

# Clostridium tyrobutyricum u mlijeku i kasno nadimanje sira

---

Čevra, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:596077>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

***CLOSTRIDIUM TYROBUTYRICUM* U MLIJEKU I KASNO  
NADIMANJE SIRA**

DIPLOMSKI RAD

Marija Čevra

Zagreb, rujan, 2024.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:

Proizvodnja i prerada mlijeka

***CLOSTRIDIUM TYROBUTYRICUM* U MLIJEKU I KASNO  
NADIMANJE SIRA**

DIPLOMSKI RAD

Marija Čevra

Mentor:

prof. dr. sc. Samir Kalit

Zagreb, rujan, 2024.  
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

**IZJAVA STUDENTA**  
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Marija Čevra**, JMBAG 0178120795, rođena 30.07.1999. u Livnu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

***CLOSTRIDIUM TYROBUTYRICUM U MLIJEKU I KASNO NADIMANJE SIRA***

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
*Potpis studentice*

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Marija Čevra**, JMBAG 0178120795, naslova

***CLOSTRIDIUM TYROBUTYRICUM* U MLIJEKU I KASNO NADIMANJE SIRA**

obranjen je i ocijenjen ocjenom \_\_\_\_\_, dana \_\_\_\_\_.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Prof. dr. sc. Samir Kalit, mentor

\_\_\_\_\_

2. Izv. prof. dr. sc. Iva Dolenčić Špehar, član

\_\_\_\_\_

3. Izv. prof. dr. sc. Milna Tudor Kalit, član

\_\_\_\_\_

## Zahvala

Ovim putem zahvaljujem mentoru prof. dr. sc. Samiru Kalitu na pruženoj stručnoj pomoći i savjetima tijekom pisanja diplomskog rada, na uloženoj trudu i strpljenju te na cjelovitom prenesenom stručnom znanju tijekom studiranja.

Zahvaljujem cijeloj obitelji, a posebno roditeljima koji su mi cijelo vrijeme tijekom studija bili podrška i oslonac. Hvala vam što ste nakon svakog mog ispita nazvali i pitali kako je prošlo.

Zahvaljujem svojim sestrama Aniti i Jeleni koje su me ohrabrivale i podržavale od prvoga dana, koje su vjerovala u mene i onda kada mi je bilo najteže i onda kada mi je došlo da odustanem. Hvala vam što ste mi tijekom studiranja bile vjetar u leđa, jer bez vas ne bih bila tu gdje jesam.

Zahvaljujem i Marku koji je cijelo vrijeme bio uz mene. Hvala ti što si vjerovao u mene, što si sa mnom prolazio kroz stresne, teške i lijepe trenutke.

Zahvaljujem i svim kolegama i prijateljima koji su bili uz mene i uljepšali mi ovih pet godina studiranja.

## Sadržaj

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Uvod.....                                                                         | 1  |
| 1.1. Cilj rada .....                                                                 | 2  |
| 2. Kasno nadimanje sira.....                                                         | 3  |
| 2.1. Problematika .....                                                              | 3  |
| 2.2. Opis nadimanja sira .....                                                       | 3  |
| 2.3. Načini sprječavanja kasnog nadimanja sira.....                                  | 11 |
| 3. <i>Clostridium tyrobutyricum</i> .....                                            | 12 |
| 3.1. Rod <i>Clostridium</i> .....                                                    | 12 |
| 3.2. <i>Clostridium tyrobutyricum</i> .....                                          | 15 |
| 3.3. Kvarenje mlijeka i mliječnih proizvoda bakterijom <i>C. tyrobutyricum</i> ..... | 16 |
| 3.4. Povezanost kvalitete silaže i zdravlja životinja .....                          | 17 |
| 3.5. Kontaminacija tla i biljaka organskim gnojivima (stajski gnoj i gnojovka).....  | 18 |
| 4. Maslačna fermentacija .....                                                       | 19 |
| 4.1. Pojam i vrste fermentacije .....                                                | 19 |
| 4.2. Maslačna fermentacija .....                                                     | 20 |
| 4.3. Organizmi koji sudjeluju u provedbi maslačne fermentacije .....                 | 21 |
| 4.4. Maslačna kiselina i njezina primjena .....                                      | 22 |
| 5. Lizozim .....                                                                     | 23 |
| 5.1. Lizozim kao antimikrobni agens .....                                            | 24 |
| 5.2. Primjena lizozima u mljekarskoj i ostalim industrijama .....                    | 24 |
| 5.3. Uloga lizozima u prevenciji bolesti i promicanju zdravlja.....                  | 27 |
| 5.4. Magareće mlijeko.....                                                           | 27 |

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.5. Usporedba lizozima iz bjelanjka kokošnjeg jajeta i iz magarećeg mlijeka.. | 30 |
| 5.6. Alergije .....                                                            | 31 |
| 5.7. Upravljanje rizikom alergena jaja .....                                   | 33 |
| 6. Zaključak.....                                                              | 34 |
| 7. Popis literature.....                                                       | 35 |



## Sažetak

Diplomskog rada studentice **Marija Čevra**, naslova

### ***CLOSTRIDIUM TYROBUTYRICUM* U MLIJEKU I KASNO NADIMANJE SIRA**

Kasno nadimanje sira je česta mana tvrdih sireva u mljekarskoj industriji. Ovu manu sira možemo prepoznati po šupljinama, atipičnim rupicama i po većem broju otvora koji su razasuti u sirnome tijestu. Osim toga, možemo ga prepoznati i po žilavome sirnome tijestu, bljutavome okusu i neugodnom mirisu. Još jedna od opasnosti kod sireva sa kasnim nadimanjem je često površinsko pucanje kroz čije se pukotine otvara put drugim štetnim bakterijama i plijesnima, u unutrašnjost sira, čime se kvarenje još više pojačava i ubrzava. Glavni uzročnik kasnog nadimanja sira je gram pozitivna bakterija *Clostridium tyrobutyricum* koja najčešće dolazi iz tla ili silaže. Ona provodi maslačno-kiselu fermentaciju, gdje iz laktata nastaju maslačna kiselina, ugljikov dioksid i vodik. Time dolazi do stvaranja plina koji uzrokuje stvaranje rupica i pukotina u sirnome tijestu. Osim bakterije *C. tyrobutyricum*, kasno nadimanje sira mogu uzrokovati i ostale *Clostridium* vrste: *C. butyricum*, *C. beijerinckii* i *C. sporogenes*. One spadaju u termorezistentnu skupinu bakterija koje preživljavaju standardnu temperaturu pasterizacije (63 °C). Stoga se tijekom procesa proizvodnje sira dodaje enzim lizozim radi prevencije pogreške nadimanja. Lizozim se proizvodi iz bjelanjka jajeta, može uzrokovati alergijske reakcije pa ga pri deklariranju na listi sastojaka sira potrebno istaknuti masnim slovima.

**Ključne riječi:** *Clostridium tyrobutyricum*, nadimanje sira, mlijeko, maslačna fermentacija, lizozim

## Summary

Of the master's thesis – student **Marija Čevra**, entitled

### ***CLOSTRIDIUM TYROBUTYRICUM* IN MILK AND LATE BLOWING OF CHEESE**

Late blowing of cheese is a cheese fault of hard cheeses that frequently occurs in the dairy industry. This defect can be identified by cavities, atypical holes, and an increased number of openings scattered throughout the cheese mass. Additionally, it can be recognized by a tough cheese texture, bland taste, and unpleasant odor. Another danger with late blooming cheeses is that they often develop surface cracks, which provide pathways for other harmful bacteria and moulds to penetrate into the interior of the cheese, thereby intensifying and accelerating spoilage. The primary cause of late blowing in cheese is the gram-positive bacterium *Clostridium tyrobutyricum*, which usually originates from soil or silage. This bacterium produces butyric acid, carbon dioxide, and hydrogen from lactate. This results in gas formation, causing holes and cracks in the cheese mass. Besides *C. tyrobutyricum*, other *Clostridium* species such as *C. butyricum*, *C. beijerinckii*, and *C. sporogenes* can also cause late blowing of cheese. These bacteria belong to the thermoresistant group, surviving the usual pasteurization temperatures. Therefore, during cheese production, the enzyme lysozyme is added to prevent this defect. Lysozyme is produced from egg white, so it needs to be highlighted in bold letters in the list of cheese ingredients, as it can cause allergic reactions.

**Keywords:** *Clostridium tyrobutyricum*, cheese blowing, milk, butiric fermentation, lysozyme

# 1. Uvod

Kasno nadimanje sira javlja se tijekom zrenja sira djelovanjem mikroorganizama koji stvaraju plinove i tvari neugodnog mirisa i okusa. Sirevi sa kasnim nadimanjem imaju vidljive otvore, pukotine i nepravilne rupe u sirnome tijestu. Primarnim uzročnikom kasnog nadimanja sira smatra se bakterija *Clostridium tyrobutyricum*. Silaža i životinjski feces smatraju se glavnim izvorom pojave spora *Clostridium* spp. u sirovom mlijeku. Osim toga, bakterije *Clostridium* spp. u mlijeko mogu dospjeti i iz zemlje, prašine, raznih sedimenata, intestinalnog trakta ljudi i životinja. Kasno nadimanje sira također mogu uzrokovati i bakterije *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Bacillus*, *Leuconostoc*, propionske bakterije, koliformne bakterije i kvasci. Osim iz silaže, uzročnici kasnog nadimanja sira u mlijeko mogu dospjeti i iz tla te od nečiste mužnje i nečiste kante za mužnju. Također, sijeno, sjenaža, svježa krma i pivski trop dio su kontaminacije gdje bakterije izravno ili neizravno dopijevaju u mlijeko. Kvarenje mliječnih proizvoda, a posebice sirovog mlijeka uglavnom nastaje zbog prisutnosti *Clostridium* vrsta (Samaržija 2021.).

*Clostridium tyrobutyricum* je štapićasta, gram-pozitivna pokretljiva bakterija koja raste u anaerobnim uvjetima. Ona proizvodi maslačnu i octenu kiselinu te plin vodik kao glavne produkte fermentacije. Optimalna temperatura rasta ove bakterije je od 30 do 37 °C (Wiedmann i sur. 2014.). Spore bakterije *C. tyrobutyricum* koje se nalaze u mlijeku namijenjenom za proizvodnju sira kasnije mogu uzrokovati kasno nadimanje koje nastaje zbog stvaranja plinova CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>.

Radi sprječavanja pogreške kasnog nadimanja sira važna je primjena prirodnog enzima lizozima tijekom procesa proizvodnje sira. Lizozim se dobiva ekstrakcijom iz bjelanjka kokošjeg jajeta. Lizozim ima široku primjenu u prehrambenoj (posebice mljekarskoj), farmaceutskoj te ostalim industrijama. U mljekarskoj industriji lizozim se koristi na način da se njegove granule otope u vodi. On se tijekom procesa proizvodnje u mlijeko za sirenje dodaje 15-ak minuta prije dodatka mljekarskih kultura i sirila kako bi se spriječio rast klostridija. Dodaje se u količini od 1-3 g na svakih 100 L mlijeka. Također, lizozim se može upotrebljavati i kod zrenja sireva na njegovu površinu koja je podložna onečišćenju mikroorganizama, pa je potrebno zaštititi površinu sira kako bi se spriječio rast i razvoj plijesni i mikotoksina. Lizozim ima sposobnost inhibiranja i uništavanja mnogih bakterija, gljivica i plijesni, pa je poznat kao antimikrobno sredstvo. Osim kod sireva, lizozim se koristi i kao konzervans u hrani poput mesnih proizvoda, pića, peciva, itd. (Gaoyuan, 2023.).

Primjer namirnice koja sadrži visok udio lizozima (1,0-3,7 mg/mL) je magareće mlijeko. Prednost lizozima iz magarećeg mlijeka u odnosu na lizozim iz kokošjeg jajeta je ta što mu nije potrebna ekstrakcija. Postupak ekstrakcije može smanjiti biološku aktivnost lizozima. Lizozim se smatra funkcionalnim dodatkom u prehrani jer ima potencijalne prednosti kod prevencije bolesti i promicanju zdravlja. Dokazano je da je lizozim iz magarećeg mlijeka bolji u odnosu na lizozim iz bjelanjka jajeta zato što ima manju vjerojatnost razvoja alergije i zato što biološka aktivnost lizozima nije narušena tijekom procesa ekstrakcije. Lizozim je potrebno istaknuti na ambalaži proizvoda zato što može uzrokovati alergijske reakcije. Lizozim spada u bjelančevine

jaja, a konzumacija određenih bjelančevina iz hrane može uzrokovati ozbiljne zdravstvene posljedice. Stoga je važno voditi računa o kontroli radi verifikacije podataka na deklaraciji. Osobe koje imaju alergiju na jaja često mogu biti nesvjesno izložene malim količinama lizozima u proizvodima poput sireva. Prevenciju alergije na hranu čini odgovornost proizvođača hrane i potrošača koji treba konzumirati hranu u skladu sa svojim preporukama te informacijama koje se nalaze na deklaraciji proizvoda (Cukon, 2013.).

