

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Maja MARKIČ

**UPORABA AVTOHTONE STARTERSKE KULTURE  
V IZDELAVI TRADICIONALNEGA SIRA –  
PROUČEVANJE DINAMIKE MIKROBNE  
POPULACIJE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Maja MARKIČ

**UPORABA AVTOHTONE STARTERSKE KULTURE V IZDELAVI  
TRADICIONALNEGA SIRA – PROUČEVANJE DINAMIKE  
MIKROBNE POPULACIJE**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**THE USE OF AUTOCHTHONOUS STARTER CULTURE IN  
TRADITIONAL CHEESE PRODUCTION – THE STUDY OF THE  
MICROBIAL POPULATION DYNAMICS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za mlekarstvo in na Katedri za mlekarstvo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete, Univerze v ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Bogdana Perka, za somentorico doc. dr. Andrejo Čanžek Majhenič in za recenzentko prof. dr. Sonjo Smole Možina.

Mentor: prof. dr. Bogdan Perko

Somentorica: doc. dr. Andreja Čanžek Majhenič

Recenzentka: prof. dr. Sonja Smole Možina

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnjice Biotehniške fakultete.

Maja Markič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 637.354:636.3:579.67(043)=163.6
KG	siri/avtohtoni slovenski ovčji siri/Kraški ovčji sir/starterske kulture/avtohtone starterske kulture/sevi/mikrobna populacija/molekularne genetske metode/DNA/PCR/RAPD/protimikrobna aktivnost
AV	MARKIČ, Maja
SA	PERKO, Bogdan (mentor)/ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (somentorica)/SMOLE MOŽINA, Sonja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2016
IN	UPORABA AVTOHTONE STARTERSKE KULTURE V IZDELAVI TRADICIONALNEGA SIRA – PROUČEVANJE DINAMIKE MIKROBNE POPULACIJE
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 60 str., 15 pregl., 19 sl., 1pril., 77 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Namen naloge je bil proučiti dinamiko mikrobne populacije avtohtone starterske kulture med tradicionalnim postopkom izdelave sira in zorenjem ter ugotoviti, ali bo izbrana starterska kultura primerna za izdelavo kakovostnega in varnega avtohtonega sira. Izdelali smo dva tipa sirov. Prvi tip so bili siri z dodano mešanico sevov avtohtone starterske kulture, drugi tip sirov pa so bili siri, katerim smo poleg mešanice sevov avtohtone starterske kulture dodali še mešanico sevov stafilokokov. Starterska kultura je bila sestavljena iz sevov, ki so bili v predhodno opravljeni raziskavi osamljeni iz avtohtonega slovenskega kraškega ovčjega sira. V startersko kulturo pa so bili izbrani na osnovi njihovih tehnoloških in protimikrobnih lastnosti. Izbrani sevi so bili identificirani kot <i>Lactobacillus paracasei</i> (K2/4), <i>Lactobacillus brevis</i> (K3/5), <i>Lactobacillus paracasei</i> (K29/3), <i>Enterococcus faecalis</i> (K9/2), <i>Enterococcus</i> spp. (K29/7) in <i>Enterococcus faecalis</i> (K50/6). Med potekom izdelave in zorenjem sira smo spremljali potek fermentacije ter sire vzorcili za mikrobiološke in molekularne analize. Z nacepljanjem vzorcev sirov smo določali gibanje velikosti mikrobne populacije v sirih. DNK izolatov iz vzorcev sirov pa smo uporabili v reakciji RAPD-PCR, kjer smo z začetnim oligonukleotidom M13 skušali določiti identičnost uporabljenih sevov laktobacilov in enterokokov v siru med zorenjem. Pri določanju identičnosti laktobacilov nismo bili uspešni, uspešno pa smo potrdili identičnost enterokokov, s prevladajočim sevom K50/6, kar potruje izsledke predhodnih raziskav. Z metodo neposrednega stika smo ugotovili protimikroben učinek sira proti stafilokoku S17 skozi celotno 8-tedensko zorenje. Zaradi pogostega vzorčenja pa so siri zaplesneli in jih na koncu nismo senzorično ocenili. Z uporabo avtohtone starterske kulture smo uspešno izdelali sir, fermentacija je bila počasnejša, učinek proti dodanim stafilokokom pa ni dosegel naših pričakovanj. Sevi so za uporabo varni, v siru so sposobni rasti in se razmnoževati do konca zorenja in so prevladovali v mikrobski populaciji zrelega sira.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 637.354:636.3:579.67(043)=163.6  
CX cheeses/autochthonous slovenian ewe's cheeses/Karst ewe's cheese/starter culture  
/autochthonous starter culture/strains/microbial population/molecular genetic  
methods/DNA/PCR/RAPD/antimicrobial activity  
AU MARKIČ, Maja  
AA PERKO, Bogdan (supervisor)/ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (co-  
advisor)/SMOLE MOŽINA, Sonja (reviewer)  
PP SI-1000, Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and  
Technology  
PY 2016  
TI THE USE OF AUTOCHTHONOUS STARTER CULTURE IN TRADITIONAL  
CHESE PRODUCTION – THE STUDY OF THE MICROBIAL POPULATION  
DYNAMICS  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XI, 60 p., 15 tab., 19 fig., 1ann., 77 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The purpose of this work was to study the dynamics of microbial population of the indigenous starter culture during the traditional cheesemaking process and ripening period, and to further establish whether the selected starter culture is suitable for production of good quality and safe artisanal cheese. Cheeses of type one were produced by the blend of – strains of autochthonous starter culture, while for – the cheeses of type two in addition to the autochthonous starter culture the blend of staphylococci strains was used. Starter culture was composed of strains previously isolated from autochthonous slovenian Karst ewe's cheese that were selected into starter culture on the basis of their technological and antimicrobial activity. The selected strains were previously identified as *Lactobacillus paracasei* (K2/4), *Lactobacillus brevis* (K3/5), *Lactobacillus paracasei* (K29/3), *Enterococcus faecalis* (K9/2), *Enterococcus* spp. (K29/7) and *Enterococcus faecalis* (K50/6). During the cheesemaking and ripening period, fermentation was monitored, as well as cheeses were sampled for microbiological and molecular analysis. The dynamics and the counts of microbial population in cheeses were monitored by plate count technique, while DNA of isolates from cheese samples were subjected to RAPD-PCR analysis where the M13 primer was used to determine the identity of used strains of lactobacilli and enterococci. The determination of lactobacilli identity failed, while the determination of enterococci identity was successful with the K50/6 being the predominant strain that is in accordance with previous findings. With the method of direct contact the antimicrobial activity of cheese samples against staphylococci S17 throughout 8-weeks ripening was demonstrated. By the use of indigenous starter culture cheeses were successfully produced but

fermentation was slower and activity against staphylococci population did not reach our expectations.

## KAZALO VSEBINE

	Str.
<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....</b>	
<b>III</b>	
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....</b>	
<b>IV</b>	
<b>KAZALO VSEBINE.....</b>	
<b>V</b>	
<b>KAZALO PREGLEDNIC.....</b>	
<b>IX</b>	
<b>KAZALO SLIK.....</b>	
<b>X</b>	
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....</b>	
<b>XI</b>	
<b>1 UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1 CILJ NALOGE.....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE .....	
2	
<b>2 PREGLED OBJAV.....</b>	
3	
2.1 TRADICIONALNI SLOVENSKI SIRI.....	3
2.2 KRAŠKI OVČJI SIR .....	
3	
2.3 MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE V SIRARSTVU.....	
4	
<b>2.3.1 Protimikrobnna aktivnost MKB.....</b>	
4	
2.3.1.1 Organske kisline.....	
5	
2.3.1.2 Vodikov peroksid.....	
5	
2.3.1.3 Ogljikov dioksid.....	
6	
2.3.1.4 Diacetil.....	
6	
2.3.1.5 Nizko molekularne protimikrobnne snovi.....	
6	
2.3.1.6 Bakteriocini MKB.....	
6	

<b>2.4 MIKROBNA ZDRUŽBA V TRADICIONALNIH SIRIH.....</b>	<b>7</b>
<b>2.4.1 Dinamika mikrobne populacije v tradicionalnih sirih.....</b>	<b>8</b>
<b>2.4.2 Mikrobna združba avtohtonega kraškega ovčjega sira.....</b>	<b>9</b>
<b>2.5 STARTERSKE KULTURE.....</b>	<b>10</b>
<b>2.5.1 Zaščitne starterske kulture .....</b>	<b>11</b>
<b>3 MATERIAL IN METODE.....</b>	<b>13</b>
<b>3.1 NAČRT DELA.....</b>	<b>13</b>
<b>3.2 MATERIAL.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.1 Mleko.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.2 Sirišče.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.3 Bakterijski sevi.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.4 Gojišča.....</b>	<b>17</b>
3.2.4.1 Tekoča gojišča in raztopine za razredčevanje.....	17
3.2.4.1.1 MRS (kat. št. 1.10660).....	17
3.2.4.1.2 M17 (kat. št. 1.15029).....	17
3.2.4.1.3 Brain heart infusion broth (BHI) (kat. št. 1.10493).....	17
3.2.4.1.4 ¼ Ringerjeva raztopina (kat. št. 1.15525).....	17
3.2.4.1.5 Raztopina dikalijevega hidrogen fosfata (kat. št. 1.05104).....	17
3.2.4.2 Trda gojišča.....	17
3.2.4.2.1 MRS (kat. št. 1.10661).....	17
3.2.4.2.2 M17 (kat. št. 1.15108).....	17
3.2.4.2.3 Brain heart infusion agar (BHI) (kat. št. 1.10493).....	18
3.2.4.2.4 Rogosa (kat. št. 1.05413).....	18
3.2.4.2.5 CATC (Citrat Azide Carbonate) (kat. št. 1.10279).....	18
3.2.4.2.6 Baird parker (BP) (kat. št. 4011162).....	18
3.2.4.2.7 Violet red bile (VRB) (kat. št. 1.01406).....	18

3.2.4.2.8 Agar bacteriological (agar agar) (kat. št. 4.11030).....	18
3.2.4.3 Poltrda gojišča.....	18
3.2.4.3.1 Brain heart infusion soft agar (BHI soft) (kat. št. 1.100493).....	18
<b>3.2.5 Kemikalije in suplementi.....</b>	<b>19</b>
3.2.5.1 Kemikalije za mikrobiološke analize.....	19
3.2.5.1.1 Oacetna kislina (kat. št. 45731).....	19
3.2.5.1.2 Citratni pufer (CP).....	19
3.2.5.1.3 Natrijev citrat dihidrat (kat. št. 1405407).....	19
3.2.5.1.4 Citronska kislina (kat. št. 1.00244).....	19
3.2.5.2 Suplementi za mikrobiološke analize.....	19
3.2.5.2.1 Natrijev karbonat (kat. št. 1.06498).....	19
3.2.5.2.2 2,3,5-trifenil tetrazolijev klorid (kat. št. 1.08380).....	19
3.2.5.2.3 Natrijev azid (kat. št. 1.06688).....	20
3.2.5.2.4 Rabbit Plasma Fibrinogen (RPF) (kat. št. 423101).....	20
3.2.5.3 Kemikalije za izolacijo DNK.....	20
3.2.5.4 Kemikalije in encimi za reakcijo RAPD-PCR.....	20
3.2.5.5 Kemikalije za izvedbo elektroforeze.....	21
3.2.5.5.1 Tris Acetatni EDTA pufer (TAE pufer).....	21
3.2.5.5.2 Agaroza (kat. št. 9539).....	A-21
<b>3.2.6 Laboratorijska oprema.....</b>	<b>21</b>
<b>3.3 METODE.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3.1 Tehnološki postopek izdelave sira.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3.2 Priprava avtohtone starterske kulture in izbranih stafilokokov.....</b>	<b>22</b>
<b>3.3.3 Merjenje vrednosti pH.....</b>	<b>23</b>

<b>3.3.4 Vzorčenje.....</b>	<b>23</b>
3.3.4.1 Vzorčenje mleka.....	23
3.3.4.1.1 Vzorčenje mleka za kemijsko analizo.....	23
3.3.4.1.2 Vzorčenje mleka za mikrobiološko analizo.....	23
3.3.4.2 Vzorčenje sirnine in sirov.....	24
<b>3.3.5 Določanje mikrobne populacije v vzorcih mleka in sirov.....</b>	<b>24</b>
3.3.5.1 Določanje velikosti mikrobne populacije čistih kultur.....	24
3.3.5.2 Določanje velikosti mikrobne populacije v termiziranem mleku.....	25
3.3.5.3 Določanje velikosti mikrobne populacije v inokuliranem mleku.....	25
3.3.5.4 Določanje velikosti mikrobne populacije v siru med zorenjem.....	25
<b>3.3.6 Ugotavljanje prisotnosti bakterij rodu <i>Lactobacillus</i> in rodu <i>Enterococcus</i> v siru med zorenjem s pregledom morfologije.....</b>	<b>26</b>
<b>3.3.7 Ugotavljanje identičnosti sevov avtohtone starterske kulture v vzorcih sira med in ob koncu zorenja.....</b>	<b>27</b>
3.3.7.1 Izolacija laktobacilov in enterokokov iz vzorcev sira.....	27
3.3.7.2 Izolacija DNK.....	27
3.3.7.3 Reakcija RAPD-PCR.....	27
<b>3.3.8 Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti vzorcev sira.....</b>	<b>28</b>
3.3.8.1 Metoda 1 – metoda z neposrednim stikom.....	28
3.3.8.2 Metoda 2 – ekstrakcijska metoda s K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	28
3.3.8.3 Metoda 3 – ekstrakcijska metoda s CP.....	29
3.3.8.4 Metoda 4 – ekstrakcijska metoda s toplo vodo.....	29
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1 KEMIJSKA ANALIZA MLEKA.....</b>	
32	

4.2 VREDNOST pH SIRA.....	32
4.2.1 Vrednost pH med stiskanjem sira.....	32
4.2.2 Vrednost pH med zorenjem sira.....	
33	
4.3 VELIKOST POPULACIJE ČISTIH KULTUR.....	
33	
4.4 UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI KOLIFORMNIH MIKROORGANIZMOV V TERMIZIRANEM MLEKU.....	
34	
4.5 MIKROBIOLOŠKA SLIKA V MLEKU IN SIRIH.....	
34	
4.5.1 Velikost populacije posameznih skupin mikroorganizmov v inokuliranem mleku.....	
34	
4.5.2 Velikost populacije posameznih skupin mikroorganizmov v sirnini.....	35
4.5.3 Velikost populacije posameznih skupin mikroorganizmov med zorenjem sira.....	35
4.6 UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI LAKTOBACILOV IN ENTEROKOKOV V SIRU MED ZORENJEM S PREGLEDOM MORFOLOGIJE.....	
38	
4.6.1 Ugotavljanje prisotnosti laktobacilov.....	
38	
4.6.2 Ugotavljanje prisotnosti enterokokov.....	38
4.7 UGOTAVLJANJE IDENTIČNOSTI LAKTOBACILOV IN ENTEROKOKOV.....	
39	
4.7.1 Ugotavljanje identičnosti laktobacilov z metodo RAPD-PCR.....	
39	
4.7.2 Ugotavljanje identičnosti enterokokov z metodo RAPD-PCR.....	
40	
4.8 PROTIMIKROBNA AKTIVNOST.....	42
4.8.1 Metoda 1 – metoda z neposrednim stikom.....	
42	
4.8.2 Metoda 2 – ekstrakcijska metoda s $K_2HPO_4$ .....	
43	
4.8.3 Metoda 3 - ekstrakcijska metoda s CP.....	
43	

<b>4.8.4 Metoda 4 - ekstrakcijska metoda s toplo vodo.....</b>	<b>43</b>
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>44</b>
5.1 RAZPRAVA.....	
44	
5.2 SKLEPI.....	
51	
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>52</b>
<b>7 VIRI.....</b>	<b>54</b>
<b>ZAHVALA</b>	
<b>PRILOGE</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
<b>Preglednica 1:</b> Bakterijski sevi, ki smo jih uporabili pri poskusu.....	16
<b>Preglednica 2:</b> Sestava reakcijske mešanice za en vzorec PCR, v skupnem volumnu 20 µl (Torrianni in sod., 1999).....	21
<b>Preglednica 3:</b> Gojišča in pogoji inkubacije za določanje velikosti populacij čistih kultur.....	24
<b>Preglednica 4:</b> Selektivna gojišča in pogoji inkubacije za določanje skupin MO v inokuliranem mleku.....	25
<b>Preglednica 5:</b> Selektivna gojišča in pogoji inkubacije za določanje skupin MO v sirih med zorenjem.....	26
<b>Preglednica 6:</b> Parametri reakcije RAPD-PCR.....	28
<b>Preglednica 7:</b> Začetne in končne vrednosti pH kontrolnih sirov med stiskanjem sira.....	32
<b>Preglednica 8:</b> Začetne in končne vrednosti pH sirov z dodanimi stafilokoki med stiskanjem sira.....	32
<b>Preglednica 9:</b> Število ke/ml čistih kultur rodu <i>Lactobacillus</i> .....	34
<b>Preglednica 10:</b> Število ke/ml čistih kultur rodu <i>Enterococcus</i> .....	34
<b>Preglednica 11:</b> Število ke/ml čistih kultur rodu <i>Staphylococcus</i> .....	34
<b>Preglednica 12:</b> Število ke/ml posameznih skupin MO v inokuliranem mleku.....	35
<b>Preglednica 13:</b> Število ke/g posameznih skupin MO v sirnini.....	35
<b>Preglednica 14:</b> Velikost populacije laktobacilov in enterokokov v kontrolnih sirih med zorenjem.....	35
<b>Preglednica 15:</b> Velikost populacije laktobacilov, enterokokov in stafilokokov v sirih z dodanimi stafilokoki med zorenjem.....	36



## KAZALO SLIK

	Str.
<b>Slika 1:</b> Prikaz identifikacije izolatov iz slovenskih tradicionalnih ovčjih sirov, pridobljeni s fenotipsko (BIOLOG) in genotipsko (PCR) metodo (Paveljšek, 2012).....	8
<b>Slika 2:</b> Shema tehnološkega postopka izdelave in vzorčenja sirov.....	14
<b>Slika 3:</b> Shema opravljenih analiz odvzetih vzorcev sira.....	15
<b>Slika 4:</b> Shema priprave plošč z ekstrakti iz sira pripravljenih po metodi 2.....	30
<b>Slika 5:</b> Shema priprave plošč z ekstrakti iz sira pripravljenih po metodi 3 in 4.....	30
<b>Slika 6:</b> Shema priprave ekstraktov.....	31
<b>Slika 7:</b> Spreminjanje vrednosti pH kontrolnih sirov (K1, K2, K3) in sirov z dodanimi stafilokoki (ST1, ST2, ST3) med zorenjem.....	33
<b>Slika 8:</b> Povprečno število laktobacilov in enterokokov v vzorcih kontrolnih sirov brez dodanih stafilokokov ob različnih časih zorenja.....	37
<b>Slika 9:</b> Povprečno število laktobacilov, enterokokov in stafilokokov v vzorcih sirov z dodanimi stafilokoki ob različnih časih zorenja.....	37
<b>Slika 10:</b> Rezultati ugotavljanja identičnosti bakterij rodu <i>Lactobacillus</i> z metodo RAPD-PCR v siru K1 na začetku zorenja (K1; t <sub>0</sub> ).....	39
<b>Slika 11:</b> Rezultati ugotavljanja identičnosti bakterij rodu <i>Lactobacillus</i> z metodo RAPD-PCR v siru K1 po 6 tednih zorenja (K1; t <sub>6</sub> ).....	40
<b>Slika 12:</b> Rezultati ugotavljanja identičnosti rodu <i>Enterococcus</i> z metodo RAPD-PCR v siru K2 po 2 tednih zorenja (K2; t <sub>2</sub> ).....	41
<b>Slika 13:</b> Rezultati ugotavljanja identičnosti rodu <i>Enterococcus</i> z metodo RAPD-PCR v siru K2 po 8 tednih zorenja (K2; t <sub>8</sub> ).....	41
<b>Slika 14:</b> Inhibicijska cona; sir K1/t <sub>0</sub> ; indikator S17 (Foto: Čanžek Majhenič).....	42
<b>Slika 15:</b> Inhibicijska cona; sir K2/t <sub>2</sub> ; indikator S17 (Foto: Čanžek Majhenič).....	42
<b>Slika 16:</b> Inhibicijska cona; sir K3/t <sub>4</sub> ; indikator S17 (Foto: Markič).....	42
<b>Slika 17:</b> Inhibicijska cona; sir K1/t <sub>6</sub> ; indikator S17 (Foto: Markič).....	42
<b>Slika 18:</b> Inhibicijska cona; sir K2/t <sub>8</sub> ; indikator S17 (Foto: Markič).....	42
<b>Slika 19:</b> Inhibicijska cona ekstrakta Sn3, iz sira K1 vzorčenega po t <sub>0</sub> , proti indikatorskem stafilokoku S17 (Foto: Markič).....	43



## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BHI	Brain heart broth (gojišče)
BP	Baird-Parker (gojišče)
bp	bazni pari
CATC	citrat azid tween carbonate (gojišče)
CP	citratni pufer
DNK	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotidtrifosfat
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
<i>Ent.</i>	<i>Enterococcus</i>
kat.	kataloška (kataloška številka)
ke	kolonijske enote
ke/g	kolonijske enote na gram
ke/ml	kolonijske enote na mililiter
<i>Lac.</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Leuc</i>	<i>Leuconostoc</i>
<i>List.</i>	<i>Listeria</i>
log	desetiški logaritem
M	molarnost (mol/l)
M17	Terzaghi bujon in agar (gojišče)
MKB	mlečnokislinske bakterije
MO	mikroorganizmi
MRS	De Man, Rogosa, Sharp (gojišče)
NMKB	nestarterska združba MKB
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
RAPD	naključno pomnožena polimorfna DNA (angl. randomly amplified polymorphic DNA) fibrinogen iz zajčeje plazme (angl. rabbit plasma fibrinogen)
RPF	
fibrinogen)	
rpm	obratov na minuto
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
spp.	vrsta (angl. species)
subsp.	podvrsta (angl. subspecies)
<i>Str.</i>	<i>Streptococcus</i>
t	čas
TAE	tris acetatni EDTA pufer
TRIS	tris-hidroksi-metil-amino metan
UV	ultravijolična svetloba
VRB	violet red bile (gojišče)
µl	mikro liter

## 1 UVOD

Avtohtonja živila imajo v proizvodnji živilskih izdelkov posebno mesto. Dandanes namreč vse bolj narašča strah pred aditivi, konzervansi in novimi povzročitelji bolezni, ki se prenašajo s hrano. Izvirnim avtohtonim in tradicionalnim izdelkom potrošniki bolj zaupajo, da so naravni in tudi bolj zdravi. Posledično se povečuje povpraševanje po izdelkih z individualnimi značilnostmi, ki izvirajo iz posebnih metod pri- ali predelave ali pa so znanega porekla (slovenska kakovost). Med tovrstnimi mlečnimi izdelki imajo pomembno mesto tradicionalni siri, saj predstavlja precejšen delež v slovenski proizvodnji sira. Na karakteristične lastnosti sira poleg vrste in kakovosti mleka ter tehnološkega postopka močno vpliva tudi mikrobiota, ki v največji meri sodeluje pri oblikovanju senzoričnih lastnosti sirov, saj v procesu zorenja sira povzroči preoblikovanje sirnine v sir značilnih organoleptičnih lastnosti. Za ohranjanje vrste sirov, narejenih po tradicionalnih postopkih je bistvenega pomena ohranjanje naravnih mikrobnih združb in specifičnih sevov prav tako pa je potrebno zagotoviti varnost tovrstnih izdelkov. Zato posebno pozornost pri proučevanju avtohtonih sirov posvečamo ravno mikrobioti.

Večina avtohtonih sirov je narejena po tradicionalni metodi iz surovega mleka in zato predstavlja zdravstveno tveganje, saj vsebujejo zelo raznoliko mikrobioto. Ta se precej razlikuje od mikrobiote industrijskih sirov, narejenih z izbranimi in definiranimi starterskimi kulturami. Potrebno je najti način, kako nadgraditi proizvodnjo tradicionalnih sirov na industrijsko raven in hkrati ohraniti edinstvene značilnosti tradicionalne proizvodnje. Toplotna obdelava mleka bi povzročila izgubo te raznolike mikrobiote, zato je lahko rešitev za zagotavljanje varnosti tovrstnih izdelkov v uporabi mikrobnih združb, pridobljenih iz tradicionalnih sirov, ki so s tvorbo bakteriocinov sposobne zavirati patogene mikroorganizme (MO) in hkrati ohranjajo želeno mikrobioto, ki daje tradicionalnim sirom tipične senzorične lastnosti.

Ker je *Staphylococcus aureus* pogost kontaminant tradicionalnih sirov je še posebno pomembno določanje in izoliranje bakteriocinogenih sevov s protistafilokokno aktivnostjo iz tradicionalnih sirov (Rogelj 2010).

Eden tovrstnih tradicionalnih slovenskih sirov je tudi kraški ovčji sir katerega izdelava ima na območju Krasa več stoletno tradicijo. Na njegovo edinstveno aromo in tekstuру vpliva več pomembnih dejavnikov kot so pasma ovc, specifičnost kraške pokrajine, podnebje in sestava tal, rastlinske združbe, sestava mleka, mikrobiota in nenazadnje zelo ugodna klima za zorenje, sušenje ter skladiščenje sira (Renčelj in sod., 2008).

## 1.1 CILJ NALOGE

Cilj diplomske naloge je bil proučiti dinamiko mikrobne populacije avtohtone starterske kulture med tradicionalnim postopkom izdelave sira in zorenjem ter ugotoviti ali bo izbrana starterska kultura primerna za izdelavo kakovostnega in varnega avtohtonega sira.

