, ki želijo za svoje proizvode pridobiti znak označbe porekla, geografske označbe ali znak zajamčene tradicionalne posebnosti, morajo najprej pridobiti zaščito posebne kakovosti na nacionalnem nivoju, šele nato pa se vloge pošljejo v presojo Evropski komisiji. Če slednja poslano vlogo zavrne, izgubi proizvod zaščito tudi v Sloveniji (MKGP, 2012a).

2.1.1.1 Zaščitena označba porekla (ZOP)

»Označba porekla« je shema kakovosti, ki ponazarja najvišjo raven zaščite proizvoda (Peterman in Pajk Žontar, 2008) in po Uredbi Sveta (ES) št. 510/2006 o zaščiti geografskih označb in označb porekla (2006) pomeni ime regije, določenega kraja ali izjemoma države, ki se uporablja za opis kmetijskega proizvoda ali živila:

- ▲ s poreklom iz te regije, določenega kraja ali države,
- ▲ katerega kakovost ali značilnosti so predvsem ali izključno posledica geografskega okolja z njemu lastnimi naravnimi in človeškimi viri, ter
- ▲ katerega proizvodnja, predelava in priprava je bila opravljena na opredeljenem geografskem območju.

Živilom, ki ustrezajo naštetim pogojem in pridobijo znak »zaščitena označba porekla«, se zaščiti njihovo ime, ki se ne sme uporabljati za noben drug izdelek. Prav tako tudi ni dovoljena pridelava oziroma predelava kmetijskih izdelkov z zaščitnim imenom izven določenega geografskega območja (Peterman in Pajk Žontar, 2008).



Slika 1: Nacionalni znak za zaščiteno označbo porekla
(MKGP, 2012c)



Slika 2: Znak Skupnosti za zaščiteni označbo porekla
(MKGP, 2012c)

2.1.1.2 Zaščiteni geografska označba (ZGO)

Uredba Sveta (ES) št. 510/2006 o zaščiti geografskih označb in označb porekla (2006) opredeljuje »geografsko označbo« kot ime regije, določenega kraja ali izjemoma države, ki se uporablja za opis kmetijskega proizvoda ali živila:

- ▲ s poreklom iz te regije, določenega kraja ali države,
- ▲ ki ima posebno kakovost, sloves ali druge značilnosti, ki jih je mogoče pripisati temu geografskemu poreklu, ter
- ▲ katerega proizvodnja in/ali predelava in/ali priprava je bila opravljena na opredeljenem geografskem območju.

Povezava med kmetijskim proizvodom in geografskim območjem je pri »geografski označbi« manj tesna kot pri »označbi porekla«. Za razliko od »označbe porekla« se lahko »geografska označba« uporablja, če najmanj ena od faz proizvodnje poteka na določenem območju, pri čemer lahko npr. surovine izvirajo iz drugega območja. Poleg tega pa pri »geografski označbi« tudi ni potrebno, da bi pomembne lastnosti proizvoda nastale izključno ali v osnovi zaradi geografskega porekla, kot to velja pri »označbi porekla« (MKGP, 2003).



Slika 3: Nacionalni znak za zaščiteni geografsko označbo
(MKGP, 2012c)



Slika 4: Znak Skupnosti za zaščiteno geografsko označbo
(MKGP, 2012c)

2.1.1.3 Zajamčena tradicionalna posebnost (ZTP)

Shema kakovosti »zajamčena tradicionalna posebnost« je odgovor na zahteve potrošnikov po tradicionalnih proizvodih s posebnimi lastnostmi. V to shemo po Uredbi Sveta (ES) št. 509/2006 o zajamčenih tradicionalnih posebnostih (2006) sodi tisti kmetijski proizvod ali živilo, ki:

- ▲ je proizveden iz tradicionalnih surovin,
- ▲ oziroma ima zanj značilno tradicionalno sestavo,
- ▲ oziroma ima zanj značilen način proizvodnje in/ali predelave, ki odraža tradicionalen način proizvodnje in/ali predelave.

Z označbo »zajamčena tradicionalna posebnost« se zaščiti predvsem receptura ali način pridelave oz. predelave, ki geografsko ni omejen, saj lahko te kmetijske pridelke oz. živila proizvajajo vsi, ki se dosledno držijo predpisane recepture, postopka in oblike živila ter imajo certifikat ustrezne akreditirane agencije (Grašek in sod., 2010).



Slika 5: Nacionalni znak za zajamčeno tradicionalno posebnost
(MKGP, 2012c)



Slika 6: Znak Skupnosti za zajamčeno tradicionalno posebnost
(MKGP, 2012c)

2.2 TRADICIONALNI OVČJI SIRI

Čeprav predstavlja ovčje mleko le 2 % celotne proizvodnje mleka na svetu, igra pomembno vlogo v mediteranskih deželah, kjer večino ovčjega mleka uporabijo za izdelavo sirov. Le-ti se, glede na tip sira in uporabljeni postopek izdelave, delijo v več kategorij (Juarez in Ramos, 2003; Litopoulou-Tzanetaki in Tzanetakis, 2011):

- ▲ sveži siri (Murazzano),
- ▲ beli siri v slanici (Feta),
- ▲ siri z modro plesnijo (Roquefort),
- ▲ mehki siri (Galotyri),
- ▲ poltrdi siri (Evora),
- ▲ trdi siri (Pecorino Romano) in
- ▲ albuminski siri (Manouri).

2.2.1 Francoski tradicionalni ovčji siri

V Franciji je do danes registriranih 43 sirov z zaščitenim geografskim poreklom, od tega so le tri vrste sira, Roquefort, Ossau-Iraty in Broccio, narejene iz ovčjega mleka (European Commission, 2012).

2.2.1.1 Roquefort

Roquefort je najpomembnejši poltrdi ovčji sir z modro plesnijo, ki nosi označbo porekla PDO že od leta 1925. Proizvajajo ga na jugu Francije, in sicer iz surovega ovčjega mleka, ki ga ponavadi cepijo z mezofilno mlečnokislinsko startersko kulturo in mu dodajo spore plesni *Penicillium roqueforti* (Medina in Nuñez, 2004). Po stiskanju in soljenju prenesejo sir v naravne, vlažne in zračne votline v gori Combalou na področju Roquefort-sur-Soulzon, ki so tudi same po sebi bogate s sporami plesni *P. roqueforti*. Sir v votlini zori 6 do 8 tednov, dokler ni popolnoma prežet s plesnijo (Prandini in sod., 2011).

2.2.1.2 Ossau-Iraty

Ossau-Iraty je trdi ovčji sir zaščiten z oznako PDO, ki ga iz surovega ali pasteriziranega ovčjega mleka proizvajajo v jugozahodnem delu Francije (Medina in Nuñez, 2004). Sirnine med izdelavo ne segrevajo, sir le rahlo stiskajo in solijo. Po soljenju morajo 4 do 5 kg hlebi sira zoreti vsaj 90 dni (Izco in sod., 2000).

Pestrost mikroflore v ovčjem siru Ossau-Iraty je po Feutry-ju in sodelavcih (2012) odvisna od mikroflore, ki je prisotna v surovem ovčjem mleku. Namreč, z izjemo mlečnokislinske bakterije *Streptococcus thermophilus* in nekaterih enterokokov, je bil vsaj en sev od vsake vrste mlečnokislinskih bakterij, prisotnih v surovem mleku, izoliran tudi iz ustreznega ovčjega sira. Med mlečnokislinskimi bakterijami so prevladovali rodovi *Lactococcus*, *Lactobacillus* in *Leuconostoc*. Število bakterij slednjih dveh rodov se je povečevalo tako med izdelavo kot tudi med procesom zorenja sira.

2.2.1.3 Broccio

Leta 1988 je status PDO prejel sveži ovčji sir Broccio, ki ga iz sirotke izdelujejo na Korziki. Sveži sirotki dodajo ovčje mleko in jo segrejejo na 80-90 °C, nato pa oborjene proteine prelijejo v oblikovala in jih stiskajo. Broccio se navadno, 48 ur po izdelavi, uživa kot sveži sir nežnega okusa, lahko pa se ga tudi soli in zatem 15 dni zori, s čimer se mu izostri okus (Medina in Nuñez, 2004).

2.2.2 Grški tradicionalni ovčji siri

Grčija ima dolgo in bogato tradicijo v proizvodnji sira. Od vsega mleka, kar ga proizvedejo, je 39 % kravjega mleka, 36 % ovčjega mleka in 25 % kozjega mleka (Medina in Nuñez, 2004). Vendar grška proizvodnja sira, kljub večjim količinam proizvedenega

kravjega mleka, temelji na ovčjem in kozjem mleku, o čemer priča tudi podatek, da je od 21 sirov, registriranih s poreklom PDO, kar 19 sirov narejenih iz ovčjega mleka oz. iz mešanice ovčjega in kozjega mleka (European Commission, 2012).

2.2.2.1 Feta

Feta je najbolj znani tradicionalni grški beli sir s poreklom PDO, ki vsaj 2 meseca zori v slanici. Feto lahko izdelujejo iz ovčjega mleka ali pa iz ovčjega mleka, ki mu dodajo največ 30 % kozjega mleka. Včasih se je v družinskih mlekarnah izdelovala iz surovega mleka, dandanes pa se komercialno proizvaja iz pasteriziranega mleka z dodatkom mezofilnih in termofilnih starterskih kultur (Medina in Nuñez, 2004). Glavne karakteristike sira Feta so snežno bela barva, prijeten, rahlo kisel okus in bogata aroma. Tekstura mora biti čvrsta, gladka in kremasta, brez očes, lahko pa je prisotnih nekaj razpok nepravilnih oblik (Litopoulou-Tzanetaki in Tzanetakis, 2011).

Najbolj številčni predstavniki mikrobne populacije v siru Feta, ki so jih izolirali Rantsiou in sodelavci (2008), so *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. coryniformis* in *Lb. fermentum*. Ti mezofilni laktobacili so, poleg zmernega števila prisotnih enterokokov, del nestarterske kulture mlečnokislinskih bakterij, katere vir je ovčje mleko. Poleg omenjenih bakterij pa se v siru Feta v manjšem številu nahajajo še *Str. thermophilus* in *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, ki ju dodajajo mleku kot startersko kulturo, ter vrste iz rodu *Lactococcus* (Rantsiou in sod., 2008).

2.2.2.2 Graviera

Med najbolj popularne tradicionalne grške trde sire prav gotovo sodi Graviera, ki je znana po svoji prijetni aromi in nežnem okusu (Litopoulou-Tzanetaki in Tzanetakis, 2011). V Grčiji obstaja več različic tega sira, vendar le tri od njih nosijo oznako PDO, in sicer Graviera Agrafon, ki jo proizvajajo v goratem področju Agrafe, Graviera Kritis iz otoka Krete in Graviera Naxou, proizvedena na otoku Naxos (Samelis in sod., 2011). Za naštete sire s statusom PDO velja, da jih proizvajajo bodisi iz ovčjega mleka bodisi iz mešanice ovčjega in kozjega mleka, ki ga koagulirajo pri 34-36 °C (za Graviero Naxou pri 36-37 °C), zatem oblikujejo sirno zrno ter ga dogrevajo na 48-52 °C (za Graviero Naxou na 50 °C), solijo v slanici ter zorijo vsaj 3 mesece oz. Graviero Naxou 70-80 dni (Graviera Kritis PDO, 1994; Graviera Agrafon cheese PDO, 1994; Graviera Naxou cheese PDO, 1994).

V siru Graviera prevladujejo nestarterski mezofilni laktobacili, kot so *Lb. casei*, *Lb. paracasei* in *Lb. plantarum*. V manjšem številu pa so prisotni še: *Str. thermophilus*, *Lac. lactis* subsp. *lactis*, bakterije rodu *Leuconostoc* in enterokoki, med katerimi je najštevilčnejši *Ent. faecium* (Samelis in sod., 2010, 2011).

2.2.2.3 Kefalotyri, Ladotyri in Kefalograviera

Kefalotyri, Ladotyri in Kefalograviera so tradicionalni trdi grški siri z zaščiteno označbo porekla, ki jih proizvajajo iz ovčjega mleka oz. iz mešanice ovčjega in kozjega mleka. Za sir Kefalotyri je značilna zelo trda tekstura, slan okus in močna aroma. Glavni karakteristiki sira Kefalograviera, ki vsebuje tehnološke elemente sirov Graviera in Kefalotyri, sta čvrsto testo, z veliko očes, in rahlo pikantna aroma. Ladotyri Mytilinis iz otoka Lesbos pa se proizvaja na podoben način kot sir Kefalotyri, vendar s to razliko, da ga po 3 mesecih zorenja konzervirajo v olivnem olju (Litopoulou-Tzanetaki in Tzanetakis, 2011).

Mikrofloro trdih ovčjih sirov Kefalotyri, Ladotyri in Kefalograviera predstavljajo vrste rodov *Enterococcus*, *Lactobacillus* in *Lactococcus*, s prevladujočimi vrstami *Ent. faecium*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei* in *Lac. lactis* subsp. *lactis*. V nizkih koncentracijah so prisotne še *Str. thermophilus* in vrste rodu *Leuconostoc* (Litopoulou-Tzanetaki in Tzanetakis, 2011; Medina in Nuñez, 2004).

2.2.2.4 Kasseri in Formaella

Kasseri in Formaella spadata med tradicionalne grške poltrde sire s statusom PDO. Izdelujejo ju iz ovčjega mleka oz. iz mešanice ovčjega in kozjega mleka, ki ga koagulirajo pri 32 °C, zatem razrežejo koagulum in dogrevajo sirno zrno na 38-40 °C. Po oblikovanju sira sledi še stiskanje, soljenje in sušenje. Sir Formaella lahko uživamo bodisi kot sveži sir, lahko pa se ga, tako kot sir Kasseri, zori vsaj 3 mesece pod ustreznimi pogoji (Medina in Nuñez, 2004).

Mikrobno populacijo poltrdih sirov Kasseri in Formaella sestavljajo enterokoki ter mezofilni in termofilni laktobacili (Medina in Nuñez, 2004; Asteri in sod., 2009).

2.2.2.5 Galotyri, Kopanisti in Pichtogalo Chanion

Sire Galotyri, Kopanisti in Pichtogalo Chanion uvrščamo med tradicionalne grške mehke sire, ki nosijo zaščiteno označbo porekla. Osnovna surovina teh sirov je ovčje mleko oz. ovčje mleko z dodatkom kozjega mleka oz. pri siru Kopanisti tudi kravje mleko. Njihova skupna značilnost je kremasta in mazava tekstura (Medina in Nuñez, 2004).

Mikrofloro mehkih sirov Galotyri, Kopanisti in Pichtogalo Chanion v večini zastopajo mezofilni laktobacili in mlečnokislinski koki ter posamezni enterokoki (Litopoulou-Tzanetaki in Tzanetakis, 2011). Pri siru Kopanisti pa med vrstami mlečnokislinskih bakterij dominirajo: *Lb. plantarum*, *Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* in *Lb. curvatus* (Tzanetakis in sod., 1987).

2.2.2.6 Manouri in Xynomyzithra

Manouri in Xynomyzithra sta tradicionalna grška mehka sira s statusom PDO, ki ju izdelujejo iz sirotke, ki ostane po izdelavi sira iz polnomastnega ovčjega mleka oz. mešanice ovčjega in kozjega mleka. V postopku izdelave segrevajo sirotko na 90 °C. Pri približno 70 °C ji dodajo manjšo količino ovčjega oz. kozjega mleka ali smetane in počakajo, da temperatura doseže 88 do 90 °C, ko pride do koagulacije sirotkinih proteinov. Po 30 minutah sirnino odlijejo bodisi v platneno vrečo (za sir Manouri) bodisi v oblikovala (za sir Xynomyzithra) in počakajo približno 5 ur, da odvečna sekundarna sirotka odteče (Medina in Nuñez, 2004).

V siru Manouri prevladujeta rod *Hafnia* iz družine *Enterobacteriaceae* in rod *Staphylococcus* (Litopoulou-Tzanetaki in Tzanetakis, 2011).

2.2.3 Italijanski tradicionalni ovčji siri

Glede na podatke podatkovne baze DOOR (European Commission, 2012) ima Italija 41 sirov registriranih s statusom PDO, od tega jih je kar 16 narejenih iz ovčjega mleka. Ti zaščiteni ovčji siri so v marsikateri italijanski regiji del kulturne dediščine. Zaradi svojega tradicionalnega postopka izdelave, ki ponekod še vedno poteka pod okriljem manjših, družinskih mlekarn, so tesno povezani z območjem, v katerem poteka proizvodnja, kar se odraža v njihovih mikrobioloških, kemijskih in senzoričnih značilnostih (Pirisi in sod., 2011).

2.2.3.1 Pecorino Romano, Pecorino Sardo in Pecorino Siciliano

Pecorino Romano, Pecorino Sardo in Pecorino Siciliano so tradicionalni italijanski siri s statusom PDO, proizvedeni iz polnomastnega ovčjega mleka. Najbolj znan med njimi je pol kuhan trdi sir Pecorino Romano, ki ga iz surovega ali termiziranega mleka izdelujejo v okolici Rima in na Sardiniji. Mleko cepijo s fermentirano sekundarno sirotko (scotta-innesto), stranskim produktom pri proizvodnji sira rikota (Medina in Nuñez, 2004; Pirisi in sod., 2011). Poleg sira Pecorino Romano na Sardiniji proizvajajo tudi pol kuhan sir Pecorino Sardo, ki je lahko dveh vrst, in sicer »dolce« (mehki sir) s kratkotrajnim zorenjem (20-60 dni) in »maturo« (poltrdi sir), ki zori vsaj 2 meseca (Madrau in sod., 2006; Pirisi in sod., 2011). Daljši čas zorenja (4-6 mesecev ali dlje) ima tudi trdi sir Pecorino Siciliano, ki ga po starodavni proizvodni praksi, iz surovega ovčjega mleka in brez dodatka komercialnih starterskih kultur, proizvajajo na Siciliji (Randazzo in sod., 2006, 2008).

Mikrofloro tradicionalnega sira Pecorino Romano zastopa mikrobna populacija iz sekundarne sirotke (scota-innesto), ki jo sestavljajo *Str. thermophilus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, ter mikrobna populacija, prisotna v

ovčjem mleku, ki jo predstavljajo enterokoki (*Ent. durans* in *Ent. faecium*) in mezofilni laktobacili, kot so *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. curvatus* in *Lb. fermentum* (Di Cagno in sod., 2003; Medina in Nuñez, 2004). Dominantno mikrobnou populacijo sira Pecorino Sardo sestavljajo termofilne mlečnokislinske bakterije, kot so *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus* in *Str. thermophilus*, mezofilni laktobacili (*Lb. casei*, *Lb. paracasei* in *Lb. rhamnosus*) in enterokoki (Mannu in sod., 2002). V trdem siru Pecorino Siciliano pa so Randazzo in sodelavci (2006, 2008) izolirali bakterije vrst: *Str. thermophilus*, *Str. bovis*, *Leuc. mesenteroides*, *Ent. faecalis*, *Ent. durans*, *Ent. hirae*, *Lac. lactis*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei* in *Lb. rhamnosus*.

2.2.3.2 Fiore Sardo in Canestrato Pugliese

Tradicionalna italijanska sira Fiore Sardo in Canestrato Pugliese, ki sta zaščiteni z označbo porekla, sodita v trdi tip sira in sta izdelana iz polnomastnega ovčjega mleka (Pirisi in sod., 2011). Za sir Fiore Sardo iz otoka Sardinije je značilno, da ga proizvajajo iz surovega ovčjega mleka, brez dodatka starterske kulture. Fermentacija in proces zorenja namreč potekata zgolj pod vplivom mikroflore, prisotne v surovem ovčjem mleku (Mannu in sod., 2000). Sir Canestrato Pugliese, ki ga izdelujejo v pokrajinah Foggia in Bari, pa je svoje ime dobil po ročno izdelanih košarah iz trstja, imenovanih »canestri«, ki so služile za oblikovala, v katerih je sir zorel (Medina in Nuñez, 2004; Aquilanti in sod., 2006).

Tako Fiore Sardo kot Canestrato Pugliese sta trda ovčja sira, zato imata podobno sestavo mikroflore. Mikrobnou populacijo obeh sirov sestavljajo *Lac. lactis* subsp. *lactis*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. pentosus*, *Lb. brevis*, *Ent. faecium* in *Ent. faecalis* (Mangia in sod., 2008; Aquilanti in sod., 2006). V siru Canestrato Pugliese pa se poleg omenjenih bakterij nahajajo še *Lac. lactis* subsp. *cremoris*, *Lac. garviae* in *Leuc. argentinum* (Aquilanti in sod., 2006).

2.2.3.3 Pecorino Toscano, Caciotta D`Urbino in Murazzano

Pecorino Toscano, Caciotta D`Urbino in Murazzano so trije tradicionalni italijanski ovčji siri z zaščitenou označbo porekla. Sir Pecorino Toscano, ki ga iz polnomastnega ovčjega mleka proizvajajo v Toskani, obstaja v dveh različicah, in sicer kot mehki sir (Pasta tenera tip), ki zori 20-60 dni, in kot poltrdi sir (Pasta semidura tip), ki zori vsaj 4 mesece (Pirisi in sod., 2011). Za mehki sir Caciotta D`Urbino je značilno, da ga izdelujejo iz 70-80 % ovčjega in 20-30 % kravjega, polnomastnega mleka. Po obliki je cilindričen in ima sladek okus. Sir Murazzano pa je sveži sir z mehko teksturo, ki ga proizvajajo bodisi iz ovčjega mleka bodisi iz mešanice ovčjega (60 %) in kravjega (40 %) mleka (Medina in Nuñez, 2004).

Dominantno mikrobnou populacijo sirov Pecorino Toscano in Caciotta D`Urbino predstavljata rodova mezofilnih mlečnokislinskih bakterij *Lactobacillus* spp. in

Lactococcus spp., poleg njiju pa so v manjšem številu prisotne še bakterije rodov *Enterococcus* in *Streptococcus* (Di Cagno in sod., 2011; Buccioni in sod., 2010).

2.2.3.4 Ricotta Romana

Ricotta Romana je sveži sir, zaščiten z označbo porekla, ki ga izdelujejo iz sirotke polnomastnega ovčjega mleka na ozemlju dežele Lacij. V postopku izdelave sira segrevajo sirotko na 80-85 °C in ji med procesom segrevanja dodajo do 15 % polnomastnega ovčjega mleka. Ko poteče toplotna koagulacija sirotkinih proteinov, se začnejo na površini sirotke pojavljati kosmiči, ki jih previdno zberejo v plitva stožčasta oblikovala in sušijo 8 do 24 ur (Objava vloge za spremembo na podlagi člena 6(2) Uredbe sveta (ES) št. 510/2006 o zaščiti geografskih označb in označb porekla za kmetijske proizvode in živila »Ricotta Romana«, 2010; Pirisi in sod., 2011).

2.2.4 Španski tradicionalni ovčji siri

V Španiji je leta 2010, po podatkih portala FAOSTAT (2012), populacija ovc štela 18 551 500 glav, od katerih je bilo 3 200 000 glav mlečnih ovc, ki so proizvedle 585 190 ton mleka. Večino ovčjega mleka so porabili za proizvodnjo ovčjega sira, ki je dotičnega leta znašala 49 700 ton (FAOSTAT, 2012).

Med ovčjimi siri, ki jih proizvajajo v Španiji, je 6 sirov, ki so zaščiteni z oznako PDO, in to so: Manchego, Roncal, Idiazábal, Zamorano, La Serena in Torta del Casar (Medina in Nuñez, 2004).

2.2.4.1 Manchego, Idiazábal, Roncal in Zamorano

Manchego, Idiazábal, Roncal in Zamorano so tradicionalni španski poltrdi do trdi siri cilindrične oblike, narejeni iz ovčjega mleka, koaguliranega s sirilom živalskega izvora, ki zorijo vsaj 6 mesecev. Idiazábal in Roncal, ki ju izdelujejo na severu Španije, sta izdelana iz surovega ovčjega mleka, sira Manchego (centralna Španija) in Zamorano (zahodna Španija) pa izdelujejo tako iz surovega kot tudi iz pasteriziranega mleka (Barron in sod., 2005).

Mikrobno populacijo tradicionalno proizvodnega sira Manchego predstavljajo: *Lac. lactis* subsp. *lactis*, *Lac. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. plantarum*, *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* in *Ent. faecalis* (Ballesteros in sod., 2006).

Pérez Elortondo in sodelavci (1998) so v španskem siru Idiazábal izolirali sledeče bakterijske vrste: *Lac. lactis* subsp. *lactis*, *Lac. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Lac. raffinolactis*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb. casei* subsp. *rhamnosus*, *Lb. curvatus* in *Leuc. lactis*. Med enterokoki pa so Arizcun in sodelavci (1997) identificirali vrste *Ent. faecalis*, *Ent. faecium*, *Ent. durans* in *Ent. avium*.

Mikrofloro španskega tradicionalnega sira Roncal sestavljajo bakterijske vrste: *Str. lactis*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Leuc. dextranicum*, *Leuc. lactis*, *Ent. faecalis*, *Ent. faecium* in *Ent. avium* (Ordoñez in sod., 1980; Arizcun in sod., 1997). Prav tako pa so bile v siru prisotne tudi tri vrste mikrokokov, ki so jih Ordoñez in sodelavci (1980) identificirali kot: *Micrococcus saprophyticus*, *M. lactis* in *M. roseus*.

2.2.4.2 La Serena in Torta del Casar

V pokrajini Extremadura na zahodu Španije proizvajajo tradicionalna poltrda sira La Serena in Torta del Casar, ki sta zaščitena z označbo porekla. Izdelujejo ju iz surovega polnomastnega ovčjega mleka, koaguliranega s sirilom rastlinskega izvora, ki ga pridobivajo z maceracijo suhih cvetov osata (*Cynara cardunculus*) v vodi. V mleko ne dodajajo starterskih kultur, saj fermentacijo sirov povzročijo avtohtone bakterije, prisotne v surovem mleku (Arqués in sod., 2006; Delgado in sod., 2010). Zorenje poteka pri 80 do 90 % relativni vlažnosti, in sicer vsaj 60 dni (Martínez in sod., 2011).

V tradicionalnem siru La Serena imajo med mikrobno populacijo dominantno vlogo bakterijske vrste *Lac. lactis*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Leuc. mesenteroides* in *Ent. faecium* (Del Pozo in sod., 1988). Prevladujoče mlečnokislinske bakterijske vrste v siru Torta del Casar pa so: *Lac. lactis* subsp. *lactis*, *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum*, *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* in *Ent. faecalis* (Pouillet in sod., 1993).

2.2.5 Portugalski tradicionalni ovčji siri

Portugalska ima močno tradicijo proizvodnje ovčjih sirov, ki jih po večini še dandanes izdelujejo po tradicionalnih metodah, in sicer iz surovega ovčjega mleka, brez dodatka starterske kulture. Najbolj znani med njimi so Serra da Estrela, Serpa, Azeitao in Castelo Branco, ki imajo poleg sirov Evora, Nisa in Terrincho zaščiteno označbo porekla (Medina in Nuñez, 2004).

2.2.5.1 Evora in Nisa

Evora in Nisa sta tradicionalna portugalska poltrda do trda sira s statusom PDO, ki ju v provinci Alentejo, na jugu Portugalske, izdelujejo iz surovega ovčjega mleka. Za koagulacijo mleka uporabljajo rastlinsko sirilo v obliki vodnega ekstrakta suhih cvetov osata (*Cynara cardunculus*). Zorenje, ki poteka pod vplivom avtohtone mikroflore surovega mleka, traja pri siru Evora od 30 (za poltrdi tip) do 90 dni (za trdi tip), pri siru Nisa pa vsaj 45 dni (Medina in Nuñez, 2004).

Med prevladujočo mlečnokislinsko populacijo ovčjega sira Evora sta Reis (1994, cit. po Freitas in Malcata, 2000) in Cardoso (1995, cit. po Freitas in Malcata, 2000) identificirala bakterijske vrste: *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lac. lactis* subsp. *lactis*, *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* in *Pediococcus* spp.

2.2.5.2 Azeitao in Castelo Branco

Tradicionalna poltrda sira Azeitao in Castelo Branco izdelujejo iz surovega ovčjega mleka, brez dodatka starterske kulture. Mleko koagulirajo s tekočim ekstraktom suhih cvetov osata (*Cynara cardunculus*), ki jih macerirajo v vodi. Sir Azeitao, ki ga proizvajajo v okolici Lizbone, zori v dveh fazah, in sicer najprej 10 dni pri sobni temperaturi in 90 do 95 % relativni vlažnosti, nato pa še 2 do 3 tedne pri temperaturi 10 do 15 °C in 85 do 90 % relativni vlažnosti. Sir Castelo Branco, ki je dobil ime po istoimenskem okrožju, ki leži v portugalski pokrajini Beira Baixa, pa mora zoreti vsaj 40 dni pri temperaturi 8 do 14 °C in 80 do 90 % relativni vlažnosti (Medina in Nuñez, 2004).

Najbolj pogoste vrste mlečnokislinskih bakterij, ki so jih Mimoso in sod. (1990, 1992, cit. po Freitas in Malcata, 2000) identificirali v ovčjem siru Azeitao, so: *Lac. lactis*, *Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus*, *Leuc. dextranicum*, *Leuc. mesenteroides* in *Leuc. lactis*.

2.2.5.3 Terrincho

Terrincho je tradicionalni poltrdi sir s statusom PDO, ki ga na severovzhodu Portugalske proizvajajo iz surovega ovčjega mleka, koaguliranega s sirilom živalskega izvora, in brez dodatka starterske kulture. Zorenje, pri katerem ima glavno vlogo avtohtona mikroflora iz surovega mleka, poteka vsaj 30 dni pri temperaturi 5 do 12 °C in 80 do 85 % relativni vlažnosti (Medina in Nuñez, 2004; Pintado in sod., 2008).

Med mikrobno populacijo sira Terrincho prevladujejo mlečnokislinske bakterije rodov *Lactococcus*, *Lactobacillus* in *Enterococcus* (Pintado in sod., 2008).

