

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Šarlota VUKOVAC

**VPLIV KOLIČINE SOLI V POLTRDIH SIRIH NA
RAZVOJ STARTERSKE KULTURE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Šarlota VUKOVAC

**VPLIV KOLIČINE SOLI V POLTRDIH SIRIH NA RAZVOJ
STARTERSKE KULTURE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**EFFECT OF SALT IN SEMI-HARD CHEESES ON THE
DEVELOPMENT OF STARTER CULTURE**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je konec univerzitetnega študija kmetijstvo – zootehnika. 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 mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Bogdana Perka in za somentorico doc. dr. Andrejo Čanžek Majhenič.

Recenzentka prof. dr. Irena Rogelj

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Ivan ŠTUHEC
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

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

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

Članica: prof. dr. Irena ROGELJ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

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

Šarlota Vukovac

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 637.3(043.2)=163.6
KG	mlečni izdelki/poltrdi siri/starterska kultura/ <i>Streptococcus thermophilus</i> TH4/sol
KK	AGRIS Q01/9430
AV	VUKOVAC, Šarlota
SA	PERKO, Bogdan (mentor)/ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (somentorica)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2010
IN	VPLIV KOLIČINE SOLI V POLTRDIH SIRIH NA RAZVOJ STARTERSKE KULTURE
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 39 str., 1 pregl., 15 sl., 3 pril., 9 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V diplomskem delu smo proučevali vpliv količine soli v poltrdih siri na razvoj komercialne starterske kulture <i>Streptococcus thermophilus</i> TH4. V treh neodvisnih poskusih smo z enakim postopkom sirjenja izdelali po tri sire. Sire iz prvih dveh poskusov smo v 20 % slanici solili 2, 4 in 6 dni, medtem ko smo sire iz tretjega poskusa solili 4, 6 in 8 dni. Po soljenju smo s pomočjo sirarskega svedra vzorčili sire ter vsak vzorec razdelili na tri enake dele (od skorje do sredice sira) in jih, glede na lego, poimenovali zunanji, srednji in notranji del/tretjina. V tako pripravljenih vzorcih smo z referenčno metodo ugotavljali vsebnost soli ter s klasično mikrobiološko tehniko gibanje populacije starterske kulture TH4. Ugotovili smo, da z dolžino soljenja premosorazmerno narašča delež NaCl v siru, še posebej je bilo to naraščanje intenzivno v zunanji tretjini pri vseh treh poskusih. Kljub naraščanju vsebnosti soli, pa le-ta ni zavrla razvoja starterske kulture TH4, kar pomeni da je sev med celotnim časovnim režimom soljenja ohranil stabilnost. Izkazalo se je tudi, da ima kultura <i>Str. thermophilus</i> TH4 zelo dobro fermentacijsko sposobnost in sposobnost hitre acidifikacije, saj je dosegla povprečno vrednost pH 5,2 v 24 urah.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 637.3(043.2)=163.6
CX	milk products/semi-hard cheeses/starter culture/ <i>Streptococcus thermophilus</i> TH4/salt
CC	AGRIS Q01/9430
AU	VUKOVAC, Šarlota
AA	PERKO, Bogdan (supervisor)/ČANŽEK MAJHENIČ, Andreja (co-supervisor)
PP	SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB	University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Animal Science
PY	2010
TI	EFFECT OF SALT IN SEMI-HARD CHEESES ON THE DEVELOPMENT OF STARTER CULTURE
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	X, 39 p., 1 tab., 15 fig., 3 ann., 9 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	<p>In this graduation thesis the influence of salt in semi-hard cheeses on the commercial starter culture <i>Streptococcus thermophilus</i> TH4 development was studied. In each of the three independent trials three cheeses were produced using the same cheese-making protocol. Cheeses from the first two trials were salted in 20 % brine for 2, 4, and 6 days while cheeses from the third trial were salted for 4, 6 and 8 days. After salting, cheese-making borer was used for cheese sampling and each sample was further divided into three equal parts (from the rind to the core of cheese). Depending on the location the thirds were named as outer, middle and inner part/third. According to the reference method and by the use of conventional microbiological technique, prepared cheese samples were analysed for the salt content and development of starter culture TH4, respectively. It was found out that the prolonged salting time resulted in the proportional increase of NaCl content in cheese, which was especially intense in the outer part of cheese samples, of all three trials. Despite increased levels, the salt did not impede the development of starter culture TH4 which means that the strain maintained stability during the whole time regime of salting. It has also been shown that <i>Str. thermophilus</i> TH4 culture possesses a very good fermentation and acidification activity as it reached an average pH value of 5.2 in 24 hours.</p>

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	IX
Okrajšave in simboli	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 POMEN SOLJENJA SIROV	2
2.2 ABSORPCIJA IN DIFUZIJA SOLI V SIRU	3
2.2.1 Načini soljenja sira	3
2.2.2 Mehanizem absorpcije in difuzije soli iz slanice v sir	4
2.2.3 Dejavniki, ki vplivajo na stopnjo absorpcije soli iz slanice v sir	5
2.2.4 Vzpostavitev ravnotežja med soljo in vodo v siru po soljenju v slanici	7
2.3 KONTROLA RASTI MIKROORGANIZMOV	9
2.4 STARTERSKE KULTURE V SIRARSTVU	11
3 MATERIAL IN METODE	13
3.1 NAČRT POSKUSA	13
3.2 MATERIAL	15
3.2.1 Mleko	15

3.2.2	Sirišče	15
3.2.3	Starterska kultura	15
3.2.4	Gojišča in raztopine za razredčevanje	15
3.2.5	Kemikalije za določanje vsebnosti kloridov v vzorcih sira	16
3.3	METODE	17
3.3.1	Tehnološki postopek izdelave sira	17
3.3.2	Merjenje vrednosti pH in temperature	17
3.3.3	Vzorčenje sira	17
3.3.4	Mikrobiološka analiza vzorcev	18
3.3.5	Določanje vsebnosti kloridov	20
4	REZULTATI	22
4.1	VREDNOSTI pH SIROV PRED, MED IN PO STISKANJU	22
4.2	VELIKOST POPULACIJE <i>Str. thermophilus</i> V VZORCIH SIRA	23
4.3	KONCENTRACIJA SOLI V VZORCIH SIRA	25
4.4	VPLIV KOLIČINE SOLI V POLTRDIH SIRI NA RAZVOJ STARTERSKE KULTURE	28
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	31
5.1	RAZPRAVA	31
5.2	SKLEPI	32
6	POVZETEK	33
7	VIRI	35

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Priprava raztopine Na-citrata	16

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Pomen soljenja sira (povzeto in prirejeno po Guinee, 2004)	3
Slika 2: Shema tehnološkega postopka izdelave sira	14
Slika 3: Odvzem vzorca s sirarskim svedrom (Foto: Š. Vukovac, 2010)	18
Slika 4: Potek mikrobiološke analize vzorcev sira (Foto: Š. Vukovac, 2010)	19
Slika 5: Potek kemijske analize določanja vsebnosti kloridov v sirih (Foto: Š. Vukovac, 2010)	20
Slika 6: Vrednosti pH sirov pred, med (po 1 uri, po 2 urah) in po stiskanju pri prvem, drugem in tretjem sirjenju	22
Slika 7: Gibanje populacije <i>Str. thermophilus</i> v vzorcih sira pred soljenjem ter po 2, 4 in 6 dneh soljenja pri prvem poskusu (z = zunanja tretjina, s = srednja tretjina, n = notranja tretjina)	23
Slika 8: Gibanje populacije <i>Str. thermophilus</i> v vzorcih sira pred soljenjem ter po 2, 4 in 6 dneh soljenja pri drugem poskusu (z = zunanja tretjina, s = srednja tretjina, n = notranja tretjina)	24
Slika 9: Gibanje populacije <i>Str. thermophilus</i> v vzorcih sira pred soljenjem ter po 4, 6 in 8 dneh soljenja pri tretjem poskusu (z = zunanja tretjina, s = srednja tretjina, n = notranja tretjina)	25
Slika 10: Vpliv časa soljenja na % NaCl v siru pri prvem poskusu (z = zunanja tretjina, s = srednja tretjina, n = notranja tretjina)	26
Slika 11: Vpliv časa soljenja na % NaCl v siru pri drugem poskusu (z = zunanja tretjina, s = srednja tretjina, n = notranja tretjina)	27
Slika 12: Vpliv časa soljenja na % NaCl v siru pri tretjem poskusu (z = zunanja tretjina, s = srednja tretjina, n = notranja tretjina)	27
Slika 13: Regresijska analiza vpliva količine soli v zunanjem delu sira na velikost populacije <i>Str. thermophilus</i>	28
Slika 14: Regresijska analiza vpliva količine soli v srednjem delu sira na velikost populacije <i>Str. thermophilus</i>	29
Slika 15: Regresijska analiza vpliv količine soli v notranjem delu sira na velikost populacije <i>Str. thermophilus</i>	29

KAZALO PRILOG

Priloga A:

Vrednosti pH sira pred, med in po stiskanju

Priloga B1:

Velikost populacije (KE/g) *Str. thermophilus* pred in med soljenjem pri prvem poskusu

Priloga B2:

Velikost populacije (KE/g) *Str. thermophilus* pred in med soljenjem pri drugem poskusu

Priloga B3:

Velikost populacije (KE/g) *Str. thermophilus* pred in med soljenjem pri tretjem poskusu

Priloga C1:

Vpliv časa soljenja na % NaCl v vzorcih sira pri prvem poskusu

Priloga C2:

Vpliv časa soljenja na % NaCl v vzorcih sira pri drugem poskusu

Priloga C3:

Vpliv časa soljenja na % NaCl v vzorcih sira pri tretjem poskusu

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

SH	kislinska stopnja po metodi Soxhlet Henkel
NaCl	natrijev klorid
kg	kilogram
<i>Str.</i>	<i>Streptococcus</i>
g	gram
w/w (%)	utežni (odstotek)
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
ml	mililiter
l	liter
M	molarnost
cm	centimeter
KE/g	kolonijskih enot na gram
z	zunanji (del/tretjina)
s	srednji (del/tretjina)
n	notranji (del/tretjina)

1 UVOD

Sol ima zelo pomembno vlogo v tehnologiji izdelave sirov, saj vpliva na teksturo sira, podaljša obstojnost, vpliva na rast in razvoj mikroorganizmov ter na aktivnost encimov, vpliva na količino vode ter vodno aktivnost v siru, vpliva na fizikalne spremembe proteinov, na oblikovanje skorje ter na okus sira.

Ena najpomembnejših nalog soli v živilski industriji je prav gotovo zaščita živil pred mikrobiološkim kvarom. Pri tem pa sol ne deluje zaviralno samo na nezaželeno mikrofloro, ampak ima določen vpliv tudi na mikroorganizme, ki jih kot startersko kulturo uporabimo pri izdelavi fermentiranega živila. Ker tudi sire v tehnološkem postopku izdelave solimo, nas je v diplomskem delu zanimal vpliv dolžine soljena na razvoj starterske kulture, ki je bila v našem primeru *Streptococcus thermophilus*.

Bakterija *Streptococcus thermophilus* spada med termofilne mlečnokislinske bakterije in jo, v kombinacijah z drugimi vrstami rodu *Lactobacillus*, tradicionalno uporabljamo kot startersko kulturo v tehnologiji izdelave švicarskih in italijanskih sirov kot sta ementalški sir in mocarela ter pri izdelavi klasičnega jogurta.

Domnevali smo, da bomo s podaljšanjem časa soljenja in posledično višjo vsebnostjo NaCl v siru zavrli rast in aktivnost starterske kulture *Streptococcus thermophilus* TH4.