## 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Avtohtona starterska kultura bo zagotovila pravilen potek fermentacije in zorenja sira ter bo ta kultura prevladujoča mikrobiota zrelega sira.
- Mogoče bo potrditi protimikrobnو delovanje starterske kulture proti stafilokokom in posledično zaviranje njihove rasti.
- Sir narejen z uporabo avtohtone starterske kulture bo senzorično ustrezен.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 TRADICIONALNI SLOVENSKI SIRI

O pomembnosti sirarstva v Sloveniji in njegovi dolgoletni tradiciji pričajo prvi zapisi o slovenskem sirarstvu, ki segajo v 12. stoletje. Današnji slovenski tradicionalni siri pa so nasledniki razvoja planinskega sirarstva iz druge polovice 19. stoletja (Renčelj in sod., 1995).

Tradisionalni slovenski siri imajo še poseben pomen, ker so izdelani po izvirnih tehnologijah, ki se prenašajo iz roda v rod. Zaradi vpliva novejše tehnologije na razvoj sirarstva se politika Evropske unije zavzema za ohranjanje tradicionalnih živilskih izdelkov in označbo njihovega porekla. Zato s svojo zakonodajo omogoča državam članicam zaščito teh izdelkov ter tako ohraniti posebne lastnosti tovrstnih izdelkov in zagotoviti njihovo varnost za potrošnika. Zelo pomembna je označba geografskega porekla z nacionalno in evropsko uvedbo pravilnikov o zaščiti geografskih označb in označb porekla za kmetijske proizvode in živila s katero smo zaščitili že pet tradicionalnih slovenskih sirov. To so Kraški ovčji sir (Pravilnik o Kraškem ovčjem siru z zaščiteno označbo porekla, 2008), Tolminc (Pravilnik o označbi geografskega porekla Tolminc, 2003), Nanoški sir (Pravilnik o označbi geografskega porekla Nanoški sir, 2003), Bovški sir (Pravilnik o označbi geografskega porekla Bovški sir, 2004) in Mohant (Pravilnik o označbi geografskega porekla Mohant, 2004).

Tradisionalni siri so večinoma izdelani iz surovega mleka, na katerega kemijsko in mikrobiološko sestavo vplivajo specifične klimatske razmere in floristična raznovrstnost. Poleg tradisionalnega tehnološkega sirarskega postopka na značilne lastnosti in prepoznavnost tovrstnih sirov vpliva tudi avtohtonata mikrobiota, ki izvira iz surovega mleka, sirarske opreme in okolja. Ta mikrobiota pa siru daje značilen vonj, okus in aroma zaradi katerih se tradisionalni siri razlikujejo od množice ostalih sirov (Renčelj in sod., 2008).

### 2.2 KRAŠKI OVČJI SIR

Kraški ovčji sir, tradisionalni slovenski trdi sir se proizvaja iz polnomastnega ovčjega mleka na aridnem območju Krasa, kjer se prepletata mediteranska in celinska klima. Izdelava Kraškega ovčjega sira ima dolgoletno tradicijo. Na njegove lastnosti vplivajo lokalni dejavniki kot so pasma ovc, specifičnost kraške pokrajine, kraško podnebje, sestava tal, travinje ter kemijska in mikrobiološka sestava mleka pridelanega na krasu, mikrobiota ter nenazadnje tudi pogoji skladiščenja. Zorenje kraškega sira je celosten proces mikrobioloških, kemijskih in fizikalnih sprememb sirnine. Razvoj značilnega okusa, arome in tekture je rezultat procesov, ki se pričnejo že v surovem mleku in se nadaljujejo med potekom izdelave in stiskanjem sira ter se končajo med zorenjem sira v zorilnici (Gerželj, 2006).

Sir tradicionalno izdelujejo iz surovega ali termično obdelanega mleka, ki ga segrejejo na temperaturo 31 do 33 °C in mu dodajo toliko sirišča (himozina ali himozin-pepsina), da mleko v 30 do 40 minutah koagulira. Za startersko kulturo mleku dodajajo fermentirano sekundarno sirotko - kisavo ali selekcionirane termofilne mlečnokislinske bakterije (MKB). Koagulum razrežejo počasi, da dobijo sirno zrno enakomerne velikosti, ki ga potem sušijo – počasi dogrevajo pri temperaturi 38 do 42 °C do primerne klenosti. Sirno zrno nato ločijo od sirotke, ga prenesejo v oblikovala in v stiskalnici oblikujejo 12 do 18 ur. Sir po stiskanju solijo 24 ur v slanici z 20 % raztopino kuhinjske soli pri temperaturi 13 do 18 °C. Suh postopek soljenja pa traja 3 do 6 dni pri temperaturi 15 do 18 °C. Nato osušene hlebce v zorilnici zorijo najmanj 2 do 3 mesece, izjemoma pa do 1 leta. Zorenje poteka pri temperaturi 15 do 18 °C in pri relativni vlagi 75 do 85 % (Renčelj in sod., 2008).

Za kraški ovčji sir je značilno, da je sir trdega tipa, po obliku okrogli hlebec težak 2,5 do 5 kg, premera 20 do 26 cm in višine 9 do 10 cm. Skorja sira je gladka, ravna, obodna stran lahko rahlo izbočena, rumenkasto-rjave barve. Testo na prerezu je kompaktno, povezano, lomljivo vendar ne drobljivo, enakomerne svetlo-rumenkasto-rjave barve, brez očes ali z drobnimi redkimi očesi. Prisotna je lahko drobna luknjičavost ali drobne razpoke, ki pa ne prevladujejo. Testo starejših sirov je bolj kompaktno, do školjkasto lomljivo. Po okusu in vonju je aromatičen, intenziven, poln, do rahlo pikanten, značilen za ovčji sir. Glavne kemične sestavine so najmanj 60 % suhe snovi, najmanj 45 % maščobe v suhi snovi in od 2 do 4 % soli v konzumni zrelosti (Renčelj in sod., 2008).

## 2.3 MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE V SIRARSTVU

MKB so po Gramu pozitivne, nesporulirajoče, mikroaerofilne ali fakultativno anaerobne bakterije, katerih glavni produkt fermentacije je mlečna kislina. Med MKB najdemo kokoidne (*Lactococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*) in paličaste (*Lactobacillus*, *Carnobacterium*) bakterije (De Vuyst in Vandamme, 1994).

Glavna lastnost MKB je tvorba kisline - še posebno mlečne kisline iz laktoze, ta pa je pomembna za trajnost izdelka, njegovo teksturo in aroma. Med fermentacijo laktoze in citrata pa se tvorijo tudi druge spojine, kot so diacetil, CO<sub>2</sub>, eksopolisaharidi, ki vplivajo na okus, teksturo in sestavo izdelka. Nenazadnje pa združba MKB s svojimi encimi povzroča reakciji razgradnje beljakovin in maščob, ki sta tudi bistveni za razvoj arome in tekture sira. Tako z uporabo MKB sir in druge mlečne izdelke konzerviramo – jim podaljšamo rok uporabe, dosežemo večjo varnost tovrstnih izdelkov, vplivamo na njihov okus, aroma in teksturo. Poleg tega pogosto vplivajo na prebavljalivost in prehransko vrednost izdelkov. V proizvodnji sirov v večini primerov uporabljamo startersko kulturo. Na ta način s poznanjem lastnosti bakterijskih vrst in sevov, katere vključimo v startersko kulturo lahko vplivamo na lastnosti, ki jih želimo v končnem izdelku (Walstra in sod., 2006).

### 2.3.1 Protimikrobnna aktivnost MKB

Ob fermentaciji MKB nastajajo primarni metaboliti (organske kisline, vodikov peroksid, acetaldehyd, diacetil, prosti radikali, D-izomere aminokislin, bakteriocini) in sekundarni metaboliti (proteolitični in lipolitični encimi), ki so za izdelavo vseh vrst sirov bistvenega pomena. MKB s svojimi metaboliti zagotavljajo potek tvorbe kisline v pravilnem obsegu, delujejo protimikrobnno in imajo glavno vlogo pri biokemijskih procesih zorenja sira (Fox in McSweeney, 1998). S fermentacijo se v substratu zmanjša količina dostopnih ogljikovih hidratov, nastali produkti primarnega in sekundarnega metabolizma pa imajo protimikrobnii učinek. Od lastnosti posameznih snovi in njihovih medsebojnih interakcij je odvisen njihov skupni učinek (De Vuyst in Vandamme, 1994).

Izločki MKB s protimikrobnim učinkom so:

- vodikov peroksid,
- ogljikov dioksid,
- diacetil,
- organske kisline
- nizko molekularne protimikrobane snovi
- bakteriocini (Ouwenhand in Vesterlund, 2004).

### 2.3.1.1 Organske kisline

Poglavitne pri protimikrobnem delovanju so organske kisline, predvsem mlečna in ocetna. Poleg zniževanja vrednosti pH imajo protimikrobnne učinke na mikrobne celice s tem, da nedisociirane vstopajo v celice, kjer disociirajo. Pri fermentaciji heksoz po homofermentativni poti nastane mlečna kislina, pri heterofermentativnem metabolizmu pa nastanejo poleg mlečne kisline še ocetna kislina, etanol in ogljikov dioksid. Znano je, da imajo šibke kisline bistveno močnejši protimikrobnii učinek, kot močne kisline, tako pri nizkih kot pri nevtralnih vrednostih pH. Ocetna kislina ima večji zaviralni učinek od mlečne kisline in deluje zaviralno proti kvasovkam, plesnim in bakterijam, s čemer dosežemo pozitivni učinek pri ohranjanju kakovosti fermentiranih živil. Ugotovljeno je, da vzajemno delovanje ocetne in mlečne kisline zavira bakterije iz rodu *Salmonella*, saj po vstopu v celico porušita ravnotežje pH in s tem zaustavita rast in razvoj. Akumulacija kislin znižuje vrednost pH medija in spodbuja nastanek vodikovega peroksidu, predvsem pa ima zaviralni učinek proti po Gramu pozitivnim in po Gramu negativnim bakterijam. Organske kisline torej zavirajo rast raznih škodljivih MO v hrani, kot so plesni in nezaželjene bakterije ter s tem podaljšajo obstojnost in kakovost izdelka (De Vuyst in Vandamme, 1994; Caplice in Fitzgerald, 1999; Ouwenhand in Vesterlund, 2004).

### 2.3.1.2 Vodikov peroksid

Nekatere MKB so sposobne ob prisotnosti kisika proizvajati  $H_2O_2$ . Njegov baktericidni učinek se odrazi v močnem oksidacijskem potencialu, ki deluje na bakterijsko celico oziroma celično membrano tako, da se sulfhidrilne skupine celičnih proteinov in lipidne komponente oksidirajo. Vloga  $H_2O_2$  pride še bolj do izraza ob prisotnosti tiocianata, ki ga oksidira do produktov z baktericidnim delovanjem, s čemer se poškoduje celična membrana in onemogoči normalni celični transport. Aktivnost  $H_2O_2$  proti po Gramu

pozitivnim bakterijam je v glavnem bakteriostatične narave, medtem ko na po Gramu negativne bakterije deluje baktericidno (De Vuyst in Vandamme, 1994).

#### 2.3.1.3 Ogljikov dioksid

CO<sub>2</sub> večinoma nastane pri heterofermentativni razgradnji heksoz. Protimikrobní učinek CO<sub>2</sub> se odraža v ustvarjanju anaerobnih pogojev, ki preprečujejo encimsko dekarboksilacijo. Akumulacija CO<sub>2</sub> v celici privede do poškodb oziroma dezintegracije celične membrane, kar povzroči lizo celic (De Vuyst in Vandamme, 1994).

#### 2.3.1.4 Diacetil

Proizvodnja diacetila je najznačilnejša za MKB rodu *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* in *Streptococcus*, proizvajajo pa ga tudi drugi rodovi MKB. Diacetil se tvori pri metabolizmu citrata. Metabolna pot gre preko piruvata v diacetil. Diacetil ima boljši protimikrobní učinek pri vrednostih pH, ki so nižje od 7 (De Vuyst in Vandamme, 1994; Ouwenhand in Vesterlund, 2004).

#### 2.3.1.5 Nizko molekularne protimikrobne snovi

Nizko molekularne protimikrobne snovi so snovi, ki jih tvorijo MKB in so aktivne pri nizki vrednosti pH, so termostabilne, imajo širok spekter aktivnosti in so topne v acetonu. Najbolj poznani od nizko molekularnih protimikrobnih snovi sta reuterin in reuterociklin. Proizvaja ju *Lb. reuteri*, ki naseljuje prebavni sistem ljudi in živali. Poznana pa je tudi piroglutaminska kislina, ki jo proizvajajo sevi *Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb. casei* subsp. *pseudoplantarum* in *Str. bovis* (Caplice in Fitzgerald, 1999; Ouwenhand in Vesterlund, 2004).

#### 2.3.1.6 Bakteriocini MKB

Bakteriocini so po 40 let stari definiciji proteini ali proteinski kompleksi, ki jih proizvajajo številne MKB in bakteriocidno delujejo na druge bakterije, ki navadno pripadajo istim ali sorodnim bakterijskim vrstam (Tagg in sod., 1976). Definicija velja za večino že raziskanih bakteriocinov, vendar je znanih vedno več bakteriocinov s širšim spektrom protimikrobnega delovanja, ki vključuje tudi nesorodne bakterije, celo iz patogenih vrst. Bakteriocini se v literaturi pogosto zamenjujejo za antibiotike, vendar se od njih ločijo po sintezi, načinu delovanja, protimikrobnem spektru, toksičnosti, mehanizmih odpornosti in imunosti gostiteljskega seva. Bakteriocini MKB so za uporabo varni in učinkovito nadzirajo rast tarčnih patogenih bakterij v hrani. Bakteriocini lahko živilom podaljšajo obstojnost, zagotovijo bakteriološko varnost, kontrolirajo fermentacijo in izboljšajo kakovost. Bakteriocini pridobivajo na pomenu, saj lahko v celoti ali vsaj delno nadomestijo uporabo kemičnih konzervansov in nekaterih kemičnih postopkov, ki živilom zmanjšajo biološko vrednost (Cleveland in sod., 2001).

## 2.4 MIKROBNA ZDRUŽBA V TRADICIONALNIH SIRIH

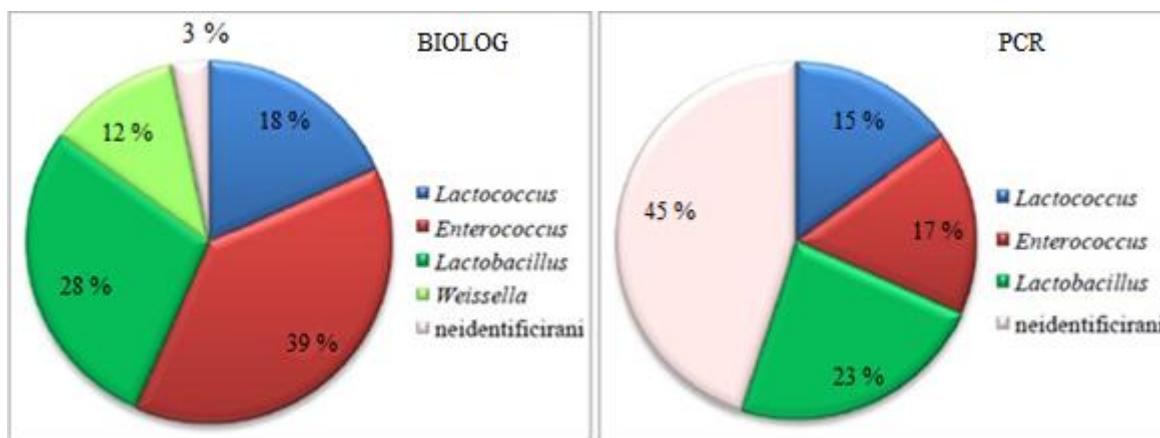
Bistveni sestavni del večine sirov so MO, saj imajo pomembno vlogo tako med fazo izdelave sira kakor tudi med fazo zorenja, ki vključuje številne zapletene biokemiske, fizikalne in mikrobiološke spremembe. V siru prevladujejo MKB, prisotne pa so tudi druge bakterije, kvasovke in plesni. Vse skupine MO v siru se povezujejo v kompleksen mikrobni ekosistem, ki sodeluje pri zorenju sira. Mikrobno združbo sirov razdelimo v dve skupini: starterske MKB in sekundarni MO. Starterske MKB med izdelavo sira proizvajajo kislino in s svojimi encimi prispevajo k zorenju. Sekundarni MO pa ne prispevajo k proizvodnji kisline toda igrajo pomembno vlogo med zorenjem sira. Sekundarni MO obsegajo nestartersko združbo MKB (NMKB), propionske bakterije, bakterije, kvasovke in plesni, ki rastejo v siru ali na površini sira in so običajno značilne za določene vrste sira (Beresford in sod., 2001).

NMKB so naključna mikrobna združba, sposobna rasti pod selektivnimi pogoji zorenja sira. Te bakterije pridejo v sir iz surovega mleka in kot posledica kontaminacije mleka po termizaciji z mlekarske opreme ali iz okolja (McSweeney in sod., 1993). NMKB so večji del laktobacili in enterokoki ter občasno pediokoki in leukonostok (Cogan in sod., 1997). NMKB so tako del pestre mikrobne združbe tradicionalnih sirov, ki se izdelujejo iz surovega mleka. Tradicionalni sirarski postopek vpliva na razvoj mikrobne združbe v siru. Mikrobna združba sirov je lahko zelo različna in posledično tudi lastnosti sirov, saj na potek njihovega nastajanja vplivajo številni pogoji (Beresford in Williams, 2004). Tradicionalni siri so bogat vir MKB, ki naseljujejo različne ekološke niše. Na oblikovanje okusa in drugih senzoričnih lastnosti sirov iz surovega mleka pomembno vplivajo specifične lastnosti surovega mleka, prehrana živali, proces izdelave in naravno prisotna mikrobna združba odgovorna za potek fermentacije in zorenja (Terzić-Vidojević in sod., 2009). Mikrobna združba sirov iz surovega mleka je veliko bolj peстра kakor v sirih iz toplotno obdelanega mleka. Poleg prisotnosti različnih vrst MKB v mikrobni združbi tovrstnih sirov pa je prisotno tudi mnogo različnih sevov, ki se pojavljajo znotraj posameznih vrst (Beuvier in Buchin, 2004).

V surovem mleku, ki se uporablja za izdelavo tradicionalnih sirov, je prisotna predvsem mezofilna, in v manjši meri termofilna, mikrobna združba, kjer prevladujeta predvsem rodova *Lactococcus* in *Enterococcus*. V surovem mleku so slabo zastopani termofilni in skupni laktobacili. K termofilnim laktobacilom spadajo predvsem striktni homofermentativni laktobacili *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus* in *Lb. helveticus* (Mangia in sod., 2008). Prisotnost rodu *Lactococcus* med zorenjem sira običajno pada, prisoten je tudi rod *Leuconostoc*, ki je v mikrobni združbi sirov prav tako zastopan v nižjih koncentracijah (Cogan in sod., 1997; Katana, 2001; Mangia in sod., 2008). *Lactobacillus* je rod, ki je pomemben del mikrobne združbe sira, saj so njegove vrste del NMKB. Laktobacili imajo namreč dobre fermentativne lastnosti. So tudi prototrofi za nekatere aminokisline. To je razlog za njihovo konstantno rast med celotnim zorenjem sira (Cogan in sod., 2007; Wouters in sod., 2002). Prav tako so del NMKB vrste iz rodu *Enterococcus*, ki so dobro zastopani že v mleku in se njihova rast ohrani skozi zorenje sira. Dolgo so enterokoki veljali za indikatorje slabe higiene, danes pa jih štejemo za normalen, zelo pomemben del mikrobne združbe zrelega sira, ki lahko celo prevlada nad laktobacili.

(Centeno in sod., 1996; Fortina in sod., 2003; Mannu in Paba, 2002; Mohar Loberg, 2008). Glavni vrsti enterokokov, ki jih najdemo v sirih sta *Ent. faecalis* in *Ent. faecium*, redkeje pa tudi *Ent. durans*. Enterokoki so slabi tvorci kislino, ki pa je pomembna za izdelavo in zorenje sira. Večinoma so slabši proteoliti, a boljši lipoliti, še posebej *Ent. faecium*, kar pozitivno vpliva na senzorične lastnosti sira. Mnogi sevi *Ent. faecalis* in *Ent. faecium*, ki jih najdemo v sirih, proizvajajo veliko acetaldehida, diacetila, etanola in acetoina, ki pozitivno vplivajo na aroma in okus sirov (Centeno in sod., 1999; Foulquier Moreno in sod., 2006; Giraffa, 2003; Sarantinopoulos in sod., 2001a).

V mikrobeni združbi tradicionalnih slovenskih trdih in poltrdih sirov prevladujeta rodova *Lactobacillus* in *Enterococcus* (Katana, 2001). Po rezultatih raziskave Paveljšek (2012) so potrjujejo tudi rezultati identifikacije izolatov iz slovenskih tradicionalnih ovčjih sirov, predstavljeni v sliki 1. Pri sirih dolenjski, bovški, kraški, paški, krčki in livanjski, ki so siri trdega tipa iz ovčjega mleka, so v večini identificirali bakterije vrst *Lb. casei/paracasei*, *Lb. plantarum*, *Ent. faecalis*, *Lb. lactis* subsp. *lactis* ter v malo manjšem odstotku *Ent. casseliflavus*, *Ent. durans* in *Ent. faecium*. V raziskavi Mohar Loberg (2008) pa so v tradicionalnih slovenskih sirih tolminc, mohant, Nanoški sir, kraški ovčji sir in bovški sir, pri raziskavi enterokokov potrdili najpogostejo prisotnost sevov *Ent. faecalis* in *Ent. faecium*. V mleku in sirnini pa so poleg teh vrst našli še nekaj sevov *Ent. casseliflavus* in *Ent. gallinarum*.



Slika 1: Prikaz identifikacije izolatov iz slovenskih tradicionalnih ovčjih sirov, pridobljenih s fenotipsko (BIOLOG) in genotipsko (PCR) metodo (Paveljšek, 2012)

#### 2.4.1 Dinamika mikrobnne populacije v tradicionalnih sirih

Tradisionalni siri so pogosto narejeni iz surovega mleka, ki ga naseljuje raznolika mikrobna združba. Del nje so MKB, ki veljajo za starterske kulture, ki hitro tvorijo kislino in znižajo pH mleka na željeno raven. V tem obdobju se tudi hitro namnožijo in v enem dnevu od izdelave sira predstavljajo večinsko populacijo MO v mlademu siru. Z nadaljnjam zorenjem pa se celice starterskih MKB razgradijo z avtolizo in sprostijo svoje encime, ki pomembno vplivajo na potek zorenja sira in prispevajo k razvoju aromatičnih komponent. Surovo mleko pa naseljujejo tudi sekundarni MO, med njimi so zelo pomembne NMKB. Te lahko vstopijo v sir tudi s sirarske opreme ali okolja in so kljub temu, da ne tvorijo veliko kislino, ključne za razvoj specifične arome in okusa tradisionalnih sirov.

Razmnožujejo se konstantno med izdelavo sira in nato v siru med zorenjem, ter ob koncu zorenja v zrelem siru predstavljajo prevladujočo populacijo MKB. V nasprotju s starterskimi MKB se NMKB dobro prilagodijo na neugodne razmere v siru med zorenjem (Beresford in Williams, 2004; Coeuret in sod., 2003).

Izmed NMKB so pomembnejša skupina laktobacili, ki običajno prevladujejo v mikrobnii združbi zrelih tradicionalnih sirov, saj se zelo dobro prilagodijo na neugodne razmere v okolju (visoka koncentracija soli, nizek pH). K njihovemu dobremu preživetju pa pripomore tudi tvorba protimikrobnih snovi kot so mlečna kislina,  $H_2O_2$  in bakteriocinov (Beresford in sod., 2001; Čanžek Majhenič in sod., 2007). V raziskavi so Čanžek Majhenič in sod. (2007) določili nizke vrednosti nestarterskih laktobacilov v surovem mleku ( $10^2$  -  $10^3$  ke/ml mleka), ki so izrazito narasle do konca zorenja kraškega ovčjega sira (do  $10^8$  ke/g zrelega sira). Podobno rast nestarterskih laktobacilov pa opisujejo tudi drugi avtorji (Mannu in sod., 2000; De Angelis in sod., 2001). Mezofilni laktobacili rastejo konstantno med zorenjem in ob koncu zorenja sirov narejenih iz surovega mleka dosegajo število  $10^7$  do  $10^8$  ke/g, medtem ko v sirih narejenih iz pasteriziranega mleka dosegajo 1 do 2 log nižje vrednosti (Beuvier in Buchin, 2004; McSweeney in sod., 1993).

Druga pomembna skupina NMKB so enterokoki, ki so predvsem značilni za tradicionalne sire izdelane na območju Mediterana. So topotno zelo stabilni in so prisotni v sirih iz surovega in topotno obdelanega mleka. Poleg topotne odpornosti pa enterokokom omogoča preživetje in razmnoževanje v zahtevnem okolju kot je sir tudi odpornost na kisline in soli. Mnogi sevi enterokokov proizvajajo bakteriocine imenovane enterocini. V tradicionalnih slovenskih sirih so določili vrednosti enterokokov v mleku in sirnini (med  $10^3$  in  $10^6$  ke/g), ter v siru (med  $10^3$  in  $10^7$  ke/g). Število enterokokov se je povečalo tako med sirjenjem, kot tudi med zorenjem sirov (Mohar Loberg, 2008). V raziskavi mikrobne populacije enterokokov med zorenjem kraškega ovčjega sira so vrednosti enterokokov z vrednosti  $1,5 \times 10^4$  ke/ml v mleku narasle na  $1,7 \times 10^8$  ke/g v siru po 60 dneh zorenja (Katana Burja in sod., 2003). Drugi avtorji opisujejo podobne vrednosti enterokokov v sirnini različnih sirov (med  $10^4$  in  $10^6$  ke/g) in v zrelih sirih (med  $10^5$  in  $10^7$  ke/g) (Foulquie Moreno in sod., 2006; Giraffa, 2002; Sarantinopoulos, 2001a; Franz in sod., 2003). Velikost populacije enterokokov v siru je odvisna od kontaminacije mleka, vrste sira, tehnoloških postopkov in uporabljene starterske kulture. Siri narejeni iz surovega mleka dosegajo večje število prisotnih enterokokov ob koncu zorenja kakor siri narejeni iz pasteriziranega mleka (Beuvier in Buchin, 2004).