## **1.1. Cilj rada**

Cilj ovog rada je opisati *Clostridium tyrobutyricum*, uzročnika nastanka kasnog nadimanja, način kontaminacije mlijeka i mehanizam njegova djelovanja u siru, te načine sprječavanja pogreške sira sa naglaskom na korištenje lizozima u proizvodnji sira.

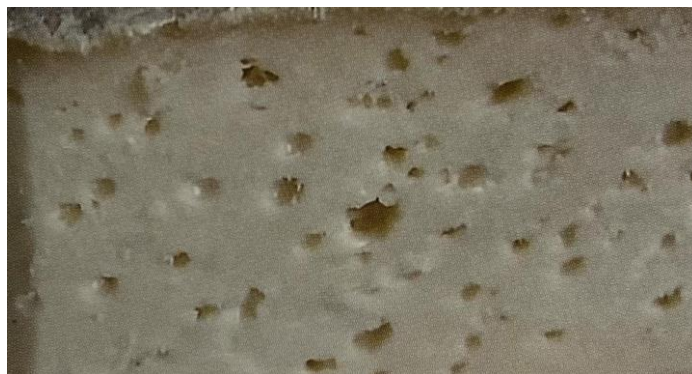
## 2. Kasno nadimanje sira

### 2.1. Problematika

Kao što je slučaj kod svih mliječnih proizvoda, tako se i kod sireva pojavljuju različite mane i nedostaci koji smanjuju njihovu kvalitetu, ali i vrijednost. Jedan od najopasnijih nedostataka sireva je nadimanje. Nadimanje sireva može biti rano i kasno. Kasno nadimanje pojavljuje se gotovo redovito u proizvodnji sira i nanosi velike štete proizvođačima i mljekarama, iz razloga što takav sir nije upotrebljiv za izravnu potrošnju.

### 2.2. Opis nadimanja sira

Kasno nadimanje sira je čest oblik kvarenja tvrdih sireva te je ono karakteristična mikrobna pogreška teksture polutvrdih i tvrdih sireva. Ono se javlja tijekom zrenja sireva, i to djelovanjem mikroorganizama koji stvaraju plinove i tvari neugodnog mirisa i okusa. Kasno nadimanje sira stvaraju anaerobne sporogene bakterije, točnije, anaerobni ili fakultativno anaerobni mikroorganizmi koji obilno stvaraju plinove CO<sub>2</sub> i/ili H<sub>2</sub> (Samaržija 2021.). Navedeni mikroorganizmi imaju sposobnost stvaranja plina u siru razgradnjom laktoze, laktata, citrata i uree prisutne u siru, ili imaju sposobnost metabolizma aminokiselina. Međutim, kasno nadimanje sira koje nastaje dekarboksilacijom glutaminske kiseline u CO<sub>2</sub> i 4-aminomaslačnu kiselinu odnosi se samo na sireve kod kojih se u proizvodnji koristi termofilna mikrobna kultura u čijem su sastavu bakterije *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus helveticus*. Pogrešku karakteriziraju vidljivi otvori, pukotine ili nepravilne rupice sirnog tijesta.



Slika 2.2.1. Pogreška kasnog nadimanja tvrdog sira uzrokovana aktivnošću bakterija *Streptococcus thermophilus* i *Lactobacillus helveticus* koje su sadržane u mikrobnjoj kulturi.

Izvor: Samaržija (2021.)

U sljedećoj tablici prikazani su uzročnici ranog i kasnog nadimanja sira. Od navedenih mikrobnih skupina/vrsta, rano nadimanje sira mogu uzrokovati koliformne bakterije i kvasci

te propionske bakterije, koje također mogu biti uzročnici i kasnog nadimanja sira. Uzročnici pogreške kasnog nadimanja su anaerobni ili fakultativno anaerobni mikroorganizmi prikazani u tablici.

Tablica 2.2.1. Mikrobne skupine i vrste koje mogu uzrokovati rano i kasno nadimanje sira

| Skupina/vrsta                                                              | Supstrat       | Plin                             |
|----------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------------------------|
| <i>Clostridium</i>                                                         |                |                                  |
| <i>Clostridium tyrobutyricum</i>                                           | Laktat         | CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> |
| <i>Lactobacillus</i>                                                       |                |                                  |
| <i>Lactobacillus brevis</i>                                                | Laktoza        | CO <sub>2</sub>                  |
| <i>Lactobacillus casei</i>                                                 | Laktoza        | CO <sub>2</sub>                  |
| <i>Streptococcus</i>                                                       |                |                                  |
| <i>Streptococcus thermophilus</i>                                          | Urea           | CO <sub>2</sub>                  |
| Koliformne bakterije                                                       | Laktoza        | CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> |
| Kvasci                                                                     | Laktoza        | CO <sub>2</sub>                  |
| <i>Lactococcus</i>                                                         |                |                                  |
| <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> | Citrat         | CO <sub>2</sub>                  |
| <i>Bacillus</i>                                                            |                |                                  |
| <i>Bacillus subtilis</i>                                                   | Laktoza        | CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> |
| <i>Leuconostoc</i>                                                         |                |                                  |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i>                                           | Laktoza/citrat | CO <sub>2</sub>                  |
| <i>Leuconostoc dextranicum</i>                                             | Laktoza/citrat | CO <sub>2</sub>                  |
| Propionske bakterije                                                       |                |                                  |
| <i>Propionibacterium shermanii</i>                                         | Laktoza        | CO <sub>2</sub>                  |

Izvor: Mullan (2003.)

Glavni znak kasnog nadimanja sira je stvaranje mnogobrojnih šupljina većih dimenzija u siru. Prema Havranek i sur. (2014.) ovisno o količini stvorenog plina i elastičnosti, odnosno čvrstoći sirnog tijesta, kasno nadimanje sira možemo lako prepoznati po nekoliko malih atipičnih rupica (otvora), a češće po većem broju otvora, odnosno rupa koje su razasute u sirnome tijestu. Također, ovu pogrešku sira još karakteriziraju i napukline ili pukotine sirnog tijesta te ispupčenje i/ili pucanje kore sira. Osim toga, takvi sirevi imaju nepoželjna senzorska svojstva, kao što su žilavo sirno tijesto, bljutavi okus i neugodan miris. Pogreška nastaje zbog fermentacije maslačne kiseline tijekom zrenja sira. Rezultat tome je prekomjerno stvaranje plinova, posebice CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>. Time dolazi do oštećenja teksture i stvaranja užeglog i neugodnog okusa sira. U praksi se kasno nadimanje sira može dokazati na način da se pri kucanju po površini sira savijenim prstom ili nekim drvenim predmetom javlja duboki zvuk, čija jačina zvuka postaje sve veća sa porastom nadimanja sira.



Slika 2.2.2. Vanjska manifestacija pogreške kasnog nadimanja polutvrdog sira.  
Detalji: A) ispupčenje gornje i donje površine sira,

## B) pucanje kore sira.

Izvor: Samaržija (2021.)

Glavni uzročnik pojave kasnog nadimanja sira je bakterija *Clostridium tyrobutyricum* koja provodi maslačno-kiselu fermentaciju, gdje se laktat prevodi u maslačnu kiselinu, ugljikov dioksid i vodik. Time nastaju velike količine plina, što dovodi do pojave velikih rupica i pukotina u sirnom tijestu čime se sir nadima te mu tijesto postaje krto (Rogelj i sur. 2015.). Neugodan okus i miris nastaju zbog prisutnosti maslačne kiseline i drugih produkata metabolizma. Osim bakterije *Clostridium tyrobutyricum*, kasno nadimanje sira također mogu uzrokovati i ostale *Clostridium* vrste, kao što su *Clostridium butyricum*, *Clostridium beijerinckii* i *Clostridium sporogenes*. Smatra se da je uz mlijeko jedan od glavnih izvora pojave bakterija *Clostridium* spp. u siru salamura koja se tijekom proizvodnje sira višekratno koristi. Rast bakterija *Clostridium* spp. u siru usko je povezan sa intenzivnom proteolizom koja se događa na kraju zrenja polutvrđih i tvrdih sireva. Posljedica toga je veća pH vrijednost te povećana koncentracija slobodnih aminokiselina u tijestu sira koji stimuliraju rast *Clostridium* spp. bakterija. Takvi novostvoreni uvjeti u siru lako postaju pogodni za njihov rast i razmnožavanje. Možemo reći da se primarnim uzročnikom kasnog nadimanja sira smatra vrsta *Clostridium tyrobutyricum*. Prema Samaržiji (2021.) pH vrijednost skoro svih vrsta polutvrđih i tvrdih sireva iznosi od 5,2 do 5,3, dok je optimalna pH vrijednost za rast *Clostridium tyrobutyricum* 5,8. Suprotno, vrstama *C. butyricum*, *C. beijerinckii* i *C. sporogenes* za rast optimalna pH vrijednost je između 6,5 i 7,0, pa su kao pojedinačne vrste rjeđe izolirani uzročnici kasnog nadimanja, vjerojatno zbog njihovih većih zahtjeva u vezi s rastom i predominantne metaboličke aktivnosti *C. tyrobutyricum*. No, u simbiotskom rastu sa *C. tyrobutyricum*, navedene vrste smatraju se sekundarnim uzročnicima nastanka kasnog nadimanja sira. *C. tyrobutyricum* svojim metabolizmom povećava pH vrijednost sira te samim time stvara povoljne uvjete za rast *C. beijerinckii* i *C. sporogenes*. Te dvije vrste svojim metaboličkim produktima (acetatom i aminokiselinama) poboljšavaju uvjete rasta bakteriji *C. tyrobutyricum*. Posljedično nastaje povećano stvaranje maslačne kiseline zbog njihovog simbiotskog odnosa. Njihova brojnost na kraju zrenja je između  $10^6$  i  $10^7$  cfu g<sup>-1</sup>. S obzirom na izgled pogreške, zbog skoro jednake sposobnosti stvaranja butirata i velikih koncentracija plinova CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>, teško je odrediti koja je od tih vrsta glavni uzročnik ove pogreške. Naime, postoje razlike u izgledu pogreške kasnog nadimanja tvrdih sireva, ovisno o mikrobnoj vrsti i čvrstoći, odnosno elastičnosti sirnog tijesta.





Slika 2.2.3. Pogreška kasnog nadimanja tvrdog švicarskog sira.

Detalji: na prerezu sira umjesto karakterističnih ravnomjerno raspoređenih očiju, u tijestu sira nalaze se veliki otvori, dok su oči sira deformirane

Izvor: Samaržija (2021.)

Sireve sa ovom pogreškom možemo lako prepoznati, jer su u većini slučajeva više ili manje jednolično izbočeni ili naduti. Tijesto takvih sireva ima puno rupica koje možemo razlikovati po obliku i veličini. Također, još jedna od opasnosti kod sireva sa kasnim nadimanjem je i ta što takvi sirevi često površinski pucaju te se kroz pukotine otvara put drugim štetnim bakterijama i plijesnima, u unutrašnjost sira, čime se kvarenje još više pojačava i ubrzava. Otvori, pukotine ili rupice u tijestu sira koje nastaju kao posljedica kasnog nadimanja mogu biti uzrokovani zbog obligatnih heterofermentativnih laktobacila te fakultativno anaerobnih laktobacila sekundarne mikrobne populacije koja uvijek kontaminira sir. Da bi pogreška bila vidljiva, ti mikroorganizmi trebali bi biti prisutni u broju  $>10^6$  cfu/g sira. U rjeđim slučajevima, izgledom isti oblik pogreške kasnog nadimanja sira mogu uzrokovati i *Bacillus* spp., koliformni organizmi, laktokoki, kvasci, streptokoki, propionske bakterije i *Leuconostoc* spp. te koliformni organizmi i kvasci (Havranek i sur. 2014.).

Što se tiče sezone nadimanja sireva, sirevi se najčešće nadimaju u proljeće kada muzne životinje prijeđu sa suhe hrane na sočnu te u jesen, ako se hrane većom količinom repe. Sirevi sa manom kasnog nadimanja mogu se također pojaviti i tijekom zime. Neki od uzroka ove pogreške su nehigijenska mužnja, nečiste kante, prerano i prenisko hlađenje mlijeka (aktivnost bakterija mliječne kiseline je usporen) te prehladne prostorije za zrenje sira (Sabadoš, D., 1952.).