2.2.5.4 Serpa in Serra da Estrela

Serpa in Serra da Estrela sta tradicionalna portugalska mehka sira. Izdelujejo ju iz surovega ovčjega mleka, ki ga koagulirajo z rastlinskim sirilom (*Cynara cardunculus*). Mleku ne dodajajo starterske kulture, zato fermentacija sirov poteka pod vplivom avtohtonih bakterij, prisotnih v surovem mleku (Medina in Nuñez, 2004; Reis in Malcata, 2011). Zorenje najbolj znanega portugalskega sira Serra da Estrela, ki je dobil ime po najvišji gorski verigi na Portugalskem, poteka 30 do 45 dni (Medina in Nuñez, 2004; Tavarina in sod., 2006), sir Serpa, ki nosi ime po vasi Serpa, pa zori 30 do 40 dni, in sicer v dveh fazah. Najprej poteka zorenje pri temperaturi 6 do 10 °C in 95 do 100 % relativni vlažnosti, nato pa pri temperaturi 7 do 11 °C in 75 do 90 % relativni vlažnosti (Medina in Nuñez, 2004; Roseiro in sod., 2003).

V ovčjem siru Serpa prevladujejo mezofilne mlečnokislinske bakterije in enterokoki, med rodovi pa sta najbolj dominantna rod *Leuconostoc* in rod *Lactococcus* (Barbosa, 2000, cit. po Freitas in Malcata, 2000).

Lac. lactis, *Ent. faecium* in *Leuc. mesenteroides* so dominantne vrste mlečnokislinskih bakterij, ki se poleg vrst *Leuc. lactis*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* in *Lb. plantarum* nahajajo v mehkem siru Serra da Estrela (Macedo in sod., 1997, cit. po Freitas in Malcata, 2000).

2.2.6 Slovenski tradicionalni ovčji siri

Kraški ovčji sir, Dolenjski ovčji sir in Bovški ovčji sir so tradicionalni slovenski trdi in polnomastni ovčji siri, od katerih sta Kraški ovčji sir in Bovški ovčji sir zaščitena z nacionalno označbo porekla (Bradeško, 2011). Vlogo za registracijo zaščitene označbe porekla na evropski ravni za Bovški sir je Društvo rejcev drobnice Bovške posredovalo tudi Evropski komisiji, ki jo je decembra leta 2011 objavila v Uradnem listu Evropske unije (Objava vloge na podlagi člena 6(2) Uredbe Sveta (ES) št. 510/2006 o zaščiti geografskih označb in označb porekla za kmetijske proizvode in živila »Bovški sir«, 2011). V šestih mesecih od objave v Uradnem listu EU lahko v skladu z Uredbo Sveta (ES) št. 510/2006 o zaščiti geografskih označb in označb porekla (2006) katerakoli država članica ali tretja država ugovarja registraciji. Če pa EU Komisija ne prejme nobenih ugovorov, se ime Bovški sir vpiše v register zaščitene označbe porekla in s tem vlagatelj, se pravi Društvo rejcev drobnice Bovške, pridobi pravico do uveljavljanja zaščite imena Bovški sir, ki je kot registrirano ime zaščiteno tako pred vsako zlorabo in posnemanjem izdelka kot tudi pred vsako napačno ali zavajajočo označbo izvora, porekla ali bistvenih lastnosti proizvoda.

2.2.6.1 Kraški ovčji sir

Tradicionalni slovenski trdi sir, ki nosi ime Kraški ovčji sir, se proizvaja iz polnomastnega ovčjega mleka, in sicer na aridnem območju Krasa, kjer se prepletata mediteranska in celinska klima. Sir tradicionalno izdelujejo iz surovega ali termiziranega mleka, ki ga koagulirajo pri temperaturi 31 do 33 °C z dodatkom sirišča, himozina ali himozin-pepsina. Za startersko kulturo uporabljajo kisavo ali pa selekcionirane termofilne mlečnokislinske bakterije. Ko koagulum razrežejo na zrno velikosti pšenice, sirno zrno sušijo pri temperaturi 38 do 42 °C do primerne klenosti. Zatem sirno zrno prenesejo v oblikovala in sledi 12- do 18-urno stiskanje. Po stiskanju lahko sir solijo po postopku suhega soljenja, ki traja 3 do 6 dni pri temperaturi 15 do 18 °C, ali pa uporabijo 24-urno soljenje v 20 % slanici pri temperaturi 13 do 18 °C. Ko se sir odcedi in osuši, ga prenesejo v zorilnico, kjer 2 do 3 mesece, izjemoma 1 leto, zori pri temperaturi 15 do 18 °C in 75 do 85 % relativni vlažnosti (Renčelj in Perko, 2008).

Rodova *Enterococcus* in *Lactobacillus* tvorita prevladujočo mikrobnno populacijo v Kraškem ovčjem siru. Pomembno vlogo igra predvsem vrsta *Ent. faecium*, ki s svojo prisotnostjo zelo koristno vpliva na zorenje sira. Med laktobacili prevladuje vrsta *Lb. paracasei*, prisotne pa so tudi vrste *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. curvatus* in *Lb. brevis* (Renčelj in Perko, 2008; Čanžek Majhenič in sod., 2007).

2.2.6.2 Dolenjski ovčji sir

Dolenjski ovčji sir je tradicionalni slovenski trdi sir, ki ni zaščiten z nacionalno oz. evropsko shemo kakovosti, saj do sedaj še ni bil proučevan in obravnavan. Prvi detajlni opisi omenjenega sira so bili narejeni šele v okviru projekta SEE-ERA.NET.

Dolenjski ovčji sir izdelujejo iz polnomastnega surovega ali termiziranega ovčjega mleka, ki mu v podporo naravni mikrobioti mleka dodajo termofilno startersko kulturo mlečnokislinskih bakterij. Koagulacija mleka poteka pri temperaturi 32 °C z dodatkom sirišča, himozina ali himozin-pepsina. Po 30 do 45 minutah čvrst koagulum razrežejo na sirno zrno velikosti lešnika, ki se med 30-minutno fazo sušenja pri temperaturi 42 do 45 °C zmanjša na velikost graha. Suho sirno zrno polnijo v oblikovala in zatem sledi 10- do 14-urno stiskanje pri obtežitvi 3 kg/kg sira. Po stiskanju lahko sir bodisi 24 ur solijo v 22 % slanici, bodisi ga 2 dni solijo po suhem postopku pri temperaturi 15 °C. Za oblikovanje aromatične in polne do rahlo pikantne arome mora sir zoreti vsaj 60 dni pri temperaturi 13 do 15 °C in 75 do 80 % relativni vlažnosti (Rogelj, 2012).

2.2.6.3 Bovški ovčji sir

Med slovenskimi ovčjimi siri je vsekakor najbolj znan Bovški sir, ki sodi med trde sire in je zaščiteno z nacionalno označbo porekla (ZOP). Izdelan je iz surovega polnomastnega ovčjega mleka, ki se mu lahko doda tudi do 20 % kravjega ali kozjega mleka (Fischione, 1998; Objava vloge na podlagi člena 6(2) Uredbe Sveta (ES) št. 510/2006 o zaščiti geografskih označb in označb porekla za kmetijske proizvode in živila »Bovški sir«, 2011).

Proizvodnja Bovškega sira je omejena na obdobje laktacije ovc avtohtone pasme Bovška ovca. Za izdelavo sira uporabljajo zorjeno večerno mleko, ki mu pred usirjanjem lahko dodajo tudi sveže jutranje mleko. Mešanico večernega in jutranjega mleka segrejejo na 35 do 36 °C, ji dodajo startersko kulturo in toliko sirišča v prahu (himosin-pepsin), da mleko koagulira v 30 do 45 minutah. Namesto starterske kulture in sirišča v prahu se lahko uporablja tudi naravno sirišče kot edini dodatek. Koagulum nato zdrobijo na sirna zrna velikosti fižola ali graha, ki jih 15 do 30 minut sušijo pri temperaturi 44 do 49 °C, da dosežejo velikost zrna pšenice in postanejo klena. Sirnino nato preložijo v oblikoval in jo 4 do 6 ur stiskajo. Po stiskanju lahko sir 34 do 47 ur solijo v 20 % slanici pri temperaturi 14 do 16 °C, lahko pa se sirarji poslužujejo 5- do 6-dnevnega postopka suhega soljenja z grobo morsko soljo. Za razvoj značilne aromatične, polne, intenzivne in rahlo pikantne arome, ki je ob dodatku kravjega ali kozjega mleka nekoliko milejša, mora sir po soljenju zoreti vsaj 2 meseca, največ pa 2 leti (Objava vloge na podlagi člena 6(2) Uredbe Sveta (ES) št. 510/2006 o zaščiti geografskih označb in označb porekla za kmetijske proizvode in živila »Bovški sir«, 2011; Rogelj, 2012).

2.3 MOLEKULARNE METODE ZA PROUČEVANJE MIKROBNIH POPULACIJ V SIRIH

Proučevanje pestrosti in dinamičnosti mikroorganizmov med proizvodnjo in zorenjem sira je pomembno zaradi iskanja povezave med prisotnostjo določenih bakterijskih vrst in/ali sevov ter njihovim vplivom na specifičen okus in senzorične lastnosti končnega produkta. Tradicionalno so bile raziskave o pestrosti mikrobne združbe v sirih omejene na kultivacijske metode, ki temeljijo na rasti mikroorganizmov na selektivnih gojiščih in njihovi nadaljnji identifikaciji na ravni rodu/vrste s pomočjo fenotipske karakterizacije. Čeprav so takšne metode lahko dokaj občuljive, pa ne dopuščajo vedno razlikovanja med vrstami ali sevi niti odkrivanja filogenetskih odnosov med določenimi skupinami bakterij (Randazzo in sod., 2009). Zato so v zadnjih dveh desetletjih mikrobiologi za ugotavljanje mikrobne pestrosti začeli uporabljati različne molekularne metode (Justé in sod., 2008), katerih uporaba se je, po njihovem nadaljnjem razvoju in izboljšavah, izkazala za močno orodje pri določanju strukture mikrobnih združb v različnih okoljih in pri opazovanju sprememb v mikrobni skupnosti. Tako imamo dandanes za proučevanje mikrobni populacij v sirih na voljo širok nabor molekularnih pristopov, ki jih lahko razdelimo na:

- gojitveno odvisne metode, ki temeljijo na kultivaciji bakterij ter fenotipski in molekularni identifikaciji, in na
- gojitveno neodvisne molekularne metode (Randazzo in sod., 2009).

2.3.1 Metode, ki zahtevajo predhodno gojenje mikrobnih populacij

Metode, ki zahtevajo predhodno gojenje mikrobnih populacij (angl. culture-dependent methods), v osnovi razdelimo na fenotipizacijske in genotipizacijske metode (Smole Možina, 2003; Temmerman in sod., 2004).

Fenotipizacijske metode temeljijo na razlikovanju mikroorganizmov na podlagi izraženih lastnosti in se uporabljajo pri preiskovanju različnih metabolnih oz. fizioloških lastnosti (biotipizacija), občutljivosti za fage (fagotipizacija), tipizaciji antigenov (serotipizacija) in podobno (Smole Možina, 2003). Predvsem v industrijski ali uporabni mikrobiologiji se fenotipski testi še vedno uporabljajo za rutinsko identifikacijo mlečnokislinskih bakterij (povezanih s hrano), saj vključujejo morfološko in fiziološko karakterizacijo, modele fermentacije ogljikovih hidratov in profiliranje proteinov. Fenotipizacijske metode so priljubljene zato, ker so cenovno bolj ugodne v primerjavi z genotipizacijskimi metodami in ne zahtevajo posebne opreme za opravljanje večine testov (Temmerman in sod., 2004). Njihove slabosti pa vključujejo slabo ponovljivost, nezmožnost tipiziranja večjega števila sevov (v primerjavi z genotipizacijskimi metodami) in nizko taksonomsko resolucijo, ki pogosto dopušča le razlikovanje na ravni rodu (McCartney, 2002; Smole Možina, 2003). Od fenotipizacijskih metod se komercialno najbolj uporabljata identifikacijska sistema API (BioMérieux, Francija) in BIOLOG, za bolj zanesljivo in ponovljivo fenotipizacijsko identifikacijsko metodo pa velja poliakrilamidna gelska elektroforeza z natrijevim dodecil sulfatom (SDS-PAGE), pri kateri poteka ločevanje proteinov na osnovi njihove molekulske mase (Temmerman in sod., 2004).

Drugo skupino gojitvenih metod predstavljajo številne, hitro razvijajoče se molekularno tipizacijske tehnike, ki omogočajo identifikacijo in klasifikacijo bakterij na ali blizu ravni seva (McCartney, 2002). Med temi tehnikami so najmočnejše molekularne metode, znane kot DNA »fingerprinting« tehnike, med katerimi se za identifikacijo in genotipizacijo izolatov mlečnokislinskih bakterij, izoliranih iz različnih fermentiranih živil ali človeškega gastrointestinalnega trakta, najpogosteje uporabljajo (makro)restriksijska analiza kromosomske DNA z gelsko elektroforezo v utripajočem polju (PFGE), restriksijska analiza pomnoženih fragmentov DNA z metodo PCR, pomnoževanje DNA z naključnimi oligonukleotidi (RAPD) in AFLP oz. pomnoževanje predhodno razrezane mikrobne DNA z izbranimi restriksijskimi encimi (McCartney, 2002; Smole Možina, 2003). Te molekularno-genetske metode temeljijo na proučevanju genoma mikroorganizmov, ki je najmanj odvisen od dejavnikov okolja in kot tak predstavlja najbolj neodvisno merilo za primerjavo mikroorganizmov (Smole Možina, 2003). Kljub temu pa imajo »fingerprinting« tehnike tudi slabe strani, med katere sodijo predhodna kultivacija, večji stroški, dražja oprema in različne omejitve metod PCR pri proučevanju mešane mikrobne populacije, ki vključujejo pomanjkljive ali preferenčne celične lize, inhibicijo PCR ter diferencialno pomnoževanje in oblikovanje navideznih produktov PCR. Določene pomanjkljivosti metod PCR so se z nadaljnjim tehnološkim razvojem že zmanjšale in/ali omilile, saj so se pojavile nove strategije, kot so npr. vključevanje moderatorjev PCR v reakcijo, izvajanje več reakcij z različnimi seti 'univerzalnih' začetnih oligonukleotidov ali nadzorovanje pogojev PCR, kot sta število ciklov in čas podaljševanja verige (McCartney, 2002).

Izbira najbolj ustrezne genotipizacijske metode je najbolj odvisna od stroškov, visoke proizvodne zmogljivosti in ponovljivosti genomskih »prstnih odtisov« (McCartney, 2002).

2.3.2 Metode, neodvisne od gojenja mikrobnih populacij

Ker se gojitvene metode zanašajo na sposobnost izolacije in kultivacije izolatov mikroorganizmov iz določenih živil oz. vzorcev iz okolja, imajo določene omejitve, kot je na primer različna stopnja revitalizacije (poškodovanih) celic, saj skupek pridobljenih izolatov vedno ne odraža dejanske mikrobne sestave vzorca (Ampe in sod., 1999). Poleg tega so tehnike, ki zahtevajo predhodno gojenje mikrobnih kultur, tudi dokaj zahtevne, dolgotrajne in imajo slabo ponovljivost, saj nimamo dovolj ustreznih selektivnih izolacijskih gojišč, na primer za izolacijo bifidobakterij, ki potrebujejo anaerobno kultivacijo (Roy, 2001).

Do razvoja metod, ki so neodvisne od predhodne kultivacije (angl. culture-independent methods), je prišlo zato, da bi se z njimi izognili oviram klasičnih kultivacijskih metod pri analizi mikrobne populacije (Vaughan in sod., 2002). Največja omejitev klasičnih metod je namreč pomanjkanje znanja o dejanskih pogojih, pod katerimi raste večina bakterij v njihovem naravnem habitatu, in s tem povezane težave pri razvoju gojišč za kultivacijo, ki bi natančno posnemala te pogoje (Ercolini, 2004). Prednost nekultivacijskih metod je v tem, da so bolj zanesljive in časovno manj zamudne, saj ne zahtevajo predhodne izolacije in kultivacije mikroorganizmov (Temmerman in sod., 2004).

Med gojitveno neodvisne metode sodijo:

- * poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajočem gradientu (DGGE) v kombinaciji z metodo PCR ali metodo RT-PCR,
- * temperaturna gradientna gelska elektroforeza (TGGE) v kombinaciji z metodo PCR ali metodo RT-PCR,
- * polimorfizem dolžin terminalnih restrikcijskih fragmentov (T-RFLP) v kombinaciji z enoverižnim konformacijskim polimorfizmom (SSCP),
- * sekvenciranje genov za 16S rRNA,
- * fluorescentna in situ hibridizacija,
- * dot-blot hibridizacija,
- * pretočna citometrija (Randazzo in sod., 2009).

2.3.2.1 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajočem gradientu

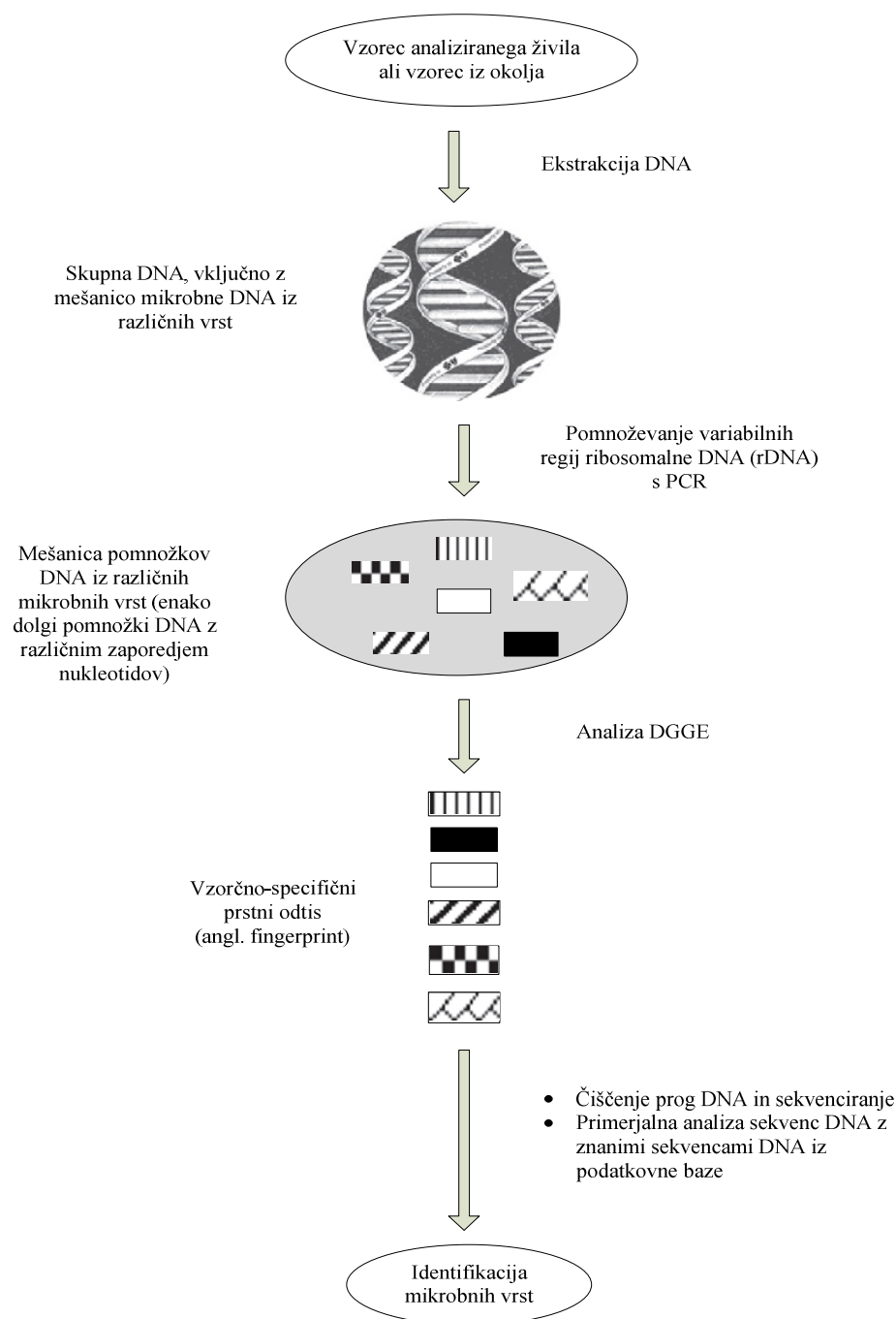
Poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajočem gradientu (DGGE) verjetno sodi med najbolj uporabljene nekultivacijske pristope (Ercolini, 2004) za neposredno določanje genetske raznolikosti kompleksnih mikrobnih populacij (Muyzer in sod., 1993). Muyzer in sod. (1993) so metodo uporabili v mikrobní ekologiji, kjer je postala cenjeno orodje tako za identifikacijo mikroorganizmov kot za študij strukture in razvoja mikrobnih združb tal, morja, rek in jezer, prebavnega trakta, čistilnih naprav, insektov, kliničnih vzorcev itd. Kasneje se je aplikacija tehnike PCR-DGGE razširila tudi v živilsko mikrobiologijo, kjer je spodbudila živilske mikrobiologe k proučevanju mikrobne fermentacije v živilih in s hrano povezanih ekosistemih (Ercolini, 2004).

DGGE je metoda, ki je neodvisna od kulture in predstavlja elektroforetski način odkrivanja razlik med fragmenti 16S rDNA, ki smo jih predhodno pomnožili s PCR. S to tehniko ločujemo enako dolge pomnožke na podlagi razlik v zaporedju DNA, pri čemer lahko teoretično odkrijemo spremembe enega samega nukleotida (Muyzer in sod., 1993). Ločitev temelji na zmanjšani elektroforetski mobilnosti delno denaturirane dvoverižne molekule DNA (dsDNA) v poliakrilamidnem gelu z linearnim denaturacijskim gradientom. Pri potovanju po gelu DGGE je namreč molekula dsDNA izpostavljena vedno večji koncentraciji denaturacijskih sredstev (mešanica uree in formamida), ki vpliva na taljenje fragmentov DNA. Le-to se prične na mestu DNA, ki ga imenujemo domena taljenja (angl. melting domain) in zastopa odseke baznih parov z identično temperaturo tališča (T_m ; angl. melting temperature). Ko domena DNA, z najnižjo temperaturo tališča, doseže na poliakrilamidnem gelu določeno mesto, ki ustreza njeni temperaturi tališča (T_m), se dsDNA na mestu domene razcepi v enoverižno DNA (ssDNA) in migracija molekule se upočasni in na koncu praktično ustavi. Zato se enako dolgi fragmenti DNA z različnimi zaporedji nukleotidov ustavijo na različnih mestih v gelu, saj imajo domene DNA z različnimi zaporedji nukleotidov različno temperaturo tališča, na katero vpliva koncentracija denaturacijskih sredstev v gelu DGGE (Muyzer in Smalla, 1998; Muyzer, 1999; Ercolini, 2004).

Z metodo DGGE ločujemo kratke fragmente DNA, ki vsebujejo do 500 bp, njihov položaj v gelu DGGE pa je odvisen od zaporedja nukleotidov in od vsebnosti gvanina in citozina (Muyzer in Smalla, 1998; Temmerman in sod., 2004). Občuljivost metode DGGE zelo povečamo, če na 5' konec enega od začetnih oligonukleotidov, ki jih uporabimo v PCR, dodamo GC-čeljust (angl. GC-clamp), ki vsebuje 30 do 50 baznih parov dolgo zaporedje nukleotidov z visoko vsebnostjo gvanina in citozina. GC-čeljust namreč deluje kot domena DNA z visoko temperaturo tališča (T_m), ki med elektroforezo preprečuje popoln razpad dvoverižne DNA na dve ločeni verigi (Muyzer in Smalla, 1998). Tako novonastala, delno denaturirana molekula DNA, po delni denaturaciji v ustrezni koncentraciji denaturanta v gelu DGGE, ostane na mestu in ne potuje več naprej (Ferris in sod., 1996).

Po končani elektroforezi obarvamo proge DNA (angl. DNA bands) na gelu DGGE z etidijevim bromidom oz. barvilom SYBR Green I, ki omogoča opazovanje tudi manj dominantnih fragmentov DNA (Muyzer in Smalla, 1998), ter primerjamo položaj posameznih prog DNA s položajem prog DNA referenčnih sevov, ki jih na gel DGGE nanesemo kot marker, in tako identificiramo vrsto mikroorganizma (Ercolini, 2004). Za

nadaljnjo karakterizacijo opazovanih prog DNA lahko fragmente DNA tudi izrežemo iz gela DGGE, jih znova pomnožimo in s sekvenciranjem določimo zaporedje nukleotidov, ki ga nato primerjamo z bazo podatkov v genski banki. Tako lahko analiziramo kompleksne mikrobne populacije iz naravnih okolij (Muyzer in sod., 1993; Ercolini, 2004).

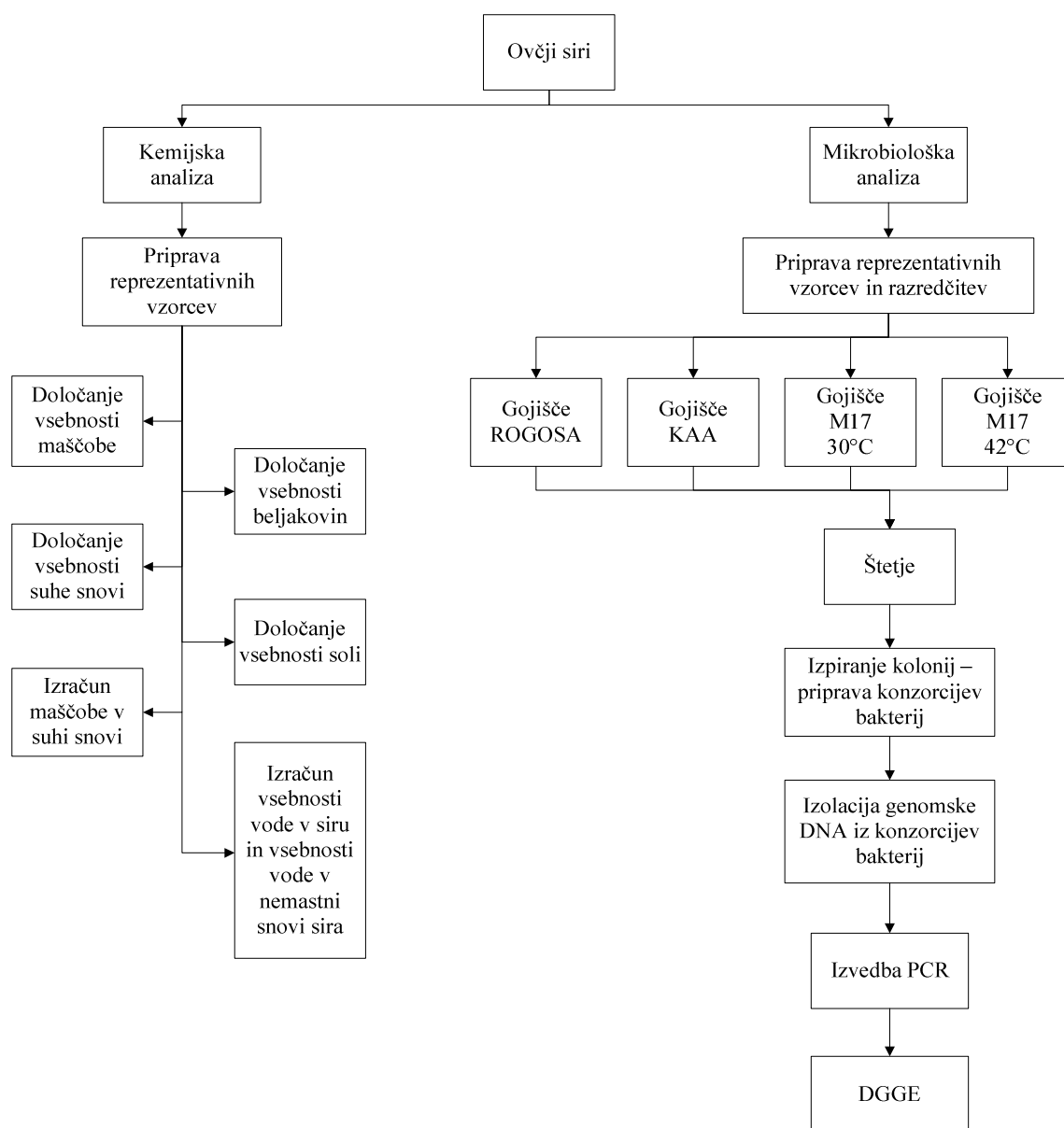


Slika 7: Shema poteka metode PCR-DGGE (Ercolini, 2004: 300)

3 MATERIAL IN METODE

Z diplomsko nalogo smo želeli določiti pestrost in dinamičnost dominantne bakterijske populacije v Kraškem, Bovškem in Dolenjskem ovčjem siru po 0, 30 in 60 dneh zorenja, kot tudi analizirati fizikalno-kemijske lastnosti teh sirov po različnih časih zorenja.

3.1 POTEK DELA



Slika 8: Shematski prikaz poteka kemijskih in mikrobioloških analiz ovčjih sirov

3.2 MATERIAL

3.2.1 Vzorci avtohtonih slovenskih ovčjih sirov

Po 0, 30 in 60 dneh zorenja smo analizirali devet vzorcev tradicionalnih ovčjih sirov, in sicer tri s področja Krasa, tri iz Dolenjske in tri iz okolice Bovca.

Vzorci Kraškega ovčjega sira so označeni z oznakami K₁, K₂ in K₃.

Vzorci Dolenjskega ovčjega sira so označeni z oznakami D₁, D₂ in D₃.

Vzorci Bovškega ovčjega sira so označeni z oznakami B₁, B₂ in B₃.