#### 2.4.2 Mikrobnna združba avtohtonega kraškega ovčjega sira

V zrelem kraškem ovčjem siru predstavljajo glavnino mikrobne združbe MKB iz rodov *Lactobacillus* in *Enterococcus* (Katana, 2001).

Iz rodu *Lactobacillus* prevladujejo bakterije iz vrste *Lb. paracasei* (59 %), ostali pripadajo drugim vrstam *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* in *Lb. curvatus* (Čanžek Majhenič in sod., 2007).

Enterokoki predstavljajo pomemben del mikrobne združbe kraškega ovčjega sira. V raziskavah Bogovič Matijašić in sod. (2002) so enterokoki predstavljeni celo prevladujočo skupino MKB. Iz rodu *Enterococcus* prevladujejo bakterije iz vrste *Ent. faecalis*, ki s svojim delovanjem zelo koristno prispeva k zorenju sira (Katana, 2001; Renčelj in sod., 2008).

## 2.5 STARTERSKE KULTURE

Starterske kulture so mikrobiološki pripravki z velikim številom celic, najmanj ene vrste MO, katere uporabimo za proizvodnjo fermentiranega živila, tako da mikrobe cepimo direktno v surovino (Leroy in De Vuyst, 2004).

Fermentacija sira pa lahko poteka tudi spontano, kot rezultat aktivnosti avtohtone mikrobne populacije mleka. Dodatek MO za sam začetek procesa ni neobhoden, vendar ima uporaba selekcioniranih sevov v starterskih kulturah številne prednosti:

- omogoča kontrolo in regulacijo procesa fermentacije – dani so pogoji za standardizacijo visokokvalitetne proizvodnje,
- izboljšana je ekonomičnost proizvodnje zaradi skrajšanega časa fermentacije in manjšega deleža izdelkov s tehnološkimi napakami,
- zmanjšano je higiensko tveganje in podaljšana obstojnost izdelkov zaradi protimikrobnega delovanja primarnih in sekundarnih metabolitov starterskih kultur proti patogenim MO in tehnološkim kvarljivcem,
- dane so možnosti za zmanjšano uporabo nekaterih kemijskih aditivov, na primer protimikrobnih sredstev, kemijskih zakisovalcev, encimov,
- izboljšana je prehranska vrednost fermentiranih živil (lažja prebavljivost, višja vsebnost vitaminov, peptidov, aminokislin, prostih maščobnih kislin, zaščita pred tvorbo mikotoksinov). Dokazan je probiotični vpliv nekaterih biokultur npr. *Lb. acidophilus* in selekcioniranih sevov bifidobakterij na črevesno mikrobeno združbo intestinalnega trakta,
- uporaba starterskih kultur z različnimi encimskimi sistemi daje možnost proizvodnje širšega assortimenta izdelkov, ki jih ni možno proizvesti s spontano fermentacijo (Smole Možina in Raspot, 1994).

Starterske kulture glede na sestavo delimo v:

- Eno-sevne starterske kulture, kjer vsako startersko kulturo sestavlja čista kultura enega samega seva.
- Več-sevne starterske kulture, ki so sestavljene iz definirane mešanice čistih kultur iz nekaj, recimo šestih, sevov različnih vrst bakterij ali iz različnih sevov ene vrste bakterij.

- Mešane starterske kulture, ki so naravne starterske kulture, sestavljene iz nedefinirane mešanice sevov različnih vrst bakterij. Sestava teh tipov starterskih kultur je osnovana na dinamičnem ravnovesju med različnimi starterskimi bakterijami in se med uporabo lahko bistveno spremenijo (Walstra in sod., 2006).

Glede na temperaturo delovanja pa jih delimo na mezofilne in termofilne starterske kulture. Med mezofilne starterske kulture, ki jih najpogosteje srečamo v mlekarstvu, spadajo predstavniki:

- *Lac. lactis* subsp. *cremoris*
- *Lac. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*
- *Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris*
- *Lb. casei*

Med termofilne starterske kulture pa spadajo predstavniki:

- *Str. thermophilus*
- *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
- *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*
- *Lb. helveticus*
- *Lb. plantarum* (Starter cultures, 2016)

### 2.5.1 Zaščitne starterske kulture

Zaščitne starterske kulture so skupina starterskih kultur s protimikrobnim delovanjem proti kvarljivcem in/ali patogenim bakterijam. Te bi se lahko razrasle v tradicionalnih sirih, saj so narejeni iz surovega mleka. Bakterije kot so *List. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* in *E. coli* predstavljajo potencialno tveganje za zdravje potrošnika. Tako je glavni izziv v tem, kako potrošniku ponuditi izdelek s pričakovanimi specifičnimi senzoričnimi lastnostmi in ga hkrati zaščititi pred možnostjo okužbe ali zastrupitve s patogenimi MO. Zaščitna starterska kultura mora v prvi vrsti preprečevati rast neželenim MO vendar hkrati ne sme zavirati rasti koristnih MO. V ta namen se v izdelavi sira uporabljam komercialne starterske kulture, ki vsebujejo izbrane seve MKB. V primeru izdelave tradicionalnih sirov pa se pojavljajo vprašanja, saj bi z uporabo starterskih kultur vnesli seve, ki niso avtohtonji za določen tradicionalen sir. Delovanje sevov zaščitne starterske kulture pa s svojo bakteriocinsko aktivnostjo lahko tudi zavira delovanje naravno prisotnih koristnih MO in posledično vpliva na mikrobeno sestavo in na fizikalno-kemijske lastnosti sira. To težavo pa je možno rešiti tako, da poiščemo ustrezne seve znotraj naravno prisotne mikrobine združbe specifičnega tradicionalnega sira. Z uporabo teh sevov lahko sestavimo starterske ali zaščitne kulture, ki so »po meri narejene« za vsak tradicionalen sir (Čanžek Majhenič in sod., 2015; Trmčić in sod., 2010). Takšno »po meri narejeno« startersko kulturo sestavljeni iz enega seva entrokoka in dveh sevov laktobacilov so za sir tolminc že uspešno pripravili in jo preskusili. Uspeli so namreč izolirati tipične predstavnike bakteriocinogene mikrobiote in jih uporabili kot starterske kulture v »challenge« testih v sirih in potrdili njihovo prisotnost ob koncu zorenja sirov. Dodatek izbranih bakteriocinogenih MKB je zmanjšal mikrobeno populacijo *S. aureus* v zrelem siru za

približno 2 log, še večji vpliv pa so imeli izbrani bakteriocinogeni sevi na vrsto *List. monocytogenes*. Poleg zaščitne vloge pa so »po meri narejene« starterske kulture, ki so jih uporabili pri izdelavi sira na pilotnem nivoju, zagotovile ustrezno fermentacijo in zorenje sirov. Zreli siri so imeli tipične senzorične lastnosti sira tolminc. Izbrane seve so v obliki starterske kulture uspešno preskusili tudi v pravi proizvodnji sira. »Po meri narejene« starterske kulture omogočajo izboljšavo tehnološkega postopka in zagotavljajo boljšo, predvsem pa bolj standardno kakovost tolminca (Rogelj, 2010).

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 NAČRT DELA

Eksperimentalni del naloge smo pričeli s tehnološkim delom izdelave sirov z dodatkom avtohtone starterske kulture (predstavniki izolatov iz avtohtonega kraškega ovčjega sira), ter sirov, katerim smo poleg avtohtone starterske kulture dodali še mešanico izbranih sevov stafilokokov. Sire z dodatkom avtohtone starterske kulture smo poimenovali »kontrolni siri« in jim dali oznake K1, K2 in K3. Sire z dodatkom avtohtone starterske kulture in mešanice sevov stafilokokov pa smo poimenovali »siri z dodanimi stafilokoki« in jim dali oznake ST1, ST2 in ST3. Shema tehnološkega postopka izdelave sirov je predstavljena na sliki 2.

V nadaljevanju eksperimentalnega dela smo izvedli vzorčenje in mikrobiološko analizo vzorcev sirnine ob času  $t=0$  in vzorcev sira med zorenjem ob času  $t=2$  tedna,  $t=4$  tedne,  $t=6$  tednov ter  $t=8$  tednov. Na sliki 2 je predstavljena shema vzorčenja ob različnih časih.

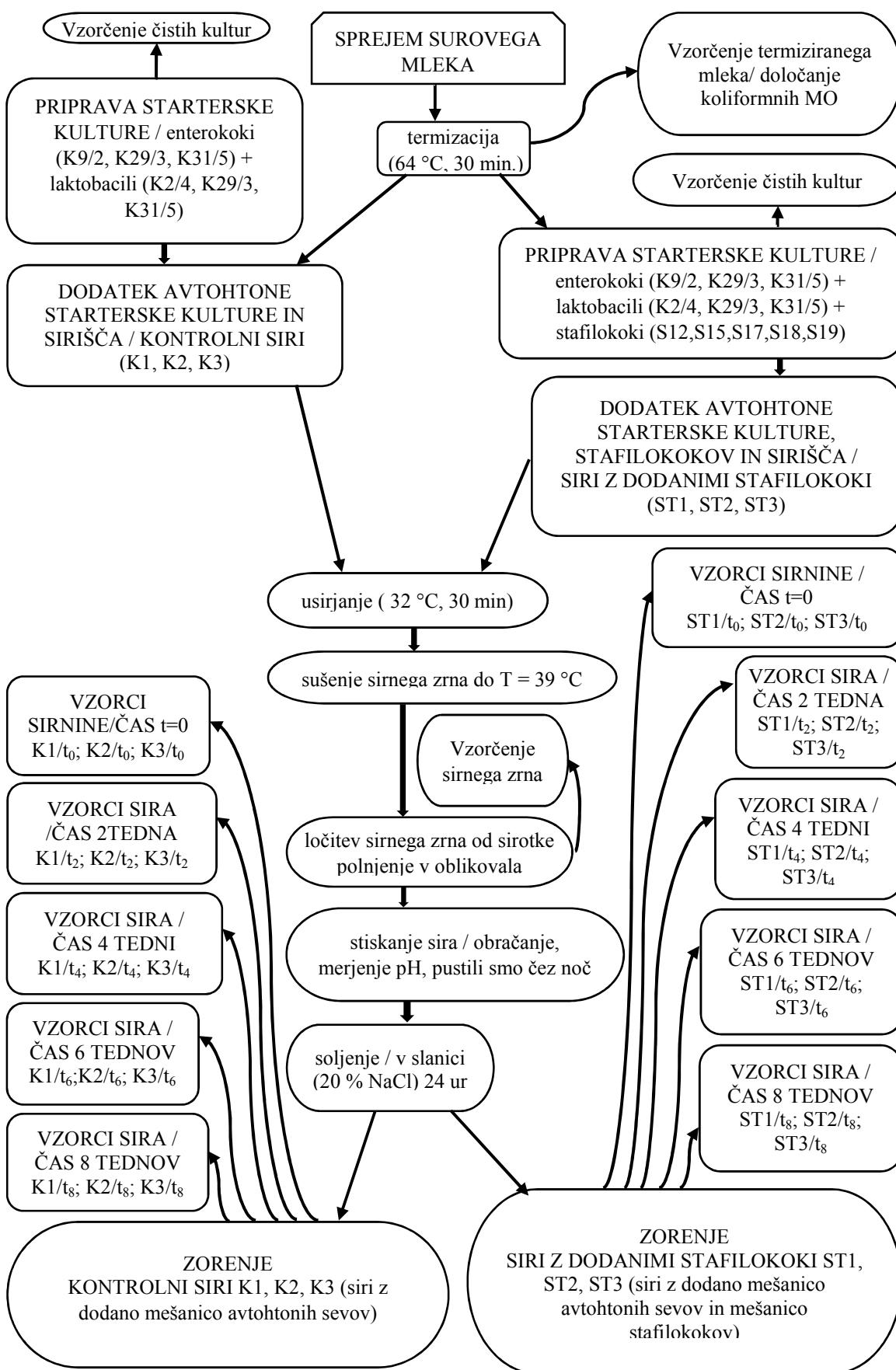
V kontrolnih sirih in sirih z dodanimi stafilokoki smo med zorenjem ugotavljeni prisotnost dodanih sevov rodu *Lactobacillus* in rodu *Enterococcus* s pregledom morfologije pod mikroskopom.

V kontrolnih sirih smo med zorenjem sira spremljali dinamiko rasti predstavnikov rodu *Lactobacillus* in rodu *Enterococcus* ter v sirih z dodanimi stafilokoki tudi rodu *Staphylococcus*.

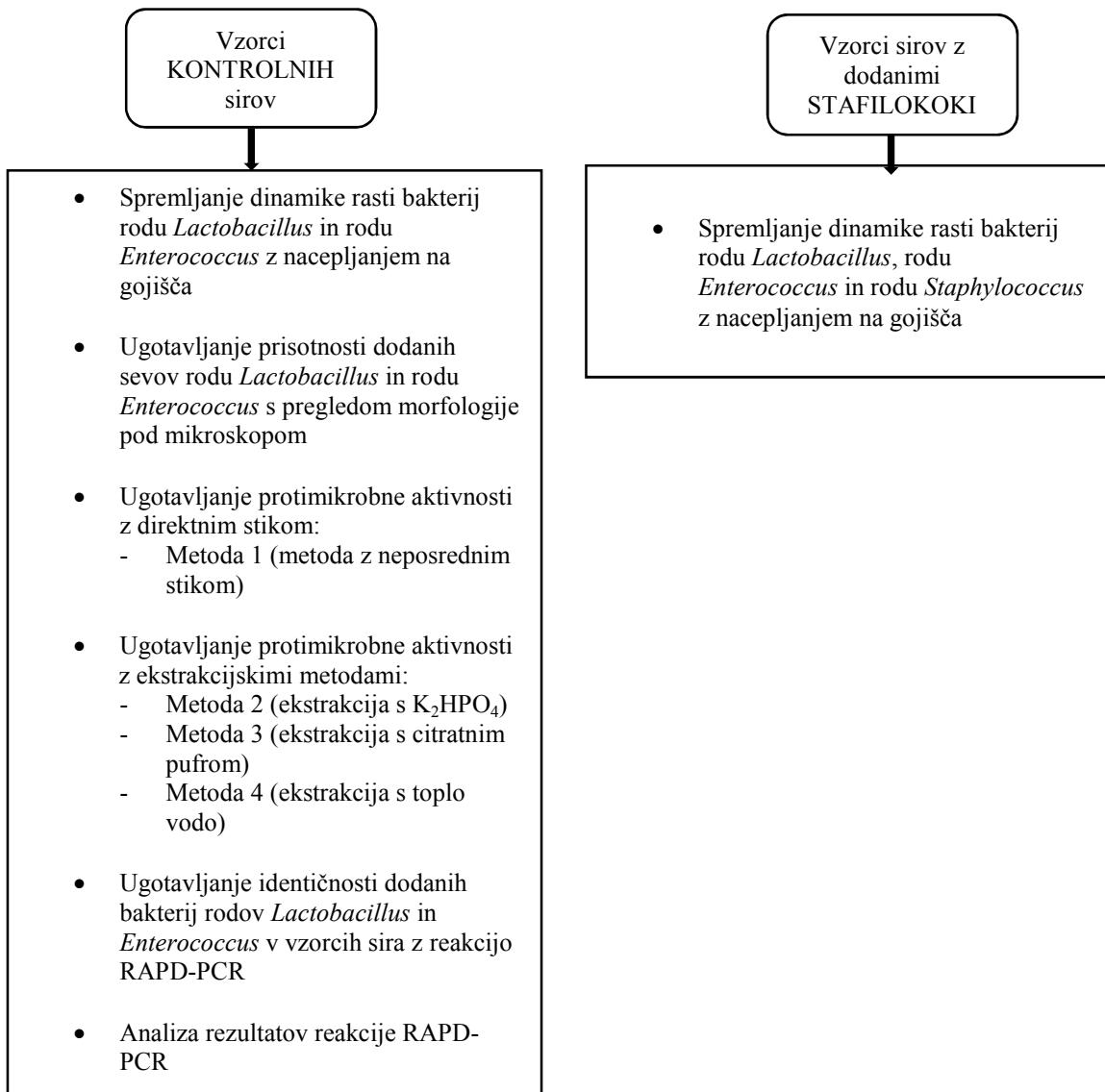
Na vzorcih kontrolnih sirov z dodatkom samo sevov starterske kulture smo ugotavljeni protimikrobni učinek ekstraktov sirov kot tudi sirov samih proti izbranim stafilokokom.

Eksperimentalno delo smo zaključili z analizo vzorcev na nivoju DNK. Z analizo RAPD-PCR smo namreč žeeli potrditi identičnost dodanih starterskih kultur v vzorcih kontrolnih sirov ob različnih časih zorenja.

Načrt opravljenih analiz na odvzetih vzorcih sirov je predstavljen na sliki 3.



Slika 2: Shema tehnološkega postopka izdelave in vzorčenja sirov



Slika 3: Shema opravljenih analiz odvzetih vzorcev sira

## 3.2 MATERIAL

### 3.2.1 Mleko

Za izdelavo sira smo uporabili sveže kravje mleko (80 litrov), ki smo ga dobili z Infrastrukturnega centra Jable (Mengeš, Slovenija). Takoj po prevzemu mleka so v Laboratoriju za mlekarstvo določili sestavo mleka in vsebnost somatskih celic.

Mleko smo pred sirjenjem termizirali (64 °C, 30 min).

### 3.2.2 Sirišče

Termizirano mleko smo ohladili na 32-33 °C in mu dodali sirišče po navodilu proizvajalca (3 g na 100 litrov mleka). Uporabili smo sirišče Chymogen 1080 (Chr. Hansen, Danska).

### 3.2.3 Bakterijski sevi

V mleko smo poleg sirišča dodali bakterijske seve, izolirane iz kraškega ovčjega sira, ki so bili izbrani na osnovi predhodno opravljenih analiz tehnoloških lastnosti.

Za pripravo kontrolnih sirov označenih s K1, K2 in K3 smo uporabili »avtohtono« startersko kulturo, ki smo jo pripravili kot mešanico treh predstavnikov rodu *Lactobacillus* in treh predstavnikov rodu *Enterococcus*. Za sire ST1, ST2 in ST3 pa smo poleg teh kultur dodali še pet predstavnikov rodu *Staphylococcus*. V Preglednici 1 so predstavljeni bakterijski sevi, ki smo jih uporabili v poskusu.

Preglednica 1: Bakterijski sevi, ki smo jih uporabili pri poskusu

Bakterija	Sevi	Oznaka
laktobacili	<i>Lactobacillus paracasei</i>	K 2/4
	<i>Lactobacillus brevis</i>	K 3/5
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	K 29/3
enterokoki	<i>Enterococcus faecalis</i>	K 9/2
	<i>Enterococcus</i> spp.	K 29/7
	<i>Enterococcus faecalis</i>	K 50/6
stafilokoki	<i>Staphylococcus</i> spp.	S 12
	<i>Staphylococcus</i> spp.	S 15
	<i>Staphylococcus</i> spp.	S 17
	<i>Staphylococcus</i> spp.	S 18
	<i>Staphylococcus</i> spp.	S 19

### 3.2.4 Gojišča

#### 3.2.4.1 Tekoča gojišča in raztopine za razredčevanje

##### 3.2.4.1.1 MRS (kat. št. 1.10660)

Hranljivo tekoče gojišče MRS smo pripravili po navodilu proizvajalca (Merck, Darmstadt, Nemčija). Avtoklavirali smo ga 15 min na 121 °C. Uporabili smo ga za precepljanje in gojenje laktobacilov.

##### 3.2.4.1.2 M17 (kat. št. 1.15029)

Tekoče gojišče M17 smo pripravili po navodilu proizvajalca (Merck). Avtoklavirali smo ga 15 min na 121 °C. Uporabili smo ga za precepljanje in gojenje enterokokov.

##### 3.2.4.1.3 Brain heart infuson broth (BHI) (kat. št. 1.10493)

Tekoče gojišče BHI smo pripravili po navodilu proizvajalca (Merck). Avtoklavirali smo ga 15 min na 121 °C. Uporabili smo ga za precepljanje in gojenje stafilokokov.

##### 3.2.4.1.4 ¼ Ringerjeva raztopina (kat. št. 1.15525)

Fiziološko raztopino smo pripravili s pomočjo Ringerjevih tablet (Merck) po navodilu proizvajalca. Pripravljeno raztopino smo razdelili po 9,2 ml v epruvete in avtoklavirali 15 min pri 121 °C. Uporabili smo jo za 10-kratno razredčevanje mikrobioloških vzorcev pri mikrobioloških analizah.

##### 3.2.4.1.5 Raztopina dikalijevega hidrogen fosfata (kat. št. 1.05104)

Raztopino soli smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck) tako, da smo v 1000 ml destilirane vode zatehtali 20 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, naravnali vrednost pH na 7,5 in avtoklavirali 15 min pri 121 °C. Tako pripravljeno raztopino smo uporabili za homogenizacijo vzorcev sira.

#### 3.2.4.2 Trda gojišča

##### 3.2.4.2.1 MRS (kat. št. 1.10661)

Trdo gojišče MRS smo pripravili po navodilu proizvajalca (Merck). Gojišče smo avtoklavirali 15 min pri 121 °C. Trdo gojišče smo uporabili za ugotavljanje števila kolonijskih enot laktobacilov v starterski kulturi.

##### 3.2.4.2.2 M17 (kat. št. 1.15108)

Trdo gojišče M17 smo pripravili po navodilu proizvajalca (Merck). Gojišče smo avtoklavirali 15 min pri 121 °C. Uporabili smo ga za ugotavljanje števila kolonijskih enot enterokokov v starterski kulturi.

### 3.2.4.2.3 Brain heart infusion agar (BHI) (kat. št. 1.10493)

Trdo gojišče BHI smo pripravili po navodilu proizvajalca (Merck). Gojišče smo avtoklavirali 15 min pri 121 °C. Uporabili smo ga za ugotavljanje števila kolonijskih enot stafilokokov pred inokulacijo v mleko.

### 3.2.4.2.4 Rogosa (kat. št. 1.05413)

Gojišče smo pripravili po navodilu proizvajalca (Merck). Zatehtali smo 74,5 g gojišča v prahu ter ga raztopili v 1000 ml destilirane vode. Tej raztopini smo dodali ocetno kislino in jo segrevali tako dolgo, da se je gojišče popolnoma raztopilo. Trdo gojišče Rogosa je selektivno gojišče za laktobacile in smo ga uporabili v mikrobioloških analizah za ugotavljanje števila kolonijskih enot laktobacilov v vzorcih sirov.

### 3.2.4.2.5 CATC (Citrate Azide Tween Carbonate) (kat. št. 1.10279)

Gojišče CATC smo pripravili po navodilu proizvajalca (Merck). Gojišče smo avtoklavirali 15 min pri 121 °C. Pred uporabo (45 °C) smo gojišču dodali suplemente natrijev karbonat, 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorid in natrijev azid. Tako smo dosegli, da je bilo gojišče selektivno za enterokoke. Uporabili smo ga v mikrobioloških analizah za ugotavljanje števila kolonijskih enot enterokokov v vzorcih sirov.

### 3.2.4.2.6 Baird parker (BP) (kat. št. 4011162)

Gojišče smo pripravili po navodilih proizvajalca (Biolife, Milano, Italija). Gojišče smo avtoklavirali 15 min pri 121 °C in mu pred uporabo (45 °C) dodali supplement Rabbit Plasma Fibrinogen (RPF). Tako pripravljeno gojišče smo uporabili v mikrobioloških analizah za ugotavljanje števila kolonijskih enot stafilokokov v vzorcih sirov, saj je selektivno za stafilokoke.

### 3.2.4.2.7 Violet red bile (VRB) (kat. št. 1.01406)

Trdo gojišče VRB smo pripravili po navodilih proizvajalca (Merck). Gojišče smo segrevali toliko časa, da se je popolnoma raztopilo. Uporabili smo ga v mikrobioloških analizah za ugotavljanje števila kolonijskih enot koliformnih bakterij.

### 3.2.4.2.8 Agar bacteriological (agar agar) (kat. št. 411030)

Gojišče agar agar smo uporabili za pripravo poltekočega gojišča BHI soft. Dodali smo ga tekočemu gojišču BHI, po navodilih proizvajalca (Biolife).

### 3.2.4.3 Polrda gojišča

#### 3.2.4.3.1 Brain heart infusion soft agar (BHI soft) (kat. št. 1.10493)

Polrdo gojišče BHI smo pripravili tako, da smo v 150 ml tekočega gojišča BHI, ki smo ga pripravili po navodilih proizvajalca (Merck) dodali 1,12 g agar agarja. Gojišče smo avtoklavirali 15 min pri 121 °C. V polrdo gojišče smo cepili posamezen stafilokok in

mešanice prelili po petrijevih ploščah za ugotavljanje protimikrobne aktivnosti sirov in njihovih ekstraktov proti stafilokokom.

### **3.2.5 Kemikalije in suplementi**

#### **3.2.5.1 Kemikalije za mikrobiološke analize**

##### **3.2.5.1.1 Oacetna kislina (kat. št. 45731)**

Oacetno kislino (96 %) (Fluka, Buchs, Švica) smo dodali v gojišče Rogosa v količini 1,3 ml/l gojišča.