Prema izgledu pogreške, teško je odrediti koja je bakterija *Clostridium* vrsta uzrokovala ovu pogrešku, s obzirom da su sve vrste jednako sposobne za stvaranje butirata i velikih količina  $\text{CO}_2$  i  $\text{H}_2$  iz laktata. U usporedbi sa uzročnicima pogreške ranog nadimanja sira, koji moraju biti prisutni u velikom broju ( $>10^6$  cfu/g), potreban broj *Clostridium* spp. bakterija u

mlijeku za pogrešku kasnog nadimanja jako je malen. Primjerice, samo 5-10 spora *C. tyrobutyricum* potrebno je u litri mlijeka za uzrokovanje kasnog nadimanja Gaude (polutvrđi sir). Međutim, ovisno o mikrobnoj vrsti i vrsti nadutog sira, izolirani broj spora iz takvog sira je između  $10^4$  i  $10^7$  cfu/g za *C. tyrobutyricum*, i između  $10^3$  i  $10^6$  cfu/g za *C. sporogenes*.

Kasno nadimanje sira koje nastaje dekarboksilacijom glutaminske kiseline u  $\text{CO}_2$  i 4-aminomaslačnu kiselinu odnosi se samo na sireve pri čijoj se proizvodnji koristi termofilna mljekarska kultura koja je sastavljena od sojeva *S. thermophilus* i *L. Helveticus* (Havranek i sur. 2014.).

Pogrešci kasnog nadimanja osobito su podložni sir Ementaler i njemu slične vrste poput ostalih švicarskih sireva ili švicarskih varijanti sireva čije kulture u svom sastavu sadrže i propionske bakterije. Kao primjer mogu poslužiti rezultati inokulacije mlijeka sporama bakterija *Clostridium spp.* kod proizvodnje švicarskog sira uz kontrolirano zrenje trajanja od 60 dana. Mlijeko za proizvodnju sira inokulirano je sa 1 do 20 spora *C. tyrobutyricum*, *C. beijerinckii* i *C. sporogenes* kao pojedinačnim vrstama ili u njihovim kombinacijama. Nakon 60 dana zrenja sira rezultat je bio idući: (i) *C. beijerinckii* i *C. sporogenes* stvaraju otvore, odnosno rupe u sirnom tijestu uz nisku koncentraciju maslačne kiseline, ali također i usporavaju propionsku fermentaciju, (ii) *C. tyrobutyricum* uz otvore (rupe) u sirnom tijestu stvara visoku koncentraciju maslačne kiseline te povećava propionsku fermentaciju, (iii) simbiotskim rastom tih triju vrsta raste obim pogreške, dok koncentracija stvorene maslačne kiseline može biti i veća od 400 mg/100g. Istim pokusom utvrđeno je i to da se brojnost *C. tyrobutyricum* već 15. dana zrenja sira povećala na oko 800 cfu/g, a 60. dana zrenja bila je  $>10^6$  cfu/g. Istovremeno, brojnost *C. beijerinckii* i *C. sporogenes* je počela postupno rasti tek nakon 30. dana zrenja, dok je njihov konačan broj 60. dana zrenja bio  $10^3$  cfu/g. Također, 60. dana zrenja pH kontaminiranih sireva porasla je u usporedbi sa kontrolnom skupinom (pH -5,62) na 5,77 do 6,13. Na idućoj slici prikazani su rezultati navedene inokulacije mlijeka sporama bakterija *Clostridium spp.*



Slika 2.2.4. Pogreška kasnog nadimanja tvrdog švicarskog sira nakon 60. dana zrenja kontaminacijom bakterijama *Clostridium spp.*

Detalji: A) kontrolni sir, B) *Clostridium tyrobutyricum*, C) *Clostridium sporogenes*, D) *Clostridium beijerinckii*, E) *Clostridium tyrobutyricum* i *Clostridium sporogenes* u omjeru 1:1, F) *Clostridium tyrobutyricum* i *Clostridium beijerinckii* u omjeru 1:1, G) *Clostridium sporogenes* i *Clostridium beijerinckii* u omjeru 1:1.

Izvor: Samaržija (2021.)

Prema Samaržiji (2021.) bakterije *Clostridium spp.*, a posebice *C. tyrobutyricum* uzrokuju pojavu kasnog nadimanja ekstratvrdih sireva, poput Grana Padano, Parmigiano Reggiano, Pekarino Sardo ili Paškog sira. Navedeni sirevi su na zrenju minimalno šest mjeseci. Utvrđeno je da uz spore i vegetativne stanice mogu preživjeti tehnološke uvjete proizvodnje sira Grana Padano. Pretvorba vegetativne stanice u sporu odvija se prilikom dogrijavanja sirnog zrna u sirarskom kotlu radi korištenja visoke temperature (53-54 °C) njegove obrade. Ponovna germinacija spora u vegetativnu stanicu događa se nakon završene obrade sirnog grša ili odmah iza stavljanja sira u kalup. *C. tyrobutyricum* za svoje preživljavanje u za nju nepovoljnim tehnološkim uvjetima u proizvodnji Grana Padano sira koristi svoj adaptivan metabolizam koji omogućuje bakterijskoj stanici: (i) sposobnost deaminacije arginina u citrulin i kasnije u ornitin i (ii) tvorbu  $\gamma$ -amino-maslačne kiseline primarno transformacijom glutamata, a manje biokemijskim reakcijama dekarboksilacije. Sposobnost deaminacije slobodnih aminokiselina u neproteinske slobodne aminokiseline poput citrulina i ornitina omogućuje

bakteriji *C. tyrobutyricum* preživljavanje u tim proizvodnim uvjetima. Posljedično, ona postaje uzrok kasnog nadimanja i ekstratvrdih sireva. U usporedbi sa sporama, smatra se da samo mali broj germinacije završava kompletan ciklus koji ponovno dovodi do vegetativne bakterijske stanice.



Slika 2.2.5. Pogreška kasnog nadimanja Paškog sira.

Detalji: na prerezu sira vidljive su atipične sirne rupe i nepravilni otvori te ulegnuće gornje površine sira.

Izvor: Samaržija (2021.)

Prema Havranek i sur. (2014.) pogreška ranog i kasnog nadimanja u literaturi najčešće se opisuje odvojeno u smislu pogrešaka koje se razlikuju. Nepoželjno nadimanje sira može biti uzrokovano i nedovoljnom higijenom, lošom proizvođačkom praksom te nedjelotvornosti mljekarske kulture koja se upotrebljava prilikom proizvodnje sira. U praksi je češći slučaj nedjeljivosti tih dviju pogrešaka radi njihove uske povezanosti. Stoga, navedene tvrdnje što je uzrok, a što posljedica pogreške nadimanja sira teško možemo jednostrano prihvatiti.

### 2.3. Načini sprječavanja kasnog nadimanja sira

Postoje tri glavna načina za sprječavanje kasnog nadimanja sira: 1) minimiziranje broja spora bakterija maslačne kiseline u sirovom mlijeku, 2) uklanjanje spora bakterija maslačne kiseline iz sirovog mlijeka putem baktofugacije, 3) sprječavanje rasta spora bakterija maslačne kiseline u siru dodatkom inhibitornih sredstava (lizozima i nitrata). Osim toga, utvrđeno je i da je visoki tlak kod prešanja sira (200-500 MPa/tijekom 10 min.) novi, alternativni i učinkoviti tehnološki pristup za sprječavanje kasnog nadimanja sira. Također, u istraživanju Inhibicijsko djelovanje ekstrakta aromatičnih biljaka protiv vrsta *Clostridium* povezanih s mliječnim proizvodima i njihova uporaba za sprječavanje kasnog nadimanja sira kojega su proveli Calzada i sur. (2023.) dokazano je inhibicijsko djelovanje ekstrakta aromatičnih biljaka protiv vrsta *Clostridium*, te njihova uporaba za sprječavanje kasnog nadimanja sira. U navedenom istraživanju dokazano je da postoji antiklostridijalno djelovanje kadulje, lavande i kamilice. Također su češnjak, cimet, origano i majčina dušica bili vrlo učinkoviti protiv bakterije *C. tyrobutyricum*.

Još neki od načina sprječavanja kasnog nadimanja sira su niska temperatura soljenja (8°C) koja sprječava klijanje spora *Clostridium*. Osim toga, važnom se pokazala i temperatura zrenja sira u kombinaciji sa temperaturom soljenja. Dokazano je da sirevi koji su bili na zrenju na temperaturi od 8 °C nisu pokazali znakove kasnog nadimanja (Morandi i sur. 2021.).

### 3. Clostridium tyrobutyricum

#### 3.1. Rod Clostridium

Prema Samaržiji (2021.) rod *Clostridium* spada u porodicu *Clostridiaceae*, koljenu *Firmicutes* te ga čine do sada opisane 203 vrste i pet podvrsta gram-pozitivnih bakterija. Vrste tog roda pojavljuju se i kao gram-negativne ili gram-varijabilne bakterije. Tijekom rane faze rasta, većina vrsta pokazuje svojstva gram-pozitivnih bakterija. U kulturi bakterije *Clostridium spp.* se i u optimalnim uvjetima pojavljuju u određenom postotku kao gram-negativne stanice koji se progresivno povećava tijekom prijelaza iz eksponencijalne u stacionarnu fazu rasta.

Navedene bakterije morfološki se pojavljuju u obliku bacila i koka, a prema zahtjevu za kisikom one mogu biti anaerobne, aerotolerantne ili fakultativno anaerobne. Vrste roda *Clostridium* povezane su s mlijekom i mliječnim proizvodima. Oni su striktni anaerobni sporotvorni organizmi koji uz sporotvorne vrste rodova *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Sporolactobacillus*, *Brevibacillus* i *Geobacillus* čine termorezistentnu skupinu organizama koja preživljava standardne temperature pasterizacije. Najčešće vrste koje uzrokuju kasno nadimanje sira su *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum* i *C. sporogenes*, dok je *C. tyrobutyricum* dominantna vrsta (Cocolin i sur., 2004.).

Bakterije *Clostridium spp.* povezane s mlijekom i mliječnim proizvodima mogu dospjeti u mlijeko iz različitih izvora poput zemlje, prašine, raznih sedimenata, intestinalnog trakta ljudi i životinja (zdrave životinje i čovjek sadržavaju ih u malom broju od oko  $100 \text{ g}^{-1}$  fecesa). Stoga se one smatraju ubikvitarnim organizmima. Mlijeko se u većoj ili manjoj mjeri može uvijek kontaminirati tim vrstama ovisno o klimatskim uvjetima, godišnjem dobu te načinu hranidbe i držanja muznih životinja. Kontaminacija sirovog mlijeka bakterijama *Clostridium* može uzrokovati značajne ekonomske gubitke kod polutvrdih i tvrdih sireva.

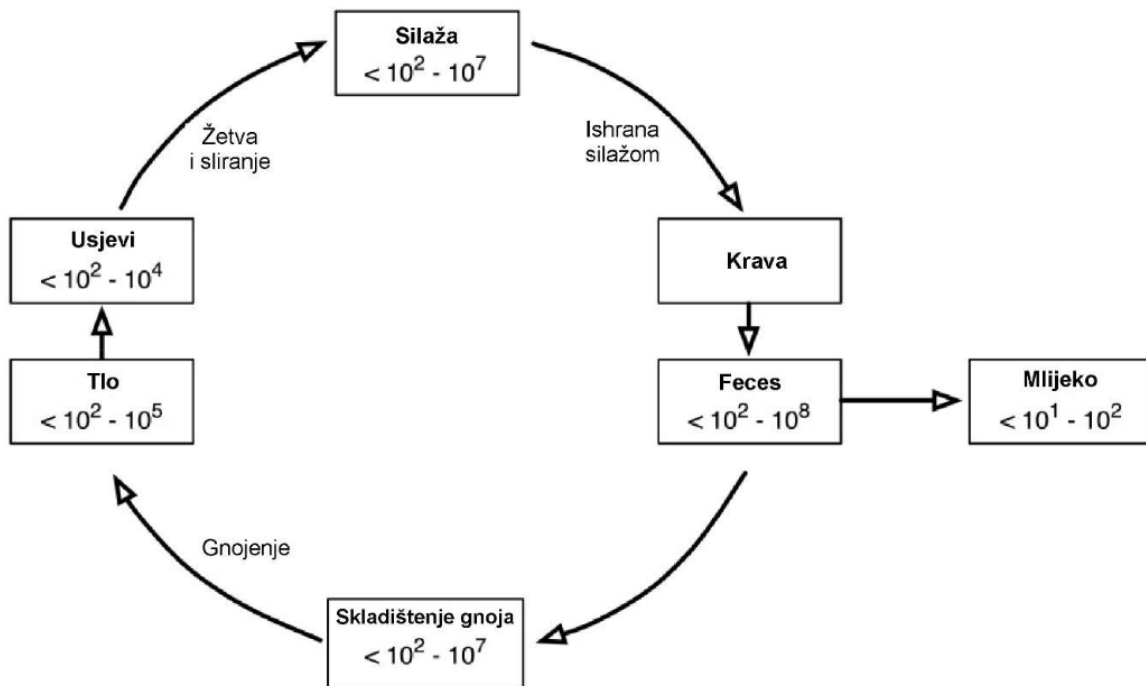
Tablica 3.1.1.. Primjer mikrobnih kontaminanata sirovog mlijeka

| Mikroorganizam     | Kontaminant                                                                                                                                                                                                                                 |
|--------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Bakterije          | <i>Lactococci</i> , <i>Lactobacilli</i> , <i>Leuconostoc</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Pseudomonas fragi</i> , <i>Bacillus spp.</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Microbacterium</i> |
| Patogene bakterije | <i>Bacillus cereus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Campylobacter jejuni</i>                                                                    |
| Gljive             | <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i>                                                                                                                                                                                   |

Izvor: Drouin i Lafrenière (2012.)