3.2.2 Gojišča, raztopine in kemikalije

3.2.2.1 Trdno gojišče ROGOSA

Po navodilih proizvajalca Merck iz Nemčije smo v več stekleničk zatehtali 14,9 g gojišča ROGOSA v prahu in dodali 200 ml deionizirane vode Mili Q. Do popolne raztopitve agarja smo stekleničke z gojiščem segrevali v mikrovalovni pečici, saj gojišča ROGOSA ne avtoklaviramo. Raztopljenemu gojišču smo dodali 0,260 ml 96-odstotne očetne kisline (Merck, Darmstadt, Nemčija).

Gojišče uporabljamo za izolacijo in določanje števila laktobacilov.

3.2.2.2 Trdno gojišče KAA

Po navodilih proizvajalca Merck iz Nemčije smo v več stekleničk zatehtali 9,5 g gojišča Kanamycin Aesculin Azid (KAA) v prahu ter dodali 200 ml deionizirane vode Mili Q. Stekleničke z gojiščem smo premešali ter jih 15 minut avtoklavirali pri temperaturi 121 °C.

Gojišče KAA uporabljamo za izolacijo in določanje števila enterokokov.

3.2.2.3 Trdno gojišče M17

Po navodilih proizvajalca Merck iz Nemčije smo v več stekleničk zatehtali 11 g gojišča M17 in ga dopolnili z 200 ml deionizirane vode Mili Q. Stekleničke z gojiščem smo premešali ter jih 15 minut avtoklavirali pri temperaturi 121 °C.

Gojišče nam služi za izolacijo in določanje števila mezofilnih in termofilnih mlečnokislinskih kokov (rodovi *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ter *Streptococcus*).

3.2.2.4 Raztopina dikalijevega hidrogenfosfata (K_2HPO_4)

Za pripravo začetne suspenzije vzorcev sira smo uporabili raztopino dikalijevega hidrogenfosfata, ki smo jo pripravili tako, da smo 20 g K_2HPO_4 (Merck, Darmstadt, Nemčija) dodali v 1000 ml deionizirane vode Mili Q in premešali na magnetnem mešalu. Ko se je sol raztopila, smo s pomočjo 1 M HCl ali 1 M NaOH uravnali vrednost pH na $7,5 \pm 0,2$ pri 25 °C. Raztopino K_2HPO_4 smo 15 minut sterilizirali pri temperaturi 121 °C, nato pa jo temperirali na 42 °C (ISO 8261/IDF 122: 2001).

3.2.2.5 Ringerjeva raztopina ¼ jakosti

Ringerjevo raztopino smo pripravili tako, da smo po dve Ringerjevi tabletki (Merck, Darmstadt, Nemčija) dodali v 1000 ml deionizirane vode Mili Q in toliko časa raztopino mešali na magnetnem mešalu, da sta se tabletki raztopili. Zatem smo po navodilih proizvajalca Merck s pomočjo 1 M HCl ali 1 M NaOH uravnali vrednost pH na $6,9 \pm 0,1$ pri temperaturi 25 °C. Tako pripravljeno raztopino smo po 9,4 ml z dispenzorjem dozirali v epruvete, ki smo jih zatem 15 minut sterilizirali pri 121 °C. Po sterilizaciji je v eprugetah ostalo $9,0 \text{ ml} \pm 2 \%$ Ringerjeve raztopine (ISO 8261/IDF 122: 2001).

3.2.2.6 Kemikalije

- amilni alkohol ($C_5H_{11}OH$), gostota pri temperaturi 20 °C je 0,808 – 0,818 g/ml
- amonijev feri (III) sulfat [nasičena raztopina $NH_4Fe(SO_4)_2$]
- APS, amonijev persulfat, 10 % (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA)
- borova kislina (H_3BO_3) z masno koncentracijo 40,0 g/l

- deioniziran formamid, 40 % (Fluka BioChemika, Švica)
- dušikova (V) kislina (HNO_3), ki ima pri temperaturi 20 °C gostoto 1,40 – 1,42 g/ml, kar ustreza 66,9 – 71,6 (ut.) %
- EDTA, etilendiamintetraocetna kislina, 0,05 M in 0,5 M, pH = 8,0 (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA)
- etanol, 70 % (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- glicerol (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- glukoza (Kemika, Hrvaška)
- izopropanol (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- kalijev ali amonijev tiocianat (0,1 M KSCN ali 0,1 M NH_4SCN)
- kalijev permanganat (KMnO_4)
- Kjeldahl tablete, ki vsebujejo kalijev sulfat kot katalizator
- klorovodikova kislina (HCl) z molarno koncentracijo ($0,1 \pm 0,0005$) mol/l
- kremenčev pesek
- magnezijev klorid – MgCl_2 (Promega, Madison, ZDA)
- mešanica akrilamida in bisakrilamida z razmerjem 37:1 (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA)
- natrijev hidroksid (NaOH) brez dušika (končna raztopina je približno 40 %)
- ocetna kislina, 96 % (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- prečiščena voda Mili Q (Millipore S.A., Francija)
- raztopina vodikovega peroksida (približno 30 g H_2O_2 na 100 ml)
- saharoza z vsebnostjo dušika največ do 0,002 %
- srebrov nitrat (0,1 M AgNO_3)
- standardna raztopina amonijevega sulfata [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]
- standardna raztopina triptofana ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$)
- pufer TAE: pripravili smo 50-kratno založno raztopino iz 242,0 g TRIS baze (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA), 57,1 ml ledocetne kisline (Merck, Darmstadt, Nemčija) in 100,0 ml 0,5 M EDTA, pH = 8,0 (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA), ki smo jo pred uporabo razredčili z vodo v razmerju 1:50

- TEMED oz. N,N,N',N' - tetrametiletilendiamin (Sigma Chemical, St. Louis, ZDA)
- urea, 7 M (Kemika, Hrvaška)
- žveplova (VI) kislina (H₂SO₄), 98 %, za določanje dušika, ki ima pri temperaturi 20 °C gostoto 1,84 g/ml
- žveplova (VI) kislina (H₂SO₄), gostota pri temperaturi 20 °C znaša 1,522 ± 0,005 g/ml, kar ustreza 61,72 – 62,63 (ut.) %

3.2.3 Reagenti in encimi za izolacijo DNA ter za metodi PCR in DGGE

- barvilo DNA:
SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Paisley, Velika Britanija)
- dNTP – mešanica deoksiribonukleotidov za PCR, 0,1 mM, (MBI Fermentas, Litva)
- komplet za metodo PCR:
GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, ZDA)
GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Madison, ZDA)
- komplet za izolacijo genomske DNA:
Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, ZDA)
- lizocim – izoliran iz jajčnega beljaka (10 mg/ml; Sigma Chemical, St. Louis, ZDA)
- mutanolizin (2500 U/ml; Sigma Chemical, St. Louis, ZDA)
- univerzalna začetna oligonukleotida, ki smo ju uporabili pri metodi PCR, sta bila naročena pri podjetju Invitrogen Life Technologies (Paisley, Velika Britanija) in sta navedena v Preglednici 1.

Preglednica 1: Začetna oligonukleotida, uporabljena pri metodi PCR

Oznaka začetnega oligonukleotida	Specifičnost	Zaporedje nukleotidov (5' → 3')	Vir
HDA 1-GC	Eubacteria	CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	Walter in sod., 2000
HDA2	Eubacteria	GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C	Walter in sod., 2000

3.2.4 Referenčni bakterijski sevi

Referenčne bakterijske seve, ki so navedeni v Preglednici 2, smo v analizi DGGE uporabili kot markerje.

Preglednica 2: Imena in izvor referenčnih bakterijskih sevov

Bakterija	Izvor
<i>Bacillus cereus</i>	IM 199
<i>Bifidobacterium animalis</i>	LMG 10508
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	LMG 11041
<i>Enterococcus faecalis</i>	LMG 7937 ^T
<i>Lactobacillus plantarum</i>	NCDO 1193
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	ATCC 53103

Legenda:

LMG: Laboratorium voor Mikrobiologie, Universiteit Gent, Belgium;

NCDO: National Collection of Dairy Organisms;

ATCC: American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA;

IM: Mikrobna zbirka Katedre za mlekarstvo, Biotehniška fakulteta, Ljubljana;

3.2.5 Laboratorijska oprema

- avtoklav: A-21 CA (Kambič)
- avtomatska titracijska enota: Metrohm 702 sm titrino
- brezprašna komora ali laminarij: M12 (Iskra PIO)
- centrifugi:
 - EBA 12 (Hettich Zentrifugen)
 - mikro 22R (Hettich Zentrifugen)
- čistilna enota oz. scrubber: Büchi scrubber B-414 (Švica)
- destilacijska enota: Büchi distillation unit B-324 (Švica)
- digestorij: Modelle 80 (Waldner)
- dispensor
- eksikator
- elektroforezni sistem: D GENE™ Denaturing Gel Electrophoresis System (Bio-Rad, Hercules, California, ZDA)
- elektronski števec kolonijskih enot: EŠKO (Labo, Slovenija)
- gnetilnik: BagMixer (Interscience)
- grelna plošča
- hladilnik
- inkubatorji oz. termostatisirane zračne komore:
 - BT150 (Marjan Krokter)
 - BTE-S (Termo-medicinski aparati)
 - Certomat HK (Braun Biotech)
 - G25 New (Brunswick Scientific)
 - Sutjeska (Fabrika medicinskih uređaja i instrumenata, Beograd)
- magnetni mešalec z grelcem
- mikrovalovna pečica: 32 L (Bosch)
- naprava za izvedbo PCR: ciklični termostat MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, California, ZDA)
- pH-metra:
 - MP 220 (Mettler Toledo)
 - MP 120 (Mettler Toledo)

- plinski gorilnik
- razklopna enota oz. razklopni blok: Büchi K424 (Švica)
- stresalnik: Mini-BeadBeater™ (BioSpec Products)
- sušilnik
- tehtnice:
 - AT 400 (Mettler Toledo)
 - EB 300M (Tehtnica Železniki)
 - P1200 (Mettler Toledo)
- titrator
- UV-transiluminator: ChemiGenius² Bio-Imaging Gel Doc System
(Syngene, Cambridge, Velika Britanija)
- vodni kopeli:
 - 0925095 MK (Marjan Krokter)
 - 9205 193 (Anton Kambič)
- vrtinčnik: Vibromix 10 (Tehtnica)
- zamrzovalnik

3.2.6 Laboratorijski material

- aluminijasta folija
- bireta
- butirometer po van Guliku z zamaškom
- epruvete
- erlenmajerice
- kovinske posodice za sušenje v sušilniku
- merilni valj
- mikrocentrifugirke Eppendorf
- nož
- petrijeve plošče

- pinceta
- pipete s plastičnimi nastavki
- plastične epruvete s pokrovčkom
- prozorne, sterilne vrečke
- razklopne epruvete
- spatula
- steklena bučka
- steklena palčka
- steklenička
- stojalo za epruvete
- stojalo za mikrocentrifugirke
- stojalo za vrečke
- strgalnik
- škatle in vrečke za ustvarjanje anaerobnih pogojev:
 GENbag anaer (BioMérieux, Francija)
 GENbox anaer (BioMérieux, Francija)
- tesnilo za vrečke
- žlička

3.2.7 Računalniški programi

- računalniški program za obdelavo fotografij GeneSnap (Syngene, Cambridge, Velika Britanija)
- računalniški program za statistično obdelavo podatkov BioNumerics (Applied Maths, Belgija)
- računalniški program Microsoft Office Excel

3.3 METODE

3.3.1 Kemijske analize

Kemijske analize, ki zajemajo določanje vsebnosti maščobe, beljakovin, suhe snovi in soli kot NaCl v vzorcih sira, smo izvedli po 0, 30 in 60 dneh zorenja ovčjih sirov.

3.3.1.1 Določanje vsebnosti maščobe v siru

Vsebnost maščobe smo merili po referenčni Van Gulik metodi (ISO 3433/IDF 222: 2008). Vse vzorce sira smo analizirali v 2 paralelkah, čistost reagentov pa preverili s slepim vzorcem, ki je vseboval samo žveplovo (VI) kislino in amilni alkohol, brez sira.

Postopek:

V starirano čašo butirometra smo zatehtali $3 \pm 0,005$ g vzorca, dodali v butirometer približno 10 ml žveplove (VI) kisline z gostoto $1,522 \pm 0,005$ g/ml, da je bila čašica z vzorcem prekrita s kislino, in butirometer postavili v vodno kopel na temperaturo 65 ± 2 °C, da se je sir popolnoma raztopil. Nato smo dodali 1 ml amilnega alkohola in toliko žveplove (VI) kisline, da je nivo tekočine segal do vrha skale butirometra. Vsebino smo dobro premešali, 10 minut centrifugirali pri 350 ± 50 g in odčitali rezultat v % (ISO 3433/IDF 222: 2008).

3.3.1.2 Določanje vsebnosti beljakovin v siru

Beljakovine smo določali s semi-mikro hitro metodo za določanje dušika v mleku in mlečnih izdelkih, ki temelji na principu razklopa vzorca v razklopnem bloku (ISO 8968-3/IDF 20-3: 2004). Vse vzorce sira smo analizirali v 2 paralelkah, čistost reagentov pa preverili s slepim vzorcem, ki je namesto sira vseboval 2 ml destilirane vode in 0,20 g saharoze (ISO 8968-3/IDF 20-3: 2004).

Postopek:

Vzorec sira smo v vodni kopeli segreli na 38 do 40 °C in ga ohladili na sobno temperaturo oz. na 20 °C. V razklopno epruveto smo dodali Kjeldahl tableto (7 g kalijevega sulfata), 0,2 g sira in 10 ml 98 % žveplove (VI) kisline. Vsebino smo premešali, dodali 5 ml vodikovega peroksida, počakali 15 minut in postavili razklopno epruveto v razklopni blok za 1,5 ure. Po končanem razklopu (turkizno zelena barva) smo z destilacijo z vodno paro, ob dodatku presežne količine natrijevega hidroksida, sprostili amoniak iz amonijevega

sulfata in ga lovili v predložko s prebitkom borove kisline. Nato smo s potenciometrično titracijo določili končno točko titracije amoniaka (pri pH 4,6) s standardno raztopino klorovodikove kisline (ISO 8968-3/IDF 20-3: 2004).

Vsebnost dušika je podana kot masni delež v g/100 g vzorca (%), vsebnost beljakovin pa izračunamo tako, da dobljeno vrednost pomnožimo s faktorjem 6,38.

Izračun:

$$\omega_N = \frac{1,4007(V_s - V_b)M_r}{m} \quad \dots(1)$$

ω_N vsebnost dušika v vzorcu (g/100 g)

V_s prostornina (v mililitrih) standardne raztopine klorovodikove kisline, porabljene pri potenciometrični titraciji vzorca, izražena na 0,05 ml natančno

V_b prostornina (v mililitrih) standardne raztopine klorovodikove kisline, porabljene pri potenciometrični titraciji slepega vzorca, izražena na 0,05 ml natančno

M_r natančna molarnost standardne raztopine klorovodikove kisline, izražena na 4 decimalna mesta

m masa vzorca (v gramih), izražena na 0,1 mg natančno

$$\omega_p = \omega_N \times 6,38 \quad \dots(2)$$

ω_p vsebnost beljakovin v vzorcu (g/100 g)

ω_N vsebnost dušika v vzorcu, podanega kot masni delež, in sicer na 4 decimalna mesta natančno

6,38 faktor, s katerim pomnožimo dobljeno vrednost dušika, da dobimo vsebnost beljakovin v vzorcu

3.3.1.3 Določanje vsebnosti suhe snovi v siru

Vsebnost suhe snovi v siru smo določali z referenčno metodo ISO 5534/IDF 4: 2004. Vse vzorce sira smo analizirali v 2 paralelkah.

Postopek:

Količina suhe snovi je količina ostanka, ki smo ga dobili s sušenjem vzorca pri temperaturi 102 °C do konstantne teže. Rezultat smo izrazili v utežnih odstotkih (ISO 5534/IDF 4: 2004).

Izračun:

$$\omega_t = \frac{(m_2 - m_0) - (m_3 - m_4)}{m_1 - m_0} \times 100 \% \quad \dots(3)$$

ω_t vsebnost suhe snovi v vzorcu (g/100 g oz. %)

m_0 masa kovinske posodice, izražena v gramih

m_1 masa vzorca sira in kovinske posodice pred sušenjem, izražena v gramih

m_2 masa vzorca sira in kovinske posodice po sušenju, izražena v gramih

m_3 masa kovinske posodice (izražena v gramih), uporabljene za slepi vzorec po enakem času sušenja kot pri m_2

m_4 masa kovinske posodice (izražena v gramih), uporabljene za slepi vzorec pred sušenjem

3.3.1.4 Izračun vsebnosti vode v siru in vsebnosti vode v nemastni snovi sira

Na osnovi podatka o vsebnosti suhe snovi smo izračunali vsebnost vode:

$$\% \text{ vode} = 100 \% - \% \text{ suhe snovi} \quad \dots(4)$$

Vsebnost vode v nemastni snovi sira, na podlagi katere lahko opredelimo tip sira glede na teksturo testa (Slanovec, 1982), smo izračunali po enačbi:

$$\% \text{ vode v nemastni snovi} = \frac{\% \text{ vode}}{100 \% - \% \text{ maščobe}} \times 100 \quad \dots(5)$$

Glede na vsebnost vode v nemastni snovi so po standardu CODEX STAN 283-1978 opredeljeni sledeči tipi sirov v povezavi s konsistenco:

- zelo trdi siri, ki vsebujejo do 51 % vode v nemastni snovi,
- trdi siri, ki vsebujejo od 49 do 56 % vode v nemastni snovi,
- poltrdi siri, ki vsebujejo od 54 do 69 % vode v nemastni snovi,
- mehki siri, ki vsebujejo nad 67 % vode v nemastni snovi.

3.3.1.5 Izračun vsebnosti maščobe v suhi snovi sira

Ko smo s pomočjo metode za ugotavljanje vsebnosti maščobe v siru, opisane pod točko 3.3.1.1, in metode za določanje suhe snovi v siru, opisane pod točko 3.3.1.3, dobili podatke o deležu maščobe in suhe snovi v siru, smo lahko izračunali vsebnost maščobe v suhi snovi sira po sledeči formuli:

$$\% \text{ maščobe v suhi snovi} = \frac{\% \text{ maščobe}}{\% \text{ suhe snovi}} \times 100 \quad \dots(6)$$

Glede na vsebnost maščobe v suhi snovi se siri delijo na (CODEX STAN 283-1978):

- prekmasten sir, ki vsebuje nad 60 % maščobe v suhi snovi,
- polnomasten sir, ki vsebuje od 45 do 60 % maščobe v suhi snovi,
- polmasten sir, ki vsebuje od 25 do 45 % maščobe v suhi snovi,
- četrtnasten sir, ki vsebuje od 10 do 25 % maščobe v suhi snovi,
- pust sir, ki vsebuje manj kot 10 % maščobe v suhi snovi.

3.3.1.6 Določanje vsebnosti soli kot NaCl v siru

Vsebnost NaCl v siru smo določali z referenčno metodo ISO 2970: 1974. Vse vzorce sira smo analizirali v 2 paralelkah, čistost reagentov pa smo preverili s slepim vzorcem, ki je namesto sira vseboval 2 ml destilirane vode.

Princip:

NaCl smo sprostili iz organskih snovi s pomočjo dušikove (V) kisline in kalijevega permanganata, nato pa kloridne ione (Cl^-) določali s titracijo presežka srebrovih ionov s tiocianatom, ob pristonosti amonijevega feri sulfata kot indikatorja.

Postopek:

Zatehtali smo 2 g sira na 1 mg natančno, dodali 25 ml 0,1 M raztopine srebrovega nitrata in 25 ml koncentrirane dušikove (V) kisline ter premešali. Segrevali smo do vrenja in med vrenjem dodali 10 ml kalijevega permanganata, premešali in pustili, da je vsebina rahlo vrela. Ko se je raztopina razbarvala, smo ponovno dodajali kalijev permanganat toliko časa, da se raztopina ni več razbarvala. Presežek permanganata (rjava barva) je pokazal, da je bila razgradnja organskih snovi končana. Presežek smo odstranili z dodatkom majhne količine glukoze. Vzorec smo razredčili s 100 ml hladne destilirane vode in ga pustili, da se je ohladil na sobno temperaturo. Nato smo dodali 5 ml amonijevega feri sulfata, temeljito premešali, presežek srebrovega nitrata pa takoj titrirali z raztopino 0,1 M tiocianata. Titracija je bila končana, ko je raztopina postala rdeče-rjave barve, ki je bila obstojna vsaj 30 sekund (ISO 2970: 1974).

Izračun:

$$\% \text{NaCl} = \frac{0,585 \times (a-b)}{c} \quad \dots(7)$$

- a* volumen dodanega srebrovega nitrata, izražen v ml
- b* volumen tiocianata (v ml), porabljenega pri titraciji vzorca
- c* masa vzorca sira v gramih

3.3.2 Mikrobiološke analize

Z mikrobiološkimi analizami smo določali število in prisotnost določenih skupin bakterij v izbranih ovčjih sirih. Pri delu v laboratoriju smo uporabljali standardne aseptične tehnike. Analize smo izvajali ob gorilniku ali v laminariju, delovne površine pa predhodno očistili in razkužili z ustreznim razkužilom. Poleg delovnih površin smo pred izvedbo analiz razkužili tudi roke ter sterilizirali ves pribor, ki smo ga tekom dela uporabljali. Mikrobiološke analize smo izvedli trikrat, in sicer po 0, 30 in 60 dneh zorenja ovčjih sirov.

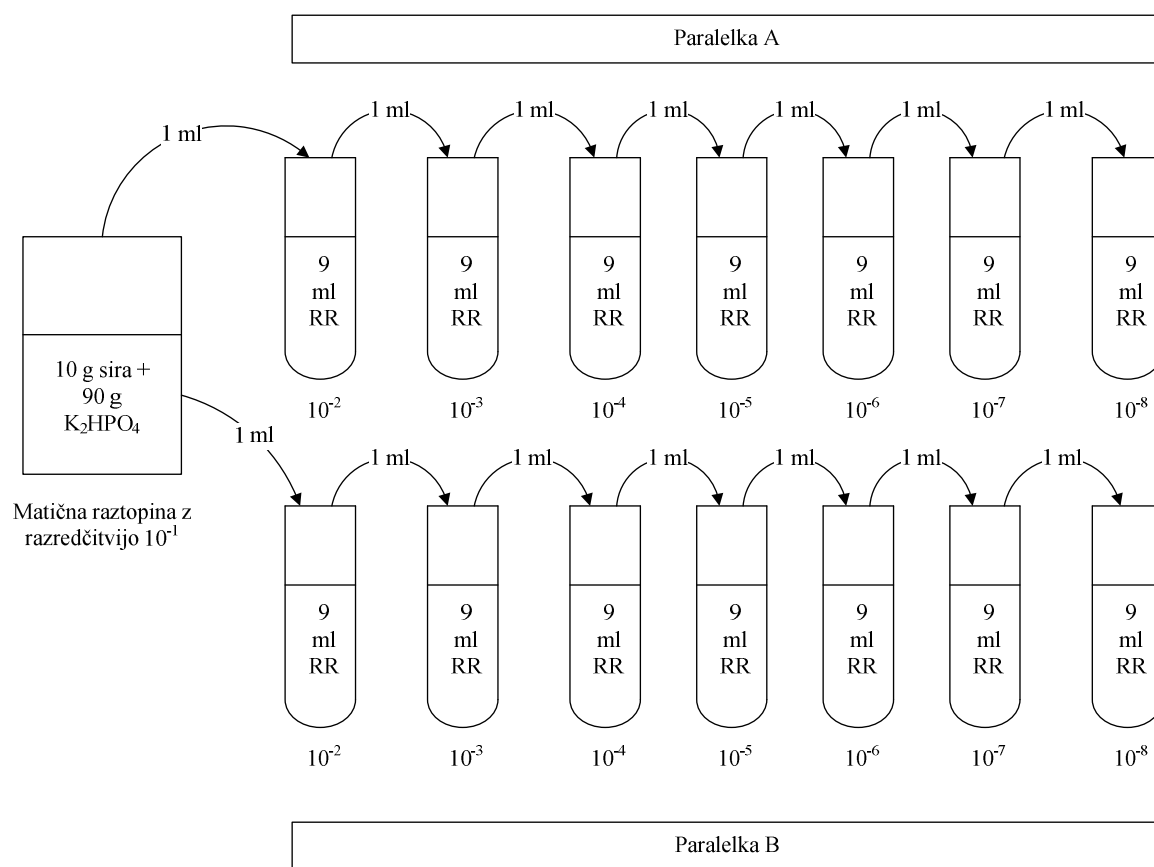
3.3.2.1 Priprava reprezentativnih vzorcev sira

Vzorci sira smo postavili iz hladilnika na delovno površino, da so se ogreli na sobno temperaturo. Ob gorilniku smo, s sterilnim nožem, odstranili skorjo sira, zunanje robove in druge površine, ki so bile daljši čas v stiku z zrakom. S sterilnim strgalnikom smo nato sir po celotnem prerezu aseptično naribali. Nastrgan sir smo s sterilno žlico dobro premešali in natehtali 10 g sira v sterilne vrečke za gnetilnik. Zatem smo dolili še 90 g sterilne, na 42 °C temperirane raztopine dikalijevega hidrogenfosfata, vrečke zatesnili s tesnilom ter vzorce z razredčevalom gnetli v gnetilniku 6 minut pri 210 udarcih/min. do homogenosti. Tako smo dobili primarno suspenzijo oz. matično raztopino vzorcev z razredčitvijo 10^{-1} .

3.3.2.2 Določanje števila bakterij z metodo štetja kolonij na različnih selektivnih trdnih gojiščih

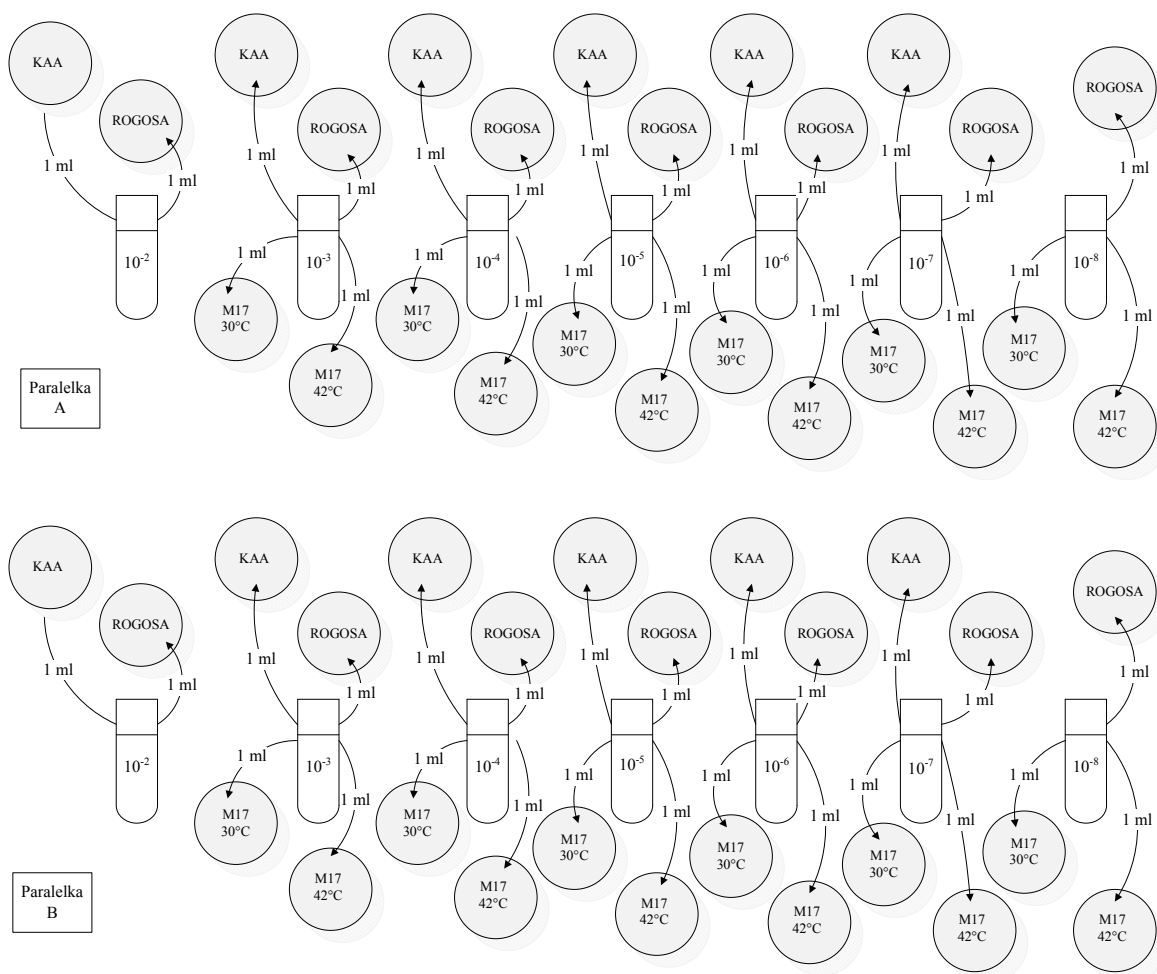
V vzorcih avtohtonih ovčjih sirov, po 0, 30 in 60 dneh zorenja, smo določali število bakterij z metodo štetja kolonij na različnih selektivnih trdnih hranljivih podlogah, pri čemer smo uporabili metodo z vmešavanjem v gojišče (angl. pour plate method).

Iz matične raztopine vzorca sira v dikalijevem hidrogenfosfatu smo pripravili ustrezne razredčitve po Koch-u, da bi po inkubaciji dobili števne plošče z 10 do 300 kolonij. Razredčevanje smo izvedli v 2 paralelkah. Iz matične raztopine smo, s pomočjo pipete, prenesli 1 ml vzorca v epruveto z 9 ml Ringerjeve raztopine iz paralelke A in nato enako ponovili še za paralelko B. Tako smo dobili dve razredčitvi 10^{-2} . Vsako epruveto z razredčitvijo 10^{-2} smo dobro homogenizirali na mehanskem stresalniku in zatem znotraj vsake posamezne paralelke nadaljevali s serijo decimalnega razredčevanja do razredčitve 10^{-8} (Slika 9).



