

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Tina ŽITNIK

**OPIS IN RAZVRSTITEV LAKTOBACILOV,
OSAMLJENIH IZ KRAŠKEGA OVČJEGA SIRA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Tina ŽITNIK

**OPIS IN RAZVRSTITEV LAKTOBACILOV, OSAMLJENIH IZ
KRAŠKEGA OVČJEGA SIRA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**IDENTIFICATION AND CLASSIFICATION OF LACTOBACILLI
ISOLATED FROM KARST EWE'S CHEESE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija zootehniko na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za mlekarstvo Oddelka za zootehniko na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani, vzorci pa odvzeti na Infrastrukturnem centru za sonaravno rekultiviranje (ICSR) Vremščica.

Študijska komisija Oddelka za zootehniko je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Andrejo Čanžek Majhenič, za somentorico asist. dr. Petro Mohar Lorbeg in za recenzenta prof. dr. Bogdana Perka.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Silvester ŽGUR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Andreja ČANŽEK MAJHENIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Bogdan PERKO
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: asist. dr. Petra MOHAR LORBEG
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega 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 knjižnice Biotehniške fakultete.

Tina Žitnik

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 637.1:636.3:579(043.2)=163.6
KG	mlečni izdelki/avtohtoni siri/kraški ovčji sir/mikroorganizmi/identifikacija/ fenotipizacija/laktobacili/ <i>Lactobacillus paracasei</i>
KK	AGRIS Q01/9430
AV	ŽITNIK, Tina
SA	ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (mentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2016
IN	OPIS IN RAZVRSTITEV LAKTOBACILOV, OSAMLJENIH IZ KRAŠKEGA OVČJEGA SIRA
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XI, 52 str., 8 pregl., 14 sl., 1 pril., 39 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Avtohtoni siri, narejeni iz surovega mleka, so neizčrpen vir raznolike in bogate mikrobne populacije, znotraj katere so laktobacili običajno prevladujoča mikrobiota. V diplomski nalogi smo osamili in identificirali laktobacile iz vzorcev mleka istrske pramenke in kraškega ovčjega sira. Po prečiščevanju izolatov z gojišča Rogosa smo pridobili populacijo potencialnih laktobacilov, ki smo jih v nadaljevanju analizirali s pomočjo fenotipskih metod (morfološke značilnosti, tipizacija s pomočjo sistema PhP mikrotitrskih plošč, test na prisotnost katalaze, ugotavljanje tvorbe plina, rast pri različnih temperaturah, identifikacija s pomočjo fermentacije ogljikovih hidratov). S pomočjo rezultatov smo opisali in razvrstili izolirane seve laktobacilov, kjer smo kljub pestremu naboru sevov laktobacilov potrdili eno prevladujočo vrsto, <i>Lb. paracasei</i> . Tako smo v nalogi pridobili pomembne informacije o sestavi, lastnostih in delovanju laktobacilov ter o možnostih izbora potencialno zanimivih izolatov za nadaljnje raziskave.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ŠD	Dn
DC	UDC 637.1:636.3:579(043.2)=163.6
CX	milk products/autochthonous cheeses/karst ewe's cheese/microorganisms/ identification/phenotyping/lactobacilli/ <i>Lactobacillus paracasei</i>
CC	AGRIS Q01/9430
AU	ŽITNIK, Tina
AA	ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
PY	2016
TI	IDENTIFICATION AND CLASSIFICATION OF LACTOBACILLI ISOLATED FROM KARST EWE'S CHEESE
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XI, 52 p., 8 tab., 14 fig., 1 ann., 39 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Autochthonous cheeses made from raw milk are an inexhaustive reservoir of various and rich microbial population where lactobacilli usually prevail. The aim of the study was to isolate and identify lactobacilli from the milk of Istrian pramenka sheep and from the Karst ewe's cheese. The population of potential lactobacilli was isolated from Rogosa agar and after purification, phenotypic characteristics of the isolates were examined (morphology, typization with PhP microplate system, catalase activity, gas production, growth at different temperatures, and carbohydrate fermentation). We successfully identified and classified tested strains, and despite their variety, the identification on species level revealed <i>Lb. paracasei</i> as predominant one. Through the study we gained important knowledge about diversity, properties and activity of lactobacilli, which will be helpful database for selection of potentially interesting isolates for further research.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI NALOGE	1
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SLOVENSKI OVČJI SIRI IN SCHEME KAKOVOSTI	4
2.1.1 Dolenjski ovčji sir	5
2.1.2 Bovški sir	5
2.1.3 Kraški ovčji sir	6
2.2 KRAŠKI OVČJI SIR	7
2.2.1 Zgodovina sira	7
2.2.2 Geografsko območje proizvodnje sira	8
2.2.3 Izdelava in značilnosti kraškega ovčjega sira	9
2.2.4 Ovčereja v Sloveniji	12
2.2.4.1 Istrska pramenka	13
2.2.5 Značilnosti Krasa	15
2.3 MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE	16
2.3.1 MKB v tradicionalnih sirih	17
2.3.2 Pomen nestarterskih MKB v sirih	18
2.3.3 Rod <i>Lactobacillus</i>	18
2.3.4 Laktobacili kot nestarterske MKB	19
2.4 METODE IDENTIFIKACIJE LAKTOBACILOV	20
2.4.1 Uporaba selektivnih gojišč	20

2.4.2	Določanje fenotipskih lastnosti	21
2.4.2.1	Test na prisotnost katalaze	21
2.4.2.2	Ugotavljanje tvorbe plina	21
2.4.2.3	Rast pri različnih temperaturah	21
2.4.2.4	Fermentacija ogljikovih hidratov	22
2.4.2.5	Sistem PhP mikrotitrskih plošč	22
3	MATERIAL IN METODE	23
3.1	NAČRT DELA	23
3.2	MATERIAL	24
3.2.1	Vzorci sira in mleka	24
3.2.2	Splošne kemikalije	25
3.2.3	Komercialni kompleti	25
3.2.4	Trda in tekoča gojišča	25
3.2.4.1	Trdo gojišče Rogosa (ROGOSA Agar; Merck, Nemčija)	25
3.2.4.2	Trdo gojišče MRS (MRS Agar; Merck, Nemčija)	25
3.2.4.3	Tekoče gojišče MRS (MRS broth; Merck, Nemčija)	26
3.2.5	Laboratorijska oprema	26
3.2.6	Programska oprema	26
3.3	METODE	27
3.3.1	Mikrobiološka analiza vzorcev	27
3.3.1.1	Priprava osnovne raztopine	27
3.3.1.2	Metoda štetja na ploščah	27
3.3.2	Prečiščevanje zraslih kolonij	28
3.3.3	Mikroskopski pregled kolonij	29
3.3.3.1	Postopek barvanja po Gramu	29
3.3.3.2	Mikroskopiranje	29
3.3.4	Zamrzovanje vzorcev	29
3.3.5	Revitalizacija zamrznjenih vzorcev	30
3.3.6	Fenotipizacija s sistemom PhP mikrotitrskih plošč	30
3.3.7	Določanje fenotipskih lastnosti	30
3.3.7.1	Aktivnost katalaze	30
3.3.7.2	Tvorba plina	31
3.3.7.3	Rast pri 15 °C in 45 °C	31
3.3.7.4	Identifikacija sevov s pomočjo sistema API 50 CH	31
4	REZULTATI	33
4.1	MIKROBIOLOŠKA ANALIZA	33

4.2	UGOTAVLJANJE MORFOLOŠKIH LASTNOSTI IN FENOTIPIZACIJA	34
4.2.1	Fenotipizacija laktobacilov s sistemom PHP	35
4.3	FENOTIPISKE LASTNOSTI REPREZENTATIVNIH SEVOV	39
4.3.1	Aktivnost katalaze	39
4.3.2	Tvorba plina	39
4.3.3	Rast pri različnih temperaturah	39
4.3.4	Identifikacija sevov s testom API 50 CH	40
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	43
6	POVZETEK	47
7	VIRI	48
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Značilnosti kraškega ovčjega sira (Renčelj in Perko, 2007: 25)	12
Preglednica 2: Število ovc v Sloveniji od leta 1869 (Kompan in sod., 1996: 12; Statistični urad Republike Slovenije, 2016)	13
Preglednica 3: Število ovc istrske pramenke v Sloveniji (Register pasem..., 2015)	15
Preglednica 4: Vzorci uporabljeni v raziskavi	24
Preglednica 5: Število laktobacilov v vzorcih mleka (log KE/ml) in sirov (log KE/g)	34
Preglednica 6: Razporeditev izolatov laktobacilov v PhP skupine in reprezentativni sevi	38
Preglednica 7: Rast reprezentativnih laktobacilov pri 15 °C in 45 °C	40
Preglednica 8: Fenotipske karakteristike reprezentativnih PhP sevov	42

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Dolenjski ovčji sir (foto: Andreja Čanžek Majhenič)	5
Slika 2: Bovški sir (foto: Davorin Koren)	6
Slika 3: Logotip KRAŠKI OVČJI SIR (Renčelj in Perko, 2007: 37)	7
Slika 4: Zemljevid območja proizvodnje kraškega ovčjega sira (Renčelj in Perko, 2007: 35)	9
Slika 5: Kraški ovčji sir (foto: Andreja Čanžek Majhenič)	9
Slika 6: Diagram izdelave kraškega ovčjega sira (prirejeno po Renčelj in Perko, 2007: 23)	11
Slika 7: Istrska pramenka (foto: Drago Kompan)	14
Slika 8: Diagram izvedbe laboratorijskega dela	23
Slika 9: Nanos kulture s cepilno zanko	28
Slika 10: Primer PhP plošče po 72-urni inkubaciji pri 37 °C	35
Slika 11: Dendrogram razvrstitve 118 izolatov laktobacilov v posamezne PhP tipe glede na njihov biokemijski prstni odtis.	37
Slika 12: Rezultat API testa po 48-urni inkubaciji	40
Slika 13: Primer preglednice, ki je priložena komercialnemu kompletu API 50 CH	41
Slika 14: Primer rezultata identifikacije izolata s programom <i>apiweb</i> TM	41

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Opisni rezultati mikroskopiranja

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

G+	Gram pozitiven
G-	Gram negativen
GRAS	splošno priznane kot varne (Generally Recognised as Safe)
ICSR	Infrastrukturni center za sonaravno rekultiviranje
KE/g	število kolonijskih enot v gramu vzorca
KE/ml	število kolonijskih enot v mililitru vzorca
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Ln.</i>	<i>Leuconostoc</i>
MKB	mlečnokislinske bakterije
MO	mikroorganizmi
μl	mikroliter
μm	mikrometer

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Uživanje tradicionalnih sirov je v zadnjih letih močno naraslo, kar gre pripisati značilnim lastnostim tovrstnih izdelkov, ki so posledica delovanja klime, vegetacije in aktivnosti mikrobiote surovega mleka. Avtohtoni siri, narejeni iz surovega mleka, so neizčrpen vir raznolike in bogate mikrobne populacije, znotraj katere so laktobacili navadno prevladujoča mikrobiota. Laktobacili so znani po svojih tehnoloških značilnostih (zorenje sirov), protimikrobnem delovanju (tvorba bakteriocinov), kakor tudi zdravju koristnih učinkih (probiotiki). Tudi literatura navaja, da so laktobacili pomemben del mikrobne združbe avtohtonih sirov, ki v procesu zorenja sodelujejo pri oblikovanju značilnih lastnosti sira. Vendar pa nam le natančno poznavanje mikrobne združbe laktobacilov omogoča razumevanje njihovega doprinosa pri oblikovanju edinstvenih lastnosti avtohtonih sirov, med katere sodi tudi kraški ovčji sir. Kraški ovčji sir je izdelan iz surovega mleka istrske pramenke brez dodatka starterskih kultur.

V nalogi bomo s pomočjo fenotipskih metod pridobili pomembne informacije o sestavi, lastnostih in delovanju laktobacilov ter o možnostih izbora potencialno zanimivih izolatov za nadaljnje raziskave. Poleg tega bodo naši rezultati prispevali k ohranjanju naravne mikrobiote kraškega ovčjega sira.

1.2 CILJI NALOGE

Namen diplomske naloge je bil osamiti čim večje število laktobacilov iz vzorcev kraškega ovčjega sira ter na podlagi fenotipskih značilnosti opisati in razvrstiti osamljene laktobacile. Prav tako smo želeli ugotoviti, katera vrsta laktobacilov (ali morda več vrst) je v kraškem ovčjem siru prevladujoča ter podati preliminarne rezultate o možnem izboru potencialno zanimivih izolatov laktobacilov kot kandidatov za starterske kulture ali dodatke krmi.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- ker je kraški ovčji sir izdelan iz surovega mleka in brez dodatka starterskih kultur pričakujemo pester nabor vrst laktobacilov (*Lb. casei* / *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. brevis*) z morebiti eno vodilno vrsto,

- na podlagi rezultatov fenotipizacije bomo laktobacile lahko razvrstili znotraj vrste po sevih in pridobili pomembne informacije o njihovi sestavi, lastnostih in delovanju
- ter s tem možnost izbora potencialno zanimivih izolatov za nadaljnje raziskave (starterske kulture, dodatki krmi).

2 PREGLED OBJAV

Siri so v številnih državah južne Evrope narejeni iz kravjega, ovčjega, kozjega ali bivoličjega mleka. Izdelujejo jih pastirji in kmetje po tradicionalnem postopku, običajno v manjših mlekarnah ali na kmetijah. Pri izdelavi teh sirov se ne uporablja komercialnih starterskih kultur, saj se sirar opira na mlečnokislinske bakterije (MKB), ki so naravno prisotne v mleku kot naključni 'onesnaževalci', ki proizvajajo mlečno kislino. Kot alternativo uporabljajo različne vrste naravnih kultur, ki so pod določenimi pogoji proizvedene z inkubacijo mleka ali sirotke prejšnjega dne. Ti siri so običajno označeni kot 'obrtniški' (Marino in sod., 2003).

Proizvodnja ovčjega sira ima dolgo zgodovino. Ker pa je priraja ovčjega mleka še vedno predvsem sezonska, se mleko ponavadi predeluje v sire v manjših obratih ter po tradicionalnih postopkih izdelave, zanje pa sta značilna poseben okus in aroma. Oblikovanje arome in okusa, ki značilno zaznamujeta posamezno vrsto sira, pa je odvisno od različnih dejavnikov, med katerimi s svojim delovanjem pomembno prispevajo prav MKB (Renes in sod., 2014).

MKB so tudi vodilna skupina mikroorganizmov, ki se uporabljajo kot komercialne starterske kulture. Razlikujemo jih po morfoloških lastnostih, po načinu fermentacije in optimalni temperaturi rasti ter po sposobnosti rasti v ekstremnih pogojih kot na primer ob prisotnosti visokih koncentracij soli ali v kislem okolju. Tako najdemo MKB v obliki kokov, palčk ali kokobacilov, zanje pa je tudi značilno, da ne sporulirajo in so po Gramu pozitivne, fakultativno anaerobne do mikroaerofilne bakterije.

Značilnost MKB je, da energijo pridobivajo s fermentacijo glukoze in sicer po homofermentativni poti, kjer je končni produkt glikolize mlečna kislina, ali po heterofermentativni poti, kjer poleg mlečne kisline nastajajo še drugi produkti kot so CO₂, etanol in očetna kislina. Nastali produkti vplivajo na oblikovanje arome in teksture izdelkov, s protimikrobnim delovanjem pa uspešno zavirajo rast številnih kvarljivcev ali celo patogenih bakterij, s čimer zagotavljajo do neke mere varnost in podaljšano obstojnost končnih izdelkov (Raspor, 2003).

2.1 SLOVENSKI OVČJI SIRI IN SCHEME KAKOVOSTI

V Sloveniji segajo začetki izdelovanja sirov vse v 12. stoletje. Poseben pomen imajo slovenski tradicionalni siri, katerih postopki izdelave se prenašajo iz roda v rod. Običajno so izdelani iz surovega mleka, ki s svojo kemijsko in mikrobiološko sestavo pomembno prispeva k oblikovanju značilnih lastnosti sira. S surovim mlekom in sirarsko opremo dobimo kombinacijo mikrobne populacije, ki oblikuje značilen okus, aromo in ostale senzorične lastnosti, po katerih so tradicionalni siri razpoznavni ter se ločijo od množice ostalih sirov. Ohranjanje tradicije, izkušenj, spretnosti in specifičnih znanj je ključnega pomena za ohranitev izviranosti tradicionalnih sirov.

