

# Primjena autohtonih sojeva bakterija mlječne kiselina kao funkcionalnih starter kultura

---

**Blažević, Marina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2019**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:147541>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-14**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2019.

Marina Blažević  
875/MB

**PRIMJENA AUTOHTONIH  
SOJEVA BAKTERIJA MLIJEČNE  
KISELINE KAO  
FUNKCIONALNIH STARTER  
KULTURA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Andreje Leboš Pavunc, uz pomoć Katarine Zorić, mag. ing. biotechn. te u firmi Probiotik d.d., uz pomoć Katarine Tonković, mag. ing. spec. u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Probiotici i starter kulture – površinski proteini i bakteriocini“ (IP-2014-09-7009).

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

## PRIMJENA AUTOHTONIH SOJEVA BAKTERIJA MLJEČNE KISELINA KAO FUNKCIONALNIH STARTER KULTURA

Marina Blažević, 875/MB

**Sažetak:** U ovom radu korišteni su sojevi *Lactobacillus brevis* ZG1, *Lactobacillus plantarum* ZG1C, *Lactococcus lactis* ZG7-10 i *Lactobacillus fermentum* D12 za proizvodnju sušenog svježeg sira. To su sojevi bakterija mliječne kiseline izolirani iz tradicionalno proizvedenih sireva, te prethodno identificirani i okarakterizirani kao funkcionalne starter kulture. Uz to je proizveden i sir s komercijalnom starter kulturom, DSM CT-203, te su ta dva sira uspoređena prema fizikalno-kemijskim i senzoričkim svojstvima. Sir proizveden s autohtonim sojevima je po senzorskim svojstvima, u odnosu na sir proizveden s komercijalnom starter kulturom, bio puno sličniji siru tradicionalno proizvedenom spontanom fermentacijom. Sekvencioniranjem je određen udio svih bakterijskih vrsta prisutnih u proizvedenom siru s najvećom koncentracijom vrste *Lactococcus lactis*. RAPD-PCR metodom potvrđena je prisutnost dodanih autohtonih bakterijskih vrsta u siru, a određen je i broj njihovih živih stanica koji je bio veći od  $10^6$  po gramu što dobiveni sir definira kao sir s funkcionalnim probiotičkim svojstvima.

**Ključne riječi:** autohtoni sojevi bakterija mliječne kiseline, probiotici, sušeni svježi sir, starter kulture

**Rad sadrži:** 45 stranica, 9 slika, 19 tablica, 39 literaturnih navoda

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc

**Pomoć pri izradi:** Katarina Butorac, mag. ing. biotechn., Katarina Tonković, mag. ing. spec.

**Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:**

1. prof. dr. sc. Blaženka Kos
2. doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc
3. prof. dr. sc. Ksenija Markov
4. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić

**Datum obrane:** lipanj 2019.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Department of biochemical engineering

Laboratory for antibiotic technology, enzymes technology, probiotics and starter cultures

**Scientific area:** Biotechnical Sciences

**Scientific field:** Biotechnology

### APPLICATION OF AUTOCHTHONOUS STRAINS OF LACTIC ACID BACTERIA AS FUNCTIONAL STARTER CULTURE

Marina Blažević, 875/MB

**Abstract:** In this research, *Lactobacillus brevis* ZG1, *Lactobacillus plantarum* ZG1C, *Lactobacillus lactis* ZG7-10 and *Lactobacillus fermentum* D12 strains were used for the production of dried fresh cheese. These lactic acid bacterial strains were isolated from traditionally produced cheeses and previously identified as well as characterized as functional starter cultures. In addition, cheese with a commercial starter culture DSM CT-203 was produced and these two cheeses were compared by physico-chemical and sensory properties. Cheese produced with autochthonous probiotic strains was, according to the sensory properties, much more similar to the traditionally produced fresh cheese than the cheese produced with commercial starter cultures. Sequencing determined the proportion of all bacterial species present in the produced cheese with the highest concentration of *Lactococcus lactis* species. The presence of autochthonous species in the cheese was confirmed by the RAPD-PCR method and the number of their live cells was determined and was higher than  $10^6$  per gram which define the produced cheese as cheese with functional probiotic properties.

**Keywords:** autochthonous lactic acid bacteria strains, probiotics, dried fresh cheese, starter culture

**Thesis contains:** 45 pages, 9 figures, 19 tables, 39 references

**Original in:** Croatian

**Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

**Mentor:** PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant Professor

**Technical support and assistance:** Katarina Butorac, mag. ing. biotechn.

#### Reviewers:

1. PhD Blaženka Kos, Full Professor
2. PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant Professor
3. PhD Ksenija Markov, Full Professor
4. PhD Jasna Mrvčić, Full Professor

**Thesis defended:** June 2019

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1. PROIZVODNJA SUŠENOG SVJEŽEG SIRA .....	3
2.1.1. Tehnologija proizvodnje sireva .....	4
2.1.2. Razvoj tehnologije kroz povijest .....	5
2.1.3. Problemi u proizvodnji i kako ih razriješiti .....	7
2.2.4. Koraci u proizvodnji sira i mikrobne kulture koje se koriste .....	8
2.2. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE U MLIJEČNOJ INDUSTRIJI .....	11
2.2.1. Bakteriocini .....	13
2.2.2. Egzopolisaharidi (EPS) .....	13
2.2.3. S-proteini („S-layer“ proteini) .....	15
3.1. MATERIJALI .....	18
3.1.1. Radni mikroorganizmi .....	18
3.1.2. Mlijeko .....	18
3.1.3. Hranjive podloge .....	18
3.1.4. Kemikalije .....	19
3.1.5. Aparatura i pribor .....	20
3.2. METODE .....	21
3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama .....	21
3.2.2. Provođenje kontrolirane fermentacije i proizvodnja tradicionalnih sušenih sireva .....	21
3.2.3. Kemijski sastav mlijeka za proizvodnju sira .....	22
3.2.4. Određivanje prinosa sira i mjerenje sinereze .....	23
3.2.5. Određivanje pH-vrijednosti i kiselosti nakon proizvodnje i tijekom skladištenja sira .....	23
3.2.6. Određivanje suhe tvari u siru nakon proizvodnje i tijekom skladištenja sira .....	24
3.2.7. Mikrobiološka analiza nakon proizvodnje i tijekom skladištenja sira .....	24
3.2.8. Određivanje količine masti i laktoze .....	25
3.2.9. Izolacija ukupne DNA iz uzoraka proizvedenih sireva .....	25
3.2.10. RAPD-PCR (eng. Random Amplified Polymorphic - DNA Polymerase chain reaction) .....	26
3.2.11. Analiza senzorskih svojstava proizvedenih sireva .....	26
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	28

4.1. PRAĆENJE KEMIJSKIH PARAMETARA SIRA NAKON PROIZVODNJE I TIJEKOM SKLADIŠTENJA.....	28
4.2. DNA ANALIZE BAKTERIJSKIH SOJEVA U PROIZVEDENIM SIREVIMA.....	35
5. ZAKLJUČCI.....	43
6. LITERATURA.....	44



# 1.UVOD

Proizvodnja svakog sira započinje od mlijeka, koje mora biti kemijski definirano i mikrobiološki ispravno. U takvo mlijeko dodaje se sirilo (enzimi) za poboljšanje provedbe reakcije, kalcijev klorid za optimiziranje ionske jakosti te bakterije mliječne kiseline (BMK) koje su odgovorne za proces fermentacije. Za fermentaciju je vrlo bitno podesiti temperaturu i pH mlijeka kako bi ono bilo optimalno za rast mikrobnih kultura. Sama tehnologija proizvodnje sira uključuje proces fermentacije pomoću bakterija mliječne kiseline pri čemu laktozu iz mlijeka prevode u mliječnu kiselinu te se kazein odvaja od sirutke. Fermentacijom mlijeka nastaje tzv. gruš koji je prvi proizvod u tehnologiji proizvodnje sireva kojega se dalje prevodi u sir. Ovisno o vrsti sira koji se želi proizvesti, slijede odgovarajući koraci u proizvodnji (Tratnik i Božanić, 2012).

Iako je tradicionalni svježi sir proizvod spontane fermentacije mlijeka bakterijama mliječne kiseline, uvođenje starter kultura rezultira mogućnošću kontroliranja procesa proizvodnje sira i dobivanju proizvoda ujednačene kvalitete. Kod tradicionalno proizvedenih sireva fermentacija se odvija spontano i uvjeti nisu strogo kontrolirani te tradicionalno proizvedeni sirevi zahvaljujući procesu spontane fermentacije često imaju bogatiji okus i aromu. Primjena izoliranih autohtonih sojeva bakterija mliječne kiseline, kao definiranih starter kultura bi u kontroliranim uvjetima proizvodnje doprinijela dobivanju proizvoda ujednačene kvalitete uz očuvanje autohtone arome i teksture. Mikrobne kulture u proizvodnji sira imaju višestruku ulogu, a njihova aktivnost može biti proizvodnja kiseline, tvorba tvari arome i plina, djelomična hidroliza i proteoliza, itd. Nastanak željenih svojstava za pojedinu vrstu sira ovisi o odabiru mikrobne kulture za njegovu proizvodnju, ali aktivnost same kulture mikroorganizama ovisi o procesnim uvjetima te o provedbi pojedinih postupaka tijekom proizvodnje ili zrenja sira (Tratnik i Božanić, 2012).

Bakterije mliječne kiseline su gram – pozitivne, nesporogene bakterije koje obuhvaćaju više bakterijskih rodova od kojih su, za prehrambenu industriju, najznačajniji: *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Lactobacillus*. Prirodno su prisutne na supstratima bogatih hranjivim tvarima kao što su meso, mlijeko i povrće te u humanom gastrointestinalnom sustavu. Posljednjih se tridesetak godina velika pozornost posvećuje BMK koje doprinose poboljšanju zdravlja ljudi i životinja, a znanstveno su definirane kao

probiotici. To su živi mikroorganizmi koji imaju korisne učinke na zdravlje domaćina kada se konzumiraju u odgovarajućim koncentracijama. Starter kulture su pripravci proizvedeni od živih organizama koji sadrže odgovarajući broj stanica najmanje jednog mikroorganizma te se dodaju sirovini u cilju fermentacije hrane. Funkcionalne starter kulture su definirane kao starter kulture koje posjeduju najmanje jedno funkcionalno svojstvo u svrhu poboljšanja kvalitete konačnog proizvoda (Leboš Pavunc, 2012).

U ovom radu su korišteni sojevi *Lactobacillus brevis* ZG1, *Lactobacillus plantarum* ZG1C, *Lactococcus lactis* ZG7-10 i *Lactobacillus fermentum* D12 za proizvodnju sušenog svježeg sira. To su sojevi bakterija mliječne kiseline izolirani iz tradicionalno proizvedenih sireva, te su prethodno identificirani i okarakterizirani kao funkcionalne probiotičke ili starter kulture u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uz to je proizveden i sir s komercijalnom starter kulturom, DSM CT-203, te su ta dva sira uspoređena prema fizikalno-kemijskim i senzoričkim svojstvima, a provedeno je i ispitivanje mikrobiološke kakvoće sireva te genetička analiza.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. PROIZVODNJA SUŠENOG SVJEŽEG SIRA

Proizvodnja sira jedan je od najstarijih postupaka koji su ljudi uveli u konzerviranje lako pokvarljive hrane kao što je mlijeko, koje se spontano kiseli i gruš. U proizvodnji sira može se upotrijebiti bilo koja vrsta mlijeka i iako se najčešće koristi kravlje (zbog dostupnosti), u mnogim krajevima se koristi i mlijeko drugih životinja. U Hrvatskoj se ovčje mlijeko najčešće upotrebljava u proizvodnji tradicionalnih sireva na otocima, od kojih je najpoznatiji Paški sir koji se može proizvesti samo od ovčjeg mlijeka paške ovce. Kozje mlijeko se uglavnom koristi za neke vrste sireva koji se proizvode u Italiji, Grčkoj i Francuskoj, dok se bivolje mlijeko obično koristi u Indiji i Egiptu gdje se čak koristi i devino mlijeko. U proizvodnji sira najvažnija je količina proteina u mlijeku kako bi ono moglo koagulirati i dobro izdvojiti sirutku, a posebno treba očuvati prirodna svojstva kazeina što osigurava bolju kvalitetu sira i veći prinos. Također, vrlo je bitna i metabolička aktivnost dodanih bakterija mliječne kiseline tijekom zrenja sira, a upravo one su zaslužne za prevođenje laktoze u mliječnu mast, razgradnju mliječne masti te proteolizu kazeina. Bakterije ne mogu trošiti kazein kao izvor energije, te ga najprije trebaju razgraditi na manje proteinske lance i aminokiseline. U slučaju produžene fermentacije (nepoželjno), svojstva mogu biti znatno oštećena prisutnošću većeg broja proteolitičkih bakterija te se to može odraziti na otežano sirenje mlijeka, njegovu gorčinu, lošu teksturu i veće gubitke gruš (manji prinos) te lošu kvalitetu sira. Proteolitičke bakterije i njihovi enzimi otporni su na toplinsku obradu mlijeka u sirarstvu pa mogu preživjeti pasterizaciju i uzrokovati naknadne štete tijekom zrenja sira zbog pojačanje proteolize i pojave gorčine (gorki peptidi). Bitno je i osigurati dostatnu količinu topljivog kalcija potrebnog za sirenje mlijeka djelovanjem enzima (dodatkom  $\text{CaCl}_2$ ), te u proizvodnji masnijih sireva količinu mliječne masti u mlijeku. Samo higijenski ispravno dobiveno mlijeko koristi se za proizvodnju sira te se ne smije primijeniti visoka toplinska obrada koja bi smanjila sposobnost sirenja mlijeka. Ako se mlijeko ne može odmah preraditi u sir, bitno je zadržati njegova svojstva koja mogu biti promijenjena tijekom čuvanja mlijeka zbog kontaminacije mikroorganizmima. Nakon duljeg hladnog skladištenja mlijeka, oslabi svojstvo sirenja jer dolazi do razgradnje kazeina i smanjenja topljivosti kalcija u mlijeku. Posebno je pri hladnom čuvanju za mlijeko štetna prisutnost psihrotrofnih bakterija *Pseudomonas* spp.

koje se lako prilagođavaju nižim temperaturama i pomoću proteolitičkih enzima razgrađuju proteine, a pomoću lipaza mast u mlijeku. Najveću štetu u sirarstvu mogu prouzročiti sporogene proteolitičke bakterije *Clostridium* spp., a posebno termostabilna *Clostridium tyrobutiricum* koje u kasnijoj fazi zrenja uzrokuju kasno nadimanje sira jer proizvode veću količinu plina i maslačne kiseline što utječe na pojavu neugodnog okus i mirisa sira te gorčinu. Također je nepoželjna kontaminiranost mlijeka većim brojem koliformnih bakterija koje uzrokuju pojavu plina i rupičast, rastresit gruša kod mekših sireva, a kod polutvrdih i tvrdih rano nadimanje sira uz neugodan okus i miris. Dakle, mlijeko za proizvodnju sira mora biti higijenski ispravno dobiveno i što prije prerađeno u sir te se prije proizvodnje sira mora provesti kontrola kvalitete mlijeka koja treba obuhvatiti određivanje kiselosti, kontrolu mastitisa, kontrolu sirivosti mlijeka te ocjenu kvalitete gruša, kontrolu prisutnosti antibiotika ili bakteriofaga, određivanje udjela mliječne masti, proteina i topljivosti kalcija. Obavezna je i kontrola prisutnosti koliformnih bakterija, klostridija i bakterije *Listeria monocytogenes* te određivanje ukupnog broja mikroorganizama (Tratnik i Božanić, 2012).