2 PREGLED OBJAV

2.1 POMEN SOLJENJA SIROV

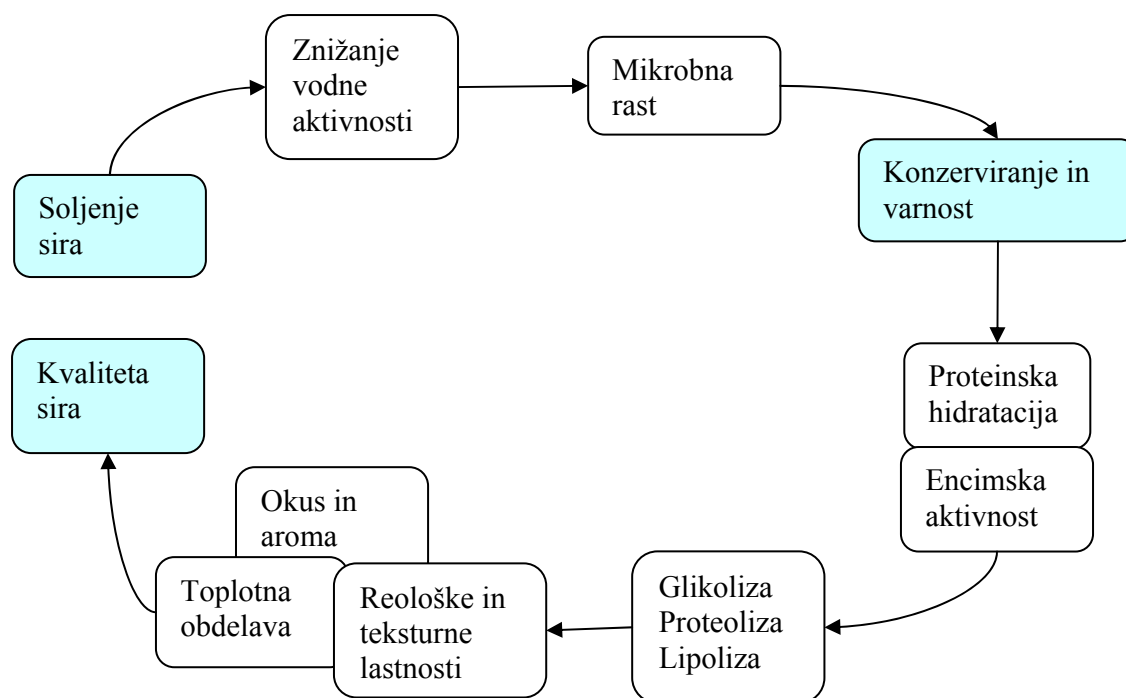
Soljenje je, poleg fermentacije, sinereze in toplotne obdelave, zelo pomembna faza v tehnološkem postopku izdelave sira. Ti dejavniki se med seboj dopolnjujejo in odločajo o kakovosti končnega izdelka. V živilski industriji se soljenje uporablja kot postopek konzerviranja, s katerim živilom podaljšamo rok trajanja in zavremo rast ter razmnoževanje škodljivih ali celo patogenih mikroorganizmov (Guinee in Fox, 2004).

Vsebnost soli v siri je, glede na tip sira, zelo različna in se giblje v mejah od 0,5 - 0,7 % (w/w) pri siri izdelanih s kislinsko koagulacijo (na primer cottage sir) oz. pri siri ementalnega tipa, ter od 4,0 - 6,0 % pri siri v slanici kot sta Domiati sir in feta (Guinee in Fox, 2004).

Med najpomembnejše naloge soli lahko zapišemo, da (Guinee, 2004):

- deluje kot konzervans
- in neposredno prispeva k oblikovanju okusa.

Poleg naštetih dveh funkcij pripisujemo soli še vrsto drugih aktivnosti, ki jih izkazuje v siru (Slika 1). Ob primerni vrednosti pH, vodni aktivnosti in redoks potencialu deluje sol v siru zaščitno z zmanjševanjem kvara sira in preprečevanjem rasti patogenih mikroorganizmov (Erkmen, 2001, cit. Guinee in Fox, 2004). Poleg tega vpliva količina soli na sestavo sira, rast mikroorganizmov, aktivnost encimov ter biokemijske spremembe med zorenjem kot so glikoliza, proteoliza, lipoliza in hidratacija para-kazeina. Količina soli močno vpliva tudi na okus in aromo sira, reološke in teksturne lastnosti, na lastnosti sirov med toplotnimi postopki in nenazadnje na celotno kakovost sira. Na vnos in porazdelitev soli v siru vplivajo številni dejavniki in le natančen nadzor teh dejavnikov nam v procesu izdelave sira zagotovi njegovo optimalno in konstantno kakovost (Guinee, 2004).



Slika 1: Pomen soljenja sira (povzeto in prirejeno po Guinee, 2004)

2.2 ABSORPCIJA IN DIFUZIJA SOLI V SIRU

2.2.1 Načini soljenja sira

Poznamo tri načine soljenja (Slanovec, 1982):

- Suho soljenje v testu: oblikovano sirno testo drobimo in neposredno solimo s suhimi kristali soli, na primer čedar in »cottage« sir.
- Suho soljenje na površini: sol vtiramo po površini, na primer siri z modro ali podobno žlahtno plesnijo.
- Soljenje v slanici: oblikovane sire potopimo v slanico, na primer edamski sir, gauda.

Sir najpogosteje solijo v slanici. Slanice pripravijo v betonskih, plastičnih ali kombiniranih koritih oz. bazenih. V večjih bazenih mora biti omogočeno kroženje slanice, da sta

koncentracija in temperatura povsod enaki. Za pravilno soljenje v slanica so pomembni trije dejavniki: koncentracija, temperatura in kislost slanice. Koncentracija slanice je odvisna od tipa sira in se giblje med 16 in 22 % natrijevega klorida. Temperatura slanice je od 14 do 18 °C, kislost pa med 10 do 25 SH. Sire dnevno obračajo, da se enakomerno nasolijo. Navadno zgornjo površino dodatno suho solijo, tako da pride ta sol ob obračanju sira v slanico in s tem vzdržujejo zahtevano koncentracijo slanice. Iz sira postopoma prehaja sirotka, lahko pa tudi delci sirnine s površine sira. Zato jo je občasno treba očistiti in razkužiti (Slanovec, 1982).

2.2.2 Mehanizem absorpcije in difuzije soli iz slanice v sir

Ko oblikovane sire potopimo v slanico, prično prehajati Na^+ in Cl^- ioni iz slanice v sirino kot posledica razlike v osmotskem tlaku sira/sirotke in slanice. Posledično začne iz matriksa sira s pomočjo difuzije izstopati sirotka in se vzpostavi ravnotežje v osmotskem tlaku. Količina izločene sirotke je navadno dvakrat večja kot količina soli, ki vstopi v sirino, saj je ionski par Na^+Cl^- približno dvakrat večji od ionskega para H^+OH^- . Zato penetracijo soli v sir in sočasno migracijo vode iz sira opisujejo kot ovirano difuzijo, kjer se migracija molekul NaCl in H_2O sicer začne kot posledica odziva na njun koncentracijski gradient, vendar pa je hitrost difuzije omenjenih molekul precej manjša v primerjavi z difuzijo v čisti raztopini. Stopnja difuzije NaCl v sirotki je nižja kot v vodi, saj je sirotka vezana na proteinsko mrežo, ki vključuje tudi maščobne kapljice in raztopljene trdne snovi. Le del sirotke ni vezan na proteine in je zato prosta za difuzijo. Migracija Na^+ in Cl^- ionov z mesta višje koncentracije k mestu z nižjo koncentracijo je v siru omejena zaradi (Guinee, 2004):

- maščobnih kapljic in proteinskih skupkov, okoli katerih morajo ioni narediti dodatno pot, da pridejo z enega mesta na drugega,
- mehanskega učinka sita, ki je posledica por proteinske mreže,
- relativno visoke viskoznosti sirotke (ki je pri 12,5 °C 1,27 krat večja kot viskoznost čiste vode), saj vsebuje raztopljene snovi, ki imajo svoj naboj in tako ovirajo migracijo Na^+ in Cl^- ionov.

2.2.3 Dejavniki, ki vplivajo na stopnjo absorpcije soli iz slanice v sir

Na stopnjo absorpcije soli iz slanice v sir vplivajo različni dejavniki, med katerimi pa je gotovo najpomembnejši gradient v koncentraciji soli med sirom in slanico.

2.2.3.1 Koncentracija slanice in gradient koncentracije

V splošnem velja, da naj bi višja koncentracija slanice povečala stopnjo absorpcije soli v sir. Vendar pa ima slanica s koncentracijo od 5 – 20 % minimalen vpliv na stopnjo difuzije soli v sir, medtem ko s povišanjem koncentracije slanice do 25 % (w/w) ali več, stopnja absorpcije celo pade. Povišanje koncentracije slanice nad 25 % lahko torej povzroči zmanjšanje stopnje absorpcije soli v siru (Melilli in sod., 2003, cit. po Guinee, 2004), kar pa je tudi zelo odvisno od vrednosti pH sira pred soljenjem in temperature soljenja. Opisani fenomen naj bi bil posledica dehidracije površine sira, kar ovira absorpcijo soli (Guinee, 2004).

2.2.3.2 Čas soljenja

Že leta 1937 sta Byers in Price (cit. po Guinee in Fox, 2004) ugotovila, da količina absorbirane soli narašča premosorazmerno s časom soljenja. Vendar pa začne stopnja absorpcije soli po določenem času upadati zaradi zmanjšanja gradienta koncentracije NaCl med sirotko v siru in slanico. Zato velja, da je količina soli, absorbirana v sir, sorazmerna s kvadratnim korenom dolžine soljenja (Geurts in sod., 1974b, cit. po Guinee in Fox, 2004).

2.2.3.3 Temperatura sirnine in slanice

Breene in sod. (1965, cit. po Guinee in Fox, 2004) so na pilotnem modelu soljenja v slanici ugotavljali vpliv različne temperature sirnine na sposobnost absorpcije soli. V poskusu so uporabili vzorce čedar sira (kocke velikosti 1 cm³) s temperaturo 27, 32, 38 in 43 °C ter jih solili v slanici s koncentracijo soli 20 oziroma 25 % (w/w), ki je imela temperaturo enako kot analizirani vzorci sira. Ugotovili so, da je bila absorpcija soli najnižja pri temperaturi 32 °C. Slabšo absorpcijo so zabeležili tudi pri temperaturi 27 in 38 °C, medtem ko je bila pri 43 °C absorpcija soli najvišja. Da je bila absorpcija soli najnižja pri temperaturi 32 °C je posledica izločene maščobe, ki se je v tanki plasti nabrala na površini analiziranih kock sirnine in tako ovirala absorpcijo soli. Pri temperaturi nižji od 32 °C, na primer pri 27 °C,

je bilo te izločene maščobe znatno manj, medtem ko pri temperaturi, višji od 32 °C, na primer pri 38 in 43 °C, postane maščoba vedno bolj tekoča in se razprši po slanici. S povišanjem temperature slanice so potrdili povečano mobilnost NaCl in s tem absorpcijo soli pri sirih gauda (Geurts in sod., 1974b, cit. po Guinee in Fox, 2004; Guinee, 1983, cit. po Guinee in Fox, 2004), ementalskem siru (Chamba, 1988, cit. po Guinee in Fox, 2004), sirih tipa Romano (Guinee, 1983, cit. po Guinee in Fox, 2004, Guinee in Fox, 1986a, cit. po Guinee in Fox, 2004) in pri turškem belem siru (Turhan in Kaletunç, 1992, cit. po Guinee in Fox, 2004).

2.2.3.4 Dimenzija sira

Absorpcija soli se povečuje z povečanjem razmerja med površino in volumnom sira (Breene in sod., 1965, cit. po Guinee, 2004; Gilles, 1976, cit. po Guinee, 2004; Guinee in Fox, 1986a, cit. po Guinee, 2004).

Guinee in Fox (1986b, 1986c, cit. po Guinee, 2004) sta primerjala stopnjo absorpcije soli v slanici pri drobljeni sirnini (na primer sir čedar) ter pri oblikovani sirnini (na primer sir Brick, ementalski sir, sir tipa Romano, siri z modro plesnijo). Izkazalo se je, da je pri drobljeni sirnini do absorpcije soli prišlo na površini večine drobljenih delcev hkrati in tako je bil čas, potreben za doseg določene vsebnosti soli pri drobljeni sirnini krajši kot pri oblikovani sirnini. Čeprav se na prvi pogled zdi, da naj bi imeli, ob enako dolgem soljenju v slanici, manjši siri v povprečju višjo vsebnost soli kot večji siri, pa to velja le v primeru, ko imamo sire enakih oblik in sorazmerij, saj je vnos soli linearno povezan z razmerjem med površino in volumnom sira.

Poleg razmerja površina/volumen sira pa na absorpcijo soli vpliva tudi oblika sira s številom ploskev skozi katere je omogočeno prehajanje soli iz slanice v sir ter z razmerjem med ravno in ukrivljeno površino sira (Geurts in sod., 1980, cit. po Guinee in Fox, 2004; Guinee in Fox, 1983b, 1986a, b, cit. po Guinee in Fox, 2004).

Geurts in sod. (1980, cit. po Guinee in Fox, 2004) so ugotovili, da je pri edamskem siru količina absorbiranega NaCl na cm^2 površine sira večja pri veliki tanki rezini sira kot pri okroglem hlebcu, relativen vnos soli pa se pri okroglem siru zmanjšuje s podaljševanjem časa soljenja in stopnjo ukrivljenosti hlebca sira. V siru tipa Romano s približno enakim

razmerjem med površino in volumnom sira je bila absorpcija soli pri kvadrasti obliki sira višja (volumen: 4000 cm³; tri smeri učinkovite penetracije soli) kot pri cilindrični obliki sira (volumen: 3400 cm³; dve smeri učinkovite penetracije soli).