##### **3.2.5.1.2 Citratni pufer (CP)**

CP z vrednostjo pH okoli 3 smo pripravili tako, da smo zmešali 46,5 ml 0,1 M raztopine citronske kisline in 3,5 ml 0,1 M raztopine natrijevega citrata dihidrata ter z destilirano vodo dopolnili do končnega volumena 100 ml. Tako pripravljen pufer smo uporabili za obdelavo ekstraktov sirov.

##### **3.2.5.1.3 Natrijev citrat dihidrat (kat. št. 1405407)**

Natrijev citrat dihidrat (Kemika, Zagreb, Hrvaška) - 0,1 M. Uporabili smo 3,5 ml raztopine za pripravo citratnega pufra.

##### **3.2.5.1.4 Citronska kislina (kat. št. 1.00244)**

Citronska kislina (Merck) - 0,1 M. Uporabili smo 46,5 ml raztopine za pripravo citratnega pufra.

#### **3.2.5.2 Suplementi za mikrobiološke analize**

##### **3.2.5.2.1 Natrijev karbonat (kat. št. 1.06498)**

Pripravili smo 10 % raztopino Na karbonata (Merck), ki smo jo sterilizirali skozi filter. V trdo gojišče CATC, ki smo ga uporabili za določanje enterokokov, smo dodali 20 ml/l raztopine. Skupaj z drugimi suplementi zagotavlja selektivnost gojišča za enterokoke.

##### **3.2.5.2.2 2,3,5-trifenil tetrazolijev klorid (kat. št. 1.08380)**

Pripravili smo 1 % raztopino 2,3,5-trifenil tetrazolijev klorid (Merck), ki smo jo sterilizirali skozi filter. V trdo gojišče CATC, ki smo ga uporabili za določanje enterokokov smo dodali 10 ml raztopine na liter. Enterokoki reducirajo brezbarven 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorid v rdeč formazan, tako so njihove kolonije rdeče obarvane.

### 3.2.5.2.3 Natrijev azid (kat. št. 1.06688)

Pripravili smo 10 % raztopino natrijevega azida (Merck), ki smo jo sterilizirali skozi filter. V trdo gojišče CATC, ki smo ga uporabili za določanje enterokokov, smo dodali 4 ml raztopine na liter. Skupaj z drugimi suplementi zagotavlja selektivnost gojišča za enterokoke.

### 3.2.5.2.4 Rabbit Plasma Fibrinogen (RPF) (kat. št. 423101)

Suplement RPF (Biolife) je sestavljen iz fibrinogena (380 mg), tripsin inhibitorja (1,5 mg) in kunčje plazme (3,0 ml). RPF smo v aseptičnih pogojih raztopili v 50 ml sterilne destilirane vode in ga primešali k 150 ml avtoklaviranega in na 45–50 °C ohlajenega gojišča BP. Tako pripravljeno gojišče smo dobro premešali in takoj uporabili za analizo, da ne bi prišlo do precipitacije fibrinogena. Baird parker je ob dodatku suplementa RPF selektivno gojišče za stafilokoke.

### 3.2.5.3 Kemikalije za izolacijo DNK

- Triton X-100 (kat. št. T-9284) (Sigma Chemicals Co., St. Louis, USA) smo uporabili za pripravo DNK za reakcijo RAPD-PCR. V 180 µl 1 % tritona smo dodali po 20 µl toplotno obdelanih celic (redčitev 1:10).

### 3.2.5.4 Kemikalije in encimi za reakcijo RAPD-PCR

- 10 mM dNTP (deoksinukleotid trifosfat) (Fermentas Life Sciences, Litva) (kat. št. R0241) – mešanica nukleotidov
- 25 mM magnezijev klorid ( $MgCl_2$ ) (Promega, Madison, USA) (kat. št. A351B) - založna raztopina magnezijevega klorida.
- Pufer - 5x Green GoTaq Flexi Buffer (Promega) (kat. št. M8911) - brez  $MgCl_2$  za polimerazo.
- Go Taq Flexi DNA Polimeraza (Promega) (kat. št. M8301)
- Začetni oligonukleotid M13 (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3') (Invitrogen life technologies, Paisley, Velika Britanija) (Torrianni in sod., 1999).

Preglednica 2: Sestava reakcijske mešanice za en vzorec PCR, v skupnem volumnu 20 µl (Torrianni in sod., 1999)

Reagent	Začetna konc.	Končna konc.	količina
tarčna DNK (pridobljena iz celic, obdelanih s toplosto in tritonom)	/	/	5 µl
dNTP	10 mM	0,1 mM	0,2 µl
začetni oligonukleotid M13	100 µM	1 µM	0,3 µl
pufer brez MgCl <sub>2</sub>	5 x	1x	4 µl
MgCl <sub>2</sub>	25mM	4 mM	3,2 µl
Go-Taq Flexi DNK polimeraza	5 U/µl	1x	0,1 µl
Mikrofiltrirana in deionizirana H <sub>2</sub> O	/	/	7,2 µl

### 3.2.5.5 Kemikalije za izvedbo elektroforeze

#### 3.2.5.5.1 Tris Acetatni EDTA pufer (TAE pufer)

Tris baza (Sigma) (kat. št. T-6066)

Ledocetna kislina (Merck).

EDTA (Sigma) (kat. št. E-6635)

Iz omenjenih kemikalij smo pripravili 1 liter 50-kratne založne raztopine kot sta opisala Sambrook in Russel (2001):

242 g Tris baze, 57,1 ml ledocetne kisline, 100 ml 0,5 M EDTA (pH=8,0) in dopolnili z destilirano vodo do 1 l. Pred uporabo smo raztopino razredčili z vodo v razmerju 1:50. 1-kratni pufer TAE smo uporabljali pri analizah pomnožkov RAPD-PCR s pomočjo gelske elektroforeze.

#### 3.2.5.5.2 Agaroza (kat. št. A-9539)

S pomočjo agaroze (Sigma) in 1-kratne raztopine pufra TAE smo pripravili 2 % agarozni gel. V 100 ml 1-kratne raztopine pufra TAE smo zamešali 2 g agaroze, segreli mešanico do popolne raztopitve agaroze ter jo ohlajeno (45 °C) razlili v banjico za pripravo agaroznega gela.

### 3.2.6 Laboratorijska oprema

- Avtoklav: A-21 CA (Kambič)
- Centrifuga:
  - EBA 12 (Hettich Zentrifugen)
  - Mikro 22R (Hettich Zentrifugen)
- Elektroforezni sistem: Sub-Cell (Bio-Rad, California, ZDA)
- Mikrovalovna pečica: 32 L (Bosch)
- pH-meter: MP120 (Mettler Toledo)
- Kombinirana vbodna elektroda (INLAB 427)
- Naprava za PCR:
  - Gene Cycler™ (Bio-Rad, California, ZDA)
  - Mastercycler Gradient (Eppendorf)
- Mešalec: Vortex

- Transiluminator: ChemiGenius<sup>2</sup> (Syngene)
- Elektronski števec: Eško 7L (Labo, Ljubljana)
- Potrošni laboratorijski material (steklovina, plastika,...)

### 3.3 METODE

#### 3.3.1 Tehnološki postopek izdelave sira

Mleko (80 l) smo termizirali (64 °C, 30 min), ohladili na 32 °C in dodali avtohtono startersko kulturo. Pri tej temperaturi smo dodali tudi ustrezno količino sirišča ter pustili 30 min, da je mleko koaguliralo. Ko je koagulacija potekla, smo koagulum razrezali s sirarsko sabljo, nato s harfo, tako da smo dobili drobna zrna. Obdelavi koaguluma je sledilo sušenje sirnih zrn, to je segrevanje ob stalnem mešanju do temperature 39 °C. Pri tej temperaturi so sirna zrna postala primerno suha oz. klena. S tako pripravljenim sirnim zrnom smo hitro napolnili oblikovala, pri čemer je večina sirotke odtekla. Sledilo je stiskanje s stiskalnico, z obtežitvijo 2 kg/kg sira. Med stiskanjem smo sire obračali, vsakokrat pa tudi izmerili njegovo vrednost pH. Sire smo pustili pod stiskalnico čez noč, zjutraj pa smo jih potopili v slanico z 20 % koncentracijo NaCl. V slanici smo jih pustili 24 ur, nakar smo jih zložili na lesene deske v zorilnem prostoru. Zorenje je potekalo osem tednov pri temperaturi 13 – 16 °C.

Izvedli smo dva tipa sirjenj na teden. V prvem sirjenju smo vsakič izdelali kontrolne sire – to so siri, katerim smo dodali avtohtono startersko kulturo - mešanico sevov enterokokov in laktobacilov. V drugem sirjenju pa smo vsakič izdelali sire z dodanimi stafilokoki – to so siri, katerim smo poleg avtohtone starterske kulture dodali tudi mešanico sevov stafilokokov. To smo ponovili trikrat - v treh tednih. Pri sirjenjih za izdelavo kontrolnih sirov, ki smo jih označili K1, K2 in K3 smo vedno uporabili »avtohtono« kulturo - mešanico sevov enterokokov (K9/2+K29/7+K50/6) in laktobacilov (K2/4+K29/3+K31/5) ter sirišče. Pri sirjenjih za izdelavo sira z dodanimi stafilokoki, ki smo jih označili ST1, ST2 in ST3 pa smo poleg avtohtone mešanice sevov in sirišča v mleko dodali še mešanico stafilokokov (S12+S15+S17+S18+S19). Tehnološki postopek izdelave sira je prikazan na sliki 2 (stran 14).

#### 3.3.2 Priprava avtohtone starterske kulture in izbranih stafilokokov

Avtohtono startersko kulturo smo pripravili kot mešanico 18-urnih kultur laktobacilov in enterokokov. Za inokulacijo mleka smo potrebovali 1 % inokulum starterske kulture (približno 800 ml). Zato smo za nacepitev laktobacilov pripravili po 140 ml tekočega gojišča MRS in za enterokoke po 140 ml tekočega gojišča M17. Nacepljena gojišča z laktobacili oz. enterokoki smo nato inkubirali 18 ur pri 37 °C. Po inkubaciji smo na trdih gojiščih MRS oz. M17 ugotavljali število kolonijskih enot čistih 18-urnih kultur laktobacilov oz. enterokokov. Kulture smo nato centrifugirali (6000 g/10 min), sprali usedlino celic s sterilno fiziološko raztopino ter ponovno centrifugirali. Sprane celice posameznih čistih kultur smo resuspendirali v 10-ih ml sterilne fiziološke raztopine. Na

koncu smo resuspendirane celice združili in tako dobili avtohtono startersko kulturo (končni volumen 60 ml), katero smo dodali termiziranemu mleku pri 32 °C.

Za izbrane izolate stafilokokov smo pripravili po 160 ml tekočega gojišča BHI, jih nacepili in inkubirali 18 ur pri 37 °C. Po inkubaciji smo najprej na trdnem gojišču BHI ugotavljali število ke čistih kultur stafilokokov, nato pa smo kulture centrifugirali, sprali usedline celic s sterilno fiziološko raztopino, ponovno centrifugirali in resuspendirali celice v 10-ih ml sterilne fiziološke raztopine. Resuspendirane celice smo združili in tako dobili mešanico stafilokokov (končni volumen 50 ml), ki smo jo dodali v termizirano mleko.

### **3.3.3 Merjenje vrednosti pH**

Vrednost pH sirov smo merili s pH metrom METTLER TOLEDO MP120 (Mettler, Nemčija) s kombinirano vbodno elektrodo (INLAB 427) pred, med in po stiskanju ter tedensko med zorenjem.

### **3.3.4 Vzorčenje**

#### **3.3.4.1 Vzorčenje mleka**

##### **3.3.4.1.1 Vzorčenje mleka za kemijsko analizo**

Mleko smo najprej vzorčili pred termizacijo in sicer tako, da smo v sterilno mlekarsko stekleničko odvezeli 50 ml vzorca. Vzorec smo oddali v Laboratorij za mlekarstvo, kjer so določili vsebnost:

- % maščobe
- % beljakovin
- % laktoze
- % suhe snovi brez maščobe
- Število somatskih celic/ml

##### **3.3.4.1.2 Vzorčenje mleka za mikrobiološko analizo**

Mleko smo sterilno vzorčili ponovno po termizaciji ter ugotavljali morebitno prisotnost koliformnih organizmov. Nato smo v mleko dodali sirišče ter avtohtono startersko kulturo in v primeru izdelave sira z dodanimi stafilokoki tudi mešanico stafilokokov ter ponovno sterilno vzorčili. V tem vzorcu pa smo določali število posameznih skupin MO (laktobacilov, enterokokov, stafilokokov), dodanih kot sestavnii del inokuluma.

### 3.3.4.2 Vzorčenje sirnine in sirov

Vzorčenje sirnine je potekalo v sterilnem okolju. Vedno smo odvzeli vzorec sirnine pred stiskanjem sira. V tem vzorecu smo določali število posameznih skupin MO (laktobacilov, enterokokov, stafilokokov), dodanih kot sestavni del inokuluma.

Vzorčenje sira je potekalo v sterilnem okolju s pomočjo sterilnega sirarskega svedra. Zavrtki sira so bili odvzeti od zunanjega roba in do središča sira, tako smo dobili povprečni vzorec celotnega prereza sira. Vzorec ob času 0 smo vzeli po soljenju sirov (to je predstavljalo začetni čas  $t_0$ ). Nato pa smo vzorce sira jemali vsak drugi teden zorenja – po 2 tednih zorenja ( $t_2$ ), po 4 tednih zorenja ( $t_4$ ), po 6 tednih zorenja ( $t_6$ ) in po 8 tednih zorenja ( $t_8$ ). Slika 2 na strani 14 prikazuje shemo vzorčenja sirnine in sirov. V teh vzorcih smo določali število posameznih skupin MO (laktobacilov, enterokokov, stafilokokov), dodanih kot sestavni del inokuluma.

### 3.3.5 Določanje mikrobne populacije v vzorcih mleka in sirov

#### 3.3.5.1 Določanje velikosti mikrobne populacije čistih kultur

V gojiščih z namnoženimi čistimi kulturami smo tik pred centrifugiranjem določali število kolonijskih enot (ke) posameznega seva s standardno metodo štetja na petrijevih ploščah. V 9 ml sterilne fiziološke raztopine smo aseptično odpipetirali po 1 ml tekočega gojišča z dobro homogeniziranimi celicami. Na ta način smo pripravili razredčitev  $10^{-1}$ . V nadaljevanju smo z metodo po Kochu pripravili zaporedne 10-kratne razredčitve in jih cepili na ustrezna gojišča ter inkubirali pri ustreznih pogojih, kot je prikazano v preglednici 3.

Preglednica 3: Gojišča in pogoji inkubacije za določanje velikosti populacij čistih kultur

Gojišče	Skupina MO	Temperatura inkubacije	Čas inkubacije
MRS	laktobacili	37 °C	48 ur
M17	enterokoki	37 °C	48 ur
BHI	stafilokoki	37 °C	48 ur

Po končani inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije s pomočjo elektronskega števca (EŠKO 7L, LABO Ljubljana). Število ke/ml gojišča smo izračunali po standardni formuli (IDF standard 100B, 1991):

$$ke = \Sigma n / ((f_a \times 1 + f_b \times 0,1) \times d) \quad \dots(1)$$

Legenda:

$\Sigma n$  vsota kolonij zraslih na ploščah

$f_a$  število plošč, uporabljenih v prvi razredčitvi

$f_b$  število plošč, uporabljenih v drugi razredčitvi

$d$  recipročni razredčitveni faktor najnižje razredčitve

### 3.3.5.2 Določanje velikosti mikrobne populacije v termiziranem mleku

V vzorcu mleka, odvzetem po termizaciji, smo s standardno metodo štetja ke ugotavljalni morebitno prisotnost koliformnih MO. Aseptično smo odpipetirali 1 ml termiziranega mleka direktno na petrijevo ploščo in ga prelili z gojiščem VRB. Prav tako smo 1 ml termiziranega mleka aseptično odpipetirali v 9 ml sterilne fiziološke raztopine in s tem dobili razredčitev  $10^{-1}$ . V nadaljevanju smo z metodo po Kochu pripravili zaporedne 10-kratne razredčitve do  $10^{-3}$  in jih cepili na gojišče VRB, ter inkubirali pri  $30^{\circ}\text{C}$  24 ur. Po končani inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije s pomočjo elektronskega števca. Število ke/ml termiziranega mleka smo izračunali po standardni formuli (IDF standard 100B:199, 1991).

### 3.3.5.3 Določanje velikosti mikrobne populacije v inokuliranem mleku

V vzorcu mleka, odvzetem po inokulaciji, smo s standardno metodo štetja ke določali prisotnost laktobacilov in enterokokov pri sirjenjih za kontrolne sire, ter laktobacilov, enterokokov in stafilocokov pri sirjenjih za sire z dodanimi stafilocoki. Aseptično smo odpipetirali 1 ml inokuliranega mleka v 9 ml sterilne fiziološke raztopine in s tem dobili razredčitev  $10^{-1}$ . V nadaljevanju smo z metodo po Kochu pripravili zaporedne 10-kratne razredčitve in jih cepili na ustrezna selektivna gojišča ter inkubirali pri ustreznih pogojih, kot je prikazano v preglednici 4.

Preglednica 4: Selektivna gojišča in pogoji inkubacije za določanje skupin MO v inokuliranem mleku

Gojišče	Skupina MO	Temperatura inkubacije	Čas inkubacije
Rogosa	laktobacili	$37^{\circ}\text{C}$	48 ur
CATC	enterokoki	$37^{\circ}\text{C}$	48 ur
BP + RPF	stafilocoki	$37^{\circ}\text{C}$	48 ur

Po končani inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije s pomočjo elektronskega števca. Število ke/ml mleka po inokulaciji smo izračunali po standardni formuli (IDF standard 100B, 1991).

### 3.3.5.4 Določanje velikosti mikrobne populacije v siru med zorenjem

V vzorcih sira smo s standardno metodo štetja ke ugotavljalni število posameznih skupin MO ob različnih časih zorenja, od časa  $t_0$  (vzorčenje sirnine) do konca zorenja sirov po 8-ih tednih ob času  $t_8$ . Pri tem smo 10 g aseptično odvzetega vzorca s pomočjo gnetilnika (Bagmixer R400, Interscience, Francija) homogenizirali v 90 ml raztopine  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  in tako dobili vzorec z razredčitvijo  $10^{-1}$ . Nadaljnje razredčitve vzorca, ki smo ga cepili na selektivna gojišča, smo pripravili po potrebi. Uporabili smo metodo razredčevanja po Kochu. Gojišča smo inkubirali pri ustreznih pogojih, kot je prikazano v preglednici 5.

Preglednica 5: Selektivna gojišča in pogoji inkubacije za določanje skupin MO v sirih med zorenjem

Gojišče	Skupina MO	Temperatura inkubacije	Čas inkubacije
VRB	koliformni MO	30 °C	24 ur
Rogosa	laktobacili	37 °C	48 ur
CACT	enterokoki	37 °C	48 ur
BP + RPF	stafilokoki	37 °C	48 ur

Po končani inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije s pomočjo elektronskega števca. Število ke/g sira smo izračunali po standardni formuli (IDF standard 100B, 1991).

### 3.3.6 Ugotavljanje prisotnosti bakterij rodu *Lactobacillus* in rodu *Enterococcus* v siru med zorenjem s pregledom morfologije

Po dveh ter štirih tednih zorenja sirov smo s pomočjo mikroskopiranja pregledali morfologijo dodanih sevov rodu *Lactobacillus* in *Enterococcus*. Opazovali smo obliko, velikost, formacije in obarvanje po Gramu. Za pripravo preparatov smo uporabili plošče z razmazi vzorcev sira, s katerih smo vzeli po nekaj kolonij, ki se na videz razlikujejo. Za ugotavljanje prisotnosti laktobacilov smo vzeli kolonije, ki so zrasle na trdem gojišču Rogosa, za ugotavljanje prisotnosti enterokokov pa smo vzeli kolonije, ki so zrasle na trdem gojišču CACT. Enterokoke smo opazovali tudi iz tekočega gojišča M17. Te kolonije smo nanesli na objektno stekelce, jih označili in nato s kompletom barvali po Gramu po navodilih proizvajalca (Bio-Mérieux, Marcy L'Etoile, Francija). Pripravljene preparate smo si ogledali pod mikroskopom pri 1000 - kratni povečavi.

Priprava vzorca za barvanje po Gramu:

- Kapljico fiziološke raztopine smo kanili na objektno steklo.
- V kapljici smo s cepilno zanko razmazali nekaj mikrobne biomase (s sterilno ezo se dotaknemo kolonije na gojišču). Uporabili smo aseptično tehniko dela.
- Razmaz smo posušili na zraku ter ga fiksirali tako, da smo ga trikrat potegnili čez plamen gorilnika.

Barvanje po Gramu:

- S kristal violet barvamo 1 min. in spiramo z vodo.
- Nanesemo barvilo lugol, barvamo 1 min. in spiramo z vodo.
- Razbarvamo preparat s 95 % mešanico etanola in etra, spiramo z vodo.
- Barvilo safranin pustimo 1 min. in spiramo z vodo.
- Preparat osušimo s papirnato brisačo in mikroskopiramo z imerzijo.

Za barvanje po Gramu smo vzorčili sire:

- K3/t<sub>2</sub>

- K1/t<sub>4</sub>
- ST3/t<sub>2</sub>
- ST1/t<sub>4</sub>

### 3.3.7 Ugotavljanje identičnosti sevov avtohtone starterske kulture v vzorcih sira med in ob koncu zorenja

Identičnost bakterij rodu *Lactobacillus* in rodu *Enterococcus* smo ugotavljali v kontrolnih sirih (K1, K2 in K3), pripravljenih brez dodanih stafilokokov. Uporabili smo metodo verižnega pomnoževanja s polimerazo (PCR) in sicer analizo RAPD, kjer smo uporabili začetni oligonukleotid M13, ki so ga uporabili Torriani in sod. (1999). Tudi mešanico in program RAPD-PCR smo izvedli kot so ga opisali v omenjenem delu.

#### 3.3.7.1 Izolacija laktobacilov in enterokokov iz vzorcev sira

Izolacijo laktobacilov in enterokokov smo izvedli vzporedno s spremeljanjem gibanja mikrobine populacije laktobacilov in enterokokov tako, da smo odvzete vzorce sira pripravili enako kot za mikrobiološke analize (poglavlje 3.3.5.4), le da smo z ustreznimi razredčitvami pripravili razmaze na ploščah z že razlitimi in osušenimi gojišči. Za podlago smo uporabili enake vrste gojišč kakor v poglavju 3.3.5.4 in jih prav tako inkubirali. Po 48 urni inkubaciji smo s plošč pod sterilnimi pogoji naključno pobrali po 21 kolonij laktobacilov in 21 kolonij enterokokov. Vsako kolonijo posebej smo nato prenesli v epico z 1 ml tekočega gojišča. Laktobacile smo vnesli v tekoče gojišče MRS, enterokoke pa v tekoče gojišče M17, čemur je sledila 24 urna inkubacija na 37 °C. Po končani inkubaciji smo epice s kulturami centrifugirali 5min. na 6000 g, sterilno odstranili gojišče, sprali celice z 1 ml sterilne deionizirane vode, resuspendirali usedlino celic v 500 µl sterilne deionizirane vode in zamrznili.

#### 3.3.7.2 Izolacija DNK

Za izolacijo DNK smo uporabili postopek s toploto, podobno kot so ga opisali Silvi in sod. (2003). Predhodno zamrznjene celice smo odmrznili, jih dobro premešali in segrevali 5 min. na 100 °C. Mešanico smo takoj nato ohladili na led, medtem pa v drugih epicah pripravili po 180 µl tritona (1%). V triton smo dodali po 20 µl toplotno obdelanih celic (redčitev 1:10). Mešanico smo dobro premešali in jo shranili v zamrzovalniku na -20 °C.

#### 3.3.7.3 Reakcija RAPD-PCR

Reakcijska mešanica 20 µl je bila sestavljena iz (Torriani in sod., 1999):

- 5 µl tarčne DNK (pridobljena iz celic, obdelanih s toploto in tritonom)
- 0,2 µl dNTP
- 0,3 µl začetnega oligonukleotida M13
- 4 µl pufra brez MgCl<sub>2</sub>
- 3,2 µl MgCl<sub>2</sub> (delovna koncentracija 4 mM)

- 0,1 µl Go-Taq Flexi DNA polimeraze
- 7,2 µl H<sub>2</sub>O

Pogoji reakcije so prikazani v preglednici 6.

Preglednica 6: Parametri reakcije RAPD-PCR

Reakcija	Parametri	Št. ciklov
začetna denaturacija DNK	94 °C / 3min.	1
Denaturacija DNK	94 °C / 1min.	
Prileganje začetnega oligonukleotida	45 °C / 20 s	40
Podaljševanje verige	72 °C / 2 min.	
Zaključno podaljševanje verige	72 °C / 5 min.	1

7 µl reakcijske mešanice smo nato analizirali z elektroforezo na 2 % agaroznem gelu. Elektroforezo smo vodili pri 100 V 60 min. Gel smo po elektroforezi obarvali s SYBR Safe™ (Invitrogen) in pregledali pod UV svetlobo ( $\lambda = 280$  nm).

### 3.3.8 Ugotavljanje protimikrobne aktivnosti vzorcev sira

Protimikrobno aktivnost kontrolnih sirov K1, K2 in K3 smo ugotavljali proti izbranim stafilokokom skozi celotno obdobje zorenja sira. V ta namen smo uporabili štiri različne metode in sicer metodo z neposrednim stikom rezine vzorca sira odvzetega ob določenem času in posameznega stafilokoka, ter tri metode različno pripravljenih ekstraktov iz vzorca sira odvzetega ob določenem času.