Slovenska zakonodaja je proizvajalcem kmetijsko živilskih pridelkov oz. izdelkov omogočila, da jih lahko zaščitijo. Tako izkoristijo posebne lastnosti, ki jih imajo nekatera živila zaradi tradicionalnih načinov pridelave oz. predelave ter specifičnih značilnosti področja izdelave in jih s tem zaščitijo pred ponarejevalci. Obliko zaščite podajajo sheme kakovosti, ki so evropske in nacionalne. Evropske sheme so predpisane z evropskimi uredbami, od katerih je najvišja oblika zaščiteni označba porekla (ZOP), sledita ji zaščiteni geografska označba (ZGO) in zajamčena tradicionalna posebnost (ZTP). Pri ZOP gre za označevanje kmetijskega pridelka ali živila, ki v celoti izvira z določenega geografskega območja in za izdelavo katerega so surovine pridelane na istem geografskem območju. Za pridobitev označbe porekla mora kmetijski pridelek ali živilo izpolnjevati dva pogoja in sicer:

- lastnosti pridelka ali živila morajo biti izključno ali bistveno rezultat naravnih in človeških dejavnikov;
- postopki pridelave, predelave in priprave pridelka oz. živila za trg morajo potekati znotraj označenega geografskega območja (Geografsko poreklo, 2016).

Znotraj shem kakovosti imamo v Sloveniji do danes zaščitenih pet tradicionalnih sirov, od katerih sta dva ovčja. To sta kraški ovčji sir in bovški sir, oba z oznako ZOP. Poleg omenjenih dveh zaščitenih ovčjih sirov imamo še dolenski ovčji sir, ki pa še ni opredeljen znotraj shem kakovosti, saj še ni bil ustrezno raziskan in proučevan. V okviru projekta SEE-ERA.NET Plus Joint Call z naslovom »Characterisation and tracking the origin of specific features of traditional cheeses in Western Balkans« (Atlas ovčjih sirov držav zahodnega Balkana) je bil razvit sistem, ki zagotavlja poenotenje opisa postopkov proizvodnje, fizikalno kemijskih in senzoričnih lastnosti ter prevladujočih bakterijskih

populacij, vključenih v procese zorenja sirov (Havranek in sod., 2012), kar je v prihodnje lahko osnova tudi za zaščito dolenskega ovčjega sira.

2.1.1 Dolenjski ovčji sir

Dolenjski ovčji sir je trd, polnomasten sir, izdelan iz ovčjega mleka jutranje in večerne molže. Pri izdelavi se naravni mikrobioti mleka kot podporno startersko kulturo dodaja termofilna starterska kultura mlečnokislinskih bakterij. Zorenje poteka najmanj 60 dni. Hlebec je okrogel, težek 1-3 kilograme, visok 8-10 centimetrov s premerom 15-25 centimetrov. Zgornja in bočna stran sira sta rahlo izbočeni, skorja je gladka, svetlo sive do slamnate barve. Prav takšne barve je tudi testo sira, ki je trdo, čvrsto in kompaktno z redkimi očesi v velikosti leče. Sir je po okusu aromatičen, čist in poln do rahlo pikanten (Havranek in sod., 2012).



Slika 1: Dolenjski ovčji sir (foto: Andreja Čanžek Majhenič)

2.1.2 Bovški sir

Bovški sir je trd, polnomasten sir, ki ga izdelujejo iz surovega ovčjega mleka ali iz mešanice s kozjim mlekom, vendar le tega ne sme biti več kot 20%. Pripravljajo ga iz zorenega mleka večerne molže in svežega jutranjega, ki mu lahko dodajo startersko kulturo. Zorenje poteka najmanj 60 dni, da dobimo hlebec okrogle oblike s premerom 20-

26 centimetrov, višine 8-12 centimetrov in teže 2,5-4,5 kilograma. Zgornja ploskev sira je ravna, po obodu je izbočen. Skorja je gladka, čvrsta, sivo rjave do nežno slamnate barve. Testo je svetlo sive do nežno slamnate barve z enakomerno porazdeljenimi očesi v velikosti leče. Konsistenca testa je kompaktna, povezana, s školjkastim lomom, vendar ne drobljiva. Okus in vonj sta intenzivna, aromatična in rahlo pikantna (Havranek in sod., 2012).



Slika 2: Bovški sir (foto: Davorin Koren)

Po predhodni pridobitvi oznake ZOP na nacionalni ravni leta 2004, je Društvo rejcev drobnice Bovške leta 2011 pristopilo še k postopku zaščite bovškega sira tudi na evropski ravni s posredovanjem vloge Evropski komisiji. Tako je bovški sir pridobil ZOP tudi na nivoju EU leta 2012 (Bovški sir..., 2012).

2.1.3 Kraški ovčji sir

Prepoznavnost kraškega ovčjega sira se odraža v senzoričnih in teksturnih lastnostih, ki so rezultat specifičnih klimatskih in florističnih posebnosti ter tradicionalne izdelave po ustaljenem postopku. Rejci ovc in izdelovalci ovčjega sira so se odločili za zaščito označbe 'Kraški ovčji sir', saj so s tem ohranili izvornost, dvignili kakovost in promocijo ter prispevali k stabilnosti in širitvi reje drobnice (Renčelj in Perko, 2007). Kraški ovčji sir je ZOP na nacionalnem nivoju pridobil leta 2008.



Slika 3: Logotip KRAŠKI OVČJI SIR (Renčelj in Perko, 2007: 37)

Slika 3 prikazuje logotip za kraški ovčji sir, katerega pravico rabe imajo vsi proizvajalci, ki ga proizvajajo skladno s specifikacijo in so pridobili certifikat za skladnost proizvodnje s specifikacijo za to vrsto sira ter izpolnjujejo higiensko sanitarne pogoje. Ob izpolnitvi zahtevanih pogojev je za vse proizvajalce raba logotipa obvezna in enaka. Njegov skrbnik je Društvo rejcev drobnice Krasa in Istre. Sestavljen je iz stilizirane risbe glave ovna in ovce ter napisa »Kraški ovčji sir«, ki sta postavljena v rahlo deformiran okvir (Renčelj in Perko, 2007).

2.2 KRAŠKI OVČJI SIR

2.2.1 Zgodovina sira

V prazgodovinski in rimski dobi so ljudje verjetno kmetovali na kraških kamnitih tleh, večinoma na območjih, kjer sta prevladovala gozd in grmovna rast. Za njimi je prišlo ljudstvo, ki so bili poljedelci in so začeli za kmetovanje izkoriščati tudi nekatere doline. Iz starih zapisov lahko razberemo, da je bilo območje Slovenije oz. natančneje Krasa zelo redko poseljeno; pokrajino so bolj intenzivno začeli poseljevati šele v času pokristjanjevanja, v drugi polovici 18. stoletja pa so pričeli uvajati hlevsko živinorejo. Krmo za vhlavljenе živali so pridobivali s travnikov ter jih na tak način počasi iztrošili. Tak način kmetovanja je trajal približno 200 let.

Skozi stoletja je prebivalce Krasa spremljala kraška ovca in tradicija predelave mleka v sir, ki je predstavljal pomemben vir prehrane za tamkajšnje prebivalce.

Iz leta 1912 obstajajo zapiski o siru, ki se je izdeloval v naših alpskih in kraških dolinah. Čeprav so zapiski o tehnološkem postopku zelo skromni in temeljijo na ustnem izročilu, se je sam opis postopka izdelave sira in njegovih lastnosti praktično nespremenjen ohranil do današnjih dni. To kaže na tradicijo izdelave sira, ki se je prenašala iz roda v rod, predvsem na podlagi izkušenj in ustnega izročila (Renčelj in Perko, 2007).

2.2.2 Geografsko območje proizvodnje sira

Območje proizvodnje kraškega ovčjega sira obsega aridno območje Krasa, kjer so ovčarji tradicionalno pasli ovce ter trgovali s sirom in jagnjetino. Meja omenjenega področja je razvidna s slike 4 in poteka od Opatjega sela po meji s sosednjo Italijo vse do Ospa, kjer gre preko Kubeda, Gračišča in Sočerge do državne meje s sosednjo Hrvaško. Meja se nadaljuje po slovensko-hrvaški meji vse do Rupe. Tam obide Novokračine in Zabiče ter zajame koto Velika Ojstrica. Nadaljuje se od vasi Jurišče do Prestranka in Razdrtega, se povzpne na Nanos in zajame kot Debeli vrh, se spusti v Podnanos ter nadaljuje vse do Štanjela. Od tu gre čez Škrbino, Temnico in Kostanjevico na Krasu ponovno do Opatjega sela, kjer se meja območja ponovno sklene (Renčelj in Perko, 2007; Perko, 2003).

Na tem območju se prepletata celinsko in mediteransko podnebje. Ko je v poletnem času zaradi suše in vročine primanjkovalo paše, so ovčarji živali gnali na Nanos, Slavnik, Javornik in planoto Vremščica. Na zimsko pašo so jih poti vodile v Istro in v smeri Tržiča. Preko paše in skupnih poti na pašo ter prodajnih poti sira in skute, so bile poti ovčarjev povezane ter so s tem zaokrožile skupno tradicijo (Renčelj in Perko, 2007; Perko, 2003).



Slika 4: Zemljevid območja proizvodnje kraškega ovčjega sira (Renčelj in Perko, 2007: 35)

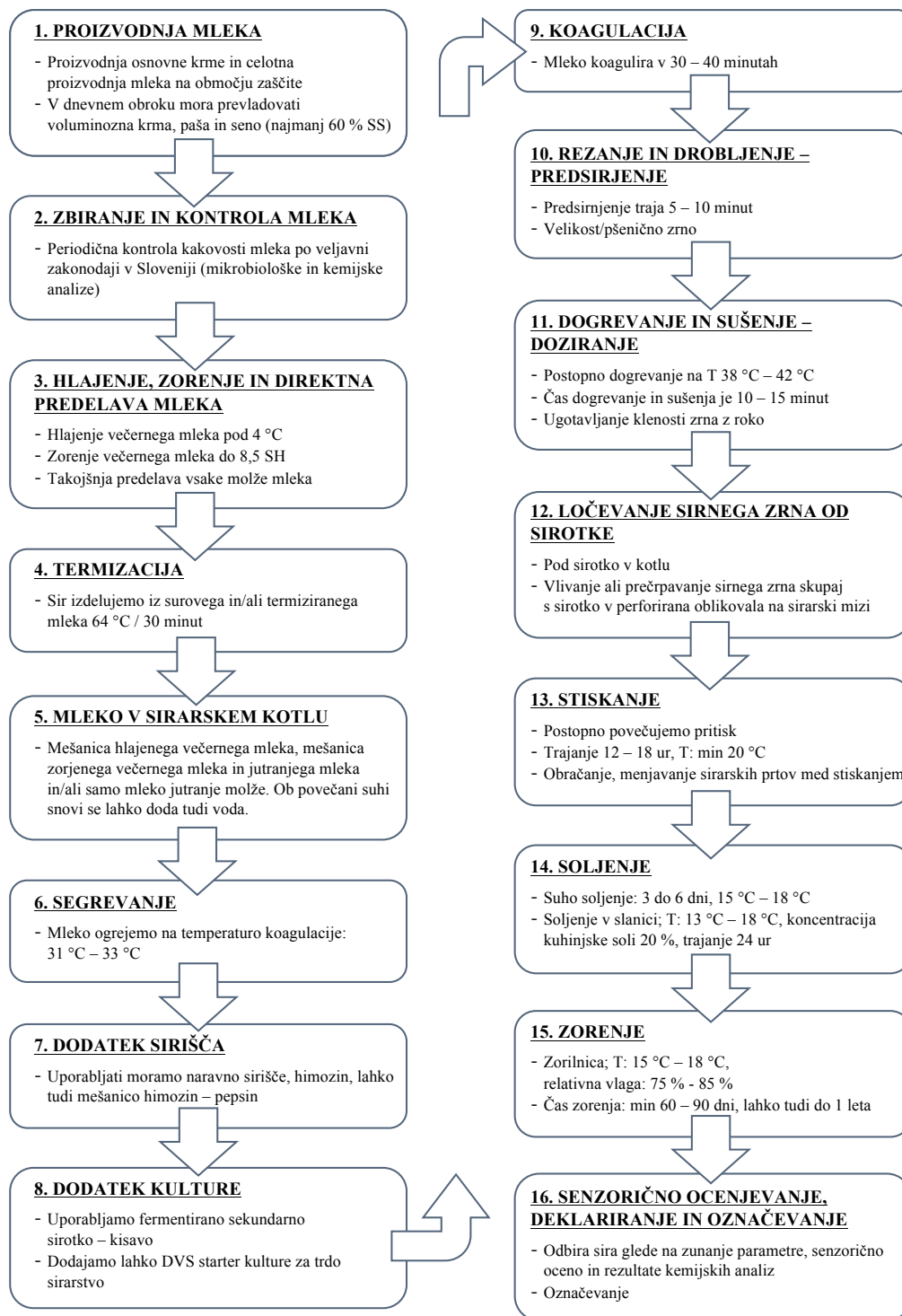
2.2.3 Izdelava in značilnosti kraškega ovčjega sira



Slika 5: Kraški ovčji sir (foto: Andreja Čanžek Majhenič)

Kraški ovčji sir (slika 5) izdelujejo iz zorenega ovčjega mleka večerne molže in jutranjega sveže namolženega. Tradicionalno se sir izdeluje iz surovega mleka, lahko se pa tudi termizira pri 64 °C / 30 minut. Mleko nato temperiramo na temperaturo usirjanja, ki je 31-33 °C, in dodamo kisavo (fermentirana sekundarna sirotka) ter toliko naravnega sirišča, da mleko koagulira v 30 do 40 minutah. Primerno čvrstost koaguluma ugotovimo z roko. Ko se koagulum z gladkim školjkastim lomom prelomi preko prsta, ga pričnemo obdelovati. V fazi predsirjenja koagulum najprej razrežemo s sirarsko sabljo, sledi drobljenje s harfo ali trnačem, da izdelamo sirno zrno velikosti pšeničnega zrna, kar traja približno 5 do 10 minut. Nadaljujemo s fazo dosirjenja, v kateri ob stalnem mešanju zrno dogrevamo na 38 °C do 42 °C in ga nato pri temperaturi dogrevanja sušimo toliko časa, da postane sirno zrno kleno. Sledi 10-minutno počivanje, ko se v kotlu pod sirotko iz sirnine oblikuje hlebec, ki ga v sirotki razrežemo na kose. Kose sirnine prenesemo v oblikovala na sirarski mizi. Druga možnost ločevanja sirnega zrna od sirotke pa je vlivanje oz. prečrpavanje sirnine skupaj s sirotko neposredno v oblikovala. Sledi postopek stiskanja, ki traja 12 do 18 ur. S tem se odstrani prosta voda, zrna se spajajo in nastaja skorja. V tem času je potrebno sir večkrat obrniti. Sledi postopek suhega ali mokrega soljenja v slanici. V primeru mokrega soljenja se sir potopi v slanico, ki ima temperaturo 15 °C do 18 °C in koncentracijo 20% NaCl. Po 24-ih urah se sir odcedi in prenese v zorilnico, kjer se mora zagotoviti konstantna temperatura 15 °C do 18 °C in relativna vlaga v območju med 75% in 85%. Sir zori najmanj 60 dni, lahko tudi 90 (Gerželj in sod., 2000). Dobimo 2,5 do 4,5 kilograma težek hlebec, s premerom 20 do 26 centimetrov, ki v višino meri 9 do 11 centimetrov. Posamezne korake tehnološkega postopka izdelave kraškega ovčjega sira prikazuje slika 6.

Glavne značilnosti kraškega ovčjega sira pa so opisane v preglednici 1.



Slika 6: Diagram izdelave kraškega ovčjega sira (prirejeno po Renčelj in Perko, 2007: 23)

Preglednica 1: Značilnosti kraškega ovčjega sira (Renčelj in Perko, 2007: 25)

Tip	Trdi sir
Oblika	Okrogel hlebec
Dimenzije	Teža: 2,5 do 5 kg Premer: 20 do 26 cm Višina: 9 do 10 cm
Zunanji videz	Skorja sira je gladka, ravna, obodna stran lahko rahlo izbočena, rumenkasto - rjave barve.
Prerez	Testo je kompaktno, povezano, lomljivo, a ne drobljivo, enakomerne svetlo rumenkasto-rjave barve, v večini brez očes ali z drobnimi redkimi očesi v velikosti majhne leče. Prisotna je lahko drobna luknjičavost ali drobne razpoke, ki pa ne prevladujejo. Testo starejših sirov je bolj kompaktno do školjkasto lomljivo.
Okus in vonj	Aromatičen, intenziven, poln do rahlo pikanten, značilen za ovčji sir.
Normalna konzumna zrelost	Najmanj 60 do 90 dni, lahko tudi do enega leta.
Kemijska sestava	% suhe snovi najmanj 60 % % maščobe v suhi snovi najmanj 45 % % soli od 2 do 4 % v konzumni zrelosti

2.2.4 Ovčereja v Sloveniji

Reja drobnice je ena od okolju prijaznejših oblik živinoreje in predstavlja tradicionalno kmetijsko dejavnost. Večina reje je v območjih z omejenimi možnostmi za kmetijsko dejavnost (Reja drobnice, 2016). Tako je reja drobnice razvita v hribovitem, gorskem in kraškem svetu, kjer z živino izkoriščamo zemljo, ki bi bila sicer kaj malo vredna za kmetijstvo. Drobnico lahko uspešno uporabljamo kot pridno negovalko prostora, ki pomaga preprečiti zaraščanje kmetijskih zemljišč in s tem ohranja kulturno krajino (Kompan in sod., 1996).