### 2.1.1. Tehnologija proizvodnje sireva

Sir se dobiva grušanjem i odvajanjem čvrste tvari iz mlijeka od sirutke (tekući dio). Što se više sirutke odvoji to se dobije tvrdi sir. Svježi sir se proizvodi tehnologijom koja ne uključuje zrenje sira (kao što je to slučaj kod tvrdih sireva). Svježi sir je proizvod dobiven zgrušavanjem pasteriziranog mlijeka s mezofilnom kulturom bakterija mliječne kiseline i kimozinom. U okolici Zagreba tradicionalno se proizvodi svježi sir, koji je karakterističnog, srednje kiselog osvježavajućeg okusa, bijele boje i konzistencije koja se "lista". Sir se konzumira svjež, nakon završenog cijedenja gruša (Leboš Pavunc, 2012; Radošević i sur., 2007). Sama tehnologija proizvodnje sira uključuje proces fermentacije pri čemu laktoza prelazi u mliječnu kiselinu te se kazein odvaja od sirutke. Za ubrzanje i poboljšavanje procesa sirenja, mlijeku se dodaje sirilo koje u sebi sadrži mnoge enzime od kojih je za postupak sirenja najznačajniji renin tj. kimozin. Kimozinski pripravak (renin ili sirilo) ekstrakt je probavnih enzima životinjskog podrijetla, a sastoji se od kimozina i pepsina. U proizvodnji svježeg sira obično se pri vrenju mlijeka dodaje i mala količina enzimskih pripravaka te simultanim djelovanjem mliječne kiseline i proteolitičkih enzima dolazi do oblikovanja čvršćeg gruša sira. Na grušanje mlijeka najviše utječu pH (optimalan je u rasponu 5,5–5,0), temperatura (optimalna za djelovanje kimozinskog pripravka je u rasponu 38–42°C), ionska

jakost (udjel  $\text{Ca}^{2+}$  iona koji se postiže dodatkom  $\text{CaCl}_2$  u mlijeko) i koncentracija dodanog enzima. Osim toga, u proizvodnji bilo koje vrste sira uvijek se primjenjuju kulture bakterija mliječne kiseline koje se mogu kombinirati međusobno ili s kulturom drugih vrsta bakterija. Nastanak željenih svojstava za pojedinu vrstu sira ovisi o odabiru mikrobne kulture za njegovu proizvodnju (Tratnik i Božanić, 2012).

U početku proizvodnje sireva naglasak je bio na umjetnosti (umijeću) proizvodnje, ali prihvaćanje znanosti i tehnologije bilo je nužno za napredak u proizvodnji sira više kvalitete. Tradicionalna proizvodnja sira nije mogla pratiti potražnju za sirom, a razvoj tvorničkog sustava bio je nužan. Tri glavne inovacije koje su promijenile, do tada upitnu kvalitetu sira bile su: hlađenje, komercijalne starter kulture i pasteurizirano mlijeko. Iako je proces hlađenja važan, za poboljšanje same proizvodnje sira nužno je bilo korištenje pasteuriziranog mlijeka i provjerenih starter kultura za fermentaciju. Temeljna istraživanja genetike starter kultura uvelike su povećale pouzdanost fermentacije, što je omogućilo automatizaciju. Zahtjevi za funkcionalnošću, primjenom u pekarstvu, obradivošću te sve većim naglaskom na nutritivne aspekte (niska masnoća i niska razina natrija) rezultirali su novim valom istraživanja kemijskih, mikrobioloških i enzimskih promjena koje nastaju tijekom proizvodnje i zrenja sira. Kako se povećavala proizvodnja mlijeka, tako su i tvornice sira trebale postati učinkovitije (Johnson, 2017). U toploj klimi u kojoj se prvi put prakticirala proizvodnja sireva, sirevi bi obično imali nisku pH vrijednost kao rezultat aktivnosti bakterija mliječne kiseline te koliformnih bakterija u sirovom mlijeku. U hladnijim podnebljima se dodavala topla voda kako bi potaknula proizvodnju kiseline (prototip sireva tipa Gouda) ili se odvajala sirutka, a sir grupirao na hrpu (kako bi se spriječilo smanjivanje temperature) te se za tako dobiven sir počeo koristiti naziv „cheddar“ sir. Budući da se prvi puta ta metoda koristila u engleskom selu Cheddar, po njemu sir dobiva ime, a metoda se ubrzo počinje i dalje koristiti (Ong i sur., 2017).

### 2.1.2. Razvoj tehnologije kroz povijest

Prvi zapisi o proizvodnji sira i kemiji sira u procesu proizvodnje potječu iz časopisa *Journal of Dairy Science* iz 1917. godine. Većina početnih radova o proizvodnji sira u časopisu bila je usmjerena na poboljšanje kvalitete sira. Pasteurizirano mlijeko za proizvodnju sira promoviralo se kao svojevrsno rješenje najvećeg nedostatka u proizvodnji sira, a to je pojava plinova u siru uzrokovana koliformnim bakterijama. Do tada se za proizvodnju sira koristilo svježije mlijeko,

a pasterizacija, kao relativno novi proces, naišla je na otpor zbog troškova implementacije, dostupnosti opreme te zbog uočenog smanjenja u razvoju arome sira. S druge strane, pasterizacija ubija većinu bakterija sposobnih za fermentaciju laktoze i stoga zahtijeva upotrebu dodatne starter kulture za pravilnu fermentaciju. Zbog pasterizacije su postrožile i kontrole zakiseljavanja tijekom proizvodnje sira što je doprinijelo boljoj kontroli procesa nad kvalitetom sira. Dalje se istraživao kemijski sastav mlijeka koji je bitan za funkcionalnost sira i fermentaciju starter kulturama.

Mlijeko se u počecima hladilo stavljanjem konzerviranog mlijeka u hladnu izvorsku vodu, što nije bilo optimalno brzo hlađenje mlijeka te je često rezultiralo vrlo visokim brojem bakterija. Ponekad se i dodavao led kako bi se brže hladilo (Johnson, 2017). Kasnije je utvrđena korelacija između brzog povećanja užeglosti mlijeka i stvaranja nepoželjnih aroma u siru sa snažnijim miješanjem mlijeka i toplinom mlijeka. Preporučalo se, dakle, hlađenje mlijeka bez ili uz vrlo malo miješanje. Sukladno tome, osmišljeni su novi načini hlađenja mlijeka te je došlo do promjena propisa i pravila o rukovanju s mlijekom. Užeglost sira je nakon toga postala vrlo rijetka te se gotovo uvijek pripisivala prekomjernom miješanju s mlijekom prikupljenog od životinja s mastitisom<sup>1</sup> (Johnson, 2017). Dvije velike promjene u propisima rezultirale su, prvo, promjenama u skladištenju mlijeka. Mlijeko se sad više nije hladilo u hladnoj vodi nego u hladnjacima od nehrđajućeg čelika koji mogu brzo ohladiti mlijeko i držati ga hladnim do transporta. Drugi propis je postavio ograničenja za maksimalni broj bakterija u sirovom mlijeku za proizvodnju sira koji se smanjio s  $1 \times 10^6$  CFU/ml na  $3 \times 10^5$  CFU/ml. S razvojem boljih sanitarnih i rashladnih postupaka od samog procesa mužnje preko isporuke mlijeka pa do proizvodnje sira, brojke koje danas postižu mnogi proizvođači su ispod  $2 \times 10^4$  CFU/ml sirovog mlijeka. Proizvođači sira imali su malu kontrolu nad načinom mužnje i rukovanjem na farmi pa nisu mogli lako ispitati kvalitetu sirovog mlijeka sve dok se nije uvela metoda mikroskopskog brojanja bakterija u mlijeku koja je omogućila rutinsko određivanje mikrobiološke kvalitete mlijeka kod pojedinačnih proizvođača. Sir se ne proizvodi u sterilnom okruženju, a potrebno je pravilno čišćenje objekta za proizvodnju sira kako bi se spriječile kontaminacije. Rast i preživljavanje patogena u siru kao posljedica onečišćenja tijekom proizvodnje, zrenja ili pakiranja ovisi i o aktivnosti vode, kompetitivnosti s drugim bakterijama i pH sira (Johnson, 2017).

---

<sup>1</sup> Upala mliječne žlijezde prouzročena djelovanjem mikroorganizama.

### 2.1.3. Problemi u proizvodnji i kako ih razriješiti

Jedna od prednosti pasterizacije mlijeka je ta što sva proizvedena kiselina potječe od dodane starter kulture. Na taj način se može kontrolirati brzina zakiseljavanja što rezultira konzistentnijom kvalitetom sira te se proizvodnja sira može provoditi u određenom vremenskom rasporedu. Problem koji je uočen pri uvođenju pasterizacije u proizvodnju je nastanak biofilmova na zidovima regenerativnih grijača radi dugotrajnog korištenja pasterizatora i neuspješnog pokušaja čišćenja i dezinfekcije opreme. Biofilmovi nastaju kad se bakterije vežu na površine opreme na kojoj se stvara biomasa, a bakterije proizvode egzopolisaharide. Biofilmovi su vrlo zabrinjavajuća pojava u tvornicama sireva i drugim postrojenjima za preradu mliječnih proizvoda. Biofilmovi su glavni izvor postpasterizacijskog onečišćenja mlijeka od strane bakterija (Somers i sur., 2001; Wong, 1998). Bakterije iz takvih biofilmova ulaze u mlijeko i tako ga kontaminiraju te njihov broj u pasteriziranom mlijeku može biti toliki da količina kiseline koju proizvede kontaminant preraste onu koju proizvede starter kultura te se time sprječava stroga kontrola brzine i količine zakiseljavanja potrebnih za pravilnu proizvodnju sira. Biofilmovi se također mogu razvijati i na poljoprivrednoj opremi te su izvor bakterijske kontaminacije sirovog mlijeka čak i patogenim bakterijama (Lee i sur., 2014; Latorre i sur., 2010). Kao rješenje problema stvaranja biofilmova se nudi upotreba enzima kao dio procesa čišćenja. Još jedno rješenje uključuje premazivanje opreme materijalom koji sprečava vezanje bakterija te samim time i stvaranje biofilmova (Jindal i sur., 2016). Dodatan problem predstavljaju i antibiotici koji se mogu naći u sirovom mlijeku zbog liječenja mastitisa. Njihova prekomjerna upotreba, naime, može dovesti do puno većeg problema nego li je sam mastitis zbog pojave rezistencije na antibiotike te činjenica da, ako antibiotik uđe u mlijeko, može spriječiti fermentaciju laktoze od strane bakterija starter kulture (McEwen i sur., 1991). Također, u svrhu poboljšanja kvalitete sira promovirano je mlijeko za proizvodnju sira na kojemu je provedeno uklanjanje stranih tvari (sediment, kosa, prljavština i dr.). Test sedimenta za sirovo mlijeko, koji je mjerio količinu stranih tvari u mlijeku, utvrđen je kao indeks kvalitete mužnje. Rezultati testa sedimenta također su korišteni kao pokazatelj bakteriološke kvalitete mlijeka. Slično mehaničkom uklanjanju stranih tvari iz mlijeka, švicarski proizvođači sira uveli su sustave za uklanjanje bakterija. Prvi put su korišteni u Europi prije nekoliko desetljeća, a oni uključuju procese centrifugiranja i mikrofiltracije za uklanjanje bakterijskih spora, uključujući spore bakterija iz rodova *Clostridia* i *Bacillus* koje uzrokuju plinovite, prorezane sireve i proizvode neugodne arome (Johnson, 2017).

Uvođenje starter kultura dovodi do novih prepreka u proizvodnji sira. U samim počecima, starter kulture su se dobivale prirodnom fermentacijom kvalitetnog mlijeka. Kasnije su proizvedene čiste starter kulture koje su proizvođači sireva mogli kupiti te ih sami uzgajati do potrebnih količina. No, često takve kulture nisu dobro funkcionirale zbog toga što su gubile sposobnost proizvodnje dovoljne količine kiseline što je vjerojatno uzrokovano infekcijom bakteriofagima. Glavni iskorak u proizvodnji odgovarajuće mliječne kiseline djelovanjem starter kultura bilo je otkriće da su sposobnosti bakterija da fermentiraju laktozu te njihova proteolitička aktivnost (potrebna za brz rast nužan za pouzdanu fermentaciju) kodirane pomoću plazmidne DNA (Romero i Klaenhammer, 1993). To je vodilo do razvoja sojeva rezistentnih na bakteriofagne infekcije i koji su mogli dosljedno zakiseljavati medij što je do danas bitna komponenta tehnologije proizvodnje sira (Cogan i sur., 2007). Aktivnost startera također ovisi i o uvjetima pod kojima je kultura uzgojena te je puno više pažnje usmjereno na medije za uzgoj; samo mlijeko kao prirodni medij je zamijenjeno „umjetnim“ medijem za startere. Danas su u uporabi visoko koncentrirane starter kulture koji se prodaju u zamrznutim peletima ili kao liofilizirani pripravci koji se dodaju izravno u mlijeko za sir bez potrebe za prethodnim uzgojem kultura u tvornici. Za povećanje proizvodnje sira bio je potreban i razvoj stabilnije i povećane ponude renina/kimozina (glavnog enzima sirila). Gotovo sav renin je jedno vrijeme bio ekstrahiran iz telećih želudaca ili izoliran iz nekih plijesni. Taj izazov je razriješen uz pomoć genetičkog inženjerstva – geni iz teladi, odgovorni za dobivanje kimozina, ubačeni su u plijesni koje kao takve (genetički modificirane) mogu sintetizirati kimozin te je tako dobiven kimozin odobren i u halal i kosher prehrani (Johnson, 2017).

#### 2.2.4. Koraci u proizvodnji sira i mikrobne kulture koje se koriste

Sirevi su svježi proizvodi ili proizvodi s različitim stupnjem zrelosti koji se proizvode odvajanjem sirutke nakon koagulacije mlijeka. Proizvodnja obuhvaća sirenje ili grušanje mlijeka, sušenje gruša i oblikovanje sirnog zrna. Sama bit proizvodnje sira je provedba koagulacije proteina tj. sirenje ili grušanje mlijeka te oblikovanje koagulumata ili sirnog gruša uz izdvajanje određene količine sirutke. Nakon što mlijeko prođe fazu sirenja i sušenja gruša, nastaje sirutka kao nusproizvod s jedne strane, te svježi gruš sira (kiseli ili slatki) s druge strane. Iz svježeg gruša sira se može dobiti svježi sir ili se pušta na daljnju obradu kojom se dobije još sirutke te nezreli sir. Takav sir prolazi kroz fazu zrenja te kao konačni proizvod, zreli sir.