#### 3.3.8.1 Metoda 1 – metoda z neposrednim stikom

Z metodo 1 smo ugotavljali protimikrobno aktivnost vzorcev sirov proti posameznim sevom stafilokokov z neposrednim stikom. Na petrijeve plošče smo nalili trdo gojišče M17. Ko se je to gojišče osušilo, smo čezenzj prelili 4 ml poltrdnega gojišča BHI, inokuliranega s 40 µl 18 urne kulture posameznega seva stafilokoka in jih prav tako osušili. Na tako pripravljene petrijeve plošče smo nato polagali rezine sira, vzorčenih vsak drugi teden zorenja (ob času t<sub>2</sub>, t<sub>4</sub>, t<sub>6</sub> in t<sub>8</sub>). Rezine sira smo pripravili tako, da smo predhodno vzorčene in zamrznjene zavrtke sirov razrezali na 5 enakih rezin. Rezine smo odrezali tako, da smo dobili celoten prerez sira. Vsak vzorec po določenem času zorenja smo razdelili na 5 petrijevih plošč z vsakim posameznim sevom stafilokoka. Plošče smo nato inkubirali 24-48 ur pri 37 °C.

#### 3.3.8.2 Metoda 2 – ekstrakcijska metoda s K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Za pripravo ekstraktov smo uporabili sir homogeniziran s K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (po postopku opisanem v poglavju 3.3.5, odstavek 4), ki smo tako pripravljenega zamrznili. Pred izvedbo poskusa smo vzorce homogeniziranega sira odmrznili in centrifugirali (10 min., 6000 g). Supernatant smo uporabili kot ekstrakt 1 (Sn1). Usedljino smo nato resuspendirali v CP (pH 2,53) 1:1, močno premešali ter vsebino razdelili na dva dela. Prvi del smo centrifugirali (10 min., 6000 g) ter supernatant uporabili kot ekstrakt 2 (Sn2), drugi del pa smo toplotno

obdelali (10 min., 100 °C), centrifugirali (10 min., 6000 g) in nato dobljeni supernatant uporabili kot ekstrakt 3 (Sn3). Shemo priprave ekstraktov prikazuje slika 6.

Za ugotavljanje protimikrobne aktivnosti teh ekstraktov smo uporabili metodo lise na trdem gojišču. Petrijeve plošče smo pripravili na način, ki je opisan zgoraj (odstavek 3.3.8.1). Po 15 µl vsakega od dobljenih ekstraktov smo nanašali na petrijeve plošče, prelite s poltrdim gojiščem BHI in inokuliranim s posameznim sevom stafilokoka. Prav tako smo za primerjavo nanašali CP. Vsak ekstrakt smo nanesli trikrat po 5 µl na isto mesto. Tako pripravljene plošče smo inkubirali 24-48 ur pri 37 °C. Shemo postopka prikazuje slika 4.

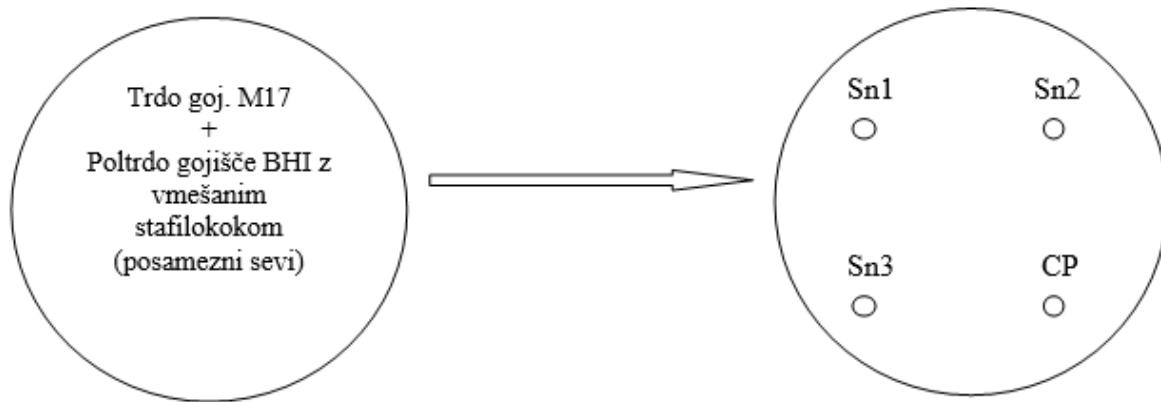
### 3.3.8.3 Metoda 3 – ekstrakcijska metoda s CP

5 g predhodno vzorčenega in zamrznjenega sira (-80 °C), smo zmečkali in homogenizirali z 10 ml CP (pH 2,56) ogretega na 45 °C. Mešanico smo inkubirali 30 min. pri 45 °C. Polovico vzorca smo nato centrifugirali (10 min., 6000 g), dali za 30 min. na -20 °C, nato pa odstranili strjeno maščobo. Dobljeni supernatant smo uporabili kot ekstrakt 1' (Sn1'). Drugo polovico smo topotno obdelali (10 min., 100 °C), centrifugirali (10 min., 6000 g), dali za 30 min. na -20 °C in nato odstranili strjeno maščobo. Tako smo dobili supernatant, ki je predstavljal ekstrakt 2' (Sn2'). Shemo priprave ekstraktov prikazuje slika 6.

### 3.3.8.4 Metoda 4 – ekstrakcijska metoda s toplo vodo

5 g predhodno vzorčenega in zamrznjenega sira (-80 °C), smo zmečkali in homogenizirali z 10 ml tople vode, zakisane z HCl (pH 2,9) ter ogrete na 45 °C. Mešanico smo inkubirali 30 min. pri 45 °C. Polovico smo nato centrifugirali (20 min., 6000 g, 4 °C), odstranili izločeno maščobo ter tako dobili supernatant, ki nam je predstavljal ekstrakt 1" (Sn1"). Drugo polovico smo topotno obdelali (10 min., 100 °C), nato centrifugirali (20 min., 6000 g, 4 °C), odstranili izločeno maščobo in supernatant uporabili kot ekstrakt 2" (Sn2"). Shemo priprave ekstraktov prikazuje slika 6.

Ekstrakte Sn1', Sn2', Sn1" in Sn2" smo nato uporabili za ugotavljanje protimikrobne aktivnosti z metodo lise na trdem gojišču. Petrijeve plošče smo pripravili na način, ki je opisan zgoraj (odstavek 3.3.8.1). Po 15 µl vsakega od dobljenih ekstraktov smo nanašali na petrijeve plošče s posameznim sevom stafilokoka. Prav tako smo za primerjavo nanašali CP in zakisano vodo. Vsak ekstrakt smo nanesli trikrat po 5 µl na isto mesto. Tako pripravljene plošče smo inkubirali 24-48 ur na 37 °C. Shemo postopka prikazuje slika 5.



Slika 4: Shema priprave plošč z ekstrakti iz sira pripravljenih po metodi 2

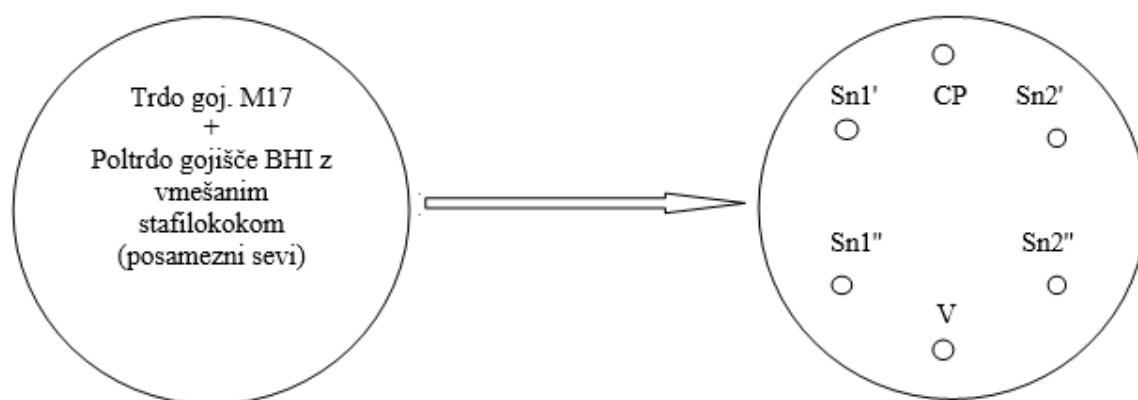
Legenda:

Sn1 – ekstrakt 1

Sn2 – ekstrakt 2

Sn3 – ekstrakt 3

CP – citratni pufer



Slika 5: Shema priprave plošč z ekstrakti iz sira pripravljenimi po metodi 3 in 4

Legenda:

Sn1' – ekstrakt 1'

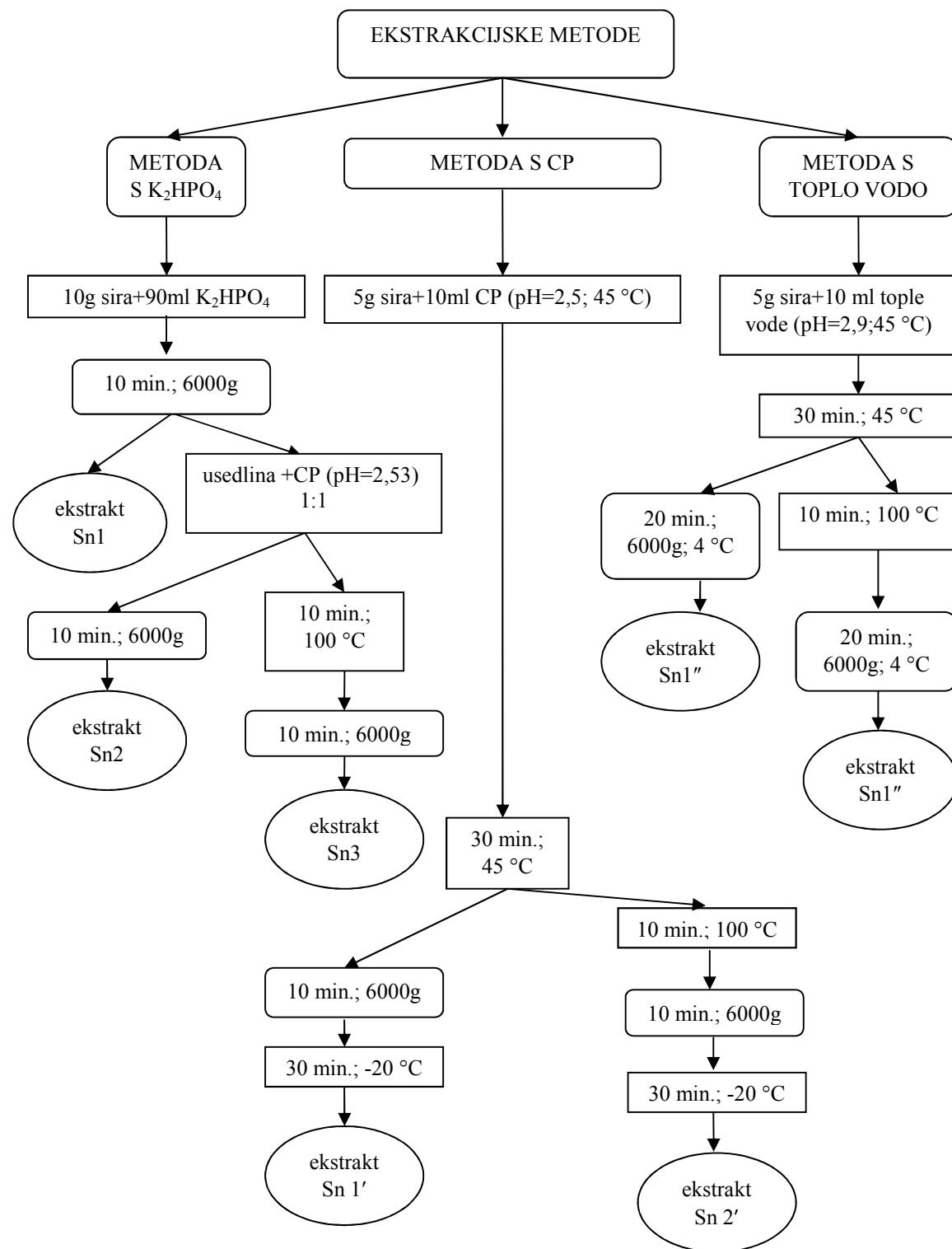
Sn2' – ekstrakt 2'

Sn1'' – ekstrakt 1''

Sn2'' – ekstrakt 2''

CP – citratni pufer

V – zakisana voda



Slika 6: Shema priprave ekstraktov

## 4 REZULTATI

### 4.1 KEMIJSKA ANALIZA MLEKA

Mleko, ki smo ga uporabili za izdelavo sirov je v povprečju vsebovalo 4,0 % maščob, 3,2 % beljakovin, 4,6 % laktoze, 8,6 % suhe snovi brez maščob ter skupno število MO nekaj več kot 396.000 ke/ml mleka. Povprečne vrednosti smo izračunali iz šestih vzorcev mleka. Kemijska sestava in mikrobiološka slika mleka sta podani v prilogi A.

### 4.2 VREDNOST pH SIRA

#### 4.2.1 Vrednost pH med stiskanjem sira

Pomembna lastnost starterskih kultur je sposobnost tvorbe kisline, ki preprečuje razvoj neželenih MO in vpliva na oblikovanje organoleptičnih lastnosti sira. Zaželeno je, da vrednost pH med stiskanjem sirov čim hitreje pade do vrednosti 5,3. V preglednicah 7 in 8 so prikazane začetne in končne vrednosti pH med stiskanjem kontrolnih sirov (K1, K2, K3) in sirov z dodanimi stafilokoki (ST1, ST2, ST3). Sirjenja so potekala pod enakimi pogojmi.

Preglednica 7: Začetne in končne vrednosti pH kontrolnih sirov med stiskanjem sira

SIR	Zač. pH	Konč. pH	Δ pH	Čas (h)
K1	6,48	5,43	1,05	20
K2	6,51	5,52	0,99	20
K3	6,58	5,53	1,05	20
povprečje	<b>6,52</b>	<b>5,49</b>	<b>1,03</b>	<b>20</b>

Preglednica 8: Začetne in končne vrednosti pH sirov z dodanimi stafilokoki med stiskanjem sira

SIR	Zač. pH	Konč. pH	Δ pH	Čas (h)
ST1	6,67	5,49	1,18	20
ST2	6,58	5,48	1,10	20
ST3	6,51	5,50	1,01	20
povprečje	<b>6,59</b>	<b>5,49</b>	<b>1,10</b>	<b>20</b>

Legenda:

Čas (h): čas stiskanja, potreben za padec vrednosti pH do približno 5,3

Δ pH: razlika med začetno in končno vrednostjo pH, med stiskanjem sirov

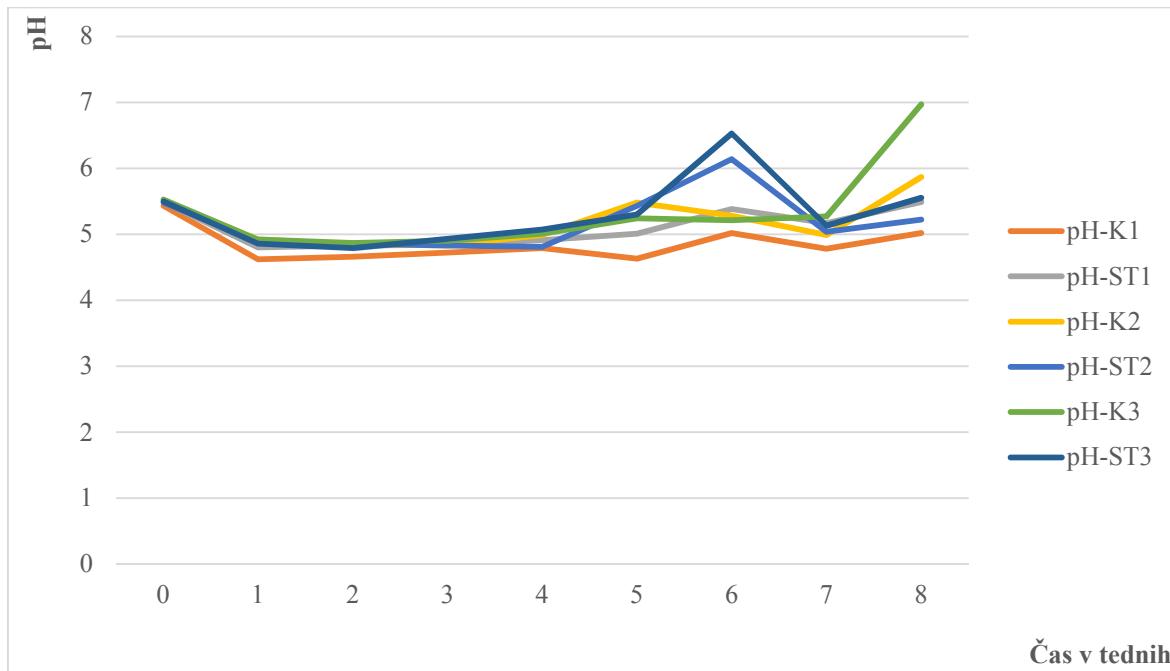
Začetni pH: vrednost pH sirov pred stiskanjem sirov

Končni pH: vrednost pH sirov po stiskanju sirov

Iz zgornjih preglednic vidimo, da se je vrednost pH med stiskanjem sirov približala želeni vrednosti pH 5,3. Za padec vrednosti pH na doseženo končno vrednost 5,49 je bilo potrebno dolgo časa (20 ur). Prav tako je razvidno, da ni bilo bistvene razlike v poteku tvorbe kisline med kontrolnim sirom, kateremu smo dodali samo avtohtono startersko kulturo in sirom, kjer smo poleg avtohtone starterske kulture dodali še stafilokoke.

#### 4.2.2 Vrednost pH med zorenjem sira

Med zorenjem sirov smo spremljali vrednost pH. Potek spremenjanja pH vrednosti kontrolnih sirov in sirov z dodanimi stafilokoki glede na izmerjene vrednosti med zorenjem je prikazan na sliki 7.



Slika 7: Spreminjanje vrednosti pH kontrolnih sirov (K1, K2, K3) in sirov z dodanimi stafilokoki (ST1, ST2, ST3) med zorenjem

Iz zgornje slike je razvidno, da poteka spremenjanje pH vrednosti pri vseh sirih podobno. Po 5 tednih zorena se sicer pojavljajo manjši odmiki meritev pri posameznih sirih, kar lahko povežemo z različnim mestom vboda sonde pri vzorčenju sirov. Po končanem stiskanju imajo vsi siri pH vrednost okoli 5,5. Ta vrednost se do 1 tedna zorena le rahlo spusti na vrednost okoli 5,0 in nato ostane nespremenjena do 4 tednov zorena, ko ponovno naraste na vrednost okoli 5,5 in pri približno enaki vrednosti ostane do konca zorena sira. pH se po 4 tednih zorena dvigne, ker so pogoji za rast MKB vse slabši in se število bakterij, ki tvorijo kisline v siru zmanjšuje – prihaja do lize bakterijskih celic in sprostitev encimov, ki pripomorejo pri proteolizi in lipolizi v siru.

#### 4.3 VELIKOST POPULACIJE ČISTIH KULTUR

Število ke čistih kultur smo podali kot število celic v ml gojišča. Rezultati velikosti populacije posamezne čiste kulture, predno smo cepili mleko za izdelavo posameznega sira, so za sire K1, K2, K3, ST1, ST2 in ST3 podani v preglednicah 9, 10 in 11.

Preglednica 9: Število ke/ml čistih kultur rodu *Lactobacillus*

Siri	Sev K 2/4	Sev K 29/3	Sev K 31/5
K 1	$9,27 \times 10^8$	$1,24 \times 10^9$	$3,91 \times 10^8$
K 2	$1,12 \times 10^9$	$6,09 \times 10^8$	$1,35 \times 10^9$
K 3	$7,54 \times 10^8$	$5,55 \times 10^8$	$9,45 \times 10^8$
ST 1	$1,24 \times 10^9$	$4,55 \times 10^8$	$1,05 \times 10^9$
ST 2	$9,0 \times 10^8$	$4,45 \times 10^8$	$1,43 \times 10^9$
ST 3	$1,36 \times 10^9$	Ni rezultata	$2,15 \times 10^9$

Preglednica 10: Število ke/ml čistih kultur rodu *Enterococcus*

Siri	Sev K 9/2	Sev K 29/7	Sev K 50/6
K 1	$2,14 \times 10^9$	$1,99 \times 10^9$	$2,66 \times 10^9$
K 2	$1,70 \times 10^9$	$1,69 \times 10^9$	$1,40 \times 10^9$
K 3	$1,41 \times 10^9$	$1,45 \times 10^9$	$1,20 \times 10^9$
ST 1	$1,48 \times 10^9$	$1,57 \times 10^9$	$1,86 \times 10^9$
ST 2	$2,17 \times 10^9$	$1,32 \times 10^9$	$1,89 \times 10^9$
ST 3	$2,95 \times 10^9$	$1,87 \times 10^9$	$2,53 \times 10^9$

Preglednica 11: Število ke/ml čistih kultur rodu *Staphylococcus*

Siri	Sev S 12	Sev S 15	Sev S 17	Sev S 18	Sev S 19
ST 1	$9,27 \times 10^8$	$6,45 \times 10^8$	Ni rezultata	$8,27 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$
ST 2	$6,82 \times 10^8$	$4,73 \times 10^8$	$4,91 \times 10^8$	$4,55 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$
ST 3	$1,05 \times 10^9$	$5,0 \times 10^8$	$8,55 \times 10^8$	$7,73 \times 10^8$	$9,27 \times 10^8$

#### 4.4 UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI KOLIFORMNIH MIKROORGANIZMOV V TERMIZIRANEM MLEKU

V vzorcih termiziranega mleka nismo zaznali prisotnosti koliformnih MO, saj v nobenem primeru ni bilo pozitivnega rezultata.

#### 4.5 MIKROBIOLOŠKA SLIKA V MLEKU IN SIRIH

##### 4.5.1 Velikost populacije posameznih skupin mikroorganizmov v inokuliranem mleku

Število ke posameznih skupin MO v inokuliranem mleku smo podali kot število celic v ml inokuliranega mleka. Rezultati velikosti populacije posameznih skupin MO v inokuliranem mleku za izdelavo posameznega sira, so za sire K1, K2, K3, ST1, ST2 in ST3 podani v preglednici 12.

Preglednica 12: Število ke/ml posameznih skupin MO v inokuliranem mleku

Siri	Laktobacili	Enterokoki	Stafilokoki
K 1	$5,45 \times 10^6$	$1,04 \times 10^5$	/
K 2	$5,09 \times 10^6$	$9,36 \times 10^6$	/
K 3	$4,91 \times 10^6$	$9,09 \times 10^6$	/
Povprečje siri K	$5,15 \times 10^6$	$6,18 \times 10^6$	/
ST 1	$1,09 \times 10^7$	$4,64 \times 10^6$	$7,73 \times 10^6$
ST 2	$2,99 \times 10^6$	$6,73 \times 10^6$	$1,54 \times 10^7$
ST 3	$7,82 \times 10^6$	$1,73 \times 10^7$	$9,64 \times 10^6$
Povprečje siri ST	$7,24 \times 10^6$	$9,56 \times 10^6$	$1,09 \times 10^6$

#### 4.5.2 Velikost populacije posameznih skupin mikroorganizmov v sirnini

Število ke posameznih skupin MO v sirnini smo podali kot število celic v g sirnинe. Rezultati velikosti populacije posameznih skupin MO v sirnini za izdelavo posameznega sira, so za sire K1, K2, K3, ST1, ST2 in ST3 podani v preglednici 13.

Preglednica 13: Število ke/g posameznih skupin MO v sirnini

Siri	Laktobacili	Enterokoki	Stafilokoki
K 1	$2,80 \times 10^7$	$5,50 \times 10^7$	/
K 2	$1,09 \times 10^7$	$2,16 \times 10^7$	/
K 3	$1,46 \times 10^6$	$4,09 \times 10^6$	/
Povprečje siri K	$1,35 \times 10^7$	$2,69 \times 10^7$	/
ST 1	$1,08 \times 10^7$	$2,72 \times 10^6$	$4,36 \times 10^6$
ST 2	$1,60 \times 10^7$	$3,15 \times 10^7$	$1,68 \times 10^6$
ST 3	$1,55 \times 10^7$	$4,70 \times 10^7$	$5,40 \times 10^6$
Povprečje siri ST	$1,41 \times 10^7$	$2,71 \times 10^7$	$3,81 \times 10^6$

#### 4.5.3 Velikost populacije posameznih skupin mikroorganizmov med zorenjem sira

Število ke celic posameznih skupin MO v siru po različnih časih zorenja smo podali kot število celic v g sira. Rezultati velikosti populacije posameznih skupin MO med zorenjem sirov, so kot povprečne vrednosti ob posameznem času za sire K1, K2 in K3 podani v preglednici 14.

Preglednica 14: Velikost populacije laktobacilov in enterokokov v kontrolnih sirih med zorenjem

Tedni	Laktobacili*	Enterokoki*
0	$4,35 \times 10^8$	$1,67 \times 10^8$
2	$7,93 \times 10^9$	$7,22 \times 10^8$
4	$1,44 \times 10^9$	$2,93 \times 10^8$
6	$5,17 \times 10^8$	$4,92 \times 10^8$
8	$9,39 \times 10^7$	$2,87 \times 10^8$

\*podane so povprečne vrednosti za sire K1, K2 in K3.

Rezultati velikosti populacije posameznih skupin MO med zorenjem sirov, so kot povprečne vrednosti ob posameznem času za sire ST1, ST2 in ST3 podani v preglednici 15.