Također, sijeno, sjenaža, silaža, svježa krma, pivski trop i/ili ako se za stelju favorizira korištenje piljevine, dio su kontaminacijskog kruga pomoću kojega te bakterije izravno ili neizravno mogu dospjeti u mlijeko. Silaža i životinjski feces primarno se smatraju najvećim

izvorom pojave spora *Clostridium spp.* u sirovom mlijeku. Kada životinje pojedu silažu koja je kontaminirana, spore će se izlučiti fecesom koji se odlaže u stajnjak prije korištenja za gnojidbu usjeva. Osim toga, feces u staji može kontaminirati vime i sise i tijekom mužnje pospješiti kontaminaciju mlijeka sporama.



Slika 3.1.1. Kontaminacijski ciklus kruženja spora bakterija *Clostridium spp.* od zemlje do sirovog mlijeka po gramu.

Izvor: Samaržija (2021.)

Ova vrsta kontaminacije može se opisati kao ciklus kruženja spora *Clostridium spp.* na mliječnim farmama. Uvjeti tijekom fermentacije silaže pogoduju germinaciji spora te ponovnom razvoju vegetativne stanice (Samaržija 2021.).

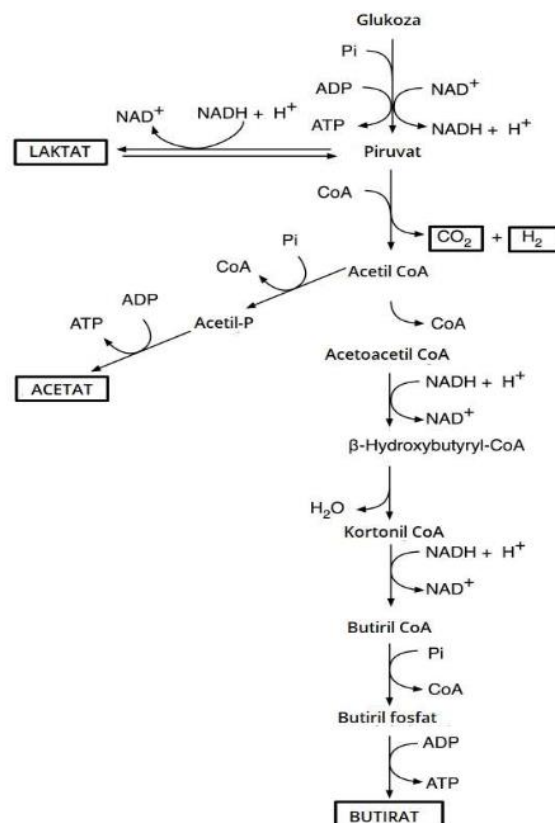
Morfološka obilježja koja su zajednička za bakterije *Clostridium spp.* su pojavnost u formi ravnih ili blago zakrivljenih bacila koji mogu biti i izrazito veliki (0,3-2,2x1,2-16,0  $\mu\text{m}$ ). U većini slučajeva one dolaze pojedinačno ili u parovima te su najčešće pokretne peritrihnim flagelama. Kod anaerobnih uvjeta one stvaraju endospore koje su otporne na visoke temperature i na druge destruktivne agense. Spore su oblikom ovalne ili okrugle te pokazuju bubrenje sporangija, dok u stanici mogu biti smještene centralno ili terminalno. Najbolje rastu na temperaturama između 25 i 45  $^{\circ}\text{C}$ , a optimalna pH vrijednost približno im je 7. One imaju sposobnost rasta na temperaturama manjim od 4  $^{\circ}\text{C}$ , ali i na temperaturama od 50  $^{\circ}\text{C}$ , u rasponu pH vrijednosti 4,0 do 9,3, u koncentraciji soli do 7% i pri aktivitetu vode 0,92. Također, one fermentiraju ugljikohidrate uz stvaranje organskih kiselina i plinova.

Veliki dio *Clostridium* vrsta pripada mikrobnim uzročnicima kvarenja mliječnih proizvoda, dok se sirovo mlijeko smatra njihovim najčešćim izvorom. Posljedično, njihova prisutnost zabilježena je i u vrhnju, pasteriziranom, steriliziranom i kondenziranom mlijeku,

fermentiranom mlijeku, sladoledu te mliječnom prahu. U tim proizvodima broj spora rijetko kada prelazi  $10 - 10^2 \text{ g}^{-1}$ . Suprotno, vrste *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes*, *C. beijerinckii* i *C. putrefaciens* smatraju se najvećim uzročnicima pogreške kasnog nadimanja polutvrđih i tvrdih sireva. Osim uzročnika kvarenja, iz mlijeka su također izolirane i patogene vrste, primarno *C. perfringens* te rjeđe *C. botulinum* i *C. tetani*. Pojavnost bakterija *Clostridium spp.* u mlijeku i mliječnim proizvodima za mljekarsku industriju su u tehnološkom i zdravstvenom smislu podjednake važnosti.

Obe skupine tih bakterija spadaju u anaerobne psihrotrofno-termorezistentne sporotvorne organizme koji mogu rasti na temperaturama od  $3^\circ$  do  $80^\circ \text{C}$ , a optimalna temperatura rasta za većinu vrsta je između  $25^\circ$  i  $40^\circ \text{C}$ . Na temelju sposobnosti metabolizma laktata u maslačnu kiselinu, bakterije *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes*, *C. beijerinckii* i *C. putrefaciens* svrstavamo i u skupinu bakterija maslačne kiseline. Njihov metabolizam laktata podrazumijeva tvorbu organskih kiselina s najvećim udjelom maslačne kiseline, gdje dolazi do oslobađanja visoke koncentracije plinova  $\text{H}_2$  i  $\text{CO}_2$ . Put fermentacije maslačne kiseline sažet je sljedećim reakcijama:

- I. Mliječna kiselina + octena kiselina = maslačna kiselina +  $\text{CO}_2$
- II. Mliječna kiselina = octena kiselina +  $\text{CO}_2$  +  $2\text{H}_2$ .



Slika 3.1.2. Metabolički put razgradnje glukoze kod bakterije *C. tyrobutyricum*

Izvor: Drouin i Lafranière (2012.)

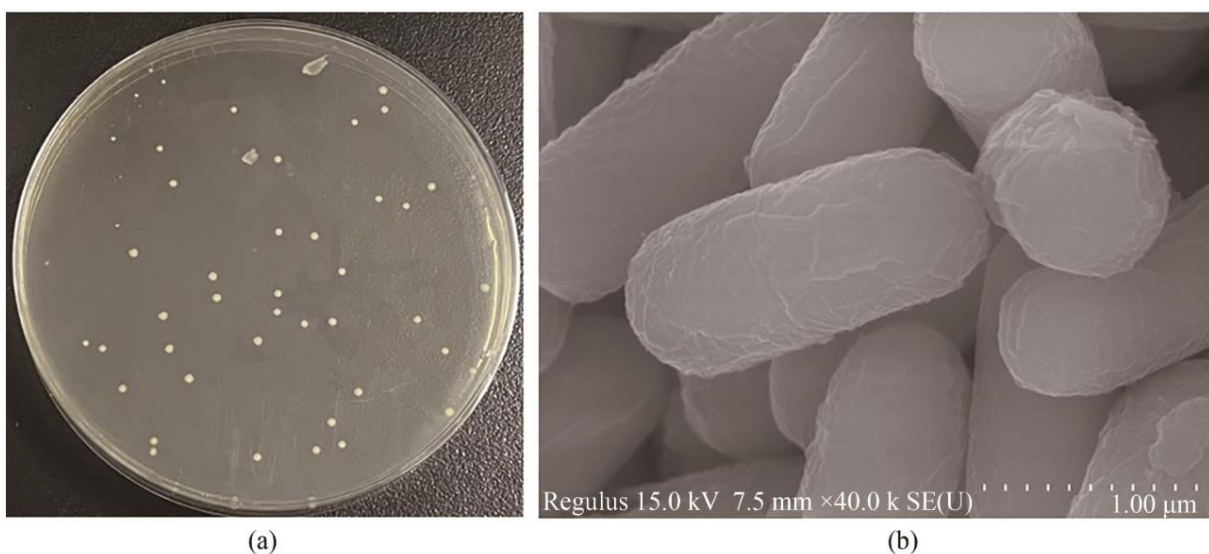


Kod anaerobnih uvjeta, bakterije *Clostridium spp.* imaju sposobnost redukcije sulfita u sulfid. Zbog te metaboličke sposobnosti, one se identificiraju i kao sulfitoreducirajuće klostridije. U mljekarskoj industriji ta se njihova metabolička sposobnost koristi kao indikator fekalnog i/ili zagađenja mlijeka zemljom. Osim toga, važno je istaknuti i da sposobnost redukcije sulfita u sulfid imaju i neke druge bakterijske vrste, poput fakultativno anaerobne bakterije *B. licheniformis*, ili nekih od vrsta gram-negativnih bakterija koje pripadaju porodici *Enterobacteriaceae*. Kako bi se izbjegnuli lažno pozitivni rezultati u mljekarskoj industriji za dokazivanje sulfitoreducirajućih klostridija, preporučuje se koristiti više selektivnih hranjivih podloga ili dodatak antibiotika u podlozi koji inhibiraju rast bakterija *Bacillus spp.*

Bakterijama maslačne kiseline označavaju se sporotvorne anaerobne vrste roda *Clostridium*. U anaerobnim uvjetima svojim metabolizmom te bakterije uz organske kiseline poput izomaslačne, propionske i octene, ali u manjim koncentracijama, stvaraju maslačnu kiselinu i plinove CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub> u visokim koncentracijama. U mljekarskoj industriji bakterije *Clostridium spp.* glavni su uzročnici pogreške kasnog nadimanja sira (Samaržija, 2021.).

### 3.2. *Clostridium tyrobutyricum*

*C. tyrobutyricum* svrstavamo u štapičastu, gram-pozitivnu bakteriju koja raste u anaerobnim uvjetima. Ona proizvodi maslačnu kiselinu, octenu kiselinu i plin vodik kao glavne produkte fermentacije iz glukoze i ksiloze (Wikipedia, 2024.) Javlja se pojedinačno ili u paru, ima peritrihalno smještene flagele koje joj omogućavaju pokretljivost. Veličina bakterije u rasponu je od 1,9-13,3x1,1-1,6 μm. Njihove spore su ovalne i subterminalne. Optimalna temperatura rasta *C. tyrobutyricum* varira od 30 do 37 °C, s umjerenim rastom na 25 °C te slabim ili nikakvim rastom na 45 °C (Wiedmann i sur. 2014.).



Slika 3.2.1. Slike kolonije (a) i skenirane elektronske mikroskopije (b) *C. tyrobutyricum*  
Izvor: Liu et al. (2022.)

Fermentacijom bakterije *C. tyrobutyricum* proizvode se velike količine maslačne i octene kiseline. Tijekom fermentacije piruvat se pretvara u butirat i acetat, dok se laktat fermentira u butirat, CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>. *Clostridium spp.* bakterije koje proizvode maslačnu kiselinu često se nazivaju „maslačnim anaerobima“, a u njih spadaju *C. butyricum*, *C. sporogenes*, *C. beijerinckii* i *C. pasteranum*. Bakterija *C. tyrobutyricum* proizvodi samo tragove alkohola u odnosu na bakteriju *C. butyricum*, koja ima sposobnost proizvodnje značajne količine butanola u kasnim fazama fermentacijskog rasta.

*C. tyrobutyricum* razlikuje se od *C. butyricum* i *C. beijerinckii* po tome što ona nema sposobnost fermentiranja laktoze, maltoze i salicina. Također, pokazalo se da ograničen broj sojeva *C. tyrobutyricum* fermentira laktozu. Neki sojevi *C. tyrobutyricum* fermentiraju manitol, ksilozu, manozu te proizvode nitrit iz nitrata.