Koagulacija kazeina (proteina) može se odvijati na dva osnovna načina; prvi način ostvaruje se djelovanjem kiseline nastale vrenjem mlijeka pod utjecajem kulture BMK (ili dodatkom neke organske kiseline) pa nastaje kiseli gruša (u proizvodnji svježih sireva). Drugi način uključuje djelovanje proteolitičkih enzima, bilo iz pripravaka životinjskog ili mikrobnog podrijetla uz pomoć kalcijevih iona pa nastaje slatki gruša (u proizvodnji ostalih sireva). Pri sirenju mlijeka djelovanjem kiselina u industriji se uglavnom dodaje i malo enzimskih pripravaka kako bi se poboljšala struktura nastalog kiselog gruša te postigla bolja sposobnost otpuštanja sirutke. Pri sirenju mlijeka djelovanjem enzima prethodno se provodi djelomično zakiseljavanje mlijeka. Bez obzira na način koagulacije proteina, sirenje se provodi pri temperaturi od oko 30°C zbog optimalnog djelovanja ili BMK ili enzimskih pripravaka. Dakle, sirenje se najčešće provodi zajedničkim djelovanjem kiseline, enzima i topline.

Bez obzira na vrstu proteina (kazein ili proteini sirutke) ili način koagulacije, osnovni mehanizmi sirenja su:

- destabilizacija proteina – poremećaj prirode strukture, razgradnja
- zbližavanje razgrađenih proteina – gubitak stabilnosti
- povezivanje promijenjenih proteina – daljnja izmjena strukture
- oblikovanje mreže gel proteina – polučvrsti sustav, koagulum ili gruša (Tratnik i Božanić, 2012)

Navedene se faze obično definiraju kao: denaturacija, asocijacija, agregacija i koagulacija proteina. Kvaliteta oblikovanog koaguluma ili gruša može varirati zbog razlika u fazi grušanja, sastava i svojstava sirovine, prethodne obrade sirovine, temperature, vrste korištene mikrobnog kulture ili sirila, a posebno i udjela te stanja proteina.

Nakon sirenja, gruša sira podliježe kiselinskoj ili toplinskoj sinerezi kojom se postiže učvršćenje gruša izlučivanjem sirutke kako bi koagulum ili sirni gruša bio sposoban za daljnju obradu. Pojam sinereza znači otpuštanje sirutke iz čestica gruša koja obuhvaća preuređenje proteinske mreže u nastalom grušu i oblikovanje čvršće kompaktnije strukture (stezanjem mreže) uz otpuštanje sirutke. Veća kiselost ili veća temperatura pridonosi stezanju proteinske mreže. Rezanjem, miješanjem, oblikovanjem i tlačenjem gruša postiže se mehaničko odvajanje sirutke i daljnje sušenje zrna do željenog udjela vode u siru. U svakom slučaju, tijekom procesa dehidracije gruša, proteini i mast mlijeka koncentriraju se 6-12 puta, ovisno o vrsti sira koji se proizvodi.

Obrada kiselog gruša, dobivenog sirenjem obranog mlijeka djelovanjem kiseline kao u proizvodnji tradicionalnog svježeg sira, vrlo je jednostavna i traje kraće nego prethodno vrenje mlijeka. Nastali se kiseli gruš može klasično ocijediti od sirutke djelovanjem vlastite mase kroz sirnu maramu ili cjedilo, uz moguće prethodno rezanje gruša te tlačenje ili stiskanje krpe, ovisno želi li se proizvesti sir s manje ili više vode. Tako dobiveni svježi sir može se odmah konzumirati, a mogu se dodati i sol i vrhnje, prema želji potrošača. Jače ocijedjeni svježi sir može se oblikovati u stožac i sušiti na zraku pa i blago prodimiti, što mu bitno produljuje vijek trajanja.

Sireve je moguće razvrstati prema određenim skupnim svojstvima:

- prema vrsti proteina (kazeinski ili albuminski mješoviti)
- prema vrsti mlijeka (kravlji, ovčji, kozji, bivolji i/ili njihove mješavine)
- prema načinu grušenja (kiseli, slatki i mješoviti)
- prema udjelu masti u suhoj tvari (od posnog do ekstra masnog)
- prema udjelu vode u bezmasnoj tvari sira (svježi, mokri, polutvrđi, tvrdi, ekstra tvrdi)
- prema procesu proizvodnje (npr. gouda, edamac, sirevi u salamuri...)
- prema načinu zrenja (svježi sirevi, bez zrenja, sirevi sa zrenjem u salamuri...)
- prema području ili mjestu proizvodnje (izvorno podrijetlo) (Tratnik i Božanić, 2012)

Mikrobne kulture u proizvodnji sira imaju višestruku ulogu, a njihova aktivnost može biti proizvodnja kiseline, tvorba tvari arome i plina, djelomična hidroliza i proteoliza, proizvodnja nespecifičnih antimikrobnih tvari (organske kiseline, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, diacetila itd.) te proizvodnja specifičnih inhibitora – bakteriocina. Nastanak željenih svojstava za pojedinu vrstu sira ovisi o odabiru mikrobne kulture za njegovu proizvodnju, ali aktivnost same kulture mikroorganizama ovisi o procesnim uvjetima te o provedbi pojedinih postupaka tijekom proizvodnje ili zrenja sira. Ovisno o tipu sira, koriste se različite kulture koje mogu biti sastavljene od različitih vrsta mikroorganizama:

- bakterije mliječne kiseline – proizvodnja mliječne kiseline, tvari arome, a neke proizvode i CO<sub>2</sub> koji može oblikovati rupice u siru
- bakterije propionske kiseline – proizvodnja specifične arome i veće količine CO<sub>2</sub> koji oblikuje veće rupice u siru
- sojevi bakterije *Brevibacterium linens* – proteoliza i proizvodnja karakteristične sluzavosti na površini sira, utječe na boju i aromu sira

- plemenite plijesni – rast bijele plijesni na površini ili rast plavo-zelene plijesni unutar sira, proizvodnja intenzivnih okusa i mirisa u vrlo zrelih sireva (izražena proteolitička i lipolitička aktivnost) (Tratnik i Božanić, 2012)

Mnoge vrste i selekcionirani sojevi BMK, bakterija propionske kiseline ili *Brevibacterium linens*, proizvode i bakteriocine – bioaktivne peptide koji imaju bakteriostatski učinak na uzročnike kvarenja mlijeka i mliječnih proizvoda, uključujući patogene. Bakteriocini su aktivni i pri relativno niskim pH vrijednostima, a zadržavaju aktivnost u proizvodu tijekom duljeg razdoblja. Bakterije mliječne kiseline koje se koriste u proizvodnji sira mogu biti mezofilne ili termofilne, a s obzirom na vrstu primijenjene kulture određuju se glavni uvjeti inkubacije mlijeka (temperatura i trajanje vrenja) koji moraju biti optimalni da bi se postigla povoljna senzorska svojstva te što bolja nutritivna svojstva fermentiranog proizvoda. Neke od bakterija mliječne kiseline potječu iz probavnog sustava ljudi ili životinja te imaju izražena antimikrobna i terapijska svojstva što ih čini terapijskim bakterijama (probiotičke bakterije). Mogu biti sastavljene od jedne mikrobne vrste, više vrsta, više sojeva iste vrste ili više sojeva različitih vrsta, a najčešće uključuju dvije do tri vrste. Aktivnost bakterija mliječne kiseline u proizvodnji sira u početku je rezultat rasta bakterija i djelovanja njihovih endogenih enzima, a tijekom procesa proizvodnje sira kultura se razmnožava od otprilike  $10^5$  do  $10^7$  živih stanica po mililitru mlijeka do između  $10^8$  i  $10^9$  živih stanica po gramu sirnoga grušča (Tratnik i Božanić, 2012).

## 2.2. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE U MLIJEČNOJ INDUSTRIJI

Bakterije mliječne kiseline su Gram-pozitivne bakterije koje fermentiraju povrće, ribu, meso i mlijeko mijenjajući im kemijski sastav te stvaraju hranu s produženim rokom trajanja. Također mogu potpomagati probavu hrane i stvarati zdravu okolinu u humanom probavnom traktu – jačati autohtonu crijevnu mikrofloru. BMK imaju genom veličine od oko 2-3Mb, a okolina u kojoj uspijevaju je bogata hranjivim tvarima kao što su mlijeko, meso, razgradni biljni materijali (Teusink i Molenaar, 2017). Zbog velikog broja glikolitičkih, lipolitičkih i proteolitičkih enzima, BMK transformiraju hranjive tvari iz medija u spojeve s poželjnim senzorskim svojstvima koji mijenjaju strukturu i aromu fermentirane hrane (Todorov i sur., 2012). Bakterije mliječne kiseline imaju širok opus korištenja diljem svijeta, a koriste se u svrhu poboljšanja senzorskih svojstava, očuvanja te poboljšanja nutritivnih vrijednosti

različitih proizvoda kao što su meso, mlijeko i povrće. Međutim, daleko najpoznatija i najbolje proučavana je fermentacija koja se koristi u- mljekarskoj industriji. BMK se mogu podijeliti na homofermentativne (*Streptococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, neke vrste iz roda *Lactobacillus*) i heterofermentativne (*Leuconostoc*, neke vrste iz roda *Lactobacillus*) bakterije koje se koriste za proizvodnju fermentiranih mliječnih proizvoda i neke od njih za proizvodnju sireva pa se ubrajaju u korisne bakterije. Često se fermentacija ne provodi pomoću jednog soja već se koriste mješavine više različitih vrsta i sojeva BMK. Mljekarska industrija pruža paletu raznovrsnih proizvoda koji se razlikuju po okusu, teksturi i načinima na koje pozitivno utječu na zdravlje, a dobiveni su iz mlijeka korištenjem različitih tehnologija i starter kultura koje su zaslužne za konačna svojstva proizvoda. Važne su značajke starter kultura brza acidifikacija, mikrobiološka čistoća mlijeka, formiranje specifičnih arome i teksture te zdravstvene beneficije. Kiselost mlijeka raste fermentacijom laktoze tijekom bakterijskog rasta te ima ulogu u zaštiti mlijeka od mikroorganizama koji uzrokuju kvarenje te proliferacije patogena. Drugi učinak acidifikacije je neutralizacija negativnih naboja na mliječnim proteinima, što rezultira njihovom koagulacijom. Tako nastaju fermentirani proizvodi, kao što su jogurt i sir, te njihov ugodno sveži i blago kiseli okus. Različite vrste i sojevi BMK imaju i različite uloge u proizvodnji fermentiranih mliječnih proizvoda. Tako primjerice neke vrste BMK mogu pridonijeti poboljšanju teksture i viskoznosti fermentiranih proizvoda; to su sojevi koji mogu sintetizirati egzopolisaharide (Ruas-Madiedo i sur., 2002). Druge korištene vrste su na primjer one koje sadrže S-proteine (*S-layer*). Takve bakterijske vrste stvaraju na površini stanice S-proteine na koji se mogu vezati proteinaze stanične ovojnice koje imaju specifične proteolitičke puteve u kojima degradiraju proteine mlijeka te nastaju bioaktivni peptidi s potencijalno terapijskim svojstvima – daju proizvodu funkcionalna probiotička svojstva (Wasko i sur, 2014). Određene vrste BMK imaju sposobnost da sintetiziraju bakteriocine te su zato korištene u starter kulturama. Bakteriocini se mogu primjenjivati u prehrambenoj industriji kao prirodni konzervansi te su zato poželjne tvari. Korištenje BMK i njihovih metaboličkih proizvoda općenito se smatra sigurnim za upotrebu (GRAS status<sup>2</sup>) te je primjena tih antimikrobnih spojeva kao prirodne barijere protiv patogena i kvarenja hrane uzrokovane bakterijskim agensima dokazano učinkovita (Zacharof i Lowitt, 2012). BMK koriste se kao probiotičke starter kulture (Carminati i sur., 2010).

---

<sup>2</sup> Generally Recognised As Safe

### 2.2.1. Bakteriocini

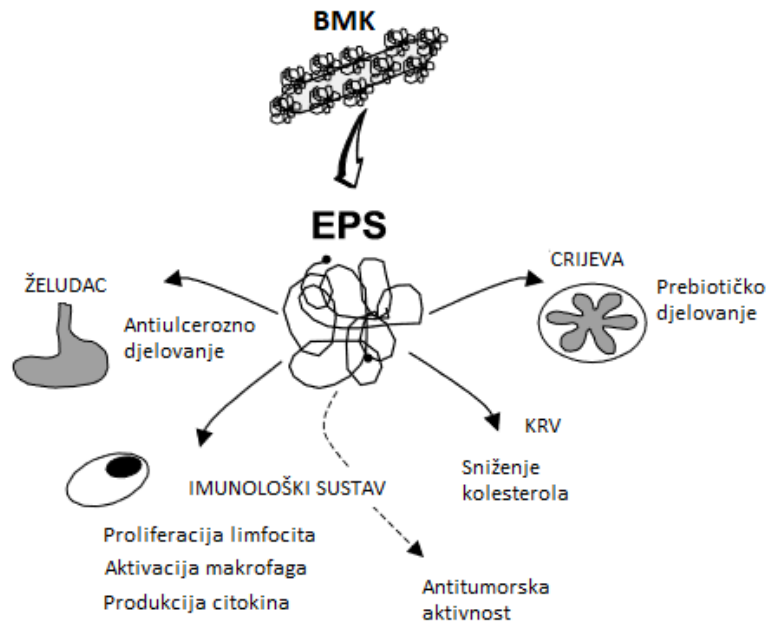
Veliki broj i Gram (+) i Gram (-) bakterija tijekom svog rasta proizvode tvari koje su proteinske strukture (bilo proteini ili polipeptidi) koje imaju svojstvo antimikrobne aktivnosti te se nazivaju bakteriocini. Bakteriocini nisu antibiotici; oni se mogu razgraditi u probavnom traktu čovjeka (za razliku od antibiotika) te se razlikuju po spektru djelovanja; bakteriocini imaju ograničeno inhibitorno djelovanje na sojeve srodne ili iste vrste u odnosu na vrstu koja bakteriocin proizvodi dok antibiotici mogu biti širokog spektra djelovanja koji uključuje i druge sojeve i vrste. Bakteriocini se sintetiziraju na ribosomima, prolaze posttranslacijske modifikacije te se izlučuju u izvanstanični medij. Male su molekulske mase pa se mogu lako degradirati proteolitičkim enzimima, posebice proteazama gastrointestinalnog trakta sisavaca, što ih čini sigurnim za ljudsku prehranu. Većina bakteriocina koje proizvode BMK su mali (<10 kDA) kationski, termostabilni, amfifilni i membranski permeabilizirajući peptidi koji se mogu podijeliti u tri glavne klase: lantibiotici, nelantibiotici i bakteriocini. Bakteriocini u širem smislu imaju veću antibakterijsku aktivnost pri nižim pH vrijednostima, a u stanicama se prvo sintetiziraju biološki neaktivni pre-peptidi koji se pomoću drugih proteina ili aminokiselina modificiraju u aktivan oblik bakteriocina. Najpoznatiji bakteriocin je nisin, a vrsta koja proizvodi bakteriocine *Lactobacillus plantarum* (Zacharof i Lowitt, 2012). Prednost pred eukariotskim antimikrobnim supstancama ipak imaju prokariotske antimikrobne supstance jer tako dobiveni bakteriocini inhibiraju rast stanica većeg broja bakterija u puno manjim koncentracijama iz razloga što ulaze u interakcije sa specifičnim receptorima prisutnima na ciljnim stanicama (Drider i sur., 2006).