Slika 9: Shematski prikaz razredčevanja po Koch-u za paralelko A in paralelko B
 (oznaka RR je okrajšava za Ringerjevo raztopino ¼ jakosti)

Po pripravi ustreznih razredčitev v obeh paralelkah smo uporabili metodo z vmešavanjem v gojišče (angl. pour plate method). Po 1 ml vzorca iz ustrezne razredčitve smo prenesli v petrijevo ploščo, dodali 10 – 15 ml ustreznega gojišča, temperiranega na 42 °C, in ga enakomerno porazdelili po petrijevi plošči. Ker smo razredčevanje po Koch-u delali v dveh paralelkah, smo dobili za vsako razredčitev po dve petrijevi plošči z enakim gojiščem (Slika 10). Ko so se gojišča z vmešanim razredčenim vzorcem strdila, smo obrnili petrijeve plošče na krovno stran in jih pod ustreznimi pogoji inkubirali (Preglednica 3).



Slika 10: Shematski prikaz cepitve trdnih gojišč z vzorci iz posameznih razredčitvev

Preglednica 3: Razredčitve, atmosferski pogoji, čas in temperatura inkubacije za posamezna gojišča

Gojišče	Skupina MO	Razredčitve	Atmosferski pogoji inkubacije	Čas in temperatura inkubacije
ROGOSA	Laktobacili	10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}	Anaerobno	72 ur na 37 °C
KAA	Enterokoki	10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}	Aerobno	48 ur na 37 °C
M17	Mezofilni MK koki	10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}	Aerobno	48 ur na 30 °C
M17	Termofilni MK koki	10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}	Aerobno	48 ur na 42 °C

Po inkubaciji smo prešteli vse vidne kolonije, ki so imele premer večji od 0,5 mm. Kolonije smo šteli na petrijevih ploščah s tisto decimalno razredčitvijo, kjer je na gojišču zraslo od 10 do 300 kolonij. Rezultate smo preračunali po Enačbi (8) in jih izrazili v številu kolonijskih enot na 1 gram vzorca (ke/g). Če je bilo število kolonij na gojišču manjše od 10, smo rezultat, pomnožen s stopnjo decimalne razredčitve, podali kot ocenjeno vrednost na gram vzorca. Če na gojišču ni bilo prisotnih kolonij, smo, za namene statistične analize, kot rezultat upoštevali polovično vrednost števila mikroorganizmov najnižje analizirane koncentracije. Če pa je bilo število zraslih kolonij na gojišču v posamezni petrijevi plošči večje od 300, smo, za namene statistične analize, kot rezultat upoštevali ocenjeno vrednost $5,00 \times 10^9$ ke/g.

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 n_2) d} \quad \dots(8)$$

$\sum C$ vsota prešteti kolonij na vseh števni petrijevih ploščah

n_1 število petrijevih plošč prve decimalne razredčitve

n_2 število petrijevih plošč druge decimalne razredčitve

d razredčitveni faktor prve decimalne razredčitve

3.3.2.3 Priprava konzorcijev bakterij

Za pripravo konzorcijev bakterij smo uporabili le vzorce avtohtonih ovčjih sirov, po 60 dneh zorenja, pri čemer smo se poslužili metode z razmazovanjem po površini strjenega gojišča (angl. spread plate method).

Najprej smo v laminariju pripravili petrijeve plošče z ustreznimi trdnimi gojišči. Nato smo iz reprezentativnih, homogenih vzorcev sira (opis v poglavju 3.3.2.1) pripravili ustrezne decimalne razredčitve (opis v poglavju 3.3.2.2) in po 100 µl vzorca iz ustrezne decimalne razredčitve s stekleno palčko enakomerno razmazali po površini pripravljenih gojišč. Tudi pri tej metodi razmazovanja (angl. spread plate method) smo dobili za vsako razredčitev po dve petrijevi plošči z enakim gojiščem, in sicer eno iz paralelke A in drugo iz paralelke B (glej Sliko 10). Ko smo nanegli vse vzorce iz ustreznih decimalnih razredčitev in jih razmazali po ustreznih gojiščih, smo obrnili petrijeve plošče na krovno stran in jih inkubirali pod ustreznimi pogoji (Preglednica 3). Po inkubaciji smo izbrali petrijeve plošče s primernim številom bakterijskih kolonij (približno 100 do 300 kolonij), ki smo jih s površin gojišča izprali in suspendirali z 1-2 ml Ringerjeve raztopine ¼ jakosti. Izprane in suspendirane bakterijske celice v Ringerjevi raztopini smo nato, s pomočjo pipete, prenesli v označene tubice oz. mikrocentrifugirke Eppendorf.

3.3.2.4 Izolacija genomske DNA iz konzorcijev bakterijskih populacij

Za izolacijo genomske DNA iz konzorcijev bakterijskih populacij smo uporabili komercialni komplet Wizard® Genomic DNA Purification Kit, pri čemer smo za izvedbo postopka (opisanega v nadaljevanju) sledili navodilom oz. protokolu proizvajalca Promega (Madison, ZDA).

Postopek:

V stekleničko smo zatehtali 0,200 g lizocima ter s pipeto dodali 20 ml 0,05 M EDTA in 0,200 ml mutanolizina. Mešanico smo dobro premešali, da so se sestavine raztopile. Mikrocentrifugirke Eppendorf s suspenzijami bakterijskih celic smo naložili v centrifugo in jih 2 minuti centrifugirali pri 18.000 obratih na minuto. Po centrifugiranju smo odlili supernatant, pelete pa resuspendirali v 600 µl mešanice lizocima, EDTA in mutanolizina, jih inkubirali v vodni kopeli pri 37 °C za 60 minut, ponovno 2 minuti centrifugirali pri 16.000 obratih na minuto ter odlili supernatant. V vsako mikrocentrifugirko smo nato dodali 500 µl raztopine Nuclei Lysis Solution ter s pomočjo pipete suspenzijo toliko časa mešali in vbrižgavali, da se je usedlina raztopila. Za vsako mikrocentrifugirko smo uporabili nov nastavek za pipeto. Ko so se usedline v vseh mikrocentrifugirkah resuspendirale oz. raztopile, smo mikrocentrifugirke za 5 minut postavili v vodno kopel na 80 °C. Po inkubaciji smo jih za kratek čas prenesli na led, da so se ohladile na sobno temperaturo. Zatam smo v mikrocentrifugirke dodali 200 µl raztopine Protein Precipitation Solution, jih dobro premešali na mehanskem stresalniku, ponovno postavili za 5 minut na led ter jih za 24 ur zamrznili pri temperaturi -20 °C. Po 24 urah smo mikrocentrifugirke odtajali na sobni temperaturi in jih 3 minute centrifugirali pri 16.000 obratih na minuto. Med centrifugiranjem smo pripravili nove mikrocentrifugirke in jih ustrezno označili. V nove in označene mikrocentrifugirke smo s pipeto dodali 600 µl izopropanola in supernatant, staro mikrocentrifugirko z usedlino pa smo zavrgli. Nove mikrocentrifugirke s supernatantom smo dobro premešali in jih 3 minute centrifugirali pri 16.000 obratih na minuto. Po končanem centrifugiranju smo previdno odlili supernatant, tako da nam je v mikrocentrifugirki ostala le usedlina (DNA). Zatam smo v vsako mikrocentrifugirko dodali 600 µl 70 % etanola in mikrocentrifugirke dobro premešali na mehanskem stresalniku. Sledilo je 3 minutno centrifugiranje pri 16.000 obratih na minuto. Ko je bilo centrifugiranje končano, smo previdno odlili supernatant in odprte mikrocentrifugirke z usedlino postavili za 40 minut v inkubator na 42 °C, da je ves preostali etanol izhlapel. Po inkubaciji smo v vsako mikrocentrifugirko s pipeto prenesli 100 µl raztopine DNA Rehydration Solution, zaprli pokrovčke mikrocentrifugirk in jih pustili mirovati za 10 minut. Nato smo jih dobro premešali na mehanskem stresalniku in jih za 24 ur shranili v hladilnik na temperaturo 4 °C. Po 24 urah smo mikrocentrifugirke vzeli iz hladilnika in v vsako dodali 2 µl raztopine Rnase Solution ter jih shranili v zmrzovalniku na temperaturi -20 °C do analize. Pripravljena suspenzija nam je služila kot tarčna DNA v verižni reakciji s polimerazo (PCR).

3.3.2.5 Pomnoževanje tarčne sekvence DNA z metodo PCR za analizo DGGE

Regijo V2 – V3 na genu 16S rDNA smo pomnoževali z verižno reakcijo s polimerazo (PCR), pri čemer smo uporabili univerzalna začetna oligonukleotida HDA 1-GC in HDA2, ki so ju opisali Turner in sod. leta 1998 (Walter in sod., 2000).

Preglednica 4: Začetna oligonukleotida, ki pomnožujeta tarčno regijo 16S rDNA

Začetni oligonukleotid (z.o.)	Nukleotidno zaporedje (5' → 3')	Tarčna regija 16S rDNA	Mesto pomnoževanja ¹	Vir
HDA 1-GC	CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G ² AC TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	V2 – V3	339 – 539	Walter in sod., 2000
HDA2	GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C			

¹ V *Escherichia coli* 16S rDNA

² Dodana GC-čeljust na 5' koncu začetnega oligonukleotida – označeno v krepkem tisku (Walter in sod., 2000)

Končno reakcijsko mešanico za PCR smo pripravili v 200 µl mikrocentrifugirkah. 50 µl mešanica PCR je vsebovala:

- 2 µl izolirane DNA,
- 10 µl brezbarvnega pufra GoTaq®,
- 5 µl MgCl₂ (2,5 mM),
- 0,25 µl z.o. HDA 1-GC (0,5 µM),
- 0,25 µl z.o. HDA2 (0,5 µM),
- 0,5 µl dNTP (0,1 mM),
- 0,25 µl GoTaq® DNA-polimeraze (5 U/µl)
- 31,75 µl vode Mili Q.

Mikrocentrifugirke s končno mešanico PCR smo prenesli v ciklični termostatski MyCycler™ Thermal Cycler, kjer je potekalo pomnoževanje tarčnega dela DNA, in sicer po programu, opisanem v Preglednici 5.

Preglednica 5: Program PCR za pomnoževanje regije V2 – V3 na genu 16S rDNA

Število ciklov	Faza	Temperatura	Čas
1	Začetna denaturacija DNA	95 °C	3 min.
40	Denaturacija DNA	95 °C	30 sek.
	Prileganje začetnih oligonukleotidov	58 °C	30 sek.
	Podaljševanje verige	72 °C	40 sek.
1	Zaključno podaljševanje verige	72 °C	5 min.

Po zaključeni PCR smo hranili pomnožke do nadaljnje analize DGGE na temperaturi 4 °C.

3.3.2.6 Poliakrilamidna gelska elektroforeza v denaturirajočem gradientu (DGGE)

Analizo DGGE, ki smo jo izvedli s pomočjo sistema D GENE™ Denaturing Gel Electrophoresis System, in nosilec za gel (sistem dveh steklenih plošč z dvema distančnikom, ki je vpet v plastično držalo) smo pripravili po navodilih proizvajalca Bio-Rad (Hercules, California, ZDA). Pri tem smo za elektroforetsko ločitev pomnožkov uporabili gele velikosti 16 cm x 16 cm x 1 mm.

Priprava raztopin za denaturacijo:

❖ 100 % raztopina z denurantom

100 % raztopina za denaturacijo je vsebovala 7 M ureo in 40 % formamid, zato smo v stekleno čašo za dva 8 % poliakrilamidna gela zatehtali 13,44 g 7 M uree ter najprej dodali 12,80 ml 40 % formamida in 0,64 ml pufru TAE 50x, nato pa še 6,40 ml mešanice akrilamida in bisakrilamida v razmerju 37:1. Dobljeno mešanico smo mešali na magnetnem mešalu in jo rahlo segrevali. Ko se je urea popolnoma raztopila, smo dodali deionizirano vodo Mili Q do končnega volumna 32 ml ter ponovno zmešali na magnetnem mešalu.

❖ Raztopina brez denaturanta

Raztopina brez denaturanta ni vsebovala 7 M uree in 40 % formamida, zato smo za pripravo dveh 8 % poliakrilamidnih gelov potrebovali le 0,78 ml pufru TAE 50x in 7,80 ml mešanice akrilamida in bisakrilamida v razmerju 37:1. Raztopini smo nato dodali še deionizirano vodo Mili Q do končnega volumna 39 ml ter zmes dobro premešali na magnetnem mešalu.

Priprava 8 % poliakrilamidnih gelov za DGGE:

Pomnožke smo ločevali z analizo DGGE na dveh 8 % poliakrilamidnih gelih (razmerje akrilamid/bisakrilamid 37:1) s 30 do 60 % denaturacijskim gradientom v pufru TAE. Za gel s 30 % denaturacijskim gradientom smo v plastični epruveti zmešali 5,1 ml raztopine z denaturantom in 11,9 ml raztopine brez denaturanta. Za gel s 60 % denaturacijskim gradientom pa smo v drugi plastični epruveti združili 10,2 ml raztopine z denaturantom s 6,8 ml raztopine brez denaturanta. Tik pred vlivanjem gelov smo v vsako plastično epruveto dodali 130 µl amonijevega persulfata (APS), ki smo ga pripravili tako, da smo v mikrocentrifugirko zatehtali 0,1 g trdnega amonijevega persulfata in nato dopolnili z deionizirano vodo Mili Q do volumna 1 ml. Poleg amonijevega persulfata, ki je bil vir prostih radikalov, v prisotnosti katerih je potekla polimerizacija akrilamida, smo v plastične epruvete dodali še 5,8 µl TEMED-a, katalizatorja, ki je vplival na počasno sproščanje radikalov iz APS-a in s tem omogočil enakomerno zamrežitev gela. Obe plastični epruveti smo dobro premešali in z njuno vsebino napolnili napravo za pripravo gradientnega gela. To napravo z dvema kolonama smo postavili na magnetno mešalo in v prvo kolono vlili raztopino s 30 % denaturacijskim gradientom, v drugo kolono pa raztopino s 60 % denaturacijskim gradientom ter pričeli polniti nosilec za gel. Ko je bil nosilec zapolnjen z gelom, smo cevko za polnjenje odstranili in na vrh gela vstavili glavnik ter počakali 3 ure, da je gel polimeriziral. Po poteku polimerizacije gela smo glavnik odstranili in žepke sprali s pufrom TAE, s katerim smo prav tako napolnili elektroforezno posodo za DGGE.

Potek DGGE in obdelava gelov po DGGE:

Pred nanosom vzorcev smo oba gela za DGGE, velikosti 16 cm x 16 cm x 1 mm, segreti na 64 °C, nato pa nanju s pipeto prenesli pomnožke. Vzorci za analizo DGGE so bili sestavljeni iz 25 µl produkta PCR in nalagalnega pufru, ki je vseboval glicerol in barvila. Poleg vzorcev smo na začetek, sredino in konec gela nanесли tudi marker, ki je služil za primerjavo posameznih bakterijskih sevov. Marker smo sestavili iz pomnožkov bakterijskih sevov *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193, *Enterococcus faecalis* LMG 7937^T, *Bacillus cereus* IM 199, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bifidobacterium bifidum* LMG 11041 in *Bifidobacterium animalis* LMG 10508. Analiza DGGE je potekala 16,5 ur, pri konstantni napetosti 75 V in temperaturi 60 °C. Ko je bila elektroforeza končana, smo gela previdno odstranili iz sistema steklenih plošč, ju sprali v pufru TAE, nato pa obarvali v raztopini barvila SYBR® Safe DNA Gel Stain. Barvanje je trajalo 30 minut, zatem pa je sledilo spiranje v deionizirani vodi Mili Q. Po spiranju smo fragmente DNA v gelu opazovali s pomočjo UV-transiluminatorja ChemiGenius² Bio-Imaging Gel Doc System. Fotografiji gelov smo posneli s programom GeneSnap, nato pa podatke obdelali z

računalniškimi programi BioNumerics ter jih na osnovi Pearson-ovega koeficienta korelacije in neutežne metode parnih skupin z aritmetično sredino (angl. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean, UPGMA) ponazorili v dendrogramu kot relativno podobnost sevov.

3.3.3 Statistična obdelava podatkov

Podatke, ki smo jih dobili pri opravljenih kemijskih in mikrobioloških analizah, smo statistično analizirali in obdelali s pomočjo računalniškega programa Microsoft Office Excel. Izračunali smo aritmetično sredino, standardni odklon, prvi in tretji kvartil, mediano ter določili najmanjšo (minimum) in največjo vrednost (maksimum).

3.3.3.1 Aritmetična sredina (povprečje) in standardni odklon

Če seštejemo vse podatke in jih delimo s številom teh podatkov, dobimo aritmetično sredino ali povprečno vrednost (Seljak, 1998), s katero smo, poleg standardnega odklona, analizirali podatke, dobljene iz kemijskih analiz.

$$\bar{X} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_N}{N} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N} \quad \dots(9)$$

$\bar{X}$ aritmetična sredina

x številska spremenljivka

$\sum_{i=1}^N x_i$ vsota vrednosti za številsko spremenljivko x

N število enot v populaciji

Če varianco, ki predstavlja povprečni kvadratni odklon individualnih vrednosti od aritmetične sredine, korenimo s kvadratnim korenom, dobimo standardni odklon ali standardno deviacijo (Seljak, 1998).

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N x_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^N x_i)^2}{N}}{N}} \quad \dots(10)$$

s standardni odklon ali standardna deviacija

x številska spremenljivka

$\sum_{i=1}^N x_i$ vsota vrednosti za številsko spremenljivko x

$\sum_{i=1}^N x_i^2$ vsota kvadratov vrednosti za številsko spremenljivko x

N število enot v populaciji

3.3.3.2 Minimum, maksimum, kvartili in mediana

Za določanje položaja posamezne enote med ostalimi enotami v populaciji se v statistiki uporabljata parametra, imenovana rang (R) in kvantilni rang (P). Prvi določa mesto posamezne statistične enote v urejeni vrsti in pove, koliko enot ima manjše ali večje vrednosti od izbrane enote. Drugi pa določa relativno mesto posamezne statistične enote v populaciji in pove, kolikšen odstotek populacije ima manjšo ali večjo vrednost od izbrane enote (Seljak, 1998).

Kvantil je vrednost spremenljivke, ki ustreza določenemu kvantilnemu rangi. Med najbolj pogoste oblike kvantilov štejemo kvartile, ki populacijo razdelijo na štiri enake dele. Prvi kvartil (Q_1), ki pripada kvantilnemu rangi $P = 0,25$, je vrednost, od katere ima 25 % enot manjše ali enake vrednosti, 75 % enot pa večje vrednosti. Drugi kvartil (Q_2), imenovan tudi mediana (s kvantilnim rangom $P = 0,50$), je vrednost, od katere ima 50 % enot manjše ali enake vrednosti, 50 % enot pa večje vrednosti. Tretji kvartil (Q_3), ki ustreza kvantilnemu rangi $P = 0,75$, je vrednost, od katere ima 75 % enot manjše ali enake vrednosti, 25 % pa večje vrednosti (Seljak, 1998).

Mediana (M_e) ali srednja vrednost je kvantil, ki ustreza kvantilnemu rangi $P = 0,50$ in tista vrednost spremenljivke, ki razdeli populacijo, glede na število enot, na dva enaka dela (Seljak, 1998).

Minimum predstavlja najmanjšo, maksimum pa največjo vrednost med zajetimi vzorci sirov.

Kvantil s kvantilnim rangom P :

$$R = N \times P + 0,5 \quad \dots(11)$$

R	rang
P	kvantilni rang
N	število enot v populaciji
$0,5$	popravek za zveznost

Mediana:

$$M_e = y_{-1} + (y_0 - y_{-1}) \times (R_{0,50} - R_{-1}) \quad \dots(12)$$

M_e	mediana
y_{-1}	vrednost, ki ustreza rangi R_{-1}
y_0	vrednost, ki ustreza rangi R_0
$R_{0,50}$	rang, izračunan na osnovi kvantilnega ranga $P = 0,50$
R_{-1}	rang pred izračunanim rangom

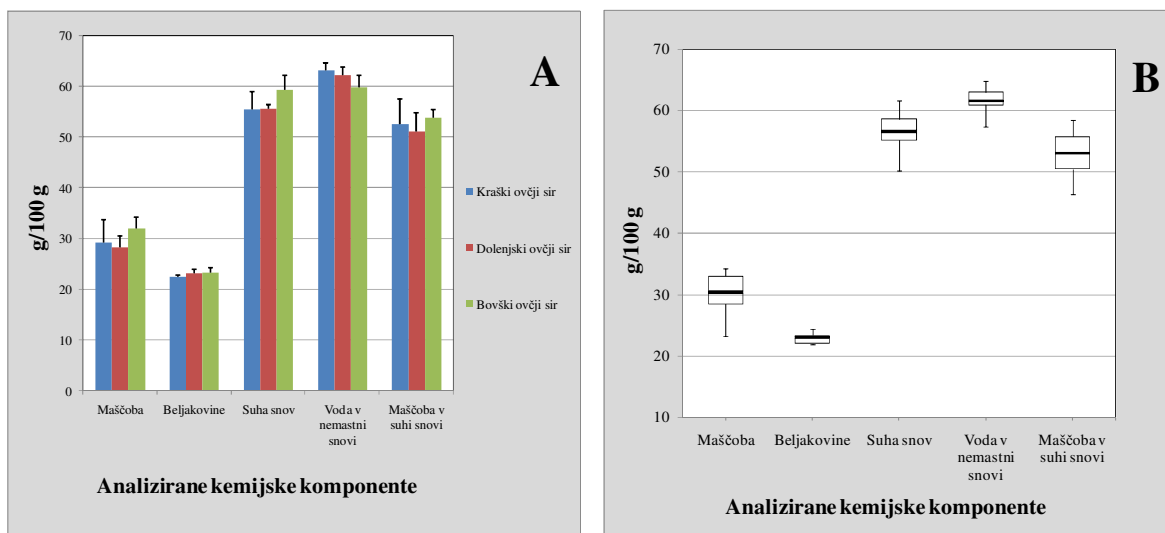
Omenjene statistične funkcije smo ponazorili s kvantilnim diagramom (box-plot diagramom), v katerem mediano predstavlja osrednja, odebeljena črta pravokotnika, prvi kvartil spodnja črta pravokotnika, tretji kvartil zgornja črta pravokotnika, minimalno vrednost označuje črta pod pravokotnikom, maksimalno vrednost pa črta nad pravokotnikom.

4 REZULTATI

4.1 KEMIJSKA SESTAVA OVČJIH SIROV

Kemijske analize vzorcev Kraškega, Dolenjskega in Bovškega ovčjega sira smo izvedli po 0, 30 in 60 dneh zorenja. Osnovni rezultati kemijskih analiz so predstavljeni v Prilogi A.

Na začetku zorenja se je povprečna vsebnost maščobe v sirih gibala med 28,33 in 31,92 %, povprečna vsebnost beljakovin med 22,41 in 23,24 %, povprečna vsebnost suhe snovi med 55,32 in 59,24 %, povprečna vsebnost vode v nemastni snovi med 59,80 in 63,09 % ter povprečna vsebnost maščobe v suhi snovi med 51,03 in 53,82 %. Največjo povprečno vsebnost maščobe, beljakovin in maščobe v suhi snovi je imel Bovški ovčji sir.



Slika 11: Kemijska sestava ovčjih sirov, po 0 dneh zorenja

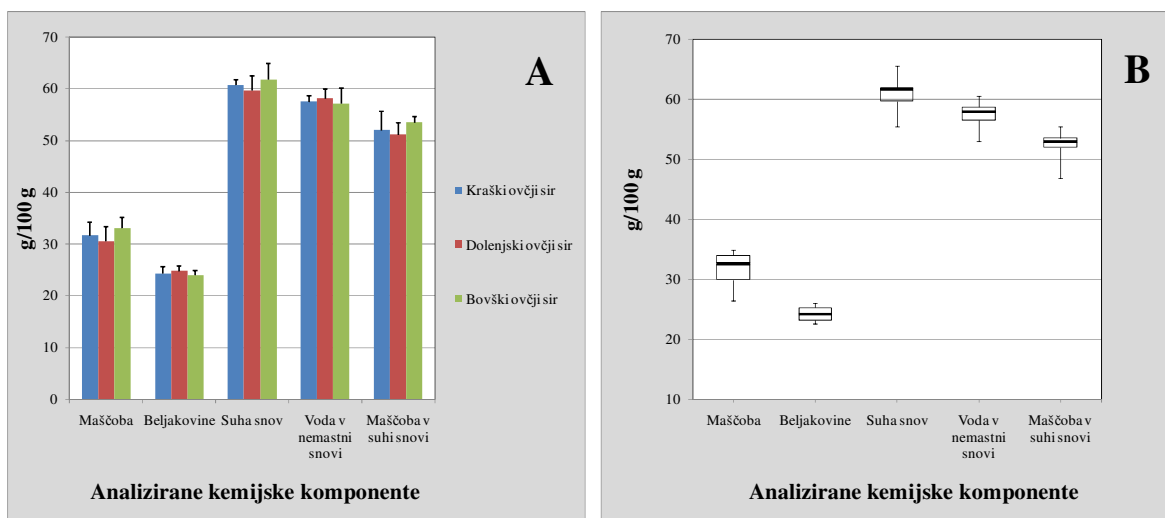
A: Povprečne vrednosti kemijskih komponent v ovčjih sirih glede na geografsko regijo, s standardnimi odkloni (n=3)

B: Variabilnost med ovčjimi siri glede na kemijsko sestavo (n=9)

Glede na povprečne vrednosti posameznih analiziranih kemijskih komponent so si bili Kraški (K), Dolenjski (D) in Bovški (B) ovčji siri med seboj podobni (Slika 11A). Iz Slike 11B, na kateri je prikazan box-plot diagram, je razvidno, da je bila najmanjša variabilnost med ovčjimi siri v vsebnosti beljakovin, največja pa v vsebnosti maščobe in maščobe v suhi snovi.

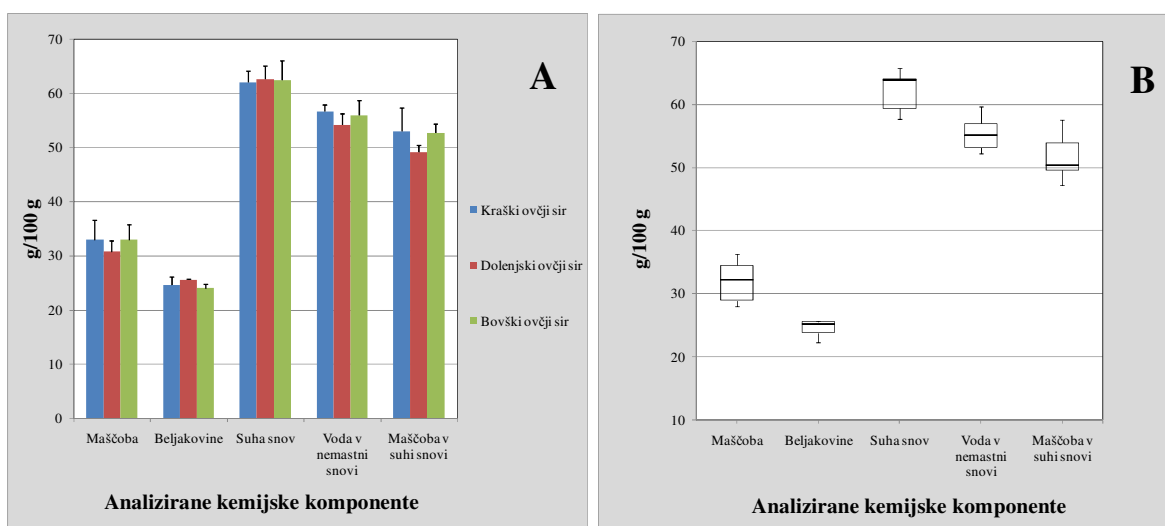
Po 30 dneh zorenja je povprečna vsebnost maščobe znašala od 30,50 do 33,00 %, povprečna vsebnost beljakovin od 23,92 do 24,75 %, povprečna vsebnost suhe snovi od 59,60 do 61,71 %, povprečna vsebnost vode v nemastni snovi od 57,07 do 58,06 % in povprečna vsebnost maščobe v suhi snovi od 51,06 do 53,45 %. Največjo vsebnost

maščobe, suhe snovi in maščobe v suhi snovi je imel Bovški ovčji sir, največjo vsebnost vode v nemastni snovi pa Dolenjski ovčji sir.



Slika 12: Kemijska sestava ovčjih sirov, po 30 dneh zorenja
A: Povprečne vrednosti kemijskih komponent v ovčjih siri glede na geografsko regijo, s standardnimi odkloni (n=3)
B: Variabilnost med ovčjimi siri glede na kemijsko sestavo (n=9)

Variabilnost v kemijski sestavi se je po 30 dneh zorenja med ovčjimi siri dokaj zmanjšala (Slika 12). Še vedno so si bili siri med seboj najbolj podobni v vsebnosti beljakovin, najbolj pa so se razlikovali v vsebnosti maščobe. Razlike v vsebnosti maščobe v suhi snovi med siri so bile po 30 dneh zorenja mnogo manjše kot pa na začetku zorenja.