Prema Wiedmannu i sur. (2014.) anaerobni *C. tyrobutyricum* fermentira ograničeni broj ugljikohidrata u silaži. Uvjeti u silosu mogu utjecati na rast i razvoj *Clostridium* bakterija. Klostridije koje se nalaze u silaži razgrađuju mliječnu kiselinu i stvaraju maslačnu kiselinu što uzrokuje osjetno povećanje pH vrijednosti silaže. Povećanjem pH vrijednosti spore klostridija klijanju i prelaze u vegetativni oblik. Na klijanje spora može utjecati nivo silaže u silosu. Dokazano je da se najviše spora nalazi u prvih 50 cm dubine silaže. Prema tome, spore *C. tyrobutyricum* iz silaže prelaze u mlijeko. Prisutnost spora u mlijeku koje je namijenjeno za proizvodnju sira kasnije može uzrokovati kasno nadimanje polutvrdih i tvrdih sireva. Prisutnost *C. tyrobutyricum* u silaži, pa tako i u mlijeku uzrokuje ekonomske gubitke proizvođačima sira. Sirevi koji su proizvedeni od mlijeka sa sporama drugih *Clostridium* vrsta, poput *C. beijerinckii* i *C. sporogenes* nisu uzrokovali pojavu kasnog nadimanja sira. Spore bakterija maslačne kiseline prisutne su i u silaži, pa tako i u kravljem mlijeku.

U istraživanju koje je provedeno u 24 nizozemske mliječne farme, dokazano je da su spore otkrivene u do 90% od ukupno 155 uzoraka silaže. Koncentracija se kretala od 40 do 10 000 000 spora/g. Prosječne vrijednosti bile su 20 000, odnosno 3 200 spora/g u kukuruznoj i travnoj silaži. Također, koncentracija spora u uzorcima mlijeka s farme bila je od 40 do 25 000 spora/L. Prosječna vrijednost bila je 1000 spora/L.

### **3.3. Kvarenje mlijeka i mliječnih proizvoda bakterijom *C. tyrobutyricum***

Bakterije koje imaju sposobnost stvaranja spora, poput *C. tyrobutyricum*, ili psihrotrofnih bakterija koje proizvode proteolitičke i lipolitičke enzime stabilne na toplini, mogu uzrokovati problem u kvaliteti sira. Stoga bi sadržaj tih bakterija trebao biti što manji u mlijeku prije proizvodnje sira. Ukupna količina bakterija u sirovom mlijeku prihvatljiva je u rasponu od 10<sup>4</sup> do 10<sup>6</sup> cfu/ml (Sorhaug i Stepianiak, 1997.). Prisutnost mikroorganizama u broju većem od 10<sup>4</sup> cfu/ml, znači dominaciju gram-negativnih i laktoza-negativnih psihrotrofnih bakterija. Kod tek pomuzenog mlijeka, 1-10% ukupnog broja bakterija čine psihrotrofne bakterije te one dominiraju nakon 2 do 3 dana skladištenja mlijeka. U prosjeku, vrijeme stvaranja psihrotrofnih bakterija na 4 °C je između 4,5 do 11 sati (Sorhaug i Stepianiak, 1997.).

*C. tyrobutyricum* iz mliječne kiseline stvara vodik, ugljikov dioksid i maslačnu kiselinu. Kod sireva koji imaju sirne oči, koji obično imaju pH >5,3 tijekom prva 24 sata zrenja može nastati kasno nadimanje u toploj zrioni, jer te bakterije dobro rastu u takvim uvjetima. Osim toga, kod sireva sa zatvorenom teksturom koji imaju pH <5,2 tijekom prva 24 sata, navedene bakterije mogu stvoriti nepoželjne arome koje čine sir nejestivim. Radi prevencije pojave tih bakterija važno je pripremiti silažu slobodnu od spora. Osim toga, sanitarni i higijenski uvjeti u štali tijekom mužnje moraju biti što bolji. Osim kvarenja polutvrdih i tvrdih sireva, bakterije *C. tyrobutyricum*, *C. sporogenes* i *C. butyricum* također mogu uzrokovati i kvarenje topljenih sireva. Spore tih anaerobnih vrsta preživljavaju temperature toplinske obrade od 85 do 105 °C tijekom 6-10 minuta. Stoga se u proizvodnji može koristiti nizin radi sprječavanja njihovog rasta. Poznato je da bakterija *C. botulinum* uzrokuje kvarenje namaza, pa je stoga u Sjedinjenim Državama nizin odobren radi inhibicije stvaranja rasta njihovih spora.

### 3.4. Povezanost kvalitete silaže i zdravlja životinja

Silaža je sitno isjeckana masa pojedinih vrsta biljaka koja je bogata raznim hranjivim tvarima. Hranjive tvari u silaži konzervirane su djelovanjem bakterija mliječne kiseline. Također, mliječna kiselina sprječava fermentaciju organskih tvari koja se u prirodi odvija djelovanjem bakterija u prisutnosti zraka. Cilj proizvodnje silaže je očuvanje nutritivne vrijednosti krme uz ograničenje gubitka suhe tvari. Silaža i način čuvanja krme često se smatraju glavnim izvorom spora bakterija maslačne kiseline u hrani preživača. S mikrobiološkog gledišta, razvoj bakterija *Clostridium* treba se izbjegavati tijekom procesa siliranja jer ona može negativno utjecati na okus, smanjenje energije hrane te može uzrokovati metaboličke poremećaje. Nepoželjnim mikroorganizmima u silaži osim klostridija smatraju se i enterobakterije jer one u silaži uzrokuju anaerobno kvarenje. Osim toga, postoji i aerobno kvarenje silaže čiji uzročnici mogu biti kvasci, plijesni i listerija. Mnogi od tih mikroorganizama kvarenja smanjuju hranidbenu vrijednost silaže te imaju štetan učinak na zdravlje životinja i/ili kvalitetu mlijeka te posljedično tome imaju i štetni učinak na zdravlje ljudi kao krajnjih konzumenata takvih proizvoda. Stoga, nepoželjni mikroorganizmi uzrokuju i ekonomske gubitke na farmama (Duniere i sur., 2013.; Driehuis i Elferink, 2000.).

Vrsta *C. tyrobutyricum* jedna je od najčešće izoliranih vrsta klostridija u uzorcima silaže. *Clostridium* vrste su gram-pozitivne, obligatne anaerobne bakterije koje imaju sposobnost stvaranja spora. *Clostridium* vrste za svoj rast zahtijevaju relativno visoke pH vrijednosti (>4,5) te visoku vlažnost krme (>70%) (Driehuis i sur., 2018.; Queiroz i sur., 2018.; Driehuis i Elferink, 2000.). Napatogene klostridije koje se obično pojavljuju u silaži uključuju *C. tyrobutyricum*, *C. butyricum* i *C. sporogenes*, dok u patogene klostridije ubrajamo *C. perfringens*, *C. difficile*, *C. tetani* i *C. botulinum* (Àvila i Carvalho, 2019.; Driehuis i sur., 2018.).

*Clostridium* vrste štetno utječu na kvalitetu silaže. Proteolitička aktivnost klostridija u silaži može uzrokovati razgradnju biljnih proteina do amonijaka, što može negativno utjecati na zdravlje životinja. U silaži se mogu pojaviti neželjeni mikroorganizmi, poput bakterija

*Clostridium spp.* i ostalih, koji uzrokuju kvarenje silaže, što može uzrokovati velike gospodarske gubitke tijekom procesa siliranja. *Clostridium* vrste koje se najčešće nalaze u silaži možemo podijeliti u tri skupine: (1) proteolitičke klostridije, (2) skupina *C. butyricum* i (3) skupina *C. tyrobutyricum* (Pahlow i sur., 2003.). Klostridije skupine 1 i 2 rastu pri pH vrijednosti iznad 5, dok skupina *C. tyrobutyricum* raste pri nižem pH, ali rjeđe pri pH manjem od 4,5. Navedene bakterije fermentiraju širok raspon ugljikohidrata u maslačnu i octenu kiselinu.

*Clostridium* vrste se u silos unose preko krmiva koja su onečišćena zemljom. Saharolitičke klostridije razgrađuju ugljikohidrate i laktate do maslačne kiseline. Razgradnjom kiseline dolazi do rasta pH vrijednosti, čime dolazi do „prevrtanja“ silaže, pa proteolitičke bakterije postaju aktivne. Proteolitičke *Clostridium* bakterije razgrađuju aminokiseline do izomaslačne kiseline i amonijaka. *Clostridium* bakterije se razvijaju u silosu bez prisutnosti zraka, čime negativno utječu na kvalitetu silaže (Gospodarski list, 2012., Nepoželjne pojave pri zimskoj upotrebi silaže). Kako bi se izbjegli neželjeni ishodi tijekom procesa siliranja, važna je redovita kontrola sigurnosti i kvalitete siliranog materijala, odnosno kontrola njene zdravstvene i hranjive vrijednosti. Time se ograničava mogućnost pojave razbolijevanja životinja te posljedični prijenos patogena na ljude kroz kontaminaciju cijelog hranidbenog lanca.

### **3.5. Kontaminacija tla i biljaka organskim gnojivima (stajski gnoj i gnojovka)**

Kruti i tekući stajski gnoj smatraju se važnim izvorima hranjivih tvari za biljke te se mogu koristiti kao gnojiva. Posljednjih godina vlada zabrinutost zbog utjecaja primjene stajskog gnoja na svojstva tla i na kvalitetu biljaka. Kontaminacija biljaka krutim ili tekućim stajskim gnojem sa enterobakterijama i klostridijama predstavlja potencijalni rizik za proizvodnju silaže i zdravlje životinja hranjenih silažom. Gnoj sadržava različite mikroorganizme, poput enterobakterija (*Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Listeria monocytogenes*), protozoe (*Cryptosporidium parvum*), te viruse. Na brojnost i raznolikost vrsta utječu čimbenici poput sezone, temperature, vrste gnoja (kruti ili tekući) te gospodarenje stajskim gnojem (npr. kompost). Broj stanica mikroorganizama može dostignuti  $10^{10}$  /g gnoja. S obzirom na okolišne uvjete, veličina populacije patogenih bakterija smanjuje se brže u odnosu na ostale vrste bakterija. Također, neki patogeni mikroorganizmi imaju sposobnost preživljavanja dužeg vremena u stajskom gnoju. Istraživanjem u SAD-u dokazano je da je *E. coli* O157:H7 preživjela 21 mjesec u krutom stajskom gnoju, a ukoliko se kompostira, onda preživljava 4 mjeseca. U tekućem gnoju primjenjuju se tehnike aerobne i anaerobne digestije za smanjenje broja patogenih mikroorganizama.

Na nekim se farmama provodi postupak prozračivanja gnojiva prije rasipanja po poljima, čime se smanjuje broj nepoželjnih mikroorganizama. Glavni čimbenici koji utječu na smanjenje populacije enterobakterija nakon primjene stajskog gnoja su UV zrake, aktivitet

vode i kompeticija s mikroorganizmima u okolišu. Pokazalo se da gnojdba aeriranim tekućim gnojem pozitivno djeluje na ukupnu kvalitetu silaže u odnosu na neprozračeni tekući gnoj.

## 4. Maslačna fermentacija

### 4.1. Pojam i vrste fermentacije

U biokemijskom smislu pojam fermentacija odnosi se na metaboličke procese kod kojih se organski spojevi, najčešće ugljikohidrati, razgrađuju uz oslobađanje energije bez prisutnosti terminalnih akceptora elektrona kisika (Samaržija, 2015). Djelomičnom oksidacijom dolazi do oslobađanja izrazito male količine ATP (adenozintrifosfat) energije u usporedbi sa stvorenom energijom potpunom oksidacijom supstrata. Ukoliko se fermentacija odvija uz prisutnost mikroorganizama koji mogu koristiti organske akceptore elektrona za procese stvaranja energije, stvaraju se različiti organski međuprodukti različitim metaboličkim putevima razgradnje. Organski spojevi određenog proizvoda koji su nastali fermentacijom mogu se međusobno razlikovati ovisno o zahtjevima mikroorganizama prema kisiku. Tako izražena razlika u okusu proizvoda nastaje zbog korištenja kulture koja u svom sastavu sadržava aerobne ili fakultativno anaerobne, kisik neovisne ili striktno anaerobne bakterijske sojeve.