Ovce je človek udomačil pred sedem do devet tisoč leti. Redijo jih po vsem svetu, običajno v velikih tropih, ponekod pa tudi le po dve ali tri. Konec 19. stoletja je bilo na območju Slovenije desetkrat več ovc kot jih redimo danes. Sredi 20. stoletja je razvoj industrije upočasnil razvoj ovčereje, vendar je bil ta trend kratkotrajen, saj se je po letu 1980 število ovc v Sloveniji ponovno povečevalo (Kompan in sod., 1996). Izboljšala se je pasemska raznolikost živali in oskrba s plemenskim materialom. V tem času se je zgradilo precej novih hlevov za ovce s sodobno urejenimi sirarnami. Kronološki pregled nihanja števila ovc v Sloveniji med leti 1869 in 2014 je razviden iz preglednice 2.

Preglednica 2: Število ovc v Sloveniji od leta 1869 (Kompan in sod., 1996: 12; Statistični urad Republike Slovenije, 2016)

Leto	Število ovc
1869	299.000
1910	160.000
1939	70.000
1955	103.000
1961	53.000
1975	23.000
1980	14.000
1990	24.000
1995	39.118
2000	96.227
2005	129.352
2010	129.788
2014	113.648

2.2.4.1 Istrska pramenka

V Sloveniji imamo štiri avtohtone pasme ovc: jezersko-solčavska ovca, bovška ovca, istrska pramenka in belokranjska pramenka. Prva je namenjena predvsem mesni prireji, bovška ovca in istrska pramenka mlečno-mesni reji, belokranjska pramenka pa predvsem za prirejo jagnjet. Avtohtone pasme so tiste pasme, za katere je na osnovi zgodovinskih zapisov dokazano, da so pasme po izvoru iz Republike Slovenije (RS), da je bila RS prvotno okolje za razvoj pasem in da zanje obstaja slovenska rejska dokumentacija, iz katere je razvidno, da se za pasme vodi poreklo že najmanj pet generacij. Hkrati se za pasme izvajajo rejska in selekcijska opravila (Program razvoja podeželja..., 2014).

Zaradi posedovanja vseh zapisanih lastnosti je tudi istrska pramenka ali istrijanka slovenska avtohtona pasma. (Program razvoja podeželja..., 2014).

Istrska pramenka izvira iz evropskega muflona, njen prednik pa je domača primitivna bela ovca, ki je bila razširjena po celotni Evropi. Ime je dobila po polotoku Istra ter dolgi, pramenasti in grobi volni. Domačini so ji rekli tudi istrijanka, kraška ovca, primorska ovca in tudi ovca surove volne (Kompan in sod., 1996, Renčelj in Perko, 2007).

Istrska pramenka je med slovenskimi ovčarji zelo cenjena zaradi svojih izrednih lastnosti. Zaradi močnih in čvrstih nog jo odlikuje dolga hoja ter paša med kamenjem in suhem kraškem terenu, kjer popase tudi suho staro travo. Je ovca velikega okvira, predvsem

zaradi dolgega in visoko nasajenega trupa ter dolgih nog. Telesna masa ovac znaša od 65 do 80 kilogramov, ovnov pa od 80 do 100. Vime je pravilne oblike, obsežno in visoko pripeto z velikimi seski, ki so primerni tudi za strojno molžo. Istrsko pramenko uporabljajo kot mlečno pasmo, zadnja leta tudi v kombinaciji s prirejo jagnjet. V običajnih rejčkih razmerah dajo ovce v laktaciji med 100 in 150 kg mleka, mlečnost pa izboljšujejo z ovni mlečnih pasem. Ima močno, ozko glavo z izbočenim nosnim grebenom, vendar ošiljen sprednji del, da lahko išče skromno pašo med kamenjem. Barva večine ovac je bela s temnimi pikami po glavi in trupu. Po nogah in trebuhu je slabše poraščena, drugod jo pokriva redka, groba in resasta krovna dlaka. Pramenke pozno dozori, saj rast končajo šele pri treh do štirih letih. Spolno zrelost dosežejo med 16 do 18 meseci, takrat jagnjico tudi prvič pripuščajo, medtem ko ovni lahko plodijo že prvo leto (Kompan in sod., 1996). Renčelj in Perko (2007) navajata, da je povprečna velikost gnezda 1,28 živorojenih jagnjet.



Slika 7: Istrska pramenka (foto: Drago Kompan)

Število ovc istrske pramenke se razlikuje glede na obstoječe vire. Po podatkih Registra pasem z zootehniško oceno (2015) število ovc istrske pramenke v Sloveniji, kljub manjšim nihanjem, ostaja približno enako (preglednica 3). Istrsko pramenko pa najdemo tudi izven Slovenije, na Hrvaškem in v Italiji.

Grčar (2011) navaja, da rejcev istrske pramenke v Sloveniji ni veliko. Večina se jih nahaja na področju Kmetijsko gozdarskega zavoda Ptuj in pri teh populacija ne presega 10 živali na rejca, medtem ko se številčno največ ovc istrske pramenke vzreja na ICSR Vremščica.

Preglednica 3: Število ovc istrske pramenke v Sloveniji (Register pasem..., 2015)

Leto	Ocena števila živali
2003	1.200
2004	1.200
2005	1.100
2006	1.100
2007	1.200
2008	1.150
2009	1.150
2010	1.150
2011	1.150
2012	1.150
2013	1.150
2014	1.150
2015	1.020

2.2.5 Značilnosti Krasa

V starejših zapisih zasledimo, da je bila ovčereja na širšem območju Krasa zelo dobro razvita. Poleg posameznih kmetij, ki so redile manjše število ovc (5 - 15), so pečat pustili tudi rejci z 200 in več glavami živine. Paša je poleti potekala na Snežniku in v njegovi okolici, jeseni v okolici planote Vremščica, v zimskem obdobju pa v Istri in Furlaniji (Renčelj in Perko, 2007).

Obsežne pašne površine dajejo Krasu značilno enoličnost. Delež travnatega sveta (košenice in pašniki) je na kraških tleh velik zaradi aridnega podnebja, razgibane konfiguracije terena in kakovosti tal. Značilna je heterogenost biocenoz, kar se odraža v bogati flori kraških travnikov, na katerih najdemo predvsem zelišča, detelje in trave. Bogato aromatičnost kraškega ovčjega sira pripisujemo tudi aromatičnim substancam paše, ki jih živali zaužijejo na tem območju (Renčelj in Perko, 2007).

Za to območje je značilno prepletanje mediteranskega in celinskega podnebja, kar omogoča velike mikroklimatske razmere na najmanjših razdaljah in s tem posledično pestrost rastlinskih združb na travnikih. Snežna odeja je kratkotrajna, zime so suhe. Prav tako je suho pozno poletje, medtem ko je zaradi bližine morja pozno jeseni in na prehodu med pomladjo in poletjem sorazmerno veliko padavin (Renčelj in Perko, 2007).

2.3 MLEČNOKISLINSKE BAKTERIJE

Mlečnokislinske bakterije (MKB) naseljujejo različne ekološke niše kot so fermentirana živila, prebavni trakt živali in ljudi, ustna votlina, urogenitalni trakt. So pomembni tehnološki mikroorganizmi, saj sodelujejo pri fermentaciji mleka, salam, kislega testa in vina, kjer oblikujejo zelene senzorične lastnosti, podaljšujejo obstojnost fermentiranih živil in povečujejo njihovo varnost. Predvsem bakterije iz rodov *Lactobacillus* in *Lactococcus* igrajo pomembno vlogo pri fermentaciji tradicionalnih živil, narašča pa tudi njihova uporaba pri izdelovanju živil nove generacije, ki imajo določene prehranske in druge zdravju ugodne učinke. MKB so znane kot varne bakterije in imajo status GRAS, najdemo pa med njimi tudi nekaj patogenih sevov, predvsem med enterokoki in streptokoki (Khalid, 2011).

Izraz mlečnokislinske bakterije se je dodobra uveljavil v začetku 20. stoletja (Carol in Leon, 2010), ko so bili hkrati opuščeni tudi drugi, trivialni opisi za to skupino bakterij kot so »bakterije, ki kisajo mleko« ali pa »bakterije, ki proizvajajo mlečno kislino«. Temelje taksonomskih opisov MKB je leta 1919 postavil Orla-Jensen, kjer je klasifikacija oz. razvrstitev rodov MKB temeljila na morfologiji, načinu fermentacije glukoze, rasti pri določenih temperaturah in obsegu izkoriščanja različnih substratov. Kljub nekajkratnemu pregledu in dopolnitvam taksonomije MKB, pa so osnovne karakteristike, ki jih je določil Orla-Jensen, še vedno temelj v klasifikaciji MKB (Khalid, 2011).

MKB so po Gramu pozitivne, katalaza negativne, nesporogene, negibljive, striktno fermentativne, po obliki pa okrogle ali paličaste bakterije. Dobro rastejo v anaerobnih pogojih, lahko pa tudi v prisotnosti manjših količin kisika, njihov glavni končni produkt pa je mlečna kislina (Björkroth in Koort, 2011; Dellaglio in sod., 1994; Ottaviani, 1991).

Trenutno MKB združujejo okoli 20 rodov, med katerimi so najpomembnejši *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* in *Weissella*. Rodova *Lactococcus* in *Lactobacillus* pogosto povežujemo z mlekom in mlečnimi izdelki. Prav tako so posamezne vrste iz rodov *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* in *Streptococcus* pogosto prisotne v mleku in mlečnih izdelkih (Björkroth in Koort, 2011).

Dellaglio in sod. (1994) MKB po obliki v grobem razdelijo v tri skupine:

- Koki, ki so sferične oblike, premera 0,5 – 2 µm. Pojavljajo se posamično, v parih, tetradah ali verižicah, včasih pa tudi v skupkih nedoločljivih oblik. V to skupino spadajo predstavniki iz rodov *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*.
- Pravilne paličaste bakterije premera 0,5 – 2 µm, ki so lahko dolge tudi več kot 10 µm. Pojavljajo se posamično, v parih ali daljših verižicah. V to skupino spadajo predstavniki rodu *Lactobacillus*.
- Nepravilne paličaste bakterije, ki so pogosto razvejane. V to skupino spadajo predstavniki rodu *Bifidobacterium*, za katerega je značilna precejšnja variabilnost med vrstami.

2.3.1 MKB v tradicionalnih siri

Populacija MKB, ki naseljuje fermentirane mlečne izdelke, je zelo heterogena. Med MKB prevladujejo rodovi *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* in *Leuconostoc*. Za tradicionalne sire je značilno, da so izdelani iz surovega mleka po tradicionalnem postopku ter so neizčrpen vir raznolike in bogate mikrobne populacije. Ta raznolikost je poglavitni dejavnik pri ohranjanju značilnih lastnosti tradicionalnih sirov (Serhan in sod., 2009).

Paveljšek (2012) je na podlagi fenotipske identifikacije ugotovila, da v slovenskih tradicionalnih ovčjih siri prevladujejo enterokoki, sledijo jim laktobacili in laktokoki, nekaj pa je tudi predstavnikov iz rodu *Weissella*. Med laktobacili sta bili prevladujoči vrsti *Lb. casei/paracasei* in *Lb. plantarum*, podobne ugotovitve o prevladujoči vrsti *Lactobacillus casei* v kraškem ovčjem siru poročata tudi Katana (2001) in Rogelj (2005).

Pri hrvaških tradicionalnih ovčjih siri pa je slika sestave mikrobne populacije malo drugačna, saj prevladujejo laktobacili, sledijo jim enterokoki in laktokoki. Podobno sestavo mikrobne populacije, s prevladujočimi laktobacili, ki jim sledijo enterokoki in laktokoki, so določili tudi v tradicionalnih ovčjih siri s področja Bosne in Hercegovine ter v tradicionalnih ovčjih siri Srbije. Pri analizi na nivoju vrste so ugotovili, da med laktobacili pri tradicionalnih ovčjih siri s področja zahodnega Balkana večino populacije predstavljata vrsti *Lb. casei/paracasei* in *Lb. plantarum* (Paveljšek, 2012).

Tudi študije tradicionalnih ovčjih sirov v evropskem prostoru navajajo podobne sestave mikrobnih populacij, s prevladujočima rodovoma MKB *Lactobacillus* in *Enterococcus*, od vrst pa je med laktobacili najbolj pogosta *Lb. casei/paracasei* (Mohar Lorbeg in sod., 2009; Rogelj, 2005; Gerasi in sod., 2003; Mannu in sod., 2002), med enterokoki pa *Enterococcus faecium* in *Enterococcus faecalis* (Mohar Lorbeg in sod., 2009; Rogelj, 2005).

2.3.2 Pomen nestarterskih MKB v sirih

Mikroorganizme v sirih lahko razdelimo v dve skupini in sicer v starterske MKB in nestarterske MKB oz. sekundarne mikroorganizme. Starterske MKB so praviloma vključene v proces izdelave sira in zorenja, medtem ko sekundarna mikrobiota ni toliko pomembna med samim procesom izdelave sira kot ima ključno vlogo med zorenjem. Sekundarna mikrobiota obsega nestarterske MKB in druge bakterije, ki so ponavadi unikatne za posamezne vrste sirov. Delovanje nestarterskih MKB v mnogih vrstah sirov pomembno prispeva h karakteristikam, ki so specifične za določeno vrsto sira. Nestarterske MKB so v večini sestavljene iz naključnih mikroorganizmov, ki vstopajo v sir bodisi iz sestavin ali iz okolja (De Angelis in Gobbetti, 2011, Beresford in sod., 2001).

Med nestarterske MKB prištevamo mezofilne laktobacile in pediokoke, ki predstavljajo pomemben del mikrobnih populacij večine vrst sirov med zorenjem in običajno niso del začetne mikrobiote pri izdelavi sira, saj v mleku ne rastejo dobro (Cogan in sod., 1997). Različne študije navajajo, da je bilo iz različnih vrst sirov izoliranih precej vrst mezofilnih laktobacilov, med katerimi se najpogosteje srečujemo z vrstami *Lb. casei/paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* in *Lb. curvatus*, med pediokoki pa z vrstama *Pediococcus acidilactici* in *Pediococcus pentosaceus* (Beresford in sod., 2001).

2.3.3 Rod *Lactobacillus*

Laktobacili so najštevilčnejši rod med MKB, saj združuje 218 vrst in 29 podvrst (List of prokaryotic..., 2016). Večinoma se uporabljajo v proizvodnji fermentiranih izdelkov, kruha, mesnih in vegetarijanskih živil ter kot probiotiki, ponašajo pa se tudi s statusom GRAS (Generally Recognized as Safe). Zaradi svojih tehnoloških in probiotičnih lastnosti

pa imajo posebno mesto v mlekarški industriji. V mleko običajno vstopijo med molžo in pri nadaljnjih postopkih rokovanja z mlekom, kjer so glavni vir laktobacilov tla, silaža, oprema za molžo ter krma. Čeprav so laktobacili eni izmed glavnih mikroorganizmov, ki sodelujejo v procesih fermentacije, pa lahko pod določenimi pogoji povzročijo tudi napake v teksturi in aromi končnega proizvoda (De Angelis in Gobbetti, 2011).

Laktobacili so po Gramu pozitivne, paličaste ali kokoidne, negibljive in nesporogene bakterije. So katalaza negativni, fakultativno anaerobni ali mikroaerofilni mikroorganizmi, katerih končni produkt razgradnje glukoze je mlečna kislina v primeru homofermentativnih laktobacilov, medtem ko heterofermentativni laktobacili poleg mlečne kisline tvorijo še druge snovi kot so očetna kislina, ogljikov dioksid, vodikov peroksid, diaceil, acetoin in acetaldehid (Adamič, 2003). Glede na tip fermentacije razdelimo laktobacile v tri skupine:

- I. skupina: obligatno homofermentativni laktobacili, ki glukozo fermentirajo izključno do mlečne kisline: *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus farciminis* in *Lactobacillus kefiranofaciens*.
- II. skupina: fakultativno heterofermentativni laktobacili: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus casei* in drugi.
- III. skupina: obligatno heterofermentativni laktobacili: *Lactobacillus sanfrancisco*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus reuteri* in drugi.

