

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Uroš ŽGUR

**PRESKUS UČINKOVITOSTI NOVE STARTERSKE
KULTURE ZA TRADICIONALNI SIR TOLMINC**

DIPLOMSKO DELO

Visokošolski strokovni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Uroš ŽGUR

**PRESKUS UČINKOVITOSTI NOVE STARTERSKE KULTURE ZA
TRADICIONALNI SIR TOLMINC**

DIPLOMSKO DELO
Visokošolski strokovni študij

**EFFICIENCY TESTING OF NEW TAILOR-MADE STARTER
CULTURE USED FOR PRODUCTION OF TRADITIONAL CHEESE
TOLMINC**

GRADUATION THESIS
Higher professional studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je zaključek Visokošolskega strokovnega študija kmetijstvo - zootehnika. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za mlekarstvo in na Katedri za mlekarstvo, Oddelka za zootehniko, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Andrejo Čanžek Majhenič in za somentorja dr. Aljošo Trmčiča.

Recenzent: prof. dr. Bogdan PERKO.

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: dr. Aljoša TRMČIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Uroš ŽGUR

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Vs
DK	UDK 637.3(043.2)=163.6
KG	mlečni izdelki/siri/tradicionalni slovenski siri/tehnologija/starterske kulture
KK	AGRIS Q01/9430
AV	ŽGUR, Uroš
SA	ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (mentorica)/TRMČIĆ, Aljoša (somentor)
KZ	SI - 1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2012
IN	PRESKUS UČINKOVITOSTI NOVE STARTERSKE KULTURE ZA TRADICIONALNI SIR TOLMINC
TD	Diplomsko delo (visokošolski strokovni študij)
OP	X, 45 str., 6 pregl., 11 slik, 2 pril., 57 vir.
IJ	sl
XJI	sl/en
AI	Namen naloge je bil preskusiti učinkovitost in uporabnost treh starterskih kultur v tehnološkem postopku izdelave sira na pilotnem nivoju. Izdelali smo dve seriji sirov po tradicionalnem postopku izdelave sira tolminc. Starterske kulture so bile sestavljene iz sevov, ki so bili osamljeni iz avtohtonih slovenskih sirov tolminc in bovški ovčji sir. Sevi so bili izbrani in sestavljeni v startersko kulturo na osnovi njihovih tehnoloških in protimikrobnih lastnosti. Izbrani sevi so bili predhodno identificirani kot <i>Enterococcus faecium</i> (BM3/2 in BM4/1), <i>Enterococcus faecalis</i> (T2 in Č25) ter <i>Lactobacillus plantarum</i> (T2-R/14 in 35). Poleg testnih sirov smo izdelali tudi dva kontrolna sira brez starterske kulture in en sir s komercialno startersko kulturo <i>Streptococcus thermophilus</i> TH4. Med postopkom sirjenja smo testne sire vzorčili in določili prisotno mikrobo združbo v njih. Vzporedno s postopkom mikrobiološke analize smo iz testnih sirov osamili tudi celokupno DNA, v kateri smo s pomočjo verižne reakcije s polimerazo in specifičnih začetnih oligonukleotidov iskali prisotnost specifičnih zaporedij za vrste in nekatere bakteriocine testiranih sevov. Celoten poskus je trajal 60 dni, dokler siri niso dosegli minimalne zrelosti, ko smo jih tudi senzorično ocenili. Sevi, ki smo jih uporabili v starterskih kulturah so pokazali zaviralni vpliv na populacijo skupnih stafilokokov. Seva <i>Enterococcus faecium</i> BM3/2 in BM4/1, ki nosita genske determinante za enterocina A in P sta se izkazala za dovolj kompetitivna, da se znotraj mikrobne združbe ohranita do konca zorenja. Kljub temu, da so se testirani sevi izkazali za uporabne kot zaščitne starterske kulture pa zaradi svojih tehnoloških lastnosti niso primerni za uporabo kot starterske kulture v proizvodnji tradicionalnih sirov. Zaradi močne proteolitične aktivnosti so bili končni testni siri izrazito grenki. Možna aplikacija testnih sevov bi lahko bila proizvodnja izdelkov na osnovi bioaktivnih peptidov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Vs
DC UDC 637.3(043.2)=163.6
CX dairy products/cheese/traditional Slovenian cheese/tehnology/starter culture
CC AGRIS Q01/9430
AU ŽGUR, Uroš
AA ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (supervisor)/TRMČIČ, Aljoša (co-supervisor)
PP SI - 1230 Domžale, Groblje 3
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
PY 2012
TI EFFICIENCY TESTING OF NEW TAILOR-MADE STARTER CULTURE
USED FOR PRODUCTION OF TRADITIONAL CHEESE TOLMINC
DT Graduation Thesis (Higher professional studies)
NO X, 45 p., 6 tab., 11 fig., 2 ann., 57 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The purpose of this study was to test efficiency and applicability of three starter cultures in cheese making technology on pilot scale. We made two batches of cheeses according to traditional procedure of tolminc cheese production. Starter cultures were made using strains isolated from autochthonous Slovenian tolminc and bovški ewe's cheeses. Strains were selected and combined into starter cultures based on their technological and antimicrobial activity. The selected strains were previously identified as *Enterococcus faecium* (BM3/2 and BM4/1), *Enterococcus faecalis* (T2 and Č25) and also as *Lactobacillus plantarum* (T2-R/14 and 35). Besides test cheeses we also produced control cheeses without addition of starter culture and one cheese with the addition of commercial culture *Streptococcus thermophilus* TH4. During the technological procedure we sampled the cheeses and determined the microbial population present in them. Together with microbiological analysis we also extracted the total DNA from these cheeses. Using polymerase chain reaction and specific oligonucleotide primers we searched for species and bacteriocins specific sequences of tested strains. The entire study lasted for 60 days, until cheeses reached minimal ripeness and were also sensorially evaluated. The strains used in starter culture inhibited *Staphylococcus* population. Strains *Enterococcus faecium* (BM3/2 and BM4/1), which carried genetic determinants of enterocins A and P were competitive enough to persist inside the population until the end of ripening period. Even though the tested strains showed to be useful as protective starter culture, because of their technological characteristics they were unsuitable to be used as starters cultures in production of traditional cheeses. At the end of 60-days of ripening cheeses were excessively bitter due to strong proteolytic activity of strains. A possible application of test strains would be in production of products based on bioactive peptides.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Kazalo prilog	X
Okrajšave in simboli	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN NALOGE	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 TRADICIONALNI SLOVENSKI SIRI	3
2.2 VLOGA MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ V SIRARSTVU	4
2.3 PROTIMIKROBNO DELOVANJE MKB	5
2.3.1 Organske kisline	5
2.3.2 Vodikov peroksid	5
2.3.3 Ogljikov dioksid	6
2.3.4 Diacetil	6
2.3.5 Acetaldehid	6
2.3.6 Nizko-molekularne protimikrobne snovi	6
2.3.7 Bakteriocini	7
2.4 SESTAVA ZDRUŽBE MKB V TRADICIONALNIH SLOVENSKIH SIRIH	7
2.5 STARTERSKE KULTURE	9
2.5.1 Zaščitne starterske kulture	10
2.5.2 Problem uporabe starterskih in zaščitnih kultur	11
3 MATERIALI IN METODE	12
3.1 MATERIALI	12
3.1.1 Bakterijski sevi	12

3.1.2	Gojišča	12
3.1.3	Kemikalije	12
3.1.4	Encimi	13
3.1.5	Komercialni kompleti	13
3.1.6	Ostali materiali	13
3.1.7	Začetni oligonukleotidi	14
3.1.8	Laboratorijska oprema	15
3.2	METODE	16
3.2.1	Priprava testnih sevov	16
3.2.2	Tehnološki postopek izdelave sira	16
3.2.3	Mikrobiološka analiza sirov	17
3.2.4	Molekularna analiza sirov	18
3.2.4.1	Osamitev celokupne DNA iz vzorcev sira	18
3.2.4.1.1	Homogenizacija vzorcev sira	18
3.2.4.1.2	Osamitev DNA s komercialnim kompletom (Miller in sod., 1988)	18
3.2.4.2	Osamitev DNA iz posameznih sevov	19
3.2.4.3	Iskanje genskih determinant za bakteriocine	19
3.2.4.4	Identifikacija sevov na nivoju vrste s pomočjo reakcije PCR	20
4	REZULTATI	22
4.1	SPREMLJANJE VREDNOSTI pH MED SIRJENJEM IN ZORENJEM TESTNIH SIROV	22
4.2	SPREMLJANJE POPULACIJE STAFILOKOKOV MED SIRJENJEM IN ZORENJEM PRI TESTNIH SIRIH	23
4.3	SPREMLJANJE POPULACIJE LAKTOBACILOV MED SIRJENJEM IN ZORENJEM PRI TESTNIH SIRIH	24
4.4	SPREMLJANJE POPULACIJE ENTEROKOKOV MED SIRJENJEM IN ZORENJEM PRI TESTNIH SIRIH	25
4.5	SPREMLJANJE POPULACIJE MEZOFILNIH IN TERMOFILNIH KOKOV MED SIRJENJEM IN ZORENJEM PRI TESTNIH SIRIH	26
4.6	SPREMLJANJE POPULACIJE ENTEROBAKTERIJ MED SIRJENJEM IN ZORENJEM PRI TESTNIH SIRIH	28

4.7	SPREMLJANJE POPULACIJE KVASOVK MED SIRJENJEM IN ZORENJEM PRI TESTNIH SIRIH	29
4.8	UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI GENSKIH DETERMINANT	30
4.8	SENZORIČNA OCENA TESTNIH SIROV	31
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	33
5.1	RAZPRAVA	33
5.2	SKLEPI	38
6	POVZETEK	39
7	VIRI	41
	ZAHVALA	
	PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Povprečno število posameznih skupin mikroorganizmov med izdelavo sira tolminc (Mohar Lorbeg, 2008: Priloge A1, A2 in A3)	8
Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi za ugotavljanje pripadnosti vrstam <i>Ec. faecium</i> , <i>Ec. faecalis</i> in <i>Lb. plantarum</i>	14
Preglednica 3: Začetni oligonukleotidi za določanje prisotnosti genskih determinant za bakteriocine	14
Preglednica 4: Programi PCR za določanje prisotnosti genskih determinant za bakteriocine	19
Preglednica 5: Programa PCR za določanje pripadnosti vrstam <i>Ec. faecalis</i> , <i>Ec. faecium</i> in <i>Lb. plantarum</i>	21
Preglednica 6: Senzorična ocena testnih sirov druge serije	32

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Spremljanje vrednosti pH pri testnih silih	22
Slika 2: Gibanje populacije skupnih stafilokokov med proizvodnjo testnih sirov	23
Slika 3: Gibanje populacije laktobacilov med proizvodnjo testnih sirov	24
Slika 4: Gibanje populacije enterokokov med proizvodnjo testnih sirov	25
Slika 5: Gibanje populacije mezofilnih laktokokov med proizvodnjo testnih sirov	26
Slika 6: Gibanje populacije termofilnih laktokokov med proizvodnjo testnih sirov	27
Slika 7: Gibanje populacije enterobakterij med proizvodnjo testnih sirov	28
Slika 8: Gibanje populacije kvasovk med proizvodnjo testnih sirov	29
Slika 9: Rezultati reakcije PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za vrsti <i>Ec. faecalis</i> in <i>Ec. faecium</i> ter <i>enterocine</i> A, B in P	30
Slika 10: Rezultati reakcije PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za vrsto <i>Lb. plantarum</i> ter plantaricin A	31
Slika 11: Prerez testnih sirov drugega sirjenja po 60 dneh zorenja	32

KAZALO PRILOG

Priloga A: Izmerjene vrednosti pH sirov med postopkom izdelave

Priloga B: Število mikroorganizmov v analiziranih sirih ob koncu zorenja

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Kratica - okrajšava	Pomen
BP	Baird-Parker (gojišče)
bp	bazni pari
C.	<i>Clostridium</i>
CATC	citrat azid tween carbonate (gojišče)
d	dan
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotidtrifosfat
<i>Ec.</i>	<i>Enterococcus</i>
EDTA	etilendiaminotetraocetna kislina
EMB	eozin metilen blue (gojišče)
h	ura
ke	kolonijske enote
ke/g	kolonijske enote na gram
ke/mL	kolonijske enote na mililiter
L	liter
<i>Lac.</i>	<i>Lactococcus</i>
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Leuc.</i>	<i>Leuconostoc</i>
log	desetiški logaritem
min	minuta
M17	Terzaghi bujon in agar (gojišče)
MKB	mlečnokislinske bakterije
MRS	De Man, Rogosa, Sharp (gojišče)
PCR	polymerase chain reaction (verižna reakcija s polimerazo)
RCM	reinforced clostridial medium (gojišče)
RNA	ribonukleinska kislina
RPF	rabbit plasma fibrinogen (fibrinogen iz zajčje plazme)
rpm	obratov na minuto
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
ssp.	subspecies (podvrsta)
<i>Str.</i>	<i>Streptococcus</i>
t	čas
TAE	mešanica TRIS, očetne kisline in EDTA
TRIS	tris-hidroksimetil-amino metan
TTC	tripentenil tetrazolijev klorid
UV	ultra-vijolična svetloba z valovno dolžino od 200 do 400 nm
VRB	violet red bile (gojišče)
YGC	yeast extract glucose chloramphenicol

1 UVOD

Diplomska naloga je bila opravljena na Katedri za mlekarstvo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete kot del štiriletnega evropskega projekta TrueFood (Traditional United Europe Food), ki je potekal v okviru šestega okvirnega programa. Skupni cilj projekta je bil vpeljati primerne inovacije na področju proizvodnje tradicionalnih živilskih izdelkov, ki bi zagotovile ohranitev in povečanje njihove kompetitivnosti na vse bolj globalnem evropskem tržišču. TrueFood je bil usmerjen predvsem k sodelovanju z manjšimi in srednje velikimi podjetji, ki predstavljajo večinski delež evropske živilske industrije, obenem pa običajno nimajo dostopa do kvalitetnega raziskovalno-razvojnega dela. Eden od glavnih izzivov v tradicionalni proizvodnji hrane je vpeljava inovacij, ki so v skladu s priporočili in zakoni evropske unije ter zagotavljajo varnost tradicionalnih prehranskih izdelkov, obenem pa zadostijo splošnim pričakovanjem in zahtevam potrošnikov za te proizvode. Usklajevanje obeh vidikov je včasih težavno, na primer izdelek mora biti na eni strani mikrobiološko popolnoma neoporečen, na drugi strani pa naj bi bil visoke prehranske in senzorične kakovosti, s čim manj procesiranja in dodatkov. Slednje je še posebno zahtevno za manjša in srednje velika podjetja, ki zaradi finančnih in prostorskih omejitev ne morejo vzpostaviti učinkovitega sistema za zagotavljanje mikrobiološke in kemijske neoporečnosti živil (Truefood, 2006). Proučevana tematika raziskovalne skupine Katedre za mlekarstvo je bila, v okviru projekta, usmerjena v ugotavljanje mikrobiološke varnosti tradicionalnih slovenskih sirov. Poseben poudarek je bil namenjen ugotavljanju prisotnosti bakterije *Staphylococcus (S.) aureus* v slovenskih tradicionalnih trdih sirihi. Zato smo poskušali iz sirov osamiti take mikrobne združbe ali posamezne seve, ki bi protimikrobno delovali na to patogeno bakterijo in ki bi jih zato lahko uporabili v starterskih ali zaščitnih kulturah.

1.1 NAMEN NALOGE

V okviru projekta TrueFood so raziskovalci Katedre za mlekarstvo proučevali mikrobioto tradicionalnega slovenskega sira tolminc. Iz množice izolatov, značilnih za mikrobioto sira tolminc, so na osnovi *in-vitro* testov izbrali seve z dobrimi tehnološkimi in protimikrobnimi lastnostmi. Izbrane seve so v različnih kombinacijah sestavili v starterske kulture. Namen diplomske naloge pa je bil preskusiti učinkovitost in uporabnost treh tako pripravljenih starterskih kultur v tehnološkem postopku izdelave sira tolminc na pilotnem nivoju.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- Ker so v starterski kulturi prisotni sevi s protimikrobnim delovanjem, usmerjenim proti stafilokokom pričakujemo, da bo starterska kultura zavrla razmnoževanje stafilokokov.
- Ker tvorijo nekateri sevi starterske kulture bakteriocine predvidevamo, da bodo dovolj kompetitivni, da se bodo ohranili med zorenjem sirov in jih bo mogoče potrditi tudi v vzorcih zrelega sira.

2 PREGLED OBJAV

2.1 TRADICIONALNI SLOVENSKI SIRI

Slovensko sirarstvo ima dolgo tradicijo in sega v čas pred 12. stoletjem, ko so nastali prvi zapisi o tej dejavnosti na Slovenskem. Današnji siri so nasledniki razvoja planinskega sirarstva, zlasti v drugi polovici 19. stoletja, ko so hoteli izdelovanje starih domačih sirov nadgraditi z novimi tehnologijami (Renčelj in sod., 1995).