Preglednica 15: Velikost populacije laktobacilov, enterokokov in stafilocokov v sirih z dodanimi stafilocokimi med zorenjem

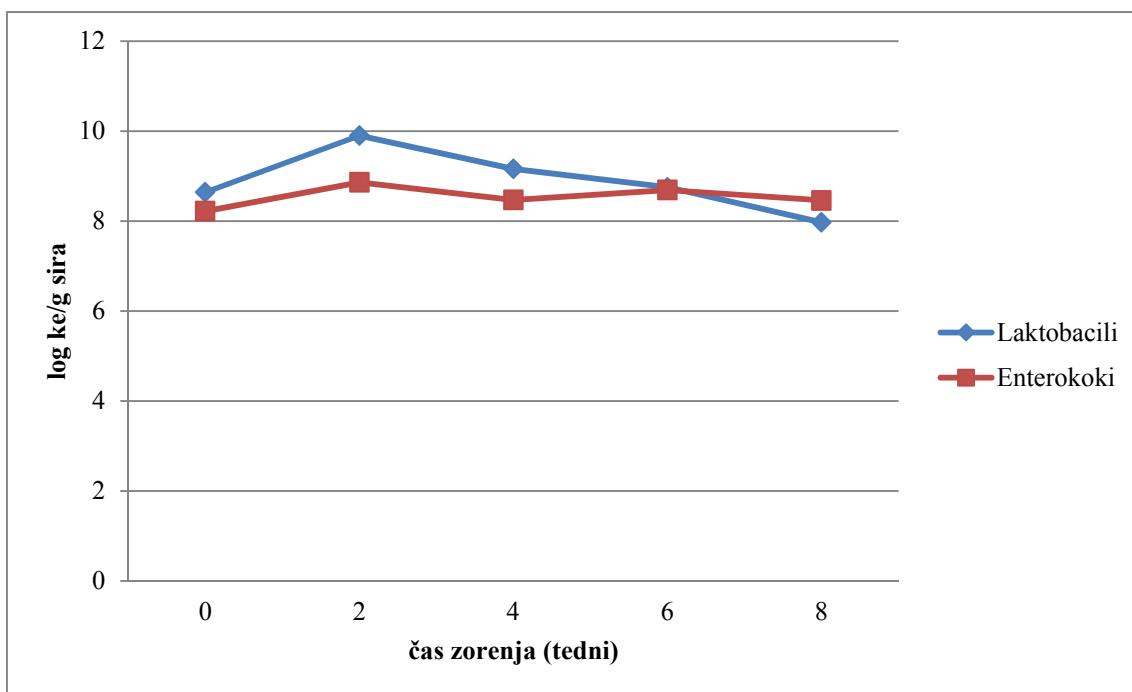
Tedni	Laktobacili*	Enterokoki*	Stafilocoki*
0	$3,44 \times 10^8$	$1,16 \times 10^8$	$4,58 \times 10^7$
2	$4,60 \times 10^9$	$1,11 \times 10^9$	$5,00 \times 10^5$
4	$5,44 \times 10^9$	$7,71 \times 10^8$	/
6	$5,58 \times 10^8$	$5,02 \times 10^8$	$6,45 \times 10^8$
8	$2,72 \times 10^8$	$5,45 \times 10^8$	$1,41 \times 10^6$

\*podane so povprečne vrednosti za sire ST1, ST2 in ST3.

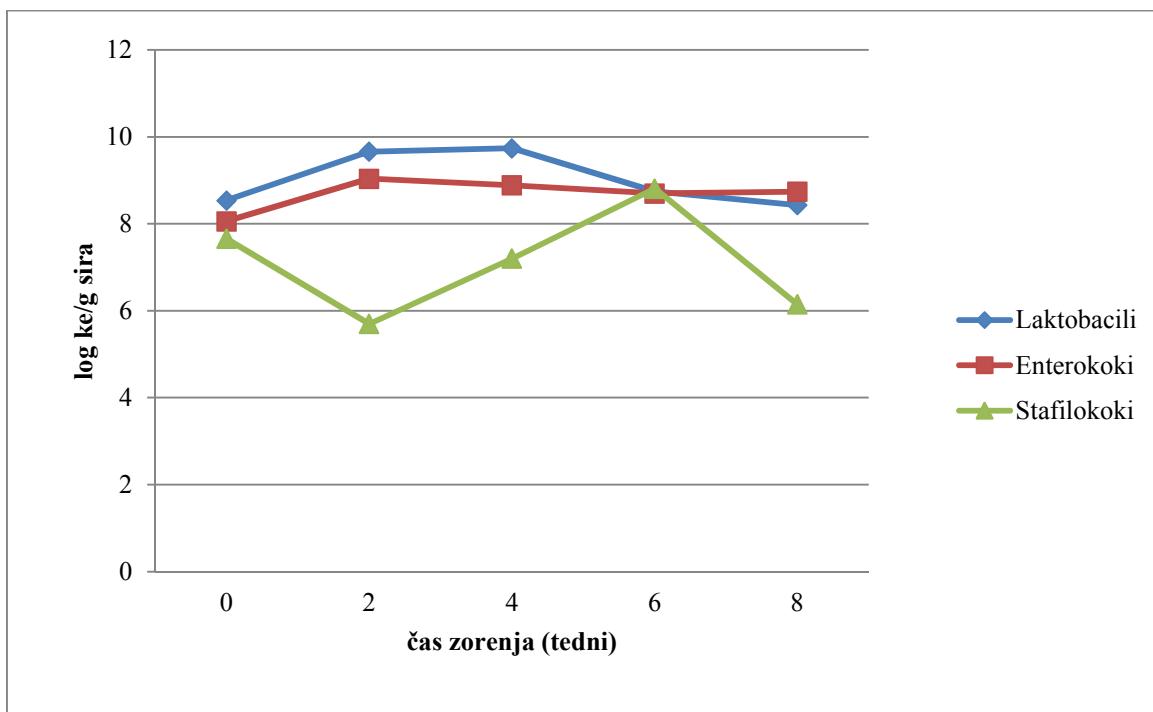
Rezultati mikrobioloških analiz sirov so prikazani na slikah 8 in 9. Podana so povprečna števila laktobacilov in enterokokov (slika 8) v kontrolnih sirih K1, K2 in K3 in v sirih z dodanimi stafilocokimi še stafilocokimi (slika 9) v sirih ST1, ST2 in ST3 med 8-tedenskim zorenjem.

Med zorenjem smo spremljali tudi število koliformnih bakterij, vendar so bile vrednosti na spodnji meji detekcije ( $\leq 10^2$ ), zato jih nismo vključili v sliko. Majhno število teh je rezultat zadovoljive kakovosti surovine in uspešne termične obdelave mleka. Le pri kontrolnem siru K3 je bilo ob  $t_0$  število zraslih kolonij na agarju VRB nekoliko više ( $6,7 \times 10^2$  ke/g sira).

Število stafilocokov je v začetku zorenja padalo vendar je po štirih tednih pričelo naraščati, po šestih tednih zorenja pa je ponovno naglo padlo. Število laktobacilov in enterokokov je v prvih dveh tednih zorenja rahlo naraščalo, nato pa pričelo padati.



Slika 8: Povprečno število laktobacilov in enterokokov v vzorcih kontrolnih sirov brez dodanih stafilokokov ob različnih časih zorenja



Slika 9: Povprečno število laktobacilov, enterokokov in stafilokokov v vzorcih sirov z dodanimi stafilokokimi ob različnih časih zorenja

## 4.6 UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI LAKTOBACILOV IN ENTEROKOKOV V SIRU MED ZORENJEM S PREGLEDOM MORFOLOGIJE

Z barvanjem po Gramu smo pripravili preparate vzorcev kolonij iz sirov K3 po 2 tednih zorenja, K1 po 4 tednih zorenja, ST3 po 2 tednih zorenja in ST1 po 4 tednih zorenja. Z opazovanjem preparatov pod mikroskopom pri 1000 – kratni povečavi smo žeeli potrditi prisotnost laktobacilov in enterokokov v siru ob različnem času zorenja.

### 4.6.1 Ugotavljanje prisotnosti laktobacilov

Z opazovanjem preparata kolonij z gojišča Rogosa, ki je selektivno gojišče za laktobacile smo po morfologiji kolonij sklepali, da so zrasli laktobacili. Po videzu so bile kolonije dveh vrst – gladke in rožičaste. Pod mikroskopom so bile gladke kolonije debelejše in malo kraje po Gramu pozitivne paličice, povezane v daljše verižice. Rožičaste kolonije pa so bile daljše po Gramu pozitivne igličaste paličice, povezane po dve skupaj, po tri in tudi več v verižice. Ena od rožičastih kolonij iz sira K3/t<sub>2</sub> pa je imela gram pozitivne paličice, ki so bile drobne a ne tako zelo tanke in igličaste.

Ker smo opazili tri različne tipe paličic, smo sklepali, da so v siru prisotni vsaj trije sevi laktobacilov, ki bi lahko bili naši sevi dodani v sir s pripravljeno startersko kulturo.

### 4.6.2 Ugotavljanje prisotnosti enterokokov

Z opazovanjem preparata kolonij z gojišča CATC smo po morfologiji kolonij sklepali, da so zrasle bakterije enterokoki. Pred uporabo (45 °C) smo namreč gojišču dodali suplemente natrijev karbonat, 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorid in natrijev azid in tako dosegli, da je bilo gojišče selektivno za enterokoke. Po videzu so bile kolonije dveh vrst, ki so se razlikovale po velikosti – velike in male kolonije. Pod mikroskopom so bile velike kolonije zelo drobni, okrogli po Gramu pozitivni koki, med njimi pa so bili okrogli prazni prostori. Male kolonije pa so bili zelo drobni po Gramu pozitivni koki, posamični vendar na gosto skupaj, vmes se pojavlja prazen prostor. Opazili smo tudi malo kolonijo z ovalnimi po Gramu pozitivnimi koki, po dva ali več skupaj.

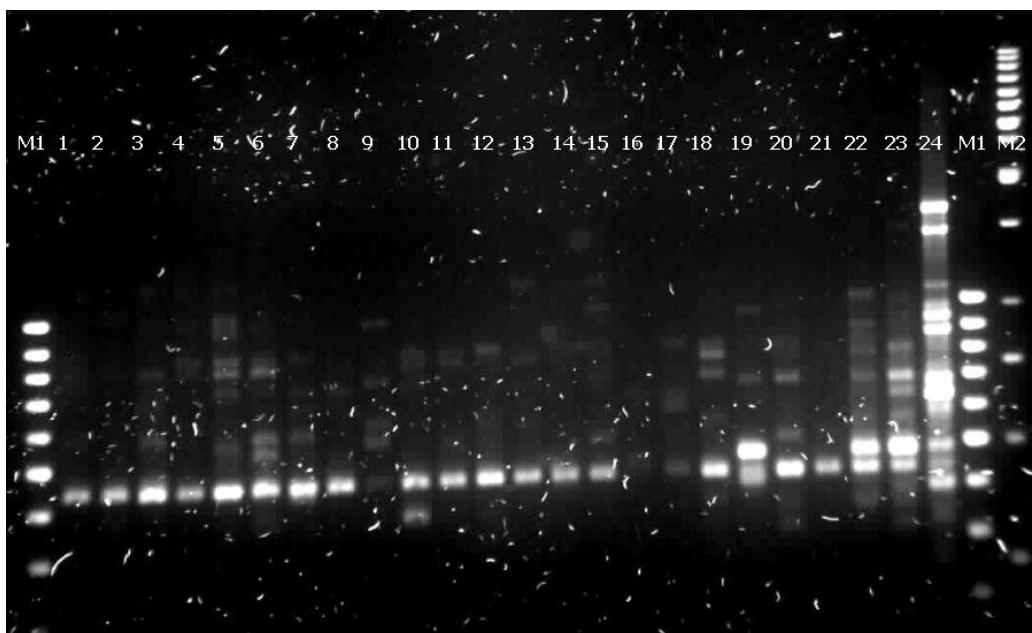
Z opazovanjem preparata pripravljenega iz tekočega gojišča M17 smo opazili ovalne po Gramu pozitivne koke po dva skupaj (diplokoke) in bolj okrogle po Gramu pozitivne koke, ki so bili posamično, po dva, po štiri skupaj in koke v gručah.

Ker smo opazili tri različne tipe kokov, smo sklepali, da so v siru prisotni vsaj trije sevi enterokokov, ki bi lahko bili naši sevi dodani v sir s pripravljeno startersko kulturo.

## 4.7 UGOTAVLJANJE IDENTIČNOSTI LAKTOBACILOV IN ENTEROKOKOV

### 4.7.1 Ugotavljanje identičnosti laktobacilov z metodo RAPD-PCR

Identičnost dodanih laktobacilov smo ugotavljali v kontrolnih sirih, ob različnih časih zorenja tako, da smo 21 naključno izbranih kolonij, zraslih na gojišču Rogosa pregledali z metodo RAPD-PCR. Slike 10 in 11 prikazujeta produkte reakcije RAPD-PCR, ki smo jih nanesli na 2 % agarozni gel, ter po ločevanju obarvali z barvilo SYBR Safe.



Slika 10: Rezultati ugotavljanja identičnosti bakterij rodu *Lactobacillus* z metodo RAPD-PCR v siru K1 na začetku zorenja (K1;  $t_0$ ); M1: velikostna lestvica 100 bp, M2: velikostna lestvica 1 kb, 1-21: DNK laktobacilov iz kontrolnih sirov, naključno osamljenih s plošč Rogosa, 22: kontrola K 2/4, 23: kontrola K 3/5, 24: kontrola K 29/3

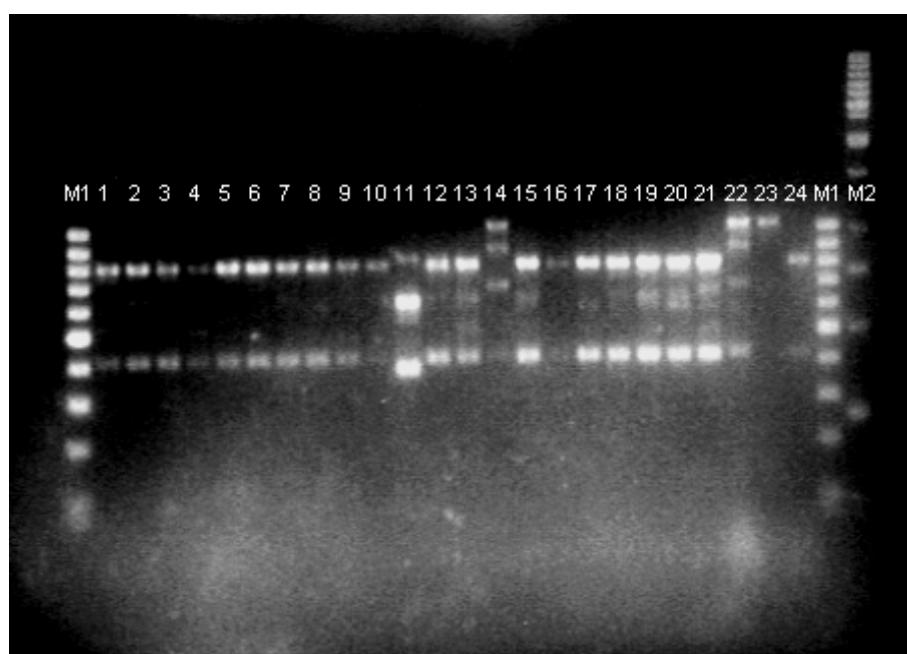


Slika 11: Rezultati ugotavljanja identičnosti bakterij rodu *Lactobacillus* z metodo RAPD-PCR v siru K1 po 6 tednih zorenja (K1;  $t_6$ ); M1: velikostna lestvica 100 bp, M2: velikostna lestvica 1 kb, 1-21: DNK laktobacilov iz kontrolnih sirov, naključno osamljenih s plošč Rogosa, 22: kontrola K 2/4, 23: kontrola K 3/5, 24: kontrola K 29/3

Z metodo RAPD-PCR smo želeli potrditi identičnost laktobacilov K2/4, K3/5 in 29/3 v siru pred in med zorenjem s čistimi kulturami omenjenih sevov. Na slikah 10 in 11 vidimo, da produkti naključno pregledanih laktobacilov ne dajo popolnoma jasnih potrditev, da bi bili sevi v siru identični uporabljenim sevom K2/4, K3/5 in K29/3. Nejasen rezultat smo dobili tudi ob začetku zorenja (ob  $t_0$ ) v sirih K1 in K2. Prav takšno sliko smo dobili po dveh tednih zorenja (ob  $t_2$ ) v siru K2. Po šestih tednih zorenja (ob  $t_6$ ) pa so se v obeh sirih K1 in K2 pojavili na nekaterih progah razmazi, kjer se ne vidi rezultatov pomnoževanja DNK - kot v progah 2, 17, 18, 19, 20 in 21 na sliki 11. Po končanem zorenju (ob  $t_8$ ) pa so bili ti razmazi v obeh sirih še številčnejši.

#### 4.7.2 Ugotavljanje identičnosti enterokokov z metodo RAPD-PCR

Prisotnost DNK dodanih enterokokov smo ugotavljali v kontrolnih sirih, ob različnih časih zorenja tako, da smo 21 naključno izbranih kolonij, zraslih na gojišču M17 pregledali z metodo RAPD-PCR. Sliki 12 in 13 prikazujeta produkte reakcije RAPD-PCR, ki smo jih nanesli na 2 % agarozni gel, ter po ločevanjuobarvali z barvilm SYBR Safe (sliki 12 in 13).



Slika 12: Rezultati ugotavljanja identičnosti rodu *Enterococcus* z metodo RAPD-PCR v siru K2 po 2 tednih zorenja (K2; t<sub>2</sub>); M1: velikostna lestvica 100 bp, M2: velikostna lestvica 1 kb, 1-21: DNK enterokokov iz kontrolnih sirov, naključno osamljenih s plošč CATC, 22: kontrola K 9/2, 23: kontrola K 29/7, 24: kontrola K 50/6



Slika 13: Rezultati ugotavljanja identičnosti rodu *Enterococcus* z metodo RAPD-PCR v siru K2 po 8 tednih zorenja (K2; t<sub>8</sub>); M1: velikostna lestvica 100 bp, M2: velikostna lestvica 1 kb, 1-21: DNK enterokokov iz kontrolnih sirov, naključno osamljenih s plošč CATC, 22: kontrola K 9/2, 23: kontrola K 29/7, 24: kontrola K 50/6

Z metodo RAPD-PCR smo želeli potrditi prisotnost in identičnost sevov K9/2, K29/7 in 50/6, predstavnikov rodu *Enterococcus* v siru, med zorenjem. Na slikah 12 in 13 vidimo, da je večina naključno pregledanih enterokokov identičnih sevu K50/6. Po dveh tednih zorenja (ob  $t_2$ ) se to lepo vidi na progah 1-10, 12, 13, 15-21 (slika 12), po osmih tednih zorenja (ob  $t_8$ ) pa na progah 1-5 ter 8-21 (slika 13). Po dveh tednih zorenja je enterokok na progi 14 identičen sevu K 9/2, medtem ko je enterokok na progi 11 nekaj nespecifičnega. Slika 13, pa ob končanem zorenju prikazuje enterokok identičen sevu K 9/2 na progi 6, enterokok identičen sevu K 29/7 pa na progi 7.

#### 4.8 PROTIMIKROBNA AKTIVNOST

##### 4.8.1 Metoda 1 – metoda z neposrednim stikom

Rezine sira smo polagali na petrijeve plošče s pripravljenimi stafilokoki in jih inkubirali pri 37 °C, 24 do 48 ur. Kot rezultat so se pojavile zelo lepe inhibicijske cone, vseh treh paralelk kontrolnih sirov tekom zorenja proti stafilokoku S 17. Slike 14, 15, 16, 17, 18 predstavljajo protimikrobni učinek sirov K1, K2 in K3 proti S17, med zorenjem. Proti ostalim stafilokokom pa niso nastale izrazite inhibicijske cone.



slika 14



slika 15



slika 16



slika 17



slika 18

Slika 14: Inhibicijska cona; sir K1/t<sub>0</sub>; indikator S17 (Foto: Čanžek Majhenič)

Slika 15: Inhibicijska cona; sir K2/t<sub>2</sub>; indikator S17 (Foto: Čanžek Majhenič)

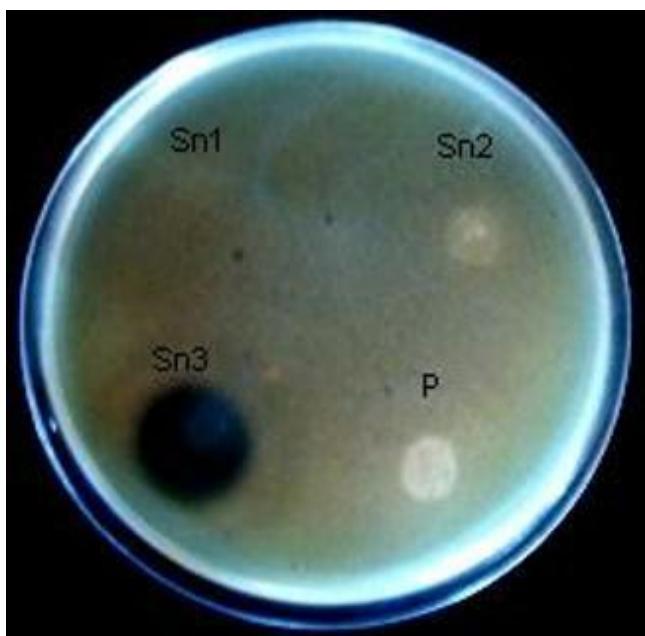
Slika 16: Inhibicijska cona; sir K3/t<sub>4</sub>; indikator S17 (Foto: Markič)

Slika 17: Inhibicijska cona; sir K1/t<sub>6</sub>; indikator S17 (Foto: Markič)

Slika 18: Inhibicijska cona; sir K2/t<sub>8</sub>; indikator S17 (Foto: Markič)

#### 4.8.2 Metoda 2 – ekstrakcijska metoda s $K_2HPO_4$

Z metodo lise na trdem gojišču smo ugotavljali protimikrobeno aktivnost ekstraktov Sn1, Sn2 in Sn3, ter samega CP (pH 2,5). Po inkubaciji 24-48 ur pri 37 °C smo dobili en pozitiven rezultat. Lepa, čista inhibicijska cona, premera 1,7 cm je nastala pri nanosu ekstrakta 3 (Sn3), pripravljenem iz sira K1 po  $t_0$ , na petrijevo ploščo z stafilokokom S17 (slika 19). Pri nobenem od ostalih testiranih supernatantov nismo opazili zaviralnega učinka proti nobenem od indikatorskih stafilokokov (S12, S15, S17, S18, S19).



Slika 19: Inhibicijska cona ekstrakta Sn3, iz sira K1 vzorčenega ob  $t_0$ , proti indikatorskemu stafilokoku S17  
(Foto: Markič)

#### 4.8.3 Metoda 3 - ekstrakcijska metoda s CP

Z metodo lise na trdem gojišču smo ugotavljali protimikrobeno aktivnost ekstraktov Sn1', Sn2', ter samega CP (pH 2,5). Po inkubaciji 24-48 ur pri 37 °C pri nobenem testiranem ekstraktu nismo opazili zaviralnega učinka proti nobenem od indikatorskih stafilokokov (S12, S15, S17, S18, S19).

#### 4.8.4 Metoda 4 - ekstrakcijska metoda s toplo vodo

Z metodo lise na trdem gojišču smo ugotavljali protimikrobeno aktivnost ekstraktov Sn1'', Sn2'', ter same zakisane vode. Po inkubaciji 24-48 ur pri 37 °C pri nobenem testiranem ekstraktu nismo opazili zaviralnega učinka proti nobenem od indikatorskih stafilokokov (S12, S15, S17, S18, S19).

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Tradisionalni siri narejeni iz surovega mleka so vir raznolike mikrobne populacije. Tudi v slovenskih tradisionalnih sirih iz surovega mleka so Čanžek Majhenič in sod. (2005, 2007) v svojih raziskavah potrdili prisotnost bogate mikrobne populacije. Številni MO tvorijo kompleksen ekosistem. MKB v sirih so odgovorne za tvorbo željenih značilnih aromatičnih snovi med zorenjem. MKB pa imajo pomembno vlogo tudi pri zagotavljanju trajnosti in varnosti fermentiranih mlečnih izdelkov. Ugotovljeno je, da imajo siri narejeni iz surovega mleka intenzivnejšo in bolj tipično aroma kakor siri narejeni iz pasteriziranega mleka. Prav zato se posebna pozornost pri proučevanju avtohtonih sirov posveča mikrobioti (Trmčić in sod., 2011; Terzić-Vidojević in sod., 2009).

Mikrobnja populacija v tradisionalnih sirih je zelo heterogena. Med zorenjem se spreminja kajti sevi, ki v siru prevladujejo v začetku zorenja ne prevladujejo nujno tudi ob koncu zorenja sira (Terzić-Vidojević in sod., 2009). Ob koncu zorenja v siru prevladujejo tiste MKB, ki so sposobne preživeti in se razmnoževati v zahtevnejših razmerah, ki se vzpostavijo v siru (prisotnost kisline, soli, malo hranilnih snovi). Med njimi so pogosto sevi bakterij, ki so sposobne tvoriti protimikrobne snovi – bakteriocine. V slovenskih tradisionalnih sirih so ob koncu zorenja prevladujoče MKB iz rodov *Lactobacillus* in *Enterococcus*, katerih mnogi sevi delujejo protimikrobno proti patogenim bakterijam in bakterijam, ki povzročajo kvarjenje sira (Sarantinopoulos in sod., 2001b, Trmčić in sod., 2011).