Općenito, pojam fermentacija je biološki proces gdje se tvar razgrađuje u jednostavniju. To je katabolički proces razgradnje hranjivih tvari pri čemu nastaje organski spoj kao konačni produkt (Thpanorama, 2024). Fermentacija se još naziva i vrenje te se ona opisuje i kao mikrobiološki proces transformacije ugljikohidrata, posebice šećera, u alkohole, kiseline, aldehide, ketone i plinove. Fermentacija nastaje razvojem mikroorganizama koji unose šećere kao hranu u svoje stanice gdje se transformiraju u krajnje proizvode. Fermentacija je veoma raširena u prirodi te se spontano događa u svim sredinama koje sadrže šećere ili alkohole. Mikrobiološki proces fermentacije čovjek iskorištava u industrijskoj proizvodnji (mliječna kiselina, limunska kiselina, aceton, etil-alkohol, i sl.). Neke vrste fermentacije koriste se kod proizvodnje alkoholnih pića (vino, rakija, pivo), kod proizvodnje kruha, mliječnih proizvoda (kiselo mlijeko, sir), kod proizvodnje kiselog kupusa, proizvodnje silaže, itd. (Tehnologija hrane, 2017).

Također, pojam fermentacija može se koristiti i za bilo koji industrijski proces koji ovisi o aktivnosti jedne ili više mikrobnih vrsta. Industrijske fermentacije najčešće se događaju u aerobnim uvjetima, kod kojih mikroorganizmi koristeći kisik u potpunosti razgrađuju supstrat. Manji dio industrijskih fermentacija u biokemijskom smislu su one fermentacije na kojima se temelji proizvodnja alkohola i svih fermentiranih mliječnih proizvoda (Samaržija, 2015.).

Općenito, u fermentaciji osnovne sirovine postoji nekoliko vrsta fermentacija. Bez obzira na to jesu li one za proizvod poželjne ili nepoželjne, one mogu biti: mliječna, propionska, alkoholna, koliformno-plinotvorna i maslačna. Nazivi navedenih vrsta fermentacija izvedeni su iz imena konačnog produkta koji nastaje u najvećem udjelu nakon završene fermentacije. Prve tri fermentacije (mliječna, propionska i alkoholna) su poželjne te

se one koriste kod proizvodnje točno određenih mliječnih proizvoda. Suprotno, zadnje dvije navedene fermentacije (koliformno-plinotvorna i maslačna) su nepoželjne jer uzrokuju kvarenje mliječnih proizvoda (Samaržija, 2015). Mliječna fermentacija podrazumijeva pretvorbu šećera, uglavnom laktoze, u mliječnu kiselinu. Primarni mikroorganizmi kod ove vrste fermentacije su bakterije mliječne kiseline *Lactococcus*, *Lactobacillus* i *Streptococcus*. Propionska fermentacija uglavnom se koristi kod proizvodnje švicarskih sireva, gdje nastaju karakteristične sirne oči (npr. Ementaler). Ovaj proces fermentacije uključuje tvorbu mliječne kiseline u propionsku kiselinu i ugljikov dioksid. Za ovu vrstu fermentacije odgovorna je bakterija *Propionibacterium freudenreichii*. Alkoholna fermentacija uključuje pretvorbu šećera, poput glukoze, u alkohol, prvenstveno etanol i ugljikov dioksid. Naširoko se primjenjuje kod proizvodnje alkoholnih pića, gdje su kvasci glavni mikroorganizmi koji su odgovorni za alkoholno vrenje (Exquisite Biochemical, 2024).

Sve navedene vrste fermentacija čine složene kemijske i biokemijske procese koji su uvjetovani brojnim čimbenicima te su radi toga za njihovo potpuno razumijevanje potrebna fundamentalna znanja iz kemije i fizike mlijeka, biokemije, reologije i mikrobiologije.

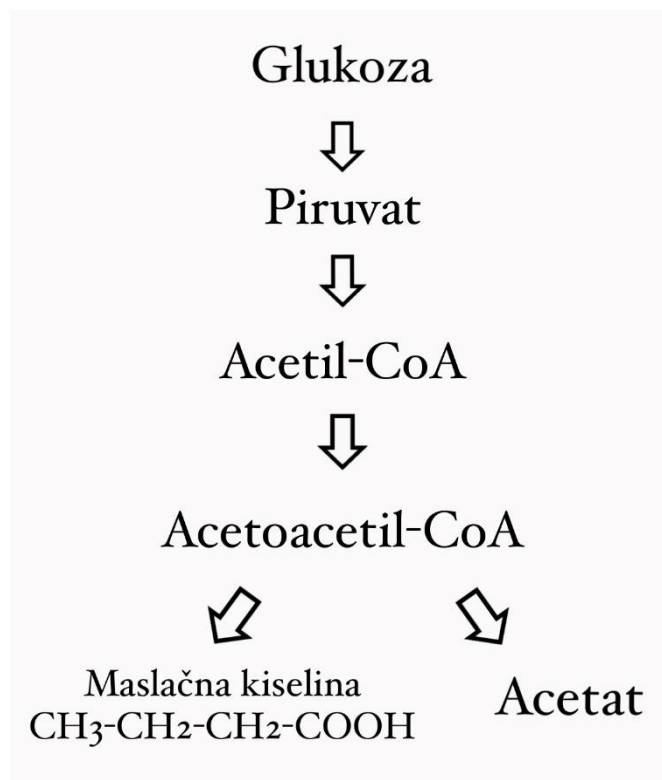
## 4.2. Maslačna fermentacija

Fermentacija glukoze pri čemu nastaje maslačna kiselina naziva se maslačna fermentacija te ju provode određene bakterije u uvjetima potpune odsutnosti kisika. Ovu vrstu fermentacije otkrio je Louis Pasteur 1861. godine. Proces maslačne fermentacije anaeroban je, ne zahtijeva kisik te je on karakterističan za mikroorganizme (bakterije i kvasci). Početak maslačne fermentacije nastaje iz molekule glukoze, preko Embden-Meyerhof-Parnasovog puta, pri čemu nastaje piruvat koji se fermentira u različite proizvode (Thpanorama, 2024.).

Postupak stvaranja maslačne fermentacije

Nastali proizvodi iz razgradnje glukoze i laktata (maslačna kiselina i plin) imaju neugodan miris. Maslačna fermentacija provodi se pomoću gram-pozitivnih bakterija roda *Clostridium*, u koje spadaju *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium thermobutyricum*, *Clostridium kluyveri* te *Clostridium pasteurianum*.

Tijekom procesa fermentacije, glukoza se katabolizira u piruvat, pri čemu proizvodi dva mola ATP i NADH. Nakon toga piruvat se fermentira u razne proizvode, ovisno o bakterijskom soju. Piruvat prelazi u laktat, zatim u acetil-CoA, pri čemu se oslobađa CO<sub>2</sub>. Zatim dvije molekule acetil-CoA formiraju acetoacetyl-CoA koji se potom reducira u butiril-CoA. Klostridije fermentiraju butiril-CoA u maslačnu kiselinu.



Slika 4.2.1. Maslačna fermentacija

Izvor: Thpanorama (2024.)

Glavni enzimi za proizvodnju butirata su fosfotransbutiralaza i butirat kinaza. Tijekom procesa stvaranja butirata nastaju 3 mola ATP-a. Kod eksponencijalnog rasta, stanice stvaraju više acetata nego butirata. Pri kraju eksponencijalne faze rasta i kod ulaska u stacionarnu fazu, bakterije proizvode manje količine acetata, a proizvodnja butirata se povećava. Osim toga, smanjuje se koncentracija vodikovih iona i dolazi do uravnoteženja pH medija (Thpanorama, 2024.).

### 4.3. Organizmi koji sudjeluju u provedbi maslačne fermentacije

Najvažniji mikroorganizam koji je zaslužan za nastanak maslačne kiseline je *C. tyrobutyricum*. Ova vrsta može fermentirati samo jedan dio ugljikohidrata, uključujući glukozu, ksilozu, fruktozu i laktat. *C. tyrobutyricum* ima sposobnost fermentiranja mnogih izvora ugljika, poput heksoza, pentoza, glicerola, lignoceluloze, melase i krumpirovog škroba. Čimbenici koji utječu na uspjeh fermentacije kod bakterije *Clostridium* su koncentracija glukoze u mediju, pH, te koncentracija acetata i butirata.

Produkti maslačne fermentacije, odnosno metaboliti su maslačna kiselina, octena kiselina, butanol, propanol, aceton, etanol, CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub>. Maslačna kiselina ima oštar i neugodan miris te umjereno slatki okus. Međutim, određeni esteri maslačne kiseline stvaraju ugodan okus i miris te se zbog toga primjenjuju kao aditivi u hrani, piću, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Thpanorama, 2024.).

#### 4.4. Maslačna kiselina i njezina primjena

Kod anaerobnih uvjeta svojim metabolizmom bakterije *Clostridium* uz organske kiseline (izomaslačne, propionske i octene u manjim koncentracijama) stvaraju maslačnu kiselinu i plinove CO<sub>2</sub> i H<sub>2</sub> u izrazito velikim koncentracijama (Samaržija, 2021.).

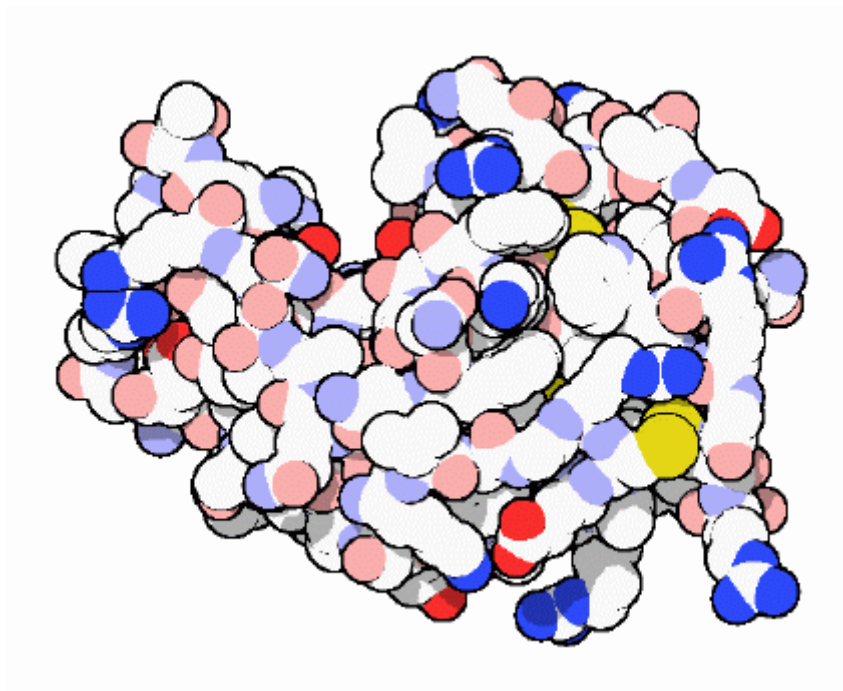
Maslačna kiselina naziva se još i butanska kiselina. Ona je bezbojna tekućina neugodnog mirisa. Nalazi se u ljudskom znoju, u svježem i pokvarenom maslacu, a može biti prisutna i u životinjskim mastima i biljnim uljima. Maslačna kiselina jedna je od tri kiseline koje se nalaze u crijevima, čija je uloga opskrba stanica debelog crijeva energijom (N1 Info, 2023.). Neke od namirnica u kojima se nalazi maslačna kiselina su maslac, tvrdi sirevi, vrhnje, mlijeko, crveno meso, biljna ulja, kiseli kupus te ostala fermentirana hrana. Maslačna kiselina je kratkolančana masna kiselina sa širokom primjenom u prehrambenoj industriji, kemijskoj industriji, industriji stočne hrane te u farmaceutskoj industriji (Wan i sur. 2023.). U farmaceutskim industrijama ona se upotrebljava kao sastojak protiv raka i drugih terapijskih tretmana, dok se kod proizvodnje parfema koriste maslačni esteri zbog svog voćnog mirisa. Soli maslačne kiseline upotrebljavaju se u kozmetici. Danas je sve veći interes za njeno korištenje te njena proizvodnja privlači sve veću pozornost zbog prednosti obnovljivosti i zaštite okoliša. Biološka proizvodnja maslačne kiseline smanjena je zbog velikih troškova supstrata, što čini oko 50% ukupnih troškova.