2.2.3.5 Začetna vsebnost vode v sirnini

Geurts in sod. (1974b, cit. po Guinee in Fox, 2004) so ugotovili, da se količina absorbirane soli v edamskem siru in gaudi poveča, čim večja je začetna vsebnost vode v sirnini, učinek pa še poveča dolžina soljenja v slanici. Do podobnih rezultatov sta prišla tudi Byers in Price (1937, cit. po Guinee in Fox, 2004) pri poskusu s sirom Brick. Potrdila sta teorijo, da se absorpcija soli skozi ravno površino sira linearno poveča s povečano vsebnostjo vode v siru. Beljakovinska mreža veže nase to vodo, zato nabrekne in posledično se poveča velikost por beljakovinske mreže, kar omogoči lažje prehajanje NaCl v sir. Kadar vsebuje sir pred soljenjem v slanici več vode, lahko pričakujemo, da bo med soljenjem izgubil manj vode, glede na težo sira, penetracija soli v siru pa bo večja.

2.2.3.6 pH sirnine in slanice

Pri gaudi in drugih siri, s podobno vsebnostjo vode v sirnini pred soljenjem velja, da nivo absorpcije soli med soljenjem pada z naraščanjem vrednosti pH od 4,7 do 5,7. V praksi je vrednost pH slanice od 5,0 – 5,3 in je podobna vrednosti pH sira pred soljenjem. Zakisanje slanice ima učinek konzervansa in zmanjša možnost deformacije skorje sirov, ki jih povezujemo z neravnovesjem H⁺ ionov, ter vpliva na nivo hidratacije kazeina. Kljub maloštevilnim informacijam o vplivu vrednosti pH na absorpcijo soli lahko sklepamo, da bi prekomerno znižanje vrednosti pH (npr. na 4,6) pripeljalo do precipitacije proteinov in velike izgube vode na površini sirov, kar bi pripeljalo do nastanka debele skorje sirov in zmanjšanega prehoda soli v sir (Geurts in sod., 1980, cit. po Guinee in Fox, 2004).

2.2.4 Vzpostavitev ravnotežja med soljo in vodo v siru po soljenju v slanici

V soljenih siri vsebnost soli pada od skorje proti sredini, medtem ko vsebnost vode upada od sredine proti skorji sira. Zaradi nenehne počasne difuzije soli od skorje proti notranjosti, gradient počasi izginja in na neki stopnji zorenja sira, ki je odvisno od tipa in velikosti sira ter tehnoloških postopkov, dosežemo ravnotežje (Guinee in Fox, 2004).

Absorpcija soli je relativno hiter dogodek, ki traja pri siru čedar od 15 - 30 minut, pri kamembertu 7,5 ur in pri parmezanu do 15 dni. V nasprotju s hitro absorpcijo soli pa je difuzija soli in vode po soljenju ter s tem vzpostavljanje ravnotežja soli v vodi celotne mase sira, počasen proces. Pri siru limburgerski traja ta proces 10 - 12 dni (McDowall in Whelan, 1933, cit. po Guinee in Fox, 2004; Kelly in Marquardt, 1939, cit. po Guinee in Fox, 2004), 8 - 12 tednov pri gaudi (Morris, 1961, cit. po Guinee in Fox, 2004), sirih tipa Brick (Beyers in Price, 1937, cit. po Guinee in Fox, 2004), sirih z modro plesnijo (Godinho in Fox, 1981b, cit. po Guinee in Fox, 2004) in sirih tipa Romano (Guinee in Fox, 1983b, cit. po Guinee in Fox, 2004), 40 tednov pri feti (Georgakis, 1973, cit. po Guinee in Fox, 2004) ter nenazadnje 10 mesecev pri parmezanu (Resmini in sod., 1974, cit. po Guinee in Fox, 2004). Za primerjavo lahko podamo še nekaj podatkov o trajanju difuzije soli po soljenju glede na obliko sira in vsebnosti vode v siru, povzetih po Sutherland (2002, cit. po Guinee in Fox, 2004): 7 - 10 dni pri kamembertu (0,25 kg, s 55 % vode), 4 - 6 tednov pri edamskem siru (2,5 kg okrogel hlebec s 46 % vode), 7 - 9 tednov pri gaudi (10 kg hlebec z 42 % vode) ter več kot 4 mesece za ementalski sir (60 - 130 kg hlebec s 36 % vode). Na podlagi predstavljenih podatkov vidimo, da razlike znotraj in med vrstami sirov nastanejo kot posledica razlik v dimenzijah sira, razmerja med površino in prostornino sira, sestave sira in pogojev soljenja v slanici.

Tako na difuzijo soli med samim soljenjem v slanici kot tudi na difuzijo soli med zorenjem oziroma skladiščenjem ter posledično na vzpostavitev ravnotežja soli in vodne faze v hlebcu sira vplivajo (Guinee in Fox, 2004):

- Velikost in oblika sira, ki določata razdaljo med skrajno zunanjo cono, z visoko vsebnostjo soli in skrajno notranjo cono, z nizko vsebnostjo soli na koncu soljenja (Guinee in Fox, 1986c, cit. po Guinee in Fox, 2004),
- temperatura,
- koncentracijski gradient med conama,
- sestava sira.

2.3 KONTROLA RASTI MIKROORGANIZMOV

Verjetno najbolj rigorozen primer uporabe NaCl za zaviranje rasti mikroorganizmov je pri proizvodnji sira domiati, ki ga izdelujejo iz mleka, kateremu dodajo 12 - 15 % NaCl (Naguib in sod., 1979, cit. po Guinee in Fox, 2004; Sußmuth, 1998, cit. po Guinee in Fox, 2004). Pri večini drugih vrst sirov pa NaCl dodajajo po oblikovanju sirnine in ima zelo pomembno vlogo pri uravnavanju in kontroli mikroflore sira.

Najosnovnejši prispevek NaCl je regulacija vrednosti pH sira, ki nato neposredno vpliva na zorenje in teksturo sira. Vrednost pH sira lahko uravnavamo z (Guinee in Fox, 2004):

- zmanjšanjem količine zaostale laktoze v sirnini tako, da spiramo sirnino z vodo, kot je pogosto navada pri proizvodnji sirov tipa gauda, Tallegio in cottage;
- dodajanjem soli.

Uporaba soli, skupaj s sposobnostjo sirov, da delujejo kot pufri za uravnavanje končne vrednosti pH, je skoraj izključno omejena le na proizvodnjo angleških tipov sira, ki so suho soljeni, na primer čedar, Cheshire in Stilton. Pri siri, izdelanih po čedar tehnologiji, pH doseže končno vrednost že pred stiskanjem, zato te sire, za ohranitev vrednosti pH, solijo takoj po fermentaciji in mletju in jih šele nato stiskajo. Pri večini ostalih, če ne kar pri vseh ostalih tipih sirov, pa sirnino prenesejo v oblikovalca že, ko je vrednost pH še vedno zelo visoka (več kot 6) in se razvoj kisline nadaljuje še med stiskanjem. Ker koncentracija soli nad 1,5 % (w/w) zavira aktivnosti starterske kulture, te sire navadno solimo s potapljanjem v slanico ali z vtiranjem suhe soli po površini sira (Guinee in Fox, 2004).

Siri tipa čedar vsebujejo navadno od 0,6 – 1,0 % laktoze (Turner in Thomas, 1980, cit. po Guinee in Fox, 2004). Zaradi delovanja starterske kulture, se ta laktoza porabi že v začetnih fazah zorenja, količina porabljene laktoze pa je odvisna od vsebnosti soli v vodni fazi sirnine in tolerance starterske kulture do soli.

Irvine in Price (1961, cit. po Guinee in Fox, 2004) sta ugotovila, da je nizka koncentracija NaCl (1 %, w/w) stimulatивно ali vsaj ne-negativno vplivala na tvorbo kisline pri šestih komercialnih mlečnokislinskih kulturah, gojenih v 10 % rekonstituiranem posnetem

mleku, medtem ko je visoka koncentracija NaCl (≥ 2.5 %) tvorbo kisline močno zavrla. V isti študiji sta avtorja namreč pokazala, da so pri 5 % koncentraciji soli vse starterske kulture kislino sicer tvorile, a le v obsegu od 45 - 55 % običajne količine. Nadalje sta vzorce sirnine (454 g), z vrednostjo pH približno 6,05, odvzete po drenaži sirotke, za 2 uri potopila v slanico s koncentracijo soli od 0 - 5 % (w/w) in temperaturo 38 °C. Pri tem sta predpostavila, da se bo razmerje soli v vodni fazi, med slanico in sirnino hitro vzpostavilo zaradi visoke temperature in odprte mreže sirnine. Največji padec vrednosti pH sta zabeležila v slanici s koncentracijo NaCl 2 %, medtem ko pri slanici s koncentracijo NaCl 5 % vrednost pH ni padla pod 5,9. Vrednost pH sirnine, ki je bila v slanici s 4 % vsebnostjo NaCl, je bila podobna vrednosti pH sirnine, ki je bila potopljena v vodi (0 % NaCl). Sirnina je v slanicah z vsebnostjo NaCl 0 %, 2 %, 4 % oz. 5 % dosegla vrednosti pH 5,65, 5,53, 5,62 in 5,90. Rezultati kažejo, da je aktivnost starterske kulture najbolj stimulirana v slanici z 2 % vsebnostjo NaCl. Irvine in Price sta predpostavila, da naj bi laktokoki v čedar siru uspešno rasli do ≤ 4 % soli v vodni fazi in da je zaviralni učinek NaCl v sirnini manjši kot v rekonstituiranem posnetem mleku. To domnevo so podprli Schroeder in sod. (1988, cit. po Guinee in Fox, 2004), ki so odkrili, da ima vsebnost soli v vodni fazi v območju od 0,18 do 4,1 % zanemarljiv učinek na populacijo starterske kulture, sestavljeno iz šestih sevov *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, v 1 dan starem čedar siru.

Vrednosti pH, pri kateri sta v svojem poskusu Irvine in Price dodala sol v rekonstituirano posneto mleko (6,7) oz. sirnino (6,05) sta bili višji, kot je vrednost pH, pri kateri se v praksi soli polnomasten čedar (5,25 – 5,35), kar morda ne izraža pravega skupnega zaviralnega učinka soli in nizke vrednosti pH. Kakorkoli, vrednost pH polmastnega čedarja, soljenega pri vrednosti pH 5,75 namesto pri 5,3 za povečanje vsebnosti vode v sirnini, je padla po prvem dnevu na 5,2, kar je podobna vrednost pH kot pri polmastnem čedarju, če so ga solili pri vrednosti pH 5,3. Ta opazovanja so potrdile ugotovitve Irvine in Price (1961, cit. po Guinee in Fox, 2004), da ima koncentracija soli v vodi do 4 % le malo zaviralnega učinka na startersko kulturo laktokokov v sirnini čedarja, kar pomeni, da vrednost pH čedarja kontrolira kombinacija soljenja in puferne kapaciteta sira.

Iz teh študij lahko sklepamo, da do zaviranja starterske kulture pride v zelo ozkem območju količine soli v vodni fazi. Ker se občutljivost starterskih kultur za sol razlikuje, je

vpliv koncentracije NaCl na tvorbo kisline v siru po soljenju odvisna od uporabljene starterske kulture. Velja na primer, da so različni sevi podvrste *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* pri vrednosti pH 5,3 na splošno bolj tolerantni za sol, kot sevi podvrste *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, precejšna razlika v občutljivosti za sol pa vlada tudi med posameznimi sevi znotraj podvrste *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Martley in Lawrence, 1972, cit. po Guinee in Fox, 2004; Turner in Thomas, 1980, cit. po Guinee in Fox, 2004).

Gomes in sod. (1998) so proučevali rast in preživetje bakterij *Bifidobacterium lactis* in *Lactobacillus acidophilus* v poltrdem siru gauda. Med devet tedenskim zorenjem pri temperaturi 13 °C so vzorčili sir na različnih osnih lokacijah (zunanj vzorec, ki sega od skorje sira do 3 cm, srednji vzorec in notranji vzorec, ki je sredica sira) in rezultate analizirali z nelinearno regresijsko analizo. Povprečni odstotek soli je bil med 2 – 4 %. Število živih probiotičnih sevov je počasi upadalo v prvih treh tednih zorenja, kasneje pa je bil upad večji. Padanje števila mikroorganizmov je bilo hitrejše v vzorcih, odvzetih iz zunanosti sira.

2.4 STARTERSKE KULTURE V SIRARSTVU

Starterske kulture so definirane kot tekoče, zamrznjene ali liofilizirane mono-, združene ali mešane kulture živih organizmov z encimskim potencialom, ki v pogojih proizvodnje sira odločilno vplivajo na oblikovanje lastnosti izdelka – fermentiranega živila (Smole-Možina in Raspor, 1994).