Ker novejšje tehnologije še danes usmerjajo in vplivajo na razvoj sirarstva in tradicionalnih postopkov, se evropska in z njo slovenska politika vse bolj zavzemata za ohranjanje kulturne dediščine in nacionalne identitete. Ta politika vključuje tudi ohranjanje tradicionalnih živilskih izdelkov v dobi, ki je zaznamovana z masovno proizvodnjo industrijsko pripravljene hrane. Obenem želijo s to politiko doseči red v proizvodnji in distribuciji teh izdelkov, kar se predvsem nanaša na njihovo varnost za potrošnika. Velik korak v doseganju teh ciljev je uvedba pravilnikov za pridobitev označbe o geografskem poreklu in njeni zaščiti. Pridobitev takšne označbe za prehranski izdelek zahteva dobro opredelitev njegovih lastnosti, ki morajo biti objektivno in tesno povezane z geografskim poreklom. Do danes smo uspeli zaščititi pet tradicionalnih slovenskih sirov in sicer nanoški sir (Pravilnik o ... Nanoški sir, 2003), tolminc (Pravilnik o ... Tolminc, 2003), bovški sir (Pravilnik o ... Bovški sir, 2004), mohant (Pravilnik o ... Mohant, 2004) in kraški ovčji sir (Grašek, 2007).

Sir tolminc se izdeluje na širšem območju Zgornjega Posočja, ki predstavlja križišče vplivov mediteranske in alpske klime. Te naravne danosti se preko krme prenašajo v mleko, od tu pa z blagimi tehnološkimi prijemi do končnega izdelka. Mleko za izdelavo tolminca prihaja predvsem od sivo-rjave pasme krav, ki jih na tem področju redijo v največjem številu. Kmetje se praviloma poslužujejo pašno-kosnega sistema prehrane živali, pogosto pa tudi planinske paše. Sir tolminc se v poletni pašni sezoni izdeluje v trinajstih aktivnih planinskih sirarnah, poleg tega pa ga izdelujejo še v nekaterih vaških sirarnah in na kmetijah, kjer sirarstvo poteka kot dopolnilna dejavnost. Tolminc ima zelo dolgo in bogato tradicijo, ki je sledila razvoju sirarstva na tem področju in drugod. Danes opisujemo sir tolminc kot trdi mastni sir z minimalno 60 % suhe snovi, minimalno 45 % maščobe v suhi snovi in 1,5 do 2,5 % soli. Sir ima obliko hlebca s premerom 23 do 27 cm in višino od 8 do 9 cm, njegova teža pa se giblje med 3,5 in 5 kg. Tehnološki postopek izdelave sira tolminc pričnemo s temperiranjem surovega kravjege mleka, ki mu je lahko dodano predzorzjeno mleko (mleko prejšnje molže), na temperaturo 32 do 34 °C ter usirjanjem z dodatkom sirišča, ki vsebuje encima himozin in pepsin. Po 25 do 35 minutah usirjenja se koagulum reže, dogreva in suši pri 44 do 48 °C dokler ni dosežena primerna

klenost sirnega zrna. Sirno zrno se prenese v oblikovala in stiska od 6 do 12 ur v primerno ogrevanem prostoru. Oblikovani siri se solijo v 20 % slanici 24 do 48 ur in nato zorijo najmanj 60 dni, lahko pa se zorenje podaljša do enega leta. Pri izdelavi sira se lahko uporablja doma pripravljena starterska kultura, izdelana iz dela mleka prejšnje molže, ki se ga segreje na 65 °C in nato temperira 12 ur na 40 do 45 °C. Lahko pa se uporablja tudi selekcionirana starterska kultura, primerna za izdelavo trdega sira (Perko in Koren, 2003; Renčelj in sod., 1995). Komercialna starterska kultura, ki jo po potrebi uporabljajo člani sirarskega društva tolminc, je monokultura vrste *Streptococcus (Str.) thermophilus* (Koren, 2007).

2.2 VLOGA MLEČNOKISLINSKIH BAKTERIJ V SIRARSTVU

Izdelava sira vključuje dve fazi – pri prvi želimo dobiti želeno sestavo in vrednost pH, pri drugi pa želimo doseči zelene fizikalne in aromatske lastnosti. Prva faza je pogojena s sestavo mleka in intenzivnostjo proizvodnje kisline med izdelavo sira. Druga faza oziroma zorenje je vsekakor pogojena s prvo fazo, vendar jo vodi metabolizem številnih mikroorganizmov, encimske in ostale kemijske reakcije. Zorenje poteka z aktivnostjo mikroorganizmov in encimov, ki izhajajo tako iz starterske kot naravno prisotne mikrobne združbe (Johnson, 1998).

Vpliv, ki ga ima mikrobna združba med obema fazama izdelave sira, izhaja predvsem iz združbe mlečnokislinskih bakterij (MKB) in ga lahko razdelimo na štiri procese: tvorba kislin, tvorba ostalih snovi, proteoliza in lipoliza. Predvsem tvorba mlečne kisline iz laktoze zelo močno vpliva na teksturo in aromo izdelka. Na aromo prav tako vplivajo številne ostale snovi, ki se tvorijo pri fermentaciji laktoze in citratov, kot so diacetil, acetaldehid in tudi etanol. Vpliv teh snovi na aromo zorenih sirov je majhen oziroma je njihova pretirana izraženost nezaželena. Namesto tega so ostale snovi, predvsem številni razgradni produkti proteolize in lipolize tiste, ki oblikujejo pravo aromo in tudi teksturo zorenih sirov. Pri teksturi sira je potrebno omeniti tudi tvorbo očes, ki nastanejo kot posledica sproščenega ogljikovega dioksida pri različnih fermentacijah, kar pa je posredno prav tako povezano z aromo sira. Poleg tega, da s svojo aktivnostjo močno določajo aromo in teksturo sira, MKB vplivajo tudi na prebavljivost in prehransko vrednost sira z razgradnjo laktoze, porabo enih in tvorbo drugih vitaminov. Ker sestava združbe MKB torej močno vpliva na potek izdelave sira, mnogo sirarjev uporablja starterske kulture, s katerimi lahko vplivajo na zgoraj omenjene procese oziroma s katerimi lažje pridejo do zelenih lastnosti v končnem izdelku (Walstra in sod., 1999). Poleg neposrednega vpliva združb MKB na sam tehnološki postopek izdelave sira ter njihovega vse večjega pomena pri oblikovanju in načrtovanju starterskih kultur, so združbe MKB vedno bolj pomembne tudi z vidika trajnosti in varnosti izdelka.

2.3 PROTIMIKROBNO DELOVANJE MKB

Nekoč je fermentacija pomenila predvsem dober način konzerviranja hrane, medtem ko danes pomeni predvsem pridobivanje izdelka z želenimi senzoričnimi in ostalimi lastnostmi. Kljub uporabi novejših metod konzerviranja so pogoji, ki jih ustvari fermentacija, v živilu glavni pri zagotavljanju obstojnosti in varnosti izdelka (Caplice in Fitzgerald, 1999).

Fermentacija zniža količino dostopnih ogljikovih hidratov, ob tem pa nastanejo številni produkti tako primarnega kot sekundarnega metabolizma, ki imajo protimikrobni učinek. Skupni učinek je odvisen od lastnosti posameznih snovi in njihovih medsebojnih interakcij (De Vuyst in Vandamme, 1994).

2.3.1 Organske kisline

Homofermentativne MKB tvorijo pri fermentaciji mlečno kislino, heterofermentativne pa poleg te še očetno kislino in/ali etanol ter ogljikov dioksid. Pri tvorbi kislin pride do znižanja vrednosti pH, kar je glavni dejavnik, ki ga uporabljamo pri konzerviranju živil. Zaviralni učinek kislin izhaja iz interakcij s celično membrano, kar poruši protonski gradient in prepreči potek aktivnega transporta. Vpliv imajo tako disociirane kot ne-disociirane oblike kislin, čeprav je znano, da le ne-disociirana oblika lahko prehaja celično membrano. Očetna kislina ima večji zaviralni učinek kot mlečna kislina, vendar je potrebno poudariti, da je učinek odvisen od številnih faktorjev, kot so vodna aktivnost, prisotnost soli, redoks potencial in ostalo (Ouweland in Vesterlund, 2004; De Vuyst in Vandamme, 1994; Caplice in Fitzgerald, 1999).

2.3.2 Vodikov peroksid

Nekatere MKB so ob prisotnosti kisika sposobne tvoriti vodikov peroksid (H_2O_2), ki se, zaradi manj izraženih mehanizmov odstranjevanja le-tega, kopiči. Baktericidni učinek vodikovega peroksida pripisujejo njegovi močni oksidacijski sposobnosti, in sicer oksidaciji membranskih lipidov in sulfhidilnih skupin celičnih proteinov. Prav tako sama tvorba vodikovega peroksida zahteva porabo kisika, kar lahko privede do anaerobnih pogojev, ki so neprimerni za rast nekaterih mikroorganizmov. Sam vpliv vodikovega peroksida se lahko poveča preko tako imenovanega laktoperoksidaznega sistema. Hipotiocianat, ki pri tem nastaja, deluje predvsem tako, da zavira glikolizo preko transportnih proteinov in encimov glikolize. Protimikrobna aktivnost vodikovega peroksida proti po gramu pozitivnim bakterijam, vključno z MKB je običajno

bakteriostatična, medtem ko je proti številnim po gramu negativnim bakterijam vpliv baktericiden (Ouwehand in Vesterlund, 2004).

2.3.3 Ogljikov dioksid

Ogljikov dioksid večinoma tvorijo heterofermentativne MKB. Protimikrobni učinek ogljikovega dioksida je na eni strani takšen, da njegovo kopičenje povzroči anaerobne pogoje, na drugi strani pa je sam po sebi zaviralen, vendar je mehanizem tega še neznan (Ouwehand in Vesterlund, 2004).

Predpostavlja se, da so zavrte encimske dekarboksilacije (Lindgren in Dobrogosz (1990) cit. po Ouwehand in Vesterlund, 2004) in da kopičenje ogljikovega dioksida v lipidnem dvosloju povzroči spremembo prepustnosti membrane (King in Nagel (1975) cit. po Ouwehand in Vesterlund, 2004).

2.3.4 Diacetil

Diacetil tvorijo številne MKB, vendar je najbolj značilen za vrste iz rodov *Lactobacillus* (*Lb.*), *Leuconostoc* (*Leuc.*) in *Streptococcus* (*Str.*). Sinteza poteka iz citrata preko piruvata in je ob prisotnosti heksoz inhibirana. Diacetil naj bi deloval tako, da reagira z vezavnim proteinom za arginin in s tem prepreči njegovo izkoriščanje. Sama aktivnost je večja pri nižjih vrednostih pH, vendar je v živilih redko prisoten v zadostni količi za zaviralni učinek (Ouwehand in Vesterlund, 2004; Caplice in Fitzgerald, 1999).

2.3.5 Acetaldehid

Acetaldehid nastaja pri metabolizmu ogljikovih hidratov heterofermentativnih MKB. Dokazano zavira tako po gramu pozitivne kot po gramu negativne bakterije, vendar pri koncentracijah, ki močno presegajo mejo senzorične sprejemljivosti (De Vust in Vandamme, 1994; Caplice in Fitzgerald, 1999).

2.3.6 Nizko-molekularne protimikrobne snovi

Obstaja več objav o nizko-molekularnih protimikrobnih snoveh, ki jih tvorijo MKB. Imajo več skupnih lastnosti, kot so aktivnost pri nizki vrednosti pH, termostabilnost, širok spekter aktivnosti in topnost v acetonu. Podrobnih informacij primanjkuje, nekateri avtorji celo niso mogli potrditi njihove aktivnosti. Najbolj znana in opisana sta reuterin in reuterociklin. Proizvaja ju *Lb. reuteri*, ki naseljuje človeški in živalski prebavni sistem. Reuterin deluje tako, da inhibira ribonukleotid reduktazo, medtem ko reuterociklin deluje

kot ionofor in vpliva na protonski potencial membrane. Poznana in opisana je še ena nizko-molekularna protimikrobna snov in sicer piroglutaminska kislina, ki jo tvorijo sevi *Lb. casei* subspecies (ssp.) *casei*, *Lb. casei* ssp. *pseudoplantarum* in *Str. bovis*. Mehanizem protimikrobnega delovanja piroglutaminske kisline naj bi bil podoben mehanizmu delovanja organskih kislin (Ouweland in Vesterlund, 2004; Caplice in Fitzgerald, 1999).

2.3.7 Bakteriocini

Pod izrazom 'bakteriocini' se skriva velika in raznolika skupina protimikrobnih proteinov oziroma peptidov, ki jih najdemo tako pri po gramu pozitivnih kot pri po gramu negativnih bakterijah. Raziskave na tem področju še intenzivno potekajo, posebno pozornost pa je posvečena bakteriocinom MKB, ki so izjemno zanimivi zaradi njihove uporabnosti kot bio-konzervansi, saj pogosto, poleg večine bakterijskih vrst, zavirajo tudi kvasovke in plesni (Pelaez in Requena, 2005; Okkers in sod., 1999).

2.4 SESTAVA ZDRUŽBE MKB V TRADICIONALNIH SLOVENSКИH SIRIH

Izdelava sira vključuje številne biokemijske, fizikalne in mikrobiološke spremembe, ki potekajo v mleku, preko osnovne fermentacije in zorenja, do končnega izdelka, zrelega sira. V sirih, izdelanih po tradicionalnem postopku iz surovega mleka, so spremembe zaradi mikrobne pestrosti še kompleksnejše. Surovo mleko in sirarska oprema v veliki meri določata osnovno mikrobno združbo, medtem ko tradicionalni sirarski postopek vpliva na njen razvoj. Zaradi številnih pogojev, od katerih je potek nastajanja sira odvisen, so mikrobna združba sira in posledično njegove lastnosti lahko zelo različne (Beresford in Williams, 2004; Beuvier in Buchin, 2004). V Preglednici 1 je prikazan razvoj združbe MKB med izdelavo tradicionalnega slovenskega sira tolminc. Surovo mleko, ki se uporablja za izdelavo tradicionalnih sirov naseljuje predvsem mezofilna mikrobna združba, znotraj katere sta najbolj zastopana rodova *Lactococcus* (*Lac.*) in *Enterococcus* (*Ec.*). Rod *Enterococcus* je prav tako dobro zastopan znotraj termofilne mikrobne združbe, medtem ko so termofilni laktobacili, tako kot skupni laktobacili zelo slabo zastopani v surovem mleku. Med termofilne laktobacile spadajo predvsem striktni homofermentativni laktobacili, katerih predstavniki so *Lb. delbrueckii*, *Lb. acidophilus* in *Lb. helveticus* (Mangia in sod., 2008). Tehnologija tradicionalnih slovenskih trdih in poltrdih sirov vzpodbuja razvoj termofilne mikrobne združbe, saj ta vključuje dogrevanje sirnega zrna tudi do 48 °C in ponekod uporabo naravne starterske kulture, ki se jo pripravi s temperiranjem dela večernega mleka na 40 do 45 °C in nadaljnjim fermentiranjem preko noči. Poleg tega je dovoljena tudi uporaba komercialnih starterskih kultur, ki vsebujejo *Str. thermophilus*, tako da je ta vrsta MKB vedno prisotna, a redko dominantna v zrelih sirih. Velikost populacije rodu *Lactococcus* med zorenjem sira navadno pade, kar je še toliko

bolj poudarjeno pri višjih temperaturah, ki se uporabljajo pri izdelavi slovenskih tradicionalnih sirov. Poleg rodu *Lactococcus* je pogosto prisoten tudi rod *Leuconostoc*, ki pa je prav tako znotraj celotne mikrobne združbe zastopan v nižjih koncentracijah (Cogan in sod., 1997; Mangia in sod., 2008; Katana, 2001).

Preglednica 1: Povprečno število posameznih skupin mikroorganizmov med izdelavo sira tolminc (Mohar Lorbeg, 2008: Priloge A1, A2 in A3).

	Mleko (n=5)	Sirnina (n=8)	Sir (n=8)
enterokoki	1,04 x 10 ⁵	6,31 x 10 ⁵	6,01 x 10 ⁵
laktobacili	1,69 x 10 ³	4,93 x 10 ³	2,19 x 10 ⁷
termofilni laktokoki	2,02 x 10 ⁵	8,84 x 10 ⁷	3,44 x 10 ⁶
mezofilni laktokoki	1,94 x 10 ⁶	9,73 x 10 ⁶	2,19 x 10 ⁷
koliformne bakterije	1,36 x 10 ⁶	8,88 x 10 ⁵	6,55 x 10 ²
enterobakterije	1,20 x 10 ⁶	3,48 x 10 ⁵	1,93 x 10 ³
kvasovke in plesni	5,20 x 10 ³	8,57 x 10 ⁷	5,01 x 10 ⁶
klostridiji	< 1	< 10	< 10
skupno število	1,32 x 10 ⁷	8,33 x 10 ⁷	1,19 x 10 ⁸

Legenda: n ... število analiziranih vzorcev

V slovenskih tradicionalnih trdih in poltrdih siri predstavljata dominantno mikrobno združbo rodova *Lactobacillus* in *Enterococcus* (Katana, 2001). Rod *Lactobacillus* je pomemben del mikrobne združbe sira, katerega vrste so pogosto glavni predstavniki nestarterskih MKB. Laktobacili imajo dobre fermentativne lastnosti in so hkrati prototrofi za nekatere aminokislino, kar skupaj doprinese k počasni, a konstantni rasti laktobacilov med celotnim zorenjem sirov (Cogan in sod., 2007; Wouters in sod., 2002). Ob koncu zorenja Kraškega ovčjega sira predstavlja vrsta *Lb. paracasei* več kot polovico vseh prisotnih laktobacilov, sledijo mu vrste *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* in *Lb. curvatus* (Čanžek Majhenič in sod., 2007). Do podobnih zaključkov so prišli tudi pri proučevanju ostalih tradicionalnih sirov iz surovega mleka, kar kaže na pomembnost teh heterofermentativnih laktobacilov pri zorenju sira (Pisano in sod., 2007; Wouters in sod., 2002).