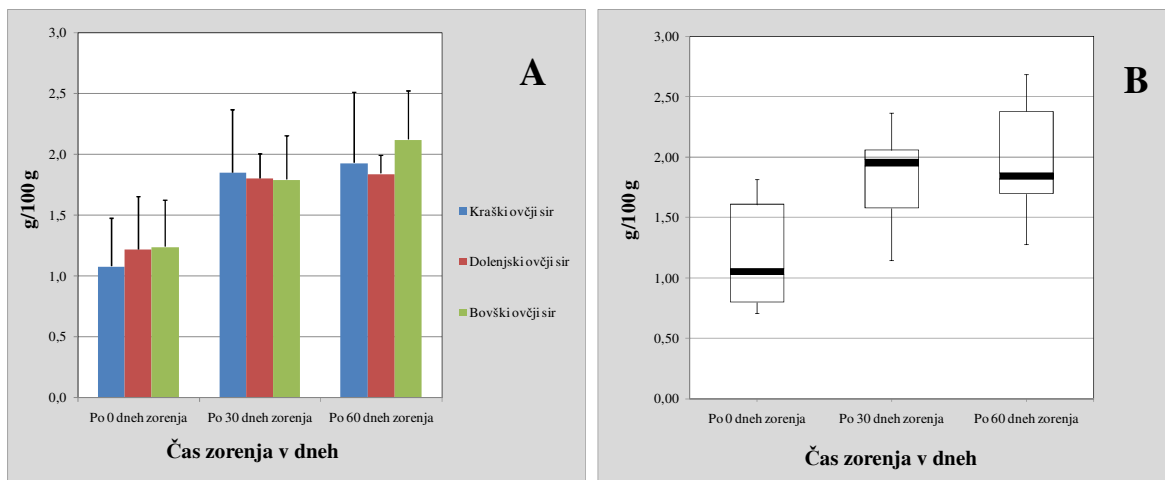
Slika 13: Kemijska sestava ovčjih sirov, po 60 dneh zorenja
A: Povprečne vrednosti kemijskih komponent v ovčjih siri glede na geografsko regijo, s standardnimi odkloni (n=3)
B: Variabilnost med ovčjimi siri glede na kemijsko sestavo (n=9)

Na koncu zorenja je povprečna vsebnost maščobe v ovčjih sirih znašala od 30,75 do 32,92 %, povprečna vsebnost beljakovin od 23,95 do 25,52 %, povprečna vsebnost suhe snovi od 62,06 do 62,49 %, povprečna vsebnost vode v nemastni snovi od 54,11 do 56,57 % in povprečna vsebnost maščobe v suhi snovi od 49,17 do 52,92 % (Slika 13, Priloga A).

Po 60 dneh zorenja se je variabilnost med ovčjimi siri zopet povečala in je bila večja kot po 30 dneh zorenja (Slika 13, Priloga A). Ovčji siri so bili najbolj izenačeni v vsebnosti beljakovin, najbolj pa so variirali v vsebnosti maščob. Večje razlike med njimi so se pokazale tudi pri vsebnosti vode v nemastni snovi in vsebnosti maščobe v suhi snovi, torej pri vrednostih, ki določajo tip sira.

Ob koncu zorenja so vsi siri vsebovali primerno vsebnost maščobe v suhi snovi za polnomastne sire (od 45 do 60 %), medtem ko so vzorci K₁, K₃, D₃ in B₃ vsebovali preveč vode v nemastni snovi (od 56,43 do 59,61 %) za trdi tip sira, ki se mora gibati med 49 in 56 %.

Povprečna vsebnost soli se je po 0 dneh zorenja gibala med 1,08 in 1,24 %, po 30 dneh zorenja med 1,79 in 1,85 % ter po 60 dneh zorenja med 1,84 in 2,12 %. Bovški ovčji sir je povprečno največ soli vseboval po 0 in 60 dneh zorenja, po 30 dneh zorenja pa je imel največjo povprečno vsebnost soli Kraški ovčji sir.



Slika 14: Vsebnost soli kot NaCl v ovčjih sirih, med zorenjem

A: Povprečna vsebnost soli v ovčjih sirih glede na geografsko regijo, s standardnimi odkloni (n=3)

B: Variabilnost med ovčjimi siri glede na vsebnost soli (n=9)

Iz grafa na Sliki 14A lahko vidimo, da so si ovčji siri med seboj zelo podobni v povprečni vsebnosti soli, po drugi strani pa se vzorci sirov znotraj iste vrste sira lahko v vsebnosti soli med seboj razlikujejo celo za več kot 1 % (Slika 14B, Priloga A). Očitno je namreč odstopanje pri Kraškem ovčjem siru, kjer je vzorec K₁ tekom zorenja vseboval občutno večji delež soli od preostalih dveh vzorcev, z oznakama K₂ in K₃.

Preglednica 6: Izračunani statistični parametri za posamezne vrste sira in za vse analizirane ovčje sire skupaj, po 0, 30 in 60 dneh zorenja

Čas zorenja	Vrsta sira	Statistični parameter	Maščoba (g/100 g)	Beljakovine (g/100 g)	Suha snov (g/100 g)	Voda v nemastni snovi (g/100 g)	Maščoba v suhi snovi (g/100 g)	NaCl (g/100 g)
Po 0 dneh zorenja	Kraški ovčji sir	Aritmetična sredina	29,25	22,41	55,32	63,09	52,56	1,08
		Standardni odklon	4,55	0,42	3,66	1,41	4,96	0,40
	Dolenjski ovčji sir	Aritmetična sredina	28,33	23,12	55,50	62,14	51,03	1,22
		Standardni odklon	2,25	0,79	0,83	1,55	3,65	0,43
	Bovški ovčji sir	Aritmetična sredina	31,92	23,24	59,24	59,80	53,82	1,24
		Standardni odklon	2,28	0,98	2,84	2,27	1,55	0,38
	Vsi ovčji siri	Aritmetična sredina	29,83	22,93	56,69	61,67	52,47	1,18
		Standardni odklon	3,55	0,85	3,26	2,26	3,84	0,41
		Max	34,25	24,43	61,58	64,87	58,45	1,82
		3. kvartil	33,00	23,32	58,60	62,97	55,75	1,61
		Mediana	30,25	22,93	56,45	61,42	52,92	1,03
		1. kvartil	28,50	22,07	55,24	60,91	50,49	0,80
		Min	23,25	21,90	50,21	57,34	46,31	0,71
Po 30 dneh zorenja	Kraški ovčji sir	Aritmetična sredina	31,58	24,25	60,69	57,49	51,99	1,85
		Standardni odklon	2,70	1,42	1,05	1,17	3,69	0,51
	Dolenjski ovčji sir	Aritmetična sredina	30,50	24,75	59,60	58,06	51,06	1,80
		Standardni odklon	2,83	1,03	2,94	1,83	2,31	0,20
	Bovški ovčji sir	Aritmetična sredina	33,00	23,92	61,71	57,07	53,45	1,79
		Standardni odklon	2,16	0,98	3,21	3,08	1,20	0,36
	Vsi ovčji siri	Aritmetična sredina	31,69	24,30	60,67	57,54	52,17	1,82
		Standardni odklon	2,77	1,21	2,73	2,21	2,79	0,38
		Max	35,00	26,06	65,55	60,63	55,51	2,37
		3. kvartil	34,00	25,30	61,88	58,75	53,57	2,06
		Mediana	32,50	24,09	61,55	57,76	52,80	1,93
		1. kvartil	30,00	23,27	59,72	56,58	52,00	1,58
		Min	26,50	22,59	55,44	53,00	46,89	1,15

Se nadaljuje.

Nadaljevanje Preglednice 6: Izračunani statistični parametri za posamezne vrste sira in za vse analizirane ovčje sire skupaj, po 0, 30 in 60 dneh zorenja

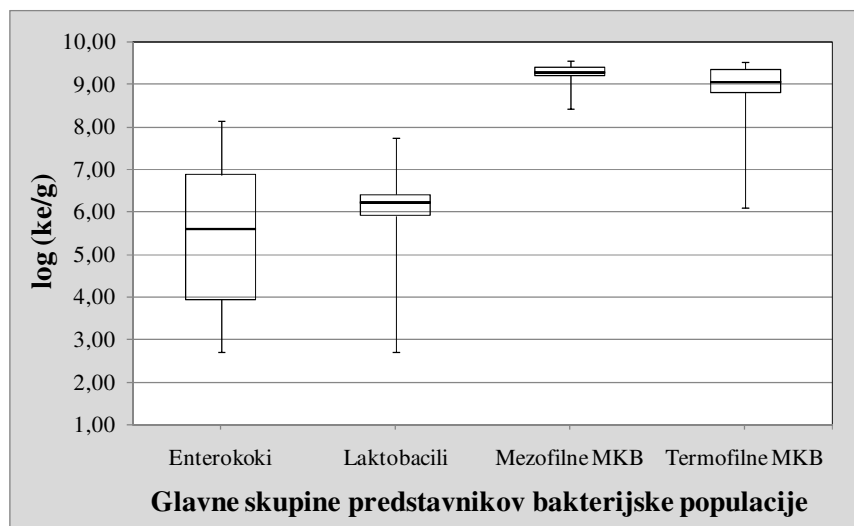
Čas zorenja	Vrsta sira	Statistični parameter	Maščoba (g/100 g)	Beljakovine (g/100 g)	Suha snov (g/100 g)	Voda v nemastni snovi (g/100 g)	Maščoba v suhi snovi (g/100 g)	NaCl (g/100 g)
Po 60 dneh zorenja	Kraški ovčji sir	Aritmetična sredina	32,92	24,53	62,06	56,57	52,92	1,93
		Standardni odklon	3,55	1,59	1,94	1,19	4,33	0,58
	Dolenjski ovčji sir	Aritmetična sredina	30,75	25,52	62,49	54,11	49,17	1,84
		Standardni odklon	1,95	0,14	2,47	2,03	1,25	0,15
	Bovški ovčji sir	Aritmetična sredina	32,92	23,95	62,46	55,84	52,61	2,12
		Standardni odklon	2,79	0,83	3,46	2,80	1,65	0,40
	Vsi ovčji siri	Aritmetična sredina	32,19	24,67	62,34	55,51	51,57	1,96
		Standardni odklon	3,02	1,22	2,70	2,35	3,25	0,43
		Max	36,25	25,74	65,74	59,61	57,58	2,69
		3. kvartil	34,50	25,58	63,99	56,94	53,93	2,38
		Mediana	32,25	25,33	63,85	55,19	50,40	1,82
		1. kvartil	29,00	23,88	59,37	53,15	49,64	1,70
		Min	28,00	22,29	57,68	52,25	47,16	1,28

Na podlagi Preglednice 6 in Priloge A opazimo, da so standardni odkloni za nekatere kemijske sestavine večji za vzorce različnih proizvajalcev istega tradicionalnega sira kot za vse avtohtone ovčje sire, vključene v raziskavo. Tako je standardni odklon za maščobo v suhi snovi za vse sire znašal 3,25 %, za Kraški ovčji sir pa 4,33 % (Preglednica 6). Poleg tega smo tako najvišjo (57,58 %) kot najnižjo vrednost maščobe v suhi snovi (47,16 %) določili pri Kraškem ovčjem siru (Priloga A). To kaže na veliko variabilnost v kemijski sestavi vzorcev sirov posameznih proizvajalcev istega ovčjega sira, med katerimi, poleg vzorcev Kraškega ovčjega sira, po nekaterih parametrih izstopajo tudi vzorci Dolenjskega ovčjega sira.

4.2 MIKROBIOLOŠKE ZNAČILNOSTI OVČJIH SIROV

4.2.1 Osnovna mikrobiološka slika dominantne bakterijske populacije v avtohtonih slovenskih ovčjih siri

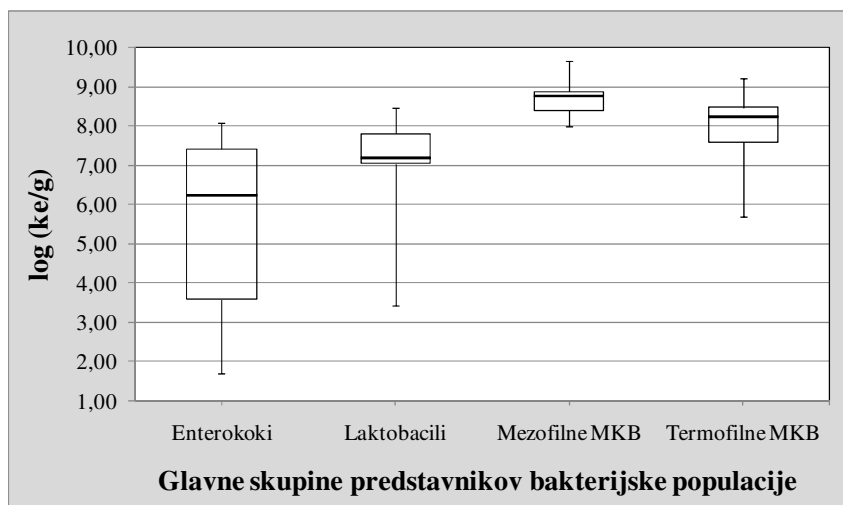
Po 0, 30 in 60 dneh zorenja smo določali velikost prevladujočih bakterijskih populacij v vzorcih avtohtonih slovenskih ovčjih sirov. S kvantitativno metodo štetja kolonij smo na gojišču KAA določali število enterokokov, na gojišču ROGOSA število laktobacilov ter na gojišču M17 število mezofilnih in termofilnih MKB. Osnovni rezultati, z izračunanimi medianami in kvartili, so predstavljeni v Prilogah B1 do B3, končni rezultati mikrobioloških analiz, po 0, 30 in 60 dneh zorenja, pa so prikazani na Slikah 15, 16, 17 in 18.



Slika 15: Zastopanost in variabilnost glavnih bakterijskih populacij v avtohtonih ovčjih siri, po 0 dneh zorenja (n=9)

Po 0 dneh zorenja je bilo v vseh ovčjih siri največje število mezofilnih MKB ($M_e = 1,86 \times 10^9$ ke/g), sledile so jim termofilne MKB ($M_e = 1,12 \times 10^9$ ke/g), tem pa populaciji laktobacilov ($M_e = 1,71 \times 10^6$ ke/g) in enterokokov ($M_e = 4,09 \times 10^5$ ke/g). Iz Slike 19 je razvidno, da so bile razlike v velikosti mikrobnih populacij najmanjše pri mezofilnih MKB, največje pa pri enterokokih. Pri laktobacilih in termofilnih MKB je bila večina vzorcev ovčjih sirov zbrana v bližini mediane, saj sta pri vsaki mikrobnii skupini ekstremno odstopala le dva vzorca, oba pa sta pripadala Dolenjskemu ovčjemu siru. Vzorec D₂ je vseboval najnižje število laktobacilov in najvišje število termofilnih MKB, vzorec D₁ pa najvišje število laktobacilov in najnižje število termofilnih MKB (Priloga B1).

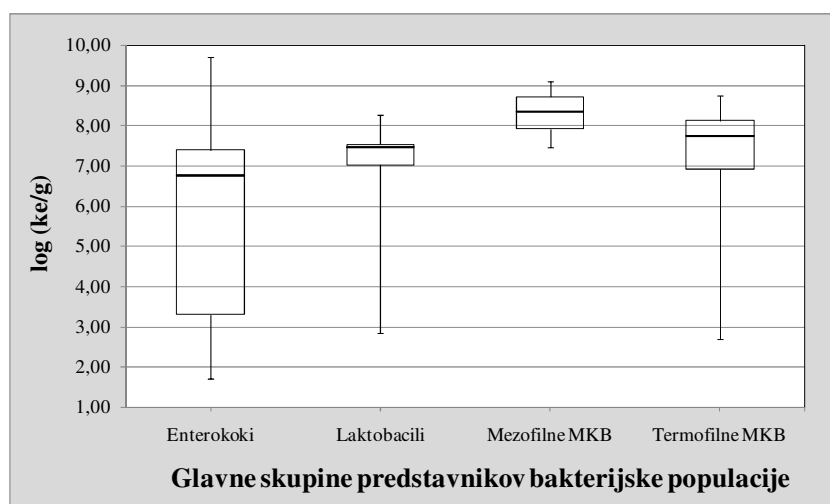
Po 0 dneh zorenja je bilo v vzorcih K₃ in D₁ število enterokokov pod mejo analitske detekcije, v vzorcu D₂ pa število laktobacilov (glej Prilogo B1).



Slika 16: Zastopanost in variabilnost glavnih bakterijskih populacij v avtohtonih ovčjih sirih, po 30 dneh zorenja (n=9)

Po 30 dneh zorenja se je pričelo število enterokokov ($M_e = 1,73 \times 10^6$ ke/g) in laktobacilov ($M_e = 1,51 \times 10^7$ ke/g) povečevati, število mezofilnih MKB ($M_e = 5,76 \times 10^8$ ke/g) in termofilnih MKB ($M_e = 1,77 \times 10^8$ ke/g) pa upadati. Siri so se najmanj razlikovali v številu mezofilnih MKB, najbolj pa v številu enterokokov (Slika 16). Pri laktobacilih in termofilnih MKB je bila zopet večina vzorcev zbrana okoli mediane, z izjemo dveh oz. treh vzorcev.

Po 30 dneh zorenja je bilo v vzorcih K_3 in D_1 število enterokokov pod mejo analitske detekcije, v vzorcih D_1 in D_2 pa število termofilnih MKB (glej Prilogo B2).

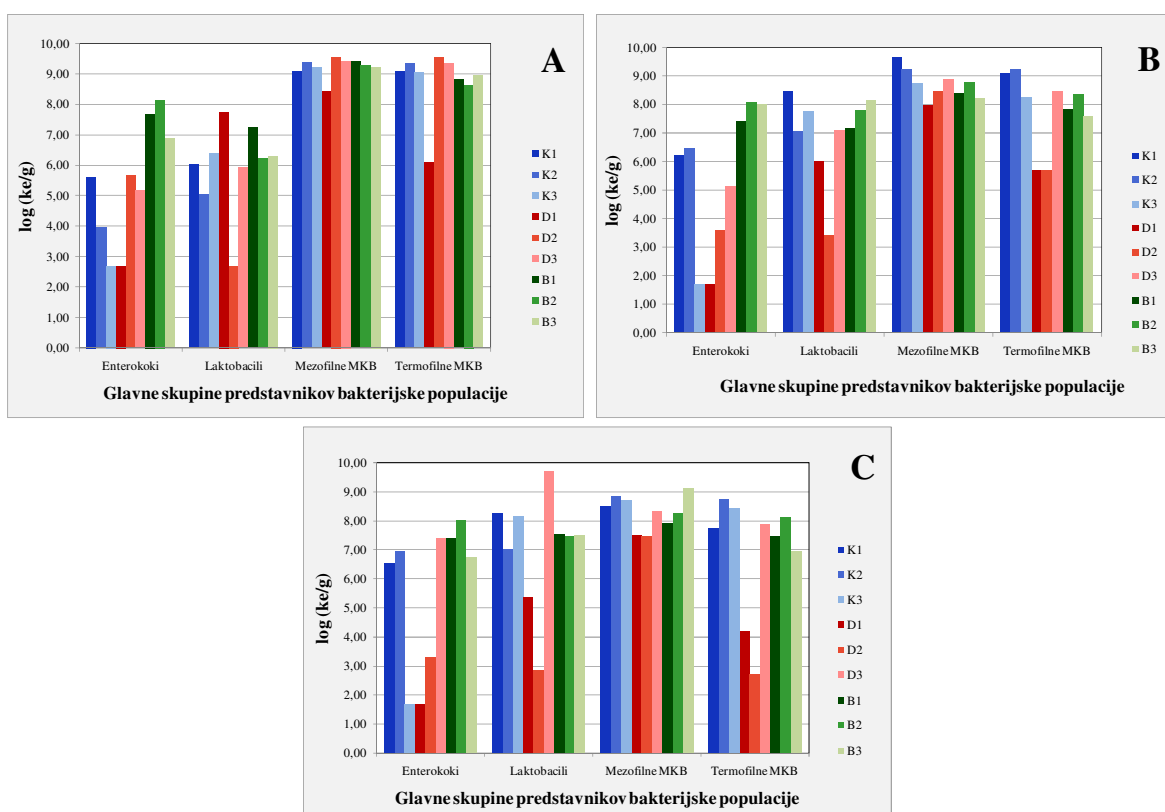


Slika 17: Zastopanost in variabilnost glavnih bakterijskih populacij v avtohtonih ovčjih sirih, po 60 dneh zorenja (n=9)

Do 60 dni zorenja je število enterokokov ($M_e = 5,73 \times 10^6$ ke/g) in laktobacilov ($M_e = 2,86 \times 10^7$ ke/g) še vedno naraščalo, število mezofilnih MKB ($M_e = 2,23 \times 10^8$ ke/g) in

termofilnih MKB ($M_e = 5,55 \times 10^7$ ke/g) pa upadalo. Na Sliki 17 lahko vidimo, da so se vzorci sirov zopet najmanj razlikovali v številu mezofilnih MKB, najbolj pa v številu enterokokov. Pri laktobacilih in termofilnih MKB je bila še vedno večina vzorcev ovčjih sirov zbrana v bližini mediane, saj sta pri vsaki mikrobni skupini ekstremno odstopala le dva vzorca.

Po 60 dneh zorenja je bilo v vzorcih K_3 in D_1 število enterokokov pod mejo analitske detekcije, v vzorcu D_2 pa število termofilnih MKB (glej Prilogo B3).



Slika 18: Število predstavnikov glavnih skupin bakterijske populacije v posameznih vzorcih ovčjih sirov, tekom zorenja

A: Število predstavnikov glavnih skupin bakterijske populacije v posameznih vzorcih ovčjih sirov, po 0 dneh zorenja

B: Število predstavnikov glavnih skupin bakterijske populacije v posameznih vzorcih ovčjih sirov, po 30 dneh zorenja

C: Število predstavnikov glavnih skupin bakterijske populacije v posameznih vzorcih ovčjih sirov, po 60 dneh zorenja

Iz Slike 18 je razvidno, da je tekom zorenja poleg variabilnosti v številu prevladujoče bakterijske mikroflore med Kraškim, Dolenjskim in Bovškim ovčjim sirom obstajala tudi variabilnost v številu mikroorganizmov med vzorci iste vrste sira. V številu enterokokov in laktobacilov so med zorenjem najbolj variirali vzorci Kraškega in Dolenjskega ovčjega sira, v številu termofilnih MKB pa vzorci Dolenjskega ovčjega sira. Med vzorci Bovškega ovčjega sira je bila tekom zorenja variabilnost v številu prevladujoče bakterijske mikroflore najmanjša.

4.2.2 Analiza produktov PCR z metodo DGGE

Analizirali smo bakterijsko DNA devetih vzorcev ovčjih sirov (po 60 dneh zorenja), ki smo jo izolirali iz 33 konzorcijev bakterijskih populacij, dobljenih po nacepiti sirov na trdna gojišča KAA, ROGOSA, M17 30 °C in M17 42 °C. Treh konzorcijev nismo uspeli pripraviti, saj na gojiščih ni bilo rasti. To se je zgodilo pri vzorcu D₁ na gojiščih KAA in M17 42 °C ter pri vzorcu K₃ na gojišču KAA. Iz slednjih treh konzorcijev ovčjih sirov za to tudi nismo mogli izolirati DNA in jo analizirati z metodo DGGE. Izolirano DNA preostalih 33 konzorcijev smo pomnožili z univerzalnima začetnima oligonukleotidoma HDA 1-GC in HDA2 ter nato pomnožke ločevali s kvalitativno metodo DGGE. Gelu DGGE smo na začetku, na sredini in na koncu dodali označevalec (marker), sestavljen iz pomnožkov bakterijskih sevov *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193, *Enterococcus faecalis* LMG 7937^T, *Bacillus cereus* IM 199, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bifidobacterium bifidum* LMG 11041 in *Bifidobacterium animalis* LMG 10508. Slike gelov s profili DGGE sta prikazani v Prilogah C1 in C2.

Z računalniškim programom BioNumerics smo na osnovi Pearson-ovega koeficienta korelacije in neutrežne metode parnih skupin z aritmetično sredino (angl. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean, UPGMA) izdelali dendrogramom (Slika 19), s katerim smo primerjali mikrobno združbo avtohtonih ovčjih sirov, po 60 dneh zorenja. Profile DGGE smo na osnovi 40 % relativne podobnosti sevov razvrstili v 5 skupin.

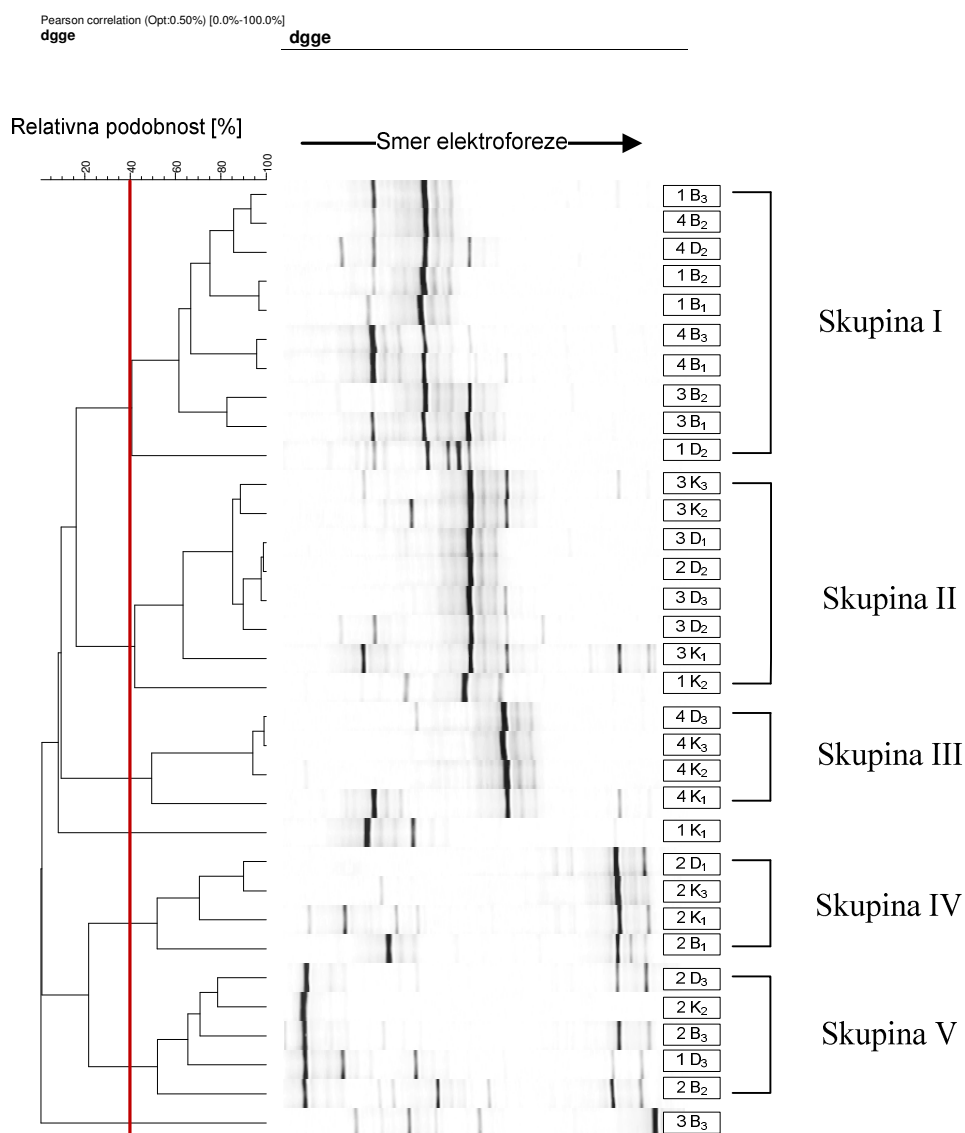
V Skupini I so se nahajali vzorci Bovškega ovčjega sira z oznakami B₁, B₂ in B₃ ter vzorec Dolenjskega ovčjega sira z oznako D₂, ki jim je bil skupen položaj proge, značilen za referenčno bakterijsko vrsto *Enterococcus faecalis* LMG 7937^T. Vse omenjene vzorce smo nacepili tako na trdno gojišče KAA, selektivno za enterokoke, kot na trdno gojišče M17 42 °C, tipično za termofilne MK koke. Vzorca B₁ in B₂ pa smo, poleg gojišč KAA in M17 42 °C, nacepili tudi na trdno gojišče M17 30 °C, tipično za mezofilne MK koke. V Skupini I smo pri vzorcih Bovškega ovčjega sira z oznakami B₁ (nacepljen na gojišči M17 30 °C in M17 42 °C), B₂ in B₃ (nacepljena na gojiščih KAA in M17 42 °C) ter pri vzorcu Dolenjskega ovčjega sira z oznako D₂ (nacepljen na gojiščih KAA in M17 42 °C) zasledili progo produkta PCR, ki se je ujemala s položajem proge vzorca D₂ (nacepljen na gojišče M17 30 °C) iz Skupine II in vzorca K₁ (nacepljen na gojišče M17 42 °C) iz Skupine III. Omenjena proga v markerju ni bila prisotna.

V Skupini II so se nahajali vzorci Kraškega ovčjega sira z oznakami K₁, K₂ in K₃ ter vzorci Dolenjskega ovčjega sira z oznakami D₁, D₂ in D₃, ki jim je bila vsem skupna določena proga produkta PCR, ki v markerju ni bila prisotna. To progo smo zasledili tudi pri profilih DGGE iz Skupine I, ki so pripadali vzorcu Dolenjskega ovčjega sira z oznako D₂ (nacepljen na gojiščih KAA in M17 42 °C) in vzorcem Bovškega ovčjega sira z oznakami B₁, B₂ (nacepljena na gojišče M17 30 °C) in B₃ (nacepljen na gojišče M17 42 °C). Vse vzorce ovčjih sirov iz Skupine II smo nacepili na trdno gojišče M17 30 °C, tipično za mezofilne MK koke, le vzorca K₂ in D₂ smo, poleg gojišča M17 30 °C, nacepili tudi na druga gojišča, in sicer vzorec K₂ na trdno gojišče KAA ter vzorec D₂ na trdno gojišče ROGOSA.

Skupino III so sestavljali vzorci Kraškega ovčjega sira z oznakami K₁, K₂ in K₃ ter vzorec Dolenjskega ovčjega sira z oznako D₃, ki smo jih nacepili na trdno gojišče M17 42 °C, tipično za termofilne MK koke. Omenjeni vzorci so imeli, poleg vzorcev Kraškega in Dolenjskega ovčjega sira z oznakami K₁, K₂, K₃, D₂, D₃ (nacepljeni na gojišče M17 30 °C) in K₂ (nacepljen na gojišče KAA), ki so se nahajali v Skupini II, ter vzorca Bovškega ovčjega sira z oznako B₁ (nacepljen na gojišče M17 42 °C) iz Skupine I, prisotno progo produkta PCR, ki se je nahajala na višini referenčnega seva *Bacillus cereus* IM 199.