Startersko kulturo dodamo v mleko pred usirjanjem. Vrsta in količina sta odvisni od načina izdelave oz. vrste sira. Njena vloga kot dodatek mleku je, da preraste mikrofloro mleka in pravilno usmerja fermentacijske procese. Poglavitne naloge starterske kulture so (Slanovec, 1982):

- proizvodnja kisline,
- proteoliza,
- lipoliza,

- tvorba plina in arome,
- inhibicija tehnološko škodljivih mikroorganizmov.

Streptococcus thermophilus spada v termofilno skupino mlečnokislinskih bakterij. V tehnologiji švicarskih in italijanskih sirov, kot sta ementalski sir in mocarela kakor tudi pri izdelavi klasičnega jogurta, bakterije vrste *Str. thermophilus* ponavadi uporabljamo skupaj z eno ali več vrstami iz rodu *Lactobacillus* (Pearce in Flint, 2002).

Str. thermophilus je po Gramu pozitivna bakterija, okrogle do jajčaste oblike, premera 0,7 – 0,9 µm in se pojavlja v parih in verižicah, ki so lahko zelo dolge. Optimalna temperatura za rast je med 40 – 45 °C, minimalna med 20 – 25 °C, maksimalna pa med 47 – 50 °C. V ustreznih razmerah se zelo hitro razmnožuje. Generacije se izmenjujejo na 20 minut. Fermentira sladkorje kot so laktoza, fruktoza, saharoza in glukoza v mlečno kislino. Je relativno občutljiv za antibiotike in ima nizko proteolitično aktivnost (Pearce in Flint, 2002).

Vrsta *Str. thermophilus* je močno prilagojena na razmere v mleku in mlečnih izdelkih, zato je praktično ne najdemo v drugih ekoloških nišah. Za svojo rast potrebujejo proste aminokislino, kot so glutaminska kislina, histidin, metionin, cistein, valin, leucin, izoleucin, triptofan, arginin in tirozin. Ta bakterija raste zelo dobro v mediju, ki vsebuje hidrolizirane proteine. Je homofermentativna bakterija, ki fermentira laktozo preko Embden–Meyerhof poti (EMP) do L (+) laktata (Pearce in Flint, 2002).

Str. thermophilus je kot sestavni del termofilnih starterskih kultur v siri odgovoren za začetno proizvodnjo kislin. Ker je *Str. thermophilus* nezmožen presnavljati galaktozo in se le-ta kopiči v siru, ga uporabljajo skupaj s termofilnimi laktobacili (*Lb. helveticus*), ki to galaktozo uporabi in zagotovi, da so proizvodni pogoji izdelave fermentiranega izdelka optimalni (Pearce in Flint, 2002).

3 MATERIAL IN METODE

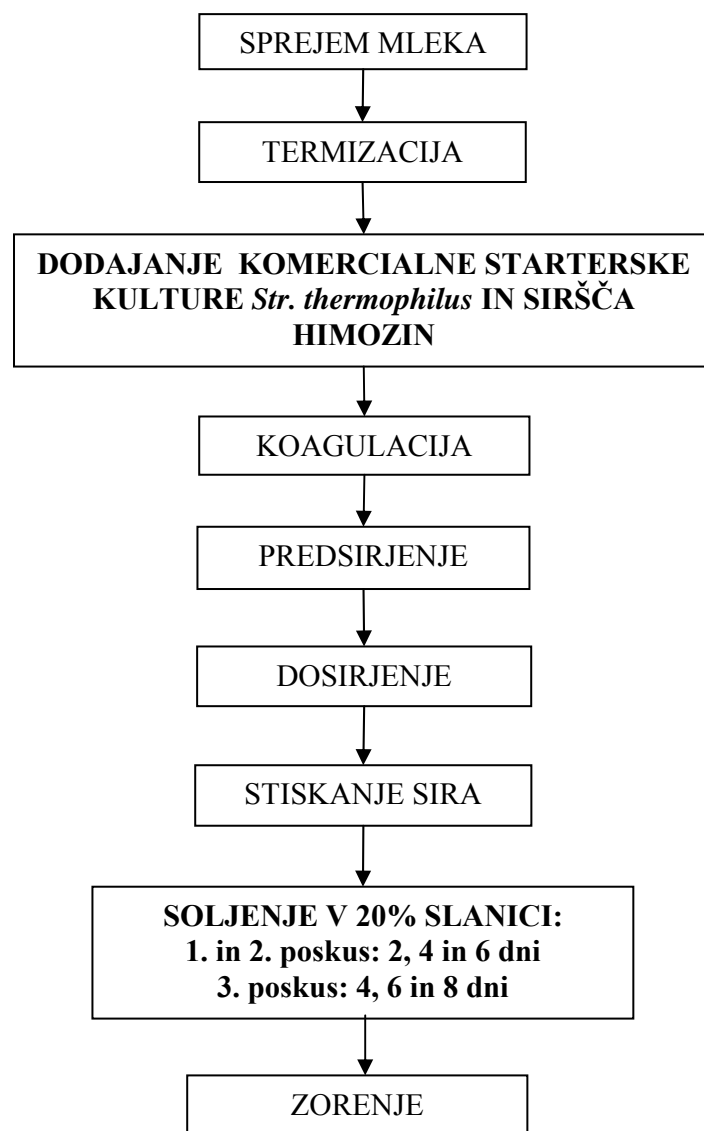
3.1 NAČRT POSKUSA

Poskus sirjenja smo izvedli trikrat. Shema tehnološkega postopka izdelave sira je prikazana na sliki 2. Med samo izdelavo sira smo dodali komercialno startersko kulturo *Str. thermophilus* TH4 in sirišče himozin.

Sire, izdelane v prvih dveh sirjenjih smo v 20 % slanici solili 2, 4 in 6 dni. Sire iz tretjega sirjenja pa smo solili 4, 6 in 8 dni. Ob teh dnevih smo sire vzorčili s sirarskim svedrom in jih shranili v hladilniku (4 – 8 °C).

Pri mikrobiološki analizi ugotavljanja velikosti populacije starterske kulture *Str. thermophilus* v odvisnosti od dolžine soljenja, smo uporabili gojišče M17.

Izvedli smo kemijsko analizo merjenja vsebnosti kloridov v vzorčkih sira v odvisnosti od dolžine soljenja.



Slika 2: Shema tehnološkega postopka izdelave sira

3.2 MATERIAL

3.2.1 Mleko

Za izdelavo sira smo uporabili surovo mleko s farme Jable. Mleko smo pred sirjenjem termizirali pri 65 °C za 30 min.

3.2.2 Sirišče

Uporabili smo sirišče himozin (CHY-MAX™ Powder Extra, Chr. Hansen, Danska). Po navodilu proizvajalca smo dodali 3 g sirišča na 100 litrov mleka. Sirišče smo hranili v embalaži proizvajalca. Za izdelavo sira iz 80 litrov mleka smo zatehtali 2,4 g sirišča, ga raztopili v 30 ml mlačne vode ter vmešali v termizirano in na 32 °C ohlajeno mleko.

3.2.3 Starterska kultura

Komercialno startersko kulturo *Str. thermophilus* TH4 v liofilizirani obliki smo hranili pri temperaturi -20 °C v embalaži proizvajalca (Chr. Hansen, Danska). Ker je bila bakterija v obliki DVS (direct vat set), smo le odtehtali ustrezno količino (1,6 g/80 l) ter jo vmešali v termizirano in ohlajeno mleko.

3.2.4 Gojišča in raztopine za razredčevanje

3.2.4.1 Raztopine za razredčevanje

3.2.4.1.1 Ringerjeva raztopina

Ringerjevo raztopino smo pripravili z uporabo Ringerjevih tablet (Merck, Darmstadt, Nemčija), ki smo jih raztopili v vodi in uravnavali pH na 6,9 (25 °C).

Pripravljeno raztopino smo razdelili po 9 ml v epruvete in jih sterilizirali 15 minut pri temperaturi 121 °C.

Raztopino smo uporabljali kot razredčevalno raztopino pri mikrobioloških analizah.

3.2.4.1.2 Raztopina Na-citrata

Raztopino Na-citrata smo naredili po standardu (IDF Standard 122B:1992).

Preglednica 1: Priprava raztopine Na-citrata

Sestavine	Količina
Na-citrat ($\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$)	20 g
Destilirana voda (H_2O)	1000 ml

Zatehtano količino Na-citrata (40 g) smo raztopili v 2000 ml vode s segrevanjem na 45 – 50 °C in uravnali vrednost pH na 7,5 (25 °C). Raztopino smo razdelili v 500 ml stekleničke in avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

V raztopini Na-citrata smo homogenizirali vzorce sterilno naribanega sira.

3.2.4.2 Trdno gojišče M17

Zatehtali smo 55 g trdnega gojišča M17 v prahu (Merck), ga raztopili v 1 litru destilirane vode ter avtoklavirali 15 minut pri 121 °C.

Trdno gojišče M17 smo uporabljali za ugotavljanje velikosti populacije starterske kulture *Str. thermophilus* v vzorcih sirov.

3.2.5 Kemikalije za določanje vsebnosti kloridov v vzorcih sira

Za določitev vsebnosti kloridov v sirih smo uporabili referenčno metodo ISO 2970-1974.

- 25 ml 0,1 M raztopine srebrovega nitrata (AgNO_3)
- 25 ml koncentrirane dušične kisline (HNO_3)
- 15 -20 ml kalijevega permanganata (KMnO_4)
- 5 ml amonijevega feri sulfata (nasičena raztopina $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$)
- 100 ml hladne destilirane vode
- Kalijev ali amonijev tiocianat (0,1 M KSCN ali 0,1 M NH_4SCN)
- Glukoza ali oksalna kislina

3.3 METODE

3.3.1 Tehnološki postopek izdelave sira

80 l mleka smo termizirali (65 °C, 30 min), ohladili na 32 °C, dodali komercialno startersko kulturo *Str. thermophilus* TH4 in sirišče ter pustili 30 - 35 minut, da je mleko koaguliralo. Usirjanju je sledila obdelava koaguluma, ki smo ga najprej razrezali s sirarsko sabljo (trakovi širine 2,5 cm) ter ga s harfo drobili do velikosti zrn 0,5 cm. Le-ta smo ob stalnem mešanju segrevali do temperature 42 °C, da smo dobili sirna zrna ustrezne klenosti, s katerimi smo napolnili oblikovalca. Temu je sledilo stiskanje, ki smo ga izvedli z obtežitvijo 2 kg/kg sira. Po stiskanju smo sire potopili v slanico z 20 % koncentracijo NaCl in sicer pri prvih dveh sirjenjih smo sire solili 2, 4 oz. 6 dni ter pri tretjem poskusu za 4, 6, oz. 8 dni. Tehnološki postopek izdelave sira je prikazan na sliki 2.

3.3.2 Merjenje vrednosti pH in temperature

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

Temperaturo sirnine smo merili s termometrom med samim sirjenjem, tik pred stiskanjem ter po 1 uri stiskanja.

3.3.3 Vzorčenje sira

Za odvzem vzorca smo uporabili sirarski sveder. Vzorec je predstavljal sirnino od skorje do sredine sira, ki smo ga nato razdelili na tri enake dele: zunanja, srednja in notranja tretjina ter jih ločeno analizirali. Vzorci so bili pri prvih dveh poskusih odvzeti po 2, 4 in 6 dneh soljenja, pri tretjem poskusu pa so bili vzorci odvzeti po 4, 6 in 8 dneh soljenja.

Mikrobiološke analize ugotavljanja velikosti mikrobne populacije starterske kulture TH4 smo v vzorcih sirov opravili neposredno po vzorčenju, vzorce sirov za kemijsko analizo določanja vsebnosti kloridov pa smo do izvedbe analize hranili v hladilniku.