2.3.4 Laktobacili kot nestarterske MKB

Poleg starterskih poznamo tudi nestarterske ali sekundarne MKB, s čimer opisujemo naključno prisotno mikrobno populacijo, ki je sposobna rasti tudi v specifičnih pogojih v obdobju zorenja sira. Nestarterski laktobacili lahko pridejo v sir iz mleka, iz proizvodnega okolja vključujoč sirarsko opremo in osebe, lahko pa so posledica rekontaminacije toplotno že obdelanega mleka. Prisotnost nestarterskih laktobacilov je značilna predvsem za tradicionalne sire, ki so pogosto izdelani iz surovega mleka in po tradicionalnih tehnoloških postopkih. Prav nestarterski mikroorganizmi naj bi bili tisti, ki z oblikovanjem značilnih senzoričnih lastnosti tradicionalnih sirov določajo njihovo geografsko prepoznavnost (De Angelis in Gobbetti, 2011; Beresford in sod, 2001).

Med nestarterskimi MKB prevladujejo laktobacili, vsebujejo pa lahko tudi nekatere vrste drugih MKB kot so pediokoki in enterokoki, *Streptococcus thermophilus* in *Leuconostoc* spp. (Briggiler-Marco in sod., 2007). Normalno je, da so MKB rodu *Lactobacillus* prisotne v sirih, ki so narejeni tako iz surovega kot toplotno obdelanega mleka, saj njihovo dokaj nizko začetno število zaradi primerne temperature in časa zorenja kasneje močno naraste. Med nestarterskimi laktobacili so najpogosteje zastopane vrste *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* in *Lb. rhamnosus*. Ravno tako pa so dokaj pogoste tudi vrste *Lb. coryneformis*, *Lb. curvatus*, *Lb. brevis*, *Lb. buchneri*, *Lb. fermentum* in *Lb. bifementans* (De Angelis in Gobbetti, 2011; Beresford in sod, 2001; Bernardeau in sod., 2008).

2.4 METODE IDENTIFIKACIJE LAKTOBACILOV

Pravilen opis in razvrstitev bakterij, torej tudi laktobacilov, je izjemnega pomena. Zaradi njihove vsestranske uporabe v proizvodnji fermentiranih živil in prehranskih dopolnil ter značilnih razlik znotraj skupine in hkrati velike sorodnosti, znanstveniki uporabljajo vrsto identifikacijskih tehnik, ki se med seboj razlikujejo v uspešnosti, ponovljivosti in hitrosti. Zahteve, ki jih morajo izpolnjevati različne tehnike identifikacije so točnost, občutljivost, specifičnost, natančnost, hitrost, enostavnost in neobčutljivost za zunanje dejavnike. MKB so vključene v nemalo raziskav, kjer ugotavljajo njihove metabolne lastnosti, uspešnost rasti pod določenimi pogoji, stabilnost med tehnološkimi procesi, obstojnost v izdelku ter druge lastnosti. V splošnem se tehnike delijo na gojitvene in od gojenja neodvisne, kjer imajo tako ene kot druge prednosti in slabosti. Prednost od gojenja neodvisnih metod je v krajšem času, potrebnem za analizo, medtem ko so gojitvene metode zanesljivejše pri identifikaciji. Gojitvene metode se delijo še na genotipske in fenotipske (Smole Možina, 2003; Temmerman in sod., 2004).

2.4.1 Uporaba selektivnih gojišč

V selektivnih izolacijskih gojiščih uporabljamo selektivne sestavine, ki inhibirajo rast čim večjega števila prisotnih mikroorganizmov, ne motijo pa rasti tarčnega organizma (Smole Možina, 2003). Priporočeno selektivno gojišče za laktobacile je Rogosa.

2.4.2 Določanje fenotipskih lastnosti

Pri identifikaciji MKB se uporabljajo tako fenotipske kot genotipske metode. S pomočjo fenotipskih metod lahko določimo morfologijo in fiziološko karakterizacijo ter fermentativne sposobnosti MKB. Čeprav so te metode slabo ponovljive, običajno dolgotrajne in precej nezanesljive ter navadno omogočajo razlikovanje le na osnovi rodu, so zaradi preproste izvedbe in nezahtevne opreme še vedno razmeroma pogoste pri identifikaciji MKB (Temmerman in sod., 2004).

2.4.2.1 Test na prisotnost katalaze

Za MKB, torej tudi za laktobacile, velja, da so katalaza negativne bakterije. Katalaza je encim, ki cepi vodikov peroksid na kisik in vodo, kar zaznamo s pojavom mehurčkov (Ottaviani, 1991, Dellaglio in sod., 1994).

2.4.2.2 Ugotavljanje tvorbe plina

Pri tem testu določanja fenotipskih lastnosti preverjamo sposobnost tvorbe plina, na podlagi česar lahko ugotovimo ali so laktobacili homo- ali heterofermentativni. Sposobnost tvorbe plina imajo načeloma le laktobacili III. skupine laktobacilov, ki so obligatno heterofermentativni. Laktobacili I. in II. skupine plina praviloma ne tvorijo (Ottaviani, 1991).

2.4.2.3 Rast pri različnih temperaturah

Literatura navaja kar nekaj podatkov o rasti laktobacilov pri različnih temperaturah. Za MKB, ki sodelujejo v procesu izdelave in zorenja sirov naj bi veljalo, da so večinoma mezofilni ali termofilni mikroorganizmi, z optimalno temperaturo rasti med 30 °C in 42 °C (Beresford in sod., 2001). Optimalna temperatura rasti za rod *Lactobacillus* je za posamezne skupine različna. Ottaviani (1991) navaja da vrste, ki spadajo v I. skupino ne rastejo pri 15 °C. Zanje je optimalna rast pri 45 °C, s čimer se v glavnem strinjajo Dellaglio in sod. (1994), katerih podatki kažejo, da večina vrst I. skupine ne raste pri 15 °C, z izjemo *Lb. amylophilus*, *Lb. farciminis*, *Lb. gallinarum*, *Lb. kefiranofaciens* in *Lb. sharpeae*. Vsi naštetih laktobacili v več kot 90 % dobro rastejo pri 15 °C, vendar ne pri 45 °C. Temperaturno območje rasti laktobacilov I. skupine je med 30 °C do 45 °C, z redkimi izjemami, ki rastejo tudi pri 52 °C.

Za laktobacile II. skupine, ki so fakultativno heterofermentativni, velja, da jih večina raste pri 15 °C, precej manj pa tudi pri 45 °C. Imamo pa tudi izjeme, ki jim ustreza tako 15 °C kot tudi 45 °C. Ena takih izjem je *Lb. paracasei*, ki v več kot 90% raste pri 15 °C, med 10 % in 90 % pa jih raste tudi pri 45 °C. Podobno velja tudi za *Lb. casei*, čeprav je za laktobacile II. skupine načeloma najbolj ugodna temperatura rasti med 30 °C in 37 °C, maksimalna pa vse do 45 °C (Dellaglio in sod., 1994; Ottaviani, 1991).

Laktobacili III. skupine so po rasti pri različnih temperaturah zelo podobni laktobacilom II. skupine. Vrste, ki pripadajo tej skupini, večinoma rastejo pri 15 °C, ne pa tudi pri 45 °C. Ponovno obstajajo izjeme, za katere velja ravno obratno. Taka izjema je denimo *Lb. fermentum*, katerega optimalna temperatura rasti je 45 °C, za ostale laktobacile te skupine pa se temperatura večinoma giblje med 30 °C in 37 °C (Dellaglio in sod., 1994).

2.4.2.4 Fermentacija ogljikovih hidratov

Eden pomembnejših fenotipskih kriterijev je tudi sposobnost fermentacije ogljikovih hidratov. Za preverjanje te sposobnosti so na voljo komercialni testi API, ki temeljijo na prepoznavanju fermentativnih sposobnosti in encimske aktivnosti mikroorganizmov. Za laktobacile uporabljamo test API 50 CHL, ki vsebuje trakove z različnimi dehidriranimi sladkorji, ki nam omogočajo proučevanje metabolizma ogljikovih hidratov. Fermentacijo zaznamo kot spremembo barve, reakcije tega testa pa interpretiramo s pomočjo tabel in programske opreme za identifikacijo.

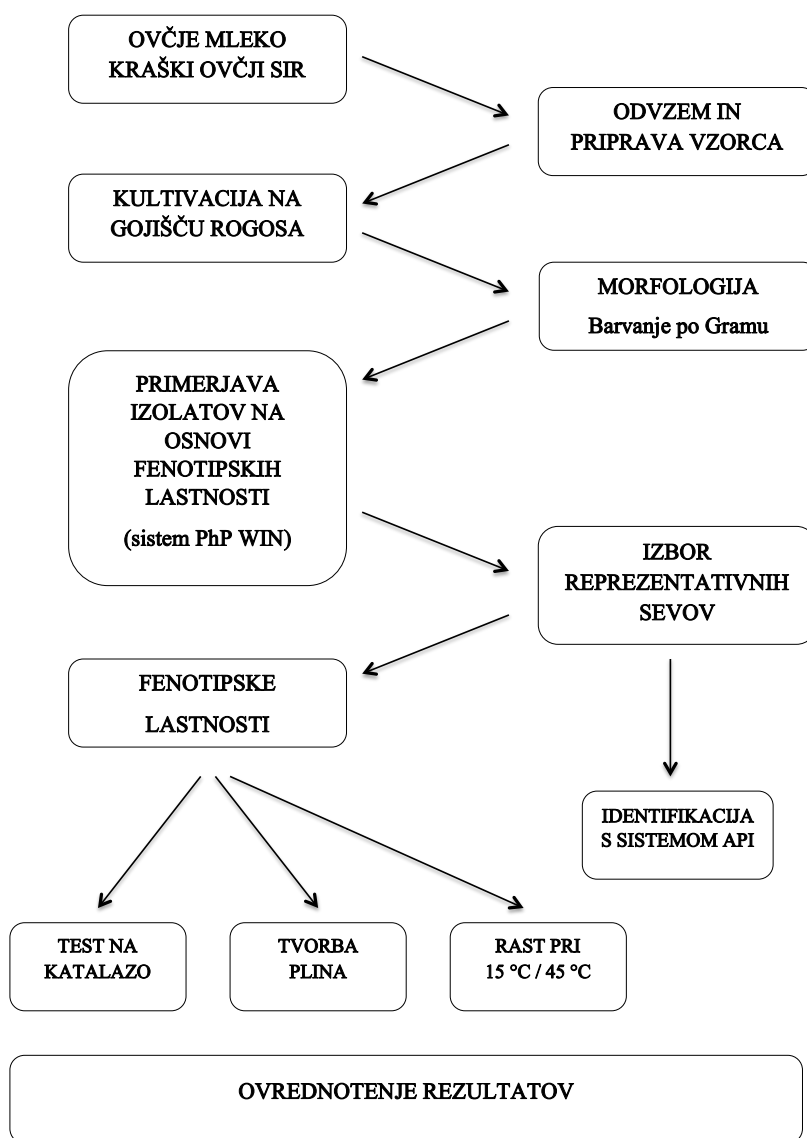
2.4.2.5 Sistem PhP mikrotitrskih plošč

Sistem PhP plošč je predvsem hitra in enostavna metoda fenotipizacije bakterij, kjer lahko hkrati testiramo več sto bakterijskih izolatov. Princip metode temelji na barvni reakciji, ki nastane zaradi bakterijske fermentacije različnih substratov, ki vsebujejo ogljik. Dobljeni rezultati so visoko specifični in ponovljivi. Plošče so prirejene za tipizacijo različnih bakterij (enterokoki, mlečnokislinske bakterije, stafilokoki,...).

3 MATERIAL IN METODE

Namen naloge je bil ugotoviti koliko in kateri laktobacili so prisotni v kraškem ovčjem siru, izdelanem po tradicionalnem postopku ter brez dodatka starterske kulture. Zato smo iz vzorcev mleka in sira osamili laktobacile, jih identificirati in proučevali njihove fenotipske lastnosti.

3.1 NAČRT DELA



Slika 8: Diagram izvedbe laboratorijskega dela

3.2 MATERIAL

3.2.1 Vzorci sira in mleka

Kraški ovčji sir je trdi tip sira, izdelan iz surovega in/ali termiziranega ovčjega mleka. Vsi vzorci so bili odvzeti pri istem proizvajalcu. Analizirali smo mleko in sire v različnih fazah zorenja.

V analize smo vključili šest vzorcev sira iz mleka ovc nižinske paše (K1-K6), ki so bili zoreni 60 (4) oz. 45 dni (2). Siri iz mleka ovc višinske paše so bili vzorčeni v štirih serijah ob različnih časih zorenja (siri vzorčeni takoj po soljenju ob času 0 ter siri zoreni 14, 30, 45 in 60 dni), odvzeli pa smo tudi vzorce mleka, iz katerih je bil sir izdelan. Vzorci mleka so bili odvzeti pred toplotno obdelavo; odvzeli smo bodisi skupno mleko ali ločeno zoreno večerno mleko in sveže namolženo jutranje mleko. Siri so bili izdelani bodisi iz surovega ali iz termiziranega mleka. Podatki o vzorcih so zbrani v preglednici 4.

Preglednica 4: Vzorci uporabljeni v raziskavi

Paša	Mleko	Toplotna obdelava	Sir (čas zorenja)				
			0 dni	14 dni	30 dni	45 dni	60 dni
N1		-					K1
N2		-					K2
N3		+					K3
N4		+					K4
N5		+				K5	
N6		+				K6	
V1	M1	-	K9	K18	K24	K29	K35
V2	M2, M3, M4	+	K12	K19	K25	K30	K36
V3	M7	+	K14	K20	K26	K31	K37
V4	M9	-	K15	K21	K27	K32	K38
V5	M10, M11						
V6	M13, M15						

N – nižinska paša, V – višinska paša, K – sir, M – mleko
M2, M10, M15 - večerno mleko
M3, M11, M13 - jutranje mleko
M1, M4, M7, M9 - skupno mleko

3.2.2 Splošne kemikalije

- 3% vodikov peroksid,
- 96% očetna kislina,
- aceton,
- destilirana voda,
- etanol,
- Ringerjeva raztopina ¼ jakosti,
- glicerol.

3.2.3 Komerčni kompleti

- API 50 CHL Medium (bioMérieux, Francija),
- Komplet za barvanje po Gramu: Color Gram 2 (bioMérieux),
- PhPlate mikrotitrne plošče in substrat, PhP-LB (PhPlate AB, Švedska).

3.2.4 Trda in tekoča gojišča

3.2.4.1 Trdo gojišče Rogosa (ROGOSA Agar; Merck, Nemčija)

Trdo gojišče Rogosa smo pripravili po navodilih proizvajalca. V litru destilirane vode smo ob segrevanju raztopili 74,5 g gojišča v prahu. Dodali smo 96% očetno kislino (cca 1,3 ml), da smo dosegli pH 5,5.

Gojišče Rogosa je selektivno gojišče, ki ga uporabljamo za izolacijo in določanje števila laktobacilov, saj po sestavi nudi optimalne pogoje za rast laktobacilov.

3.2.4.2 Trdo gojišče MRS (MRS Agar; Merck, Nemčija)

Trdo gojišče MRS smo pripravili po navodilih proizvajalca. V liter destilirane vode smo raztopili 68,2 g gojišča v prahu in ga avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

Trdo gojišče MRS vsebuje posebne rastne faktorje, ki omogočajo rast laktobacilov in ga lahko uporabljamo za izolacijo ali kultivacijo. Ker ima zelo nizko stopnjo selektivnosti,

lahko na njem rastejo tudi druge vrste MKB, kot so bakterije iz rodov *Pediococcus* in *Leuconostoc*.

3.2.4.3 Tekoče gojišče MRS (MRS broth; Merck, Nemčija)

Tekoče gojišče MRS smo prav tako pripravili po navodilih proizvajalca. V liter destilirane vode smo dodali 52,2 g gojišča v prahu in ga raztopili. Ker smo ga potrebovali za precepljanje in namnoževanje že izoliranih laktobacilov, smo ga prelili v epruvete (po 10 ml) in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

Potrebovali smo ga tudi za ugotavljanje tvorbe plina. Za ta namen smo v epruvete vložili Durchamove cevke in šele nato avtoklavirali na 121 °C za 15 minut.