Vrste iz rodu *Enterococcus* so prav tako del nestarterske mikrobne združbe, le da ti ohranijo svojo dobro zastopanost že iz osnovne surovine. Dolga leta so enterokoke šteli za indikatorje slabe higiene, medtem ko danes ta rod štejemo za normalni del mikrobne združbe, ki lahko celo prevlada nad laktobacili v zrelem siru (Centeno in sod., 1996; Fortina in sod., 2003; Mannu in Paba, 2002). Čanžek Majhenič in sod. (2005) poročajo o velikosti populacije enterokokov v tradicionalnem slovenskem siru tolminc od 1×10^5 do $3,7 \times 10^6$ ke/g, kar je skladno z rezultati, ki jih za podobne evropske sire podajajo tudi drugi avtorji (Psoni in sod., 2003; Menendez in sod., 2001). Glavni vrsti enterokokov, ki se pojavljajta v sirih sta *Ec. faecalis* in *Ec. faecium*, medtem ko predstavnike vrste *Ec. durans* in ostalih le redko osamimo iz sira. Čeprav se na splošno enterokoki ne odrežejo najbolje kot kislinotvorci, proteoliti, lipoliti ter pri izkoriščanju citrata, vendar je pri vsem tem najuspešnejši *Ec. faecalis*, kar je najverjetneje razlog zakaj je dominanten enterokok v slovenskih in ostalih tradicionalnih sirih (Menendez in sod., 2004; Giraffa, 2003; Katana, 2001; Čanžek Majhenič in sod., 2005).

Pri mikrobni združbi sirov iz surovega mleka je potrebno poudariti, da je ta, v primerjavi z mikrobno združbo sirov iz toplotno obdelanega mleka, precej bolj pestra. Pestrost mikrobne združbe se ne kaže samo v prisotnosti različnih vrst MKB v siru, temveč tudi v paleti različnih sevov, ki se pojavljajo znotraj posameznih vrst (Beuvier in Buchin, 2004). Ista vrstna oziroma sevna pestrost se preko različnih metabolnih lastnosti prenaša tudi na senzorično pestrost končnega izdelka. Glavni vplivi na zorenje sira so za naravno prisotno mikrobno združbo MKB že poznani, vse večjo pozornost pa se posveča njihovi sposobnosti tvorbe bakteriocinov in s tem vplivu na varnost končnega izdelka (Menendez in sod., 2004).

2.5 STARTERSKE KULTURE

Starterske kulture (mikrobiološka cepiva) so pripravki tehnološko koristnih mikroorganizmov, ki se uporabljajo pri postopku proizvodnje fermentiranih izdelkov (Oberman, 1985).

Zaradi različnih razlogov, predvsem pridelave in toplotne obdelave mleka, je naravna mikrobna združba mleka lahko neučinkovita, nenadzorovana, nepredvidljiva ali celo odsotna. Starterska kultura lahko ustvari želeno lastnost izdelka v fermentaciji, ki je bolj kontrolirana in predvidljiva. Primarna naloga starterske kulture je proizvodnja mlečne kisline iz laktoze, med ostale funkcije starterskih kultur pa prištevamo še:

- proizvodnjo arome, alkohola in plina
- proteolitično in lipolitično aktivnost
- protimikrobno delovanje

Poznamo dve vrsti starterskih kultur:

- enostavna ali definirana: en sev določene vrste ali več sevov iste ali različnih vrst, katerih število in razmerje je znano
- mešana: več različnih sevov različnih vrst, katerih sestava in število niso popolnoma znani

Glede na optimalno temperaturo delovanja pa starterske kulture lahko definiramo kot mezofilne ali termofilne kulture.

Predstavniki mezofilnih starterskih kultur

- *Lac. lactis* ssp. *cremoris*
- *Lac. delbrueckii* ssp. *lactis*
- *Lac. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*
- *Leuc. mesenteroides* ssp. *cremoris*

Predstavniki termofilnih starterskih kultur

- *Str. salivarius* ssp. *thermophilus*
- *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*
- *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis*
- *Lb. casei*
- *Lb. helveticus*
- *Lb. plantarum*

(Starter cultures, 2011)

2.5.1 Zaščitne starterske kulture

Namen prvih starterskih kultur, ki so bile zasnovane za uporabo v mlekarski industriji, je bil doseči standardiziran mlečni izdelek, brez napak in potencialne nevarnosti za zdravje potrošnika. Slednje je temeljilo na izbiri sevov, ki so zagotovili hitro izpeljano fermentacijo, pri čemer pa je sama kvaliteta izdelka pogosto trpela. Pri tradicionalno izdelanih sirihi je problem ravno obraten, saj zaradi uporabe surovega mleka obstaja objektivna nevarnost razrasta patogenih bakterij kot so *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella* in *Escherichia coli*. Tako industrijsko kot tradicionalno sirarstvo iščeta rešitve v mikrobni združbi surovega mleka. Večina raziskav naravnih izolatov je osredotočenih na izboljšanje senzoričnih lastnosti sirov (Crow in sod., 2001; Mangia in sod., 2008; Pisano in sod., 2007), medtem ko je število objav, ki se ukvarjajo z izboljšanjem varnosti za potrošnika, precej manjše.

V zaščitnih kulturah najbolj pogosto uporabljajo seve *Lac. lactis* ssp. *lactis* in *Pediococcus acidilactici*, pri čemer zaščita temelji na sposobnosti tvorbe nizina ali pediocina PA-1 (Wouters in sod., 2002; Rodriguez in sod., 2000; Rilla in sod., 2004), poskusi pa so bili opravljeni tudi s sevi, ki tvorijo bakteriocina lakticin 3147 in 481 (McAuliffe in sod., 1999; Ryan in sod., 1996). Foulquie Moreno in sod. (2003) so spremljali rast dveh sevov enterokokov in aktivnost njihovih enterocinov v siru Čedar. Čeprav vrst enterocinov niso identificirali, so ugotovili, da je njihova aktivnost stabilna med celotno proizvodnjo sira in so zato bakteriocinogeni sevi primerni za uporabo v zaščitnih kulturah. V bolj definiranem poskusu so uporabili dva seva enterokokov, ki tvorita enterocin AS-48 in ugotovili, da se bakteriocin tvori pri proizvodnji sira in dokazano zavira rast *S. aureus* pri različnih stopnjah kontaminacije (Munoz in sod., 2007; Arques in sod., 2005). Podobne rezultate so v klobasah dobili Ananou in sod. (2005). Pri analizi mikrobnih združb različnih tradicionalnih sirov in njihovih bakteriocinogenih sevov so vedno bakteriocini laktokokov in enterokokov tisti, ki so najbolj zastopani (Ghraiiri in sod., 2004). Vzroka, da do sedaj še ni bilo objavljenih rezultatov poskusa, kjer bi kot zaščitne kulture uporabili naravne bakteriocinogene seve iz rodu *Lactobacillus* pa sta najverjetneje njihova počasna rast in slaba zastopanost v začetnih fazah sirjenja, ko je ključen trenutek rasti nezaželenih mikroorganizmov (Delbes in sod., 2006). Edini poskus uporabe laktobacila kot zaščitne kulture so izvedli Bogovič Matijašič in sod. (2007), ki so s pomočjo humanega izolata *Lb. gasserii* K7, ki tvori gasericina A in B, omejili pojav poznega napihovanja pri poltrdem siru. Poleg zaviralnega učinka na bakterijo *Clostridium (C.) tyrobutyricum*, ki povzroča pozno napihovanje, so zasledili tudi močan zaviralni učinek na populacijo mezofilnih laktobacilov, ki imajo velik vpliv na senzorične lastnosti končnega izdelka. S tem se je pokazala pomembnost kompatibilnosti uporabljenega zaščitnega seva s sevi starterske kulture in naravne mikrobne združbe.

2.5.2 Problem uporabe starterskih in zaščitnih kultur

Pri izdelavi tradicionalnih izdelkov je uporaba komercialnih zaščitnih ali starterskih kultur problematična z dveh vidikov. Prvi je, da se s startersko kulturo že v osnovi dodajajo sevi, ki niso avtohtoni siru, drugi pa, da lahko ti sevi s svojo bakteriocinsko aktivnostjo zavirajo tudi naravno prisotno koristno mikrobno združbo in s tem še dodatno spreminjajo mikrobiološko in posledično tudi fizikalno-kemijsko sestavo sira. Primeren pristop k reševanju problema bi bila analiza naravno prisotne mikrobne združbe posameznih tradicionalnih sirov in iskanje primernih bakteriocinogenih sevov. S takšnimi sevi bi lahko sestavili startersko kulturo, ki je pripravljena 'po meri' posameznemu tradicionalnemu siru. Uporaba takšne starterske kulture bi preprečila večino težav, ki spremljajo tradicionalno tehnologijo (surovo mleko) in obenem ohranila vse specifične lastnosti tradicionalnega sira, vključno s senzoričnimi.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Bakterijski sevi

- T2 – R/14 – *Lb. plantarum*, izoliran iz tradicionalnega sira tolminc
- Č35 – *Lb. plantarum*, izoliran iz tradicionalnega sira tolminc
- BM3/2 – *Ec. faecium*, izoliran iz mleka bovške ovce
- BM4/1 – *Ec. faecium*, izoliran iz mleka bovške ovce
- T5 – *Ec. faecalis*, izoliran iz tradicionalnega sira tolminc
- Č25 – *Ec. faecalis*, izoliran iz tradicionalnega sira tolminc
- TH4 – *Str. thermophilus* – komercialna kultura (Chr. Hansen)

3.1.2 Gojišča

Uporabili smo naslednja komercialna gojišča, ki smo jih pripravili po navodilih proizvajalca:

- BP (Bair-Parker) trdno gojišče (Biolife, 4011162)
- CATC (citrat azid tween carbonate) trdno gojišče (Merck, 1.10279)
- EMB (eozin metilen blue) trdno gojišče (Merck, 1.01347)
- M17, Terzaghi tekoče in trdno gojišče (Merck, 1.15029 in 1.15108)
- MRS (po De Man, Rogosa, Sharp) tekoče in trdno gojišče (Merck, 1.10660 in 1.10661)
- RCM (reinforced clostridial medium) trdno gojišče (Merck, 1.05411)
- ROGOSA trdno gojišče (Merck, 1.05431)
- VRB (violet red bile) trdno gojišče (Merck, 1.01406)
- YGC (yeast extract glucose chloramphenicol) trdno gojišče (Merck, 1.16000)

3.1.3 Kemikalije

- agar agar (Merck, 1.101613)
- agaroz (Sigma, A-9539)
- EDTA, etilendiaminotetraocetna kislina (Sigma, E-6635)
- etanol (Merck, 1.00971)
- fiziološka raztopina (Merck, 1.15525.0001)
- glicerol (Merck, 4049)
- propanol (Carlo Erba reagenti, 415154)

- natrijev azid (Merck, 1.06688)
- natrijev citrat dihidrat (Kemika, 1405407)
- natrijev hidroksid (Merck, 1.06498)
- ocetna kislina (Fluka, 45731)
- TRIS, trizma osnova (Sigma, T-6066)
- TTC, tripentenil tetrazolijev klorid (Merck, 1.08380)

3.1.4 Encimi

- himozin (CHY-MAXTM Powder Extra, Chr. Hansen, 107021)
- kimotripsin (Sigma, C 4192)
- lizocim (Sigma, L-7651)
- mutanolizin (Sigma, M-9901)
- proteinaza K (Sigma, P 8044)
- ribonukleaza (Sigma, R-6513)

3.1.5 Komerercialni kompleti

- Komplet za izolacijo genomske deoksiribonukleinske kisline (DNA): Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, A1120)
- MaxwellTM 16 Cell DNA Purification Kit (Promega, AS1020)
- Komplet za PCR (polymerase chain reaction) analizo: GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase (Promega, M 8301)
- GoTaq[®] DNA Polymerase (Promega, M 3171)

3.1.6 Ostali materiali

- DNA barvilo: SYBR[®] Safe DNA gel stain (Invitrogen, S33102)
- dNTP (deoksinukleotidrifosfat) 2 mM (Fermentas, R0241)
- dodatek BP gojišču: RPF (Rabbit Plasma Fibrinogen) supplement (Biolife, 423101)
- vrečke za ustvarjanje anaerobnih pogojev:
 - GENbag anaer (BioMérieux, 45534)
 - GENbox anaer (BioMérieux, 96124)
- nanašalni pufer za elektroforezo: 6 x DNA Loading dya (Fermentas, R0611)
- označevalec velikosti: 100 bp DNA ladder (Fermentas, SM243)

3.1.7 Začetni oligonukleotidi

Začetni oligonukleotidi, ki smo jih uporabljali pri verižnih reakcijah s polimerazo (PCR), so navedeni v Preglednicah 2 in 3.

Preglednica 2: Začetni oligonukleotidi za ugotavljanje pripadnosti vrstam *Ec. faecium*, *Ec. faecalis* in *Lb. plantarum*.

Ugotavljanje pripadnosti	Začetni oligonukleotidi	Zaporedje nukleotidov (5'→3')	Velikost pomnožka (bp)	Vir
vrsti <i>Ec. faecalis</i>	E1	ATC AAG TAC AGT TAG TCT T	941	(Dutka-Malen in sod., 1995)
	E2	ACG ATT CAA AGC TAA CTG		
vrsti <i>Ec. faecium</i>	F1	GCA AGG CTT CTT AGA GA	550	(Dutka-Malen in sod., 1995)
	F2	CAT CGT GTA AGC TAA CTT C		
vrsti <i>Lb. plantarum</i>	PLANT1	ATC ATG ATT TAC ATT TGA GTG	996	(Chagnaud in sod., 2001)
	LOWLAC	CGA CGA CCA TGA ACC ACC TGT		

Preglednica 3: Začetni oligonukleotidi za določanje prisotnosti genskih determinant za bakterioicine.

Genske determinante za	Začetni oligonukleotidi	Zaporedje nukleotidov (5'→3')	Velikost pomnožka (bp)	Vir
enterocin A	Ent A f	GGT ACC ACT CAT AGT GGA AA	/	(De Vuyst in sod., 2003)
	Ent A n	AAT GTA CGG TCG ATT GGG CCA		
	Ent A r	CCC TGG AAT TGC TCC ACC TAA		
enterocin B	Ent B f	CAA AAT GTA AAA GAA TTA AGT ACG	/	(De Vuyst in sod., 2003)
	Ent B n	AAC TTA TCT AAA GGT GGA GCA		
	Ent B r	AGA GTA TAC ATT TGC TAA CCC		

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

enterocin P	Ent P f Ent P r	GCT ACG CGT TCA TAT GGT AAT TCC TGC AAT ATT CTC TTT AGC	/	(De Vuyst in sod., 2003)
plantaricin A	PlnA f PlnA r	TGA AAA TTC AAA TTA AAG GTA TGA AGC TTA CCA TCC CCA TTT TTT AAA CAG TTT	145	(Maldonado in sod., 2004)

3.1.8 Laboratorijska oprema

- avtoklav: A-21 CA (Kambič)
- brezprašna komora: M12 (Iskra PIO)
- centrifugi:
 - EBA 12 (Hettich Zentrifugen)
 - mikro 22R (Hettich Zentrifugen)
- elektroforezni sistem: Sub-Cell (Bio-Rad)
- gnetilnik: BagMixer (Interscience)
- inkubatorji:
 - BT150 (Marjan Krokter)
 - BTE-S (Termo-medicinski aparati)
 - Certomat HK (Braun Biotech)
 - G25 New (Brunswick Scientific)
 - Sutjeska (Fabrika medicinskih uređaja i instrumenata, Beograd)
- mikrovalovna pečica: 32 L (Bosch)
- naprava za avtomatsko osamitev DNA: Maxwell™ 16 System (Promega)
- napravi za PCR:
 - Gene Cycler™ (Bio-Rad)
 - Mastercycler Gradient (Eppendorf)
- pH-meter: MP 120 (Mettler Toledo)
- tehtnice:
 - AT 400 (Mettler Toledo)
 - EB 300M (Tehtnica Železniki)
 - P1200 (Mettler Toledo)

- transiluminator: ChemiGenius² (Syngene)
vodni kopeli:
 - 0925095 MK (Marjan Krokter)
 - 9205 193 (Anton Kambič)
- vrtinčnik: Vibromix 10 (Tehtnica)

3.2 METODE

3.2.1 Priprava testnih sevov

Testni sevi, ki smo jih uporabili, so bili shranjeni na -20 °C. Pred uporabo smo seve namnožili v tekočem gojišču, njihovo živost pa vzdrževali s precepljanjem in inkubacijo 24 h pri 37 °C. Celice smo pripravili tako, da smo 18-urno kulturo centrifugirali (10 min, 6000 rpm (obratov na minuto), 15 °C), sprali celice s fiziološko raztopino in resuspendirali v sterilnem mleku. Tako pripravljeno kulturo smo uporabili pri izdelavi sira in sicer toliko, da smo dosegli začetno koncentracijo celic približno 10⁷ ke/mL.