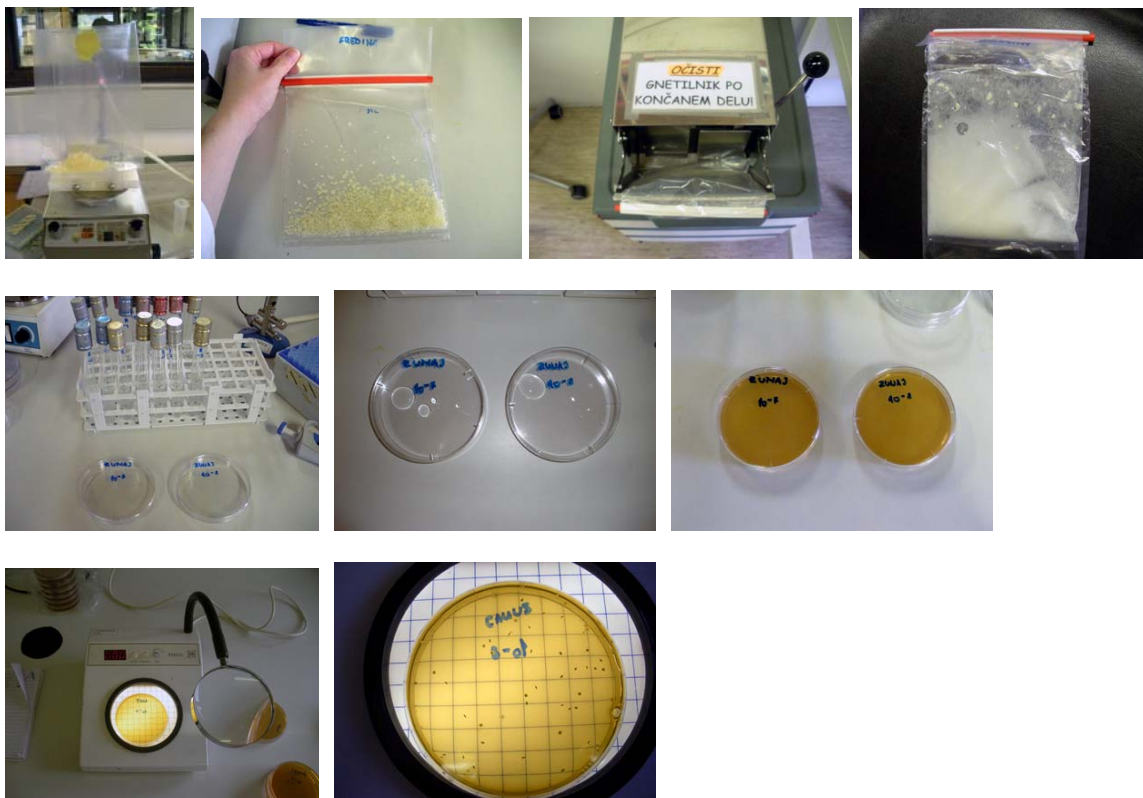
Slika 3: Odvzem vzorca s sirarskim svedrom (Foto: Š. Vukovac, 2010)

3.3.4 Mikrobiološka analiza vzorcev

Ugotavljali smo velikost populacije *Str. thermophilus* v vzorcih sirov po dveh, štirih, šestih in osmih dneh soljenja v 20 % slanici. Da smo poznali tudi začetno velikost populacije TH4, smo vzorce sirov analizirali še neposredno pred soljenjem.

3.3.4.1 Priprava vzorcev

Vsi postopki mikrobiološke analize so potekali v aseptičnem okolju, uporabljeni materiali so bili predhodno sterilizirani. Posamezne vzorce smo razdrobili, zatehtali, 10-krat razredčili z dodatkom raztopine Na-citrata, jih 3 min homogenizirali v gnetilniku BagMixer® 400 (Interscience, Francija) in tako dobili 10-kratne razredčitve vzorcev ($R=10^{-1}$). S pomočjo Ringerjeve raztopine smo z razredčevanjem nadaljevali še do razredčitve 10^{-6} . Primerne razredčitve vzorcev smo cepili na trdno gojišče M17 in nacepljeno gojišče inkubirali 48 ur, pri 42 °C, v aerobnih pogojih. Po končani inkubaciji smo prešteli zrasle kolonije s pomočjo elektronskega števca (EŠKO, 7L, LABO Ljubljana).



Slika 4: Potek mikrobiološke analize vzorcev sira (Foto: Š. Vukovac, 2010)

3.3.4.2 Kvantitativna določitev mikroorganizmov

Ko smo po končani inkubaciji prešteli izrasle kolonije, smo število mikroorganizmov (N) na gram sira izračunali po naslednji formuli (IDF standard 100B:1991):

$$N = \frac{\sum c}{(n_1 + 0.1 \times n_2) \times d}$$

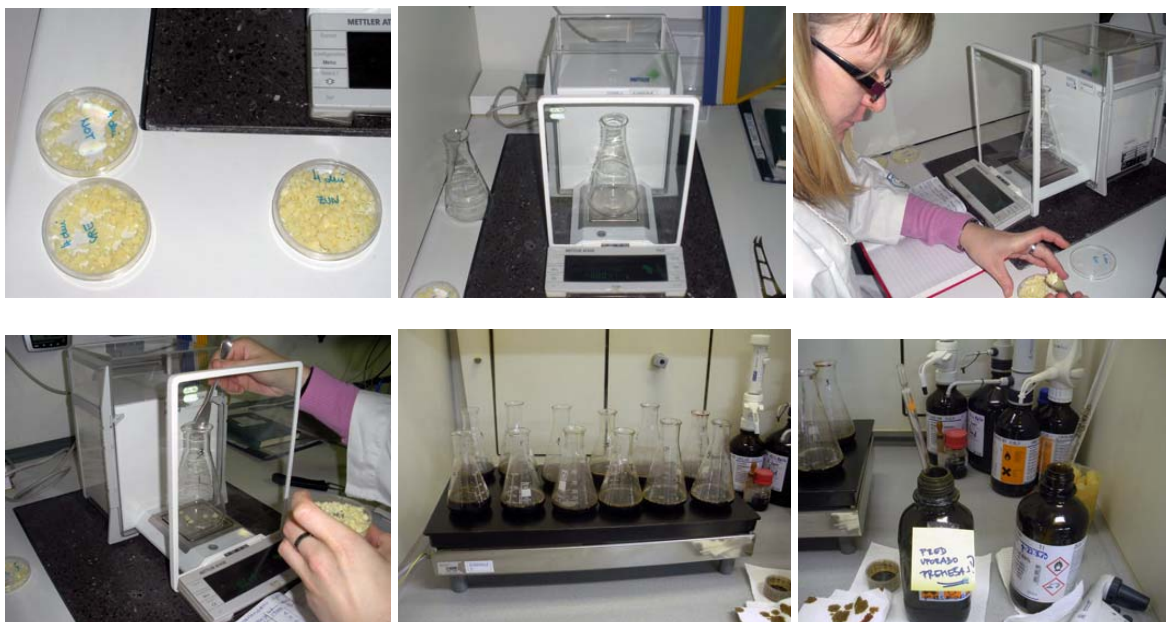
- Σc vsota vseh kolonij zraslih na ploščah, ki vsebujejo 10 do 300 kolonij
- n_1 število plošč, uporabljenih v prvi razredčitvi
- n_2 število plošč, uporabljenih v drugi razredčitvi
- d recipročni razredčitveni faktor najnižje razredčitve

3.3.5 Določanje vsebnosti kloridov

Določili smo vsebnost kloridov v vzorcih sira po referenčni metodi ISO 2970-1974.

3.3.5.1 Postopek

Odtehtali smo 2-3 g vzorca na mg natančno in mu dodali 25 ml 0,1 M raztopine srebrovega nitrata in 25 ml koncentrirane dušične kisline ter premešali. Mešanico smo segreli na zmernem ognju do vrenja, med vrenjem dodali 10 ml kalijevega permanganata in pustili, da je vsebina rahlo vrela. Ko se je raztopina razbarvala, smo dodali še kalijev permanganat ter ga dodajali toliko časa, dokler se raztopina ni več razbarvala. Presežek kalijevega permanganata smo odstranili z dodatkom majhne količine glukoze. Vzorec smo razredčili s 100 ml hladne destilirane vode in dodali 5 ml amonijevega feri sulfata ter temeljito premešali. Presežek srebrovega nitrata smo titrirali z raztopino 0,1 M tiocianata. S titracijo smo končali, ko se je raztopina obarvala rdeče-rjavo in je bila barva obstojna okrog 30 sekund.



Slika 5: Potek kemijske analize določanja vsebnosti kloridov v sirihi (Foto: Š. Vukovac, 2010)

3.3.5.2 Izračun

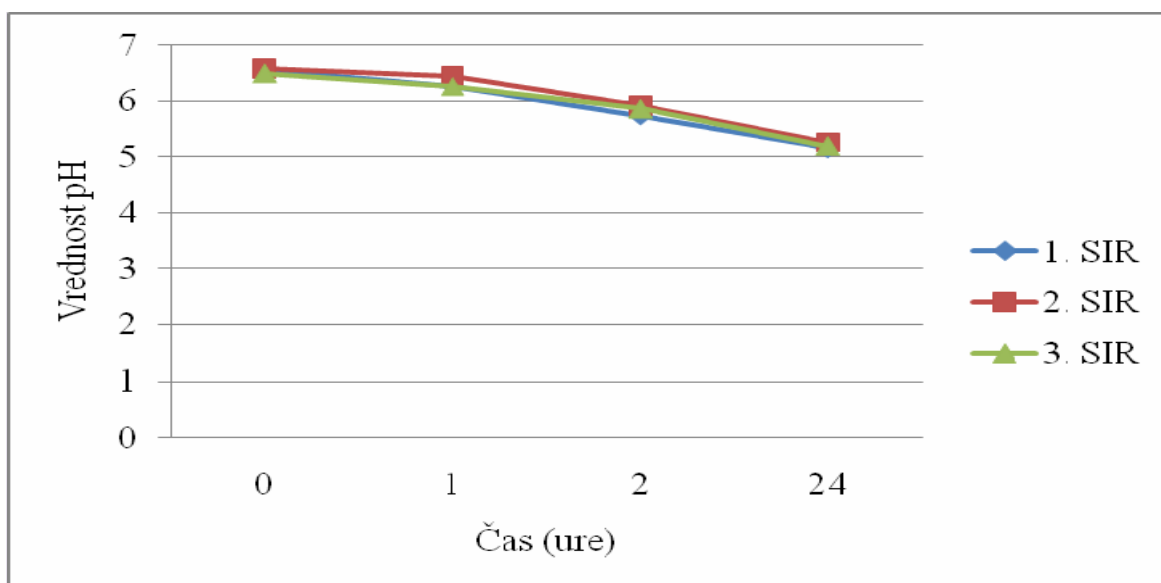
$$\%NaCl = \frac{0.585 * (a - b)}{c}$$

- a...količina dodanega AgNO₃ (25 ml)
- b...poraba ml tiocianata pri titraciji vzorca
- c...masa vzorca sira v gramih

4 REZULTATI

4.1 VREDNOSTI pH SIROV PRED, MED IN PO STISKANJU

Za starterske kulture je zelo pomembna sposobnost hitra acidifikacija, ki preprečuje razvoj neželenih mikroorganizmov in vpliva na oblikovanje organoleptičnih lastnosti sira. Spremljali smo sposobnost acidifikacije komercialne starterske kulture *Str. thermophilus* TH4. Sirjenja so potekala pod enakimi pogoji. Izmerjene vrednosti pH pred, med in po stiskanju so podane v prilogi A. Na sliki 6 je prikazan časovni potek padanja vrednosti pH pred, med (po 1 uri, po 2 urah) in po stiskanju sira, izdelanega s komercialno startersko kulturo *Str. thermophilus* TH4.

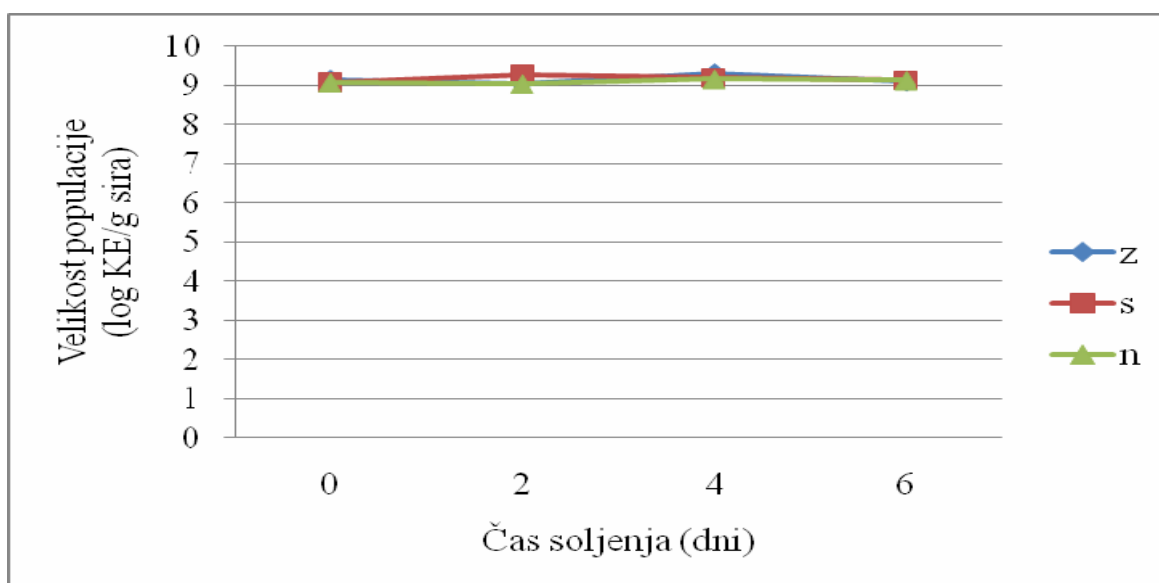


Slika 6: Vrednosti pH sirov pred, med (po 1 uri, po 2 urah) in po stiskanju pri prvem, drugem in tretjem sirjenju

Iz rezultatov, ki smo jih dobili med spremljanjem vrednosti pH pred, med in po stiskanju, smo ugotovili, da je vrednost pH sira padala primerno hitro glede na čas stiskanja. Ugotovimo lahko, da ima starterska kultura TH4 zelo dobro fermentacijsko sposobnost in sposobnost hitre acidifikacije, saj je dosegla povprečno vrednost pH 5,2 v 24 urah.