## 5. Lizozim

Lizozim (*lysis*=otopiti, *zym*=enzim) odnosno muramidaza ili N-acetilmuramska hidrolaza je prirodni enzim koji se kao sastavni dio može pronaći u nekim dijelovima tijela, a nalazi se i u kokošnjem jajetu u količini od 0,5%. U manjim količinama možemo ga pronaći i u kravljem mlijeku, suzama i u slini. Osim toga, nalazi se i u krvi, leukocitima, spermi te u pilećim proteinima. Mlijeko žena sadrži veće količine lizozima od kravljeg mlijeka. Lizozim izdvojen iz bjelanjka ima visoku ekonomsku vrijednost i igra važnu ulogu u biokemiji, medicini i drugim područjima (Zhao i sur. 2021). Ovaj enzim slučajno je otkrio Alexander Fleming 1922. godine tako što je kap svoje nosne sluzi uzrokovao lizu bakterija prisutnih na pločici. To mu je omogućilo da otkrije izvanredan baktericidni spoj kojeg je kasnije nazvao lizozimom. Kasnije je lizozim pronađen u velikim količinama u ljudskim organima, tkivima, izlučevinama (slezena, posteljica). Slični enzimi kasnije su izolirani iz organa i izlučevina raznih kralježaka, beskralježnjaka, bakterija te čak i biljaka koje čine lizozim široko rasprostranjenim enzimom (Wu i sur. 2019.).

Lizozim podrijetlom iz bjelanjka kokošnjeg jajeta je protein čiji se peptidni lanac sastoji od 129 aminokiselina.



Slika 5.1. Lizozim

Izvor: <https://pdb101.rcsb.org/motm/9>

Lizozim je široko rasprostranjen u prirodi. Ima niz farmakoloških učinaka poput antibakterijskih, antifungalnih i antitumorskih. Lizozim ima karakteristike dobre biokompatibilnosti, ne iritira i nije toksičan za tkiva (Wu i sur. 2019).

## 5.1. Lizozim kao antimikrobni agens

Lizozim je hidrolitički enzim koji provodi cijepanje  $\beta$ -1,4-glikozidnih veza između N-acetilmuraminske kiseline i N-acetilglukozamina peptidoglikana stanične stjenke bakterija. Peptidoglikan je glavna komponenta stanične stjenke bakterija. Lizozim ima antimikrobni učinak samo na gram-pozitivne bakterije, dok na gram-negativne nema. To je zbog velike razlike u sadržaju peptidoglikana u staničnoj membrani. Razgrađuje stanične stjenke gram-pozitivnih bakterija jer sadrže više mureina. Kod patogenih bakterija, gram-negativne bakterije su opasnije od gram-pozitivnih. Stoga, lizozim ostaje neučinkovit protiv njih jer su stanične stjenke gram-negativnih bakterija zaštićene dodatnom membranom koja sprječava prolazak lizozima. Zbog posebnog bakteriostatskog mehanizma lizozima, stanična stjenka gram-pozitivnih bakterija sastoji se uglavnom od peptidoglikana, pa je osjetljivija na lizozim. Suprotno, membrana gram-negativnih bakterija obložena je polisaharidima, pa će inhibicijski učinak lizozima na gram-negativne bakterije biti slab. Zbog svog antibakterijskog djelovanja protiv gram-pozitivnih bakterija, lizozim je naišao na primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji gdje se koristi kao aditiv, odnosno antimikrobni agens (Horvatić, 2020.). U današnje vrijeme kada borba za ostvarenje profita tvrtki ponekad nadilazi dozvoljenu uporabu ovog antimikrobnog agensa, javlja se potreba za sustavnim praćenjem njegove uporabe kako u prehrambenim, tako i u farmaceutskim proizvodima, sve u svrhu zaštite potrošača.

## 5.2. Primjena lizozima u mljekarskoj i ostalim industrijama

Lizozim ima sve veću primjenu u prehrambenim industrijama. U mljekarskoj industriji koristi se kao dodatak kod proizvodnje sireva da bi se spriječila pogreška ranog i kasnog nadimanja sira. Osim što sprječava pojavu nadimanja sireva, lizozim još i ubrzava zrenje. Na tržištu ovaj enzim dolazi u obliku bijelih lako topljivih granula. Potrebno ga je otopiti u vodi kako bi se što bolje rastopio u mlijeku za sirenje. Po pravilu, on se dodaje 15-ak minuta prije dodavanja mljekarskih kultura i sirila radi sprječavanja rasta klostridija. Lizozim pokazuje snažna antiklostridijalna svojstva bez utjecaja na tehnološki postupak proizvodnje tvrdih sireva ili na aktivnost bakterijske flore mlijeka, što uvjetuje nepromjenjivost senzornih svojstava sira. Lizozim se u mlijeko za sirenje dodaje u količini od 1-3 g na svakih 100 L mlijeka za sirenje, ovisno o riziku od kasnog nadimanja sira (Matijević i sur. 2015.). U svrhu inhibicije rasta bakterija iz roda *Clostridium* i sprječavanja kasnog nadimanja sira, osim lizozima, u prošlosti su se u mlijeko za sirenje dodavali i kalijev i natrijev nitrat u količini 10-20 g/100 L mlijeka. Danas je u mnogim zemljama zabranjeno korištenje nitrata kod proizvodnje sireva, pa se umjesto njega koristi lizozim. U mnogim vrstama sireva bakterije iz roda *Clostridium* mogu laktat preraditi u maslačnu kiselinu i vodik koji uzrokuje kasno nadimanje i strani okus sira. Kontaminacija sirnog grušta klostridijama može se spriječiti odgovarajućom i pravilnom

higijenom, uklanjanjem spora iz mlijeka postupcima baktofugacije ili mikrofiltracije te prevencijom njihova rasta dodatkom lizozima u mlijeko za sirenje (Havranek i sur. 2014.).

Tehnološka primjena lizozima u siru radi prevencije kasnog nadimanja posebno se koristi za proizvodnju tvrdih sireva u Italiji. Trenutno je dopuštena primjena lizozima (2 g/100 L) kao sredstvo protiv klostridija u siru Grana Padano. U praksi je nemoguće zrenje sira Grana Padano bez dodatka lizozima ili nekog drugog sredstva za prevenciju tijekom 18 mjeseci, a da se ne pojavi kasno nadimanje zbog rasta klostridija. Stoga se nadimanje sprječava dodatkom lizozima u mlijeko za sir, što je praksa dopuštena od strane Talijanskog odbora za zdravlje (Niro i sur., 2017.).

S obzirom na svoja baktericidna svojstva, lizozim se često upotrebljava u zrenju sireva, zato što je sir podložan kontaminaciji mikroorganizama. Stoga je potrebno zaštititi površinu sira kako bi se preduhitrio rast i razvoj plijesni te stvaranje mikotoksina. Važno je da se vodi računa da korišteno sredstvo ne mijenja karakteristična svojstva i kvalitetu sira. Navedena kontaminacija može izazvati promjene koje utječu na proces zrenja sira, čime se narušava očekivana kvaliteta sira.

Osim kod sireva, lizozim se također može koristiti i kao aditiv (E 1105) u proizvodnji piva, vina, te kao sredstvo za njihovo bistrenje. Iako je riječ o prirodnom zaštitnom sredstvu koje se preporučuje u proizvodnji različitih namirnica kod kojih postoji mogućnost porasta sporogenih bakterija, konzumacija hrane koja sadrži lizozim može uzrokovati alergijske reakcije (Novak, 2020). Također, lizozim se koristi i u stočarskoj industriji kao zamjena za antibiotike i sredstvo za poticanje rasta (Marino i sur. 2024.).

Dokazano je da lizozim može inhibirati ili ubiti mnoge bakterije, gljivice i plijesni, pa stoga on ima široku primjenu kao antibakterijsko sredstvo u medicini, hrani i bio inženjerskim istraživanjima. Također, lizozim se koristi i protiv bakterijskih, virusnih i upalnih bolesti u farmaceutskoj industriji.

Svjetska zdravstvena organizacija u području sigurnosti hrane, priznala ga je kao siguran dodatak hrani. Njegova primjena u prehrambenoj industriji dijeli se na:

- konzervanse u hrani (konzervansi imaju dobre učinke u poboljšanju kvalitete i trajnosti hrane. Razvojem društva potrošači sve više obraćaju pažnju na sigurnost hrane. Kao prirodno antibakterijsko sredstvo, lizozim ima nisku toksičnost, pa se stoga koristi kod konzerviranja peciva, mesnih proizvoda, čajeva, pića, sireva, kobasica, i druge hrane),



Slika 5.2.1. Lizozim u prahu

Izvor: Gaoyuan (2023.)

- dodatke u hrani (mliječni proizvodi su bogati hranjivim tvarima, ali se lako kvare zbog razvitka stafilokoka, salmonela, *Bacillus cereusa* te ostalih mikroorganizama. Dodatak lizozima mliječnim proizvodima produljuje rok trajanja i poboljšava imunitet čovjeka) (Gaoyuan, 2023.).

Prema istraživanju Karakteristike lizozima bjelanjka kokošnjeg jajeta, strategije za probijanje antibakterijskih ograničenja i njihova primjena u konzerviranju hrane, kojega su proveli Zhang i sur. (2024), u Kini se lizozim iz kokošnjeg bjelanjka koristi kao dodatak hrani zbog svojih antibakterijskih svojstava. Uprava za hranu i lijekove Sjedinjenih Država priznala je lizozim kao siguran dodatak te je opsežno istražen i korišten u konzerviranju hrane. Danas su istraživanja o lizozimu uglavnom usmjerena na njegova antibakterijska svojstva. Kokošja jaja imaju visoku nutritivnu vrijednost te imaju dobar izvor proteina. U bjelanjku kokošnjeg jajeta nalazi se niz proteina, uključujući lizozim (3,4%), ovalbumin (54%), ovotransferin (12%), ovomucin (3,5%), ovomukoid (11%) te G2 i G3 globulini (svaki po 4%). Navedeni proteini zbog svojih funkcionalnih svojstava istraživani su u prehrambenoj, biološkoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj te ostalim industrijama. Biološke aktivnosti lizozima uključuju protuupalna, antioksidativna i antibakterijska svojstva. Globalno se koristi kao aditiv za konzerviranje hrane (Zhang i sur. 2024.).

Mikrobna kontaminacija hranom glavni je uzročnik kvarenja hrane, što dovodi do problema kod sigurnosti hrane. S obzirom da otpornost mikroorganizama nastavlja s rastom, očekuje se da će prirodni konzervansi sa snažnim antibakterijskim djelovanjem zamijeniti kemijske i biosintetske antimikrobike. Kao antibakterijski protein, lizozim iz kokošnjeg bjelanjka priznat je kao siguran i pokazuje značajnu antibakterijsku učinkovitost (Zhang i sur. 2024.).

### **5.3. Uloga lizozima u prevenciji bolesti i promicanju zdravlja**

Lizozim je poznat više od stotinu godina, a njegova funkcionalna svojstva proučavana su od samog njegovog otkrića. Lizozim pomaže kod promicanja zdravlja i prevencije bolesti. Osim što ga možemo pronaći u bjelanjku jajeta, također je prisutan i u magarećem mlijeku. Danas konzumacija magarećeg mlijeka nije česta iz razloga što ono ima visoku cijenu, velike troškove proizvodnje i ograničenu dostupnost i tržišnu nišu. Koristi se prvenstveno za prehranu novorođenčadi kada dojenje nije moguće. Također, koristi se i za dojenčad koja imaju alergiju na proteine kravljeg mlijeka zbog sličnosti sa humanim mlijekom (Marino i sur. 2024.).

Lizozim iz bjelanjka jajeta jeftiniji je za proizvodnju, ali se zato njegova biološka aktivnost smanjuje kroz proces ekstrakcije. Magareće mlijeko izaziva manje alergije i sadrži nekoliko drugih spojeva koji pridonose povećanju njegove funkcionalne prednosti u odnosu na ekstrahirani lizozim. Primjena lizozima ostvarila je dobrobiti u prevenciji i liječenju bolesti. Poznat je po svojim baktericidnim, bakteriostatskim i antivirusnim svojstvima, a osim toga ima i antifungalna, protuupalna i antikancerogena svojstva. U nekim zemljama lizozim je dobio status odobrenog lijeka. Uz svoje potencijalne terapijske primjene, on prevenira bolesti povezane sa imunostimulirajućim i antioksidativnim svojstvima. Osim toga, utječe i na morfologiju probavnog sustava i mijenja populaciju crijevnih mikroba smanjujući brojnost bakterija koje su povezane sa bolesti i povećavajući broj bakterija koje su povezane sa zdravljem. Zabilježene su različite dnevne oralne doze lizozima za liječenje i prevenciju bolesti u rasponu od 60 do 1000 mg, ovisno o specifičnoj namjeni (Marino i sur. 2024.).