3.2.2 Tehnološki postopek izdelave sira

Sire smo izdelali iz surovega mleka (farma Jable) po postopku, ki se je kar najbolj približal tehnologiji priprave tradicionalnega sira tolminc. Mleko posameznih poskusov (20 L) smo segreli na 32 °C, dodali sirišče in cepili z izbranimi sevi (1 % vcepek) in pričeli sirjenje tako, da smo najprej v 1 h in 30 min mleko in vsakemu od obravnavanj dodali sirišče (0,75g himozina / 20 L mleka). Po približno 30 min usirjanja smo koagulum počasi razrezali in pričeli z dogrevanjem. Dogrevanje je potekalo tako, da se je temperatura v 10 min dvignila na temperaturo 45 °C in pri tej temperaturi vzdrževalo 20 min. Po dogrevanju smo kleno sirno zrno prenesli v modele in stiskali pri 22 °C. Sire smo po 12 urah stiskanja, ko so dosegli pH vrednost približno 5,4, prenesli v 20 % slanico na soljenje (24 h). Tako pripravljene sire smo premazali s premazom proti izsuševanju in zorili 60 dni pri 19 °C. Med tehnološkim postopkom izdelave sira smo spremljali temperaturo, padec vrednosti pH ter sestavo mikrobne združbe. Izvedli smo dve ločeni sirjenji z različnimi kombinacijami sevov, pri čemer smo vsakič izdelali tudi sir iz surovega mleka brez dodanih pripravljenih starterskih kultur, kar je predstavljalo kontrolni sir.

Uporabili smo sledeče kombinacije sevov:

Prvo sirjenje:

- Sir 1_1: surovo mleko
Sir 1_2: surovo mleko
Ec. faecium BM3/2
Ec. faecium BM4/1
Lb. plantarum T2-R/14
Sir 1_3: surovo mleko
Str. thermophilus TH4 (Chr. Hansen)

Drugo sirjenje:

- Sir 2_1: surovo mleko
Sir 2_2: surovo mleko
Ec. faecium BM3/2
Ec. faecium BM4/1
Lb. plantarum 35
Sir 2_3: surovo mleko
Ec. faecalis T5
Ec. faecalis T25
Lb. plantarum 35

3.2.3 Mikrobiološka analiza sirov

Kvantifikacijo mikrobne sestave sirov smo ugotavljali z večkratnim vzorčenjem med potekom izdelave sira. Za odvzem vzorca smo uporabili sirarski sveder, s katerim smo zajeli vsebino sira od skorje do sredine. Sir smo po odvzemu vzorca premazali s premazom proti izsuševanju. Pri vsakem odvzemu vzorca smo izmerili vrednost pH sirov. Vzorec vsakega sira smo razdrobili, zatehtali v sterilni vrečki, dodali 9x količino raztopine Nacitrata in homogenizirali s pomočjo gnetilnika BagMixer® 400 (3 min pri 210 udarcih/min). Po homogenizaciji smo homogenat redčili z metodo po Kochu s pomočjo fiziološke raztopine. Ustrezne, 10-kratne razredčitve smo v obliki razmaza cepili na pripravljena trdna gojišča (M17, CATC, BP, VRB, EMB, YGC, RCM ter Rogosa). V primeru gojišč VRB in EMB smo ustvarili mikroaerofilne pogoje tako, da smo razmaze po sušenju prekrili z dodatnim slojem gojišča. Plošče z gojiščem M17 smo inkubirali 48 h, polovico plošč pri 30 °C in drugo polovico pri 42 °C. Plošče z gojiščem Rogosa smo inkubirali 72 h pri 37 °C v anaerobnih razmerah, plošče z gojiščema CATC in BP pa v aerobnih razmerah 24 h pri 37 °C. Plošče z gojiščema VRB in EMB smo inkubirali pri 37

°C/24 h, plošče z gojiščem YGC pa pri 25 °C/48 h. Po zaključeni inkubaciji smo kolonije na posameznih števnih ploščah prešteli s pomočjo elektronskega števca (30-300 ke).

Število mikroorganizmov smo izračunali po naslednji formuli (IDF standard 100B: 1991):

$$N = \sum c / (n_1 + 0.1 \times n_2) / d \quad \dots (1)$$

$\sum c$ – vsota vseh zraslih kolonij (30-300 ke)

n_1 – število plošč uporabljenih v prvi razredčitvi

n_2 – število plošč uporabljenih v drugi razredčitvi

d – recipročni razredčitveni faktor najnižje razredčitve

3.2.4 Molekularna analiza sirov

3.2.4.1 Osamitev celokupne DNA iz vzorcev sira

Celokupno DNA smo iz predhodno homogeniziranih vzorcev sira osamili s pomočjo komercialnega kompleta Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit.

3.2.4.1.1 Homogenizacija vzorcev sira

V gnetilniku smo 10 g sira in 90 g raztopine 2 % (w/v) natrijevega citrata (IDF 122B:1992) homogenizirali 3 minute pri 210 udarcih/min. 10 mL homogenata smo centrifugirali 10 minut pri 6000 rpm in nato s sterilnim filter papirjem odstranili na vrhu izločeno maščobo. Supernatant smo odlili, usedlino pa resuspendirali v 1 mL vode in jo uporabili za osamitev DNA po enem od nadaljnjih postopkov.

3.2.4.1.2 Osamitev DNA s komercialnim kompletom (Miller in sod., 1988)

Izolacijo smo izvedli s pomočjo komercialnega kompleta za osamitev genomske DNA (Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit, Promega). Pri postopku smo se držali originalnih navodil proizvajalca: 1 mL homogenata smo centrifugirali 3 min pri 12000 rpm. Celično usedlino smo resuspendirali v 600 μ L 50 mM EDTA, ki smo ji dodali 6 mg lizocima. Suspenzijo smo inkubirali 60 min pri 37 °C in potem centrifugirali 2 min pri 14000 rpm. Usedlino smo resuspendirali v 600 μ L raztopine za lizo jedra (angl. Nuclei Lysis Solution), inkubirali 5 min pri 80 °C in nato ohladili na sobno temperaturo. Dodali

smo 3 μL raztopine RNaze (angl. RNase Solution), nežno premešali in inkubirali 30 min pri 37 °C. Po inkubaciji smo dodali 200 μL raztopine za obarjanje beljakovin (angl. Protein Precipitation Solution) in 5 min inkubirali na ledu. Po centrifugiranju (3 min, 14000 rpm) smo supernatant odlili v 600 μL izopropanola in nežno premešali. Po centrifugiranju (2 min, 14000 rpm) smo oborjeno DNA spirali z 70 % etanolom, sušili in rehidrirali v 100 μL rehidracijske raztopine (angl. DNA Rehydration Solution).

3.2.4.2 Osamitev DNA iz posameznih sevov

Iz posameznih sevov smo osamili DNA s pomočjo komercialnega kompleta za izolacijo genomske DNA (Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit, Promega). Izhajali smo iz 1 mL 18 urne kulture ter osamili DNA po originalnih navodilih proizvajalca, ki so opisani pod točko 3.2.4.1.2.

3.2.4.3 Iskanje genskih determinant za bakteriocine

Za iskanje genskih determinant za bakteriocine MKB smo uporabili reakcijo PCR, ki smo jo izvedli z začetnimi oligonukleotidi, ki so navedeni v Preglednici 3. Mešanico PCR smo sestavili iz 1 x GoTaq[™] puffer z 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mM dNTP, 10 μM vsakega od začetnih oligonukleotidov, 0,1 μL GoTaq[™] DNA-polimeraze in 0,5 μL osamljene DNA. Posamezni programi za reakcije PCR so opisani v Preglednici 4.

Za ločevanje dobljenih pomnožkov PCR smo uporabili elektroforezo v 1,8 % agaroznem gelu. Pripravili smo ga s segrevanjem agaroze v 1-kratnem puftru TAE (mešanica TRIS, očetne kisline in EDTA). Puffer smo pripravili iz založne raztopine 50-kratnega puftra TAE. Založna raztopina puftra TAE je vsebovala: 242 g trizma osnove, 57,1 g led očetne kisline, 100 mL 0,5 M EDTA (pH 8). Založno raztopino smo nato dopolnili še z vodo do enega litra. Nastale pomnožke smo še pred nanosom v žepke gela obarvali ter obtežili s pomočjo nanašalnega puftra. Po zaključeni elektroforezi smo agarozne gele obarvali s fluorescentnim barvilom SYBR[®] Safe (Invitrogen) in nato ločene pomnožke detektirali na UV-transiluminatorju pri 280 nm.

Preglednica 4: Programi PCR za določanje prisotnosti genskih determinant za bakteriocine.

ŠTEVILO CIKLOV	FAZA	TEMPERATURA	ČAS
Enterocin A (De Vuyst in sod., 2003)			
1	Začetna denaturacija DNA	95 °C	5 min
30	Denaturacija DNA	95 °C	30 s
	Prileganje začetnih oligonukleotidov	58 °C	30 s
	Podaljševanje verige	72 °C	30 s
1	Zaključno podaljševanje verige	72 °C	5 min

»se nadaljuje«

»nadaljevanje«

ŠTEVILO CIKLOV	FAZA	TEMPERATURA	ČAS
Enterocin B (De Vuyst in sod., 2003)			
1	Začetna denaturacija DNA	95 °C	5 min
30	Denaturacija DNA	95 °C	30 s
	Prileganje začetnih oligonukleotidov	56 °C	30 s
	Podaljševanje verige	72 °C	30 s
1	Zaključno podaljševanje verige	72 °C	5 min

ŠTEVILO CIKLOV	FAZA	TEMPERATURA	ČAS
Enterocin P (De Vuyst in sod., 2003)			
1	Začetna denaturacija DNA	95 °C	5 min
30	Denaturacija DNA	95 °C	30 s
	Prileganje začetnih oligonukleotidov	56 °C	30 s
	Podaljševanje verige	72 °C	30 s
1	Zaključno podaljševanje verige	72 °C	5 min

ŠTEVILO CIKLOV	FAZA	TEMPERATURA	ČAS
Plantaricin A (145 bp) (Maldonado in sod., 2004)			
1	Začetna denaturacija DNA	95 °C	4 min
30	Denaturacija DNA	95 °C	30 s
	Prileganje začetnih oligonukleotidov	60 °C	1 min
	Podaljševanje verige	72 °C	1 min
1	Zaključno podaljševanje verige	72 °C	5 min

3.2.4.4 Identifikacija sevov na nivoju vrste s pomočjo reakcije PCR

Za identifikacijo vrste *Ec. faecium*, *Ec. faecalis* in *Lb. plantarum* smo izvedli reakcijo PCR, v kateri smo uporabili specifične začetne oligonukleotide. Program reakcije in uporabljeni specifični začetni oligonukleotidi so navedeni v Preglednici 5.

Pri identifikaciji vrste *Ec. faecium* in *Ec. faecalis* smo uporabili oba para začetnih oligonukleotidov (multipla PCR). PCR mešanico (30 µL) smo sestavili tako, da je vsebovala 0,1 µL osamljene DNA, 0,15 µL GoTaq™ DNA-polimeraze, 1 x GoTaq™ puffer, 3 mM MgCl₂, 0,1 mM dNTP in 10 µM vsakega od začetnih oligonukleotidov.

Za identifikacijo vrste *Lb. plantarum* smo mešanico PCR (20 µL) sestavili tako, da je vsebovala 0,5 µL osamljene DNA, 0,15 µL GoTaq™ DNA-polimeraze, 1 x GoTaq™ puffer z 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mM dNTP in 1 µM vsakega od začetnih oligonukleotidov (PLANT1, LOWLAC). Pomnožke smo preverili z elektroforezo na agaroznem gelu po postopku, ki je opisan pod točko 2.2.4.3.

Preglednica 5: Programa PCR za določanje pripadnosti vrstam *Ec. faecalis*, *Ec. faecium* in *Lb. plantarum*.

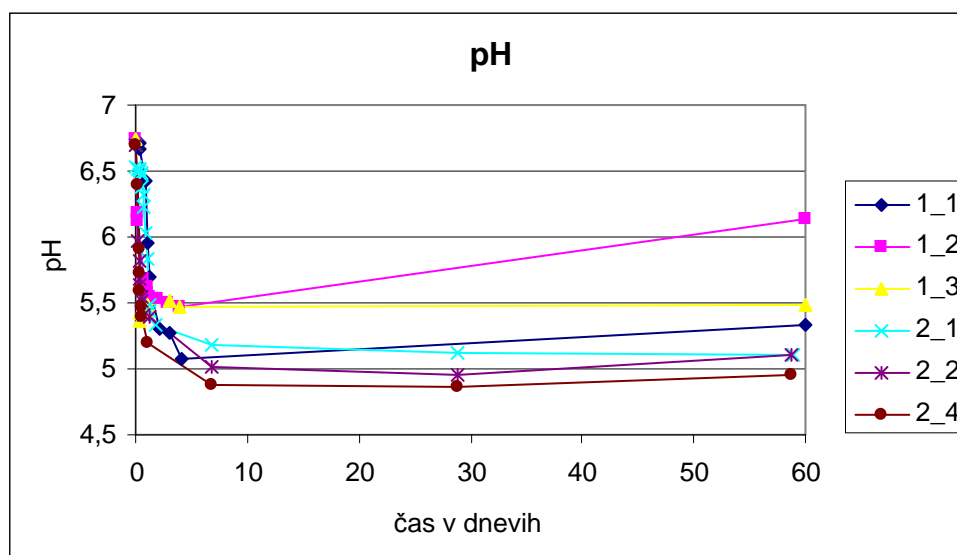
ŠTEVILO CIKLOV	FAZA	TEMPERATURA	ČAS
<i>Ec. faecalis</i> , <i>Ec. faecium</i> (multipla PCR) (Dutka-Malen in sod., 1995)			
1	Začetna denaturacija DNA	94 °C	2 min
30	Denaturacija DNA	94 °C	1 min
	Prileganje začetnih oligonukleotidov	54 °C	1 min
	Podaljševanje verige	72 °C	1 min
1	Zaključno podaljševanje verige	72 °C	10 min

ŠTEVILO CIKLOV	FAZA	TEMPERATURA	ČAS
<i>Lb. plantarum</i> (Chagnaud in sod., 2001)			
1	Začetna denaturacija DNA	95 °C	5 min
40	Denaturacija DNA	95 °C	1 min
	Prileganje začetnih oligonukleotidov	30 °C	1 min
	Podaljševanje verige	72 °C	1 min
1	Zaključno podaljševanje verige	72 °C	5 min

4 REZULTATI

4.1 SPREMLJANJE VREDNOSTI pH MED SIRJENJEM IN ZORENJEM TESTNIH SIROV

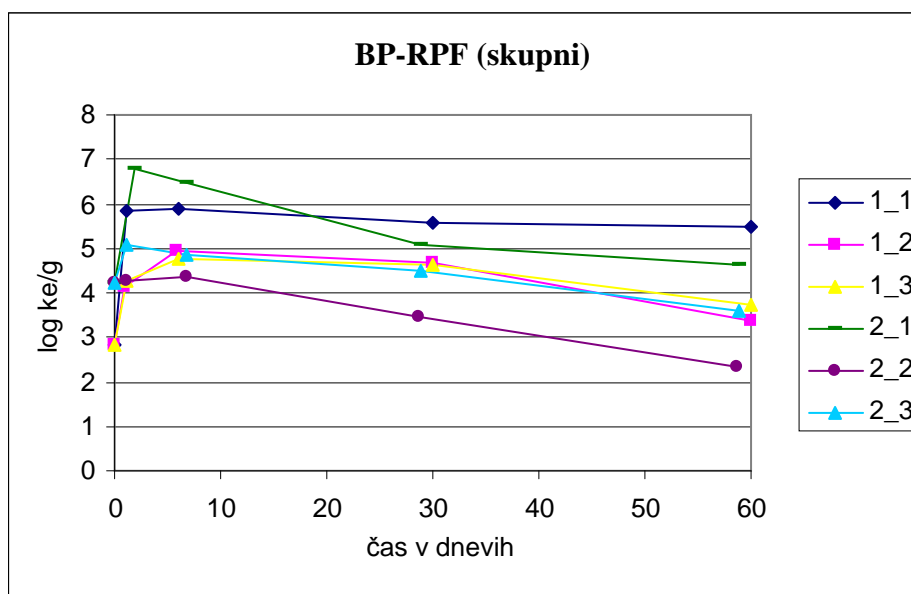
Na sliki 1 so predstavljene izmerjene vrednosti pH testnih sirov med njihovo proizvodnjo. Vrednost pH surovega mleka pred segrevanjem je bila okoli 6,7. Pri siru 1_3 z dodano komercialno startersko kulturo *Str. thermophilus* TH4 opazimo najhitrejši potek acidifikacije, v 7,5 h se vrednost pH zniža na 5,36. Pri nadaljnjem zorenju sira se vrednost pH bistveno ne spremeni. Pri siru 2_3 z dodano kulturo sevov *Ec. faecalis* T5, *Ec. faecalis* Č25 in *Lb. plantarum* 35 smo zaznali največjo stopnjo acidifikacije, pH doseže vrednost 5,2 po enem dnevu oziroma 4,9 po približno 7 dnevih. Med zorenjem se vrednost pH tega sira bistveno ne spremeni. Najslabšo sposobnost acidifikacije smo zaznali pri kulturi sestavljeni iz sevov *Ec. faecium* BM3/2, BM4/1 in *Lb. plantarum* T2 – R/14. Ta kultura je potrebovala 1 dan, da je v siru 1_2 znižala vrednost pH na 5,5, med samim zorenjem pa smo opazili strmo naraščanje vrednosti pH, ki ob koncu zorenja doseže vrednost 6,13. Pri obeh kontrolnih sirih (1_1 in 2_1) izdelanih iz surovega mleka brez dodane kulture smo zaznali primerljivo acidifikacijo okoli 5,2. Med zorenjem je vrednost pH pri siru 1_1 narasla na 5,4, medtem ko je pri siru 2_1 padla na 5,11.