### 2.2.2. Egzopolisaharidi (EPS)

Egzopolisaharidi (EPS) bakterija mliječne kiseline imaju veliki broj poželjnih učinaka na zdravlje potrošača zahvaljujući strukturnoj varijabilnosti ovih polimera. Smatra se da egzopolisaharidi snižavaju kolesterol, imaju ulogu u imunomodulaciji, posjeduju antioksidativno, antivirusno i antikoagulatívno djelovanje što ovim biopolimerima daje veliku komercijalnu vrijednost za globalno tržište te se njihovi potencijali apliciraju i u medicinskoj primjeni (Zhou i sur., 2018). Polisaharidi su široko rasprostranjeni te se mogu naći u biljkama, životinjama i mikroorganizmima u različitim oblicima (strukturama) što rezultira njihovom

kemijskom raznolikošću, te različitim fiziološkim svojstvima i biološkim aktivnostima (Chen i Huang, 2018). EPS su biopolimeri koji mogu biti vezani na stanicu jer tvore adherentni kohezivni sloj (kapsularni polisahardi) ili se izlučuju u medij tijekom rasta mikroorganizma po čemu su i dobili ime (egzocelularni polisaharid ili EPS). Sama struktura egzopolisaharida i grananje njegovih podjedinica također varira od linearnih molekula pa do visoko razgranatih molekula (Welman i Maddox, 2003; Cerning, 1994). Bakterije EPS ne koriste kao izvor energije nego te strukture imaju zaštitnu ulogu kada je mikroorganizam u svom prirodnom okruženju, npr., protiv isušivanja, fagocitoze, zaštita od protozoa, faga, antibiotika ili toksičnih spojeva te osmotskog stresa. Također, EPS ima ulogu i u prepoznavanju stanica, prijanjanju na površine i formiranju biofilmova koji olakšavaju kolonizaciju različitih biosustava (Looijesteijn i sur., 2001). Primjerice, EPS koje proizvode bakterije *Streptococcus salivarius* i *S. mutans* koloniziraju i stvaraju zubni plak (Cerning, 1994). EPS kojeg proizvodi *Lactococcus lactis subsp. cremoris* NZ4010 štiti bakterije od nekoliko antimikrobnih čimbenika kao što su bakteriofagi, metalni ioni, nisin i lizozim (Looijesteijn i sur., 2001). EPS se mogu podijeliti na homopolisaharide koji se sastoje od identičnih podjedinica (npr. celuloza, dekstran) te na heteropolisaharide ako su u njihovom sastavu prisutni različiti monosaharidi (npr. ksantan). Dakle, njihove strukture se mogu razlikovati, ali njihovi biosintetski putevi imaju veliku sličnost među različitim vrstama mikroorganizama (Schmid i sur., 2015). Fizikalno-kemijska svojstva EPS-a određuju njihovu viskoznu učinkovitost stoga je poznavanje odnosa struktura i funkcija ovih biopolimera ključno za odabir ili projektiranje polimera za određenu tehnološku primjenu. BMK koje proizvode EPS igraju važnu ulogu u mljekarskoj industriji zbog njihovog doprinosa konzistenciji i reologiji fermentiranih mliječnih proizvoda. EPS se smatraju prirodnim zgušnjivačima jer se proizvode pomoću starter kultura BMK koje imaju GRAS status. Osim toga, imaju i neke zdravstvene beneficije kao što su antitumorska i imunomodulacijska aktivnosti te se pretpostavlja i njegova prebiotička funkcija, ali nije još dovoljno istražena *in vivo* (slika 1) (Ruas-Madiedo i sur., 2002). Primjerice, upotreba "ropy" (eng. ljepljiv, nitast, vlaknast) starter kultura koji sadrže *S. thermophilus* i *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* je uobičajena praksa u proizvodnji jogurta za poboljšanje teksture, izbjegavanje sinereze i povećanje viskoznosti jogurta. Čvrstoća i kohezivnost jogurta napravljenih s "ropy" sojevima smanjuje se s prisutnošću povećanih količina EPS-a. EPS bi mogao utjecati na povezanost između kazeinskih micela koje rezultiraju manje čvrstim koagulom. Jogurti napravljeni od "ropy" kultura pokazali su najveću sposobnost držanja vode koji smanjuju osjetljivost na sinerezu. U skandinavskim mliječnim proizvodima se koriste sojevi iz *Lactococcus* roda koji stvaraju EPS. Osim ove

uloge u formiranju teksture, pretpostavlja se da se pozitivni fiziološki učinci fermentiranih mliječnih proizvoda na ljudsko zdravlje mogu pripisati i nekoliko komponenti stanične stijenke BMK, osobito izvanstaničnih polisaharida, odnosno, EPS (Kitazawa i sur., 1998; Hassan i sur., 1996).

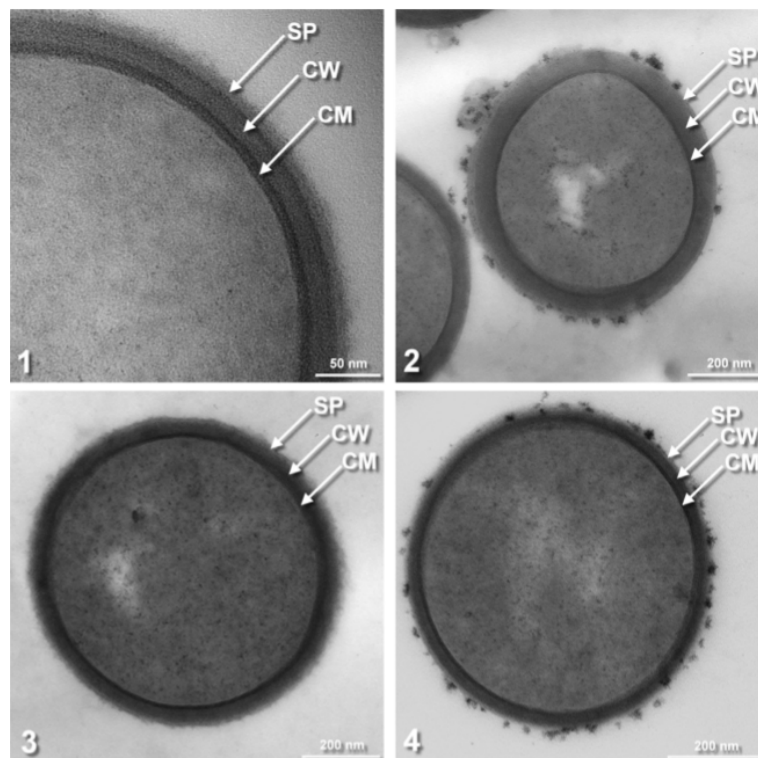


**Slika 1.** Shematski prikaz mogućih zdravstvenih svojstava egzopolisaharida koje proizvode bakterije mliječne kiseline (Ruas-Madiedo i sur., 2002)

### 2.2.3. S-proteini („S-layer“ proteini)

S-slojevi (površinski proteinski slojevi) predstavljaju jednostavne biološke membrane razvijene tijekom evolucije i jedan su od najopsežnijih biopolimera na Zemlji. S-slojevi su parakristalne dvodimenzionalne strukture monomera bjelančevina, koja potpuno pokrivaju staničnu površinu nekoliko gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterijskih vrsta i arhea tijekom svih stadija rasta (Gerbino i sur., 2015). Velika je raznolikost na genetičkoj razini ako se usporede aminokiselinske sekvence među S-slojevima laktobacila koji nisu usko povezani. Općenito, S-proteini laktobacila u pravilu imaju visok sadržaj hidrofobnih aminokislina, a nizak sadržaj aminokiselina koje sadrže sumpor, te u njihovom sastavu gotovo apsolutno izostaju cisteinski ostaci. Njihova molekulska masa kod laktobacila iznosi od 40 do 70 kDa, visoko su bazični proteini s vrijednostima pI u rasponu 9,3 – 10 te uglavnom nisu glikolizirani (slika 2) (Wasko i sur., 2014). S-slojevi stvaraju se kod nekih vrsta i sojeva Gram (+)

bakterija mliječne kiseline. Oni su metabolički skupi produkti koji mogu biti uključeni u određivanje staničnog oblika i dijeljenja stanica, mogu djelovati kao zaštitni slojevi, kao promotori za adheziju stanica, molekularna sita, molekulske i ionske zamke, kao čimbenici virulencije u patogenim organizmima (Sleytr i sur., 2014) ili kao skela za vanjski izgled drugih proteina i glikoproteina (Klotz i sur., 2017). S-slojevi mogu imati ulogu nosioca antigena ili drugih važnih molekula te su stoga dobri kandidati za primjenu u zdravstvu (Hynonen i Palva, 2013), ali i daju probiotičku funkciju BMK jer takve vrste bakterija imaju pozitivan utjecaj na zdravlje čovjeka djelujući kao imunomodulatori, ulaze u interakcije s različitim dijelovima intestinalnog trakta (adhezini), djeluju kao zaštitne molekule pod stresnim uvjetima okoline te kao zaštita od digestivnih enzima i kiselina (Uroić i sur., 2016; Beganović i sur., 2011). S-proteini na površini stanice omogućuju vezanje proteolitičkih enzima (proteinaze, endo- i egzo- peptidaze) koji u bakterija formiraju proteolitički put što je bitna i poželjna tehnološka funkcija. Također je dokazano da S-proteini imaju ulogu u preživljavanju tijekom izlaganja stresnim uvjetima, zatim u agregaciji i adheziji na različite epitelne i subepitelne strukture gastrointestinalnog trakta te su odgovorni za bakterijsko vezanje na stanice i za antimikrobnu aktivnost kompetitivnim isključivanjem patogena. Upravo su ta svojstva poželjne karakteristike funkcionalne probiotičke kulture (Banić i sur., 2018; Wasko i sur., 2014).



**Slika 2.** Prijenosne elektronske mikrofografije sojeva *Lactobacillus helveticus* sakupljenih u



kasnoj eksponencijalnoj fazi; SP-sloj S-proteina, CW-stanična stijenka, CM-stanična membrana (Wasko i sur., 2014)

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom diplomskom radu korištena su četiri soja bakterija mliječne kiseline (tablica 1). Sojevi su izolirani, selekcionirani i identificirani u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, a čuvaju se u Zbirci mikroorganizama istog Laboratorija pri  $-80^{\circ}\text{C}$  u odgovarajućoj tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15% (v/v) glicerola. *Lactobacillus fermentum* D12 je autohtoni izolat iz dimljenog sira, a sojevi *Lactococcus lactis* ZG7-10, *Lactobacillus plantarum* ZG1C i *Lactobacillus brevis* ZG1 su autohtoni izolati iz svježeg, tradicionalno proizvedenog sira.

**Tablica 1.** Sojevi bakterija mliječne kiseline korišteni u ovom radu

Bakterijski soj	Oznaka soja	Hranjiva podloga i uvjeti rasta
<i>Lactobacillus brevis</i>	ZG1	MRS, $37^{\circ}\text{C}$ , anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ZG1C	MRS, $37^{\circ}\text{C}$ , anaerobno
<i>Lactococcus lactis</i>	ZG7-10	M17, $24^{\circ}\text{C}$ , aerobno
<i>Lactobacillus fermentum</i>	D12	MRS, $37^{\circ}\text{C}$ , anaerobno

#### 3.1.2. Mlijeko

Za proizvodnju svježeg sira korišteno je svježe pasteriziranog nehomogenirizano punomasno mlijeka proizvođača „Veronika“ d.o.o.

#### 3.1.3. Hranjive podloge

Tijekom rada su za održavanje, čuvanje i uzgoj bakterija mliječne kiseline korištene hranjive podloge:

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar sustava (Biolife, Italija): pepton 10,0 g/L; mesni ekstrakt 10,0 g/L; kvašćev ekstrakt 5,0 g/L; glukoza 20,0 g/L; Tween 80 1,0 g/L; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,1 g/L; MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,05 g/L; natrijev acetat 5,0 g/L; agar 20,0 g/L u destiliranoj vodi. pH vrijednost podloge iznosi 6,5.
- MRS bujon istog je sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.
- M17 agar sastava (Biolife, Italija): tripsinski hidrolizat kazeina 2,5 g/L; pepton 2,5 g/L; sojin pepton 5,0 g/L; kvašćev ekstrakt 2,5 g/L; mesni ekstrakt 5,0 g/L; laktoza 5,0 g/L; natrijev glicerofosfat 19,0 g/L; magnezijev sulfat 0,25 g/L; askorbinska kiselina 0,5 g/L. pH vrijedost podloge iznosi 7,1.
- M17 bujon je istog sastava kao podloga M17, ali bez dodatka agara.

Sterilizacija svih hranjivih podloga provodi se pri 121°C tijekom 15 minuta.

- XLD agar (selektivni medij za izolaciju *Salmonella* i *Shigella* vrsta) (Biolife, Italija): ksiloza 3,5 g/L; L-lizin 5,0 g/L; laktoza 7,5 g/L; saharoza 7,5 g/L; NaCl 5,0 g/L; kvašćev ekstrakt 3 g/L; deoksikolna kiselina 2,5 g/L; natrijev tiosulfat 6,8 g/L; amonij željezov citrat 0,8 g/L; fenol crveno 0,08 g/L; agar 13,5 g/L. 55 g podloge se resuspendira u 1000 mL hladne destilirane vode. Zagrijavati uz miješanje dok se potpuno ne otopi (bez autoklaviranja) te ohladiti na 45-50°C, dobro promiješati i izliti u sterilnu Petrijevu zdjelicu.
- Aloa agar (selektivna podloga za izolaciju test-mikroorganizama *Listeria monocytogenes*) (Biolab, Mađarska): pepton 34 g/L; glukoza 2 g/L; mineralne soli 15,5 g/L; natrijev piruvat 2 g/L; L- $\alpha$ -fosfatidilinozitol 2 g/L; kromogeni supstrat 0,05 g/L; antibiotici 0,17 g/L; amfotericin B 0,01 g/L; puferi 3,5 g/L; agar 13 g/L. pH podloge je 6,8. 35 g podloge se resuspendira u 400 mL destilirane vode i zagrije, uz često miješanje, do vrenja. Nakon toga se provodi sterilizacija pri 121°C tijekom 15 minuta, a nakon što se podloga ohladi na 50°C, sterilno se doda 100 mL tekućeg dodatka i jedna bočica selektivnog dodatka.