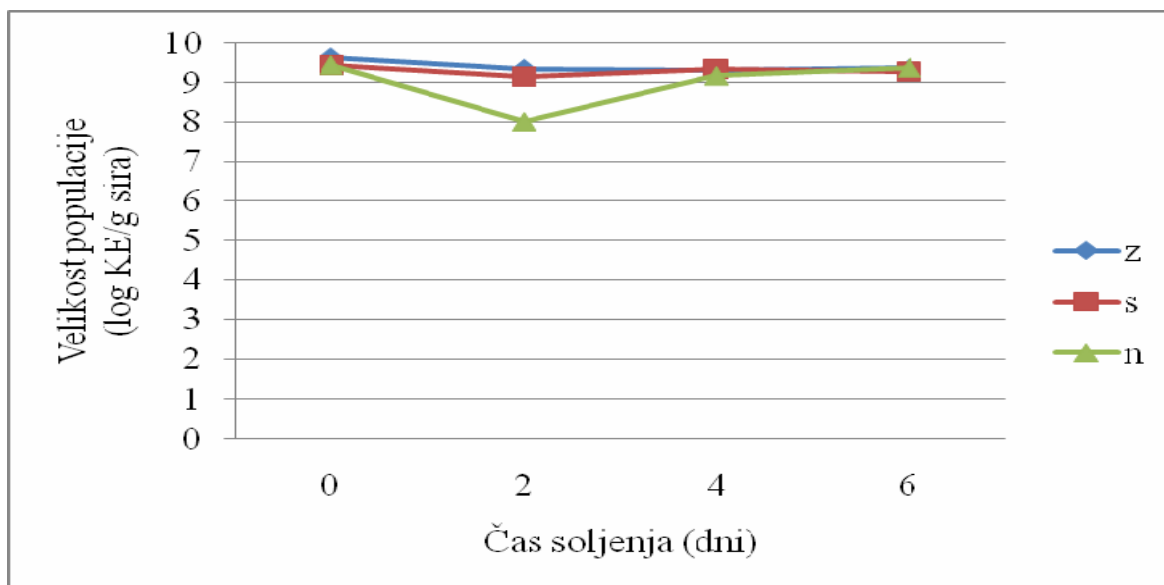
4.2 VELIKOST POPULACIJE *Str. thermophilus* V VZORCIH SIRA

Gibanje velikosti populacije *Str. thermophilus* smo v vzorcih sira spremljali pred soljenjem ter po 2, 4 ter 6 oz. 8 dneh soljenja pri prvem in drugem oz. tretjem poskusu ter rezultate podali glede na lego vzorčene tretjine: velikost populacije v zunanji (z), srednji (s) oz. notranji tretjini (n) (Priloge B1, B2 in B3). Rezultati so prikazani na slikah 7, 8 in 9. Soljenje je potekalo pod enakimi pogoji.



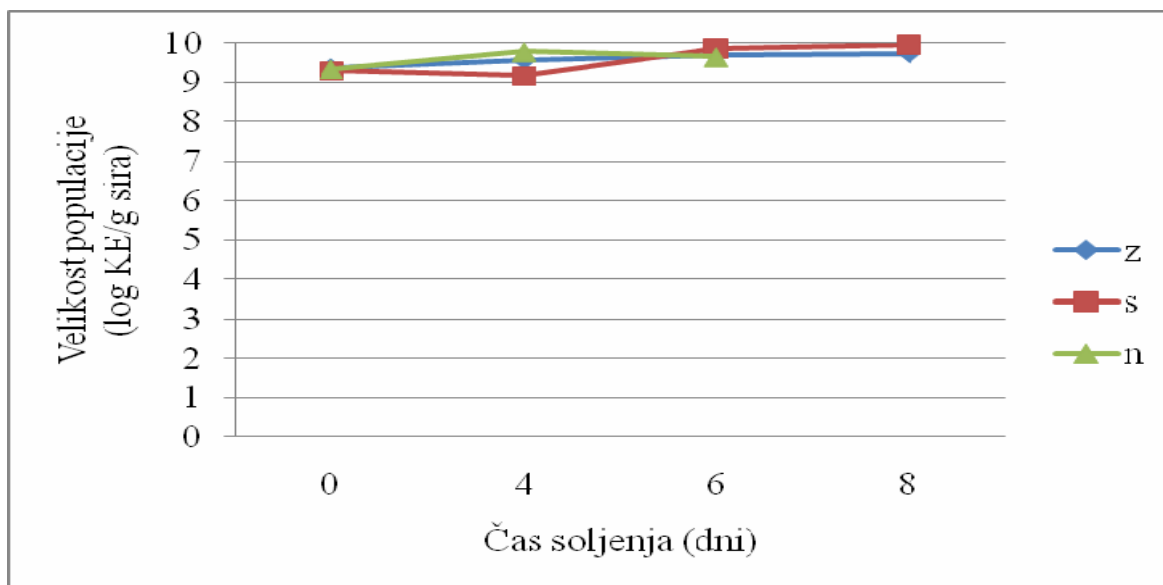
Slika 7: Gibanje populacije *Str. thermophilus* v vzorcih sira pred soljenjem ter po 2, 4 in 6 dneh soljenja pri prvem poskusu (z = zunanja tretjina, s = srednja tretjina, n = notranja tretjina)

V prvem poskusu je velikost populacije seva TH 4 ostala približno enako velika med celotnim poskusom, pred soljenjem kakor tudi med soljenjem, ne glede na lego vzorčene tretjine; zunanja, srednja ali notranja. Povprečno število bakterij starterske kulture je bilo $1,4 \times 10^9$ KE/g sira tekom prvega poskusa. Opažena so le rahla nihanja v velikosti populacije, katera lahko zanemarimo, pripišemo pa jih lahko kvečjemu vzorčenju, saj je ta korak zelo zahteven, ker gre za popolnoma ročen postopek vzorčenja živila, ki praviloma ni popolnoma homogen in enoten.



Slika 8: Gibanje populacije *Str. thermophilus* v vzorcih sira pred soljenjem ter po 2, 4 in 6 dneh soljenja pri drugem poskusu (z = zunanja tretjina, s = srednja tretjina, n = notranja tretjina)

Tudi v drugem poskusu so vidna rahla nihanja. Velikost populacije seva TH 4 je ostala približno enako velika med celotnim poskusom, pred soljenjem kakor tudi med soljenjem, ne glede na lego vzorčene tretjine; zunanja, srednja ali notranja.

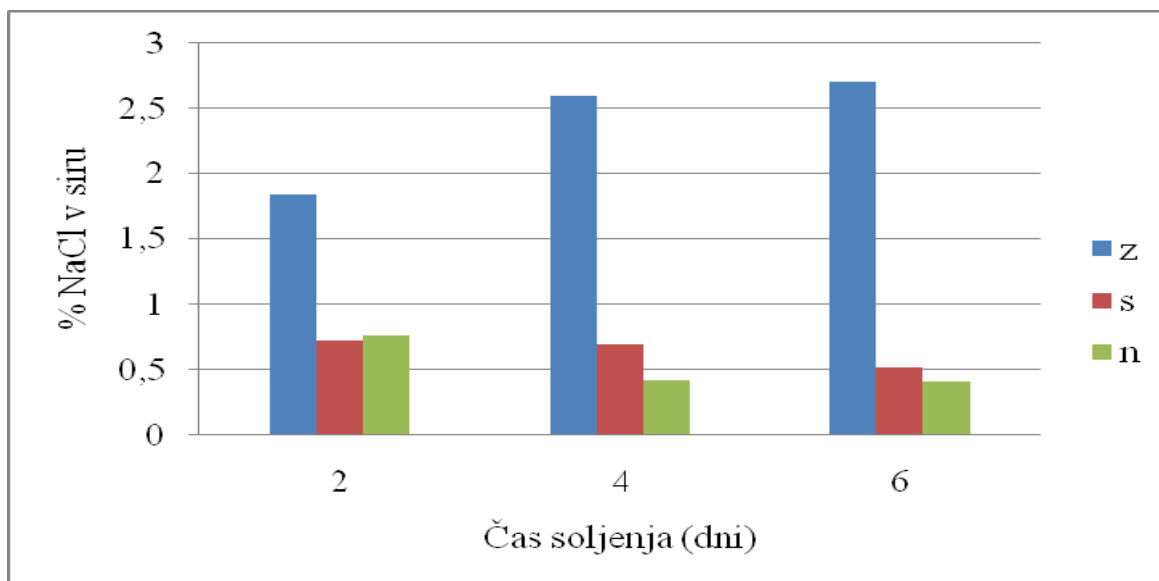


Slika 9: Gibanje populacije *Str. thermophilus* v vzorcih sira pred soljenjem ter po 4, 6 in 8 dneh soljenja pri tretjem poskusu (z = zunanja tretjina, s = srednja tretjina, n = notranja tretjina)

Pri tretjem poskusu smo podaljšali čas soljenja in sicer smo sire solili 4, 6 in 8 dni. Izkazalo se je, da tudi 8-dnevno soljenje ni zavrlo aktivnosti starterske kulture, ne glede na analizirano tretjino. Tudi v tretjem poskusu je bila velikost populacije seva TH4 pred soljenjem v vseh analiziranih tretjinah primerljiva velikosti populacij v prvem in drugem poskusu pred soljenjem, in sicer okoli $2,0 \times 10^9$ KE/g sira (Priloge B1, B2 in B3). Po osmih dneh soljenja opazimo precejšen porast populacije TH4, predvsem v notranji tretjini, v kateri smo ugotovili $>10^{10}$ KE/g sira.

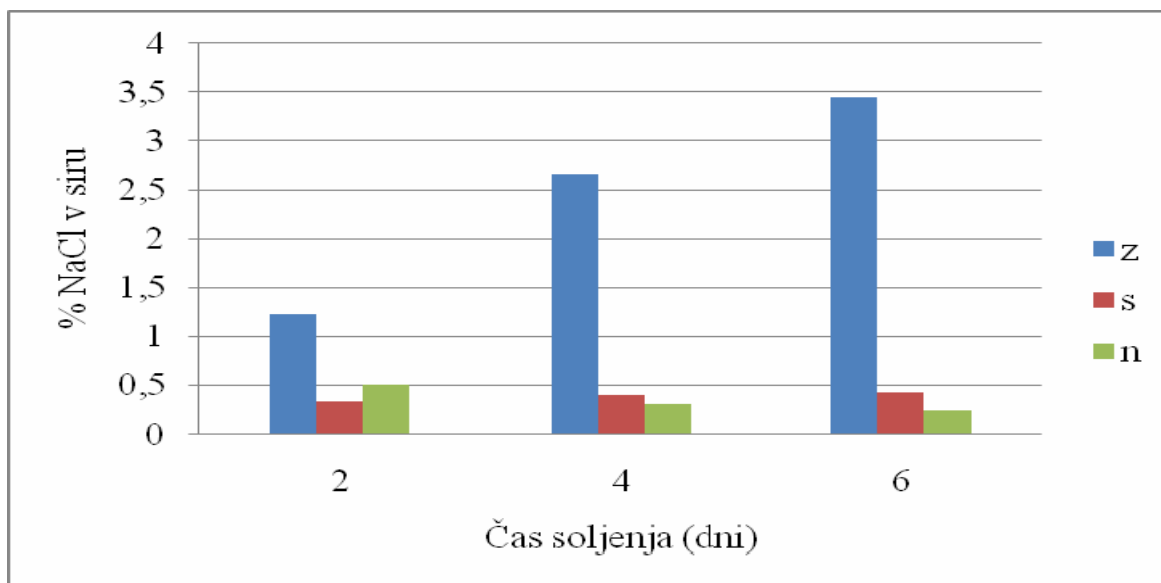
4.3 KONCENTRACIJA SOLI V VZORCIH SIRA

Količina absorbirane soli narašča premo sorazmerno s časom soljenja. Vsebnosti NaCl v vzorcih sira smo ugotavljali v paralelkah, povprečje obeh paralelk pa je predstavljal naš rezultat. Na slikah 10 in 11 so prikazani rezultati vpliva 2, 4 in 6 dnevnega soljenja na % NaCl v sirih v prvem in drugem poskusu, glede na lego vzorca (zunanji, srednji in notranji del), na sliki 12 pa so prikazani rezultati vpliva 4, 6 in 8 dnevnega soljenja na % NaCl v sirih v tretjem poskusu, glede na lego vzorca (zunanji, srednji in notranji del). Soljenje je potekalo pod enakimi pogoji. Rezultati določitev % NaCl v vzorcih sira pri prvem, drugem in tretjem poskusu so prikazani v prilogah C1, C2 in C3.