3.2.5 Laboratorijska oprema

Pri laboratorijskem delu so bili uporabljeni naslednji aparati in laboratorijska oprema:

- avtoklav A-21CA (Kambič),
- vrtičnik Vibromix 10 (Tehtnica),
- gnetilnik BagMixer (Interscience),
- gorilnik,
- hladilnik,
- inkubatorji: BT150 (Marijan Krokter),
- mikrovalovna pečica, 32 L (Bosch),
- svetlobni mikroskop (Reichert),
- tehtnice: AT 400 (Mettler Toledo),
P1200 (Mettler Toledo),
EB 300M (Tehtnica Železniki),
- anaerobne posode (GENbox) in generatorji anaerobnih razmer (BioMérieux)
- zamrzovalnik.

3.2.6 Programska oprema

- Identifikacijska programska oprema za API 50 CHL *apiweb*TM (bioMérieux),
- PhPWIN software (PhPlate AB).

3.3 METODE

3.3.1 Mikrobiološka analiza vzorcev

Mikrobiološko analizo vzorcev smo opravili na klasičen način z določanjem števila kultivabilnih mikroorganizmov s štetjem kolonij na ploščah.

Vse postopke mikrobioloških analiz smo opravljali v aseptičnem okolju. Pred začetkom dela smo razkužili vse delovne površine in uporabljali sterilni laboratorijski pribor. Prav tako smo razkužili roke, delo pa je vedno potekalo ob prižganem gorilniku.

3.3.1.1 Priprava osnovne raztopine

Vzorci za analizo smo zbrali na terenu in jih hranili na hladnem (4 °C – 8 °C) ter jih še isti dan analizirali v laboratoriju.

Siru smo odrezali zunanje dele, ki so bili v stiku z zrakom ali embalažo, v katero je bil zavrt, ter aseptično odvzeli notranji del sira za analizo. V sterilno vrečko smo zatehtali 10 g sira in mu dodali 90 g Ringerjeve raztopine $\frac{1}{4}$ jakosti. Vzorec z raztopino smo tri minute gnetli v gnetilniku do homogenosti. Tako smo dobili vzorec z razredčitvijo 10^{-1} .

Pri pripravi vzorca mleka, smo vzorčeno mleko previdno premešali in odpipetirali 1 ml ter mu dodali 9 ml Ringerjeve raztopine $\frac{1}{4}$ jakosti. Raztopino smo premešali na vrtičniku. Tako smo dobili vzorec mleka z razredčitvijo 10^{-1} .

3.3.1.2 Metoda štetja na ploščah

V petrijevko smo s pipeto odmerili 1 ml osnovne raztopine vzorca in jo prelili s trdim gojiščem Rogosa ter z mešanjem enakomerno porazdelili po celotni površini petrijevke. Istočasno smo pripravili ustrezne razredčitve, kjer smo 1 ml osnovne raztopine prenesli v 9 ml Ringerjeve raztopine $\frac{1}{4}$ jakosti in premešali ter tako dobili vzorec z razredčitvijo 10^{-2} . Tako smo nadaljevali do višjih razredčitev z namenom, da bi na ploščah dobili posamezne kolonije. Petrijeva plošča velja za števno, če na njej zraste do 300 kolonij. Petrijevke smo zložili v vrečko, da smo jih zavarovali pred izsušitvijo in jih prenesli v inkubator na 37 °C za 72 ur.

Po inkubiranju v aerobnih pogojih smo na petrijevih ploščah prešteli zrasle kolonije, ki so imele premer več kot 0,5 mm. Število kolonijskih enot v gramu (KE/g) oz. mililitru (KE/ml) vzorca smo izračunali s pomočjo naslednje enačbe:

$$KE = \sum n / ((a + 0,1 * b) * d) \quad \dots(1)$$

$\sum n$ = vsota prešteti kolonij

a = število števnih plošč prve razredčitve

b = število števnih plošč druge razredčitve

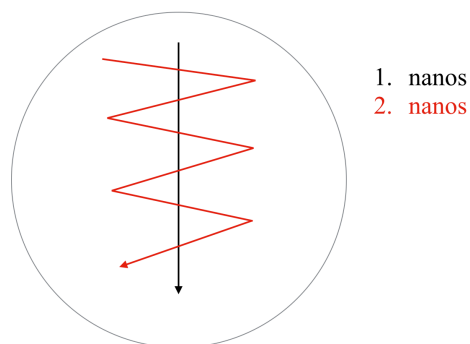
d = faktor najnižje razredčitve

3.3.2 Prečiščevanje zraslih kolonij

Gojišče Rogosa je selektivno gojišče za laktobacile, zato smo predvidevali, da so kolonije, ki so po inkubiranju zrasle na omenjenem gojišču, laktobacili. Seve laktobacilov je potrebno osamiti iz selektivnega gojišča in jih prečistiti. Iz vsakega vzorca smo osamili po 5 kolonij.

Za prečiščevanje smo uporabili trdo gojišče MRS. S cepilno zanko smo s selektivnega gojišča Rogosa prenesli posamezno kolonijo in jo prenesli v 9 ml Ringerjeve razopine $\frac{1}{4}$ jakosti. Epruveto z vsebino smo premešali na vrtičniku in s sterilno cepilno zanko razmazali po trdem gojišču MRS. Na sliki 9 je grafično prikazan nanos razredčene kulture na petrijevo ploščo.

Plošče z razmazi smo inkubirali anaerobno 48 ur pri 37 °C.



Slika 9: Nanos kulture s cepilno zanko

3.3.3 Mikroskopski pregled kolonij

Za karakterizacijo in ugotavljanje morfoloških lastnosti MKB smo uporabili metodo diferencialnega barvanja po Gramu in mikroskopiranja. S to metodo razdelimo bakterije v dve veliki skupini, po Gramu pozitivne in po Gramu negativne bakterije. Vzorec se različno obarva, kar je posledica razlik v zgradbi bakterijske celične stene.

3.3.3.1 Postopek barvanja po Gramu

Na objektno stekelce smo nanesti kapljico Ringerjeve raztopine $\frac{1}{4}$ jakosti in vanjo s cepilno zanko vmešali kolonijo, ki smo jo postrgali s trdega gojišča MRS. Kapljica se je morala posušiti na zraku, nato pa smo razmaze fiksirali s hitrim potegom nad ognjem. Sledilo je barvanje.

Fiksirane razmaze smo najprej pobarvali s kristal vijoličnim barvilom in jih sprali z destilirano vodo. Sledila je fiksacija z lugolom (1 minuta) in ponovno spiranje z destilirano vodo. Odvečno barvilo kristal vijolično smo dodatno sprali z raztopino acetona in etanola, ki povzroči razbarvanje po Gramu negativnih bakterij. Vzorce smo ponovno sprali z destilirano vodo in pobarvali še s safraninom. Po minuti smo objektna stekelca sprali in posušili na zraku.

3.3.3.2 Mikroskopiranje

Mikroskopski pregled smo izvedli s svetlobnim mikroskopom, uporabili smo 1000–kratno povečavo. Opazovali smo velikost, obliko, obarvanost in organiziranost bakterij. Bakterije, ki so se pobarvale modro-vijolično, smo označili za po Gramu pozitivne, rdeče obarvane pa po Gramu negativne.

3.3.4 Zamrzovanje vzorcev

Prečiščene seve, ki smo jih osamili iz mleka in iz kraškega ovčjega sira, je bilo potrebno zamrzniti za nadaljnje preiskave. V epico smo odpipetirali 1 ml tekočega gojišča MRS ter vanj prenesli eno kolonijo s trdega gojišča MRS. Epico smo premešali ter inkubirali 24-48 ur pri 37 °C. Po inkubaciji smo izraslim kulturam dodali 250 µl glicerola, premešali in zamrznili. Glicerol smo dodali zato, da celice pri zamrzovanju ne popokajo.

3.3.5 Revitalizacija zamrznjenih vzorcev

Zamrznjene seve smo za nadaljnje analize revitalizirali v tekočem gojišču MRS. Epice s sevi smo iz zamrzovalnika na delovno površino prenesli v prenosnem zamrzovalniku, da se zamrznjeni vzorci med delom ne odtajajo. Zamrznjene izolate smo s cepilno zanko nacepili v tekoče gojišče MRS, premešali in inkubirali 24 ur pri 37 °C.

3.3.6 Fenotipizacija s sistemom PhP mikrotitrskih plošč

Po mikroskopiranju smo za fenotipizacijo po Gramu pozitivnih, paličastih bakterij, uporabili sistem PhPlate mikrotitrskih plošč za tipizacijo laktobacilov (PhP-LB).

Seve iz mleka in sirov smo nacepili na trdo gojišče MRS in jih inkubirali 48 ur pri 37 °C. Z gojišča smo s cepilno zanko prenesli nekaj izraslih kolonij v 5 ml PhP substrata, ki poleg hranil vsebuje tudi indikator bromkrezol vijolično. Suspenzijo smo premešali in inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi. Po inkubaciji smo po 150 µl suspenzije prenesli v luknjice mikrotitrskih plošč. Plošče smo inkubirali v anaerobnih pogojih tri dni pri 37 °C. Kinetiko fermentacije smo spremljali z opazovanjem spremembe barve indikatorja v substratu (iz vijolične v rumeno) po 24, 48 in 72 urah inkubacije. Rezultate smo obdelali s programom PhPWIN, ki seve na osnovi podobnosti razdeli v skupine in izbere tudi reprezentativen sev oz. tipičnega predstavnika iz posamezne skupine.

3.3.7 Določanje fenotipskih lastnosti

S spodnjimi testi smo ugotavljali ali imajo reprezentativni sevi lastnosti, ki so značilne za tipične predstavnike laktobacilov.

3.3.7.1 Aktivnost katalaze

Pri tem testu ugotavljamo ali MKB vsebujejo encim katalaza, ki vodikov peroksid (je stranski produkt metabolnih procesov) v celici razgradi na neškodljive produkte - na vodo in kisik. To opazimo kot prisotnost zračnih mehurčkov ob dodatku 3% vodikovega peroksida h kulturi (Simon, 2014).

Reprezentativne seve smo nacepili v tekoče gojišče MRS in jih čez noč inkubirali pri 37 °C. 500 µl kulture smo dodali 100 µl 3 % vodikovega peroksida, pretresli in opazovali ali nastajajo mehurčki, ki kažejo na prisotnost katalaze.

3.3.7.2 Tvorba plina

Za ugotavljanje tvorbe plina smo po 100 µl prekonočne kulture sevov prenesli v tekoče gojišče MRS z vstavljenimi Durchamovimi cevkami. Po 48 urni inkubaciji pri 37 °C smo opazovali ali je v Durchamovi cevki prisoten zračni mehurček. Prisotnost mehurčka kaže na to, da so laktobacili heterofermentativni, saj tvorijo plin.

3.3.7.3 Rast pri 15 °C in 45 °C

Za določanje fenotipskih lastnosti je pomemben dejavnik tudi sposobnost rasti pri različnih temperaturah. Za laktobacile opazujemo rast na gojišču MRS pri 15 °C in 45 °C v anaerobnih razmerah.

Iz tekočega gojišča MRS smo s cepilno zanko v dveh serijah naredili razmaz kulture na trdno gojišče MRS. Plošče smo inkubirali bodisi 7 dni pri 15 °C ali 2 dni pri 45 °C . Obe inkubaciji sta potekali anaerobno. Po inkubaciji smo opazovali prisotnost kolonij.

3.3.7.4 Identifikacija sevov s pomočjo sistema API 50 CH

Za identifikacijo različnih bakterij so zelo uporabni kompleti API, ki temeljijo na biokemijskih testih. Tako je na voljo tudi komplet API 50 CH, ki je prirejen za identifikacijo laktobacilov. API 50 CH sestavlja 5 trakov, na katerih je skupno 50 žepkov, od katerih je prvi negativna kontrola, ostalih 49 pa vsebuje različne dehidrirane substrate iz skupine ogljikovih hidratov, s pomočjo katerih ugotavljamo fermentacijsko sposobnost preiskovane bakterije. Sposobnost metabolizma točno določenega sladkorja zaznamo kot spremembo barve v žepkih.

Kulturo iz tekočega gojišča MRS smo razredčili v gojišču API 50 CH skladno z navodili proizvajalca. S tako pripravljeno suspenzijo smo napolnili žepke na API trakovih in z nanosom nekaj kapljic umerzijskega olja žepke zaprli ter tako ustvarili anaerobne pogoje. API trakove smo inkubirali pri 37 °C ter po 24 in 48 urah zabeležili rezultate. Fermentacija ogljikovih hidratov in encimska aktivnost sevov se kaže kot sprememba barve gojišča iz vijolične v rumeno.

Identifikacijo analiziranega seva smo izvedli s pomočjo *apiweb*TM programske opreme.

4 REZULTATI

4.1 MIKROBIOLOŠKA ANALIZA

Iz vzorcev kraškega ovčjega sira in mleka smo želeli osamiti populacijo nestarterskih laktobacilov, zato smo za nacepljanje primernih razredčitev vzorcev mleka in sirov uporabili gojišče Rogosa, ki je predlagano kot selektivno za laktobacile. Predvidevali smo, da so kolonije, ki so zrasle na Rogosi, pripadale rodu *Lactobacillus*.

V preglednici 5 so prikazani rezultati velikosti populacije laktobacilov, ki smo jih določili v vzorcih mleka in sirov. Pri štetju kolonij na petrijevih ploščah smo upoštevali kolonije s premerom večjim od 0,5 mm, kot števne petrijeve plošče pa so veljale tiste, na katerih je zraslo do 300 kolonij. Iz rezultatov preglednice 5 vidimo, da smo laktobacile uspešno izolirali iz vseh preiskovanih vzorcev mleka ali sirov, ne glede na to, ali so bili siri izdelani iz surovega ali toplotno obdelanega mleka in ali iz mleka ovc z višinske ali nižinske paše. Skladno z našimi pričakovanji, je bilo število nestarterskih laktobacilov v vzorcih mleka nižje, od 2,0 log KE/ml do 3,6 log KE/ml vzorca, v vzorcih sirov pa tudi štirikrat višje. Med zorenjem sirov je opazen trend naraščanja števila laktobacilov, ki pri konzumni zrelosti nekaterih sirov dosežejo vrednosti tudi do 8,4 log KE/g. Število laktobacilov je naraščalo do drugega tedna zorenja, dosežene vrednosti pa so v glavnem ostale nespremenjene do konca zorenja. Pri ugotavljanju vpliva termizacije mleka na velikost populacije laktobacilov v sirih med in ob koncu zorenja opazimo, da ne glede na pašo, toplotna obdelava mleka ne vpliva nujno na velikost populacije laktobacilov. Pri sirih nižinske paše smo največ laktobacilov določili pri siru K4 (N4) kjub temu, da je bil izdelan iz termiziranega mleka. Podobno ugotovimo tudi pri nekaterih sirih z višinske paše (K20, K26, K31 in K37), kjer kljub toplotni obdelavi mleka pred sirjenjem beležimo zelo visoko število laktobacilov, pri siru K20 in K26 pa celo najvišje vrednosti (8,4 log KE/g). Ne glede na to, da so bili siri V1 izdelani iz surovega mleka in siri V3 iz termiziranega mleka, pri njih beležimo zelo podobno velikost populacije laktobacilov. Precejšen padec populacije med zorenjem se kaže pri sirih V2, kar je morda posledica termizacije mleka, iz katerega je bil narejen sir. Število med zorenjem niha in tudi na koncu ne doseže vrednosti, ki se kažejo pri ostalih sirih.

V sirih narejenih iz mleka nižinske paše se število laktobacilov giba v primerljivih okvirih kot pri sirih višinske paše. Tukaj večjih odstopanj ni zaznati.

Preglednica 5: Število laktobacilov v vzorcih mleka (log KE/ml) in sirov (log KE/g)

Paša	Mleko (log KE/ml)	Toplotna obdelava	Sir (čas zorenja)				
			0 dni	14 dni	30 dni	45 dni	60 dni
Število laktobacilov v sirih (log KE/g)							
N1	-	NE	-	-	-	-	6,8 _(K1)
N2	-	NE	-	-	-	-	7,0 _(K2)
N3	-	DA	-	-	-	-	6,2 _(K3)
N4	-	DA	-	-	-	-	7,1 _(K4)
N5	-	DA	-	-	-	6,1 _(K5)	-
N6	-	DA	-	-	-	5,1 _(K6)	-
V1	2,7 _(M1)	NE	4,2 _(K9)	8,0 _(K18)	8,1 _(K24)	8,3 _(K29)	8,2 _(K35)
V2	2,3 _(M2)	DA	< 1 _(K12)	3,9 _(K19)	1,9 _(K25)	3,4 _(K30)	3,7 _(K36)
V3	2,0 _(M7)	DA	4,9 _(K14)	8,4 _(K20)	8,4 _(K26)	7,7 _(K31)	8,1 _(K37)
V4	3,6 _(M9)	NE	4,8 _(K15)	< 5 _(K21)	5,1 _(K27)	4,5 _(K32)	5,6 _(K38)
V5	2,7 _(M11)	NE	-	-	-	-	-
V6	2,0 _(M13)	NE	-	-	-	-	-

K – sir, M – mleko, N – nižinska paša, V – višinska paša
M2 - večerno mleko
M11, M13 - jutranje mleko
M1, M7, M9 - skupno mleko
-: vzorci niso bili odvzeti

Za nacepljanje vzorcev mleka in sirov smo uporabili selektivno gojišče Rogosa, zato smo pričakovali, da so na njih zrasli laktobacili. Ker smo želeli preveriti naša predvidevanja, smo po štetju kolonij z vsake petrijeve plošče naključno izbrali pet kolonij in jih dvakrat prečistili na trdem gojišču MRS. Tako smo iz vsakega vzorca mleka ali sira dobili pet kolonij.