Slika 1: Spremljanje vrednosti pH pri testnih sirih (1_1, 2_1=siri brez dodane kulture, 1_2=sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecium* BM3/2, *Ec. faecium* BM4/1, *Lb. plantarum* T2-R/14, 1_3= sir z dodano komercialno kulturo *Str. thermophilus* TH4, 2_2= sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecium* BM3/2, *Ec. faecium* BM4/1, *Lb. plantarum* 35, 2_3= sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecalis* T5, *Ec. faecalis* Č25, *Lb. plantarum* 35).

4.2 SPREMLJANJE POPULACIJE STAFILOKOKOV MED SIRJENJEM IN ZORENJEM PRI TESTNIH SIRIH

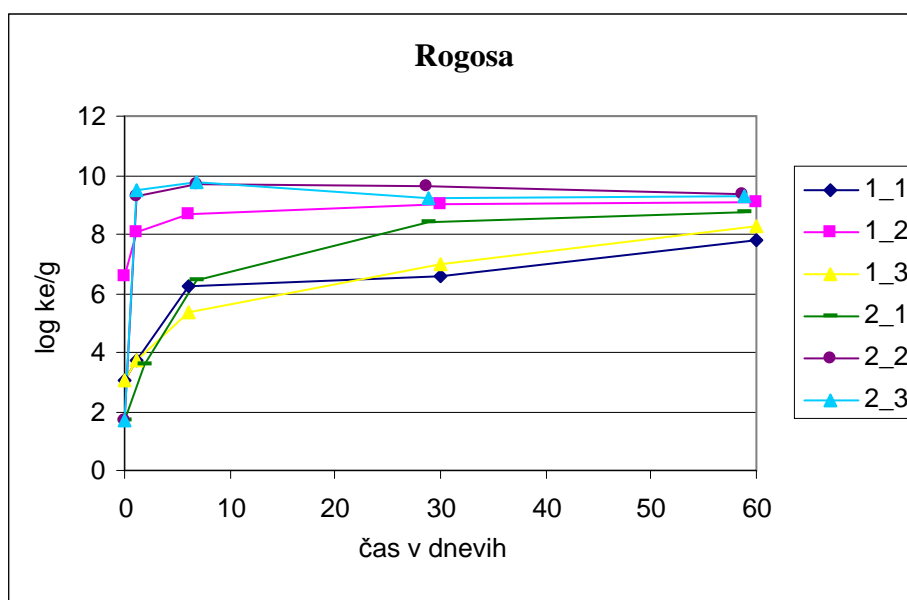
Pri mikrobiološki analizi izdelanih testnih sirov nismo potrdili prisotnosti koagulaza pozitivnih stafilocokov. Na sliki 2 so predstavljene velikosti populacij skupnih stafilocokov, ki smo jih določili med izdelavo in zorenjem testnih sirov. Pri obeh kontrolnih sirih, izdelanih iz surovega mleka brez dodane kulture, smo zasledili najvišje število skupnih stafilocokov (Slika 2). Začetno število skupnih stafilocokov je bilo pri drugem sirjenju nekoliko višje ($5,9 \times 10^6$ ke/g) kot pri prvem sirjenju ($1,7 \times 10^4$ ke/mL). Med zorenjem je število skupnih stafilocokov v kontrolnem siru drugega sirjenja (2_1) padlo za dve logaritamski stopnji, medtem ko smo pri kontrolnem siru prvega sirjenja opazili le manjši upad v številu le-teh ($3,0 \times 10^5$ ke/g). Število skupnih stafilocokov v sirih z dodanimi različnimi kulturami je po končanem zorenju primerljivo za vsa obravnavanja, okoli $3,0 \times 10^3$ ke/g. Izjema je sir z dodano kulturo iz sevov *Ec. faecium* BM3/2, *Ec. faecium* BM4/1, *Lb. plantarum* 35, pri katerem smo zasledili najnižje število skupnih stafilocokov med celotnim postopkom izdelave in zorenja sira. Končno število skupnih stafilocokov v tem siru je bilo $2,1 \times 10^2$ ke/g.



Slika 2: Gibanje populacije skupnih stafilocokov med proizvodnjo testnih sirov (1_1, 2_1=siri brez dodane kulture, 1_2=sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecium* BM3/2, *Ec. faecium* BM4/1, *Lb. plantarum* T2-R/14, 1_3= sir z dodano komercialno kulturo *Str. thermophilus* TH4, 2_2= sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecium* BM3/2, *Ec. faecium* BM4/1, *Lb. plantarum* 35, 2_3= sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecalis* T5, *Ec. faecalis* Č25, *Lb. plantarum* 35).

4.3 SPREMLJANJE POPULACIJE LAKTOBACILOV MED SIRJENJEM IN ZORENJEM PRI TESTNIH SIRIH

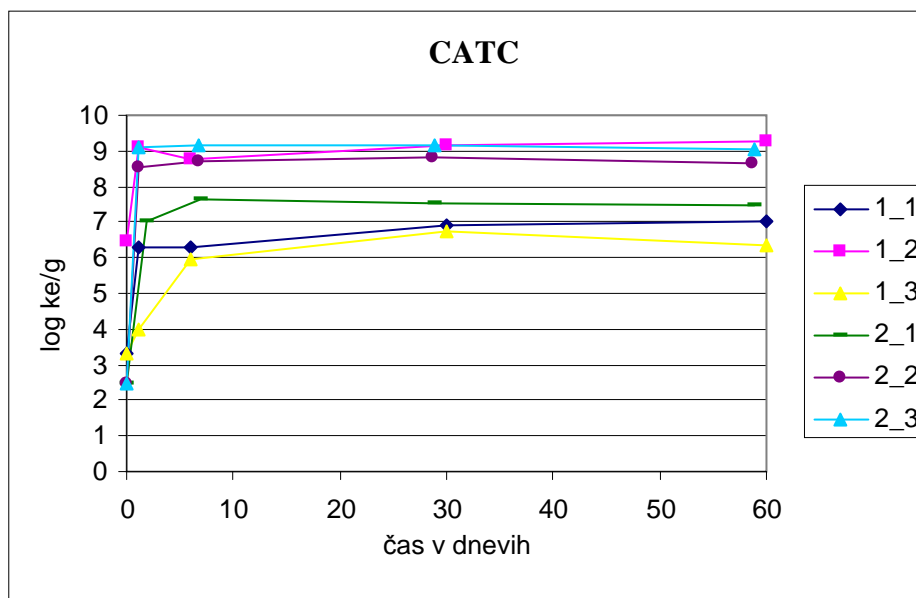
Na sliki 3 je predstavljeno gibanje populacije laktobacilov v testnih sirih med njihovo proizvodnjo. Pri sirih izdelanih z dodatkom kultur, ki vsebujejo seve laktobacilov (1_2, 2_2 in 2_3) je skupno število laktobacilov skladno višje med celotnim postopkom proizvodnje in zorenja sirov. Po 24 h dosežejo laktobacili v teh sirih maksimalno število, ki ostane do konca zorenja sirov nespremenjeno. Siri, izdelani iz surovega mleka brez dodatka kultur (1_1 in 2_1) in sir, izdelan z dodatkom kulture, ki ne vsebuje laktobacilov (1_3) so imeli začetno število nativnih oz. ne-starterskih (naravno prisotnih v mleku) laktobacilov najnižje in skladno s tem tudi najbolj počasno rast populacije ne-starterskih laktobacilov, ki je na koncu zorenja sirov dosegla velikost okoli $1,0 \times 10^8$ ke/g.



Slika 3: Gibanje populacije laktobacilov med proizvodnjo testnih sirov (1_1, 2_1=siri brez dodane kulture, 1_2=sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecium* BM3/2, *Ec. faecium* BM4/1, *Lb. plantarum* T2-R/14, 1_3= sir z dodano komercialno kulturo *Str. thermophilus* TH4, 2_2= sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecium* BM3/2, *Ec. faecium* BM4/1, *Lb. plantarum* 35, 2_3= sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecalis* T5, *Ec. faecalis* Č25, *Lb. plantarum* 35).

4.4 SPREMLJANJE POPULACIJE ENTEROKOKOV MED SIRJENJEM IN ZORENJEM PRI TESTNIH SIRIH

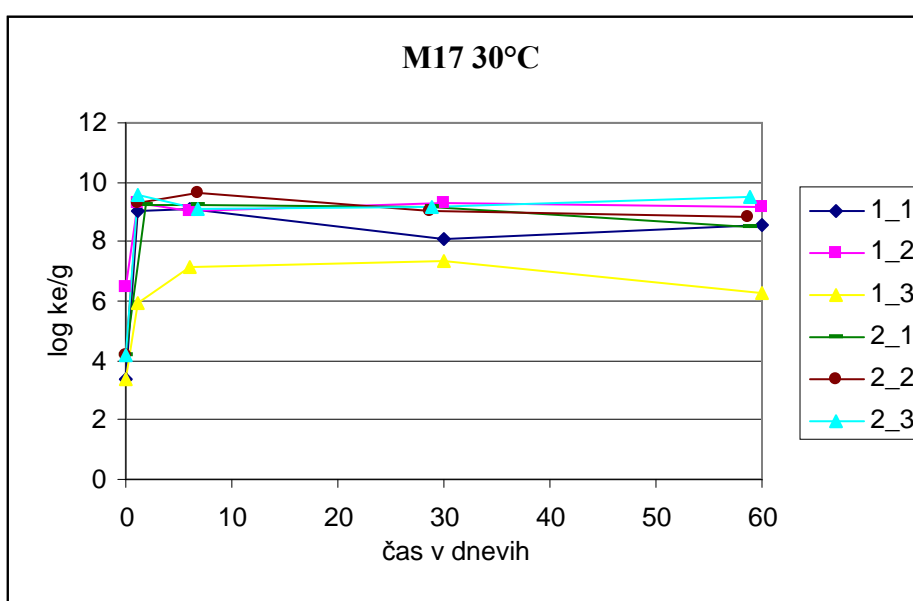
Podobno kot v primeru populacije laktobacilov smo pri sirih, izdelanih z dodatkom kultur, ki vsebujejo seve enterokokov (1_2, 2_2 in 2_3) zaznali višje skupno število enterokokov med celotnim postopkom proizvodnje in zorenja sirov (Slika 4). Po 24 h doseže populacija enterokokov v teh sirih število okoli $1,0 \times 10^9$ ke/g, ki ostane do konca zorenja sirov nespremenjeno. Siri, izdelani iz surovega mleka brez dodatka kultur (1_1 in 2_1) so imeli začetno število ne-starterskih enterokokov nizko in skladno s tem tudi nizko končno število, okoli $1,0 \times 10^7$ ke/g. Pri siru, izdelanem z dodatkom kulture, ki ne vsebuje enterokokov (1_3) smo zaznali poleg nizkega začetnega števila ne-starterskih enterokokov tudi počasnejšo rast populacije, ki pa do konca zorenja sira doseže primerljivo število s siri, izdelanimi brez dodanih kultur.



Slika 4: Gibanje populacije enterokokov med proizvodnjo testnih sirov (1_1, 2_1=siri brez dodane kulture, 1_2= sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecium* BM3/2, *Ec. faecium* BM4/1, *Lb. plantarum* T2-R/14, 1_3= sir z dodano komercialno kulturo *Str. thermophilus* TH4, 2_2= sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecium* BM3/2, *Ec. faecium* BM4/1, *Lb. plantarum* 35, 2_3= sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecalis* T5, *Ec. faecalis* Č25, *Lb. plantarum* 35).

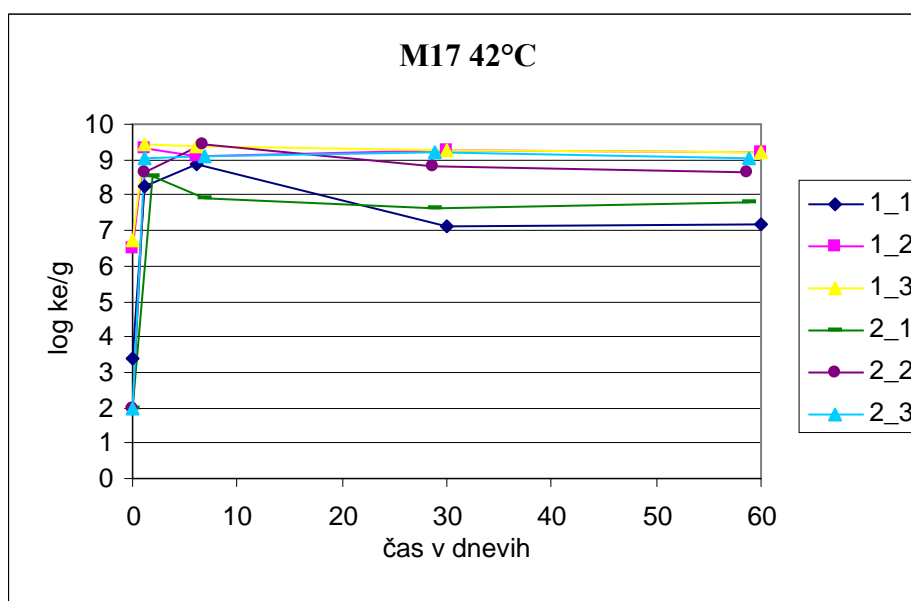
4.5 SPREMLJANJE POPULACIJE MEZOFILNIH IN TERMOFILNIH KOKOV MED SIRJENJEM IN ZORENJEM PRI TESTNIH SIRIH

Na sliki 5 je predstavljeno gibanje populacije ne-starterskih mezofilnih laktokokov v testnih sirih med njihovo proizvodnjo in zorenjem. Pri siru, izdelanem s komercialno kulturo TH4 (1_3) smo zasledili najslabšo rast populacije ne-starterskih mezofilnih laktokokov. Populacija le-teh doseže vrh po 30 dneh zorenja ($2,2 \times 10^7$ ke/g), do zaključka zorenja pa njihovo število pade za eno logaritemsko stopnjo. Pri vseh ostalih testnih sirih smo po 24 h zasledili primerljivo koncentracijo ne-starterskih mezofilnih laktokokov (okoli $2,0 \times 10^9$ ke/g), ki ostane nespremenjena do konca zorenja.



Slika 5: Gibanje populacije mezofilnih laktokokov med proizvodnjo testnih sirov (1_1, 2_1=siri brez dodane kulture, 1_2= sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecium* BM3/2, *Ec. faecium* BM4/1, *Lb. plantarum* T2-R/14, 1_3= sir z dodano komercialno kulturo *Str. thermophilus* TH4, 2_2= sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecium* BM3/2, *Ec. faecium* BM4/1, *Lb. plantarum* 35, 2_3= sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecalis* T5, *Ec. faecalis* Č25, *Lb. plantarum* 35).

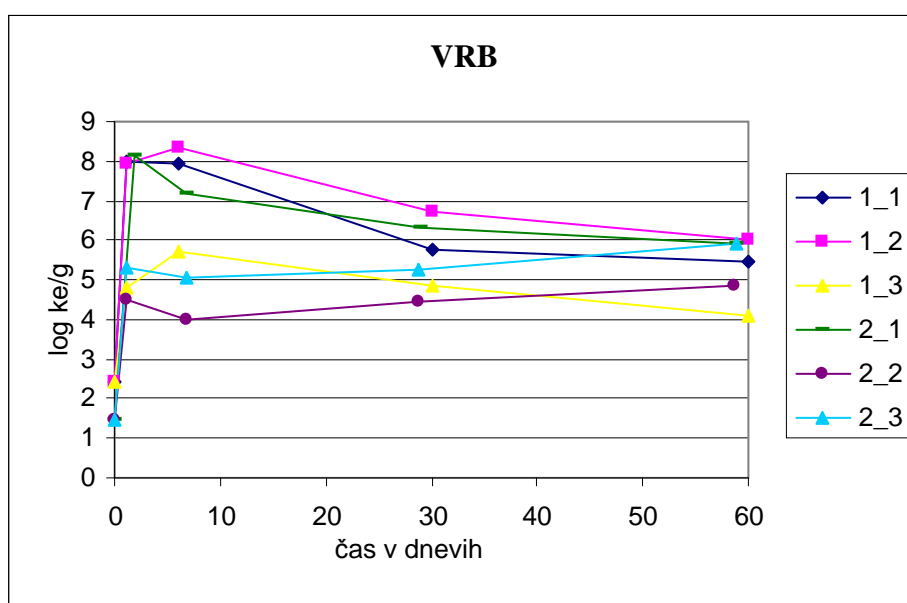
Pri vseh testnih sirih smo zasledili podobno rast populacije termofilnih laktokokov v prvih 24 h proizvodnje sira (okrog $1,0 \times 10^9$ ke/g) (Slika 6). Populacija termofilnih laktokokov pri sirih z dodano kulturo je ostala praktično nespremenjena do konca zorenja. Populacija ne-starterskih termofilnih laktokokov pri obeh kontrolnih sirih (1_1, 2_1) je po dosegu maksimalnega števila ($1,0 \times 10^9$ ke/g) konstantno padala med zorenjem. Končna koncentracija ne-starterskih termofilnih laktokokov v kontrolnem siru prvega sirjenja (1_1) je bila po 60 dneh zorenja $1,5 \times 10^7$ ke/g in v kontrolnem siru drugega (2_1) $6,5 \times 10^7$ ke/g.



Slika 6: Gibanje populacije termofilnih laktokokov med proizvodnjo testnih sirov (1_1, 2_1=siri brez dodane kulture, 1_2= sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecium* BM3/2, *Ec. faecium* BM4/1, *Lb. plantarum* T2-R/14, 1_3= sir z dodano komercialno kulturo *Str. thermophilus* TH4, 2_2= sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecium* BM3/2, *Ec. faecium* BM4/1, *Lb. plantarum* 35, 2_3= sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecalis* T5, *Ec. faecalis* Č25, *Lb. plantarum* 35).