V Skupini IV so se nahajali vzorca Kraškega ovčjega sira z oznakama K₁ in K₃, vzorec Dolenjskega ovčjega sira z oznako D₁ ter vzorec Bovškega ovčjega sira z oznako B₁, ki smo jih nacepili na trdno gojišče ROGOSA, selektivno za laktobacile. Našteti vzorci so, poleg vzorcev Kraškega ovčjega sira z oznakami K₁, K₃ (nacepljena na gojišče M17 30 °C) iz Skupine II in K₁ (nacepljen na gojišče M17 42 °C) iz Skupine III ter vzorcev Bovškega in Dolenjskega ovčjega sira z oznakami B₂, B₃ (nacepljena na gojišče ROGOSA) in D₃ (nacepljen na gojiščih ROGOSA in KAA) iz Skupine V, vsebovali progo na gelu DGGE, ki se je nahajala na višini, značilni za referenčni sev *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Skupino V so sestavljali vzorec Kraškega ovčjega sira z oznako K₂, vzorec Dolenjskega ovčjega sira z oznako D₃ in vzorca Bovškega ovčjega sira z oznakama B₂ in B₃, ki smo jih nacepili na trdno gojišče ROGOSA, selektivno za laktobacile. Vzorec D₃ smo, poleg gojišča ROGOSA, nacepili tudi na gojišče KAA, selektivno za enterokoke. Vsem omenjenim vzorcem in vzorcu Kraškega ovčjega sira z oznako K₁ (nacepljen na gojišče ROGOSA) iz Skupine IV je bila skupna proga produkta PCR, značilna za referenčni sev *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193.



Slika 19: Dendrogramski prikaz profilov DGGE konzorcijev bakterijskih populacij. Dendrogram je izrisan na osnovi Pearson-ovega koeficienta korelacije in neutežne metode parnih skupin z aritmetično sredino (UPGMA).

Legenda:

- K₁, K₂, K₃ – vzorci Kraškega ovčjega sira;
- D₁, D₂, D₃ – vzorci Dolenjskega ovčjega sira;
- B₁, B₂, B₃ – vzorci Bovškega ovčjega sira;
- 1 – trdno gojišče KAA;
- 2 – trdno gojišče ROGOSA;
- 3 – trdno gojišče M17, inkubirano pri 30 °C;
- 4 – trdno gojišče M17, inkubirano pri 42 °C.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V diplomskem delu smo raziskali kemijske in mikrobiološke lastnosti Kraškega, Dolenjskega in Bovškega ovčjega sira. Na izbranih vzorcih smo po 0, 30 in 60 dneh zorenja opravili kemijske in mikrobiološke analize. Kemijske analize so vključevale določanje vsebnosti maščobe, beljakovin, suhe snovi in soli, s čimer smo lahko opredelili tip sira. Mikrobiološke analize pa so vključevale določanje koncentracije glavnih skupin mlečnokislinskih bakterij in opis prevladujočih mikrobnih združb ovčjih sirov s pomočjo molekularne metode PCR-DGGE. Na osnovi rezultatov danih analiz smo iskali podobnosti/razlike v mikrobiološki sestavi ovčjih sirov, ki bi bile lahko povezane z različnimi geografskimi področji znotraj Slovenije.

5.1.1 Kemijska sestava avtohtonih slovenskih ovčjih sirov

Kraški, Dolenjski in Bovški ovčji sir so trdi polnomastni avtohtoni slovenski ovčji siri (Renčelj in Perko, 2008; Rogelj, 2012; Objava vloge na podlagi člena 6(2) Uredbe Sveta (ES) št. 510/2006 o zaščiti geografskih označb in označb porekla za kmetijske proizvode in živila »Bovški sir«, 2011).

Tip sira določa vsebnost vode v nemastni snovi sira, kar pomeni, da lahko trdi siri vsebujejo od 49 do 56 % vode v nemastni snovi (CODEX STAN 283-1978). Od teh zahtev so odstopali 4 vzorci z oznakami K₁, K₃, D₃ in B₃, ki so vsebovali več vode v nemastni snovi (od 56,43 do 59,61 %) od predpisanih vrednosti za trdi tip sira, kar bi lahko pripisali slabi kontroli tehnološkega postopka. Na preveliko vsebnost vode v nemastni snovi sira lahko vplivajo (Slanovec, 1982) bodisi višja vsebnost maščobe (kar velja za vzorec K₃), višja temperatura termizacije mleka, homogenizacija mleka, preveliko sirno zrno, prenizka temperatura sušenja sirnega zrna ali v manjši meri prekratek čas stiskanja, premajhna obtežitev sira in nepravilen potek fermentacije.

Polnomastni siri vsebujejo 45 do 60 % maščobe v suhi snovi sira (CODEX STAN 283-1978). Predpisanim vrednostim so ustrezali vsi ovčji siri.

Po specifikacijah mora Kraški ovčji sir vsebovati od 28 do 36 % maščobe, Dolenjski ovčji sir od 25 do 35 % maščobe in Bovški ovčji sir od 35 do 45 % maščobe (Rogelj, 2012). V naši raziskavi je Kraški ovčji sir ob konzumni zrelosti vseboval od 28,00 do 36,25 % maščobe, Dolenjski ovčji sir od 28,00 do 32,25 % maščobe in Bovški ovčji sir od 29,00 do 35,25 % maščobe. Pri Kraškem ovčjem siru je izstopal vzorec K₃, ki je vseboval malenkost več maščobe (36,25 %) od predpisane vrednosti, pri Bovškem ovčjem siru pa sta izstopala vzorca B₁ in B₃, ki sta vsebovala manj maščobe (34,50 %; 29,00 %) od predpisane vrednosti. Kljub temu da sta vzorca Bovškega ovčjega sira vsebovala manj maščobe od

predpisane, pa je Bovški ovčji sir v povprečju vseboval več maščobe od Kraškega in Dolenjskega ovčjega sira. Vsebnost maščobe v siru je delno pogojena s tehnološkim postopkom (tipizacija mleka oz. uravnavanje količine maščobe mleka s posnemanjem), kar pa za obravnavane sire ne velja, saj so izdelani iz surovega mleka, brez predhodne obdelave. Pri teh sirih je vsebnost maščobe v siru bolj povezana z vsebnostjo maščobe v mleku, na katero najbolj vplivata pasma ovc (Sakul in Boylan, 1992) in/ali obdobje laktacije (Tsiplakou in sod., 2006), manj pa prehrana. Slednja bolj vpliva na maščobnokislinsko sestavo maščobe kot pa na samo količino maščobe v mleku in s tem posledično v siru (Tsiplakou in sod., 2008; Cabiddu in sod., 2006).

Predpisana vsebnost suhe snovi se v Kraškem in Dolenjskem ovčjem siru giblje med 60 in 65 %, v Bovškem pa med 60 in 70 % (Rogelj, 2012). Od predpisanih vrednosti so odstopali vzorec Kraškega ovčjega sira K₁, ki je vseboval 59,37 % suhe snovi, vzorec Dolenjskega ovčjega sira D₃, ki je vseboval 59,00 % suhe snovi in vzorec Bovškega ovčjega sira B₃, ki je vseboval 57,68 % suhe snovi. Kljub relativno majhnim odstopanjem od predpisanih vrednosti pa so rezultati pokazali, da so tehnološki postopki pri posameznih proizvajalcih še vedno premalo kontrolirani in ustaljeni.

Ob konzumni zrelosti morata po pravilniku Dolenjski in Bovški ovčji sir vsebovati od 1,5 do 2,5 % soli (Rogelj, 2012; Bovški sir, 2005), Kraški ovčji sir pa od 1,5 do 3 % soli (Rogelj, 2012; Kraški ovčji sir, 2005). Od predpisanih zahtev za Kraški ovčji sir je odstopal vzorec K₂, ki je vseboval le 1,28 % soli. To zopet kaže na slabo kontrolo tehnološkega postopka. Glede na sodobne trende v prehrani bi bila nekoliko nižja vsebnost soli celo zaželena, vendar bi bilo le-to potrebno tudi zapisati v specifikacijo.

Vzorcem Bovškega ovčjega sira, ki so povprečno vsebovali največ soli (2,12 %), se je vsebnost vode v nemastni snovi tekom zorenja najpočasneje zmanjševala, vzorcem Dolenjskega ovčjega sira, ki so povprečno vsebovali najmanj soli (1,84 %), pa se je vsebnost vode v nemastni snovi tekom zorenja najhitreje zniževala. Zato predvidevamo, da sta na počasnejšo izgubo vode med zorenjem in s tem posledično počasnejše zmanjševanje vsebnosti vode v nemastni snovi lahko vplivali tako večja stopnja vlage v zoričnici kot večja količina soli v siru.

Večja vsebnost soli v Bovškem ovčjem siru, glede na ostala dva sira, je posledica daljšega časa soljenja. Le-to pri omenjenem siru traja po suhem postopku soljenja z grobo morskjo soljo 5-6 dni, po mokrem postopku v 20 % slanici pri temperaturi 14-16 °C pa 34-47 ur. Tako pri Dolenjskem kot pri Kraškem ovčjem siru sta suhi in mokri postopek soljenja krajša. Pri Dolenjskem ovčjem siru poteka suho soljenje 2 dni, mokro soljenje v 22 % slanici pri temperaturi 15 °C pa 24 ur. Pri Kraškem ovčjem siru pa solijo sir 3-6 dni po suhem postopku soljenja ali 24 ur v 20 % slanici pri temperaturi 15-18 °C (Rogelj, 2012).

Poleg časa soljenja vplivajo na absorpcijo soli iz slanice v sir tudi koncentracija slanice, gradient koncentracije soli, temperatura soljenja, geometrija sira, začetna vsebnost vode v siru in ter pH vrednost siru in slanice (Guinee, 2004). Od naštetih dejavnikov bi lahko nekoliko nižja temperatura soljenja (15 °C) in nekoliko nižja povprečna vsebnost vode v nemastni snovi vplivali na to, da smo pri Dolenjskem ovčjem siru v povprečju izmerili najnižjo vsebnost soli med vsemi tremi avtohtonimi ovčjimi siri.

Iz Slik 11A, 12A, 13A in 14A, ki prikazujejo grafe s povprečnimi vrednostmi in standardnimi odkloni, je razvidno, da so bili avtohtoni ovčji siri po osnovni kemijski sestavi dokaj podobni. Po drugi strani pa lahko iz Slik 11B, 12B, 13B in 14B, ki prikazujejo box-plot diagrame, vidimo, da je bila sestava posameznih sirov precej variabilna. Razlike v sestavi so bile med zorenjem najmanjše v vsebnosti beljakovin, večje pa pri ostalih merjenih parametrih. Po 30 dneh zorenja je bila razpršenost od mediane najmanjša, nato pa se je po 60 dneh zorenja ponovno povečala. Predvidevamo, da je bila variabilnost v kemijski sestavi na začetku zorenja posledica razlik v sestavi mleka (predvsem vsebnost maščobe) in tehnoloških postopkih (velikost sirnega zrna, temperatura dogrevanja), po 60 dneh zorenja pa so prišli do izraza specifični pogoji zorenja v zorilnicah (temperatura in vlaga v zorilnici).

Na osnovi Preglednice 6, ki prikazuje povprečne vrednosti kemijskih komponent s standardnimi odkloni tako za posamezne ovčje sire kot za vse avtohtone ovčje sire skupaj, opazimo veliko variabilnost med vzorci različnih proizvajalcev znotraj Kraškega in znotraj Dolenjskega ovčjega sira, kar bi lahko pripisali razlikam v sestavi mleka ali premalo usklajenim tehnološkim postopkom s postopki v specifikaciji. V nasprotju z omenjenima dvema siroma izstopa Bovški ovčji sir, ki je imel najmanjšo variabilnost med vzorci različnih proizvajalcev, prav tako pa se mu je tekom zorenja najbolje ohranil ponavljajoči se trend koncentracije maščobe, suhe snovi in maščobe v suhi snovi, kar je razvidno iz Preglednice 6 in Priloge A. Vse to nakazuje, da so bili pogoji zorenja vzorcev Bovškega ovčjega sira podobni, kar lahko pripišemo dobri usklajenosti tehnoloških postopkov med proizvajalci, ustreznosti kontroli proizvodne prakse in navsezadnje tudi dolgi tradiciji proizvodnje Bovškega ovčjega sira.

5.1.2 Mikrobiološka sestava avtohtonih slovenskih ovčjih sirov

Geografska regija s svojim podnebjem in rastjem vpliva na mikrobno populacijo posameznega avtohtonega ovčjega sira. To sta potrdila raziskovalca Tavarina in Malcata (2000), ki sta pri proučevanju mikrobiologije ovčjega sira Serra da Estrela prišla do ugotovitev, da na število enterokokov, laktobacilov in laktokokov ne vpliva leto proizvodnje, temveč geografska lokacija. Število enterokokov, laktobacilov in laktokokov v sirih posamezne sirarne je bilo namreč v različnih letih proizvodnje podobno, razlikovalo pa se je med siri sirarn iz različnih geografskih področij. Do podobnih izsledkov smo prišli tudi v naši diplomski nalogi, le da nismo delali primerjav med posameznimi leti proizvodnje. Mikrobiološke analize so pokazale razlike v številu predstavnikov prevladujočih bakterijskih populacij med ovčjimi siri iz različnih geografskih regij (Slike 15, 16 in 17). Te so bile najmanjše v številu mezofilnih mlečnokislinskih bakterij, največje pa v številu enterokokov, medtem ko smo pri laktobacilih in termofilnih mlečnokislinskih bakterijah (MKB) pri ovčjih sirih zasledili le dva do tri vzorce, ki so ekstremno odstopali, ostali vzorci pa so bili zbrani v bližini mediane.

Razlike v številu predstavnikov prevladujočih bakterijskih skupin se niso pokazale le med avtohtonimi ovčjimi siri, ampak tudi med vzorci iste vrste sira (Slika 18). V številu enterokokov in laktobacilov so se namreč med seboj najbolj razlikovali vzorci Kraškega in

Dolenjskega ovčjega sira, v številu termofilnih MKB pa vzorci Dolenjskega ovčjega sira. Izjema je bil le Bovški ovčji sir, pri katerem nismo zasledili velikih odstopanj med vzorci v številu glavnih skupin mlečnokislinskih bakterij. Za to je bila verjetno odgovorna enaka proizvodna praksa, podobna (bodisi boljša bodisi slabša) higienska praksa in/ali podobna mikrobiološka sestava ovčjega mleka.

V vseh avtohtonih slovenskih ovčjih sirih smo določili največje število mezofilnih MKB, sledile pa so populacije termofilnih MKB, laktobacilov in enterokokov. Ker spadajo vsi trije proučevani siri med trdi tip sira, bi pričakovali, da bodo prevladovale termofilne MKB, vendar je kar nekaj dejavnikov, ki prispevajo k dobljenim rezultatom.

Temperature dogrevanja sirnega zrna za trde sire se gibljejo od 50 do 55 °C (Slanovec, 1982). To so temperature, ki so selektivne za rast tipičnih termofilnih MKB, katerih optimalno območje rasti se nahaja med 40 in 50 °C, nekoliko slabše pa lahko rastejo tudi pri temperaturah od 35 do 40 °C in pri temperaturah med 60 in 70 °C (Smole Možina in Bem, 2003; Mavrin in Oštir, 2002). Pri avtohtonih slovenskih ovčjih sirih so temperature dogrevanja sirnega zrna nekoliko nižje. Sirno zrno za Bovški ovčji sir se dogreva na 44 do 49 °C, sirno zrno za Dolenjski ovčji sir na 42 do 45 °C in sirno zrno za Kraški ovčji sir le na 38 do 42 °C (Rogelj, 2012). Te temperature še ustrezajo tudi nekaterim mezofilnim MKB, ki imajo sicer optimalno območje rasti od 37 do 40 °C, vendar lahko rastejo tudi pri temperaturah od 45 do 49 °C (Smole Možina in Bem, 2003). Iz tega sklepamo, da so na prevladujoče število mezofilnih MKB v analiziranih ovčjih sirih verjetno vplivale nižje temperature dogrevanja sirnega zrna, ki so omogočile boljšo rast mezofilnim kot termofilnim MKB.

Poleg temperature dogrevanja in sušenja sirnega zrna je lahko na rezultat določanja števila mezofilnih in termofilnih MKB vplivala sama mikrobiološka metoda, ki smo jo uporabili. Skupno število mezofilnih in termofilnih MKB smo določali na ploščah s trdnim gojiščem M17, ki smo jih inkubirali pri temperaturah 30 °C in 42 °C. Gojišče M17 je sicer tipično gojišče za izolacijo in kvantifikacijo MK kokov, kamor spadajo rodovi *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* ter *Streptococcus*, vendar pa omogoča rast tudi predstavnikom drugih rodov MKB, kot sta *Enterococcus* (Caridi in sod., 2003) in *Lactobacillus* (Mannu in sod., 2000). Enterokoki in nekateri laktobacili lahko rastejo tako pri temperaturah 30 °C kot 42 °C. Zato domnevamo, da so lahko k večjemu številu mezofilnih MKB v ovčjih sirih prispevali tako enterokoki kot nekateri predstavniki laktobacilov, ki so izrasli tudi na ploščah, inkubiranih pri 30 °C. Vsekakor bi morali za potrditev te domneve opraviti dodatne potrditvene analize, na primer identifikacijo vrst v izraslih kolonijah s PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (Walter in sod., 2001).

Manjše število termofilnih MKB v vzorcih avtohtonih ovčjih sirov je lahko tudi posledica odstotnosti selekcionirane termofilne starterske kulture. V vzorcu D₂ se je namreč število termofilnih MKB nahajalo pod mejo detekcije tako po 30 kot po 60 dneh zorenja, prav tako pa je bilo, po 0 dneh zorenja, pod mejo detekcije tudi število laktobacilov. Število slednjih je sicer po 30 dneh zorenja naraslo in doseglo vrednost $2,68 \times 10^3$ ke/g, nato pa po 60 dneh zorenja padlo na vrednost $6,82 \times 10^2$ ke/g. Ker lahko število laktobacilov, ki so vključeni v startersko kulturo, med proizvodnjo sira doseže koncentracijo 10^9 ke/g sira in med zorenjem lahko tudi hitro upade na vrednosti pod 10^7 ke/g sira (Wouters in sod., 2002), predvidevamo, da je fermentacija v vzorcu D₂ potekala le pod vplivom naravne

mikroflоре zorjenega ovčjega mleka, saj nestarterski laktobacili, ki izvirajo iz mleka in okolja, kasneje narastejo, vendar lahko dosežejo večje vrednosti v zrelem siru kot laktobacili iz starterske kulture (Wouters in sod., 2002). Prav tako pa je tudi možno, da proizvajalec kot dodatek uporablja selekcionirano mezofilno startersko kulturo, saj so v vzorcu D₂ v vseh fazah zorenja, od prvega do 60 dne, prevladovalе izključno mezofilne MKB (glej Priloge od B1 do B3).

Iz rezultatov osnovnih mikrobioloških analiz lahko zaključimo, da so v celotni mikrobni populaciji avtohtonih ovčjih sirov največjo vlogo pri zorenju odigrali enterokoki in laktobacili, saj se je tekom zorenja njihovo število povečevalo, dočim je skupno število mezofilnih in termofilnih MKB padalo. Izjemi sta vzorca Dolenjskega ovčjega sira z oznakama D₁ in D₂, v katerih je ves čas zorenja prevladovala populacija mezofilnih MKB, kar zopet potrjuje prejšnjo hipotezo o možni uporabi selekcionirane mezofilne starterske kulture pri izdelavi Dolenjskega ovčjega sira.

Enterokoki so gram-pozitivni koki, ki imajo v mlekarški industriji dokaj pomembno vlogo. Kot nestarterske bakterije se namreč pojavljajo v različnih sirih, zato ni presenetljivo, da predstavljajo pomemben del mikrobne populacije v tradicionalnih trdih ovčjih sirih južne Evrope (Giraffa, 2003), kot so Pecorino Romano (Di Cagno in sod., 2003), Pecorino Siciliano (Randazzo in sod., 2006, 2008), Manchego (Ballesteros in sod., 2006), Roncal (Arizcun in sod., 1997), Graviera (Samelis in sod., 2010), Kefalotyri (Litopoulou-Tzanetaki in Tzanetakis, 2011) in drugi. Njihovo prisotnost v avtohtonih slovenskih ovčjih sirih so s svojimi raziskavami potrdili tudi številni slovenski raziskovalci (Katana Burja in sod., 2003; Mohar Lorbeg, 2008; Paveljšek, 2012; Katana, 2001). Razlog za razširjenost enterokokov v mlečnih izdelkih so dolgo časa povezovali s slabo higiensko prakso med proizvodnjo in predelavo mleka, vendar se je njihova navzočnost v živilih velikokrat izkazala za nepovezano z neposredno fekalno kontaminacijo. Enterokoki lahko v mleko zaidejo tudi posredno iz onesaženih vodnih virov, s stikom z zunanostjo živali, iz opreme za molžo in/ali iz hladilnega bazena. Velikost mikrobne populacije enterokokov v sirih je odvisna od kontaminacije mleka, tipa sira, uporabljene starterske kulture in tehnološkega postopka. Prav rast v širokem temperaturnem območju (od 10 do 45 °C; optimalna temperatura je 35 °C) ter visoka odpornost proti temperaturi (večina enterokokov preživi pri temperaturi 62,8 °C 30 minut), kislini (med pH 4,0 in 9,6) in relativno visokim koncentracijam soli (prenesejo 6,5 % NaCl) pa enterokokom omogoča preživetje in razmnoževanje tako v sirih, proizvedenih iz surovega mleka, kot v sirih, proizvedenih iz termiziranega mleka (Giraffa, 2003; Foulquié Moreno in sod., 2006).

V raziskavah, ki so jih opravili Mohar Lorbeg (2008) ter Katana Burja in sod. (2003), naj bi enterokoki zavzemali večji del mikrobne populacije v tradicionalnih slovenskih ovčjih sirih, zlasti v Kraškem ovčjem siru (Katana, 2001). Tudi Diana Paveljšek (2012) je v svoji diplomski nalogi potrdila, da Kraški, Dolenjski in Bovški ovčji sir vsebujejo med 17 in 39 % bakterij rodu *Enterococcus*. V ovčjih sirih, ki smo jih analizirali v dotični diplomski nalogi, je bila velikost mikrobne populacije enterokokov tekom zorenja pod mejo detekcije le v dveh vzorcih, in sicer v vzorcu K₃ in v vzorcu D₁, po drugi strani pa so v vzorcu D₃, po 60 dneh zorenja, enterokoki predstavljali prevladujočo mikrobno populacijo. Za vzorca K₃ in D₁ lahko sklepamo, da sta bila izdelana v boljših higienskih razmerah ali pa je bilo mleko termizirano (Garabal in sod., 2008).

Laktobacili, ki spadajo med najpomembnejše mlečnokislinske bakterije in igrajo pomembno vlogo pri zorenju sirov, naj bi poleg enterokokov predstavljali dominantno mikrobnno populacijo v avtohtonih ovčjih sirih, kot so Feta (Rantsiou in sod., 2008), Fiore Sardo (Mannu in sod., 2000), Canestrato Pugliese (Aquilanti in sod., 2006), La Serena (Arques in sod., 2006), Zamorano (Ferrazza in sod., 2004) itd. Srečamo jih tudi v slovenskih ovčjih sirih, kjer z vrstami *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. curvatus*, *Lb. brevis* in *Lb. coryniformis* subsp. *torquens* zavzemajo 23 do 28 % celotne bakterijske populacije (Paveljšek, 2012; Čanžek Majhenič in sod., 2007; Katana, 2001). V analiziranih ovčjih sirih smo nizko število laktobacilov, ki se je nahajalo pod mejo detekcije, tekom zorenja opazili le v vzorcu D₂.

5.1.2.1 Podobnosti in razlike v mikrobní združbi avtohtonih slovenskih ovčjih sirov (analiza DGGE)

Za analizo sestave mikrobne združbe zrelih avtohtonih slovenskih ovčjih sirov smo se poslužili poliakrilamidne gelske elektroforeze v denaturirajočem gradientu (DGGE), ki jo v zadnjem času vedno bolj uporabljajo za mikrobiološko karakterizacijo sirov (Bonetta in sod., 2008; Giannino in sod., 2009). Iz dobljenih profilov DGGE smo s pomočjo računalniškega programa BioNumerics na osnovi Pearson-ovega koeficienta korelacije in neutežne metode parnih skupin z aritmetično sredino (UPGMA) izdelali dendrogram.

Pri pregledu dendrograma profilov DGGE smo na podlagi 40 % relativne podobnosti sevov določili 5 glavnih skupin (Slika 19). V Skupini I so se nahajali profili DGGE vzorcev Bovškega ovčjega sira z oznakami B₁, B₂ in B₃ ter vzorca Dolenjskega ovčjega sira z oznako D₂, dobljeni s trdnih gojišč KAA in M17. Ker je bila tem profilom skupna proga produkta PCR, ki se je nahajala na višini, značilni za referenčni sev *Enterococcus faecalis* LMG 7937^T, domnevamo, da se je v Bovškem ovčjem siru in v vzorcu Dolenjskega ovčjega sira z oznako D₂ nahajala vrsta *Ent. faecalis*. Njena prisotnost bi lahko sovpadala tako z naravo gojišča KAA, ki velja za selektivno gojišče za enterokoke (Reuter, 1995), kot s slabo selektivnostjo gojišča M17, ki omogoča rast tudi enterokokom (Caridi in sod., 2003). Poleg tega pa je bakterijska vrsta *Ent. faecalis*, ki je sposobna rasti v širokem temperaturnem območju, najbolj tipična predstavnik enterokokov v slovenskih ovčjih sirih, kar sta v svojih raziskavah potrdili raziskovalki Mohar Lorbeg (2008) in Paveljšek (2012). V Skupini I smo pri vzorcu B₁, nacepljenem na gojišči M17 30 °C in M17 42 °C, ter pri vzorcih B₂, B₃ in D₂, nacepljenih na gojišči KAA in M17 42 °C, opazili tudi prisotnost proge produkta PCR na isti višini kot pri vzorcu D₂, nacepljenem na gojišče M17 30 °C, iz Skupine II in pri vzorcu K₁, nacepljenem na gojišče M17 42 °C, iz Skupine III. Proga sicer ni sovpadala z nobeno progo referenčnih sevov. Ker pa je večina izolatov omenjenih vzorcev izvirala iz konzorcija, pridobljenega z gojišča M17, inkubiranega pri 42 °C, ki se smatra kot semiselektivno gojišče za vrsto *Streptococcus thermophilus*, je možno, da gre za to vrsto, ki je velikokrat prisotna v trdih sirih kot predstavnik termofilnih MKB (Beresford in sod., 2001).

Skupino II so predstavljali profili DGGE vzorcev Kraškega in Dolenjskega ovčjega sira, dobljeni s trdnega gojišča M17, inkubiranega pri temperaturi 30 °C. Poleg omenjenega

gojišča sta bila v tej skupini prisotna tudi trdno gojišče ROGOSA, na katerega smo nacepili vzorec Dolenjskega ovčjega sira z oznako D₂, in trdno gojišče KAA, na katerega smo nacepili vzorec Kraškega ovčjega sira z oznako K₂. Glede na to, da je gojišče M17, inkubirano pri 30 °C, tipično gojišče za mezofilne MK koke, predvidevamo, da se je tako v Kraškem kot v Dolenjskem ovčjem siru nahajala vrsta iz rodu *Lactococcus* spp., katerega predstavnike naj bi zasledili tudi na gojiščih ROGOSA in KAA (García Fontán in sod., 2006). Med izolati slovenskih ovčjih sirov naj bi, po podatkih, ki jih navaja Paveljšek (2012), rod *Lactococcus* predstavljal 15-18 % mikrobne populacije, njegova dominantna vrsta pa je *Lac. lactis* subsp. *lactis*. Slednja bi prav lahko predstavljala progo produkta PCR, ki je bila skupna vsem profilom DGGE iz Skupine II ter nekaterim profilom DGGE vzorcev Dolenjskega in Bovškega ovčjega sira z oznakami D₂, B₁, B₂ in B₃ iz Skupine I. Položaja omenjene proge žal nismo mogli primerjati s progo v markerju, saj vrsta *Lac. lactis* subsp. *lactis* v njem ni bila prisotna.

Profili DGGE vzorcev Kraškega ovčjega sira z oznakami K₁, K₂ in K₃ ter vzorca Dolenjskega ovčjega sira z oznako D₃, dobljeni s trdnega gojišča M17, inkubiranega pri temperaturi 42 °C, so sestavljali Skupino III. Skupna značilnost profilov DGGE v tej skupini je bila proga produkta PCR, ki se je nahajala na višini referenčnega seva *Bacillus cereus* IM 199 in smo jo zasledili tudi v Skupini I pri profilih DGGE vzorcev Bovškega ovčjega sira z oznako B₁ ter v Skupini II pri profilih DGGE vzorcev Kraškega ovčjega sira (K₁, K₂ in K₃) in vzorcev Dolenjskega ovčjega sira z oznakama D₂ in D₃. Ker bakterija *Bacillus cereus* ni tipičen predstavnik prevladujoče mikroflore ovčjih sirov, predvidevamo, da gre za drugo vrsto, morda vrsto *Weissella viridescens*. Rod *Weissella* namreč lahko raste na gojišču M17, tako pri temperaturi 30 kot 42 °C (Papagianni in Papamichael, 2011; Huys in sod., 2012), prisotnost vrste *Weissella viridescens* pa je bila tudi identificirana v avtohtonih slovenskih ovčjih sirih (Paveljšek, 2012). Seveda je to samo predvidevanje, ki bi ga morali z nadaljnjimi analizami potrditi.