4.2 UGOTAVLJANJE MORFOLOŠKIH LASTNOSTI IN FENOTIPIZACIJA

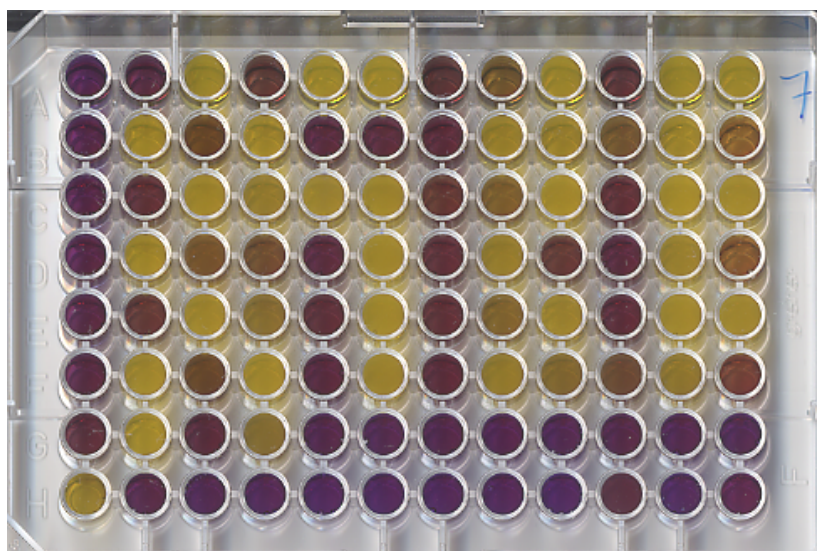
Za ugotavljanje, ali prečiščene kolonije pripadajo rodu *Lactobacillus*, smo najprej preverili morfološke lastnosti kolonij z metodo barvanja po Gramu. Laktobacili so po Gramu pozitivne bakterije, ki se obarvajo vijolično. Po obliki so krajše ali daljše posamezne palčke, ki se lahko povezujejo v verižice.

Po Gramu smo pobarvali skupno 163 izolatov, ki smo jih naključno izbrali z gojišča Rogosa ter prečistili na gojišču MRS. Izkazalo se je, da sta bila 2 izolata po Gramu negativna, saj sta se obarvala rdeče in bila v obliki kokov. Preostalih 161 izolatov je bilo po Gramu pozitivnih, od tega 21 izolatov kroglaste oblike, 140 izolatov pa je bilo po Gramu pozitivnih paličic.

Vse izolate, ki smo jih potrdili kot po Gramu pozitivne paličice, smo shranili z zamrzovanjem pri $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ za nadaljnje raziskave.

4.2.1 Fenotipizacija laktobacilov s sistemom PhP

Pred določanjem fenotipskih lastnosti posameznih sevov, smo izolate obdelali s sistemom PhP mikrotitrskih plošč in sicer z modelom PhP-LB, ki je prirejen za tipizacijo laktobacilov. Na podlagi intenzivnosti spremembe barve indikatorja iz vijolične v rumeno zaradi bakterijske fermentacije različnih substratov, ki vsebujejo ogljik, smo s pomočjo programa PhPWIN seve s podobnim fermentacijskim vzorcem razvrstili v posamezne PhP tipe. Rezultat biokemijskega prstnega odtisa laktobacilov na PhP plošči prikazuje slika 10.

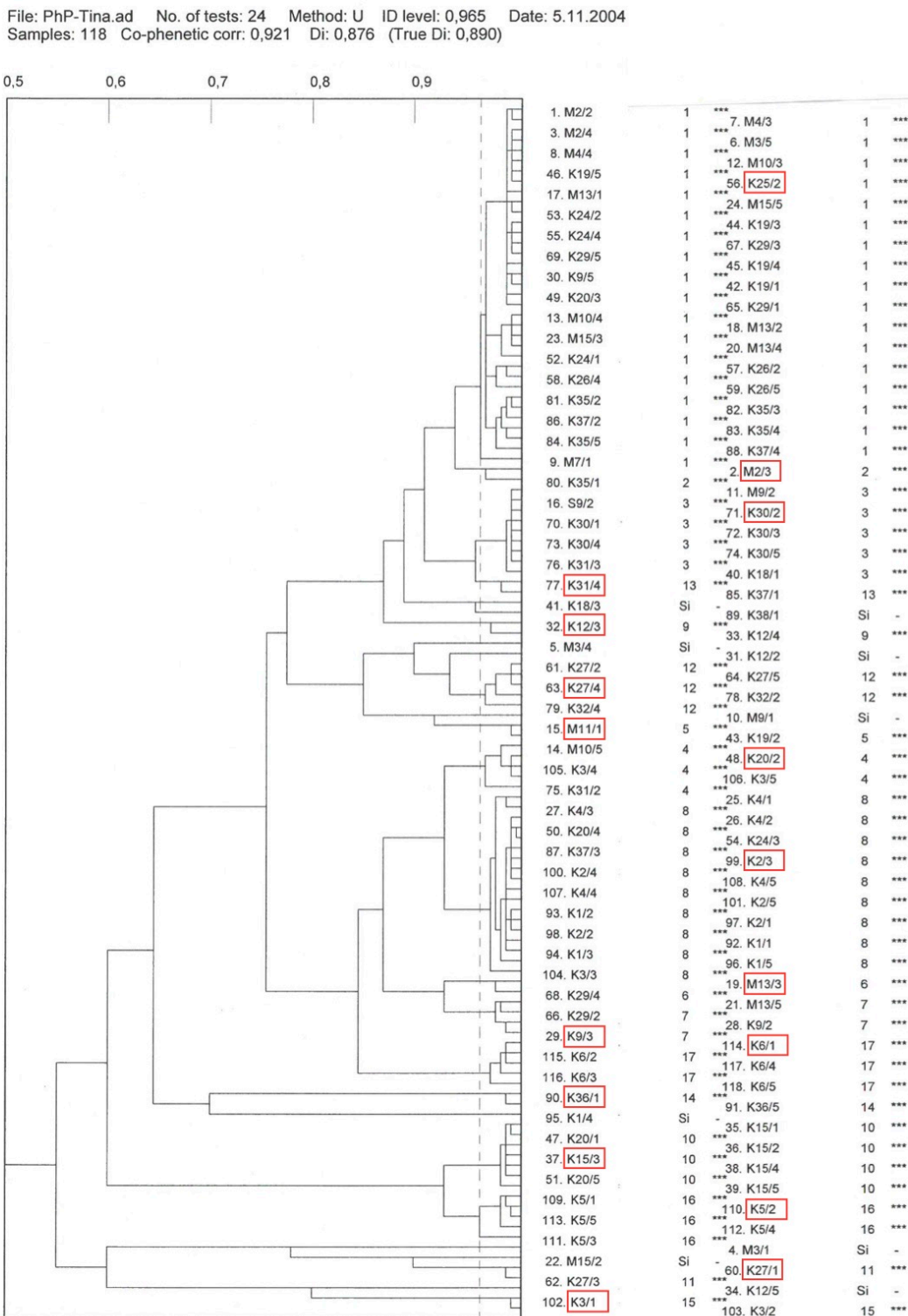


Slika 10: Primer PhP plošče po 72-urni inkubaciji pri $37\text{ }^{\circ}\text{C}$

Program PhPWIN nam je glede na biokemijski prstni odtis 140 izolatov razvrstil v 19 PhP skupin. Od tega je 22 izolatov od skupno 140 PhPWIN označil kot vzorce, ki so zelo slabo reagirali (oznaka !nf) oziroma s sistemom sploh niso reagirali (oznaka !NF). Oboje smo označili za negativne rezultate in jih v nadaljevanju naših analiz nismo več upoštevali (rezultati niso prikazani).

Po izločitvi 22 izolatov, smo v nadaljevanju rokovali s preostalimi 118 izolati, ki smo jih ponovno analizirali s programom PhPWIN.

Na sliki 11 je prikazan dendrogram oz. drevo sorodnosti, kjer je program PhPWIN, glede na biokemijski prstni odtis, razvrstil 118 izolatov. Prekinjena horizontalna črta predstavlja mejno vrednost oz. stopnjo sorodnosti (ID level = 0,965). Izolati s korelacijskim koeficientom, ki je enak ali višji od 0,965, namreč predstavljajo isto PhP skupino. Sistem je 109 izolatov iz mleka in sirov, od skupno 118-ih, razvrstil v posamezne PhP tipe, medtem ko se 9 izolatov ni razvrstilo v nobeno od obstoječih skupin in jih je sistem označil kot Si (single isolate), saj so se fenotipsko preveč razlikovali od ostalih analiziranih izolatov (slika 11). Program PhPWIN je 109 izolatov razvrstil v 17 sorodnih PhP skupin in iz vsake skupine izbral po en reprezentativen sev (preglednica 6).



Slika 11: Dendrogram razvrstitve 118 izolatov laktobacilov v posamezne PhP tipe glede na njihov biokemijski prstni odtis.

Preglednica 6 prikazuje 17 oblikovanih PhP skupin, oznako reprezentativnega seva posamezne PhP skupine in koliko sevov se je razvrstilo v posamezno skupino.

Preglednica 6: Razporeditev izolatov laktobacilov v PhP skupine in reprezentativni sevi

Skupina PhP	Reprezentativen sev	Število izolatov v skupini
1	K25/2	35
2	M2/3	2
3	K30/2	9
4	K20/2	5
5	M11/1	2
6	M13/3	2
7	K9/3	4
8	K2/3	18
9	K12/3	2
10	K15/3	7
11	K27/1	2
12	K27/4	5
13	K31/4	2
14	K36/1	2
15	K3/1	2
16	K5/2	5
17	K6/1	5

Iz preglednice 6 lahko razberemo, da imamo dve večji skupini, ki združujeta 18 in 35 izolatov, nekaj srednje velikih, ki združujejo od 4 do 9 izolatov ter 8 skupin, ki združujejo po dva izolata. Reprezentativni sevi so tako iz mleka kot iz sira. Največja skupina, ki šteje 35 izolatov, vsebuje seve izolirane tako iz surovega mleka kot iz sirov pri različni zrelosti. Zanimivo je, da v tej skupini ni nobenega izolata iz mleka in sirov višinske paše V4.

V drugi največji skupini PhP 8, ki združuje 18 izolatov, najdemo pretežno izolate 60 dni zorenih sirov nižinske paše (K1, K2, K3 in K4) in sicer 15 izolatov. Od preostalih treh izolatov pripadata dva siru višinske paše V3 in sicer en izolat siru, zorenemu 14 dni (K20) ter en siru, zorenemu 60 dni (K37), tretji izolat pa siru V1, zorenemu 30 dni (K24). V največjih dveh skupinah PhP, 1 in 8, pa ne najdemo izolatov iz sirov nižinske paše, ki sta bila vzorčena po 45-ih dneh zorenja (K5 in K6), kakor tudi izolatov iz sira, izdelanega iz mleka višinske paše V4.

4.3 FENOTIPSE LASTNOSTI REPREZENTATIVNIH SEVOV

Program PhPWIN nam je 118 izolatov razvrstil v 17 skupin in za vsako od njih izbral reprezentativnega predstavnika. Ker je tako izbran sev reprezentativen predstavnik vseh izolatov znotraj posamezne PhP skupine, smo v nadaljevanju analize izvedli le z izbranimi 17 reprezentativnimi sevi. Rezultate, ki smo jih dobili pri analizi reprezentativnih sevov, smo preslikali na celotno PhP skupino.

4.3.1 Aktivnost katalaze

Test na prisotnost katalaze smo naredili s 3% raztopino vodikovega peroksida, ki smo ga dodali prekončni kulturi ter opazovali nastanek mehurčkov. Pri nobenem od preskušanih 17-ih sevov ni prišlo do izhajanja mehurčkov, kar potrjuje znano lastnost MKB in tudi laktobacilov, da so katalaza negativni.

4.3.2 Tvorba plina

Pri opazovanju pojava plina v Durchamovih cevkah po inkubaciji smo ugotovili, da večina preiskovanih izolatov (88 %) ne tvori plina. Pojav plina smo zaznali le pri dveh sevih in sicer pri K27/1 in K36/1, oba seva pa sta bila izolirana iz sira; K27/1 je bil izoliran iz 30 dni zorenega sira K27, narejenega iz surovega mleka višinske paše V4, K36/1 pa iz konzumno zrelega sira K36, izdelanega iz toplotno obdelanega mleka višinske paše V2. Sposobnost tvorbe plina je značilna samo za III. skupino laktobacilov, torej obligatno heterofermentativne laktobacile. Iz tega sklepamo, da so ostali sevi najverjetneje pripadniki I. ali II. skupine laktobacilov.

4.3.3 Rast pri različnih temperaturah

Vsi mikroorganizmi, ki smo jih 7 dni inkubirali pri 15 °C, so izkazali zelo dobro rast, medtem ko so pri 45 °C zrasli le 3 izolati od 17-ih. Iz tega lahko sklepamo, da je v populaciji kraškega ovčjega sira 18 % termofilnih in večina oz. 82 % mezofilnih laktobacilov.

Rezultati rasti pri različnih temperaturah so navedeni v preglednici 7.

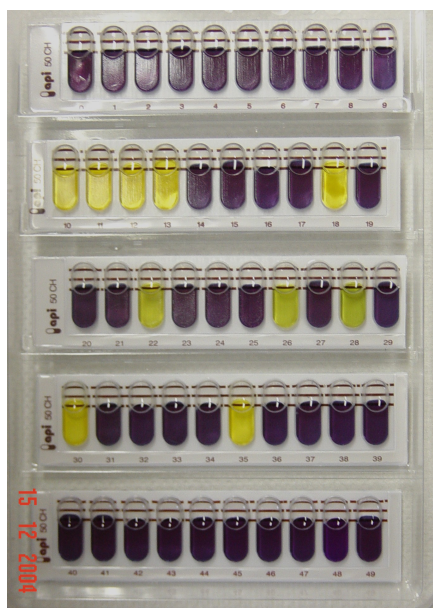
Preglednica 7: Rast reprezentativnih laktobacilov pri 15 °C in 45 °C

Izolat	15 °C / 7 dni	45 °C / 2 dni	Izolat	15 °C / 7 dni	45 °C / 2 dni
K25/2	+	-	K15/3	+	+
M2/3	+	-	K27/1	+	-
K30/2	+	-	K27/4	+	-
K20/2	+	-	K31/4	+	-
M11/1	+	-	K36/1	+	+
M13/3	+	-	K3/1	+	+
K9/3	+	-	K5/2	+	-
K2/3	+	-	K6/1	+	-
K12/3	+	-			

+ : je rast
- : ni rasti

4.3.4 Identifikacija sevov s testom API 50 CH

S testom API 50 CH smo identificirali reprezentativne seve laktobacilov na nivoju vrste. Na sliki 12 je prikazan rezultat testa API po inkubaciji, kjer so na petih trakovih v posameznih žepkih dobro vidne spremembe barve gojišča iz vijolične v rumeno v primeru fermentacije substrata v žepku.



Slika 12: Rezultat API testa po 48-urni inkubaciji

Rezultate fermentacije smo odčitavali in beležili po 24-ih in 48-ih urah inkubacije. Za beleženje rezultatov smo uporabili preglednice, ki so priložene v komercialnem kompletu API 50 CH (slika 13).