Z diplomsko nalogo smo žeeli preskusiti avtohtono mikroblno populacijo laktobacilov in enterokokov izolirano iz kraškega ovčjega sira v obliki »po meri narejene« starterske kulture za izdelavo sira. Proučevali smo dinamiko mikrobne populacije avtohtone starterske kulture in dinamiko mikrobne populacije avtohtone starterske kulture ob prisotnosti stafilokokov med postopkom izdelave sira in zorenjem. Spremljali smo potek fermentacije in zorenja sira, določali smo protimikrobno aktivnost sira proti nekaterim predstavnikom stafilokokov ter določali prevladujočo mikrobioto v siru med zorenjem in v zrelem siru.

V kraškem ovčjem siru prevladujejo MKB iz rodov *Lactobacillus* in *Enterococcus* (Katana, 2001). Predstavniki mikrobne starterske kulture so bili skupaj z mnogimi drugimi sevi laktobacilov in enterokokov prvotno izolirani iz tega avtohtonega sira z aseptičnim vzorčenjem in naključnim izborom 437 izolatov enterokokov z gojišča CATC (Mohar in sod., 2005) in 117 izolatov laktobacilov iz gojišča Rogosa (Čanžek Majhenič in sod., 2007). Biokemijski »prstni odtis« (sistem PhP plošč) je razvrstil enterokoke v 34 in laktobacile v 16 PhP tipov. Predstavniki posameznih skupin enterokokov in laktobacilov so bili tudi opisani z osnovnimi fenotipskimi in genotipskimi metodami. V naši starterski kulturi so prisotni trije sevi iz rodu *Lactobacillus* in trije sevi iz rodu *Enterococcus*. Izmed 11 najzanimivejših enterokokov in 10 najzanimivejših laktobacilov pa so bili ti izbrani na podlagi proučevanja njihovih tehnoloških karakteristik.

Izmed enterokokov so bili izbrani sevi K9/2, K29/7 in K50/6.

- K9/2 ali *Enterococcus faecalis* je proteolit, mleko koagulira po 12 urah, predstavnik PhP skupine z 8 izolati in je protimikroben za 1 od 33 stafilokokov (oster rob).
- K29/7 ali *Enterococcus* spp. je proteolit, mleko koagulira po 24 urah, predstavnik PhP skupine z 22 izolati in je protimikroben za 5 od 33 stafilokokov(oster rob).
- K50/6 ali *Enterococcus faecalis* je proteolit, mleko koagulira po 24 urah, predstavnik PhP skupine z 49 izolati in je močno protimikroben za 5 od 33 stafilokokov (oster rob) ter rahlo protimikroben za 1 od 33 stafilokokov (zabrisan rob).

Izmed laktobacilov pa so bili izbrani K2/4, K29/3 in K31/5.

- K2/4 ali *Lactobacillus paracasei* ni proteolit, mleko koagulira po 9 urah, predstavnik PhP skupine z 18 izolati in je rahlo protimikroben za 23 od 33 stafilokokov (zabrisan rob).
- K29/3 ali *Lactobacillus paracasei* je proteolit, mleko koagulira po 24 urah, predstavnik PhP skupine z 27 izolati in je rahlo protimikroben za 22 od 33 stafilokokov (zabrisan rob).
- K31/5 ali *Lactobacillus brevis* ni proteolit, mleko koagulira po 24 urah, predstavnik PhP skupine z 12 izolati in je rahlo protimikroben za 16 od 33 stafilokokov (zabrisan rob).

Med razlogi, zakaj v sirih izdelanih po tradicionalnem postopku prevladujejo enterokoki nad laktobacili in laktokoki, so včasih omenjali predvsem nehigienske razmere med molžo in obdelavo mleka za sirjenje. Glede enterokokov so tudi sicer mnenja deljena. Na eni strani so nekateri sevi neposredno povezani z nekaterimi kliničnimi infekcijami. Poleg tega proizvajajo tudi biogene amine, kot sta tiramin in histamin in so odporni tudi proti nekaterim antibiotikom. Vse to kaže na njihovo potencialno nevarnost za zdravje. Na drugi strani pa naj bi imeli pomembno vlogo pri nastanku tipične arome sira, kot posledici metabolizma citrata (Suzzi in sod., 2000; Čanžek Majhenič, 2006; Mohar Loberg, 2008; Terzić-Vidojević in sod., 2015). Zato je mogoče enterokoke s pozitivnimi tehnološkimi in metabolnimi lastnostmi tudi vključiti med starter kulture predvsem zaradi njihovih specifičnih proteolitičnih lastnosti in tvorbe aromatičnih snovi, ter zaradi tvorbe bakteriocinov (Suzzi in sod., 2000; Mohar Loberg, 2008; Foulquie Moreno in sod., 2006). Mnogi sevi *Ent. faecalis* in *Ent. faecium*, ki jih najdemo v sirih, proizvajajo veliko acetaldehyda, diacetila, etanola in acetoina in tako lahko pozitivno vplivajo na aroma in okus sirov. Poleg tega so enterokoki učinkoviti lipoliti, kar tudi pozitivno vpliva na senzorične lastnosti sirov (Terzić-Vidojević in sod., 2015; Giraffa, 2002; Sarantinopoulos in sod., 2001a; Foulquie Moreno in sod., 2006). Enterokoki so pogosto tvorci bakteriocinov imenovanih enterocini, ki pa so v proizvodnji živil zelo velikega pomena kot naravni konzervans saj zavirajo rast bakterij, ki povzročajo kvar sira in nekaterih patogenih bakterij, ki izvirajo iz hrane (Sarantinopoulos in sod., 2001b). Seva *Ent. faecalis* in *Ent. faecium* sta v mleku in sirih sposobna proizvajati enterocine, ki zavirajo rast bakterij *List. monocytogenes* (Giraffa in Carminati, 1997; Ennahar in sod., 1998). Du Toit in sod. (2000) so proučevali bakterije *Ent. faecalis* in *Ent. faecium* iz blata prašičev ter tvorbo bakteriocinov in ugotovili, da *Ent. faecalis* proizvaja manj bakteriocinov kot *Ent. faecium*,

čigar bakteriocinsko delovanje je usmerjeno antagonistično proti rodovom *Enterococcus* spp., *Clostridium* spp., in *Propionibacterium* spp. Bakteriocini so pokazali visoko raven termostabilnosti in najvišjo aktivnost pri nevtralnem pH. Nekateri enterocini pa so protimikrobeno aktivni tudi proti vrstam *S. aureus*, *Bacillus cereus* in *Vibrio Cholerae* (Franz in sod., 1999; Ghrairi in sod., 2008; Ogier in Serror, 2008). Predpostavljam, da sposobnost protimikrobeno aktivnosti širokega spektra omogoča prevlado v mikrobnji populaciji sira, narejenega iz surovega mleka vrsti *Ent. faecalis*. Enterokoki naj bi imeli tudi pozitiven vpliv na rast in razmnoževanje drugih MKB, kateri njihova močna proteolitična aktivnost naj bi spodbujala produkcijo plina pri bakterijah iz rodov *Leuconostoc* ter produkcijo kisline pri predstavnikih rodov *Lactococcus* (López – Díaz in sod., 2000). V raziskavah Mohar Loberg (2008) in Katana Burja in sod. (2003), naj bi enterokoki zavzemali večji del mikrobske populacije v tradicionalnih slovenskih ovčjih sirih, zlasti v kraškem ovčjem siru (Katana, 2001). V raziskavi Paveljšek (2012) so prav tako ugotovili, da kraški, dolenjski in bovški ovčji sir vsebujejo med 17 % in 39 % bakterij rodu *Enterococcus*. Trmčić in sod. (2008) pa so v sirih tolminc in kraški ovčji določili prisotnost bakteriocinov enterocin P, A, B, L50A, L50B in citozin, kateri so značilni za seva *Ent. faecalis* in *Ent. faecium*. To pa ni presenetljivo, saj sta ta dva seva v obeh preiskovanih sirih izmed enterokokov najbolje zastopana.

Laktobacili so skupina MKB, ki pomembno vplivajo na oblikovanje teksturnih in organoleptičnih lastnosti tradicionalnih sirov. Mezofilni laktobacili, ki so običajno del mikrobiote tradicionalnih sirov so znani kot MO z dobro fermentacijsko sposobnostjo ter se uveljavljajo kot MO s pozitivnim učinkom na zdravje (Čanžek Majhenič in sod., 2007). Laktobacili veljajo za MO, ki so varni za uporabo v hrani – status GRAS in so pogosto uporabljeni kot probiotiki. Skupaj z enterokoki predstavljajo prevladujočo mikrobsko populacijo v avtohtonih ovčjih sirih, kot so Feta (Rantsiou in sod., 2008), Fiore sardo (Mannu in sod., 2000), Canestrato Pugliese (Aquilanti in sod., 2006), sir iz regije Mariovo (Levkov in sod., 2014) in drugi. Značilni so tudi za slovenske ovčje sire, kjer najdemo vrste *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. curvatus*, *Lb. brevis* in *Lb. coryniformis* subsp. *torquens*, katere predstavljajo 23 do 28 % celotne bakterijske populacije (Paveljšek, 2012; Čanžek Majhenič in sod., 2007; Katana, 2001). Mannu in sod. (2000), Fitzsimons in sod. (1999) in drugi avtorji ugotavljajo, da je med laktobacili vodilen sev *Lb. paracasei* v sirih narejenih iz surovega mleka, v vseh stopnjah zorenja. Tudi v kraškem ovčjem siru je med laktobacili *Lb. paracasei* daleč prevladujoč, saj predstavlja 59 % vseh laktobacilov. Komaj 15 % vseh laktobacilov predstavlja *Lb. brevis*, 10 % *Lb. plantarum*, 4 % *Lb. rhamnosus*, 4 % *Lb. curvatus* in 2 % *Lactobacillus* spp. (Čanžek Majhenič in sod., 2007). *Lb. paracasei* spada med skupino fakultativno heterofermentativnih laktobacilov, kateri uspešno preživijo v neugodnem okolju sira (nizek pH, visoka vsebnost soli, pomankanje fermentabilnih ogljikovih hidratov, konkurenčna mikrobska populacija, nizek redoks potencial), kar kaže, da imajo na pomembno vlogo pri zorenju sirov. Poleg dobre prilagodljivosti na neugodne razmere pa k njihovi sposobnosti preživetja v siru vpliva tudi tvorba protimikrobnih snovi kot so mlečna kislina, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in bakteriocini. Nekateri sevi bakterije *Lb. paracasei* izločajo bakteriocine s širokim spektrom delovanja, ki protimikrobeno delujejo proti nekaterim patogenim bakterijam kot so *S. aureus*, *Bacillus cereus*, proti *Salmonella* spp. in *Pseudomonas aeruginosa* (Lozo in sod.,

2004) ali z ozkim spektrom delovanja proti sorodnim vrstam bakterij (Lozo in sod., 2007). V raziskavi Trmčić in sod. (2008) pa so v sirih tolminc in kraški ovčji določili prisotnost bakteriocinov plantaricin A, helveticin J in acidocin B. Med njimi prevladuje plantaricin A, kar je v skladju z pričakovanji, saj je *Lb. plantarum* po raziskavi Čanžek Majhenič in sod. (2007) eden najbolj reprezentativnih sevov kraškega ovčjega sira, medtem ko *Lb. helveticus* in *Lb. acidophilus* nista bila značilna predstavnika.

Pri spremeljanju tehnoloških zmogljivosti naše avtohtone starterske kulture smo med stiskanjem sira zasledili počasno padanje vrednosti pH, saj željene vrednosti 5,3 v času stiskanja nismo dosegli. Končna dosežena vrednost pH je bila 5,49, za dosego te vrednosti pa smo potrebovali nekoliko dlje časa. Tudi v siru z dodanimi stafilokoki je tvorba kisline potekala počasi. Razlog za počasno padanje vrednosti pH najdemo v tem, da smo v avtohtonih starterski kulturi uporabili mešanico več sevov NMKB. Vinderola in sod. (2002) so namreč opazili, da pri proizvodnji sira kjer uporabljamo kombinacijo starterskih kultur pogosto zasledimo interakcije med posameznimi sevi, ki se lahko odražajo kot stimulativno ali inhibitorno medsebojno delovanje. Počasno oziroma zakasnjeno tvorbo kislin omenja tudi Oumer s sod. (2001). Pri izdelavi čedarja so bakteriocini inhibirali mezofilno startersko kulturo in s tem upočasnili začetek fermentacije, kar se je odražalo v zmanjšani produkciji kisline. Bakteriocin laktokokcin, ki ga proizvaja *Lb. lactis* subsp. *lactis* DPC3286 povzroča, če sev dodamo h kulturi *Lb. lactis* subsp. *cremoris* HP, časovno zakasnitev pri padcu pH na 5,2 pri izdelavi čedarja. Avtohtona starterska kultura, ki smo jo uporabili pri izdelavi sirov je sestavljena iz sevov pripadnikov NMKB, te pa na splošno veljajo za slabše tvorce kisline. Še posebej za slabe tvorce kisline veljajo enterokoki. Čeprav so v različnih sirih našli seve *Ent. faecalis* in *Ent. faecium*, ki so dobri tvorci kisline in jih poizkušali uporabiti kot startersko kulturo, nimamo podatkov o njeni uspešni uporabi (Giraffa, 2003). Za izboljšanje tehnoloških zmogljivosti starterske kulture bi bilo potrebno preizkusiti druge kombinacije izoliranih avtohtonih sevov, ki bi bili pri tvorbi kisline med fermentacijo uspešnejši. Potrebna pa bi bila tudi optimizacija tehnološkega postopka izdelave sira.

Med zorenjem sira smo tedensko spremljali spreminjačje vrednosti pH sira v kontrolnih sirih ter sirih z dodanimi stafilokoki. Vsem sirom se pH približno enako znižuje in doseže najnižjo vrednost po 2 tednih zorenja in se ne spreminja veliko do 4 tedna zorenja, ko vrednost pH sirov prične rasti. Siru z dodanimi stafilokoki prične močneje rasti kakor pri kontrolnem siru in v 5 tednu doseže znatno višjo vrednost. Ta pojav lahko ponovno razložimo z opažanjem Vinderola in sod. (2002) in dejstvom, da smo siru z dodanimi stafilokoki dodali mešanico različnih sevov stafilokokov, ki imajo določen vpliv na avtohtono startersko kulturo. Logično je namreč pričakovati, da tudi med zorenjem sira potekajo razne interakcije med samimi sevi stafilokokov, kakor tudi med stafilokoki in MO, ki so dodani kot predstavniki avtohtone starterske kulture. Lahko pa sklepamo, da so večja odstopanja meritev pH vrednosti posledica močne plesnivosti sirov, ki se je razrasla zaradi pogostega vzorčenja sirov in pogojev zorenja, ki niso bili idealni. Iz tega razloga sirov nismo senzorično ocenili. Siri z dodanimi stafilokoki so ob koncu zorenja dosegli podobne vrednosti pH od 5,2 do 5,5. Kontrolni siri pa so imeli različne vrednosti pH ob koncu zorenja.

Spremljali smo dinamiko rasti laktobacilov v sirih z in brez dodane mešanice sevov stafilokokov. Število laktobacilov se je v kontrolnih sirih, kjer smo dodali samo avtohtono mešanico sevov iz začetnega števila  $5,15 \times 10^6$  ke/g v inokuliranem mleku hitro povečalo že v sirnem zrnu in med stiskanjem ter nato doseglo najvišje število po dveh tednih zorenja  $7,93 \times 10^9$  ke/g. Nato je rast števila laktobacilov počasi začela padati vse do konca zorenja, ko smo ugotovili število  $9,39 \times 10^7$  ke/g. V siru, kjer smo poleg avtohtone starterske kulture dodali tudi stafilokoke so laktobacili v začetku dosegali podobno hitro rast in prav tako dosegli najvišjo rast po 2 tednih zorenja sirov, ki pa se je pri teh sirih obdržala tudi še po 4 tednih zorenja in šele nato začela padati. Najvišje doseženo število laktobacilov pa je pri teh sirih  $5,44 \times 10^9$  ke/g, kar je za spoznanje nižje kakor pri sirih brez dodanih stafilokokov. Po 6 tednih zorenja sira je število laktobacilov v obeh sirih enako, nato pa smo na koncu zorenja sirov – po 8 tednih ugotovili v sirih z dodanimi stafilokoki število  $2,72 \times 10^8$  ke/g, kar je višje kakor pri kontrolnih sirih.

Spremljali smo dinamiko rasti enterokokov v sirih z in brez dodane mešanice sevov stafilokokov. Število enterokokov se je v kontrolnih sirih, kjer smo dodali samo avtohtono mešanico sevov iz začetnega števila  $6,18 \times 10^6$  ke/g v inokuliranem mleku hitro povečalo že v sirnem zrnu in med stiskanjem ter nato doseglo najvišje število po 2 tednih zorenja  $7,22 \times 10^8$  ke/g. Nato je rast števila enterokokov le rahlo padla, ter se nato obdržala vse do konca zorenja, približno enaka – ob koncu zorenja sira smo ugotovili število  $2,87 \times 10^8$  ke/g. Torej je v tem siru število enterokokov ob koncu zorenja višje od števila laktobacilov. V siru, kjer smo poleg avtohtone starterske kulture dodali tudi stafilokoke, so enterokoki v začetku dosegali podobno hitro rast in prav tako dosegli najvišjo rast po 2 tednih zorenja sirov, ko je ugotovljeno število enterokokov  $1,11 \times 10^9$  ke/g, kar je za spoznanje višje kakor pri sirih brez dodanih stafilokokov. Nato pa do konca zorenja sira število rahlo pada, je po 6 tednih zorenja v obeh sirih približno enako, po 8 tednih zorenja pa smo ugotovili število  $5,45 \times 10^8$  ke/g – rahlo višje število kakor pri kontrolnih sirih. Število enterokokov in laktobacilov je ob koncu zorenja tega sira približno enako.

Rast stafilokokov med zorenjem sira smo pozorno spremljali, saj smo žeeli določiti vpliv dodane avtohtone starterske kulture na njihovo rast. Želeli smo določiti morebitno antistafilokokno aktivnost, saj je *S. aureus* pogost kontaminant tradicionalnih poltrdih in trdih tipov sira. Ta bakterijska vrsta je sposobna tvoriti različne enterotoksine, ki pa je močno povezana z rastno krivuljo bakterije. Tvorba je največja v fazi pospešene rasti in v prvi polovici eksponentne faze zato je pomembna omejitev rasti in delovanja stafilokokov že v začetnih fazah izdelave sira. V našem primeru je število predstavnikov stafilokokov je v začetku zorenja tudi v resnici padlo, vendar je po 4 tednih pričelo ponovno hitro naraščati, pri 6 tednih zorenja je bilo število stafilokokov v siru najvišje, ko smo ugotovili število  $6,45 \times 10^8$  ke/g. Za tem je ponovno naglo padlo, vendar ne toliko kakor smo pričakovali, saj doseže končno število  $1,41 \times 10^6$  ke/g. Gibanje rasti stafilokokov med zorenjem lahko primerjamo z gibanjem vrednosti pH v stafilokoknih sirih. Po dveh tednih zorenja sira, ko je pH v sirih najnižji je število predstavnikov avtohtone starterske kulture največje. Tako lahko zaključimo, da ima na rast stafilokokov v tem obdobju zorenja sira močen vpliv tvorba kisline prisotnih sevov avtohtone starterske kulture. Vrednost pH v siru namreč pade z naraščanjem šibkih kislin, ki jih v sir izločajo MKB oziroma v našem

primeru avtohtona starterska kultura. Šibke kisline predvsem mlečna in ocetna pa poleg tega, da v siru znižata vrednost pH učinkujeta na celice tudi baktericidno, saj nedisociirane vstopajo v mikrobne celice, kjer disociirajo, kar je za celice usodno (Owehand in Vesterlund, 2004). Abdalla in sod. (1993) so ugotovljali vpliv komercialne starterske kulture MKB na preživetje treh patogenov, ki pogosto kontaminirajo sire narejene iz surovega mleka (White Pickled Cheese) in ugotovili, da njena uporaba inhibira rast vseh treh. Po 30 dneh v siru z dodano startersko kulturo niso odkrili prisotnosti celic *S. aureus*. V vseh poskusih se je v sirnini sira narejenega z dodatkom starterske kulture pH spustil pod 4,7 medtem, ko je bil v poskusih brez nje vedno više od 5,5. Zatorej so ugotovili, da je uporaba starterske kulture izredno pomembna za varnost tega sira in da tradicionalna metoda izdelave ni bila potrjena kot varna praksa. Zato se danes za zagotavljanje varnosti tradicionalnih sirov že uporablajo zaščitne starterske kulture. Intenzivno pa se raziskuje seve NMKB in poskuša odkriti pravo kombinacijo, ki bo sposobna tvoriti zadostno količino kisline in dodatno s svojim izločanjem bakteriocinov zavirala rast patogenih MO ter hkrati ohranjala značilne senzorične lastnosti tradicionalnih sirov. Takšno tako imenovano »po meri narejeno« zaščitno startersko kulturo so uspešno sestavili za sir tolminc (Čanžek Majhenič in sod., 2015; Trmčić in sod., 2010; Rogelj, 2010). Ko so izbrane avtohtone združbe MO preskusili v »challenge« testih so mleko v treh paralelkah kontaminirali s *S. aureus*, prvo praralelko so uporabili kot kontrolo rasti brez prisotnosti avtohtone mikrobne združbe, v drugi paralelki so dodali avtohtono združbo predstavnikov laktobacilov in v tretji paralelki celotno avtohtono mikrobno združbo sira. Tako pripravljeno mleko so inkubirali in sledili temperaturno/časovnem režimu izdelave sira tolminc. Pri poskusu so spremljali rast MKB, kontaminanta *S. aureus* in padec vrednosti pH. Tako avtohtona združba predstavnikov laktobacilov kot celotna avtohtona mikrobna združba sta bili uspešni pri zaviranju rasti *S. aureus*, vendar inhibicije niso mogli pripisati delovanju bakteriocinov. Končni zaključek te študije je bil, da kljub prisotnosti bakteriocinogenih sevov v mikrobni združbi tradicionalnih sirov, inhibicije *S. aureus* ne moremo pripisati samo delovanju bakteriocinov, temveč so bakteriocini le ena izmed tehnoloških zaprek za razrast tega oportunistika.

Z metodo RAPD-PCR smo žeeli potrditi prisotnost in identičnost predstavnikov rodu *Lactobacillus* - sevov K2/4, K3/5 in 29/3 ter prisotnost predstavnikov rodu *Enterococcus* - sevov K9/2, K29/7 in K50/6 v sirih med zorenjem. Za analizo smo uporabili začetni oligonukleotid M13 kot so opisali Torriani in sod. (1999), ki so z njegovo uporabo uspešno določili identičnost bakterij *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*. Rezultati, ki smo jih mi pridobili na ta način so manj zanesljivi za rod *Lactobacillus*, saj iz slik ni jasno razvidne identičnosti med produkti RAPD-PCR naključno pregledanih sevov ter kontrolnih sevov. Zaradi težav z jasnostjo rezultatov smo opravili na laktobacilih več ponovitev, v dveh paralelkah sirjenj (sir K1 in K2) ter ob vseh časih vzorčenj med zorenjem, vendar so dobljeni rezultati identični. Za jasnejše rezultate bi bilo potrebno metodo optimizirati na primer z izborom ustreznejšega RAPD primerja ali/in z optimizacijo pogojev reakcije RAPD-PCR. Za rod *Enterococcus* pa smo z uporabo začetnega oligonukleotida M13 v analizi RAPD uspeli potrditi identičnost vseh sevov. Naši rezultati namreč prisotnost sevov K9/2, K29/7 in K50/6 nedvomno potrjujejo, saj so

pokazali, da je večina naključno pregledanih sevov identičnih sevu K50/6. Potrdili smo tudi prisotnost seva K9/2 v dveh primerih in seva K29/7 v enem primeru. Iz teh rezultatov sklepamo, da je v siru najbolje preživel sev K50/6 in je tako najverjetnejše prevladajoč. Sev K50/6 pa je prav tako najbolje zastopan v kraškem ovčjem siru saj je bilo iz njega izoliranih največ ravno predstavnikov tega seva (Mohar in sod., 2005)

Pri določanju protimikrobne aktivnosti sira z neposrednim polaganjem rezin sirov – metoda z neposrednim stikom na petrijeve plošče s stafilokoki smo dobili lepe cone inhibicije vseh treh paralelk sirov, vzorčenih ob različnih časih zorenja, proti indikatorskemu stafilokoku S17. Predvidevamo, da je tak rezultat posledica delovanja bakteriocina, ki ga izločajo starterske kulture in je zaviralno deloval le na stafilokok S17. Na tak način so Sarantinopoulos in sod. (2001b) poskušali določiti tvorbo bakteriocina pri *Ent. faecium* FAIR-E 198 izoliranem iz tradicionalnega grškega sira Feta. Ta sev so uporabili kot startersko kulturo pri proizvodnji Feta sira. Kot indikatorski organizem so uporabili *List. innocua* CTC 1014, vendar pa pri svojem poskusu niso dobili pozitivnih rezultatov. Pri določanju protimikrobne aktivnosti ekstraktov sira pa smo dobili le en pozitiven rezultat in sicer z ekstrakcijsko metodo s  $K_2HPO_4$  – metoda 2. Ekstrakt Sn3 iz vzorca sira K1 je po času 0 z indikatorskim stafilokokom S17 dal čisto inhibicijsko cono premera 1,7cm. Ta rezultat nakazuje verjetno delovanje bakteriocina na indikatorski stafilokok S17, kakor smo predvidevali po dobljenih rezultatih z metodo z neposrednim stikom. Ekstrakcijsko metodo s toplo vodo, ki v našem primeru ni dala pozitivnega rezultata pa so Rodríguez in sod. (2005) opisali kot uspešno. Trmčić in sod. (2008), Rogelj (2010), Čanžek Majhenič in sod. (2015), pa so pri raziskavah opravljenih na siru tolminc prav tako uporabili metodo neposrednega polaganja koščkov sira na trdo gojišče, inokulirano s stafilokoki, in metodo lise na površini z izvlečki iz sirov, ki so jih pripravili po treh različnih protokolih. Proti-stafilokorno aktivnost so detektirali le pri metodi neposrednega polaganja koščkov sira, izvlečki iz sira pa so bili aktivni proti enterokokom, neučinkoviti pa proti stafilokokom. Kot najboljši način priprave izvlečkov se je izkazal postopek »kuhanja« v CP. Predvidevali so, da delujejo v siru protimikrobne snovi sinergistično, medtem ko se pri pripravi izvlečkov iz sirov, bodisi določene protimikrobne snovi (predvsem bakteriocini) ne izločijo ali pa razredčijo do te mere, da izvleček ni inhibitoren za stafilokoke. Zato so za ugotavljanje protimikrobne aktivnosti mikrobnne združbe sira izbrali drug pristop. Uporabili so metodo iskanja genskih determinant za bakteriocine na skupni DNK, izolirani iz sira. Najprej so optimizirali postopek direktne ekstrakcije DNK iz sira. Na izolirani DNK so izvedli PCR pomnoževanje za 19 bakteriocinov MKB. Genske determinante za bakteriocine so detektirali v vseh sirih, v nekaterih celo za 9 različnih bakteriocinov. Za pridobitev bakteriocinogenih izolatov, so nato iz 9-tih sirov (5 sirov tolminc in 4 kraški ovčji) pridobili mikrobnne združbe na različnih selektivnih podlogah (CATC za enterokoke, Rogosa za laktobacile, M17 za skupne mezofilne ter termofilne koke). Sledilo je preverjanje protimikrobne aktivnosti mikrobnih združb in njihovih supernatantov z metodo spota na površini. Kljub temu, da so tako v siru, kot izoliranih mikrobnih združbah, potrdili prisotnost bakteriocinogenih sevov, so z metodo spotov ugotovili proti-stafilokokni učinek edino pri mikrobnih združbah laktobacilov, ki pa je po nevtralizaciji kisline v supernatantih izginil, zato so sklepali, da so

stafilokoki, vključeni v raziskavo, neobčutljivi za bakteriocine sevov, ki so sestavljeni mikrobeno populacijo obravnavanih sirov. Kot najuspešnejša se je pokazala direktna detekcija bakteriocinskih genov v siru in mikrobenih združbah, pridobljenih iz istih vzorcev sira.