V Skupini IV so se nahajali profili DGGE vzorcev vseh treh avtohtonih slovenskih ovčjih sirov z oznakami K₁, K₃, D₁ in B₁, dobljeni s trdnega gojišča ROGOSA, ki je selektivno gojišče za laktobacile. Proga na gelu DGGE, ki je bila skupna vsem vzorcem iz omenjene skupine ter vzorcem ovčjih sirov, porazdeljenih po Skupinah II (K₁ in K₃), III (K₁) in V (D₃, B₂ in B₃), se je nahajala na višini, značilni za referenčni bakterijski sev *Lactobacillus rhamnosus* GG. Iz tega sklepamo, da je bila v omenjenih vzorcih prisotna vrsta *Lb. rhamnosus*, ki je že bila identificirana v nekaterih slovenskih ovčjih sirih, kot sta Dolenjski in Kraški ovčji sir (Paveljšek, 2012; Čanžek Majhenič in sod., 2007).

V Skupini V so se nahajali profili DGGE vzorca Kraškega ovčjega sira (K₂), vzorca Dolenjskega ovčjega sira (D₃) in vzorcev Bovškega ovčjega sira (B₂ in B₃), dobljeni s trdnega gojišča ROGOSA. V tej skupini se je nahajal tudi profil DGGE vzorca Dolenjskega ovčjega sira z oznako D₃, dobljen s trdnega gojišča KAA, selektivnega za enterokoke. Profili DGGE (vzorci K₂, D₃, B₂ in B₃) iz Skupine V ter profil DGGE vzorca K₁ iz Skupine IV, ki so izvirali z gojišča ROGOSA, so po vsej verjetnosti vključevali bakterijo *Lb. plantarum*, ki sodi med dominantne vrste laktobacilov v slovenskih ovčjih sirih (Paveljšek, 2012; Čanžek Majhenič in sod., 2007; Mohar Lorbeg, 2008). To je potrjevala tudi proga produkta PCR, ki je bila prisotna na višini, značilni za referenčni bakterijski sev *Lb. plantarum* NCDO 1193. Za profil DGGE vzorca Dolenjskega ovčjega sira z oznako D₃, ki je izviral s trdnega gojišča KAA, pa sklepamo, da ne vsebuje

predstavnikov laktobacilov, saj trdno gojišče KAA zaradi svoje sestave in aerobne inkubacije ne omogoča rasti laktobacilov (Reuter, 1995), zato bi bilo zanimivo ugotoviti, kateri bakterijski vrsti pripada dotična proga produkta PCR.

Analiza skupin (angl. cluster analysis) profilov DGGE je, kljub nekaterim skupnim program produktov PCR, pokazala, da ima vsak avtohtoni ovčji sir specifičen »bakterijski profil«, kar lahko pripišemo vplivu različnih geografskih regij, o čemer so razpravljali že drugi avtorji (Giannino in sod., 2009; Poznanski in sod., 2004).

Do odstopanj v mikrobiološki sestavi oz. prisotnosti/odsotnosti določenih prog produktov PCR na gelu DGGE (ki naj bi ponazarjale določene bakterijske vrste) je prihajalo tudi med vzorci znotraj posameznih ovčjih sirov. Pri tem sta bila najbolj edinstvena profila DGGE vzorca Kraškega ovčjega sira z oznako K₁ (nacepljen na trdno gojišče KAA) in vzorca Bovškega ovčjega sira z oznako B₃ (nacepljen na trdno gojišče M17 30 °C), ki sta se popolnoma razlikovala od ostalih profilov DGGE. Na ta odstopanja bi lahko vplivala različna higienska praksa proizvajalcev, različna mikrobiološka slika ovčjega mleka in/ali specifične razlike v tehnološkem postopku izdelave sira (temperatura, obdelava koaguluma, soljenje ipd.).

5.2 SKLEPI

- Osnovne kemijske analize so pri večini vzorcev Kraškega, Dolenjskega in Bovškega ovčjega sira potrdile ustrezno sestavo za uvrstitev v tip trdi polnomastni sir, kakor so ti siri predstavljeni v registraciji.
- Ob koncu zorenja so vsi siri vsebovali primerno vsebnost maščobe v suhi snovi za polnomastne sire (od 45 do 60 %), medtem ko so vzorci K₁ (56,43 %), K₃ (58,10 %), D₃ (56,94 %) in B₃ (59,61 %) vsebovali preveč vode v nemastni snovi za trdi tip sira, ki se mora gibati med 49 in 56 %.
- Variabilnost v vsebnosti kemijskih komponent med vzorci proizvajalcev Kraškega in Dolenjskega ovčjega sira je bila večja od variabilnosti kemijske sestave vseh proučevanih sirov.
- V vseh proučevanih slovenskih ovčjih sirih so prevladujočo mikrobnno populacijo predstavljale mezofilne MKB.
- Število enterokokov in laktobacilov v gramu zrelega sira se je močno razlikovalo ne le med Kraškim, Dolenjskim in Bovškim ovčjim sirom, temveč tudi med vzorci proizvajalcev istega sira. Število enterokokov se je v zrelih ovčjih sirih gibalo med $5,00 \times 10^1$ in $5,00 \times 10^9$ ke/g, število laktobacilov pa med $6,82 \times 10^2$ in $1,82 \times 10^8$ ke/g sira.
- Kljub relativno nizkemu deležu enterokokov in laktobacilov sta imeli najverjetneje prav ti dve skupini največjo vlogo pri zorenju sirov, saj se je število enterokokov in laktobacilov med zorenjem v vseh ovčjih sirih povečevalo, skupno število mezofilnih in termofilnih MKB pa zmanjševalo.
- »Bakterijski profili« Kraškega, Dolenjskega in Bovškega ovčjega sira so različni in specifični za vsak sir.

6 POVZETEK

Pričujoče diplomsko delo je bilo del evropskega projekta RegTrac (SEE-ERA.NET). Glavni cilj projekta je bil opis tehnoloških, kemijskih in mikrobioloških značilnosti tradicionalnih ovčjih sirov s področja Zahodnega Balkana. V projekt so bili uvrščeni tudi trije avtohtoni slovenski ovčji siri, in sicer Kraški, Dolenjski in Bovški ovčji sir.

Namen diplomske naloge je bil raziskati kemijske in mikrobiološke značilnosti avtohtonih slovenskih ovčjih sirov, ki izvirajo iz treh različnih geografskih regij. Po 0, 30 in 60 dneh zorenja smo na izbranih vzorcih sirov, devetih različnih proizvajalcev, opravili kemijske in mikrobiološke analize. S kemijskimi analizami smo določali vsebnost maščobe, beljakovin, suhe snovi in soli, s čimer smo lahko opredelili tip sira. Mikrobiološke analize pa so vključevale klasično metodo gojenja na ploščah, s katero smo določali velikost prevladujočih mikrobnih populacij, ter molekularno metodo PCR-DGGE, ki nam je služila za ugotavljanje pestrosti mikrobne združbe analiziranih ovčjih sirov.

Izsledki kemijskih analiz so pokazali, da so si bili avtohtoni slovenski ovčji siri, kot polnomastni trdi siri, med seboj najbolj podobni v vsebnosti beljakovin, medtem ko so se v vseh ostalih analiziranih kemijskih parametri bolj ali manj razlikovali. Variabilnost v kemijski sestavi se je po 30 dneh zorenja zmanjšala, nato pa ob koncu zorenja ponovno povečala, zato predvidevamo, da je bila začetna variabilnost odvisna od surovine, se pravi ovčjega mleka, na variabilnost po koncu zorenja pa so verjetno vplivali specifičnimi pogoji zorenja v zorilnicah. Vendar pa se Kraški, Dolenjski in Bovški ovčji sir po kemijski sestavi niso razlikovali le med seboj, ampak so se še bolj razlikovali vzorci posameznih proizvajalcev, predvsem znotraj Kraškega in Dolenjskega ovčjega sira. Takšne razlike so najverjetneje posledica različnih dejavnikov, od kakovosti mleka do neustaljenih tehnoloških postopkov in neizenačenih pogojev v zorilnih prostorih.

S pomočjo mikrobioloških analiz smo ugotovili, da se ovčji siri iz različnih geografskih regij razlikujejo tudi v sestavi in velikosti prevladujoče bakterijske populacije. V vseh proučevanih slovenskih ovčjih siri so prevladujočo mikrobno populacijo predstavljale mezofilne MKB, vendar pa so se siri razlikovali v številu enterokokov, laktobacilov in termofilnih MKB. Očitno je, da na mikrobno populacijo ovčjih sirov, poleg proizvodnih pogojev, vplivajo tudi specifična klima in vegetacija določene geografske regije.

Vsem avtohtonim ovčjim sirom je bilo skupno prevladujoče število mezofilnih MKB, čeprav smo pričakovali, da bodo prevladovali termofilne MKB, ki so bolj značilne za trdi tip sirov. Predvidevamo, da na dominantnost mezofilnih MKB vplivajo nižje temperature dogrevanja sirnega zrna v ovčjih siri, sposobnost rasti nekaterih laktobacilov in enterokokov na gojišču M17 pri temperaturi 30 °C ter neuporaba termofilne starterske kulture v izdelavi teh sirov.

Kljub številčnosti mezofilnih in termofilnih MKB pa so v celotni mikrobni populaciji največjo vlogo pri zorenju sirov najverjetneje odigrali enterokoki in laktobacili, saj se je število tako enih kot drugih tekom zorenja povečevalo, medtem ko se je skupno število mezofilnih in termofilnih MKB zmanjševalo.

Za primerjavo mikrobnih združb avtohtonih slovenskih ovčjih sirov smo uporabili verižno reakcijo s polimerazo v kombinaciji s poliakrilamidno gelsko elektroforezo v denaturirajočem gradientu. Analiza skupin (angl. cluster analysis) dobljenih profilov DGGE ni pokazala velike podobnosti med analiziranimi tradicionalnimi slovenskimi ovčjimi siri, saj je vsak ovčji sir imel specifični »bakterijski profil«, kar smo pripisali vplivom geografske regije.

Po pregledu dendrograma, ki smo ga z računalniškim programom BioNumerics izdelali iz dobljenih profilov DGGE na podlagi Pearsonovega koeficienta korelacije in neutežne metode parnih skupin z aritmetično sredino (UPGMA), smo na osnovi 40 % relativne podobnosti sevov določili 5 glavnih skupin. Na osnovi prog produktov PCR, ki so se nahajale na višinah, značilnih za določen referenčni sev, smo določili možne predstavnike mlečnokislinskih bakterij, ki so bile prisotne v konzorcijih prevladujoče mikrobne populacije. To so bile vrste *Ent. faecalis*, *Lb. rhamnosus* in *Lb. plantarum*. Glede na hranljivo podlogo, s katere smo pridobili konzorcije, in glede na pogoje inkubacije predvidevamo, da bi nekatere izrazite proge lahko predstavljale vrste *Lac. lactis* subsp. *lactis*, *W. viridescens* in *Str. thermophilus*. Seveda je to zgolj špekulacija, saj pri analizi DGGE za te vrste nismo imeli referenčnih sevov. Za potrditev prisotnosti omenjenih vrst v analiziranih siri bi se morali poslužiti dodatnih metod identifikacije, kot je npr. sekvenciranje.

7 VIRI

- Ampe F., Ben Omar N., Moizan C., Wachter C., Guyot J.P. 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 12: 5464-5473
- Aquilanti L., Dell'Aquila L., Zannini E., Zocchetti A., Clementi F. 2006. Resident lactic acid bacteria in raw milk Canestrato Pugliese cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 2: 161-167
- Arizcun C., Barcina Y., Torre P. 1997. Identification and characterization of proteolytic activity of *Enterococcus* spp. isolated from milk and Roncal and Idiazábal cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 38, 1: 17-24
- Arqués J.L., Garde S., Gaya P., Medina M., Nuñez M. 2006. Inactivation of microbial contaminants in raw milk La Serena cheese by high-pressure treatments. *Journal of Dairy Science*, 89, 3: 888-891
- Asteri I., Robertson N., Kagkli D., Andrewes P., Nychas G., Coolbear T., Holland R., Crow V., Tsakalidou E. 2009. Technological and flavour potential of cultures isolated from traditional Greek cheeses – A pool novel species and starters. *International Dairy Journal*, 19, 10: 595-604
- Ballesteros C., Poveda J.M., González-Viñas M.A., Cabezas L. 2006. Microbiological, biochemical and sensory characteristics of artisanal and industrial Manchego cheeses. *Food Control*, 17, 4: 249-255
- Barbosa M. 2000. Queijos Serra da Estrela e Serpa – 30 anos de arte e ciência em retrospectiva. V: Proc. encontro sobre queijos tradicionais Ibéricos, Porto, Portugal: 1-19 (in press). Cit. po: Freitas C., Malcata F.X. 2000. Microbiology and biochemistry of cheeses with appellation d'origine protégée and manufactured in the Iberian peninsula from ovine and caprine milks. *Journal of Dairy Science*, 83, 3: 584-602
- Barron L.J.R., Redondo Y., Flanagan C.E., Pérez-Elortondo F.J., Albisu M., Nájera A.I., de Renobales M., Fernández-García E. 2005. Comparison of the volatile composition and sensory characteristics of Spanish PDO cheeses manufactured from ewes' raw milk and animal rennet. *International Dairy Journal*, 15, 4: 371-382
- Beresford T.P., Fitzsimons N.A., Brennan N.L., Cogan T.M. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11, 4-7: 259-274
- Bogataj J. 1999. Mleko. Ljubljana, Rokus: 126 str.

- Bonetta S., Bonnetta S., Carraro E., Rantsiou K., Cocolin L. 2008. Microbiological characterisation of Robiola di Roccaverano cheese using PCR-DGGE. *Food Microbiology*, 25, 6: 786-792
- Bovški sir. 2005. Agrislove.net – il portale transfrontaliero dei territori sloveni e veneziani: 2 str.
http://www.agrislove.net/search_pr.php?lang=slo&ID=29 (29. oktober 2012)
- Bradeško S. 2011. Seznam dejavnosti iz delno fleksibilnega dela obsega akreditacije – Specifikacije ZKP. Ljubljana, Bureau Veritas Slovenija: 1 str.
<http://www.bureauveritas.si> (11. maj 2012)
- Buccioni A., Rapaccini S., Antongiovanni M., Minieri S., Conte G., Mele M. 2010. Conjugated linoleic acid and C18:1 isomers content in milk fat of sheep and their transfer to Pecorino Toscano cheese. *International Dairy Journal*, 20, 3: 190-194
- Cabiddu A., Addis M., Pinna G., Spada S., Fiori M., Sitzia M., Pirisi A., Piredda G., Molle G. 2006. The inclusion of a daisy plant (*Chrysanthemum coronarium*) in dairy sheep diet. 1: Effect on milk and cheese fatty acid composition with particular reference to C18:2 cis-9, trans-11. *Livestock Science*, 101, 1-3: 57-67
- Cardoso A.M.C.F.R. 1995. Identificação de bactérias lácticas presentes o queijo artesanal produzido na região de Évora. Relatório Fim de Curso. Universidade de Évora, Évora, Portugal. Cit. po: Freitas C., Malcata F.X. 2000. Microbiology and biochemistry of cheeses with appellation d'origine protégée and manufactured in the Iberian peninsula from ovine and caprine milks. *Journal of Dairy Science*, 83, 3: 584-602
- Caridi A., Micari P., Caparra P., Cufari A., Sarullo V. 2003. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. *International Dairy Journal*, 13, 2-3: 191-200
- CODEX STAN 283-1978. 1978. General standard for cheese. Revision 1-1999. Amendment 3-2010: 7 str.
- Čanžek Majhenič A., Mohar Lorberg P., Rogelj I. 2007. Characterisation of the *Lactobacillus* community in traditional Karst ewe's cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 60, 3: 182-190
- Del Pozo B.F., Gaya P., Medina M., Rodríguez-Marín M.A., Nuñez M. 1988. Changes in the microflora of La Serena ewes' milk cheese during ripening. *Journal of Dairy Research*, 55, 3: 449-455
- Delgado F.J., Rodríguez-Pinilla J., González-Crespo J., Ramírez R., Roa I. 2010. Proteolysis and texture changes of a Spanish soft cheese ('Torta del Casar') manufactured with raw ewe milk and vegetable rennet during ripening. *International Journal of Food Science and Technology*, 45, 3: 512-519

- Di Cagno R., Banks J., Sheehan L., Fox P.F., Brechany E.Y., Corsetti A., Gobbetti M. 2003. Comparison of the microbiological, compositional, biochemical, volatile profile and sensory characteristics of three Italian PDO ewes' milk cheeses. *International Dairy Journal*, 13, 12: 961-972
- Di Cagno R., De Pasquale I., De Angelis M., Buchin S., Calasso M., Fox P.F., Gobbetti M. 2011. Manufacture of Italian Caciotta-type cheeses with adjuncts and attenuated adjuncts of selected non-starter lactobacilli. *International Dairy Journal*, 21, 4: 254-260
- Ercolini D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 3: 297-314
- European Commission. 2012. DOOR – Database of protected product names. Brussels, European Commission, Agriculture and Rural Development: database.
<http://ec.europa.eu/agriculture/quality/door/list.html> (21. apr. 2012)
- FAOSTAT. 2012. Official statistical database of production. Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations: database.
<http://faostat.fao.org/> (7. maj 2012)
- Ferrazza R.E., Fresno J.M., Ribeiro J.I., Tornadijo M.E., Mansur Furtado M. 2004. Changes in the microbial flora of Zamorano cheese (P.D.O.) by accelerated ripening process. *Food Research International*, 37, 2: 149-155
- Ferris M.J., Muyzer G., Ward D.M. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2: 340-346
- Feutry F., Oneca M., Berthier F., Torre P. 2012. Biodiversity and growth dynamics of lactic acid bacteria in artisanal PDO Ossau-Iraty cheeses made from raw ewe's milk with different starters. *Food Microbiology*, 29, 1: 33-42
- Fischione A. 1998. Sirarstvo na Tolminskem, Kobariškem in Bovškem. Ljubljana, ČZD Kmečki glas: 118 str.
- Foulquié Moreno M.R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 1: 1-24
- Garabal J.I., Rodríguez-Alonso P., Centeno J.A. 2008. Characterization of lactic acid bacteria isolated from raw cows' milk cheeses currently produced in Galicia (NW Spain). *LWT – Food Science and Technology*, 41, 8: 1452-1458
- García Fontán M.C., Martínez S., Franco I., Carballo J. 2006. Microbiological and chemical changes during the manufacture of Kefir made from cows' milk, using a commercial starter culture. *International Dairy Journal*, 16, 7: 762-767

- Giannino M.L., Marzotto M., Dellaglio F., Feligini M. 2009. Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, 130, 3: 188-195
- Giraffa G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88, 2-3: 215-222
- Gobbetti M. 2007. What is a 'controlled designation of origin'? V: Cheese problems solved. McSweeney P.L.H. (ed.). Cambridge, Woodhead Publishing Limited: 178-180
- Grašek V., Kos-Skubic M., Verbič M., Kuipers A., Klopčič M. (ur.). 2010. Slovenski zaščiteni kmetijski pridelki in živila. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano: 32 str.
- Graviera Agrafon cheese PDO. 1994. Application for registration GR/0449/940121. Athens, Ministry of Agriculture, Directorate for the Processing, Standardization and Quality Control of Products of Plant Origin: 2 str.
- Graviera Kritis PDO. 1994. Application for registration GR/0451/940121. Athens, Ministry of Agriculture, Directorate for the Processing, Standardization and Quality Control of Products of Plant Origin: 2 str.
- Graviera Naxou cheese PDO. 1994. Application for registration GR/0434/940121. Athens, Ministry of Agriculture, Directorate for the Processing, Standardization and Quality Control of Products of Plant Origin: 2 str.
- Guinee T.P. 2004. Salting and the role of salt in cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 2-3: 99-109
- Huys G., Leisner J., Björkroth J. 2012. The Lesser LAB Gods: *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, and affiliated genera. V: Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects. 4th ed. Lahtinen S., Ouwehand A.C., Salminen S., von Wright A. (eds.). Boca Raton (FL), CRC Press: 93-121
- ISO 2970. 1974. Cheese – Determination of chloride content (Reference method). 1st ed.: 2 str.
- ISO 3433/IDF 222. 2008. Cheese – Determination of fat content – Van Gulik method. 2nd ed.: 4 str.
- ISO 5534/IDF 4. 2004. Cheese and processed cheese – Determination of the total solid content (Reference method). 2nd ed.: 7 str.
- ISO 8261/IDF 122. 2001. Milk and milk products – General guidance for the preparation of test samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological examination. 2nd ed.: 12 str.

- ISO 8968-3/IDF 20-3. 2004. Milk – Determination of nitrogen content – Part 3: Block-digestion method (Semi-micro rapid routine method). 1st ed.: 11 str.
- Izco J.M., Torre P., Barcina Y. 2000. Ripening of Ossau-Iraty cheese: determination of free amino acids by RP-HPLC and of total free amino acids by the TNBS method. *Food Control*, 11, 1: 7-11
- Juarez M., Ramos M. 2003. Sheep milk. V: *Encyclopedia of food science and nutrition*. Vol. 8. 2nd ed. Caballero B., Trugo L.C., Finglas P.M. (eds.). Amsterdam, Elsevier Academic Press: 5198-5205
- Justé A., Thomma B.P.H.J., Lievens B. 2008. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology*, 25, 6: 745-761
- Katana Burja V., Bogovič Matijašić B., Rogelj I. 2003. Overview of microbial population and identification of enterococci during autochthonous ewe's cheese ripening. V: *Milk&dairy products: book of abstracts*. European Dairy Congress 03, Portorož, 15.-18.11.2003. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 85-85
- Katana V. 2001. Proučevanje mikrobne populacije avtohtonega kraškega ovčjega sira. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 63 str.
- Kraški ovčji sir. 2005. Agrislove.net – il portale transfrontaliero dei territori sloveni e veneziani: 1 str.
http://www.agrislove.net/search_pr.php?lang=slo&ID=28 (29. oktober 2012)
- Litopoulou-Tzanetaki E., Tzanetakis N. 2011. Microbiological characteristic of Greek traditional cheeses. *Small Ruminant Research*, 101, 1-3: 17-32
- Macedo A.C., Freitas A.C., Tavaría F., Malcata F.X. 1997. Portuguese traditional cheeses: Native microbiota. V: *Proc. of AIR-Concerted action n° 3 – The influence of native flora on the characteristics cheeses with “appellation d’origine protégée” (AOP) made from raw milk*, ed. Tecnograf, Reggio Emilia, Italy: 55-63. Cit. po: Freitas C., Malcata F.X. 2000. Microbiology and biochemistry of cheeses with appellation d’origine protégée and manufactured in the Iberian peninsula from ovine and caprine milks. *Journal of Dairy Science*, 83, 3: 584-602
- Madrau M.A., Mangia N.P., Murgia M.A., Sanna M.G., Garau G., Leccis L., Caredda M., Deiana P. 2006. Employment of autochthonous microflora in Pecorino Sardo cheese manufacturing and evolution of physicochemical parameters during ripening. *International Dairy Journal*, 16, 8: 876-885
- Mangia N.P., Murgia M.A., Garau G., Sanna M.G., Deiana P. 2008. Influence of selected lab cultures on the evolution of free amino acids, free fatty acids and Fiore Sardo cheese microflora during ripening. *Food Microbiology*, 25, 2: 366-377

- Mannu L., Comunian R., Scintu M.F. 2000. Mesophilic lactobacilli in Fiore Sardo cheese: PCR-identification and evolution during cheese ripening. *International Dairy Journal*, 10, 5-6: 383-389
- Mannu L., Riu G., Comunian R., Fozzi M.C., Scintu M.F. 2002. A preliminary study of lactic acid bacteria in whey starter culture and industrial Pecorino Sardo ewes' milk cheese: PCR-identification and evolution during ripening. *International Dairy Journal*, 12, 1: 17-26
- Martínez S., Franco I., Carballo J. 2011. Spanish goat and sheep milk cheeses. *Small Ruminant Research*, 101, 1-3: 41-54
- Mavrin D., Oštir Š. 2002. Tehnologija mleka in mlečnih izdelkov: učbenik za program srednjega strokovnega in poklicno-tehniškega izobraževanja živilski tehnik. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 218 str.
- McCartney A.L. 2002. Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88, Suppl. 1: S29-S37
- Medina M., Nuñez M. 2004. Cheeses made from ewes' and goats' milk. V: *Cheese: Chemistry, physics and microbiology. Major cheese groups*. Vol. 2. 3rd ed. Fox P.F., McSweeney P.L.H., Cogan T.M. Guinee T.P. (eds.). Amsterdam, Elsevier Academic Press: 279-299
- Mimoso M.C., Firme M.P., Carreira D. 1990. Estudo dos grandes grupos microbianos que intervêm no processo de maturação do queijo de Azeitão. V: *Proc. I Jornadas Indústrias Agro-Alimentares*. Instituto Superior de Agronomia, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisbon, Portugal: 286-292. Cit. po: Freitas C., Malcata F.X. 2000. Microbiology and biochemistry of cheeses with appellation d'origine protégée and manufactured in the Iberian peninsula from ovine and caprine milks. *Journal of Dairy Science*, 83, 3: 584-602
- Mimoso M.C., Firme M.P., Carreira D. 1992. Principais grupos microbianos responsáveis pela maturação do queijo. Isolamento e caracterização das bactérias lácticas. *Dep. Technol. Food Ind., Natl. Lab. Eng. Ind. Technol.* Lisbon, Portugal. Cit. po: Freitas C., Malcata F.X. 2000. Microbiology and biochemistry of cheeses with appellation d'origine protégée and manufactured in the Iberian peninsula from ovine and caprine milks. *Journal of Dairy Science*, 83, 3: 584-602
- MKGP. 2003. Zaščitni znak za označevanje kmetijskih pridelkov oziroma živil. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Sektor za varnost in kakovost hrane: 4 str.
- MKGP. 2012a. Zaščita kmetijskih pridelkov oziroma živil – uvod. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Direktorat za varno hrano: 1 str.
http://www.mkgp.gov.si/si/o_ministrstvu/direktorati/direktorat_za_varno_hrano/stara_sektor_za_varnost_in_kakovost_hrane_in_krme/zascita_kmetijskih_pridelkov_oziro_ma_zivil/uvod/ (25. mar. 2012)

- MKGP. 2012b. Zaščita kmetijskih pridelkov oziroma živil – zakonodaja. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Direktorat za varno hrano: 1 str. http://www.mkgp.gov.si/si/o_ministrstvu/direktorati/direktorat_za_varno_hrano/stara_sektor_za_varnost_in_kakovost_hrane_in_krme/zascita_kmetijskih_pridelkov_oziroma_zivil/zakonodaja/ (25. mar. 2012)
- MKGP. 2012c. Zaščita kmetijskih pridelkov oziroma živil – zaščitni znaki. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano, Direktorat za varno hrano: 2 str. http://www.arhiv.mkgp.gov.si/si/o_ministrstvu/direktorati/direktorat_za_varno_hrano/starasektor_za_varnost_in_kakovost_hrane_in_krme/zascita_kmetijskih_pridelkov_oziroma_zivil/zascitni_znaki/ (25. mar. 2012)
- Mohar Lorbeg P. 2008. Fenotipska in genotipska raznolikost enterokokov iz tradicionalnih slovenskih sirov. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 133 str.
- Muyzer G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 2, 3: 317-322
- Muyzer G., De Waal E.C., Uitterlinden A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3: 695-700
- Muyzer G., Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 1: 127-141
- Objava vloge na podlagi člena 6(2) Uredbe Sveta (ES) št. 510/2006 o zaščiti geografskih označb in označb porekla za kmetijske proizvode in živila »Bovški sir«. 2011. Uradni list Evropske unije, 54, C364: 25-28
- Objava vloge za spremembo na podlagi člena 6(2) Uredbe sveta (ES) št. 510/2006 o zaščiti geografskih označb in označb porekla za kmetijske proizvode in živila »Ricotta Romana«. 2010. Uradni list Evropske unije, 53, C101: 20-25
- Ordoñez J.A., Masso J.A., Marmol M.P., Ramos M. 1980. Contribution à l'étude du fromage »Roncal«. *Le Lait*, 60, 595-596: 283-294
- Papagianni M., Papamichael E.M. 2011. Purification, amino acid sequence and characterization of the class IIa bacteriocin weissellin A, produced by *Weissella paramesenteroides* DX. *Bioresource Technology*, 102, 12: 6730-6734
- Paveljšek D. 2012. Identifikacija in primerjava vrst mlečnokislinskih bakterij v tradicionalnih ovčjih sirih s področja zahodnega Balkana. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 73 str.
- Pérez Elortondo F.J., Aldámiz Echobarria P., Albisu M., Barcina Y. 1998. Indigenous lactic acid bacteria in Idiazábal ewes' milk cheese. *International Dairy Journal*, 8, 8: 725-732

- Peterman M., Pajk Žontar T. 2008. Slovenska tradicionalna živila: imena in zaščitni znaki posebnih kmetijskih pridelkov in živil. Ljubljana, Zveza potrošnikov Slovenije: 16 str.
- Pintado A.I.E., Pinho O., Ferreira I.M.P.L.V.O., Pintado M.M.E., Gomes A.M.P., Malcata F.X. 2008. Microbiological, biochemical and biogenic amine profiles of Terrincho cheese manufactured in several dairy farms. *International Dairy Journal*, 18, 6: 631-640
- Pirisi A., Comunian R., Urgeghe P.P., Scintu M.F. 2011. Sheep`s and goat`s dairy products in Italy: Technological, chemical, microbiological, and sensory aspects. *Small Ruminant Research*, 101, 1-3: 102-112
- Pouillet B., Huertas M., Sánchez A., Cáceres P., Larriba G. 1993. Main lactic acid bacteria isolated during ripening of Casar de Cáceres cheese. *Journal of Dairy Research*, 60, 1: 123-127
- Poznanski E., Cavazza A., Cappa F., Cocconcelli P.S. 2004. Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park. *International Journal of Food Microbiology*, 92, 2: 141-151
- Prandini A., Sigolo S., Piva G. 2011. A comparative study of fatty acid composition and CLA concentration in commercial cheeses. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 1: 55-61
- Pravilnik o Kraškem ovčjem siru z zaščiteno označbo porekla. 2008. Uradni list Republike Slovenije, 18, 29: 2714-2714
- Pravilnik o označbi geografskega porekla Bovški sir. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 47: 6289-6289
- Pravilnik o postopkih zaščite kmetijskih pridelkov oziroma živil. 2008. Uradni list Republike Slovenije, 18, 15: 1062-1066
- Pravilnik o priznanju skupin proizvajalcev posebnih kmetijskih pridelkov oziroma živil. 2009. Uradni list Republike Slovenije, 19, 71: 9599-9601
- Pravilnik o zaščitnem znaku za označevanje kmetijskih pridelkov oziroma živil. 2011. Uradni list Republike Slovenije, 21, 3: 291-293
- Randazzo C.L., Caggia C., Neviani E. 2009. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *Journal of Microbiological Methods*, 78, 1: 1-9
- Randazzo C.L., Pitino I., De Luca S., Scifò G.O., Caggia C. 2008. Effect of wild strains used as starter cultures and adjunct cultures on the volatile compounds of the Pecorino Siciliano cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 3: 269-278

- Randazzo C.L., Vaughan E.E., Caggia C. 2006. Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: Microbial dynamics during manufacture assessed by culturing and PCR-DGGE analyses. *International Journal of Food Microbiology*, 109, 1-2: 1-8
- Rantsiou K., Urso R., Dolci P., Comi G., Cocolin L. 2008. Microflora of Feta cheese from four Greek manufacturers. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 1-2: 36-42
- Reis C.M.L.M.R. 1994. Caracterização microbiológica do queijo da região de Évora – Pesquisa e identificação de bactérias lácticas. Relatório Fim de Curso. Universidade de Évora, Évora, Portugal. Cit. po: Freitas C., Malcata F.X. 2000. Microbiology and biochemistry of cheeses with appellation d'origine protégée and manufactured in the Iberian peninsula from ovine and caprine milks. *Journal of Dairy Science*, 83, 3: 584-602
- Reis P.J.M., Malcata F.X. 2011. Current state of Portuguese dairy products from ovine and caprine milks. *Small Ruminant Research*, 101, 1-3: 122-133
- Renčelj S., Perko B. 2008. Kraški ovčji sir za zaščiteno označbo porekla. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije: 39 str. http://www.mko.gov.si/fileadmin/mko.gov.si/pageuploads/podrocja/Varna_in_kakovostna_hrana_in_krma/zasciteni_kmetijski_pridelki/Specifikacije/KRASKI_OVCJI_SIR.pdf (4. marec 2012)
- Reuter G. 1995. Culture media for enterococci and group D-streptococci. V: Culture media for food microbiology. Corry J.E.L., Curtis G.D.W., Baird R.M. (eds.). Amsterdam, Elsevier Science B.V.: 51-61
- Rogelj I. 2012. »Specifikacija za slovenske ovčje sire – še neobjavljeni podatki v okviru projekta SEE-ERA.NET.« Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Irena.Rogelj@bf.uni-lj.si (osebni vir, 4. apr. 2012)
- Roseiro L.B., Wilbey A., Barbosa M. 2003. Serpa cheese: Technological, biochemical and microbiological characterisation of a PDO ewe's milk cheese coagulated with *Cynara cardunculus* L. *Lait*, 83, 6: 469-481
- Roy D. 2001. Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 69, 3: 167-182
- Sakul H., Boylan W.J. 1992. Evaluation of U.S. sheepbreeds for milk production and milk composition. *Small Ruminant Research*, 7, 3: 195-201
- Samelis J., Bleicher A., Delbès-Paus C., Kakouri A., Neuhaus K., Montel M.C. 2011. FTIR-based polyphasic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek Graviera cheese. *Food Microbiology*, 28, 1: 76-83
- Samelis J., Kakouri A., Pappa E.C., Bogovič Matijašić B., Georgalaki M.D., Tsakalidou E., Rogelj I. 2010. Microbial stability and safety of traditional Greek Graviera cheese: Characterization of the lactic acid bacterial flora and culture-independent

detection of bacteriocin genes in the ripened cheeses and their microbial consortia. *Journal of Food Protection*, 73, 7: 1294-1303

Seljak J. 1998. Statistične metode. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Visoka upravna šola: 229 str.