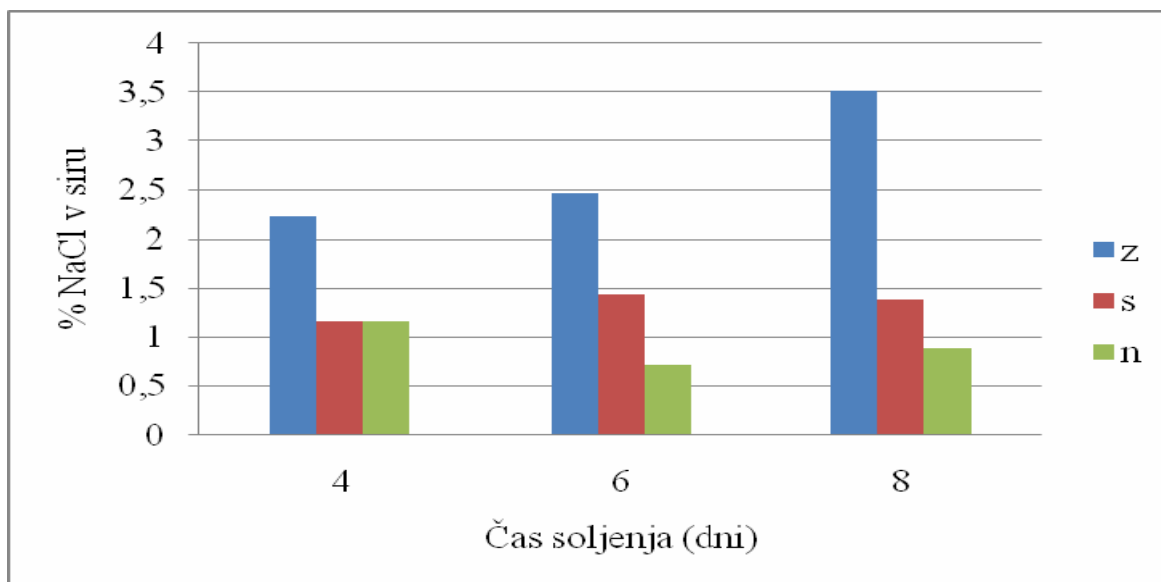
Slika 10: Vpliv časa soljenja na % NaCl v siru pri prvem poskusu (z = zunanja tretjina, s = srednja tretjina, n = notranja tretjina)

Rezultati prvega poskusa so pokazali, da se v zunanjem delu vzorca % NaCl premo sorazmerno s časom soljenja povečuje. V srednjem in notranjem delu vzorca pa je % NaCl precej manjši kot v primerjavi z zunanjim delom in nekoliko niha. Menimo, da opažena rahla nihanja v velikosti populacij lahko zanemarimo, pripišemo pa jih lahko kvečjemu vzorčenju, saj je ta korak zelo zahteven, ker gre za popolnoma ročen postopek vzorčenja živila, ki praviloma ni popolnoma homogen in enoten.



Slika 11: Vpliv časa soljenja na % NaCl v siru pri drugem poskusu (z = zunanja tretjina, s = srednja tretjina, n = notranja tretjina)

Tudi pri drugem poskusu smo, podobno kot v prvem poskusu ugotovili, da samo v zunanji tretjini zasledimo sorazmerno rast % NaCl s časom soljenja, medtem ko je v srednji in notranji tretjini % NaCl precej manjši in s časom soljenja nekoliko niha.

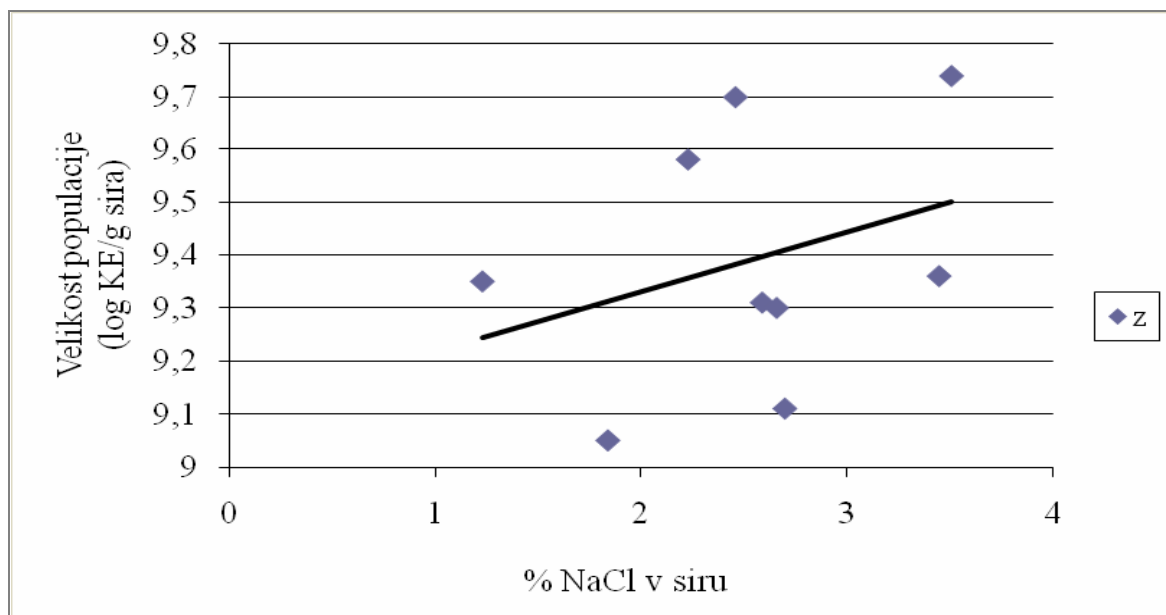


Slika 12: Vpliv časa soljenja na % NaCl v siru pri tretjem poskusu (z = zunanja tretjina, s = srednja tretjina, n = notranja tretjina)

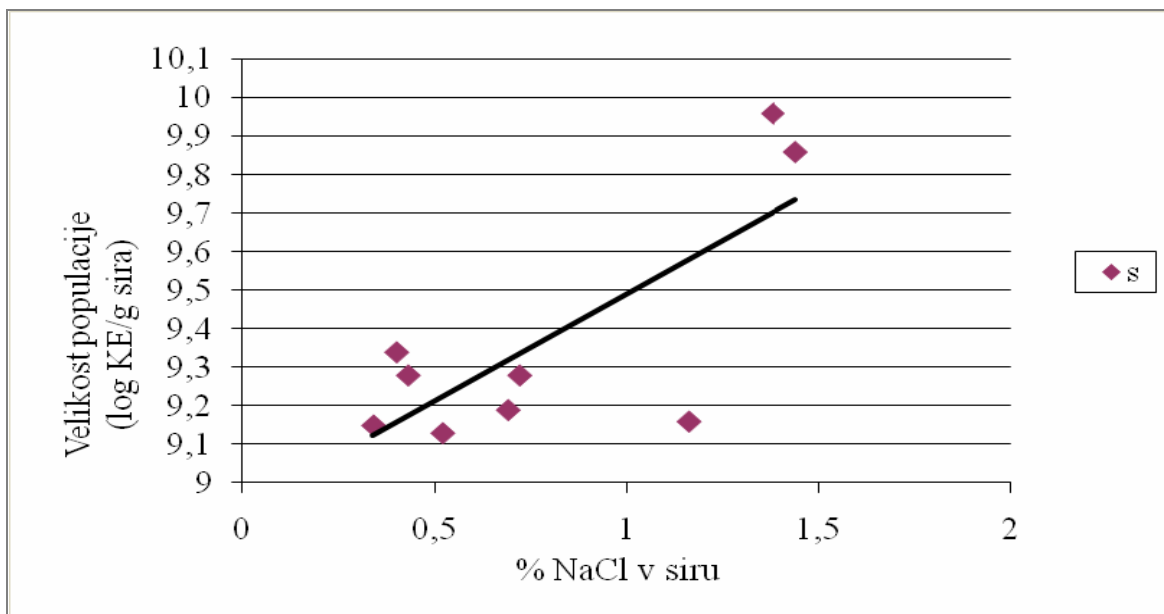
Prav tako se tudi iz rezultatov tretjega poskusa vidi, da v zunanem delu vzorca sorazmerno narašča % NaCl v siru glede na čas soljenja. V srednjem in notranjem delu je v tretjem poskusu vsebnost NaCl rahlo višja, v primerjavi z vsebnostjo NaCl v srednjem in notranjem delu prvega in drugega poskusa. Podobno kot v prejšnjih dveh poskusih tudi v tretjem vsebnost NaCl v srednjem in notranjem delu niha.

4.4 VPLIV KOLIČINE SOLI V POLTRDIH SIRI NA RAZVOJ STARTERSKE KULTURE

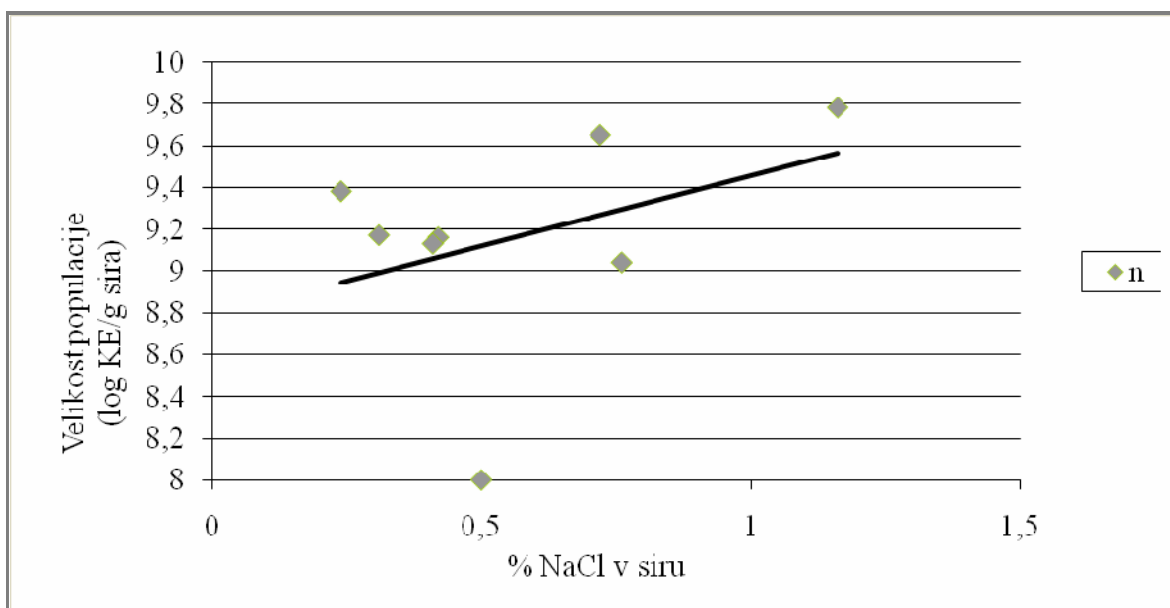
Domnevali smo, da bomo s podaljšanjem časa soljenja in posledično višjo vsebnostjo NaCl v siru zavrla rast in aktivnost starterske kulture *Str. thermophilus* TH4. Na slikah 13, 14 in 15 so prikazani rezultati regresijske analize vpliva količine soli na razvoj starterske kulture v zunanem (z), srednjem (s) in notranjem (n) delu sira.



Slika 13: Regresijska analiza vpliva količine soli v zunanem delu sira na velikost populacije *Str. thermophilus*



Slika 14: Regresijska analiza vpliva količine soli v srednjem delu sira na velikost populacije *Str. thermophilus*



Slika 15: Regresijska analiza vpliva količine soli v notranjem delu sira na velikost populacije *Str. thermophilus*

Čeprav lahko iz celotnega poskusa zaključimo, da količina soli, še posebej v zunanjem delu sira, ni negativno vplivala na razvoj starterske kulture TH4, pa lahko iz rezultatov regresijske analize vseeno opazimo rahel trend zaviralnega učinka soli na TH4, predvsem v

zunanjem in deloma srednjem delu sira, medtem ko je bila velikost populacije TH4 v notranjem delu sira malo večja. Da je bila rast kulture TH4 v notranjosti sira boljša, lahko pripišemo dejstvu, da se je notranjost najpočasneje ohlajala in je bila tako dlje časa ugodnejša temperatura za mikroorganizme, hkrati pa je bila količina soli, ki je prodrla do notranjosti, izredno majhna.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo ugotavljali vpliv količine soli v poltrdih sirih na razvoj starterske kulture. Ena izmed poglavitnih nalog starterske kulture je usmerjanje fermentacijskih procesov s proizvodnjo kisline (Slanovec, 1982). Pri večini ne-angleških tipih sirov se sirnina prenese v oblikovala, ko je vrednost pH zelo visoka (več kot 6) in se razvoj kisline nadaljuje med stiskanjem.