Slika 13: Primer preglednice, ki je priložena komercialnemu kompletu API 50 CH

Po analizi vseh reprezentativnih izolatov z API testom, smo zabeležene rezultate vnesli v program *apiweb*TM, ki nam je po obdelavi podatkov z določeno stopnjo verjetnosti podal rezultat identifikacije izolata na nivoju vrste (slika 14).

```

Reference : M2/3                                     Date : 12/16/2004
VERY GOOD IDENTIFICATION

Strip : API 50 CHL          V5.0                      Read on: 12/16/2004
Profile : -----+--+ +++++----- -++++----- -++++----- +-----
0 - GLY - ERY - DARA- LARA- RIB + DXYL- LXYL- ADO + MDX - GAL +
GLU + FRU + MNE + SBE + RHA - DUL - INO - MAN + SOR + MDM - MDG -
NAG + AMY - ARB + ESC + SAL + CEL + MAL + LAC + MEL - SAC - TRE +
INU - MLZ + RAF - AMD - GLYG- XLT - GEN + TUR + LYX - TAG + DFUC-
LFUC- DARL- LARL- GNT - 2KG - 5KG -

----- Significant taxa ----- % Id. --- T -- Tests against -----
Lacto.para.paracasei 1 99.6 0.55 4
Next choice
Lacto.para.paracasei 3 0.2 0.27 6
    
```

Slika 14: Primer rezultata identifikacije izolata s programom *apiweb*TM

Sliki 13 in 14 prikazujeta primer identifikacije reprezentativnega seva M2/3, ki ga je sistem API z 99,6 % verjetnostjo identificiral kot *Lb. paracasei*.

Na ta način smo identificirali vse reprezentativne predstavnike vseh PhP skupin.

V preglednici 8 so zbrani rezultati API identifikacije in ostalih fenotipskih lastnosti laktobacilov.

Preglednica 8: Fenotipske karakteristike reprezentativnih PhP sevov

Reprezentativen izolat	Vrsta (API test)	Število izolatov v skupini	Tvorba plina	Rast pri 15 °C/7 dni	Rast pri 45 °C/2 dni	Prisotnost katalaze
K25/2	<i>Lb. paracasei</i>	35	-	+	-	-
K2/3	<i>Lb. paracasei</i>	18	-	+	-	-
K30/2	<i>Lb. paracasei</i>	9	-	+	-	-
K15/3	<i>Lb. plantarum</i>	7	-	+	+	-
K27/4	<i>Lb. curvatus</i>	5	-	+	-	-
K20/2	<i>Lb. paracasei</i>	5	-	+	-	-
K6/1	<i>Lb. rhamnosus</i>	5	-	+	-	-
K5/2	<i>Lb. plantarum</i>	5	-	+	-	-
K9/3	<i>Lb. paracasei</i>	4	-	+	-	-
M2/3	<i>Lb. paracasei</i>	2	-	+	-	-
K31/4	<i>Lb. paracasei</i>	2	-	+	-	-
K12/3	<i>Lb. paracasei</i>	2	-	+	-	-
M11/1	<i>Lb. paracasei</i>	2	-	+	-	-
M13/3	<i>Lb. paracasei</i>	2	-	+	-	-
K36/1	<i>Lb. brevis</i>	2	+	+	+	-
K27/1	<i>Lb. brevis</i>	2	+	+	-	-
K3/1	<i>Ln. lactis</i>	2	-	+	+	-

Iz rezultatov API identifikacije smo ugotovili, da se 10 PhP reprezentativnih sevov od 17 uvršča v vrsto *Lb. paracasei*, kar pomeni 81 sevov od 109 laktobacilov, razvrščenih s PhP sistemom. Zaključimo lahko, da je vrsta *Lb. paracasei* najbolj zastopana v preiskovanih vzorcih mleka in sirov in predstavlja kar 74 % populacije laktobacilov. Sledi ji *Lb. plantarum* z 11 % zastopanostjo (12 sevov), medtem ko *Lb. rhamnosus* (5 sevov) in *Lb. curvatus* (5 sevov) predstavljata po 4,6 % ter *Lb. brevis* (4 sevi) 3,7 % celotne populacije laktobacilov. Določili smo tudi 2 seva iz vrste *Leuconostoc lactis*. Čeprav smo za izolacijo laktobacilov iz mleka in sirov uporabili gojišče Rogosa, ki je predlagano kot selektivno za laktobacile, je njegova selektivnost pričakovano omejena in smo izolirali tudi predstavnike iz rodu *Leuconostoc*, kar smo s 96,2 % verjetnostjo potrdili s sistemom API.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

V diplomski nalogi smo želeli osamiti in identificirati čim večje število laktobacilov iz vzorcev kraškega ovčjega sira in mleka, iz katerega so bili siri izdelani. Kot navaja literatura, so laktobacili pogosto prevladujoča mikrobiota avtohtonih sirov, narejenih po tradicionalnih postopkih.

Za opis populacije laktobacilov v kraškem ovčjem siru smo vzorčili sire nižinske paše, zorene 60 dni (K1 do K4) in 45 dni (K5 in K6) ter surovo mleko in sire višinske paše po soljenju ter po 14-ih, 30-ih, 45-ih in 60-ih dneh zorenja. Za izolacijo laktobacilov smo uporabili selektivno gojišče Rogosa, nadaljnje prečiščevanje posameznih kolonij je potekalo na gojišču MRS. Prečiščene kolonije smo pobarvali po Gramu in pregledali pod mikroskopom. Ker so laktobacili po Gramu pozitivne paličice, smo na podlagi morfoloških lastnosti iz nadaljnjih analiz izločili vse izolate, ki so se bodisi obarvali po Gramu negativno ali pa so bili krogličaste oblike. Preostalih 140 izolatov, za katere smo predvidevali, da pripadajo rodu *Lactobacillus*, smo analizirali s sistemom PhP. Reprezentativne seve posamezne PhP skupine smo obdelali s sistemom API in z dodatnimi najobičajnejšimi fenotipskimi analizami.

Od 140 izolatov, analiziranih s sistemom PhP, jih je sistem 22 označil kot neustrezne zaradi zelo slabe oz. negativne reakcije, zato smo jih izločili iz nadaljnjih analiz. Preostalih 118 izolatov pa je dalo zadovoljive rezultate, na podlagi katerih jih je sistem 109 razdelil v 17 PhP tipov, 9 sevov pa se je po biokemijskem profilu preveč razlikovalo od ostalih in se niso razvrstili v nobeno od skupin. Sistem PhP je izbral tudi reprezentativne seve iz posamezne PhP skupine, zato smo v nadaljnjih analizah določanja fenotipskih lastnosti preiskovali le 17 sevov. Izkazalo se je, da kar 74 % pregledanih izolatov iz vzorcev sirov in mleka pripada vrsti *Lb. paracasei*, ki je tudi običajno prevladujoča vrsta med laktobacili avtohtonih sirov. Kot smo ugotovili v naši raziskavi, je ta vrsta prisotna med celotnim procesom izdelave in zorenja sirov, vse od surovega mleka do sirov konzumne zrelosti, to je po 60-ih dneh zorenja. Če podrobneje pogledamo rezultate naše raziskave ugotovimo, da so izolati, ki pripadajo največji PhP skupini (ki šteje 35 izolatov), prisotni le v surovem mleku in sirih višinske paše. Izolati, ki pripadajo drugi največji PhP skupini (18 izolatov) pa so bili v večini izolirani iz sirov nižinske paše (K1-K4). Sicer gre za isto vrsto, *Lb. paracasei*, pa vendar je zanimivo, da so se ločili glede na nižinsko in višinsko pašo. Ostali izolati, ki pripadajo vrsti *Lb. paracasei*, so bili zabeleženi oz. razporejeni med mleko in različne sire ob različni konzumni zrelosti.

Mannu in sod. (2000) prav tako navajajo, da je za *Lb. casei/paracasei* značilno, da je vrsta dobro zastopana med celotnim procesom zorenja sirov.

Do podobnih ugotovitev je prišla Paveljšek (2012), ki navaja, da so med mikrobnou populacijo avtohtonih ovčjih sirov z Balkana v največjem deležu zastopane MKB iz rodu *Lactobacillus*, na nivoju vrste pa predvsem *Lb. casei/paracasei* in *Lb. plantarum*.

Tudi v naši raziskavi se je pokazalo, da je *Lb. plantarum* druga najbolj zastopana vrsta in predstavlja 11 % populacije laktobacilov. Pojavlja se med celotnim zorenjem sirov, v surovem mleku ga ne beležimo. Zastopanost omenjene vrste v sirih med zorenjem navajajo tudi Mannu in sod. (2000).

Lb. curvatus in *Lb. rhamnosus* kot tretji najbolj zastopani vrsti v kraškem ovčjem siru imata zelo podobno pojavnost. Prvi se pojavi le v dveh sirih višinske paše (V4) zorenih 30 in 45 dni, *Lb. rhamnosus* pa le v vzorcu K6, 45 dni zorenemu siru nižinske paše. V surovem mleku in začetnih fazah zorenja prisotnosti *Lb. curvatus* in *Lb. rhamnosus* nismo potrdili. Katana (2001) navaja, da je v kraškem ovčjem siru med MKB iz rodu *Lactobacillus* prevladujoča vrsta *Lb. casei*. S tem se strinja tudi Rogelj (2005), ki pa ob tem še navaja, da so poleg *Lb. casei* v kraškem ovčjem siru prisotni še laktobacili vrste *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. rhamnosus* in *Lb. curvatus*. Z rezultati naše raziskave smo prišli do zelo podobnih ugotovitev.

Vse štiri vrste, *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* in *Lb. curvatus*, ki so bile najmočnejše zastopane v vzorcih mleka in sirov, pripadajo II. skupini laktobacilov in so fakultativno heterofermentativni. So mezofilne MKB, katerih optimalna temperatura rasti je med 30 °C in 37 °C (Dellaglio in sod., 1994). Večino nestarterskih MKB v procesu zorenja tradicionalnih sirov predstavljajo prav mezofilni laktobacili, ki pomembno vplivajo na razvoj tipičnega okusa sira. Ravno predstavniki vrste *Lb. casei* so v sirih prepoznani kot eni najpomembnejših MO, ki sodelujejo pri oblikovanju okusa (De Angelis in Gobbetti, 2011; Albenzio in sod., 2001).

Po navedbah Dellaglio in sod. (1994), večina vrst laktobacilov, ki pripada II. skupini, dobro raste pri 15 °C, ne pa tudi pri 45 °C. Do podobnih ugotovitev smo prišli tudi v naši raziskavi, z izjemo sevov vrste *Lb. plantarum*, ki so dobro rasli tudi pri 45 °C. Zaključimo lahko, da večina predstavnikov vrste *Lb. plantarum* ne raste pri 45 °C, najverjetneje pa je to sevno specifična lastnost, kar pomeni, da imamo lahko tudi izjeme.

V naši raziskavi je v najmanjšem deležu zastopana vrsta *Lb. brevis*, ki pripada III. skupini laktobacilov, ki je sicer tudi mezofilna, vendar obligatno heterofermentativna (Adamič, 2003). Podobno kot sevi vrste *Lb. plantarum*, so tudi sevi vrste *Lb. brevis* v naši raziskavi rasli pri 45 °C.

Marino in sod. (2003) so spremljali dinamiko rasti mikrobiote od surovega mleka pa vse do konzumne zrelosti pri siru Montasio, ki je sicer narejen iz kravjega mleka. Prisotnost vrste *Lb. brevis* so ugotovili v surovem mleku, medtem ko je v zrelem siru ni bilo več zaznati. Naši rezultati pa so ravno nasprotni, saj v surovem mleku *Lb. brevis* nismo potrdili, potrdili pa smo jo v 30 dni zorenem siru višinske paše V4 in 60 dni zorenem siru višinske paše V2.

Po identifikaciji seva K3/1, ki je predstavnik PhP skupine 18, nam je API 50 CH test s 96,2 % verjetnostjo podal, da gre za vrsto *Leuconostoc lactis*, ki je v našem primeru predstavljala 1,8 % celotne populacije laktobacilov. Pod mikroskopom so leukonostoki sferične oblike, podaljšani koki oz. kratke paličice, ki tvorijo pare ali verižice. Prav zaradi tega jih je lahko zamenjati z laktobacili (Dellaglio in sod., 1994). Bakterije iz rodu *Leuconostoc* so se sposobne razmnoževati v temperaturnem območju od 1 °C do 30 °C, njihova optimalna temperatura pa je med 25 °C in 30 °C (Dellaglio in sod., 1994).

Vrsto *Ln. lactis* zelo pogosto najdemo v surovem mleku, kefirjevih zrnih in tradicionalnih sirih, kjer igrajo pomembno vlogo pri razvoju arome in nastajanju očes med zorenjem. Poleg tega imajo podobne prehranske zahteve kot MKB iz rodu *Lactobacillus* in *Pediococcus*, z laktobacili pa si delijo še nekaj značilnosti (Gerasi in sod., 2003; Dellaglio in sod., 1994). Morda je ravno to razlog, da je sev K3/1 kazal podobne fenotipske lastnosti kot laktobacili vse do identifikacije na nivoju vrste, ko smo ugotovili, da gre najverjetneje za leukonostok.

V siru Pecorino Sardo (Mannu in sod., 2002), ki je prav tako narejen iz surovega ovčjega mleka, je bila večina populacije termofilnih MKB (76 %) in le 24 % mezofilnih MO, kjer sta med slednjimi prevladovali vrsti *Lb. casei* in *Lb. rhamnosus*. Med laktobacili v naši raziskavi pa so prevladovale mezofilne vrste.

Da so mezofilni laktobacili med prevladujočimi bakterijami v sirih poročajo tudi Cogan in sod. (1997), ki so proučevali mikrobioto 35 različnih sirov, med katerimi je bilo tudi 24

tradicionalnih sirov iz različnih držav. Mezofilni laktobacili so bili prisotni v 19-ih od 35 sirov, od tega pa prevladujoča populacija v petih sirih.

Mikrobiota mleka in sira med zorenjem se ves čas spreminja. S preiskovanjem vzorcev smo dobili pester izbor laktobacilov, ki naseljujejo in se razmnožujejo v kraškem ovčjem siru. Naše rezultate lahko strnemo v nekaj sklepov:

- Prisotnost nestarterskih laktobacilov smo potrdili v vseh vzorcih mleka in sirov, ne glede na toplotno obdelavo mleka ali lokacijo paše. V konzumni zrelosti sirov dosežejo vrednosti tudi do 8,4 log KE/g vzorca.
- V vzorcih mleka in sirov je med laktobacili prevladujoča vrsta *Lactobacillus paracasei* s 74 % zastopanostjo, sledijo ji *Lb. plantarum* (11 %), *Lb. rhamnosus* (4,6 %), *Lb. curvatus* (4,6 %) in *Lb. brevis* (3,7 %).
- Vrsta *Lb. paracasei* je lahko potencialno zanimiv izolat za nadaljnje raziskave (starterske kulture, dodatki krmi).

6 POVZETEK

Iz dosedanje literature je znano, da so laktobacili običajno prevladujoča mikrobiota tradicionalnih ovčjih sirov. Kraški ovčji sir je po tradicionalnem postopku narejen sir iz surovega mleka, lahko pa se mleko pred izdelavo tudi termizira. V diplomski nalogi smo osamili in identificirali laktobacile iz vzorcev mleka in kraškega ovčjega sira, narejenega iz surovega ali termiziranega mleka ovc višinske ali nižinske paše. Vzorčili smo surovo mleko in sire po soljenju (čas 0) ter zorenju 14, 30, 45 in 60 dni.

Laktobacile smo iz vzorcev osamili s pomočjo gojišča Rogosa, ki je selektivno za laktobacile, ter z barvanjem po Gramu izločili Gram negativne in kokoidne bakterije. Predvidevali smo, da imamo le MKB iz rodu *Lactobacillus*, zato smo za nadaljnje analize uporabili uveljavljene metode za določanje fenotipskih lastnosti laktobacilov: test na prisotnost katalaze, ugotavljanje tvorbe plina, rast pri različnih temperaturah, fenotipizacija na nivoju vrste s sistemom API ter tipizacija izolatov na podlagi sorodnega biokemijskega prstnega odtisa s pomočjo sistema PhP mikrotitrskih plošč.

Ugotovili smo, da 74 % izolatov pripada vrsti *Lb. paracasei*, ki jo tudi literatura pogosto navaja kot prevladujočo vrsto laktobacilov v avtohtonih siri, izdelanih po tradicionalnih postopkih. Po zastopanosti sledijo vrste *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. curvatus* in *Lb. brevis*. Tako naša populacija v večini pripada II. skupini laktobacilov, to so fakultativno heterofermentativni laktobacili. So mezofilne MKB, kar potrjujejo rezultati preverjanja rasti pri različnih temperaturah. Pri 15 °C so namreč zrasli vsi reprezentativni sevi, pri 45 °C pa rasti večinoma ni bilo zaznati, z izjemo treh izolatov. Izolate, ki so pri 45 °C zrasli, bi lahko uvrstili med termofilne laktobacile, čeprav pri identifikaciji na nivoju vrste niso bili prepoznani kot termofilni laktobacili.