#### 3.1.4. Kemikalije

- 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, SAD)
- agaroz, „Appligane“, Francuska
- EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix-a (2x Premix) (Takara, Japan)

- „nuclease free“ voda, Takara, Japan
- etanol, „Kemika“, Hrvatska
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Mannheim
- fenolftalein (2%) „Kemika“, Hrvatska
- lizozim, „EuroBio“, Francuska
- M13 početnica (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3')
- natrijev hidroksid „Kemika“, Hrvatska
- natrijev klorid „Kemika“, Hrvatska
- Tris (hidroksimetil)-aminoetan, „Carlo Erba“
- kompleksal III (etilendiamintetraoctena kiselina dinatrijeva sol-dihidrat), „Kemika“, Hrvatska
- $\lambda$  DNA HindIII (Fermentas, Canada)
- 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, SAD)
- Maxwell<sup>®</sup> DNA Tissue kit

### 3.1.5. Aparatura i pribor

- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- Bagmixer, „Interscience“, Francuska
- BioSpec Nano, „Shimatzu“, Japan
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- DNA-termoblok, Mastercyclerpersonal, „Eppendorf“
- eksikator
- elektroforetska kadica, „BioRad“, SAD
- tubice od 1,5 i 2 ml, „Eppendorf“, SAD
- epruvete
- hladnjak, „Gorenje“, Hrvatska
- kivete za centrifugiranje
- Maxwell<sup>®</sup> 16 Research System instrumentu (Promega, SAD)

- Petrijeve zdjelice
- pH-metar, „Metrohm“, Švicarska
- pinceta
- sušionik, „Instrumentaria“, Hrvatska
- stalci za tubice od 1,5 i 2 ml
- stalci za epruvete
- nastavci za automatske pipete, „Eppendorf“, SAD
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- transiluminator MiniBIS Pro, „DNT“, Njemačka
- vaga, „Sartorius“, Njemačka
- vodena kupelj, „Sutjeska“, Jugoslavija
- zamrzivač (-80°C), „New Brunswick Scientific“, SAD

### 3.2. METODE

#### 3.2.1. Održavanje i čuvanje mikroorganizama

Sojevi bakterija mliječne kiseline čuvani su pri -80°C u odgovarajućoj tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15% (v/v) glicerola. Probiotički sojevi su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta. Dan prije eksperimenta sojevi se inokuliraju u svježu hranjivu podlogu te inkubiraju pri optimalnoj temperaturi rasta.

#### 3.2.2. Provođenje kontrolirane fermentacije i proizvodnja tradicionalnih sušenih sireva

Za proizvodnju „sušenog“ kravljeg sira u suradnji s tvrtkom Probiotik d.o.o. korišteno je dvije litre pasteriziranog mlijeka „Veronika“ za svaki pojedini sir. Proizvedene su ukupno tri paralele dvije vrste sira, od kojih je jedan sir proizveden primjenom komercijalne starter kulture DSM CT-203 (kontrolni sir, sir A) sljedećeg sastava: *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* i *Leuconostoc* sp. Drugi sir, sir B, je proizveden uz dodatak autohtonih izoliranih probiotičkih sojeva *Lb. brevis* ZG1, *Lb. plantarum* ZG1C, *Lb. fermentum* D12 i *Lc. lactis* ZG7-10. Izolat *Lb. brevis* ZG1 je detaljno okarakteriziran kao soj koji eksplicira S-proteine na površini

svojih stanica, soj *Lb. plantarum* ZG1C je producent bakteriocina, soj *Lb. fermentum* D12 proizvodi funkcionalne makromolekule egzopolisaharide, dok je soj *Lc. lactis* ZG7-10 odabran zbog proteolitičke aktivnosti koja je nužan preduvjet u proizvodnji sireva zbog toga što pridonosi njegovoj aromi. Nakon optimizacije uvjeta potrebnih za proizvodnju sira odgovarajuće kvalitete, prekonoćne kulture odabranih izolata BMK su centrifugirane 10 min pri 4200 o/min, a talog je ispran dva puta sterilnom fiziološkom otopinom. Prije dogrijavanja mlijeka, nakon inokulacije i tijekom fermentacije izmjerena je pH vrijednost mlijeka te je izmjerena temperatura. Nakon dodatka autohtonih starter kultura određen je broj živih stanica dodanih kultura indirektnom metodom tj. naciepljivanjem 10 $\mu$ L priređenih decimalnih razrjeđenja na MRS hranjivu podlogu za laktobacile i M-17 hranjivu podlogu za laktokoke u dvije paralele. MRS ploče s naciepljenima *Lactobacillus* vrstama inkubirane su anaerobno pri 37°C, dok su M-17 ploče s naciepljenim sojem *Lactococcus lactis* ZG7-10 inkubirane aerobno pri 24°C. Nakon 48 sati inkubacije izbrojane su porasle kolonije te je izračunata srednja vrijednost broja bakterijskih stanica (eng. Colony Forming Unit, CFU) po mililitru upotrijebljenog mlijeka. Nakon dobivanja svježeg sira određena je pH vrijednost i masa dobivenog sira te volumen sirutke zaostale nakon proizvodnje. U svrhu dobivanja tradicionalnog „sušenog sira“, dobiveni svježi sirevi su sušeni tijekom 48 sati pri 40°C uz okretanje sireva nakon 24 sata.

### 3.2.3. Kemijski sastav mlijeka za proizvodnju sira

Kemijski sastav kupovnog mlijeka „Veronika“ je analiziran od strane proizvođača, te je naveden na samoj ambalaži proizvoda.

**Tablica 2.** Kemijski sastav mlijeka „Veronika“ analiziran od strane proizvođača

PROSJEČNE HRANJIVE VRIJEDNOSTI U 100 g:	
Energija	256 kj / 61 kcal
Masti	3,2 g
od toga zasićene masne kiseline	1,9 g
Ugljikohidrati	4,8 g
od toga šećeri	4,8 g
Bjelančevine	3,3 g
Sol	0,1 g

### 3.2.4. Određivanje prinosa sira i mjerenje sinereze

Nakon proizvodnje svježih sireva određene su njihove mase te volumeni sirutki zaostalih nakon proizvodnje. U svrhu dobivanja tradicionalnog „sušenog sira“, dobiveni svježi sirevi su sušeni tijekom 48 sati pri 40°C uz okretanje sireva nakon 24 sata. Također, nakon dobivanja konačnog tradicionalnog proizvoda, „sušenog sira“, izvagana im je masa te određen prinos. Prinos „sušenog sira“ se određuje vaganjem mase proizvedenog sira, a računa se prema količini uporabljene sirovine, odnosno svježeg mlijeka, prema navedenoj formuli:

$$\text{Prinos sira (\%)} = (\text{masa proizvedenog sira/volumen korištene sirovine}) \times 100$$

Sinereza je određena mjerenjem volumena izdvojene sirutke tijekom proizvodnje svježeg sira.

### 3.2.5. Određivanje pH-vrijednosti i kiselosti nakon proizvodnje i tijekom skladištenja sira

pH vrijednost i kiselost proizvedenih sireva određene su nakon proizvodnje i tijekom skladištenja, odnosno nakon 5 i 10 dana skladištenja proizvedenih sireva pri 4°C.

Mjerenje pH vrijednosti je provedeno uranjanjem pH elektrode u sir i očitavanjem izmjerene vrijednosti na mjernom instrumentu. pH metar je prije upotrebe baždaren uranjanjem u otopine poznate pH vrijednosti. Nakon svakog mjerenja, pH metar se ispiru destiliranom vodom s ciljem uklanjanja zaostalih komadića sira.

Kiselost sira određena je na način da se 5 g sira izradi u finu, jednoličnu i kremastu masu dodatkom 100 mL zagrijane destilirane vode na 50°C primjenom tarionika i tučka. Dobivenoj emulziji se doda 1 mL fenolftaleina (2%) te titrira s 0,1 M NaOH do pojave blijedo ružičaste boje. Kiselost sira se izračuna prema navedenoj formuli:

$$^{\circ}\text{SH} = \text{mL NaOH} \times f (\text{faktor NaOH}) \times 8$$

$$f_{\text{NaOH}} = 1$$

### 3.2.6. Određivanje suhe tvari u siru nakon proizvodnje i tijekom skladištenja sira

Suha tvar je određena u uzorcima sireva tijekom skladištenja (0., 5. i 10. dan) u tri paralele direktnom metodom prema Božanić i sur. (2010) koja se temelji na isparavanju vode iz uzoraka sira sušenjem u sušioniku do konstantne mase. Dno aluminijske posudice se prekrije kvarcnim pijeskom promjera 0,1-0,5 mm i suši u sušioniku pri  $102\pm 2^{\circ}\text{C}$  tijekom 3-4 sata s ciljem dodatnog izvlačenja vlage iz pijeska. U ohlađenu i izvaganu posudicu s pijeskom se doda 2-3 g pripremljenog uzorka sira nakon čega se uzorci suše pri temperaturi od  $102\pm 2^{\circ}\text{C}$  tijekom 2 sata. Nakon 2 sata sušenja, posudica s poklopcem i uzorkom se hladi u eksikatoru, najmanje 30 minuta i nakon toga važe. Postupak se ponavlja do dobivanja konstantne mase, pri čemu se za izračunavanje postotka suhe tvari u siru koristi najmanje zabilježena vrijednost. Svi uzorci su pripremljeni u tri paralele, pri čemu je izračunata srednja vrijednost i standardna devijacija ( $\pm$  SD).

Iz razlike u masi se izračuna postotak suhe tvari:

$$\% \text{ vode u siru} = a/c \times 100$$

a = razlika u masi aluminijske posudice s uzorkom prije i nakon sušenja (g)

c = masa odvaganutog uzorka (g)

### 3.2.7. Mikrobiološka analiza nakon proizvodnje i tijekom skladištenja sira

Mikrobiološka čistoća nakon proizvodnje i tijekom skladištenja sireva nakon 5 i 10 dana pri  $4^{\circ}\text{C}$  određena je indirektnom metodom. 1 gram sterilno je uzet iz unutrašnjosti sira i suspendiran u 9 ml sterilne destilirane vode te smrvljen u „bag mixer-u“ do dobivanja homogene suspenzije. Nakon toga su načinjena decimalna razrjeđenja i po  $10\mu\text{L}$  uzorka uzorka nacijepljeno je na određenu hranjivu podlogu u dvije paralele.

U svrhu detekcije patogenih bakterija roda *Listeria* i *Salmonella*, bakterijske suspenzije su nacijepljene na Aloa agar i XLD agar. Nakon 48 h aerobne inkubacije pri  $37^{\circ}\text{C}$ , izbrojane su porasle kolonije, te je izračunat broj bakterijskih stanica (CFU) po gramu uzorka.



U svrhu određivanja broja bakterijskih stanica roda *Lactobacillus*, suspenzija je naciepljena na MRS agar, a u svrhu određivanja broja bakterijskih stanica roda *Lactococcus*, suspenzija je naciepljena na M-17 agar. Nakon 48 h anaerobne inkubacije pri 37°C, za bakterije roda *Lactobacillus* i aerobne inkubacije pri 24°C za bakterije roda *Lactococcus*, izbrojane su porasle kolonije, te je izračunat broj bakterijskih stanica (CFU) po gramu uzorka. Smrtnost stanica bakterija mliječne kiseline 5 i 10 dana nakon skladištenja izražene su kao razlika logaritamskih vrijednosti ( $\Delta \log$  CFU/g sira) od logaritamske vrijednosti broja živih bakterijskih stanica nakon proizvodnje sira (0. dan).

### 3.2.8. Određivanje količine masti i laktoze

Količina masti i laktoze određena je iz 50 grama uzoraka „sušenih sireva“ u Centru za kontrolu namirnica (CKN) Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Količina masti određena je metodom po Soxhletu, a količina laktoze gravimetrijskom metodom.

### 3.2.9. Izolacija ukupne DNA iz uzoraka proizvedenih sireva

Uzorci sireva (100 mg) za izolaciju mješovite DNA uzeti su sterilno iz unutrašnjosti te suspendirani u 1 mL fiziološke otopine. Nakon centrifugiranja 10 min pri 13000 o/min, talog je suspendiran u 400  $\mu$ L otopine lizozima (5 mg/mL) u TE puferu (10 mM Tris + 1 mM EDTA). Nakon inkubacije od ukupno 1,5 sata, DNA je izolirana iz ukupnog volumena pripremljenog uzorka u Maxwell<sup>®</sup> 16 Research System instrumentu primjenom odgovarajućeg Maxwell<sup>®</sup> DNA Tissue kita. Koncentracija DNA je izmjerena uređajem Biospec-nano. Uzorci izolirane DNA su poslani na Illumina MiSeq sekvenciranje, a ostatak je pohranjen na -20°C za daljnje analize. Dobiveni podaci u „fasta“ formatu korišteni su za bioinformatičku analizu pomoću QIIME (eng. Quantitative Insights Into Microbial Ecology) programa u suradnji s Kabinetom za bioinformatiku Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

### 3.2.10. RAPD-PCR (eng. Random Amplified Polymorphic - DNA Polymerase chain reaction)

DNA izolirana iz sojeva korištenih u proizvodnji autohtonih „sušenih“ sireva i mješovita DNA izolirana iz proizvedenih sireva (sir A i sir B) poslužila je kao kalup za RAPD-PCR reakciju (Leboš Pavunc i sur., 2012) koja je provedena u DNA-termobloku. Korištena je M13 početnica (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3') prema Martín-Platero i sur. (2008). Smjesa za PCR reakciju se sastojala od EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix-a (2x Premix), vode (Takara, Japan), uzoraka DNA i početnice (M13). Kao negativna kontrola da fragment dobiven nakon PCR reakcije nije produkt dimerizacije dviju početnica korišten je uzorak bez DNA. Standard se sastojao od  $\lambda$  DNA HindIII i 100 bp DNA Ladder, a reakcija se odvijala prema uvjetima navedenim u tablici 3, nakon čega su dobiveni PCR produkti razdvojeni u 1%-tnom agaroznom gelu elektroforezom pri 150 V tijekom 1 sata. Gel je obojan u etidijevom bromidu, koncentracije 0,5  $\mu\text{g/mL}$  i vizualiziran ultraljubičastim svjetlom na transiluminatoru pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture (Leboš Pavunc i sur., 2012).

**Tablica 3.** Uvjeti provođenja PCR reakcije s M13 početnicom za RAPD-PCR

Broj ponavljanja	T [°C]	Vrijeme	Korak
1	94	1 min	inicijalna denaturacija
35	94	1 min	denaturacija
	40	20 s	sparivanje
	72	80 s	polimerizacija
1	72	5 min	završna elongacija

### 3.2.11. Analiza senzorskih svojstava proizvedenih sireva

Senzorska svojstva proizvedenih sireva ocjenjena su prema tablici 4, neposredno nakon sušenja sira (Kirin, 2006). Utvrđena su organoleptička svojstva sira mjerenjem, vaganjem i opisom vanjskog izgleda, konzistencije, prereza, mirisa i okusa. Grupa ocjenjivača se

sastojala od 5 članova, a rezultati ocjene senzorskih svojstava su navedeni kao srednja vrijednost svih ocjenjivača.

Vanjski izgled sira određen je njegovim dimenzijama, tj. promjerom i visinom, masom sira, te oblikom i bojom kore, koja je posljedica sušenja. Određena je srednja vrijednost dimenzija sušenih sireva iz tri paralele uz izračunate standardne devijacije ( $\pm$  SD).