V našem primeru smo dodali mleku komercialno startersko kulturo *Str. thermophilus* TH4, ki fermentira laktozo do mlečne kisline (Pearce in Flint, 2002). Usirjanju je sledila obdelava koaguluma s sirarsko sabljo in harfo do sirnega zrna velikosti graha. Ko je sirno zrno doseglo primerno klenost, smo sirnino prenesli v oblikovala in pred stiskanjem zmerili pH sirnine, ki je bila v vseh treh poskusih zelo visoka, nad 6,0. Z merjenjem pH smo nadaljevali med stiskanjem (po 1 in 2 urah stiskanja), kjer so vrednosti pH padle po 2 urah stiskanja pod 6,0. Po 24-urnem stiskanju pa se je vrednost pH gibala med 5,15 – 5,26.

Po navedbi Guinee in Fox (2004) koncentracija soli nad 1,5 % (w/w) zavira aktivnosti starterske kulture v čedar sirih. Po vseh podatkih, ki sta jih zbrala Guinee in Fox (2004), se vplivi količine soli na različne starterske kulture razlikujejo, kar pomeni, da je vpliv koncentracije NaCl na tvorbo kisline v siru po soljenju odvisen od lastnosti uporabljene starterske kulture.

Gomes in sod. (1998) so proučevali rast in preživetje *Bifidobacterium lactis* in *Lactobacillus acidophilus* v poltrdem siru gauda. Med devet tedenskim zorenjem pri temperaturi 13 °C so vzorčili sir na različnih osnih lokacijah (zunanji vzorec, ki sega od skorje sira do 3 cm, srednji vzorec in notranji vzorec, ki je sredica sira) in ugotovili, da je bil povprečen odstotek soli med 2 – 4 %. Število živih probiotičnih sevov je počasi upadalo v prvih treh tednih zorenja, kasneje pa je bil upad še intenzivnejši. Znižanje števila mikroorganizmov je bilo izraziteje v vzorcih, odvzetih iz zunanosti sira.

Naši rezultati pa opisujejo vpliv količine soli na razvoj populacije *Str. thermophilus* med soljenjem. Ugotovili smo, da je bila velikost populacije seva TH4, ne glede na dolžino

soljenja ali na lego vzorčene tretjine, zelo stabilna, saj nismo zabeležili zaviralnega učinka soli. Ker pa je večina maloštevilnih objav, ki poročajo o vplivu soljenja na starterske kulture, ta vpliv proučevala predvsem v obdobju zorenja, torej po soljenju, so naši rezultati o velikosti populacije starterske kulture med soljenjem težko primerljivi. Zagotovo pa so zelo obetavni, saj nedvoumno kažejo na stabilnost in sposobnost razvoja uporabljene starterske kulture.

Delež NaCl se je sorazmerno povečeval predvsem v zunanjih delih pri vseh treh poskusih, kar potrjuje ugotovitev Byers in Price-a (1937. cit. po Guinee in Fox, 2004), da s podaljševanjem časa soljenja sorazmerno narašča % NaCl v siru.

Na podlagi naših rezultatov lahko ugotovimo, da količina soli nima negativnega vpliva na razvoj starterske kulture *Str. thermophilus* TH4, vendar pa rezultati regresijske analize, predvsem zunanjega dela sira, nakazujejo rahel trend zaviralnega učinka na populacijo TH4.

5.2 SKLEPI

- Komercialna starterska kultura *Str. thermophilus* TH4 ima dobro fermentacijsko sposobnost s proizvodnjo kisline.
- Soljenje sirov v 20 % slanici ne zavira razvoja populacije starterske kulture *Str. thermophilus* TH4
- Zaviralni učinek soljenja v 20% slanici na razvoj starterske kulture *Str. thermophilus* se z dolžino soljenja ne povečuje.
- Čas soljenja vpliva predvsem na povečevanje deleža NaCl v zunanji tretjini sira, medtem ko je vpliv dolžine soljenja na koncentracijo soli v srednjem in notranjem delu sira majhen.

6 POVZETEK

Sol ima zelo pomembno vlogo v tehnologiji izdelave sirov, saj vpliva na teksturo sira, podaljša obstojnost, vpliva na rast in razvoj mikroorganizmov ter na aktivnost encimov, vpliva na količino vode ter vodno aktivnost v siru, vpliva na fizikalne spremembe proteinov, na oblikovanje skorje ter na okus sira.

Ena najpomembnejših nalog soli v živilski industriji je prav gotovo zaščita živil pred mikrobiološkim kvarom. Pri tem pa sol ne deluje zaviralno samo na nezaželeno mikrofloro, ampak lahko vpliva tudi na mikroorganizme, ki jih kot startersko kulturo uporabimo pri izdelavi fermentiranega živila. Najpomembnejša naloga starterskih kultur, tudi v sirarstvu je, da preraste oz. zavira neželena mikroflora in pravilno usmerja fermentacijske procese.

O vplivu dolžine soljenja na razvoj oziroma stabilnost mlečno-kislinskih starterskih kultur je v literaturi malo podatkov, zato smo v diplomski nalogi ugotavljali, kako vpliva dolžina soljenja sirov v 20 % slanici na razvoj oziroma stabilnost starterske kulture *Str. thermophilus* TH4, ki se v sirarstvu pogosto uporablja tudi pri nas. *Str. thermophilus* spada med termofilne mlečnokislinske bakterije in jo, v kombinacijami z drugimi vrstami rodu *Lactobacillus*, tradicionalno uporabljamo kot startersko kulturo v tehnologiji izdelave švicarskih in italijanskih sirov kot sta ementalski sir in mocarela ter pri izdelavi klasičnega jogurta.

V našem poskusu smo s pomočjo komercialne starterske kulture *Str. thermophilus* TH4 in sirišča v treh neodvisnih poskusih, z enakim postopkom sirjenja, izdelali po tri sire. Sire iz prvih dveh poskusov smo v 20 % slanici solili 2, 4 in 6 dni, medtem ko smo sire iz tretjega poskusa solili 4, 6 in 8 dni. Po soljenju smo, pri aseptično pripravljenih vzorcih, izvedli mikrobiološko analizo, kjer smo s pomočjo gojišča M17 spremljali velikost populacije starterske kulture *Str. thermophilus*, ter kemijsko analizo, kjer smo določili vsebnost kloridov.

Izkazalo se je, da je sev TH4 med celotnim časovnim režimom soljenja ohranil stabilnost, saj, ne glede na lego vzorčene tretjine, nismo zabeležili zaviralnega učinka soli. Potrdili

smo tudi, da ima komercialna starterska kultura *Str. thermophilus* TH4 zelo dobro fermentacijsko sposobnost, saj je bila povprečna vrednost pH sirov po 24 urah 5,2.

Na podlagi rezultatov smo dognali, da z dolžino soljenja premosorazmerno narašča koncentracija NaCl v zunanji tretjini sirov, medtem ko ostane v srednjem in notranjem delu sira delež soli skoraj nespremenjen.

7 VIRI

- Gomes A.M.P., Vieira M.M., Malcata F.X. 1998. Survival of Probiotic Microbial Strains in a Cheese Matrix During Ripening: Simulation of Rates of Diffusion and Microorganism Survival. *Journal of Food Engineering*, 36: 281-301
- Guinee T.P. 2004. Salting and the role of salt in cheese. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 2-3: 99-109
- Guinee T.P., Fox P.F. 2004. Salt in cheese: physical, chemical and biological aspect. V: *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Fox P.F. (ed.). Vol. 1. 3rd edition. London, Elsevier Academic Press: 207-259
- ISO 2970-1974. Cheese – Determination of chloride content: 3 str
- IDF standard, 100B:1991. Milk and milk products – Enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30 °C: 3 str
- IDF standard, 122B:1992. Milk and milk products – Preparation of Samples and dilutions for microbiological examination: 4 str
- Pearce L., Flint S. 2002. *Streptococcus thermophilus*. V: *Encyclopedia of dairy sciences*. Roginski H., Fuquay J.W., Fox P.F. 2003 (eds.). London, San Diego, Academic Press: 2577-2582
- Slanovec T. 1982. *Sirarstvo*. Ljubljana, ČZP Kmečki glas. 175 str.
- Smole-Možina S., Raspor P. 1994. Starter kulture v živilstvu. V: *Aditivi*. 16. Bitenčevi živilski dnevi, 1. Simpozij živilcev Slovenije. Bled, 9-10 jun. 1994. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 99-108

ZAHVALA

Ob koncu študija se iskreno zahvaljujem mentorju prof. dr. Bogdanu Perku in somentorici doc. dr. Andreji Čanžek Majhenič za vso strokovno pomoč, nasvete in usmerjanje pri delu in pisanju diplomskega dela.

Zahvaljujem se Gašperju Jančigaju za pomoč pri kemijski analizi.

Zahvaljujem se recenzentki prof. dr. Ireni Rogelj za strokovno recenzijo diplomskega dela.

Zahvaljujem se referentki Sabini Knehtl, ki me je tekom študija spodbujala, mi bila v veliko oporo in pomoč, ter hvala njenim strokovnim nasvetom.

Na koncu še iskrena zahvala mojim staršem in bližnjim za potrpežljivost, nasvete in spodbudo ob študiju ter prijateljem, ki ste me spremljali tekom študija.

PRILOGE

Priloga A:
Vrednosti pH sira pred, med in po stiskanju

	Pred stiskanjem	Med stiskanjem		Po stiskanju
		Po 1 uri	Po 2 urah	
Prvo sirjenje	6,56	6,27	5,74	5,15
Drugo sirjenje	6,58	6,45	5,92	5,26
Tretje sirjenje	6,50	6,27	5,86	5,19

Priloga B1:
Velikost populacije (KE/g) *Str. thermophilus* pred in med soljenjem pri prvem poskusu

	Pred soljenjem (KE/g)	2. dan (KE/g)	4. dan (KE/g)	6. dan (KE/g)
Zunanji del	$1,4 \times 10^9$	$1,12 \times 10^9$	$2,03 \times 10^9$	$1,28 \times 10^9$
Srednji del	$1,2 \times 10^9$	$1,91 \times 10^9$	$1,55 \times 10^9$	$1,34 \times 10^9$
Notranji del	$1,2 \times 10^9$	$1,09 \times 10^9$	$1,43 \times 10^9$	$1,36 \times 10^9$

Priloga B2:
Velikost populacije (KE/g) *Str. thermophilus* pred in med soljenjem pri drugem poskusu

	Pred soljenjem (KE/g)	2. dan (KE/g)	4. dan (KE/g)	6. dan (KE/g)
Zunanji del	$4,4 \times 10^9$	$2,23 \times 10^9$	$1,99 \times 10^9$	$2,30 \times 10^9$
Srednji del	$2,77 \times 10^9$	$1,43 \times 10^9$	$2,20 \times 10^9$	$1,92 \times 10^9$
Notranji del	$2,84 \times 10^9$	1×10^8	$1,48 \times 10^9$	$2,40 \times 10^9$

Priloga B3:
Velikost populacije (KE/g) *Str. thermophilus* pred in med soljenjem pri tretjem poskusu

	Pred soljenjem (KE/g)	4. dan (KE/g)	6. dan (KE/g)	8. dan (KE/g)
Zunanji del	$2,3 \times 10^9$	$3,84 \times 10^9$	$5,04 \times 10^9$	$5,50 \times 10^9$
Srednji del	$1,94 \times 10^9$	$1,43 \times 10^9$	$7,22 \times 10^9$	$9,20 \times 10^9$
Notranji del	$2,18 \times 10^9$	$6,04 \times 10^9$	$4,44 \times 10^9$	> 1010

Priloga C1:
Vpliv časa soljenja na % NaCl v vzorcih sira pri prvem poskusu

	2. dan	4. dan	6. dan
Zunanji del	1,84	2,59	2,70
Srednji del	0,72	0,69	0,52
Notranji del	0,76	0,42	0,41

Priloga C2:
Vpliv časa soljenja na % NaCl v vzorcih sira pri drugem poskusu

	2. dan	4. dan	6. dan
Zunanji del	1,23	2,66	3,45
Srednji del	0,34	0,40	0,43
Notranji del	0,50	0,31	0,24

Priloga C3:
Vpliv časa soljenja na % NaCl v vzorcih sira pri tretjem poskusu

	4. dan	6. dan	8. dan
Zunanji del	2,23	2,46	3,51
Srednji del	1,16	1,44	1,38
Notranji del	1,16	0,72	0,87