4.6 SPREMLJANJE POPULACIJE ENTEROBAKTERIJ MED SIRJENJEM IN ZORENJEM PRI TESTNIH SIRIH

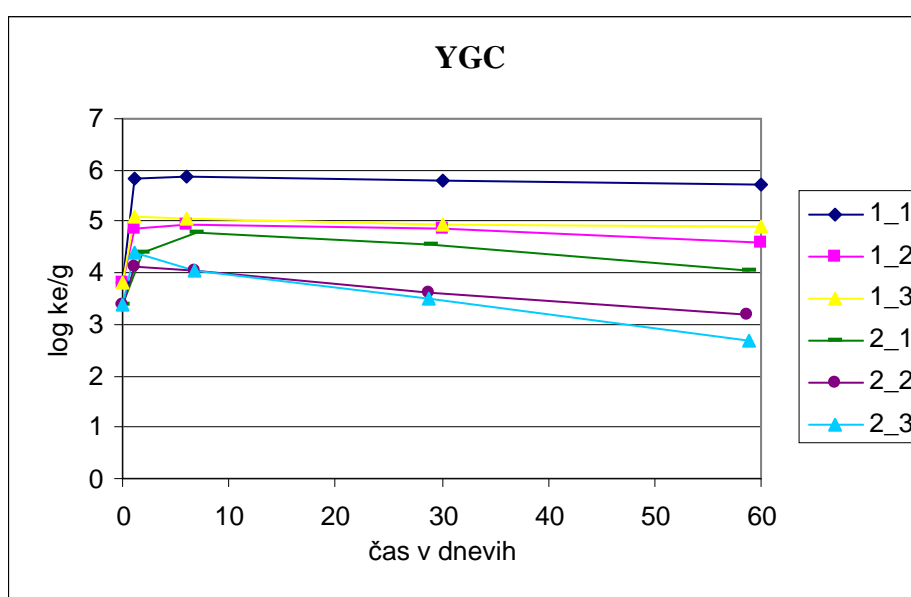
Na sliki 7 je predstavljeno gibanje populacije enterobakterij v testnih sirih med njihovo proizvodnjo in zorenjem. Pri kontrolnih sirih (1_1, 2_1) in siru z dodatkom kulture sevov *Ec. faecium* BM3/2, *Ec. faecium* BM4/1, *Lb. plantarum* T2-R/14 (1_2) smo zasledili najvišjo rast populacije enterobakterij. Po 24 h fermentacije doseže populacija enterobakterij v teh sirih koncentracijo okoli $1,0 \times 10^8$ ke/g. Pri siru z dodano komercialno kulturo TH4 (1_3) in sirih z dodanima kulturama, ki sta vsebovali sev *Lb. plantarum* 35 (2_2, 2_3) smo zasledili najslabšo rast populacije enterobakterij, ki pa je bila prisotna vseh 60 dni zorenja sirov. Po začetni rasti v prvih 24 h izdelave sira (do $2,0 \times 10^5$ ke/g) se koncentracija prisotnih enterobakterij v siru z dodano kulturo sevov *Ec. faecalis* T5, *Ec. faecalis* Č25, *Lb. plantarum* 35 (2_3) dvigne na isto število kot smo ga zasledili v kontrolnem siru (2_1).



Slika 7: Gibanje populacije enterobakterij med proizvodnjo testnih sirov (1_1, 2_1=siri brez dodane kulture, 1_2= sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecium* BM3/2, *Ec. faecium* BM4/1, *Lb. plantarum* T2-R/14, 1_3= sir z dodano komercialno kulturo *Str. thermophilus* TH4, 2_2= sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecium* BM3/2, *Ec. faecium* BM4/1, *Lb. plantarum* 35, 2_3= sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecalis* T5, *Ec. faecalis* Č25, *Lb. plantarum* 35).

4.7 SPREMLJANJE POPULACIJE KVASOVK MED SIRJENJEM IN ZORENJEM PRI TESTNIH SIRIH

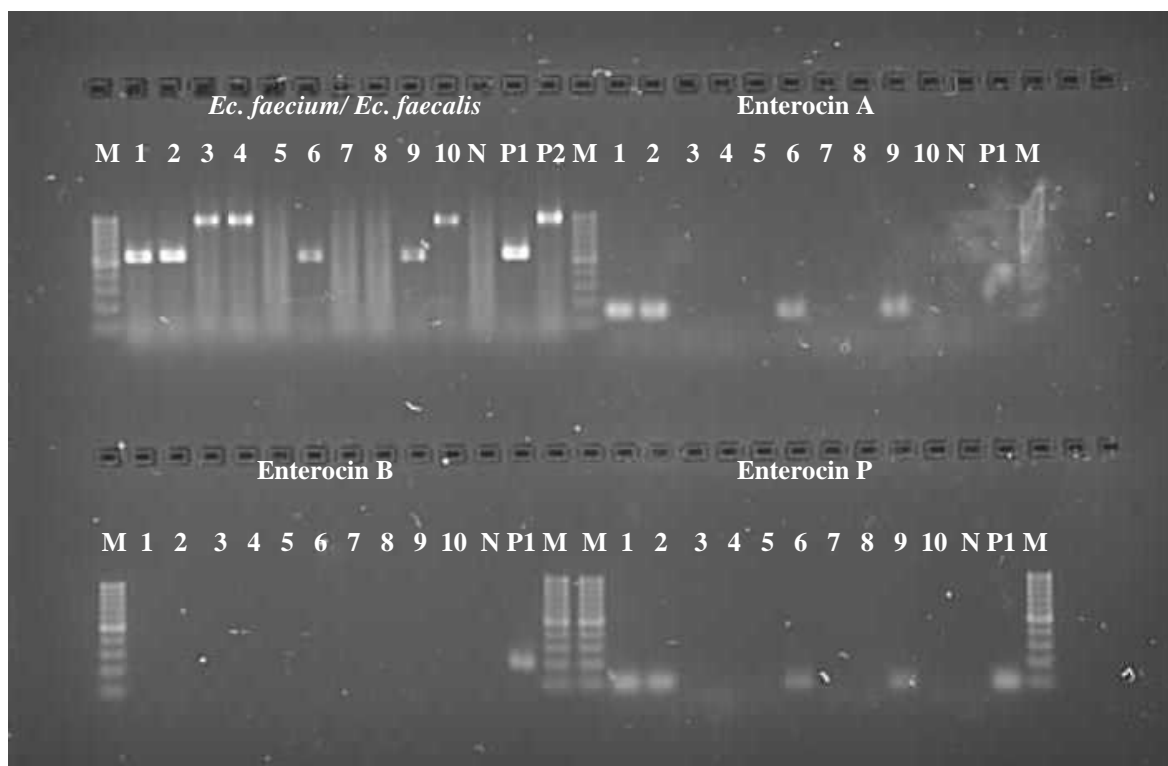
Na sliki 8 je predstavljeno gibanje populacije skupnih kvasovk v testnih sirih med njihovo proizvodnjo. V surovem mleku, ki smo ga uporabili pri prvem in drugem sirjenju smo zaznali primerljivo število kvasovk. Končna koncentracija kvasovk je bila v sirih prvega sirjenja (1_1, 1_2, 1_3) za približno dve logaritmski stopnji višja kot v sirih drugega sirjenja (2_1, 2_2, 2_3). Pri testnih sirih obeh sirjenj smo zaznali nižjo rast kvasovk v sirih z dodanimi starterskimi kulturami. Razlika v koncentraciji kvasovk med kontrolnim sirom in siri z dodanimi starterskimi kulturami je bila okoli ene logaritmske stopnje.



Slika 8: Gibanje populacije kvasovk med proizvodnjo testnih sirov (1_1, 2_1=siri brez dodane kulture, 1_2= sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecium* BM3/2, *Ec. faecium* BM4/1, *Lb. plantarum* T2-R/14, 1_3= sir z dodano komercialno kulturo *Str. thermophilus* TH4, 2_2= sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecium* BM3/2, *Ec. faecium* BM4/1, *Lb. plantarum* 35, 2_3= sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecalis* T5, *Ec. faecalis* Č25, *Lb. plantarum* 35).

4.8 UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI GENSKIH DETERMINANT

Na sliki 9 so prikazani rezultati reakcije PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi, ki potrjujejo identifikacijo testnih sevov BM3/2, BM4/1 kot *Ec. faecium* in sevov T5, Č25 kot *Ec. faecalis*. Na isti sliki so vidni tudi pozitivni rezultati, ki potrjujejo, da seva BM3/2 in BM4/1 nosita genske determinante za enterocina A in P. Rezultati, ki smo jih dobili pri DNA, osamljeni neposredno iz testnih sirov kažejo pozitiven rezultat za vrsto *Ec. faecium* pri sirih, kjer sta bili dodani starterski kulturi, ki vsebujeta seva BM3/2 in BM4/1 (1_2 in 2_2). Pri istih dveh sirih so bili rezultati pozitivni na enterocina A in P. Pri siru, ki je bil izdelan s startersko kulturo, ki je vsebovala seva T5 in Č25 (2_3) smo dobili pozitiven rezultat s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za vrsto *Ec. faecalis*. Na sliki 10 so predstavljeni rezultati reakcije PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za vrsto *Lb. plantarum* in bakteriocin plantaricin A. Pozitiven rezultat na vrsto *Lb. plantarum* smo dobili pri obeh testiranih sevih (T2-R/14, Č35) in vseh testnih sirih (1_1, 1_2, 1_3, 2_1, 2_2, 2_3). Pri sirih brez dodane starterske kulture (1_1, 2_1), siru z dodano komercialno startersko kulturo (1_3) in siru s testno startersko kulturo (2_2) so bili rezultati reakcije PCR pozitivni za bakteriocin plantaricin A.



Slika 9: Rezultati reakcije PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za vrsti *Ec. faecalis* in *Ec. faecium* ter enterocine A, B in P (1=Sev BM 3/2, 2=Sev BM 4/1, 3=Sev T5, 4=Sev Č25, 5=Sir 1_1, 6=Sir 1_2, 7=Sir1_3, 8=Sir2_1, 9=Sir2_2, 10=Sir2_3, N=Negativna kontrola, P1=Pozitivna kontrola za *Ec. faecium* in enterocine A, B in P, P2=Pozitivna kontrola za *Ec. faecalis*, M=Molekularni označevalec 100bp).

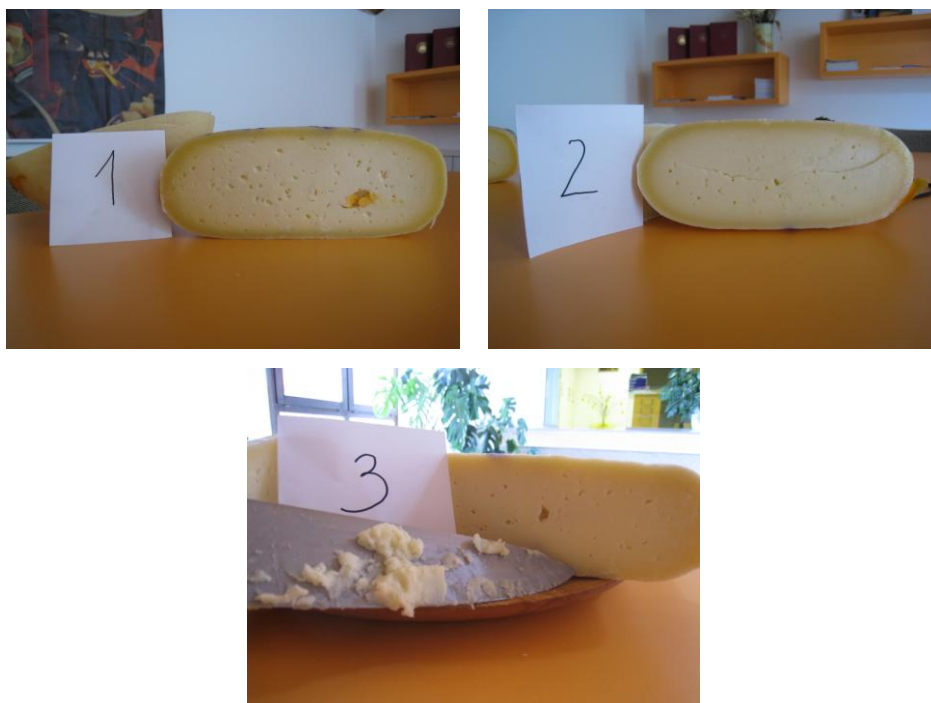


Slika 10: Rezultati reakcije PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za vrsto *Lb. plantarum* ter plantaricin A (1=Sev T2-R/14, 2=Sev Č35, 3=Sir 1_1, 4=Sir 1_2, 5=Sir1_3, 6=Sir2_1, 7=Sir2_2, 8=Sir2_3, N=Negativna kontrola, P=Pozitivna kontrola za *Lb. plantarum* in plantaricin A, M=Molekularni označevalec 100bp).

4.8 SENZORIČNA OCENA TESTNIH SIROV

Po 60 dneh zorenja smo sire drugega sirjenja tudi senzorično ocenili. Siri so bili ocenjeni skladno s postopkom, ki ga navaja Pravilnik o označbi geografskega porekla tolminc (2003). V Preglednici 6 so navedene glavne točke senzoričnega ocenjevanja testnih sirov drugega sirjenja. Kontrolni sir izdelan brez dodatka starterske kulture (2_1) je bil na prerezu tipičen za sir tolminc, po barvi (bela) in aromi sodeč pa sir še ni bil dovolj zrel (Slika 11). Po okusu je bil kontrolni sir tipičen za sir tolminc vendar nekoliko preveč grenek in kisel. Po teksturi je bil ta sir preveč mazav. Pri siru z dodano startersko kulturo, ki je vsebovala seve *Ec. faecium* BM3/2, *Ec. faecium* BM4/1 in *Lb. plantarum* Č35 (2_2) smo zasledili nižjo grenkobo in kislost kot pri kontrolnem siru. Poleg tega smo opazili nekatera odstopanja od zahtev za tradicionalni sir tolminc. Sir je imel manjše število očes, rahlo povečano zatohlost ter pomanjkanje tipične arome. Od vseh treh sirov, ki so bili izdelani pri drugem sirjenju smo pri siru z dodano startersko kulturo sestavljeno iz sevov

Ec. faecalis T5, *Ec. faecalis* Č25 in *Lb. plantarum* Č35 (2_3) ugotovili največja odstopanja od zahtev za sir tolminc.



Slika 11: Prerez testnih sirov drugega sirjenja po 60 dneh zorenja (1=siri brez dodane kulture (2_1); 2= sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecium* BM3/2, *Ec. faecium* BM4/1, *Lb. plantarum* 35 (2_2); 3= sir z dodano kulturo sevov *Ec. faecalis* T5, *Ec. faecalis* Č25, *Lb. plantarum* 35 (2_3)).

Preglednica 6: Senzorična ocena testnih sirov druge serije

Sir	Prerez	Okus	Št. očes	Kislost	Mazavost
2_1	tipičen	grenak	tipično število očes	kisel	malo mazav
2_2	tipičen	malo grenak	manj očes	manj kisel	malo mazav
2_3	netipičen	zelo grenak	manj očes	kisel	zelo mazav

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Iz sevov, ki so bili osamljeni iz tradicionalnih sirov tolminc in bovški ovčji sir smo sestavili tri starterske kulture. V dveh ločenih sirjenjih smo testirali uporabnost pripravljenih starterskih kultur. Skupno smo izdelali šest testnih sirov, od katerih smo tri izdelali z dodatkom sestavljenih starterskih kultur, dva kot kontrolna sira izdelana brez dodatka starterskih kultur in enega z dodatkom komercialne starterske kulture. Med izdelavo in zorenjem sira smo spremljali vrednost pH in analizirali prisotno mikrobnou populacijo. Mikrobiološka analiza je vključevala določanje števila bakterij iz skupine laktobacilov, enterokokov, termofilnih in mezofilnih laktokokov, stafilokokov, enterobakterij in kvasovk.

Velika zaplesnjenost sirov, ki se je zaradi pogostega vzorčenja pojavila pri sirih iz prvega sirjenja, je vplivala na več končnih rezultatov. Na eni strani je bilo nemogoče senzorično oceniti sire iz te serije, poleg tega pa je rast plesni najverjetneje vplivala tudi na vrednost pH. Siri iz prve serije sirjenj (1_1, 1_2, 1_3) so po 60 dneh zorenja dosegli najvišjo pH vrednost (Slika 1). Razlog za tako veliko spremembo v vrednosti pH pri siru z dodano kulturo sevov *Ec. faecium* BM3/2, *Ec. faecium* BM4/1, *Lb. plantarum* T2-R/14 (1_2), ki se je pojavila med 30 in 60 dnevom zorenja, je najverjetneje posledica napake pri merjenju oziroma mestu uboda pH sonde. Vrednost pH je v neposredni bližini zaplesnjenosti, kjer poteka intenzivna proteoliza, pogosto višja kot v delih sira, kjer samo bakterijski encimi katalizirajo proteolizo.