## 5.2 SKLEPI

Po analizi rezultatov, ki smo jih dobili v naši nalogi, lahko povzamemo sledeče sklepe:

- Avtohtona starterska kultura je zagotovila fermentacijo, vendar je vrednost pH med stiskanjem sirov padala počasi, kjer smo za dosego končne vrednosti pH 5,49 potrebovali dlje časa. V poteku fermentacije med sirom, kateremu smo dodali samo avtohtono startersko kulturo in sirom, kjer smo poleg avtohtone starterske kulture dodali še stafilokoke, ni bilo bistvene razlike.
- V mikrobeni populaciji zrelega sira je prevladovala avtohtona starterska kultura, ki uspešno raste in se razmnožuje do konca zorenja sira.
- Število stafilokokov v zrelem siru je bilo večje kot smo pričakovali. Njihovo število je najbolj padlo po štirih tednih zorenja, nato pa je ponovno naraslo.
- Z metodo RAPD-PCR nismo uspeli potrditi identičnosti bakterij rodu *Lactobacillus* v siru ob začetku zorenja, po 2 tednih in po 6 tednih.
- Z metodo RAPD-PCR smo uspešno potrdili identičnost bakterij rodu *Enterococcus* v siru ob začetku zorenja, po 2 tednih in po 6 tednih. Med enterokoki je prevladujoč sev *Enterococcus faecalis* K50/6, ki je med enterokoki prav tako najbolje zastopan v kraškem ovčjem siru.
- Sir ima protimikrobeni učinek skozi celotno zorenje proti sevu S17 kar smo potrdili z metodo z neposrednim stikom za določanje protimikroben aktivnosti. Uspeli smo tudi dokazati protimikroben učinek sira K1 po času 0 proti sevu S17 z ekstrakcijsko metodo s  $K_2HPO_4$  - lisa na trdem gojišču.
- Sir smo z uporabo avtohtone starterske kulture uspeli izdelati, vendar bi bilo potrebno tehnološki postopek še optimizirati. Uporabljeni sevi z zdravstvenega vidika niso oporečni.
- V primeru optimizacije pogojev zorenja bi nastali sir lahko senzorično poizkusili. Sklepamo, da bi bila testirana kultura uspešna pri zagotavljanju teksturnih in aromatičnih lastnosti sira in bi bil ustrezen za uporabo.

## 6 POVZETEK

V diplomski nalogi smo proučevali dinamiko mikrobne populacije avtohtone starterske kulture med tradicionalnim postopkom izdelave sira in zorenjem ter ob dodatku mešanice stafilokokov. Uporabljene seve, ki so bili sestavni del avtohtone starterske kulture so predhodno izbrali raziskovalci katedre za mlekarstvo Biotehniške fakultete izmed mnogih izolatov, tipičnih predstavnikov mikrobne združbe kraškega ovčjega sira. Sevi so bili izbrani na osnovi njihovih tehnoloških in protimikrobnih lastnosti. Pričakovali smo, da bodo izbrani sevi zagotovili pravilen potek fermentacije in zorenja sira, ter da bo ta kultura prevladajoča mikrobiota zrelega sira. Pričakovali smo tudi, da bodo izbrani sevi delovali zaviralno na stafilokoke, ter da bomo uspeli potrditi delovanje bakteriocinov, predstavnikov starterske kulture proti stafilokokom. Izdelali smo dva tipa sirov. Prvi tip so bili siri z dodano mešanico sevov avtohtone starterske kulture, drugi tip sirov pa so bili siri katerim smo poleg mešanice sevov avtohtone starterske kulture dodali mešanico sevov stafilokokov. Avtohtono startersko kulturo so sestavljeni sevi *Lactobacillus paracasei* K 2/4, *Lactobacillus brevis* K 3/5, *Lactobacillus paracasei* K 29/3, *Enterococcus faecalis* K 9/2, *Enterococcus spp.* K 29/7 in *Enterococcus faecalis* K 50/6. Sire smo vzorčili in določali prisotnost sevov avtohtone starterske kulture. Mikrobiološka analiza je vključevala določanje števila bakterij iz skupine laktobacilov, enterokokov, stafilokokov ter v vzorcih termiziranega mleka prisotnost koliformnih MO. Z izolacijo DNK iz vzorcev testnih sirov ter s pomočjo reakcije PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi smo ugotavljali prisotnost in identičnost uporabljenih sevov v siru med zorenjem.

Rezultati spremeljanja vrednosti pH med izdelavo sira so pokazali, da je avtohtona starterska kultura zagotovila tvorbo kisline, vendar je vrednost pH med stiskanjem sirov padala počasi, ker je bilo za dosego končne vrednosti 5,49 potrebno dlje časa. Sir smo z uporabo avtohtone starterske kulture uspešno izdelali, vendar je zaradi pogostega vzorčenja zaplesnel in ga nismo senzorično analizirali. Z metodo RAPD-PCR nismo uspeli potrditi identičnosti bakterij rodu *Lactobacillus* v siru ob začetku zorenja, po 2 in po 6 tednih, smo pa bili uspešni pri potrditvi identičnosti bakterij rodu *Enterococcus* v siru ob začetku zorenja ter po 2 in po 6 tednih. Ugotovili smo, da je med enterokoki prevladajoč sev *Ent. faecalis* K50/6, kar potrjuje izsledke predhodne raziskave Mohar in sod. (2005), da je ta sev najbolje zastopan v kraškem ovčjem siru saj je bilo iz njega izoliranih največ ravno predstavnikov tega seva. Rezultati spremeljanja števila stafilokokov v siru so pokazali, da starterske kulture ne zavirajo njihove rasti v želenem obsegu, dejstvo pa je, da je dodana avtohtona starterska kultura do določene meje vseeno uspešno zavirala prekomerno razrast dodanih stafilokokov. Z metodo neposrednega polaganja sira na gojišče z nacepljenimi stafilokoki smo dokazali protimikrobeni učinek skozi celotno zorenje proti sevu stafilokoka S17 ter v enem primeru z ekstrakcijsko metodo s  $K_2HPO_4$  - lisa na trdem gojišču.

Za izboljšanje tehnoloških zmogljivosti starterske kulture bi bilo potrebno preskusiti druge kombinacije izoliranih avtohtonih sevov, ki bi bili pri tvorbi kisline med fermentacijo uspešnejši. Potrebna pa bi bila tudi optimizacija tehnološkega postopka izdelave sira. Uporabljeni sevi z zdravstvenega vidika niso oporečni in v primeru optimizacije pogojev zorenja bi izdelani sir lahko senzorično ovrednotili. Sklepali smo, da bi bila testirana

kultura uspešna pri zagotavljanju teksturnih in aromatičnih lastnosti sira in bi bil sir ustrezen za uporabo. Nadalje, da je v mikrobski populaciji zrelega sira prevladovala avtohtona starterska kultura, ki se je med zorenjem sposobna prilagoditi neugodnim razmeram v siru in uspešno rasti in se razmnoževati do konca zorenja sira ter da so poleg sevov enterokokov, katerih identičnost smo potrdili med zorenjem sira prisotni tudi uporabljeni sevi laktobacilov, vendar bi morali metodo optimizirati na primer z izborom ustreznejšega RAPD primerja ali/in z optimizacijo pogojev reakcije PCR.

## 7 VIRI

- Abdalla O.M., Davidson P.M., Christen G.L. 1993. Survival of selected pathogenic bacteria in white pickled cheese made with lactic acid bacteria or antimicrobials. *Journal of Food Protection*, 56: 972-976
- 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
- Beresford T.P., Fitzsimons N.A., Brennan N.L., Cogan T.M. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11: 259-274
- Beresford T., Williams A. 2004. The microbiology of cheese ripening. V: *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Vol. 1. 3<sup>rd</sup> ed. Fox P.F., McSweeney P.L.H., Cogan T.M., Guiney T.P. (eds.). London, Elsevier Academic Press: 287-318
- Beuvier E., Buchin S. 2004. Raw milk cheeses. V: *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. Vol. 1. 3<sup>rd</sup> ed. Fox P.F., McSweeney P.L.H., Cogan T.M., Guiney T.P. (eds.). London, Elsevier Academic Press: 319-345
- Bogovič Matijašić B., Katana V., Rogelj I., Perko B., Kelly W., Ward L.J. H. 2002. Enterococci: the prevailing microflora of autochthonous ewe's cheese produced in Slovenia. V: *Enterococci in foods: functional and safety aspects: programme and book of abstracts*, May 30-31, 2002, Germany, Berlin. [S. l.], European commission: 12 str. [http://www.bfr.bund.de/cm/343/enterococci\\_may\\_02\\_abstracts00.pdf](http://www.bfr.bund.de/cm/343/enterococci_may_02_abstracts00.pdf) (17. junij 2016)
- Caplice E., Fitzgerald G.F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50: 131-149
- Centeno J. A., Menendez S., Rodriguez-Otero J. L. 1996. Main microbial flora present as natural starters in Ceberino raw cow's-milk cheese (Northwest Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 33: 307-313
- Centeno J. A., Menendez S., Hermida M. A., Rodriguez-Otero J. L. 1999. Effects of the addition of *Enterococcus faecalis* in Cebreiro cheese manufacture. *International Journal of Food Microbiology*, 48: 97-111
- Cleveland J., Montiville T.J., Nes I.F., Chikindas M.L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71: 1-20
- Coeuret V., Dubernet S., Bernardeau M., Gueguen M., Vernoux J. P. 2003. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait*, 83: 269–306

- Cogan T.M., Barbosa M., Beuvier E., Bianchi-Salvadori B., Cocconcelli P.S., Fernandes I., Gomez J., Kalantzopoulos G., Ledda A., Medina M., Rea M.C., Rodriguez E. 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research* 64: 409-421
- Cogan T.M., Beresford T.P., Steele J., Broadbent J., Shah N. P., Ustunol Z. 2007. Invited review: advances in starter cultures and cultured foods. *Journal of Dairy Science*, 90: 4005-4021
- Čanžek Majhenič A., Rogelj I., Perko B. 2005. Enterococci from Tolminc cheese: population structure, antibiotic susceptibility and incidence of virulence determinants. *International Journal of Food Microbiology*, 102: 239-244
- Čanžek Majhenič A. 2006. Enterococci: yin – yang microbes. *Mljekarstvo*, 56, 1: 5-20
- Čanžek Majhenič A., Mohar P., Rogelj I. 2007. Characterisation of the *Lactobacillus* community in traditional Karst ewe's cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 60, 3: 182-190
- Čanžek Majhenič A., Bogovič Matijašić B., Trmčić A., Rogelj I. 2015. Tailor-made starter cultures for preserving the uniqueness of traditional cheeses. V: *Beneficial microbes in fermented and functional foods*. Ravishankar Rai V., Jamuna Bai A. (eds.). Boca Raton, CRC Press Taylor & Francis Group: 15-34
- De Angelis M., Corsetti A., Tosti N., Rossi J., Corbo M. R., Gobbetti M. 2001. Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2011–2020
- De Vuyst L., Vandamme E.J. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria V: Bacteriocins of lactic acid bacteria. De Vuyst L., Vandamme E.J. (eds.). London, Blackie Academic & Professional: 91-142
- Du Toit M., Franz C.M.A.P., Dicks L.M.T., Holzapfel W.H. 2000. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 482 – 494
- Ennahar S., Auode-Werner D., Assobhei O., Hasselmann C. 1998. Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 521 – 526
- Fortina M. G., Ricci G., Acquati A., Zeppa G., Gandini A., Manachini P. L. 2003. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. *Food Microbiology*, 20: 397- 404

- Foulquier 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: 1-24
- Fox P., McSweeney P.L.H. 1998. Dairy chemistry and biochemistry. London, Blackie Academic & Professional: 478 str.
- Franz C. M. A. P., Holzapfel W. H., Stiles M.E. 1999. Enterococci at the crossroads of the food safety? International Journal of Food Microbiology, 47: 1-24
- Franz C.M.A.P., Stiles M.E., Schleifer K.H., Holzapfel W.H., 2003. Enterococci in foods - a conundrum for food safety. International Journal of Food Microbiology, 88: 105-122
- Gerželj E. 2006. Kraški ovčji sir, specifikacija o priznanju označbe porekla. Sežana, Društvo rejcev drobnice: 41 str.
- Ghrairi T., Frere J., Berjeaud J.M., Manai M. 2008. Purification and characterisation of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* from Tunisian rigouta cheese. Food Control, 19: 162-169
- Giraffa G., Carminati D. 1997. Control of *Listeria monocytogenes* in the rind of Taleggio, a surface smear cheese, by a bacteriocin from *Enterococcus faecium* 7 C5. Sciences Aliments, 17: 383-391
- Giraffa G. 2002. Enterococci from foods. FEMS Microbiology Reviews, 26: 163– 171
- Giraffa G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. International Journal of Food Microbiology, 88: 215-222
- IDF Standard 100B: Milk and milk products. Enumeration of microorganisms colony count technique at 30 °C. 1991: 3 str.
- Katana V. 2001. Proučevanje mikrobnne populacije avtohtonega Kraškega ovčjega sira. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 63 str.
- 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, Slovenija 15-18. 11. 2003. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 85-85
- Leroy F., De Vuyst L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends in Food Science & Technology, 15: 67 – 78
- Levkov V., Srbinovska S., Gjorgovska N. 2014. Microbiological and chemical characteristics of traditional ewe's milk cheese from Mariovo region. Mljetkarstvo, 64, 3: 195-206
- López – Díaz T.M., Alonso C., Román C., García - López M.L., Moreno B. 2000. Lactic acid bacteria isolated from hand – made blue cheese. Food Microbiology, 17: 23 – 32

- Lozo J., Vukasinović M., Strahinić I., Topisirović L. 2004. Characterization and antimicrobial activity of bacteriocin 217 produced by natural isolate *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGBUK2-16. Journal of Food Protection, 67, 12: 2727-34
- Lozo J., Jovcić B., Kojić M., Dalgalarondo M., Chobert J.M., Haertlé T., Topisirović L. 2007. Molecular characterization of a novel bacteriocin and an unusually large aggregation factor of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* BGSJ2-8, a natural isolate from homemade cheese. Current Microbiology, 55: 266-271
- Mangia N.P., Murgia M. A., Garau G., Sana M.G., Deiana P. 2008. Influence of selected lab cultures on the evolution of free amino acids and Fiore Sardo cheese microflora during the ripening. Food Microbiology, 25: 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: 383-389
- Mannu L., Paba A. 2002. Genetic diversity of lactococci and enterococci isolated from home-made Pecorino Sardo ewes' milk cheese. Journal of Applied Microbiology, 92: 55-62
- McSweeney P.L.H., Fox P.F., Lucey J.A., Jordan K.N., Cogan T.M. 1993. Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese. International Dairy Journal, 3: 613-634
- Mohar P., Čanžek Majhenič A., Rogelj I. 2005. Phenotypic characterisation, antibiotic susceptibility and antimicrobial activity of enterococcal population from Karst ewe's cheese. 2<sup>nd</sup> International ASM-FEMS Conference on Enterococci, August 28 – 31, 2005, Helsingør, Denmark. Washington, AMS: 39-39
- Mohar Lorbeg P. 2008. Fenotipska in genotipska raznolikost enterokokov iz tradicionalnih slovenskih sirov. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 117 str.
- Ogier J. C., Serrò P. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. International Journal of Food Microbiology, 126: 291– 301
- Oumer A., Garde S., Gaya P., Medina M., Nuñez M. 2001. The effects of cultivating lactic starter cultures with bacteriocin-producing lactic acid bacteria. Journal of Food Protection, 64, 1: 81-86
- Ouwenhand A. C., Vesterlund S. 2004. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. V: Lactic acid bacteria: microbial and functional aspects. 3<sup>rd</sup> ed. Salminen S., von Wright A., Ouwenhand A. (eds.) New York, Marcel Dekker: 375-395
- 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: 64 str.

Pravilnik o označbi geografskega porekla Nanoški sir. 2003. Uradni list Republike Slovenije, 13, 15: 2139-2139

Pravilnik o označbi geografskega porekla Tolminc. 2003. Uradni list Republike Slovenije, 13, 101: 14081-14081

Pravilnik o označbi geografskega porekla Bovški sir. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 47: 6289-6289

Pravilnik o označbi geografskega porekla Mohant. 2004. Uradni list Republike Slovenije, 14, 47: 6289-6289

Pravilnik o Kraškem ovčjem siru z zaščiteno označbo porekla. 2008. Uradni list Republike Slovenije, 18, 29: 2714-2714

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: 36 – 42

Renčelj S., Perko B., Bogataj J. 1995. Siri – nekdaj in zdaj. Ljubljana, Kmečki glas: 203 str.

Renčelj S., Perko B. Gerželj E. 2008. Kraški ovčji sir za zaščiteno označbo porekla. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije: 38 str.

[http://www.mko.gov.si/fileadmin/mko.gov.si/pageuploads/podrocja/Varna\\_in\\_kakovo\\_stna\\_hrana\\_in\\_krma/zasciteni\\_kmetijski\\_pridelki/Specifikacije/KRASKI\\_OVCJI\\_SIR.pdf](http://www.mko.gov.si/fileadmin/mko.gov.si/pageuploads/podrocja/Varna_in_kakovo_stna_hrana_in_krma/zasciteni_kmetijski_pridelki/Specifikacije/KRASKI_OVCJI_SIR.pdf) (4.mar. 2016)

Rodríguez E., Calzada J., Arqués J.L., Rodríguez J.M., Nuñez M., Medina M. 2005. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. International Dairy Journal, 15: 51-57

Rogelj I. 2010. Po meri narejene starterske kulture za izdelavo tradicionalnih sirov. Zaključno poročilo o rezultatih raziskovalnega projekta. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 19 str.

<http://www.dlib.si/details/URN:NBN:SI:DOC-9UJ73PO8/?query=%27keywords%3dPo+meri+narejene+starterske+kulture+za+izdelavo+tradicionalnih+sirov%27&pageSize=25> (23.jun.2016)

Sambrook J., Russell D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3<sup>rd</sup> ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 32-80

Sarantinopoulos P., Andriguetto C., Georganaki M.D., Rea M.C., Lombardi A., Cogan T.M., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E. 2001a. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. International Dairy Journal, 11: 621 – 647

Sarantinopoulos P., Leroy F., Leontopoulou E., Marnia D., Georganaki M., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E., De Vuyst L. 2001b. Bacteriocin production by *Enterococcus*

- faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Feta cheese making. International Journal of Food Microbiology, 72: 125-136
- Silvi S., Verdenelli M.C., Orpianesi C., Cresci A. 2003. EU project Crownalife: functional foods, gut microflora and healthy agening. Isolation and identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from faecal samples of elderly subjects for a possible probiotic use in functional foods. Journal of Food Engineering, 56 : 195-200
- Smole Možina S., Raspot P. 1994. Starter kulture v živilstvu. V: Aditivi. 16. Bitenčevi živilski dnevi, 1. simpozij živilcev Slovenije, Bled, 9 in 10 junij 1994. Raspot P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 99–108
- Starter cultures. 2016. Guelph, University of Guelph: 1str.  
<https://www.uoguelph.ca/foodscience/book-page/starter-cultures> (13. jun. 2016)
- Suzzi G., Caruso M., Gardini F., Lombardi A., Vannini L., Guerzoni M.E., Andriguetto C., Lanorte M.T. 2000. A survey of the enterococci isolated from an artisanal Italian goat's cheese ( semicotto caprino). Journal of Applied Microbiology, 89: 267 – 274
- Tagg J.R., Dajani A.S., Wannamaker L.W. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriological Reviews, 40, 3: 722-756
- Terzić-Vidojević A., Veljović K., Tolinacki M., Nikolić M., Ostojić M., Topisirović L. 2009. Characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Zlatar cheeses produced at two different geographical location. Genetika, 41, 1: 117-136
- Terzić-Vidojević A., Veljović K., Begović J., Filipić B., Popović D., Tolinački M., Miljaković M., Kojić M., Golić N. 2015. Diversity and antibiotic susceptibility of autochthonous dairy enterococci isolates: are they safe candidates for autochthonous starter cultures? Frontiers in Microbiology, 6: 954. doi: 10.3389/fmicb.2015.00954: 10 str.
- Trmčić A., Obermajer T., Rogelj I., Bogovič Matijašić B. 2008. Short communication: culture - independent detection of lactic acid bacteria bacteriocin genes in two traditional Slovenian raw milk cheeses and their microbial consortia. Journal of Dairy Science, 91: 4535-4541
- Trmčić A., Obermajer T., Mohar Loberg P., Čanžek Majhenič A., Bogovič Matijašić B. 2010. Characterization of bacteriocinogenic strains of lactic acid bacteria from traditional Slovenian cheese ‘Tolminc’. Mlječarstvo, 60, 4: 228-236
- Trmčić A., Obermajer T., Čanžek Majhenič A., Bogovič Matijašić B., Rogelj I. 2011. Competitive advantage of bacteriocinogenic strains within lactic acid bacteria consortium of raw milk cheese. Mlječarstvo, 61, 1: 26-32
- Torriani S., Zapparoli G., Dellagio F. 1999. Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. Applied and Environmental Microbiology, 65, 10: 4351-4356

Vinderola C. G., Mocchiuti P., Reinheimer J. A. 2002. Interactions among lactic acid starters and probiotic bacteria used for dairy products. *Journal of Dairy Science*, 85: 721 – 729

Walstra P., Wouters J.T.M., Geurts T.J. 2006. *Dairy science and technology*. 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton, CRC Press Taylor & Francis Group: 641 – 646

Wouters J. T. M., Ayad E.H.E., Hugenholtz J., Smith G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12: 91-109

## **ZAHVALA**

Za strokoven pregled diplomske naloge se zahvaljujem recenzentki prof. dr. Sonji Smole Možina.

Za pomoč pri izvedbi praktičnega dela diplomske naloge ter strokoven pregled diplomskega dela se zahvaljujem mentorju prof. dr. Bogdanu Perku.

Zahvaljujem se somentorici doc. dr. Andreji Čanžek Majhenič za vsestransko pomoč, vodstvo in potrpežljivost pri raziskovalnem delu ter strokoven in natančen pregled diplomske naloge.

Za tehnični pregled diplomske naloge in pomoč pri iskanju virov gre zahvala gospe Barbari Slemenik.

Dario, hvala za vse spodbudne besede, potrpežljivost in podporo v času pisanja diplomske naloge ter pomoč pri oblikovanju naloge.

Hvala staršem za vso podporo v času študija in mojim deklicam za razumevanje ter potrpežljivost v času pisanja diplomske naloge.

## PRILOGE

Priloga A: Rezultati kemijske analize mleka

Datum odvzema vzorca	24.1. 2006	26.1. 2006	31.1. 2006	2.2. 2006	7.2. 2006	9.2. 2006
Sirjenje-oznaka sira	K1	ST1	K2	ST2	K3	ST3
Maščoba, %	4,02	4,02	3,84	4,04	4,23	4,04
Beljakovine, %	3,22	3,27	3,21	3,21	3,26	3,19
Laktoza, %	4,66	4,66	4,64	4,61	4,65	4,64
Suha snov brez maščobe, %	8,62	8,60	8,76	8,55	8,64	8,56
Št. somatskih celic/ml	331,000	385,000	424,000	401,000	463,000	373,000