Slanovec T. 1982. Sirarstvo. Ljubljana, Kmečki glas: 175 str.

Smole Možina S. 2003. Metode mikrobiološke preiskave živil. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 87-113

Smole Možina S., Bem Z. 2003. Dejavniki razmnoževanja mikroorganizmov. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 47-86

Tavaria F.K., Malcata F.X. 2000. On the microbiology of Serra da Estrela cheese: geographical and chronological considerations. *Food Microbiology*, 17, 3: 293-304

Tavaria F.K., Reis P.J.M., Malcata F.X. 2006. Effect of dairy farm and milk refrigeration on microbiological and microstructural characteristics of matured Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal*, 16, 8: 895-902

Temmerman R., Huys G., Swings J. 2004. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 7-8: 348-359

Tsiplakou E., Kominakis A., Zervas G. 2008. The interaction between breed and diet on CLA and fatty acids content of milk fat of four sheep breeds kept indoors or at grass. *Small Ruminant Research*, 74, 1-3: 179-187

Tsiplakou E., Mountzouris K.C., Zervas G. 2006. The effect of breed, stage of lactation and parity on sheep milk fat CLA content under the same feeding practices. *Livestock Science*, 105, 1-3: 162-167

Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetaki E., Manolkidis K. 1987. Microbiology of Kopanisti, a traditional Greek cheese. *Food Microbiology*, 4, 3: 251-256

Uredba Komisije (ES) št. 1216/2007 z dne 18. oktobra 2007 o določitvi podrobnih pravil za izvajanje Uredbe Sveta (ES) št. 509/2006 o zajamčenih tradicionalnih posebnostih kmetijskih proizvodov in živil. 2007. Uradni list Evropske unije, 50, L275: 3-15

Uredba Komisije (ES) št. 1898/2006 z dne 14. decembra 2006 o podrobnih pravilih za izvajanje Uredbe Sveta (ES) št. 510/2006 o zaščiti geografskih označb in označb porekla za kmetijske proizvode in živila. 2006. Uradni list Evropske unije, 49, L369: 1-19

- Uredba Sveta (ES) št. 509/2006 z dne 20. marca 2006 o zajamčenih tradicionalnih posebnostih kmetijskih proizvodov in živil. 2006. Uradni list Evropske unije, 49, L093: 1-11
- Uredba Sveta (ES) št. 510/2006 z dne 20. marca 2006 o zaščiti geografskih označb in označb porekla za kmetijske proizvode in živila. 2006. Uradni list Evropske unije, 49, L093: 12-25
- Vaughan E.E., De Vries M.C., Zoetendal E.G., Ben-Amor K., Akkermans A.D.L., De Vos W.M. 2002. The intestinal LABs. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 1-4: 341-352
- Walter J., Hertel C., Tannock G.W., Lis C.M., Munro K., Hammes W.P. 2001. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 6: 2578-2585
- Walter J., Tannock G.W., Tilsala-Timisjarvi A., Rodtong S., Loach D.M., Munro K., Alatosava T. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1: 297-303
- Wouters J.T.M., Ayad E.H.E., Hugenholtz J., Smit G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12, 2-3: 91-109
- Zakon o kmetijstvu (ZKme-1). 2008. Uradni list Republike Slovenije, 18, 45: 4965-4993

ZAHVALA

Za strokovnost, potrpežljivost, pomoč in prijaznost pri izvedbi raziskovalnega dela in pisanju diplomske naloge se najlepše zahvaljujem mentorici prof. dr. Ireni Rogelj in dr. Aljoši Trmčiču.

Za strokoven pregled diplomske naloge se iskreno zahvaljujem recenzentki prof. dr. Barbari Jeršek.

Za pregled referenc in nasvete pri oblikovanju diplomske naloge se zahvaljujem Lini Burkan Makivić.

Posebna zahvala je namenjena Katji Černe za njeno prijaznost, pomoč, dobrosrčnost in prijateljstvo skozi vsa leta študija na Biotehniški fakulteti.

Hvala vsem sošolcem in prijateljem za pomoč in lepe trenutke tekom študija.

Hvala mojemu fantu Samu Grosu in njegovi družini ter Antonu Grilcu za spodbudo in podporo. Predvsem pa se najlepše zahvaljujem svoji mami Bredi Grohar ter babici Ceciliji Grohar in pokojnemu dedku Leopoldu Groharju za vso podporo in ljubezen, ki sem jo bila in sem jo še deležna.

PRILOGE

Priloga A:

Vsebnost maščobe, beljakovin, suhe snovi, vode v nemastni snovi, maščobe v suhi snovi in soli v 100 gramih vzorcev avtohtonih slovenskih ovčjih sirov, tekom zorenja

Analizirane kemijske komponente	Vrsta sira	Oznaka vzorca	Po 0 dneh zorenja	Po 30 dneh zorenja	Po 60 dneh zorenja
Maščoba g / 100 g	Kraški ovčji sir	K ₁	23,25	28,00	28,00
		K ₂	30,25	32,25	34,50
		K ₃	34,25	34,50	36,25
	Dolenjski ovčji sir	D ₁	31,00	32,50	32,00
		D ₂	28,50	32,50	32,25
		D ₃	25,50	26,50	28,00
	Bovški ovčji sir	B ₁	34,00	34,00	34,50
		B ₂	33,00	35,00	35,25
		B ₃	28,75	30,00	29,00
Beljakovine g / 100 g	Kraški ovčji sir	K ₁	22,41	26,06	25,74
		K ₂	22,93	24,09	25,56
		K ₃	21,90	22,59	22,29
	Dolenjski ovčji sir	D ₁	22,07	26,03	25,66
		D ₂	23,97	24,70	25,58
		D ₃	23,32	23,52	25,33
	Bovški ovčji sir	B ₁	23,26	23,27	23,88
		B ₂	24,43	25,30	25,01
		B ₃	22,04	23,18	22,97
Suha snov g / 100 g	Kraški ovčji sir	K ₁	50,21	59,72	59,37
		K ₂	57,16	60,20	63,85
		K ₃	58,60	62,15	62,96
	Dolenjski ovčji sir	D ₁	55,61	61,55	64,47
		D ₂	56,45	61,81	63,99
		D ₃	54,43	55,44	59,00
	Bovški ovčji sir	B ₁	60,90	61,88	63,97
		B ₂	61,58	65,55	65,74
		B ₃	55,24	57,69	57,68
Voda v nemastni snovi g / 100 g	Kraški ovčji sir	K ₁	64,87	55,94	56,43
		K ₂	61,42	58,75	55,19
		K ₃	62,97	57,79	58,10
	Dolenjski ovčji sir	D ₁	64,33	56,96	52,25
		D ₂	60,91	56,58	53,15
		D ₃	61,17	60,63	56,94
	Bovški ovčji sir	B ₁	59,24	57,76	55,01
		B ₂	57,34	53,00	52,91
		B ₃	62,82	60,44	59,61
Maščoba v suhi snovi g / 100 g	Kraški ovčji sir	K ₁	46,31	46,89	47,16
		K ₂	52,92	53,57	54,03
		K ₃	58,45	55,51	57,58
	Dolenjski ovčji sir	D ₁	55,75	52,80	49,64
		D ₂	50,49	52,58	50,40
		D ₃	46,85	47,80	47,46
	Bovški ovčji sir	B ₁	55,83	54,95	53,93
		B ₂	53,59	53,39	53,62
		B ₃	52,05	52,00	50,28
NaCl g / 100 g	Kraški ovčji sir	K ₁	1,64	2,37	2,69
		K ₂	0,80	1,15	1,28
		K ₃	0,80	2,03	1,82
	Dolenjski ovčji sir	D ₁	0,81	1,58	1,77
		D ₂	1,03	1,77	1,70
		D ₃	1,82	2,06	2,05
	Bovški ovčji sir	B ₁	0,71	1,30	1,55
		B ₂	1,61	2,15	2,43
		B ₃	1,40	1,93	2,38

Priloga B1:

Število enterokokov, laktobacilov, mezofilnih in termofilnih MKB v vzorcih Kraškega, Dolenjskega in Bovškega ovčjega sira, z izračunano mediano in kvartili, po 0 dneh zorenja

Vrsta sira	Oznaka sira	Enterokoki		Laktobacili		Mezofilne MKB		Termofilne MKB	
		ke/g	log (ke/g)	ke/g	log (ke/g)	ke/g	log (ke/g)	ke/g	log (ke/g)
Kraški ovčji sir	K₁	4,09x10 ⁵	5,61	1,09x10 ⁶	6,04	1,28x10 ⁹	9,11	1,19x10 ⁹	9,08
	K₂	9,00x10 ³	3,95	1,13x10 ⁵	5,05	2,40x10 ⁹	9,38	2,18x10 ⁹	9,34
	K₃	5,00x10 ² ^A	2,70	2,56x10 ⁶	6,41	1,58x10 ⁹	9,20	1,12x10 ⁹	9,05
Dolenjski ovčji sir	D₁	5,00x10 ² ^A	2,70	5,55x10 ⁷	7,74	2,62x10 ⁸	8,42	1,25x10 ⁶	6,10
	D₂	4,60x10 ⁵	5,66	5,00x10 ² ^A	2,70	3,57x10 ⁹	9,55	3,38x10 ⁹	9,53
	D₃	1,52x10 ⁵	5,18	8,09x10 ⁵	5,91	2,64x10 ⁹	9,42	2,26x10 ⁹	9,35
Bovški ovčji sir	B₁	4,82x10 ⁷	7,68	1,75x10 ⁷	7,24	2,55x10 ⁹	9,41	6,50x10 ⁸	8,81
	B₂	1,37x10 ⁸	8,14	1,71x10 ⁶	6,23	1,86x10 ⁹	9,27	4,42x10 ⁸	8,65
	B₃	7,36x10 ⁶	6,87	2,01x10 ⁶	6,30	1,67x10 ⁹	9,22	8,80x10 ⁸	8,94
Vsi ovčji siri	Max	1,37x10 ⁸	8,14	5,55x10 ⁷	7,74	3,57x10 ⁹	9,55	3,38x10 ⁹	9,53
	3. kvartil	7,36x10 ⁶	6,87	2,56x10 ⁶	6,41	2,55x10 ⁹	9,41	2,18x10 ⁹	9,34
	Mediana	4,09x10 ⁵	5,61	1,71x10 ⁶	6,23	1,86x10 ⁹	9,27	1,12x10 ⁹	9,05
	1. kvartil	9,00x10 ³	3,95	8,09x10 ⁵	5,91	1,58x10 ⁹	9,20	6,50x10 ⁸	8,81
	Min	5,00x10 ²	2,70	5,00x10 ²	2,70	2,62x10 ⁸	8,42	1,25x10 ⁶	6,10

OPOMBA:

^A za namene statistične analize smo vzorcem, v katerih je bilo število mikroorganizmov pod mejo detekcije, pripisali polovično vrednost števila mikroorganizmov najnižje analizirane koncentracije

Priloga B2:
Število enterokokov, laktobacilov, mezofilnih in termofilnih MKB v vzorcih Kraškega, Dolenjskega in Bovškega ovčjega sira, z izračunano mediano in kvartili, po 30 dneh zorenja

Vrsta sira	Oznaka sira	Enterokoki		Laktobacili		Mezofilne MKB		Termofilne MKB	
		ke/g	log (ke/g)	ke/g	log (ke/g)	ke/g	log (ke/g)	ke/g	log (ke/g)
Kraški ovčji sir	K₁	1,73x10 ⁶	6,24	2,92x10 ⁸	8,47	4,65x10 ⁹	9,67	1,20x10 ⁹	9,08
	K₂	2,93x10 ⁶	6,47	1,11x10 ⁷	7,05	1,68x10 ⁹	9,23	1,65x10 ⁹	9,22
	K₃	5,00x10 ¹ ^A	1,70	5,75x10 ⁷	7,76	5,76x10 ⁸	8,76	1,77x10 ⁸	8,25
Dolenjski ovčji sir	D₁	5,00x10 ¹ ^A	1,70	1,05x10 ⁶	6,02	9,59x10 ⁷	7,98	5,00x10 ⁵ ^A	5,70
	D₂	3,82x10 ³	3,58	2,68x10 ³	3,43	2,86x10 ⁸	8,46	5,00x10 ⁵ ^A	5,70
	D₃	1,33x10 ⁵	5,12	1,21x10 ⁷	7,08	7,55x10 ⁸	8,88	3,00x10 ⁸	8,48
Bovški ovčji sir	B₁	2,63x10 ⁷	7,42	1,51x10 ⁷	7,18	2,50x10 ⁸	8,40	6,86x10 ⁷	7,84
	B₂	1,21x10 ⁸	8,08	6,25x10 ⁷	7,80	6,00x10 ⁸	8,78	2,35x10 ⁸	8,37
	B₃	1,05x10 ⁸	8,02	1,44x10 ⁸	8,16	1,66x10 ⁸	8,22	3,90x10 ⁷	7,59
Vsi ovčji siri	Max	1,21x10 ⁸	8,08	2,92x10 ⁸	8,47	4,65x10 ⁹	9,67	1,65x10 ⁹	9,22
	3. kvartil	2,63x10 ⁷	7,42	6,25x10 ⁷	7,80	7,55x10 ⁸	8,88	3,00x10 ⁸	8,48
	Mediana	1,73x10 ⁶	6,24	1,51x10 ⁷	7,18	5,76x10 ⁸	8,76	1,77x10 ⁸	8,25
	1. kvartil	3,82x10 ³	3,58	1,11x10 ⁷	7,05	2,50x10 ⁸	8,40	3,90x10 ⁷	7,59
	Min	5,00x10 ¹	1,70	2,68x10 ³	3,43	9,59x10 ⁷	7,98	5,00x10 ⁵	5,70

OPOMBA:

^A za namene statistične analize smo vzorcem, v katerih je bilo število mikroorganizmov pod mejo detekcije, pripisali polovično vrednost števila mikroorganizmov najnižje analizirane koncentracije

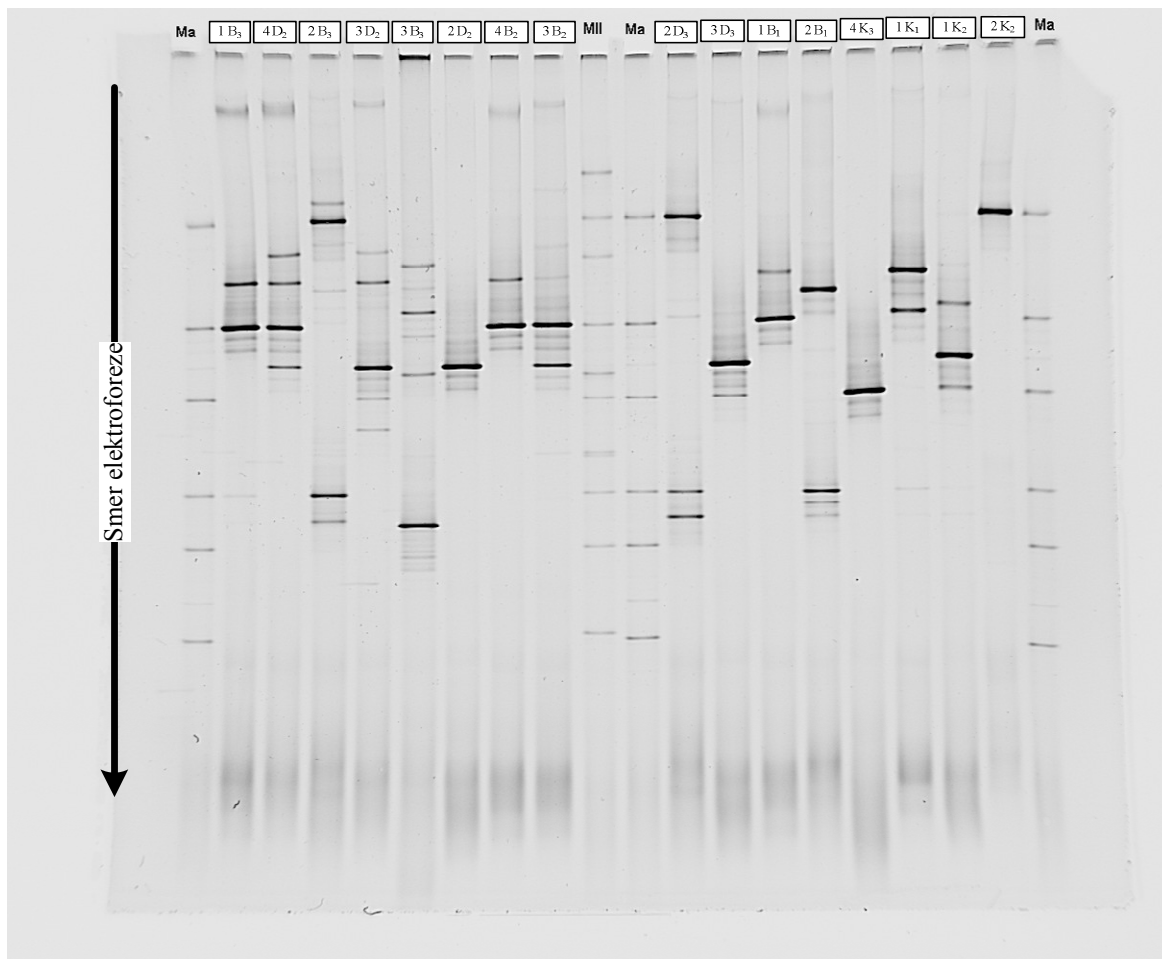
Priloga B3:
Število enterokokov, laktobacilov, mezofilnih in termofilnih MKB v vzorcih Kraškega, Dolenjskega in Bovškega ovčjega sira, z izračunano mediano in kvartili, po 60 dneh zorenja

Vrsta sira	Oznaka sira	Enterokoki		Laktobacili		Mezofilne MKB		Termofilne MKB	
		ke/g	log (ke/g)	ke/g	log (ke/g)	ke/g	log (ke/g)	ke/g	log (ke/g)
Kraški ovčji sir	K₁	3,40x10 ⁶	6,53	1,82x10 ⁸	8,26	3,13x10 ⁸	8,50	5,55x10 ⁷	7,74
	K₂	8,33x10 ⁶	6,92	1,05x10 ⁷	7,02	6,86x10 ⁸	8,84	5,36x10 ⁸	8,73
	K₃	5,00x10 ¹ ^A	1,70	1,41x10 ⁸	8,15	5,18x10 ⁸	8,71	2,67x10 ⁸	8,43
Dolenjski ovčji sir	D₁	5,00x10 ¹ ^A	1,70	2,43x10 ⁵	5,39	3,10x10 ⁷	7,49	1,50x10 ⁴	4,18
	D₂	2,00x10 ³	3,30	6,82x10 ²	2,83	2,89x10 ⁷	7,46	5,00x10 ² ^A	2,70
	D₃	5,00x10 ⁹ ^B	9,70	2,45x10 ⁷	7,39	2,23x10 ⁸	8,35	7,86x10 ⁷	7,90
Bovški ovčji sir	B₁	2,44x10 ⁷	7,39	3,32x10 ⁷	7,52	8,32x10 ⁷	7,92	2,91x10 ⁷	7,46
	B₂	1,04x10 ⁸	8,02	2,86x10 ⁷	7,46	1,77x10 ⁸	8,25	1,31x10 ⁸	8,12
	B₃	5,73x10 ⁶	6,76	2,95x10 ⁷	7,47	1,23x10 ⁹	9,09	8,32x10 ⁶	6,92
Vsi ovčji siri	Max	5,00x10 ⁹	9,70	1,82x10 ⁸	8,26	1,23x10 ⁹	9,09	5,36x10 ⁸	8,73
	3. kvartil	2,44x10 ⁷	7,39	3,32x10 ⁷	7,52	5,18x10 ⁸	8,71	1,31x10 ⁸	8,12
	Mediana	5,73x10 ⁶	6,76	2,86x10 ⁷	7,46	2,23x10 ⁸	8,35	5,55x10 ⁷	7,74
	1. kvartil	2,00x10 ³	3,30	1,05x10 ⁷	7,02	8,32x10 ⁷	7,92	8,32x10 ⁶	6,92
	Min	5,00x10 ¹	1,70	6,82x10 ²	2,83	2,89x10 ⁷	7,46	5,00x10 ²	2,70

OPOMBI:

- ^A za namene statistične analize smo vzorcem, v katerih je bilo število mikroorganizmov pod mejo detekcije, pripisali polovično vrednost števila mikroorganizmov najnižje analizirane koncentracije
- ^B za namene statistične analize smo vzorcu sira, pri katerem je število kolonij na gojišču v petrijevi plošči preseglo vrednost 300, pripisali ocenjeno vrednost 5,00x10⁹ ke/g

Priloga C1:
Prvi gel DGGE, na katerem je prikazana elektroforetska ločitev pomnožkov z metodo
DGGE



Legenda:

K₁, K₂, K₃ – vzorci Kraškega ovčjega sira;

D₁, D₂, D₃ – vzorci Dolenjskega ovčjega sira;

B₁, B₂, B₃ – vzorci Bovškega ovčjega sira;

1 – selektivno trdno gojišče KAA;

2 – selektivno trdno gojišče ROGOSA;

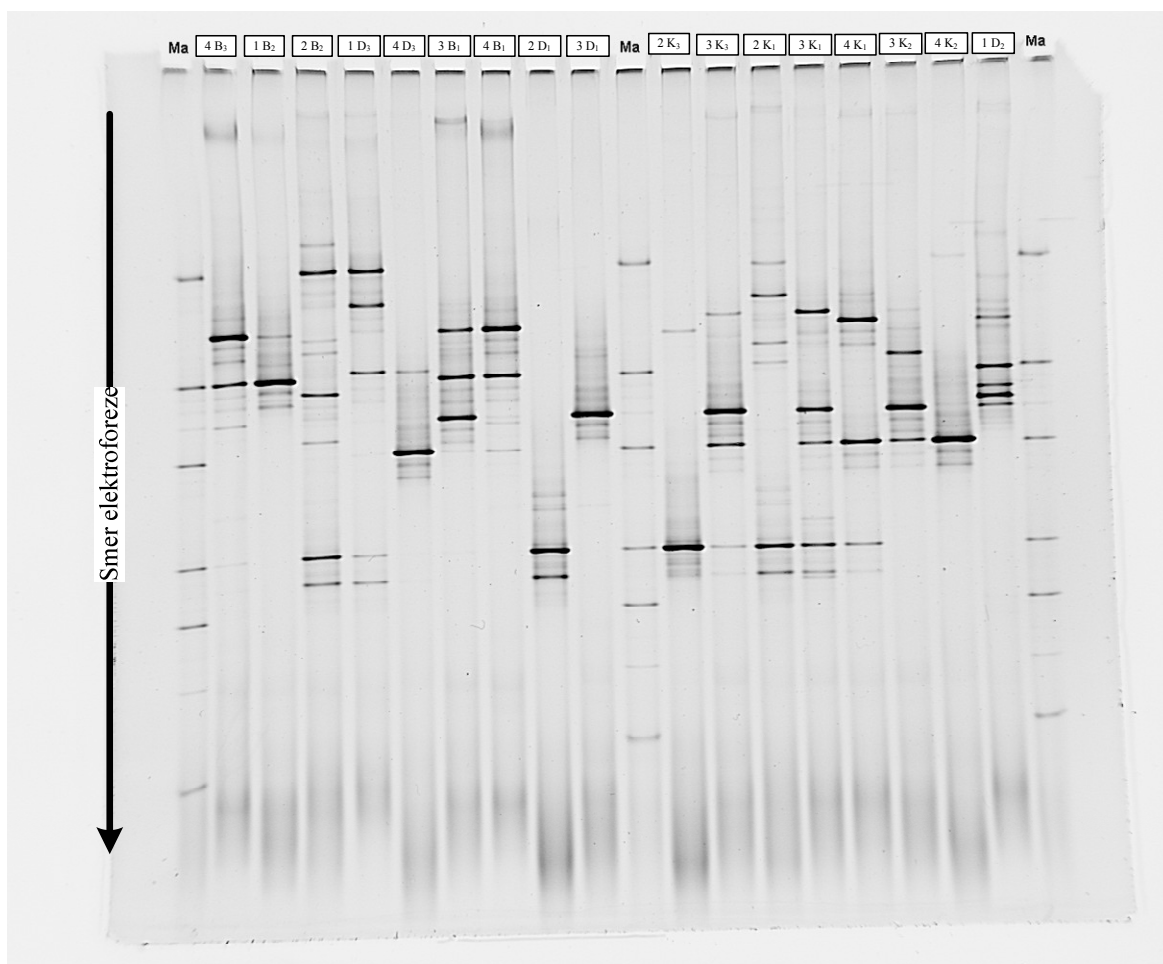
3 – selektivno trdno gojišče M17, inkubirano pri temperaturi 30 °C;

4 – selektivno trdno gojišče M17, inkubirano pri temperaturi 42 °C;

Ma in MII – označevalca, nanešena na gelu DGGE, ki sta sestavljena iz pomnožkov bakterijskih sevov

Lb. plantarum NCDO 1193, *Ent. faecalis* LMG 7937^T, *Bacillus cereus* IM 199, *Lb. rhamnosus* GG,
Bifidobacterium bifidum LMG 11041, *B. animalis* LMG 10508.

Priloga C2:
Drugi gel DGGE, na katerem je prikazana elektroforetska ločitev pomnožkov z metodo DGGE



Legenda:

K₁, K₂, K₃ – vzorci Kraškega ovčjega sira;

D₁, D₂, D₃ – vzorci Dolenjskega ovčjega sira;

B₁, B₂, B₃ – vzorci Bovškega ovčjega sira;

1 – selektivno trdno gojišče KAA;

2 – selektivno trdno gojišče ROGOSA;

3 – selektivno trdno gojišče M17, inkubirano pri temperaturi 30 °C;

4 – selektivno trdno gojišče M17, inkubirano pri temperaturi 42 °C;

Ma – označevalec, nanešen na začetku, na sredini in na koncu gela DGGE, ki je sestavljen iz pomnožkov bakterijskih sevov *Lb. plantarum* NCDO 1193, *Ent. faecalis* LMG 7937^T, *Bacillus cereus* IM 199, *Lb. rhamnosus* GG, *Bifidobacterium bifidum* LMG 11041, *B. animalis* LMG 10508.