Pri spremljanju števila stafilokokov smo potrdili že znano dejstvo, da precejšen del mikrobne populacije surovega mleka predstavljajo vrste bakterij iz rodu *Staphylococcus* (Slika 2). Čeprav pri analizi surovega mleka, ki smo ga mi uporabili pri prvem in drugem postopku sirjenja, nismo potrdili prisotnosti koagulaza pozitivnih stafilokokov obstaja še vedno objektivna verjetnost, da so ti lahko prisotni v surovem mleku, ki se običajno uporablja za izdelavo tradicionalnih sirov. Kljub odstotnosti koagulaza pozitivnih stafilokokov lahko sklepamo, da bi ti, v primeru, da so prisotni, imeli podobno rastno dinamiko in občutljivost na seve dodane starterske kulture, kot jo imajo skupni stafilokoki. Glede na to, da smo v kontrolnih sirih obeh sirjenj (1_1 in 2_1) določili najvišje število skupnih stafilokokov lahko sklepamo, da prisotnost izbranih sevov starterskih kultur zavira oziroma omejuje njihovo rast. Vpliv dodanih starterskih kultur se kaže že v začetnih fazah sirjenja in se ohrani do konca zorenja testnih sirov (60 dni). Vpliv v začetnih fazah izdelave sira je pomemben zaradi potencialne prisotnosti koagulaza pozitivnih stafilokokov. Koagulaza je encim, ki katalizira koagulacijo krvne plazme in je sam po sebi virulenčni dejavnik. Spособnost tvorbe tega encima pri stafilokokih povezujemo z vrsto *S.*

aureus, ki ima poleg tega še ostale virulenčne dejavnike. Najbolj kritičen virulenčen dejavnik pri tej bakterijski vrsti, s stališča varnosti hrane, je sposobnost tvorbe različnih enterotoksinov. Tvorba enterotoksinov je močno povezana z rastno krivuljo bakterije. Tvorba je najbolj izrazita v fazi pospešene rasti in prvi polovici eksponentne faze zaradi česar je zelo pomembno, da se rast in delovanje stafilokokov omeji že v začetnih fazah izdelave sira. V primeru izdelave prvih testnih sirov je prisotnost starterske kulture sevov *Ec. faecium* BM3/2, *Ec. faecium* BM4/1 in *Lb. plantarum* T2-R/14 (Sir 1_2) znižala rast prisotnih skupnih stafilokokov za dve logaritmski stopnji in bila povsem primerljiva z vplivom, ki ga je imela prisotnost komercialne starterske kulture (Sir 1_3). Rezultati drugega sirjenja kažejo podobno učinkovitost starterske kulture sevov *Ec. faecium* BM3/2, *Ec. faecium* BM4/1, *Lb. plantarum* 35 (Sir 2_3), medtem ko je skupna učinkovitost sevov *Ec. faecalis* T5, *Ec. faecalis* Č25, *Lb. plantarum* 35 v siru 2_3 bila nekoliko slabša, saj je bilo število skupnih stafilokokov nižje le za eno logaritmsko stopnjo. Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da sta seva *Ec. faecium* BM3/2 in *Ec. faecium* BM4/1 najverjetneje odgovorna za zaviralni vpliv. Glede na rezultate merjenja vrednosti pH v testnih sirih (Slika 1) lahko prav tako sklepamo, da tvorba kisline ni odgovorna za opažen zaviralni vpliv ali pa je njen prispevek k le-tej manjši. Z molekularno analizo, reakcijo PCR, smo potrdili, da omenjena seva nosita genske determinante za enterocina A in P. Prisotnost istih smo potrdili tudi v celokupni DNA, ki smo jo osamili neposredno iz testnih sirov (Slika 9). Trmčič in sod. (2011) so potrdili prisotnost bakteriocinske aktivnosti pri sevih BM 3/2 in BM 4/1, čeprav te aktivnosti niso mogli pripisati enemu, drugemu ali obema enterocinoma. Sami bi lahko poskusili potrditi tvorbo bakteriocinov v testnih sirih s pomočjo nekaterih ekstrakcijskih metod, ki so jih prav tako preskusili Trmčič in sod. (2011), a smo jih zaradi časovnih in materialnih omejitev opustili. Trmčič in sod. (2011) so metodo preskusili na sirih, ki so bili izdelani s sevom, ki tvori bakteriocin nizin. Nizin je bakteriocin širokega spektra, ki ima zelo izraženo aktivnost, kar lahko pomeni, da bi lahko bila uspešnost metode na naših testnih vzorcih vprašljiva.

Pri spremljanju populacije laktobacilov (Slika 3) se je dodatek starterskih kultur, ki so vsebovale laktobacile odražal na njihovem skupnem številu. Populacija laktobacilov je posledično v teh testnih sirih (1_2, 2_2, 2_3) imela po 24 urah fermentacije jasen prehod iz eksponentne v stacionarno fazo, medtem ko je populacija laktobacilov v sirih brez dodanih laktobacilov (1_1, 1_3, 2_1) bila v konstantni in počasni rasti vseh 60 dni zorenja. Razlog za hitro rast populacije laktobacilov v testnih sirih, kjer so bile dodane starterske kulture so lahko sevi enterokokov, ki so bili dodani skupaj z laktobacili. Podoben sinergistični učinek je poznan pri klasični jogurtovi kulturi, kjer *Str. thermophilus* in *Lb. bulgaricus* skupaj rasteta veliko hitreje in proizvedeta veliko več mlečne kisline kot če rasteta posebej. Druga možnost pa je, da je v surovem mleku prisoten večji delež laktobacilov, ki so prilagojeni na okolje mleka in manjši delež laktobacilov, ki so prilagojeni na okolje sira. Znano je, da v

začetnih fazah zorenja sirov prevladujejo vrste iz rodov *Enterococcus* in *Streptococcus*, ki jih v kasnejših fazah prerastejo tisti laktobacili, ki so prilagojeni na okolje sira. Seve iz katerih smo sestavili starterske kulture smo osamili iz polno zrelih sirov, kar bi pomenilo, da so bili ti laktobacili najverjetneje tisti, ki so bolj sposobni rasti v naših testnih sirih. S hitrejšo rastjo in višjo koncentracijo laktobacilov bi prav tako pričakovali, da bodo tudi količine proizvedene mlečne kisline višje. Če te rezultate primerjamo z rezultati vrednosti pH v testnih sirih (Slika 1) lahko vidimo, da so ti nekoliko neskladni. Največje neskladje smo opazili pri testnem siru z dodanimi sevi *Ec. faecium* BM3/2, *Ec. faecium* BM4/1 in *Lb. plantarum* T2-R/14 (1_2), kar ponovno kaže na to, da so bile zadnje meritve pri tem siru nekoliko neustrezne. S pomočjo vrstno specifične reakcije PCR smo potrdili prisotnost vrste *Lb. plantarum* (Slika 10) v vseh testnih sirih ne glede na to ali je ta vrsta bila dodana s startersko kulturo ali ne. Slednje kaže na to, da so bakterije te vrste naravno prisotne v surovem mleku, ki se uporablja za izdelavo sirov. Prisotnost bakterij iste vrste ne pomeni tudi isto delovanje teh bakterij. Kot primer lahko rečemo, da je sposobnost proizvodnje bakteriocinov sevno in ne vrstno specifična lastnost, kar dokazuje tudi rezultat reakcije PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi (Slika 10). Kljub temu, da smo v vseh testnih sirih potrdili prisotnost vrste *Lb. plantarum*, smo samo v štirih potrdili prisotnost genskih determinant za bakteriocin plantaricin A (1_1, 1_3, 2_1, 2_2). Sevi, ki nosijo genske determinante za ta bakteriocin, so tako naravno prisotni v surovem mleku, ki se ga uporablja za izdelavo sirov. Nobeden od sevov *Lb. plantarum* (T2-R/14 in 35), ki smo jih osamili in uporabili v naših starterskih kulturah ne nosi determinant za bakteriocin plantaricin A. Trmčič in sod. (2011) so pri obeh osamljenih sevih potrdili protimikrobno snov proteinske narave, ki pa je na osnovi specifičnih reakcij PCR niso mogli pripisati aktivnosti plantaricina A. Kljub temu, da so bakterije, ki nosijo genske determinante za plantaricin A prisotne v surovem mleku, ki smo ga uporabili za izdelavo testnih sirov, teh determinant v dveh testnih sirih (1_2 in 2_3) nismo potrdili. Razlog za takšne rezultate lahko v primeru sira 1_2 pripišemo dodanemu sevu *Lb. plantarum* T2-R/14 in v primeru sira 2_3 dodanima sevoma *Ec. faecium* T5 in T25. Obstaja možnost, da je višja koncentracija teh sevov v siru zavrla rast naravno prisotnih sevov, ki nosijo genske determinante za plantaricin A, vendar bi bilo potrebno to možnost še preveriti z dodatnimi poskusi.

Če upoštevamo, da je jakost signala reakcije PCR za plantaricin A nekoliko slabši pri siru 2_2 (Slika 10) in da bi slednje lahko pomenilo manjšo velikost populacije sevov, ki nosijo te genske determinante, bi lahko zaviralni učinek na iste seve pripisali večji populaciji enterokokov. Pri spremljanju populacije enterokokov (Slika 4) smo zaznali njihovo višje število pri sirih, kjer so bili kot starterske kulture dodani sevi tega rodu (1_2, 2_2, 2_3). Kljub temu, da so začetne velikosti populacij enterokokov višje kot pri testnih sirih, kjer enterokokov nismo dodajali (1_1, 1_3, 2_1), to ni vplivalo na rastno dinamiko

enterokokov. Čeprav je bilo končno število populacije enterokokov v teh sirih za 1,5 do 2 logaritma nižje kot v preostalih treh sirih so to koncentracijo oziroma zaključek eksponentne faze rasti dosegli po 24 urah fermentacije. Pri analizi vzorcev smo s pomočjo reakcije PCR in specifičnih začetnih oligonukleotidov (Slika 9) potrdili prisotnost vrst *Ec. faecalis* in *Ec. faecium* v testnih sirih, kjer smo te vrste dodajali v obliki pripravljene starterske kulture. V kontrolnih sirih obeh sirjenj, ki smo jih pripravili samo iz surovega mleka brez dodatka starterskih kultur, nismo potrdili prisotnosti bakterij teh dveh vrst. Slednje je zelo neobičajno saj sta v surovem mleku krav in ovc ti dve vrsti najbolj zastopani vrsti znotraj rodu *Enterococcus* (Mohar Lorbeg, 2008). Razlog za to je lahko, da je število enterokokov 10^7 ke/g enterokokov znotraj 1000 krat večje populacije ostalih rodov in vrst prenizka za zanesljivo detekcijo tarčnih zaporedij DNA. V DNA, osamljeni neposredno iz testnih sirov, katerim smo dodali seve enterokokov, ki proizvajajo enterocina A in P, smo skladno s tem potrdili prisotnost specifičnih genskih determinant za ta dva bakteriocina.

Poleg bolj selektivnih gojišč za laktobacile (Rogosa) in enterokoke (CATC) smo prisotno mikrobno populacijo v testnih sirih spremljali tudi na nekoliko manj selektivnem gojišču M17. S tem gojiščem smo želeli spremljati mezofilno (30 °C) in termofilno (42 °C) mikrobno populacijo kokov. Rezultati pri siru 1_3, kjer smo dodali komercialno termofilno startersko kulturo TH4 (*Str. thermophilus*) kažejo na to, da so bili v tem primeru gojišče in rastni pogoji primerni. Vrsta *Str. thermophilus* ne raste pri temperaturi 30 °C (Slika 5) ob primerjavi z rezultati kontrolnega sira pa vidimo, da je ta termofilna vrsta zavrla oziroma delno nadomestila ne-startersko mezofilno populacijo. Razlika v mezofilni populaciji med tema dvema siroma je bila približno dve logaritmski stopnji. Glede na to, da so enterokoki zastopani tako v mezofilni kot termofilni populaciji nam primerjava z rezultati na gojišču CATC (Slika 4) pokaže, da populacija mezofilnih bakterij v siru 1_3 ni nižja na račun teh. Prisotnost *Str. thermophilus* v siru z dodano komercialno startersko kulturo 1_3 smo potrdili na gojišču M17 pri 42 °C, velikost populacije pa je bila okoli 10^9 CFU/g in primerljiva z velikostjo termofilne populacije v sirih, ki smo jim dodali naše pripravljene starterske kulture (1_2, 2_2, 2_3). Glede na to, da laktobacili slabo rastejo na gojišču M17 lahko sklepamo, da večji del te populacije predstavljajo dodani enterokoki. Koncentracija predstavnikov termofilne mikrobne populacije v kontrolnih sirih (1_1, 2_1) je do 24 ur fermentacije primerljiva s koncentracijo v ostalih testnih sirih, potem pa se ta zniža za eno do dve logaritmski stopnji. Iz tega lahko ponovno sklepamo, da so sevi, ki smo jih dodajali v obliki starterskih kultur bolje prilagojeni na okolje, ki nastane v siru med zorenjem. Slednje je bilo tudi pričakovano, saj so bili ti sevi osamljeni iz konzumno zrelih tradicionalnih sirov.

Dodatek komercialne starterske kulture TH4 je imel največji vpliv na populacijo enterobakterij, ki smo jo določili na gojišču VRB. Po sedmih dneh fermentacije je populacija enterobakterij v tem siru (1_3) konstantno padala in dosegla vrednost 10^4 ke/g po 60 dneh zorenja sira. Ob koncu zorenja sirov je bila populacija enterobakterij pri vseh ostalih sirih med 10^5 in 10^6 ke/g. Čeprav so bile koncentracije enterobakterij primerljive ob koncu zorenja, lahko na Sliki 7 vidimo, da je bila ta populacija v sirih, kjer smo dodajali sev *Lb. plantarum* 35 zavrtta že v začetnih fazah in nekoliko manj v kasnejših fazah izdelave sirov (2_2, 2_3), medtem ko je bil pri ostalih sirih zaviralni vpliv viden šele v kasnejših fazah. Trmčić in sod. (2011) so pri obeh sevih *Lb. plantarum*, ki smo ju uporabili v starterskih kulturah potrdili sintezo bakteriocinu podobnih snovi. Obstaja verjetnost, da bakteriocinu podobne snovi, ki jih tvori eden in drug sev *Lb. plantarum* niso iste in da tiste, ki jih proizvaja sev 35 učinkujejo bolj zaviralno na populacijo enterobakterij. Da bi potrdili to domnevo, bi morali preveriti protimikrobno delovanje omenjenih sevov proti nekaterim vrstam iz skupine enterobakterij. Najbolj enostavna takšna testa sta izvedena po metodi direktne inhibicije na trdnem gojišču, kjer se uporabi ali aktivna oblika kulture ali supernatant gojišča, v katerem je kultura rasla in proizvajala protimikrobne snovi.

Pri spremljanju skupnega števila kvasovk na gojišču YGC (Slika 8) smo ugotovili, da je bila koncentracija kvasovk med zorenjem sirov za eno do dve logaritemski stopnji višja pri prvem sirjenju. Razlog za to je lahko kemijski ali tehnološki. Kemijski razlog je lahko, da je sestava surovega mleka, ki smo ga uporabili pri enem in drugem sirjenju različna, možno je tudi, da je pri drugem sirjenju mleko vsebovalo nekatere snovi s fungicidnim delovanjem. Čeprav je tehnologija izdelave tradicionalnih sirov določena, obstajajo vedno manjša ali večja odstopanja, ki imajo lahko za rezultat razlike v številu skupnih kvasovk. Razlog za takšen rezultat je lahko tudi način vzorčenja. V primeru prvega sirjenja smo v začetnih fazah zorenja sirov večkrat vzorčili, kar je v kasnejših fazah privedlo do večjih razlik (aerobnosti, hidracije, zaplesnjenosti, itd.). Kljub opaženim razlikam med obema sirjenjema se je pokazalo, da so vse štiri uporabljene starterske kulture imele podoben vpliv na populacijo kvasovk v siru. Pri vseh štirih testnih sirih z dodano startersko kulturo (1_2, 1_3, 2_2, 2_3) je bila populacija skupnih kvasovk za približno eno logaritemsko stopnjo nižja kot v kontrolnih sirih.

Način vzorčenja nam je prav tako onemogočil senzorično oceno sirov prvega sirjenja. Iz rezultatov senzoričnega ocenjevanja, ki so predstavljeni na Sliki 11 in v Preglednici 5 je razvidno, da nobena od preskušanih starterskih kultur pri drugem sirjenju ni primerna za uporabo pri izdelavi tradicionalnega sira tolminc. Startersko kulturo, ki smo jo uporabili pri siru 2_2 bi z nadaljnjo optimizacijo oziroma zamenjavo nekaterih sevov lahko izboljšali do te mere, da bi dobili končni izdelek želene kakovosti. Nasprotno pa rezultati za startersko kulturo iz sira 2_3 kažejo, da je ta popolnoma neprimerna za uporabo. Trmčić in sod.

(2011) so s pomočjo *in-vitro* testov ugotovili, da imata seva *Ec. faecalis* 5 in 25 izjemno močno proteolitično aktivnost. Proteolitična aktivnost sevov je pri zorenju sira zaželeno, vendar v primeru, da je ta aktivnost premočna, to lahko vodi v tvorbo kratkih di- in tri-peptidov za katere je znano, da imajo nezaželeno grenak okus. Čeprav sta ta dva seva popolnoma neprimerna s stališča zorenja sira, bi se lahko izkazala za zelo koristna pri proizvodnji bioaktivnih peptidov. Ti bioaktivni peptidi so prav tako znani kot kratki peptidi, ki imajo pri človeku lahko pozitiven vpliv na zdravje. V tem primeru bi bili ti peptidi bolj domena farmacevtske branže, ki nima problemov s senzorično kakovostjo svojih izdelkov.