**Tablica 4.** Opisni parametri senzorskih svojstava sušenog sira

<b>SENZORSKO SVOJSTVO</b>	<b>OPISNI PARAMETRI</b>	<b>OCJENA</b>
<b>Oblik, kora i vanjska boja</b>	Pravilan oblik, glatka kora, ujednačena boja	4-5
	Dijelom nepravilan oblik, hrapava kora, neujednačena boja	3
	Nepravilan oblik, raspucala kora, neujednačena boja	1-2
<b>Konzistencija</b>	Lako reziva, elastična, mekana	4-5
	Reziva, djelomično lomljiva i zrnata	3
	Reziva, krta, lomljiva	1-2
<b>Prerez</b>	Lijepo povezano bijelo tijesto, manji broj nepravilnih okašaca ujednačene veličine	4-5
	Povezano bijelo tijesto, veći broj nepravilnih okašaca neujednačene veličine	3
	Djelomično lomljivo bijelo tijesto, veliki broj nepravilnih okašaca različite veličine	1-2
<b>Miris</b>	Ugodan mliječno kiseli miris	4-5
	Slabiji mliječno kiseli miris	3
	Bez izraženog mliječno kiselog mirisa	1-2
<b>Okus</b>	Blago mliječno kiselkast okus, umjereno slan	4-5
	Kiselkast okus, malo slaniji	3
	Kiseliji okus, izraženije slan	1-2

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. PRAĆENJE KEMIJSKIH PARAMETARA SIRA NAKON PROIZVODNJE I TIJEKOM SKLADIŠTENJA

Bakterijske kulture ZG1, ZG1C, ZG7-10 i D12, izolirane iz tradicionalnih sireva, identificirane i okarakterizirane kao funkcionalne starter kulture korištene su za proizvodnju sušenog svježeg sira, a kao sirovina je korišteno nehomogenizirano pasterizirano punomasno mlijeko tvrtke „Veronika d.o.o.“. Nakon dodatka inokuluma odgovarajućih autohtonih starter kultura određen je broj živih stanica dodanih kultura indirektnom metodom tj. naciepljivanjem priređenih decimalnih razrjeđenja na odgovarajuće hranjive podloge u dvije paralele. Srednja vrijednost izbrojanih bakterijskih stanica prikazana je u tablici 5.

**Tablica 5.** Broj živih stanica nakon inokulacije sira po mililitru mlijeka

Bakterijski soj	CFU/ml ( $\pm$ SD)
<i>Lactobacillus brevis</i> ZG1	$1,71 \cdot 10^6$ ( $\pm 0,685$ )
<i>Lactobacillus plantarum</i> ZG1C	$1,5 \cdot 10^6$ ( $\pm 0,546$ )
<i>Lactococcus lactis</i> ZG7-10	$3,55 \cdot 10^6$ ( $\pm 0,846$ )
<i>Lactobacillus fermentum</i> D12	$1,98 \cdot 10^6$ ( $\pm 0,921$ )

Kako bi se pratilo što se događa u procesu proizvodnje sira, prate se različiti parametri u proizvodnji. Prije dogrijavanja mlijeka „Veronika“, nakon inokulacije i tijekom fermentacije izmjerena je pH vrijednost mlijeka te je određena temperatura mjerenja, a rezultati su prikazani u tablici 6. Osim sira B, koji je dobiven upotrebom autohtonih kultura, isti se postupak provodio i s kontrolnim sirom koji je komercijalno proizveden primjenom komercijalne starter kulture DSM CT-203 (*Lactococcus lactis* spp *lactis/cremoris*, *Lactococcus lactis* spp *lactis biovar diacetylactis* i *Leuconostoc* sp.) (sir A). Osim toga, nakon dobivanja svježeg sira određena je pH vrijednost prikazana u tablici 7.

**Tablica 6.** Izmjerene pH-vrijednosti svježeg mlijeka prije (a) i nakon (b) inokulacije združenim autohtonim starter kulturama

a)

	pH vrijednost
<b>sir B</b>	6,69 ( $\pm 0,03$ )
<b>sir A</b>	6,71 ( $\pm 0,02$ )

b)

	pH vrijednost
<b>sir B</b>	6.63 ( $\pm 0.01$ )
<b>sir A</b>	6.63 ( $\pm 0.02$ )

**Tablica 7.** Izmjerene pH-vrijednosti proizvedenih svježih sireva

	pH vrijednost
<b>sir B</b>	4.29 ( $\pm 0.02$ )
<b>sir A</b>	4.36 ( $\pm 0.01$ )

Tablica 6 prikazuje izmjerenu srednju vrijednost pH za 3 paralele dvaju sireva te se može vidjeti da nakon dodavanja autohtonih starter kultura raste kiselost mlijeka što se može objasniti zakiseljavanjem mlijeka prouzrokovanog bakterijskim kulturama koje fermentiraju laktozu u mliječnu kiselinu te tako snižavaju pH vrijednost. Time se također može objasniti i puno veći pad kiselosti nakon fermentacije mlijeka u siru koji prikazuje tablica 7. U početku fermentacije bakterije provode proces fermentacije u puno manjoj mjeri zato što tada još nisu u potpunosti prilagođeni uvjetima reakcije. Fermentacija se nastoji provoditi pod optimalnim uvjetima za rast bakterijskih kultura što uvjetuje njihov brži rast, reakcije prevođenja šećera u laktat se značajnije odvijaju te je količina oslobođene kiseline veća, što uvjetuje veće sniženje pH vrijednosti.

U svrhu dobivanja tradicionalnog „sušenog sira“, dobiveni svježi sirevi su sušeni tijekom 48 sati pri 40°C uz okretanje sireva nakon 24 sata. Kako bi se odredio prinos sira, izvagana je masa sira prije i poslije procesa sušenja sira, a za određivanje sinereze bilo je potrebno izmjeriti volumen sirutki zaostalih nakon proizvodnje. Tablice 8 i 9 prikazuju dobivene rezultate.

**Tablica 8.** Izvagane mase svježih i „sušenih sireva“ te prinos „sušenih sireva“

	Masa svježeg sira (g)	Masa „sušenog sira“ (g)	Prinos „sušenog sira“ (%)
<b>sir B</b>	597.45 (±65.95)	221.83 (±9.34)	11.09 (±0.47)
<b>sir A</b>	787.48 (±15.19)	239.65 (±14.47)	11.98 (±0.72)

**Tablica 9.** Sinereza dobivena nakon proizvodnje svježih sireva

	Sinereza (ml)
<b>sir B</b>	1298.33 (±50.08)
<b>sir A</b>	1132.67 (±23.69)

Masa sireva uvelike je veća prije sušenja, a nakon postupka sušenja pada zbog gubitka vode te je prinos otprilike jednak kod oba sira. Sinereza je u slučaju sira B nešto veća nego kod kontrolnog sira A, odnosno, dobiveno je više sirutke.

pH vrijednost i kiselost proizvedenih sireva određeni su nakon proizvodnje i tijekom skladištenja, odnosno nakon 5 i 10 dana skladištenja proizvedenih sireva pri 4°C. Tablica 10 prikazuje parametre kiselosti sira B, a tablica 11 parametre kiselosti kontrolnog sira A.

**Tablica 10.** Određivanje pH vrijednosti i kiselosti sira B nakon proizvodnje i tijekom čuvanja (5. i 10. dan) pri 4°C

	pH-vrijednost	Stupanj kiselosti; °SH
0. dan	4,23 (± 0,07)	180,13 (± 3,11)

5. dan	4,29 ( $\pm$ 0,03)	169,33 ( $\pm$ 5,62)
10. dan	4,27 ( $\pm$ 0,07)	178,40 ( $\pm$ 11,84)

**Tablica 11.** Određivanje pH vrijednosti i kiselosti kontrolnog sušenog sira A nakon proizvodnje i tijekom čuvanja (5. i 10. dan) pri 4°C

	pH-vrijednost	Stupanj kiselosti; °SH
0. dan	4,44 ( $\pm$ 0,05)	166,13 ( $\pm$ 6,06)
5. dan	4,47 ( $\pm$ 0,09)	145,33 ( $\pm$ 22,38)
10. dan	4,38 ( $\pm$ 0,18)	157,60 ( $\pm$ 31,73)

pH-vrijednost i stupanj kiselosti sira B variraju tokom 10 dana, ali zadržavaju okvirnu vrijednost. Isto vrijedi i za kontrolni sir koji, u odnosu na sir B, ima nešto veću pH-vrijednost (manje je kisel) te nešto niži stupanj kiselosti.

Suha tvar je još jedan od parametara koji je određen u uzorcima sireva tijekom skladištenja (0., 5. i 10. dan) u tri paralele, a rezultati su prikazani u tablici 12.

**Tablica 12.** Udio (%) suhe tvari ( $\pm$  SD) u uzorcima sireva tijekom skladištenja (0., 5. i 10. dan)

Uzorak	% suhe tvari
<b>sir B</b>	
0. dan	71,30 ( $\pm$ 0,64)
5. dan	68,88 ( $\pm$ 1,31)
10. dan	71,39 ( $\pm$ 1,52)
<b>sir A</b>	
0. dan	69,51 ( $\pm$ 2,87)
5. dan	69,58 ( $\pm$ 3,76)
10. dan	72,12 ( $\pm$ 4,48)

Udio suhe tvari u sirevima varira kroz 10 dana, ali zbog većeg stupnja devijacije može se reći da je oko 70% suhe tvari u oba sira, a oko 30% vode.

Kako bi dobiveni sir bio mikrobiološki ispravan i siguran za konzumaciju, bitno je i potvrditi njegovu mikrobiološku čistoću, odnosno provjeriti prisustnost patogenih bakterija u proizvodu. Nakon proizvodnje i tijekom skladištenja sireva nakon 5 i 10 dana pohranjenih pri 4°C, određena je mikrobiološka čistoća, a rezultati su prikazani u tablici 13 (za sir B) i tablici 14 (za kontrolni sir A).

**Tablica 13.** Određivanje mikrobiološke čistoće nakon proizvodnje i tijekom skladištenja u siru B

Vrijeme skladištenja	<i>Listeria sp.</i>	<i>Salmonella sp.</i>
<b>0. dan</b>	nd*	nd
<b>5. dan</b>	nd	nd
<b>10. dan</b>	nd	nd

*\*non detected*

**Tablica 14.** Određivanje mikrobiološke čistoće nakon proizvodnje i tijekom skladištenja u kontrolnom sušenom siru A

Vrijeme skladištenja	<i>Listeria sp.</i>	<i>Salmonella sp.</i>
<b>0. dan</b>	nd*	nd
<b>5. dan</b>	nd	nd
<b>10. dan</b>	nd	nd

*\*non detected*

Kroz 10 dana skladištenja sireva ispitivana je mikrobiološka čistoća sireva te je pokazano da niti jedan sir nije bio kontaminiran patogenim bakterijama roda *Listeria* i *Salmonella* te je potvrđena mikrobiološka čistoća sireva.

Kemijski sastav sireva proveden je u Centru za kontrolu namirnica (CKN), a uključivao je metode za određivanje masti i laktoze u sirevima. Rezultati su prikazani u tablicama 15 i 16.



**Tablica 15.** Količina masti (%) u uzorcima sireva metodom po Soxhlet-u

Uzorak	Količina masti (%)
sir A	26,57
sir B	27,62

**Tablica 16.** Količina laktoze (%) u uzorcima sireva gravimetrijskom metodom

Uzorak	Količina laktoze (%)
sir A	5,82
sir B	5,16

Tablice 15 i 16 prikazuju da kontrolni sir sadrži nešto manje masti u odnosu na sir B, ali veće količine laktoze u odnosu na sir B.

Utvrđena su i senzorska svojstva proizvedenih „sušenih sireva“ koja su ocjenjena prema tablici 4 (Kirin, 2006), neposredno nakon sušenja sira. U tablici 17 prikazane su srednje vrijednosti rezultata dobivenih ocjenama 5 članova grupe. Utvrđena su organoleptička svojstva sira mjerenjem, vaganjem i opisom vanjskog izgleda, konzistencije, prereza, mirisa i okusa.

**Tablica 17.** Rezultati senzorskog ispitivanja proizvedenih sireva

OCJENJIVANO SVOJSTVO:	<i>Molimo upisati postignutu ocjenu od 1 do 5 za svako svojstvo u koloni odgovarajućeg uzorka</i>	
	sir B	sir A
OBLIK, KORA I VANJSKA BOJA	3,6	3,2
KONZISTENCIJA	3,8	3,2

PREREZ	4,4	4
MIRIS	4,9	3,4
OKUS	4,9	3,2

Kontrolni sir je sir proizveden primjenom komercijalne starter kulture, dok je sir B sir proizveden uz dodatak autohtonih izoliranih probiotičkih sojeva. Prema ispitivanjima senzorskih svojstava tih dvaju sireva, iz tablice 17 može se vidjeti da je sir B pokazao nešto bolja svojstva u mirisu, okusu, konzistenciji te izgledu prema ocjenama članova grupe.

**Tablica 18.** Procjena vanjskog izgleda sira

Dimenzije	sir B	sir A
Promjer (mm)	166,67 ( $\pm 2,52$ )	198 ( $\pm 11,36$ )
Visina (mm)	48,33 ( $\pm 1,15$ )	36,67 ( $\pm 6,43$ )
Težina (g)	221,86 ( $\pm 9,29$ )	239,65 ( $\pm 14,47$ )



**Slika 3.** Fotografija kontrolnog sira A neposredno nakon sušenja

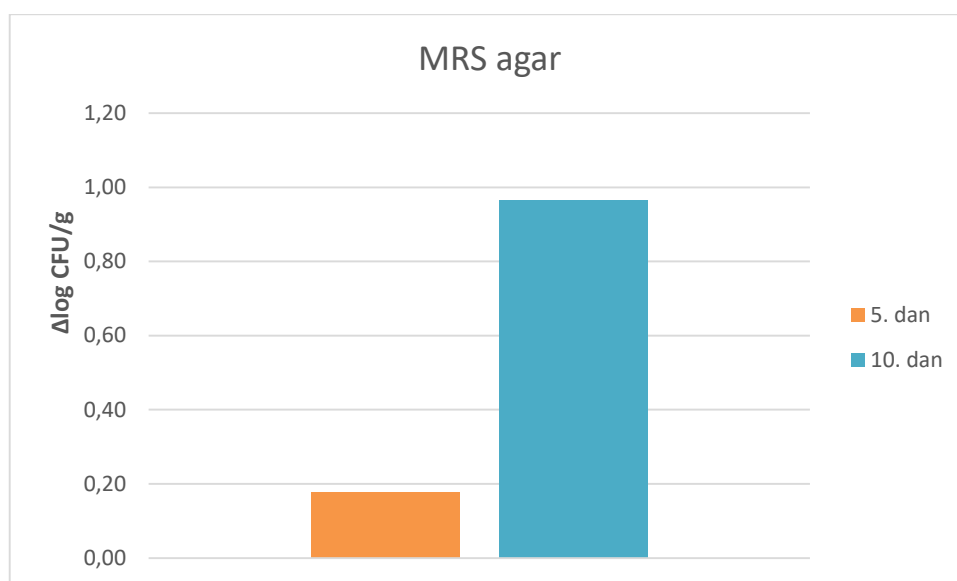


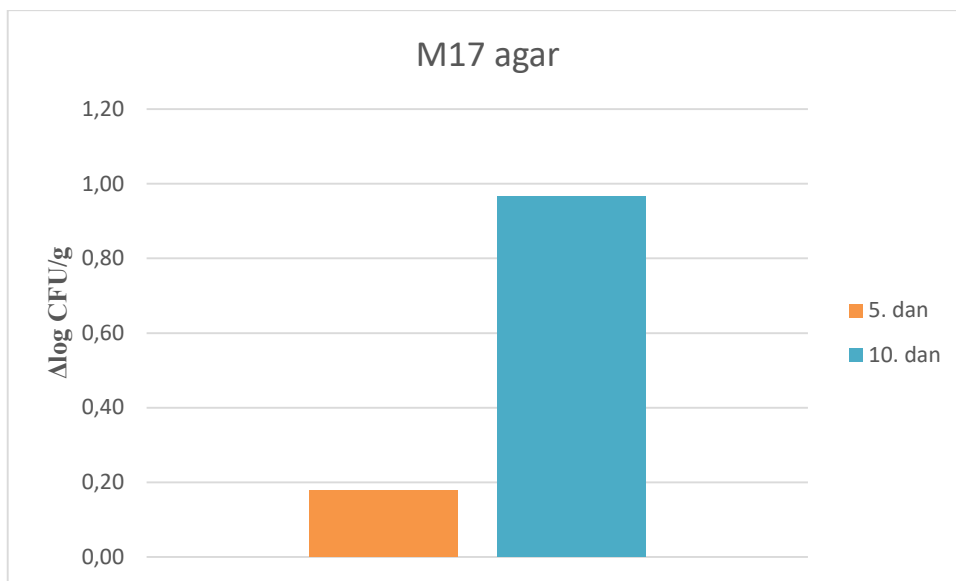
**Slika 4.** Fotografija sira B neposredno nakon sušenja

Prema tablici 18 mogu se očitati i razlike u vanjskom izgledu kontrolnog sira i sira B, a razlike su vidljive i na slikama 3 i 4.