Vsi vzorci so bili katalaza negativni. Prav tako pri preverjanju tvorbe plina s pomočjo Durchamovih cevčic nismo beležili nastanka mehurčkov, razen pri dveh izolatih, ki sta se pri kasnejši identifikaciji izkazala za *Lb. brevis*, ki pripada III. skupini laktobacilov in velja za obligatno heterofermentativnega.

Glede na to, da *Lb. paracasei* prevladuje v mikrobni populaciji laktobacilov v kraškem ovčjem siru, bi lahko seve te vrste na podlagi nadaljnjih raziskav uporabili kot potencialne starterske kulture za izdelavo kraškega ovčjega sira.

7 VIRI

- Adamič J. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-45
- Albenzio M., Corbo M.R., Rehman S.U., Fox P.F., De Angelis M., Corsetti A., Sevi A., Gobbetti M. 2001. Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot way. *International Journal of Food Microbiology*, 67: 35-48
- Beresford T.P., Fitzsimons N.A., Brennan N.L., Cogan T.M. 2001. Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*, 11: 259-274
- Bernardeau M., Vernoux J.P., Henri-Dubernet S., Gueguen M. 2008. Safety assesment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126: 278-285
- Björkroth J., Koort J. 2011. Taxonomy and Biodiversity. V: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Vol. 3. Second edition. Relton S., Collins E., Byrne C. (ur.). Amsterdam, Elsevier Ltd.: 45-48
- Bovški sir že štirinajsti slovenski proizvod zaščiten v EU. 2012. RS, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano (21.08.2012) http://www.mkgrp.gov.si/nc/si/medijsko_sredisce/novica/article/1328/5901/ (14.04.2016)
- Briggiler-Marco M., Capra M.L., Quiberoni A., Vinderola G., Reinheimer J.A., Hynes E. 2007. Nonstarter *Lactobacillus* strains as adjunct cultures for cheese making: In vitro characterization and performance in two model cheeses. *Journal of Dairy Science*, 90: 4532-4542
- Carol A.R., Leon M.T.D. 2010. Horizontal gene transfer amongst probiotic lactic acid bacteria and other intestinal microbiota: what are the possibilities? A review. *Archives of Microbiology* 193, 3: 157-168

- Cogan T.M., Barbarosa M., Beuvier E., Bianchi-Salvadori B., Cocconcelli P., Fernandes I., Gomez J., Gomez R., 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
- De Angelis M., Gobbetti M. 2011. *Lactobacillus* spp.: General Characteristics. V: *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Vol. 3. Second edition. Relton S., Collins E., Byrne C. (ur.). Amsterdam, Elsevier Ltd.: 78-90
- Dellaglio F., de Roissart H., Torriani S., Curk M.C., Janssens D. 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. V: *Bactéries lactiques*. De Roissart H., Luquet F.M. (ur.). Uriage, Loriga: 25-116
- Geografsko poreklo. Označbe geografskega porekla. *Gospodarska zbornica Slovenije, Zbornica kmetijskih in živilskih podjetij*.
<https://www.gzs.si/Default.aspx?tabid=44614> (02.02.2016)
- Gerasi E., Litopoulou-Tzanetaki E., Tzanetakis N. 2003. Microbiological study of Manura, a hard cheese made from raw ovine milk in the Greek island Sifnos. *International Journal of Dairy Technology*, 56: 117-122
- Gerželj E., Renčelj S., Perko B. 2000. *Elaborat o označbi porekla blaga kraški ovčji sir. Senožeče*, Društvo rejcev drobnice s Krasa: 11 str.
- Grčar U. 2011. *Telesne mere in značilnosti istrske pramenke*. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 50 str.
- Havranek J., Perko B., Trmčić A., Čanžek Majhenič A., Rogelj I., Antunac N. (ur.), Mikulec N. (ur.). 2012. *Atlas ovčjih sirov držav zahodnega Balkana*. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet: 38 str.
- Katana V. 2001. *Proučevanje mikrobne populacije avtohtonega kraškega ovčjega sira*. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 63 str.

Khalid K. 2011. An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences*, 1: 1-13

Kompan D., Erjavec E., Kastelic D., Kavčič S., Kermauner A., Rogelj I., Vidrih T. 1996. Reja Drobnice. Ljubljana, Kmečki glas: 309 str.

List of prokaryotic names with standing in nomenclature. Genus *Lactobacillus*.

<http://www.bacterio.net/lactobacillus.html#r> (14.04.2016)

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., Riu G., Comunian R., Fozzi M.C., Scintu M.F. 2002. A preliminary study of lactic acid bacteria in whey starter culture and industrial Pecorino Sardo ewes' milk cheese: PCR-identification and evolution during ripening. *International Dairy Journal*, 12: 17-26

Marino M., Maifreni M., Rondinini M. 2003. Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 229: 133-140

Mohar Lorbeg P., ČanžekMajhenič A., Rogelj I. 2009. Evaluation of different primers for PCR-DGGE analysis of cheese-associated enterococci. *Journal of Dairy Research*, 76: 265-271

Ottaviani F. 1991. L'analisi microbiologica dei prodotti lattiero-caseari. Milano, Tecniche Nuove: 457 str.

Paveljšek D. 2012. Identifikacija in primerjava vrst mlečnokislinskih bakterij v tradicionalnih ovčjih siri s področja zahodnega Balkana. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 76 str.

Perko B. 2003. Slovenski avtohtoni siri – siri z geografskim poreklom: zgodovina, področje, tehnološki postopki. Delavnica za kmetijske svetovalce, Rodica, 18.-19. November 2003. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 53 str.

Program razvoja podeželja Republike Slovenije za obdobje 2007-2013. Priloga 8: Opis avtohtonih in tradicionalnih pasem domačih živali. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano: 25 str.

Raspor P. 2003. Starterske kulture. V: Mikrobiologija živil živalskega izvora. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 171-206

Register pasem z zootehniško oceno. 2015. Genska banka v živinoreji. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko.
<http://www.genska-banka.si/pasme/register-pasem-z-zootehnisko-oceno/> (19.02.2016)

Reja drobnice. Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije.
<http://www.kgzs.si/gv/kmetijstvo/zivinoreja/reja-drobnice.aspx> (19.02.2016)

Renčelj S., Perko B. 2007. Kraški ovčji sir. Specifikacija o priznanju označbe porekla. Sežana, Društvo rejcev drobnice Krasa in Istre: 48 str.

Renes E., Diezhandino I., Fernandez D., Ferrazza R.E., Tornadijo M.E., Fresno J.M. 2014. Effect of autochthonous starter cultures on the biogenic amine content of ewe's milk cheese throughout ripening. *Food Microbiology*, 44: 271-277

Rogelj I. 2005. Poročilo o raziskavah mikrobioloških značilnostih kraškega ovčjega sira. Rodica, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 11 str.

Serhan M., Cailliez-Grimal C., Borges F., Revol-Junelles A.M., Hosri C., Fanni J. 2009. Bacterial diversity of Darfiyeh, a Lebanese artisanal raw goat's milk cheese. *Food Microbiology*, 26: 645-652

Simon L. 2014. Analiza mikrobiote zbirnega jezera vod iz naprave za odstranjevanje tekočih odpadkov iz proizvodnje TiO₂. Diplomsko delo. Maribor, Univerza v Mariboru, Fakulteta za naravoslovje in matematiko, Oddelek za biologijo: 48 str.

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

Statistični urad Republike Slovenije (SURS). Število ovc v Sloveniji po letih.

http://pxweb.stat.si/pxweb/dialog/varval.asp?ma=1517404S&ti=&path=%2E%2E%2FDatabase%2FOkolje%2F15_kmetijstvo_ribistvo%2F05_zivinoreja%2F01_15174_stevil_o_zivine%2F&xu=&yp=&lang=2 (19.02.2016)

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

PRILOGE

PRILOGA A: Opisni rezultati mikroskopiranja

Vzorec	Opis
M1/1	G+, koki
M1/4	G+, koki
M1/5	G+, koki
M2/1	G+, kratke in dolge palčke, posamezne
M2/2	G+, zelo kratke palčke, v verižicah
M2/3	G+, zelo kratke palčke, v verižicah
M2/4	G+, zelo kratke palčke, v verižicah in posamezno
M3/1	G+, zelo kratke in vmes dolge palčke
M3/2	G+, kratke in dolge palčke / dolge so modre, kratke pa bolj rdečkaste
M3/4	G+, kratke in dolge palčke
M3/5	G+, zelo kratke palčke
M4/1	G+, kratke palčke, posamične
M4/2	G+, kratke palčke, posamične
M4/3	G+, kratke palčke, v verižicah / odsevajo zelo na rdeče
M4/4	G+, kratke palčke, v verižicah
M4/5	G+, dolge palčke
M7/1	G+, palčke
M7/3	G+, koki
M7/4	G+, diplokoki
M9/1	G+, palčke, v verižicah
M9/2	G+, zelo drobne palčke, v verižicah in posamezno
M9/3	G+, kratke in dolge palčke
M9/4	G+, kratke in dolge palčke
M9/5	G+, kratke in dolge palčke
M10/3	G+, dolge palčke, v verižicah
M10/4	G+, palčke, v verižicah
M10/5	G+, drobne, kratke palčke, v krajših verižicah
M11/1	G+, palčke, v verižicah; nekatere neobarvane
M11/2	mesnati, debeli koki
M11/3	mesnati, debeli koki
M13/1	G+, drobne palčke, v verižicah
M13/2	G+, drobne palčke, v verižicah, tudi kakšna dolga palčka
M13/3	G+, kratke palčke, posamične
M13/4	G+, kratke palčke, posamične in v parih
M13/5	G+, kratke palčke, posamične
M15/1	G+, tanke, kratke in dolge palčke, posamezne
M15/2	G+, tanke, kratke palčke, posamezne
M15/3	G+, kratke, skodrane palčke, v verižicah
M15/4	G+, palčke vseh dolžin, posamezne

PRILOGA A: nadaljevanje

M15/5	G+, zelo kratke, skodrane, drobne palčke, v verižicah, rahlo rdečkaste
K1/1	G+, kratke palčke, v verižicah
K1/2	G+, kratke palčke, v verižicah
K1/3	G+, kratke palčke, v verižicah
K1/4	G+, kratke palčke, posamične
K1/5	G+, daljše palčke, v verižicah
K2/1	G+, kratke palčke, v verižicah
K2/2	G+, kratke palčke, v verižicah
K2/3	G+, kratke palčke, v verižicah
K2/4	G+, kratke palčke, v verižicah
K2/5	G+, kratke palčke, v verižicah
K3/1	G+, kratke palčke, posamične
K3/2	G+, kratke palčke, posamične
K3/3	G+, kratke palčke, v verižicah
K3/4	G+, kratke palčke, v verižicah
K3/5	G+, kratke palčke, v verižicah
K4/1	G+, kratke palčke, povezane po 2 ali 3 skupaj
K4/2	G+, kratke palčke, povezane po 2 ali 3 skupaj
K4/3	G+, zelo kratke palčke
K4/4	G+, kratke palčke, v verižicah
K4/5	G+, zelo kratke palčke, povezane po 2 ali 3 skupaj
K5/1	G+, zelo dolge palčke, povezane po 2 ali 3 skupaj
K5/2	G+, zelo dolge in tudi kratke palčke
K5/3	G+, kratke palčke
K5/4	G+, kratke in izjemno dolge palčke
K5/5	G+, kratke in izjemno dolge palčke
K6/1	G+, zelo kratke palčke
K6/2	G+, zelo kratke palčke, povezane v zelo dolge verige
K6/3	G+, zelo kratke palčke, povezane po 2 ali 3 skupaj
K6/4	G+, kratke palčke, v verižicah
K6/5	G+, kratke palčke, v verižicah
K9/2	G+, nafrkljane palčke, povezane in posamezne
K9/3	G+, nafrkljane palčke, povezane in posamezne
K9/4	G+, palčke in koki – ponovno na prečiščevanje
K9/5	G+, zelo kratke palčke, malce čudne (kot da so podobne kokom, pa vendar niso)
K12/2	G+, lepe, drobne palčke
K12/3	G+, palčke, vmes tudi koki
K12/3	G+, drobne palčke / ponovno mikroskopiranje
K12/4	G+, palčke
K12/5	G+, drobne palčke
K15/1	G+, drobne palčke, posamično
K15/2	G+, drobne palčke, posamično
K15/3	G+, drobne palčke, posamično
K15/4	G+, kratke palčke, vmes tudi nekaj daljših
K15/5	G+, drobne palčke, posamično

PRILOGA A: nadaljevanje

K18/1	G+, kratke palčke, posamezno in v verižicah
K18/3	G+, kratke palčke, posamezno in v verižicah
K19/1	G+, dolge palčke, v verižicah
K19/2	G+, dolge palčke, v verižicah
K19/3	G+, dolge palčke, v zelo dolgih verigah
K19/4	G+, kratke palčke
K19/5	G+, dolge palčke, v verižicah
K20/1	G+, zelo kratke palčke, za kakšno se zdi, da so okrogle (koki)
K20/2	G+, kratke palčke
K20/3	G+, palčke, v dolgih verigah
K20/4	G+, palčke
K20/5	G+, drobne palčke
K24/1	G+, dolge palčke, v verižicah
K24/2	G+, dolge palčke, v verižicah
K24/3	G+, palčke, v verižicah
K24/4	G+, dolge palčke, v verižicah
K24/5	G+, kratke in dolge palčke, posamično in v verižicah
K25/1	G+, kratke in dolge palčke, posamezne
K25/2	G+, zelo kratke palčke, povezane v verižice
K26/1	G+, kratke palčke, posamezne
K26/2	G+, kratke palčke, v verižicah
K26/3	G+, palčke vseh dolžin, tanke, posamezne
K26/4	G+, kratke, drobne palčke, v verižicah in posamezno, rdečkaste
K26/5	G+, kratke, drobne palčke, v verižicah, rdečkaste
K27/1	G+, ekstremno dolge, tanke palčke
K27/2	G+, tanke palčke različnih dolžin, posamezne
K27/3	G+, tanke palčke različnih dolžin, posamezne
K27/4	G+, kratke in dolge palčke, v verižicah, rahlo rdeče
K27/5	G+, kratke in zelo dolge, povezane
K29/1	G+, drobne, kodraste palčke, v verižicah, rahlo rdeče
K29/2	G+, kratke, debele (tolste), kodraste palčke, v verižicah
K29/3	G+, kratke, tanke palčke, v verižicah, rahlo rdeče
K29/4	G+, kratke, tanke, drobne palčke (komaj vidne), posamezne, rahlo rdeče
K29/5	G+, kratke, tanke palčke, v verižicah, rahlo rdeče
K30/1	G+, kratke, debele (tolste), posamezne in v verižicah
K30/2	G+, kratke, tanke palčke, v verižicah in posamezno, rahlo rdeče
K30/3	G+, kratke, debele (tolste), posamezne in v verižicah
K30/4	G+, kratke, debele (tolste), posamezne in v verižicah
K30/5	G+, zelo kratke palčke, posamezne
K31/1	G+, tanke palčke, posamezne
K31/2	G+, tanke palčke, posamezne in v verižicah
K31/3	G+, kratke, debele (tolste) palčke, v verižicah
K31/4	G+, kratke, debele (tolste) palčke, v verižicah
K31/5	G+, palčke, posamezne
K32/1	G+, zelo dolge palčke, posamezne, rahlo rdeče

PRILOGA A: nadaljevanje

K32/2	G+, palčke različnih dolžin, posamezne, rahlo rdeče
K32/3	G+, palčke, posamezne
K32/4	G+, palčke, posamezne, rahlo rdeče
K32/5	G+, palčke, posamezne, rahlo rdeče
K35/1	G+, kratke, nakodrane palčke, v verižicah
K35/2	G+, zelo kratke palčke, v verižicah
K35/3	G+, zelo kratke palčke, v verižicah
K35/4	G+, zelo kratke palčke, v verižicah
K35/5	G+, zelo kratke palčke, v verižicah
K36/1	G+, kratke, mesnate palčke
K36/2	G+, kratke, mesnate palčke
K36/3	G+, kratke, mesnate palčke
K36/4	G+, zelo kratke, mesnate palčke
K36/5	G+, zelo kratke, mesnate palčke
K37/1	G+, kratke palčke, v verižicah
K37/2	G+, kratke palčke, v verižicah
K37/3	G+, kratke palčke, posamezne in v verižicah
K37/4	G+, kratke palčke, posamezne in v verižicah
K37/5	G+, kratke, mesnate palčke
K38/1	G+, dolge palčke, v verižicah
K38/2	G+, tanke palčke, posamezne
K38/3	G+, palčke, posamezne
K38/4	G+, kratke, nakodrane palčke, v verižicah in posamezno
K38/5	G+, palčke, vse posamezne