5.2 SKLEPI

- Sevi, ki smo jih uporabili pri sestavi starterskih kultur so med proizvodnjo testnih sirov pokazali protimikrobno delovanje proti stafilokokom, kar potrjuje predhodne rezultate *in-vitro* testiranj.
- Seva *Ec. faecium* BM 3/2 in BM 4/1, ki nosita genske determinante za enterocina A in P sta bila v mikrobnih združbi testnih sirov dovolj kompetitivna, da sta se ohranila znotraj te do konca zorenja sirov.
- Senzorična ocena sirov z dodanimi sevi *Ec. faecium* BM3/2 in BM4/1, *Ec. faecalis* T2 in Č25 ter *Lb. plantarum* 35 je pokazala, da so sevi z vidika senzorične analize neustrezni kot starterske kulture.

6 POVZETEK

V diplomski nalogi smo proučevali nove starterske kulture za izdelavo mikrobiološko neoporečnega in senzorično primernega tradicionalnega sira tolminc. Te starterske kulture so bile sestavljene iz sevov, ki so jih izbrali raziskovalci Katedre za mlekarstvo Biotehniške fakultete iz množice izolatov, tipičnih predstavnikov mikrobiote sira tolminc, na osnovi njihovih tehnoloških in protimikrobnih lastnosti. Pričakovali smo, da bodo izbrani sevi delovali zaviralno na stafilokoke ter zaradi sposobnosti tvorbe bakteriocinov bili dovolj kompetitivni, da bomo njihovo prisotnost potrdili tudi v končnih vzorcih sira.

Izdelali smo dve seriji sirov, v vsaki seriji so bili izdelani trije siri po tehnološkem postopku izdelave tradicionalnega sira tolminc. Uporabili smo sestavljene starterske kulture iz izbranih sevov *Ec. faecium* BM3/2 in BM4/1, *Ec. faecalis* T2 in Č25, *Lb. plantarum* T2-R/14 in 35. Izdelali smo tudi dva kontrolna sira brez dodatka starterskih kultur ter enega s komercialno kulturo *Streptococcus thermophilus* TH4. Sire smo vzorčili in analizirali prisotno mikrobno združbo. Mikrobiološka analiza je vključevala določanje števila bakterij iz skupine laktobacilov, enterokokov, termofilnih in mezofilnih kokov, stafilokokov, enterobakterij in kvasovk. Z osamitvijo celokupne DNA neposredno iz vzorcev testnih sirov ter s pomočjo reakcije PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi smo ugotavljali prisotnost izbranih sevov ter genskih determinant za bakteriocine, ki jih tvorijo. Testne sire smo po koncu zorenja (60 dni) tudi senzorično ocenili.

Rezultati spremljanja števila stafilokokov so pokazali, da starterske kulture uspešno zavirajo njihovo rast. Izstopa starterska kultura z izbranimi sevi *Ec. faecium* BM3/2 in BM4/1, zato lahko sklepamo, da sta tista, ki sta odgovorna za večji zaviralni vpliv. S pomočjo reakcije PCR smo potrdili, da omenjena seva nosita genske determinante za enterocina A in P. Prisotnost istih genskih determinant za oba enterocina smo potrdili tudi v DNA, ki smo jo osamili neposredno iz vzorcev testnih sirov. Prav tako smo z vrstno specifično reakcijo PCR potrdili prisotnost vrste *Lb. plantarum* v vseh testnih siri, kar kaže na to, da so te bakterije naravno prisotne v surovem mleku, ki se ga uporablja za izdelavo sirov. Ugotovili smo, da je delovanje teh istih bakterij lahko različno, kar se vidi iz rezultatov reakcije PCR s specifičnimi začetnimi oligonukleotidi za bakteriocin plantaricin A. V štirih testnih siri smo potrdili prisotnost genskih determinant za ta bakteriocin čeprav teh determinant ne nosita testna seva *Lb. plantarum* T2-R14 ali 35. Slednje govori o tem, da so sevi, ki nosijo genske determinante za plantaricin A najverjetneje naravno prisotni v surovem mleku, ki ga uporabljamo za izdelavo sirov. Pri senzorični oceni prve serije sirov smo opazili večjo zaplesnjenost, ki je nastala zaradi pogostega vzorčenja in posledično teh testnih sirov nismo mogli senzorično oceniti. Večja zaplesnjenost je prav tako lahko vplivala na povišanje vrednosti pH v testnih siri. Senzorična ocena testnih sirov druge serije je pokazala, da so sevi *Ec. faecium*, *Ec. faecalis*

in *Lb. plantarum* zaradi prevelike proteolitične sposobnosti neprimerni za startersko kulturo.

Kot končne sklepe naše študije lahko zapišemo, da so sevi, ki smo jih uporabili v starterskih kulturah, med proizvodnjo testnih sirov protimikrobno delovali proti stafilokokom, kar potrjuje predhodne rezultate *in-vitro* testiranja. Seva *Ec. faecium* BM 3/2 in BM 4/1, ki nosita genske determinante za enterocina A in P, sta bila v mikrobnih združbi testnih sirov dovolj kompetitivna, da sta se ohranila znotraj te do konca zorenja sirov. Senzorična ocena sirov z dodanimi sevi *Ec. faecium* BM3/2 in BM4/1, *Ec. faecalis* T2 in Č25 ter *Lb. plantarum* 35 je pokazala, da so sevi z vidika senzorične analize neustrezni kot starterske kulture.

7 VIRI

- Ananou S., Maqueda M., Martinez-Bueno M., Galvez A., Valdivia E. 2005. Control of *Staphylococcus aureus* in sausages by enterocin AS-48. *Meat Science*, 71: 549-556
- Arques J. L., Rodriques E., Gaya P., Medina M., Guamis B., Nunez M. 2005. Inactivation of *Staphylococcus aureus* in raw milk cheese by combinations of high-pressure treatments and bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 254-260
- Beresford T., Williams A. 2004. The microbiology of cheese ripening. V: *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1. Fox P. F., McSweeney P. L. H., Cogan T. M., Guinee T. P. (eds.). London, Elsevier Academic Press: 287-318
- Beuvier E., Buchin S. 2004. Raw milk cheese V: *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*. Vol. 1. Fox P. F., McSweeney P. L. H., Cogan T. M., Guinee T. P. (eds.). London, Elsevier Academic Press: 319-345
- Bogovič Matijašić B., Koman Rajšp M., Perko B., Rogelj I. 2007. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*. *International Dairy Journal*, 17: 157-166
- Caplice E., Fitzgerald G. F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50: 131-149
- Centeno J. A., Menendez S., Rodriguez-Otero J. L. 1996. Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (Northwest Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 33: 307-313
- Chagnaud P., Machinis K., Coutte L. A., Maredat A., Mercenier A. 2001. Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. *Journal of Microbiological Methods*, 44: 139-148
- Cogan T. M., Barbosa M., Beuvier E., Bianchi-Salvadori B., Cocconcelli P. S., 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
- Cogan T. M., Beresford T. P., Steele J., Broadbent J., Shah N. P., Ustunol Z. 2007. Invited review: Advances in starter cultures and cultured foods. *Journal of Dairy Science*, 90: 4005-4021

- Crow V., Curry B., Hayes M. 2001. The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand cheddar. *International Dairy Journal*, 11: 275-283
- Čanžek Majhenič A., Lorberg M. P., Rogelj I. 2007. Characterisation of the *Lactobacillus* community in traditional Karst ewe's cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 60, 3: 182-190
- Čanžek Majhenič A., Rogelj I., Perko B. 2005. Enterococci from Tolminc Cheese: Population structure, antibiotic susceptibility and incidence of virulence determinants. *International Journal of Food Microbiology*, 102: 239-244
- Delbes C., Alomar J., Chougui N., Martin J. M., Montel M. C. 2006. *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production during the manufacture of uncooked, semihard cheese from cows' raw milk. *Journal of Food Protection*, 69, 9: 2161-2167
- De Vuyst L., Foulquié Moreno M. R., Revents H. 2003. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology*, 84: 299-318
- De Vuyst L., Vandamme E. J. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria V: Bacteriocins of lactic and bacteria. De Vuyst L., Vandamme E. J. (eds.). London, Blackie academic & professional: 91-142
- Dutka – Malen S., Evers S., Courvalin P. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant *Enterococci* by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 24-27
- Fortina M. G., Ricci G., Acquati A., Zeppa G., Gandini A., Manachini P. L. 2003. Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. *Food Microbiology*, 20: 397-404
- Foulquie Moreno M. R., Rea M. C., Cogan T. M., De Vuyst L. 2003. Applicability of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* as a co-culture in cheddar cheese manufacture. *International Journal of Food Microbiology*, 81: 73-84
- Ghraiiri T., Manai M., Berjeaud J. M., Frere J. 2004. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from rigouta, a traditional Tunisian cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 621-628
- Giraffa G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88: 215-222

- Grašek V. 2007. »Označba geografskega porekla Kraški ovčji sir«. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije. vlasta.grasek@gov.si (osebni vir, december, 2007)
- IDF Standard, 100B:1991. Milk and milk products – Enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30 °C. 1991: 3 str.
- IDF Standard 122B:1992. Milk and milk products. Preparation of samples and dilutions for microbiological examination. 1992: 3 str.
- Johnson M. E. 1998. Cheese products. V: Applied dairy microbiology. Marth E. H., Steel J. L. (eds.). New York, Marcel Dekker Inc.: 213-250
- Katana V. 2001. Proučevanje mikrobne populacije avtohtonega Kraškega ovčjega sira. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 63 str.
- Koren D. 2007. »Uporaba starterskih kultur pri izdelavi sira Tolminc«. Kobarid, Sirarsko društvo Tolminc. davorin.koren@tnp.gov.si (osebni vir, november, 2007)
- Maldonado A., Jiminez-Diaz R., Ruiz-Barba J. L. 2004. Induction of plantaricin production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after coculture with specific gram-positive bacteria is mediated by an autoinduction mechanism. *Journal of Bacteriology*, 186: 1556-1564
- Mangia N. P., Murgia M. A., Garau G., Sana M. G., Deiana P. 2008. Influence of selected Lab cultures on the evolution of free amino acids, free fatty acids and Fiore Sardo cheese microflora during the ripening. *Food Microbiology*, 25: 366-377
- Mannu L., Paba A. 2002. Genetic diversity of lactococci and enterococci isolated from home-made Pecorino Sardo ewes' milk cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 55-62
- McAuliffe O., Hill C., Ross R. P. 1999. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese manufactured with a lacticin 3147-producing starter culture. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 251-256
- Menendez S., Godinez R., Centeno J. A., Rodriguez-Otero J. L. 2001. Microbiological, chemical and biochemical characteristics of Tetilla raw cows-milk cheese. *Food Microbiology*, 18: 151-158
- Menendez S., Godinez R., Hermida M., Centeno J. A., Rodriguez-Otero J. L. 2004. Characteristics of Tetilla pasteurized milk cheese manufactured with the addition of autochthonous cultures. *Food Microbiology*, 21: 97-104

- Miller S. A., Dykes D. D., Polesky H. F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16, 3: 1215
- Mohar Lorbeg P. 2008. Fenotipska in genotipska raznolikost enterokokov iz tradicionalnih slovenskih sirov. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta: 134 str.
- Munoz A., Ananou S., Galvez A., Martinez-Bueno M., Rodriguez A., Maqueda M., Valdivia E. 2007. Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: Bactericidal synergism with heat. *International Dairy Journal*, 17: 760-769
- Oberman, H. 1985. Fermented milks. V: *Microbiology of fermented foods*. Vol.1. Wood B. J. B. (ed.), London, Elsevier Applied Science Publication: 167-195
- Okkers D. J., Dicks L. M. T., Silvester M., Joubert J. J., Odendaal H. J. 1999. Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *Journal of Applied Microbiology*. 87: 726-734
- Ouwehand A. C., Vesterlund S. 2004. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. V: *Lactic acid bacteria: microbial and functional aspects*. 3rd ed.. Salminen S., von Wright A., Ouwehand A. (eds.) New York, Marcel Dekker, Inc.: 375-395
- Pelaez C., Requena T. 2005. Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. *International Dairy Journal*, 15: 831-844
- Perko B., Koren D. 2003. Specifikacija za sir Tolminc. Ljubljana, Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije: 44 str.
- Pisano M. B., Fadda M. E., Deplano M., Corda A., Casula M., Cosentino S. 2007. Characterization of Fiore Sardo cheese manufactured with the addition of autochthonous cultures. *Journal of Dairy Research*, 74: 255-261
- Pravilnik o označbi geografskega porekla Bovški sir. Ur. l. RS št. 47-2238/2004
- Pravilnik o označbi geografskega porekla Mohant. Ur. l. RS št. 47-2239/2004
- Pravilnik o označbi geografskega porekla Nanoški sir. Ur. l. RS št. 15-600/2003
- Pravilnik o označbi geografskega porekla Tolminc. Ur. l. RS št. 101-4509/2003
- Psoni L., Tzanetakis N., Litopoulou-Tzanetakki. 2003. Microbiological characteristics of Batzos, a traditional greek cheese from raw goat's milk. *Food Microbiology*, 20: 575-582

- Renčelj S., Perko B., Bogataj J. 1995. Siri-nekdaj in zdaj. Ljubljana, Kmečki glas: 203 str.
- Rilla N., Martinez B., Rodriguez A. 2004. Inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in Afuega'l Pitu cheese by the nisin Z-producing strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IPLA 729. Journal of Food Protection, 67: 928-933
- Rodriguez E., Arques J. L., Gaya P., Tomillo J., Nunez M., Medina M. 2000. Behaviour of *Staphylococcus aureus* in semi-hard cheese made from raw milk with nisin-producing starter cultures. Milchwissenschaft, 55: 633-635
- Ryan M. P., Rea M. C., Hill C., Ross R. P. 1996. An application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad-spectrum bacteriocin, lacticin 3147. Applied and Environmental Microbiology, 62, 2: 612-619
- Starter cultures. 2011. University of Guelph.
<http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/micro.html> (20. nov. 2011)
- Trmčić A. 2011. Detection of lactic acid bacteria bacteriocins' genes and their expression in cheese. Doctoral dissertation. Ljubljana, Biotechnical faculty: 109 str.
- TrueFood. 2006. European Commission.
www.truefood.eu (23. avg. 2011)
- Walstra P., Geurts T. J., Noomen A., Jellema A., van Boekel M. A. J. S. 1999. Dairy technology: principles of milk properties and processes. New York. Marcel Dekker Inc.: 727 str.
- Wouters J. T. M., Ayad E. H. E., Hugenholtz J., Smit G. 2002. Microbes from raw milk for fermented dairy products. International Dairy Journal, 12: 91-109

ZAHVALA

Zahvaljujem se predsedniku komisije doc. dr. Silvestru Žgur in recezentu prof. dr. Bogdanu Perku za strokoven pregled diplomske naloge.

Prav tako gre zahvala mentorici doc. dr. Andreji Čanžek Majhenič za vse nasvete in pomoč pri izdelavi diplomske naloge ter strokoven pregled le te.

Za izvedbo poskusov in veliko pomoč ter potrpežljivost pri izdelavi diplomske naloge se lepo zahvaljujem delovnemu mentorju dr. Alojši Trmčiču.

Še posebno hvala mami in sestri ter puncu Nini za vso podporo in pomoč v času šolanja.

Hvala vsem, ki ste mi kakor koli pripomogli k pridobitvi visokošolske strokovne izobrazbe.

PRILOGE

Priloga A: Izmerjene vrednosti pH sirov med postopkom izdelave

Oznaka sira	1. dan	2. dan	3. dan	4. dan	5. dan	60. dan
1_1	6,66	5,55	5,31	5,27	5,07	5,33
1_2	6,12	5,54	5,53	5,5	5,47	6,13
1_3	5,36	/	/	5,51	5,47	5,48
	1. dan	2. dan	3. dan	8. dan	30. dan	60. dan
2_1	6,51	5,44	5,33	5,18	5,12	5,11
2_2	5,97	5,39	/	5,02	4,96	5,11
2_3	5,91	5,2	/	4,88	4,87	4,96

Priloga B: Število mikroorganizmov v analiziranih silih ob koncu zorenja

Oznaka sira	Skupni stafilokoki (ke/g)	Enterokoki (ke/g)	Laktobacili (ke/g)	Mezofilni koki (ke/g)	Termofilni koki (ke/g)	Entero-bakterije (ke/g)	Kvasovke (ke/g)
1_1	$3,00 \times 10^5$	$1,10 \times 10^7$	$6,20 \times 10^7$	$3,40 \times 10^8$	$1,50 \times 10^7$	$2,90 \times 10^5$	$5,10 \times 10^5$
1_2	$2,40 \times 10^3$	$1,90 \times 10^9$	$1,20 \times 10^9$	$1,55 \times 10^9$	$1,70 \times 10^9$	$1,00 \times 10^6$	$3,90 \times 10^4$
1_3	$5,30 \times 10^3$	$2,20 \times 10^6$	$1,80 \times 10^8$	$2,00 \times 10^6$	$1,70 \times 10^9$	$1,25 \times 10^4$	$7,60 \times 10^4$
2_1	$4,10 \times 10^4$	$3,00 \times 10^7$	$5,60 \times 10^8$	$3,30 \times 10^8$	$6,50 \times 10^7$	$8,60 \times 10^5$	$1,10 \times 10^4$
2_2	$2,10 \times 10^2$	$4,40 \times 10^8$	$2,20 \times 10^9$	$6,80 \times 10^8$	$4,70 \times 10^8$	$7,20 \times 10^4$	$1,60 \times 10^3$
2_3	$3,90 \times 10^3$	$1,10 \times 10^9$	$1,90 \times 10^9$	$3,20 \times 10^9$	$1,10 \times 10^9$	$8,20 \times 10^5$	$5,00 \times 10^2$