#### **4.2. DNA ANALIZE BAKTERIJSKIH SOJEVA U PROIZVEDENIM SIREVIMA**

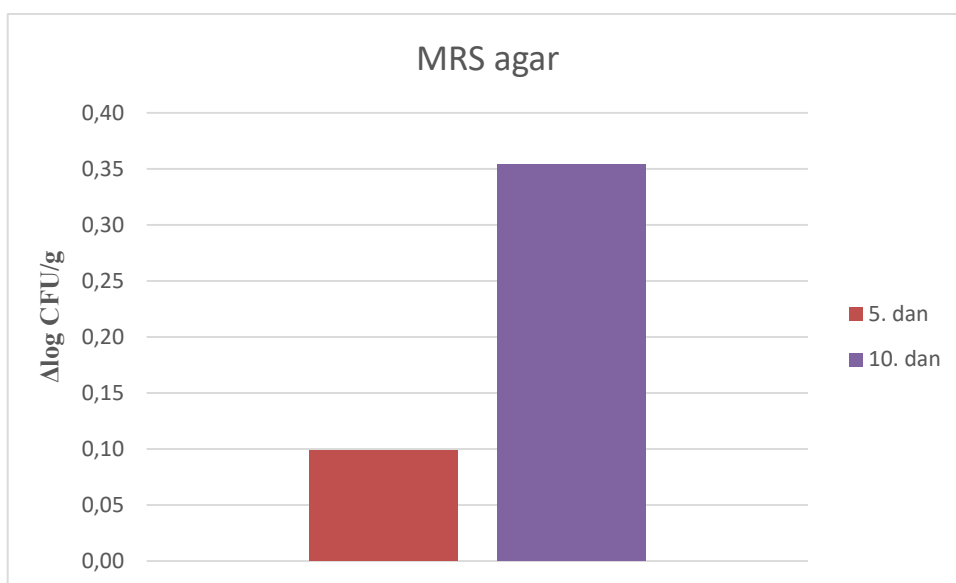
U svrhu određivanja probiotičkih svojstava dobivenih sireva, treba se dokazati prisutnost inokuliranih bakterija u dovoljnom broju u proizvedenom siru. Broj živih mikroorganizama nakon proizvodnje i tijekom skladištenja sireva nakon 5 i 10 dana pohranjenih pri 4°C određen je i prikazan na slikama 5 (sir B) i 6 (kontrolni sir A).

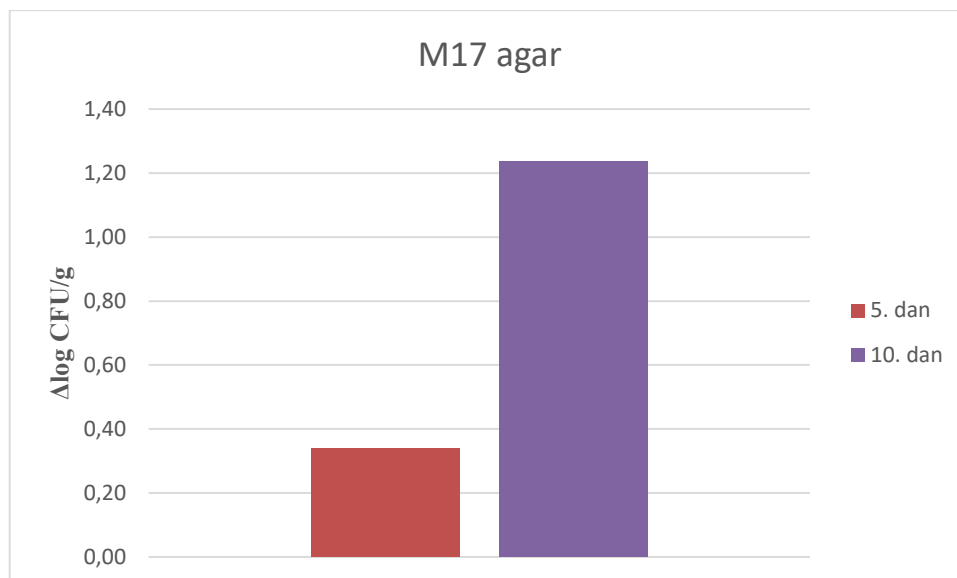




**Slika 5.** Smrtnost stanica bakterija mliječne kiseline izbrojanih na MRS i M17 agaru nakon 5 i 10 dana izražene kao razlika logaritamskih vrijednosti ( $\Delta\log$  CFU/g sira) u siru B

Utvrđivanje bakterijskih stanica roda *Lactobacillus* potvrđeno je na MRS agaru, a utvrđivanje bakterijskih stanica roda *Lactococcus* potvrđeno je na M17 agaru. Slika 5 pokazuje logaritamsku vrijednost smrtnosti bakterijskih stanica u siru B nakon 5. i 10. dana. Smrtnost bakterijskih stanica je podjednaka na obje podloge za sir B što znači da se podjednako smanjuje broj laktobacila i laktokoka.





**Slika 6.** Smrtnost stanica bakterija mliječne kiseline nakon 5 i 10 dana izražene kao razlika logaritamskih vrijednosti ( $\Delta\log$  CFU/g sira) u kontrolnom siru A

Utvrđivanje bakterijskih stanica roda *Lactobacillus* potvrđeno je na MRS agaru, utvrđivanje bakterijskih stanica roda *Lactococcus* potvrđeno je na M17 agaru. Slika 6 pokazuje logaritamsku vrijednost smrtnosti bakterijskih stanica u kontrolnom siru nakon petog i desetog dana. Najmanja smrtnost bakterijskih stanica se vidi u kontrolnom siru na MRS agaru, a na M-17 je najveća smrtnost bakterijskih stanica, što znači da je smrtnost laktokoka nešto veća nego smrtnost laktobacila u kontrolnom siru.

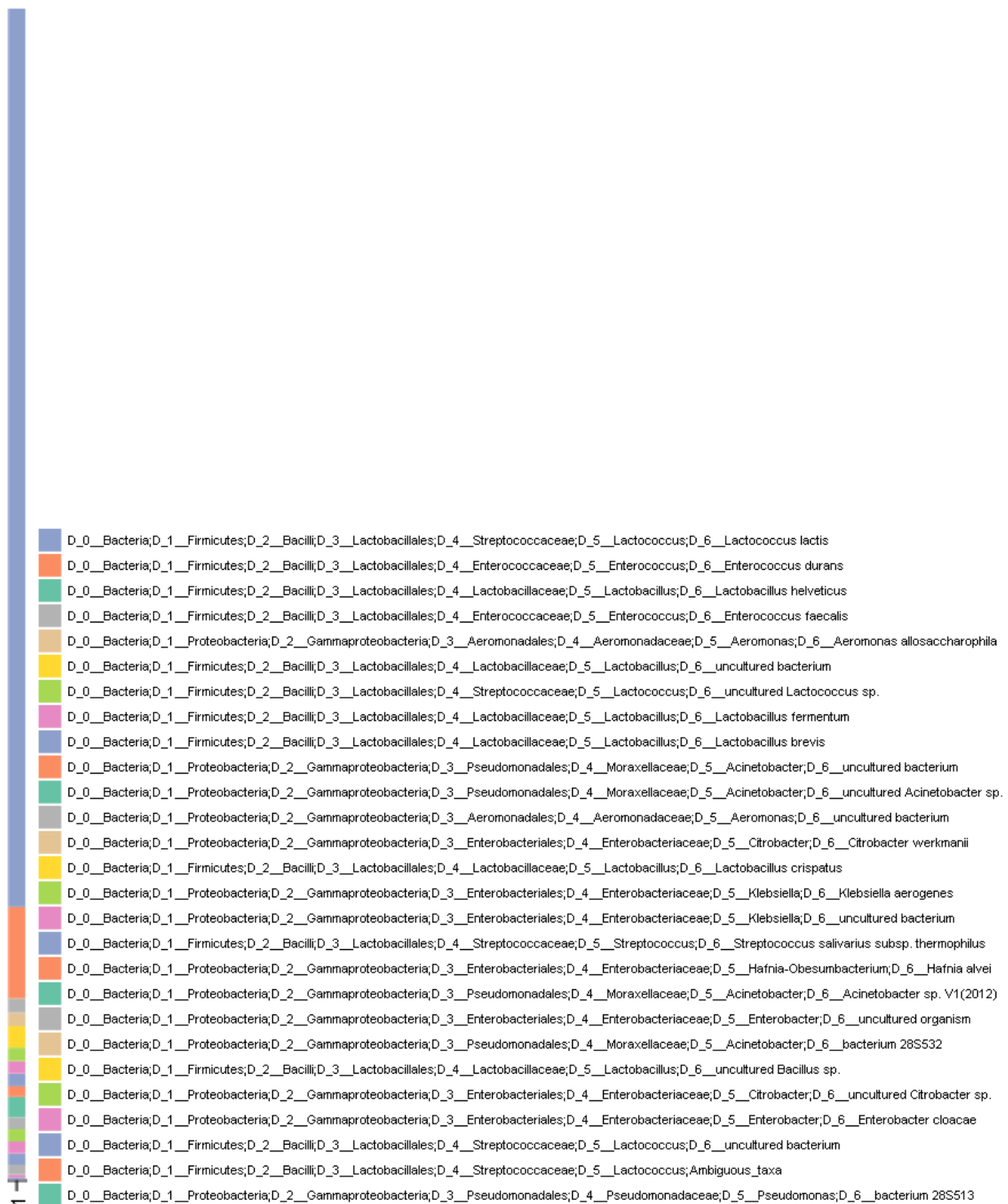
Iz uzoraka proizvedenih sireva izolirana je ukupna DNA te je izmjerena koncentracija. Ukupna DNA izolirana je iz tri paralele sira B, kontrolnog sira A, te iz autohtonih sojeva korištenih za proizvodnju sira B, zbog usporedbe. Uzorci izolirane DNA su poslani na sekvencioniranje, a ostatak je pohranjen na  $-20^{\circ}\text{C}$  za daljnje analize. Koncentracije izoliranih DNA prikazane su u tablici 19, a slika 7 prikazuje detaljnije sekvencioniranje genoma u siru B kako bi se pobliže vidio sadržaj bakterijskih stanica u dobivenom sušenom siru. Kontrolni sir nije poslan na sekvencioniranje budući da se korištene kulture koriste u komercijalne svrhe te im je bakterijski sastav otprije poznat.

**Tablica 19.** Izmjerene koncentracije uzoraka DNA izoliranih iz sireva (0,7 mm)

Uzorak	Koncentracija dsDNA (ng/ $\mu\text{L}$ )
--------	--

<b>Sir B<sup>1</sup></b>	<b>91,98</b>
<b>Sir B<sup>2</sup></b>	<b>109,4</b>
<b>Sir B<sup>3</sup></b>	<b>69,97</b>
<b>Kontrolni sir A</b>	<b>75,60</b>
<i>Lb. brevis</i> ZG1	89,77
<i>Lb. plantarum</i> ZG1C	234,40
<i>Lb. fermentum</i> D12	460,96
<i>Lc. lactis</i> ZG7-10	454,59

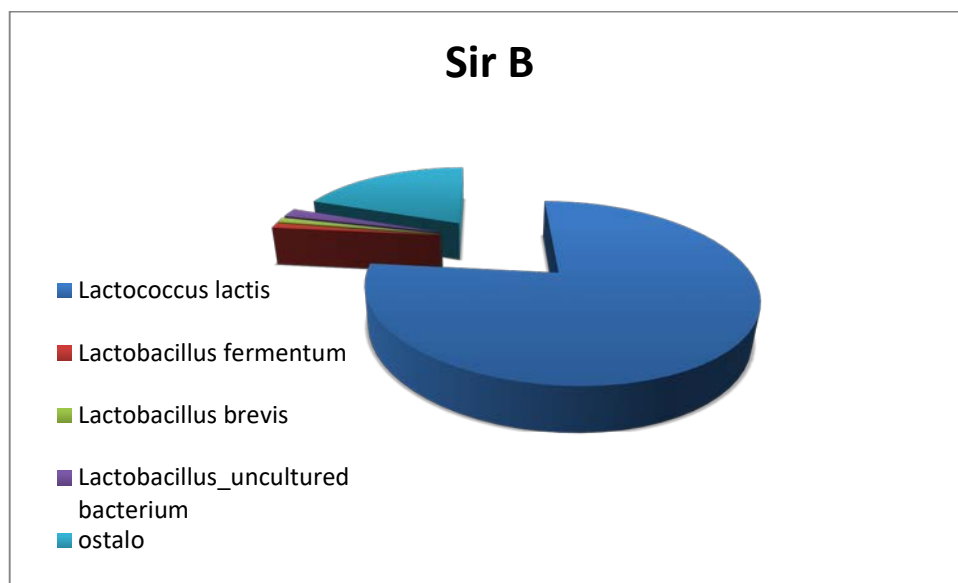
U tablici 19 mogu se vidjeti razlike u koncentraciji DNA u tri paralele sira B, no to nije zabrinjavajuće budući da količina DNA ovisi o tome koji komad sira je uzet, odnosno sir u različitim dijelovima može imati veću ili manju koncentraciju DNA.



**Slika 7.** Prikaz udjela svih bakterijskih vrsta u mikrobiomu proizvedenog sušenog sira B čija je DNA poslana na sekvencioniranje

Slika 7 prikazuje udjel svih bakterijskih vrsta pronađenih u siru B. Tri paralele sira B pomiješane su u jedan uzorak i kao takav poslana na sekvencioniranje te se može reći da je na slici prikazana srednja vrijednost svih bakterijskih vrsta u 3 paralele sira B. Lijeva linija na

slici 7 pokazuje udjel određenih vrsta, dok različite boje predstavljaju različite bakterijske vrste. *Lactobacillus plantarum* nije očit na sekvencioniranju, ali je očit *Lactobacillus\_uncultured bacterium* koji uređaj nije mogao prepoznati te se može zaključiti da je upravo to *Lb. plantarum* budući da je taj soj zasigurno inokuliran u mlijeko. Na slici 7 se također može primijetiti 27 različitih bakterijskih vrsta u proizvedenom siru. Ako se isključi 4 soja koja se dodaju na početku proizvodnje u pasterizirano mlijeko, može se zaključiti da su ostali sojevi prirodno prisutni u mlijeku te su tako ostali prisutni i u konačnom proizvodu (siru) nakon fermentacije.



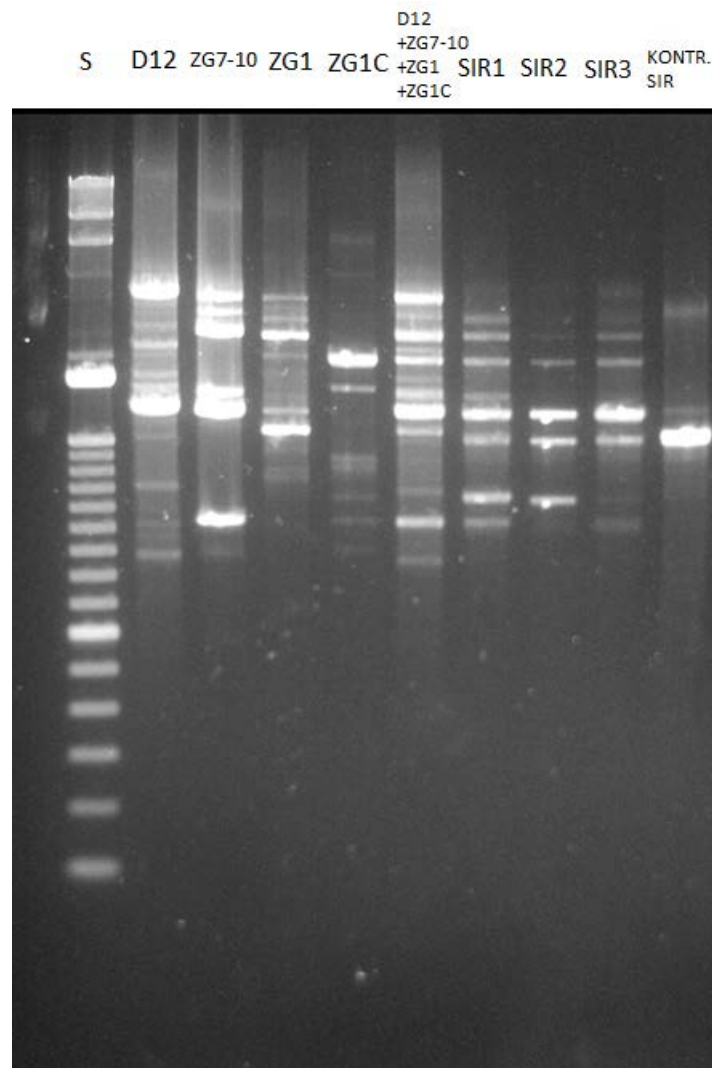
**Slika 8.** Prikaz udjela inokuliranih bakterijskih vrsta u mikrobiomu proizvedenog sušenog sira B čija je DNA poslana na sekvencioniranje

Na slici 8 izdvojeni su udjeli inokuliranih bakterijskih vrsta u siru B te se vidi da je najveći udjel vrste *Lactococcus lactis* koja je i pri inokulaciji dodana u najvećoj količini (100 mL) za razliku od drugih inokuliranih vrsta (33mL). Preostale tri vrste imaju podjednaki udjel u ukupnom genomu sekvencioniranog sira B, a veliki udjel zauzimaju i druge bakterijske vrste prirodno prisutne u mlijeku.

DNA izolirana iz sojeva korištenih u proizvodnji autohtonih „sušenih“ sireva i mješovita DNA izolirana iz proizvedenih sireva (sir B, kontrolni sir) poslužila je kao kalup za RAPD-PCR reakciju (eng. Random Amplified Polymorphic - DNA Polymerase chain reaction). To je nasumična metoda koja umnaža različite fragmente DNA te nakon provedbe PCR reakcije



stavlja se na gel elektroforezu te se prema dobivenim vrpčama mogu usporediti dobiveni genomi što je prikazano na slici 9.



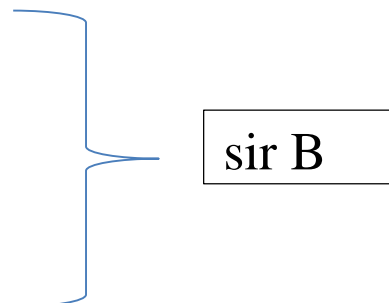
**Slika 9.** Elektroforeza produkata dobivenih RAPD metodom s M13 početnicom

ZG1 = *Lb. brevis*

ZG1C = *Lb. plantarum*

D12 = *Lb. fermentum*

ZG7-10 = *Lc. lactis*



Prema podacima dobivenim elektroforezom, na slici 9 može se vidjeti da su tri paralele sira B (SIR1, SIR2 i SIR3) sličnog sastava što je i očekivano, s obzirom da je svaka paralela sira B

proizvedena dodatkom istih kultura. Genom kontrolnog sira se razlikuje od sira B jer je proizveden dodatkom komercijalnih starter kultura DSM CT-203 koja se razlikuje od startera dodanih za proizvodnju sira B. Na slici 9 jače umnoženi fragment koji je vidljiv kod kontrolnog sira može odgovarati fragmentu iz stupca za *Lc. lactis* ZG7-10, dakle *Lc. lactis* vrsti koji je dodana u i okviru komercijalne starter kulture za proizvodnju kontrolnog sira. Također, sir 1 daje jako sličan odgovor kao mješavina kultura (D12+ZG7-10+ZG1+ZG1C) samo nešto slabijeg intenziteta prema čemu se može zaključiti da zaista proizvedeni sir 1 sadrži sve autohtone kulture koje su dodane u mlijeko. Slabiji intenzitet može se objasniti time što se početnica u genomima veže nasumično, pa nema pravila koji će se fragmenti bolje umnožiti. Također, koncentracija DNA u bakterijskih vrsta i paralelama sira 1 nije jednaka, pa se tako i intenzitet umnoženih fragmenata razlikuje. Umnoženi fragmenti 6., 7., 8. i 9. stupca se podudaraju, što je dokaz da je sastav sira 1 i mješavine kultura stavljene na elektroforezu podjednak, odnosno da sir 1 sadrže iste bakterijske vrste u genomu koje su dodane na početku eksperimenta.

## 5. ZAKLJUČCI

1. Sir proizveden s autohtonim sojevima je po senzorskim svojstvima, u odnosu na sir proizveden s komercijalnom starter kulturom, bio puno sličniji siru tradicionalno proizvedenom spontanom fermentacijom.
2. Sekvencioniranjem je određen udio svih bakterijskih vrsta prisutnih u proizvedenom siru s najvećom koncentracijom vrste *Lactococcus lactis*. RAPD metodom potvrđena je prisutnost dodanih autohtonih bakterijskih vrsta u siru, a određen je i broj njihovih živih stanica koji je bio veći od  $10^6$  po gramu što dobiveni sir definira kao sir s funkcionalnim probiotičkim svojstvima.

## 6. LITERATURA

- Banić M., Uroić K., Leboš Pavunc A., Novak J., Zorić K., Durgo K., Petković H., Jamnik P., Kazazić S., Kazazić S., Radović S., Scalabrin S., Hynönen U., Šušković J., Kos B. (2018) Characterization of S-layer proteins of potential probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* SF9B isolated from sauerkraut. *LWT- Food Sci. Technol.* **93**, 257-267.
- Beganović, J., Frece, J., Kos, B., Leboš Pavunc, A., Habjanič, K., Šušković, J. (2011) Functionality of the S-layer protein from the probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Antonie Van Leeuwenhoek* **100**(1), 43–53.
- Božanić, R., Jeličić, I., Bilušić, T. (2010) Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda, Plejada, Zagreb.
- Carminati, D., Giraffa, G., Quiberoni, A., Binetti, A., Suárez, V., Reinheimer, J. (2010) Advances and trends in starter cultures for dairy fermentations. U: Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Application (Mozzi, F., Raya, R. R., Vignolo, G. M., ured.) Wiley-Blackwell , Iowa, SAD, str. 177-192.
- Cerning, J. (1994) Polysaccharides exocellulaires produits par les bacteries lactiques. U: Luquet, Bacteries Lactiques. *Aspects Fondamentaux et Technologiques*, **Vol. I** (H. de Roissart, F. M., ured.) Lorica, France, str. 309–329.
- Chen, F., Huang, G. (2018) Preparation and immunological activity of polysaccharides and their derivatives. *Int. J. Biol. Macromol.* **112**, 211-216.
- Cogan T. M., Beresford T. P., Steele J., Broadbent J., Shah N. P., Ustanol Z. (2007) Invited review: Advances in starter cultures and cultured foods. *J. Dairy Sci.* **90**, 4005–4021.
- Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., McMullen, L. M., Prévost, H. (2006) The continuing story for class IIa bacteriocins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**(2), 564-582.
- Gerbino, E., Carasi, P., Mobili, P., Seradell, M. A., Gómez-Zavaglin, A. (2015) Role of S-layer proteins in bacteria. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **31**(12), 1877–1887.
- Hassan, A. N., Frank, J. F., Schmidt, K. A., Shalabi, S. I. (1996) Textural properties of yogurt made with encapsulated nonropy lactic cultures. *J. Dairy Sci.* **79**, 2098–2103.

Hynönen, U., Palva, A. (2013) *Lactobacillus* surfacelayer proteins: Structure, functions and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**(12), 5225–5243.

Jindal S., Anand S., Huang K., Goddard J., Metzger L., Amamcharla J. (2016) Evaluation of modified stainless steel surfaces targeted to reduce biofilm formation by common milk sporeformers. *J. Dairy Sci.* **99**, 9502–9513.

Johnson M. E. (2017) A 100 year review: Cheese production and quality. *J. Dairy Sci.* **100**, 9952-9965.

Kirin, S. (2006) Bjelovarski autohtoni «sušeni sir». *Mljekarstvo*, **56** (4) 343-356.

Kitazawa, H., Harata, T., Uemura, J., Daito, T., Kaneko, T., Itoh, T. (1998) Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*. *Int. J. Food Microbiol.* **40**, 169–175.

Klotz, C., O'Flaherty, S., Goh, Y. J., Barrangou, R. (2017) Investigating the effect of growth phase on the surface-layer associated proteome of *Lactobacillus acidophilus* using quantitative proteomics. *Front Microbiol.* **8**, 2174.

Latorre, A. A., Van Kessel J. S., Karns J. S., Zurakowski M. J., Pradhan A. K., Boor K. J., Jayarao B. M., Houser B. A., Daugherty C. S., Schukken Y. H. (2010) Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *J. Dairy Sci.* **93**, 2792–2802.

Leboš Pavunc, A. (2012) Fenotipska i genotipska karakterizacija sojeva bakterije mliječne kiseline u svrhu proizvodnje probiotika i funkcionalnih starter kultura. Disertacija, Prehrambeno-biotehnoški fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Leboš Pavunc A., Beganović J., Kos B., Uroić K., Blažić M., Šušćović J. (2012) Characterization and application of autochthonous starter cultures for fresh cheese production, *Food Technol. Biotechnol.* **50** (2) 141-151.

Lee S. H. I., Mangolin B. L. C., Gonçalves J. L., Neeff D. V., Silva M. P., Cruz A. G., Oliveira C. A. F. (2014) Biofilm-producing ability of *Staphylococcus aureus* isolates from Brazilian dairy farms. *J. Dairy Sci.* **97**, 1812–1816.

- Looijesteijn, P. J., Trapet, L., de Vries, E., Abee, T., & Hugenholtz, J. (2001) Physiological function of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Microbiol.* **64**, 71–80.
- Martín-Platero, A. M., Valdivia, E., Maqueda, M., Martín-Sánchez, I., Martínez-Bueno, M. (2008) Polyphasic Approach to Bacterial Dynamics during the Ripening of Spanish Farmhouse Cheese, Using Culture-Dependent and -Independent Methods. *App. Environ. Microbiol.* **74**, 5662-5673.
- McEwen S. A., Black W. D., Meek A. H. (1991) Antibiotic residue prevention methods, farm management, and occurrence of antibiotic residues in milk. *J. Dairy Sci.* **74**, 2128–2137.
- Ong L., Lawrence R. C., Gilles J., Creamer L. K., Crow V. L., Heap H. A., Honoré C. G., Johnston K. A., Samal P. K., Powell I. B., Gra S. L. (2017) Cheddar Cheese and Related Dry-Salted Cheese Varieties. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 829-863.
- Radošević, V., Tonković, K., Gregurek, Lj., Kos, B., Šušković, J. (2007) Production of fresh probiotic cheese with addition of transglutaminase. *Mljekarstvo* **57**(1), 15-29.
- Romero D. A., Klaenhammer T. R. (1993) Transposable elements in lactococci: A review. *J. Dairy Sci.* **76**, 1–19.
- Ruas-Madiedo P., Hugenholtz J., Zoon P. (2002) An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J*, **12**, 163-171.
- Schmid, J., Sieber, V., Rehm, B. (2015) Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Front Microbiol.* **6**, 496.
- Sleytr, U. B., Schuster, B., Egelseer, E. M., Pum, D. (2014) S-layers: Principles and applications. *FEMS Microbiol Rev*, **38**(5), 823–864.
- Somers E. B., Johnson M. E., Wong A. C. L. (2001) Biofilm formation and contamination of cheese by nonstarter lactic acid bacteria in the dairy environment. *J. Dairy Sci.* **84**, 1926–1936.
- Teusink B., Molenaar D. (2017) Systems biology of LAB: For food and thought. *Curr. Opin. Syst. Biol.* **6**, 7-13.

- Todorov, S. D., LeBlanc, J. G., Franco, B. D. G. M. (2012) Evaluation of the probiotic potencial and effect of encapsulation on survival for *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 973-984.
- Tratnik Lj., Božanić R. (2012) Mlijeko i mliječni proizvodi, nadopunjeno izd., Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
- Uroić, K., Novak, J., Hynönen, U., Pietilä, T. E., Leboš Pavunc, A., Kant, R., Šušković, J. (2016) The role of S-layer in adhesive and immunomodulating properties of probiotic starter culture *Lactobacillus brevis* D6 isolated from artisanal smoked fresh cheese. *LWT-Food Sci Technol.* **69**, 625–632.
- Wasko A., Polak-Berecka M., Kuzdralinski A., Skrzypek T. (2014) Variability of S-layer proteins in *Lactobacillus helveticus* strains. *Anaerobe* **25**, 30-60.
- Welman, A., Maddox, I. (2003) Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends Biotechnol.* **21**(6), 269-274.
- Wong A. C. L. (1998) Biofilms in food processing environments. *J. Dairy Sci.* **81**, 2765–2770.
- Zacharof M. P., Lowitt R. W. (2012) Bacteriocins produced by Lactic acid bacteria. *APCBEE Procedia* **2**, 50-56.
- Zhou Y., Cui Y., Qu X. (2018) Exopolysaccharides of lactic acid bacteria: structure, bioactivity and associations: A review. *Carbohydr. Polym.* **207**, 317-332.

## IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Ime i prezime studenta