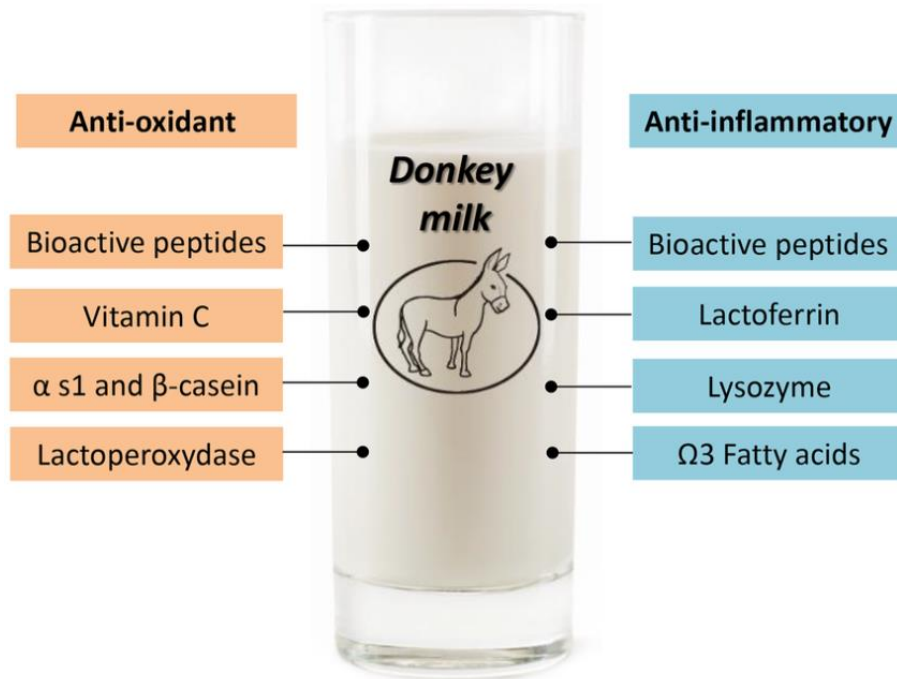
Najčešće korišteni izvori lizozima su ekstrakti bjelanjka kokošnjeg jajeta. Magareće mlijeko za razliku od mlijeka drugih mliječnih životinja i ljudskog mlijeka sadrži veće količine lizozima. Ono se preporučuje za svakodnevnu primjenu kao imunostimulans u prehrani imunokompromitiranih osoba.

Još u rimsko doba Plinije Stariji opisao je magareće mlijeko u svom enciklopedijskom djelu *Naturalis Historia* kao terapijski proizvod koji sadrži 54 ljekovite primjene. Stoljećima se magareće mlijeko nudilo osobama sa osjetljivim zdravljem.

### **5.4. Magareće mlijeko**

Magareće mlijeko sve više privlači pažnju zbog svojih hranjivih i funkcionalnih svojstava, te ono s vremenom postaje sve zanimljivije kao prirodni prehrambeni i ljekoviti proizvod zbog toga što je njegov sastav sličan humanom mlijeku te ima neka potencijalna biološka svojstva, kao što su antioksidativna, protuupalna, anti-age, antimikrobna i antikancerogena svojstva. Također, smatra se da magareće mlijeko ima dobru hranjivu vrijednost i funkcionalna svojstva te je dobro kod ublažavanja nekih kroničnih bolesti povezanih sa upalama. Pokazalo se da magareće mlijeko i njegovi srodni proizvodi uklanjaju

reaktivne vrste kisika, aktiviraju antioksidativni sustav, poboljšavaju imunološku funkciju te održavaju ravnotežu crijevne flore (Li i sur. 2021.).



Slika 5.4.1. Antioksidativna i protuupalna svojstva magarećeg mlijeka

Izvor: Li i sur. (2021.)

Slika 5.4.1. prikazuje antioksidativna svojstva magarećeg mlijeka - bioaktivni peptidi, vitamin C,  $\alpha$ 1 i  $\beta$  –kazein, laktoperoksidaza te protuupalna svojstva - bioaktivni peptidi, laktoferin, lizozim i omega 3 masne kiseline.

Osim njegovih zdravstvenih prednosti, ono je veoma važno jer se u nekim slučajevima koristi kod proizvodnje polutvrdih i tvrdih sireva radi sprječavanja kasnog nadimanja jer u sebi sadrži lizozim u znatno većim količinama u odnosu na mlijeka preživača. Udio lizozima u magarećem mlijeku varira između 1,0 i 3,7 mg/mL, ovisno o fazi laktacije i sezoni proizvodnje, što je znatno više nego u kravljem (0,13  $\mu$ g/mL), ovčjem (0,20  $\mu$ g/mL) ili kozjem mlijeku (0,25  $\mu$ g/mL) (Cosentino i sur. 2015.). Tako Cosentino i sur. (2015) navode da su najčešći pristupi za sprječavanje kasnog nadimanja sira baktofugacija ili mikrofiltracija mlijeka, dodavanje nitrata ili lizozima, dodavanje sojeva bakterija mliječne kiseline tijekom proizvodnje sira koji proizvode biološki aktivne peptide protiv gram pozitivnih bakterija, te dodavanje magarećeg mlijeka. Magareće mlijeko karakterizira visok sadržaj lizozima te niz spojeva koji poboljšavaju imuni sustav organizma poput laktoperoksidaze, laktoferina, imunoglobulina sa sposobnošću ubijanja ili inhibiranja širokog spektra patogenih mikroorganizama.

Tablica 5.4.1. Usporedni sastav sirovog kravljeg i magarećeg mlijeka

| Parametar                                              | Kravlje mlijeko | Magareće mlijeko |
|--------------------------------------------------------|-----------------|------------------|
| Protein, %                                             | 3,30            | 1,70             |
| Mliječna mast, %                                       | 3,70            | 1,30             |
| Laktoza, %                                             | 4,10            | 6,40             |
| Suha tvar (ST), %                                      | 11,70           | 9,60             |
| Pepeo, %                                               | 0,50            | 0,40             |
| Lizozim, mg/mL                                         | 0,18            | 2,03             |
| pH pri 25 °C                                           | 6,70            | 7,10             |
| <i>C. tyrobutyricum</i> , log <sub>10</sub> stanica/mL | 230             | <10              |
| Ukupan broj bakterija, log <sub>10</sub> cfu/mL        | 4,20            | 2,90             |

Izvor: Cosentino i sur. (2015.)

U istraživanju Cosentino i sur. (2015), autori zaključuju da dodatak sirovog magarećeg mlijeka utječe na smanjenje pojave kasnog nadimanja polutvrdog sira. Nakon 120 dana zrenja polutvrdog sira analizirani su fizikalni, kemijski i mikrobiološki parametri. Rezultati su pokazali da je dodatak magarećeg mlijeka pasteriziranom kravljem mlijeku dovelo do smanjenja pH vrijednosti (pospješilo je mliječno-kiselinsku fermentaciju) i ukupnog broja bakterija, kao i spora *C. tyrobutyricum*. Također, dokazano je postupno smanjenje pojave kasnog nadimanja sira kao posljedica većeg dodatka magarećeg mlijeka tijekom proizvodnje sira. Osim toga, dodatak magarećeg mlijeka nije uzrokovao nikakve senzorne promjene sira. Ovim istraživanjem pokazalo se da je antimikrobna aktivnost lizozima veoma važna u magarećem mlijeku, te se ono preporučuje kao moguća alternativa lizozima iz jajeta za sprječavanje kasnog nadimanja sira. Visoke pH vrijednosti uočene su kod sireva koji su sadržavali manje količine magarećeg mlijeka, a to može biti posljedica deacidifikacije kao rezultat metaboličke aktivnosti *C. tyrobutyricum*.

Isti autori navode da je magareće mlijeko učinkovita zamjena za lizozim iz bjelanjka jajeta kod proizvodnje sira Grana Padano. Također, dokazano je da dodatak 10 L magarećeg mlijeka u 500 L kravljeg mlijeka značajno poboljšava neke od fizikalno-kemijskih i mikrobioloških svojstava sira. Osim toga, poznato je i da dodatak magarećeg mlijeka u ovčje mlijeko može inhibirati koliformne bakterije i spriječiti kasno nadimanje sira (Cosentino i sur. 2015.). Stoga se preporuča korištenje magarećeg mlijeka kao nove tehnološke strategije u proizvodnji tvrdih sireva s ciljem izbjegavanja kasnog nadimanja sira (Niro i sur. 2017.).

## 5.5. Usporedba lizozima iz bjelanjka kokošnjeg jajeta i iz magarećeg mlijeka

Magareće mlijeko preporučuje se pasterizirati radi sigurnosti hrane toplinskom obradom pri 63 °C tijekom 30 minuta ili 72 °C tijekom 15 sekundi prema Europskoj uredbi. Pasterizacija magarećeg mlijeka može uzrokovati smanjenje udjela lizozima od 7-25%. Kao što se preporučuje provedba toplinske obrade mlijeka radi sigurnosti hrane, tako se preporučuje i izbjegavanje konzumacije sirovih jaja. Ona se moraju zagrijavati zbog mikrobne sigurnosti i povećanja probavljivosti proteina. U usporedbi sa pasterizacijom, jaja se najčešće zagrijavaju na većim temperaturama kuhanjem ili prženjem, s tim da se očekuju veći gubitci sadržaja i aktivnosti lizozima nakon kuhanja ili prženja jaja.

S obzirom na ekonomsku procjenu, lizozim dobiven iz kokošnjeg bjelanjka pokazao se povoljnijom opcijom u odnosu na lizozim dobiven iz magarećeg mlijeka. Troškovi lizozima kokošnjeg jajeta uključuju ekstrakciju lizozima. Trošak ekstrakcije na industrijskoj razini iznosi oko 2 €/g lizozima. Suprotno, magareće mlijeko u Italiji trenutno se prodaje po cijeni od oko 10 €/L, što uključuje troškove proizvodnje za krajnjeg potrošača. Danas magareće mlijeko ima slabo tržište, pa se stoga očekuje da će potencijalni porast i razvoj tržišta uzrokovati smanjenje troškova proizvodnje magarećeg mlijeka (Marino i sur. 2024.).

Osim ekonomske usporedbe, lizozim iz ova dva proizvoda može se usporediti i sa nutritivnog aspekta. Dokazano je da konzumacija magarećeg mlijeka može imati prednosti u odnosu na ekstrahirani lizozim iz kokošnjeg bjelanjka.

Lizozim bjelanjka i magarećeg mlijeka identificirao je Pododbor za nomenklaturu alergena WHO/IUIS kao Gal d4, odnosno Equ a6. Alergija putem jaja najčešće se javlja kod djece, gdje su glavni alergeni ovalbumin, ovomukoid, ovotransferin i lizozim. Stoga, alergija na jaja ne mora se odnositi samo na lizozim, nego ona može nastati i od ostalih navedenih alergena iz jajeta.

Dokazano je da je lizozim iz magarećeg mlijeka pokazao velike sličnosti sa ljudskim lizozimom, gdje se aminokiselinske sekvence magarećeg mlijeka i ljudskog lizozima preklapaju sa 99%, dok je preklapanje između bjelanjka jajeta i ljudskog lizozima samo 44%.

Prednost lizozima iz magarećeg mlijeka u odnosu na lizozim iz bjelanjka je ta što mu nije potrebna ekstrakcija. Postupak ekstrakcije može smanjiti biološku aktivnost lizozima. U usporedbi sa ekstrahiranim lizozimom iz jajeta, magareće mlijeko sadrži dodatne komponente koje djeluju na lizozim tako što pojačavaju njegove antibakterijske, protuupalne, antioksidativne i imunomodulatorne funkcije. Magareće mlijeko pomaže kod održavanja ravnoteže crijevne mikrobiote. Osim toga, ono ima i ostale zdravstvene i terapijske učinke. Sinergetski spojevi u magarećem mlijeku su laktoferin, laktoperoksidaza,  $\alpha$ -laktalbumin, imunoglobulini i alkalna fosfataza. Osim toga, sinergijsko djelovanje imaju i neke od masnih kiselina, poput linolne, laurinske i oleinske kiseline. Oleinska kiselina i alfa-laktalbumin imaju povećano baktericidno djelovanje i citotoksične učinke protiv tumorskih stanica, što doprinosi terapijskom učinku. Lizozim, alkalna fosfataza i laktoferin nalaze se pretežno u frakciji sirutke, a dio tih spojeva nalazi se i u membrani globule mliječne masti. Antioksidativna





na jaja odgovorne su bjelančevine koje se nalaze u bjelanjku, iako je dokazano da se alergeni bjelančevine nalaze i u bjelanjku i u žumanjku. Dokazano je da različite skupine ljudi slično reagiraju na 4 vrste bjelančevina podrijetlom iz jaja, a to su: 1) bjelančevine bjelanjka lizozim i ovalbumin, 2) bjelančevina bjelanjka ovomukoid, 3) bjelančevina bjelanjka ovomucin, i 4) bjelančevina bjelanjka ovotransferin i bjelančevine žumanjka fosvitin, apovitelenin I i VI. Najvažnijim alergenima iz jaja smatraju se ovomukoid i ovoalbumin. Također, smatra se da je ovomukoid najčešći alergen iz jaja.

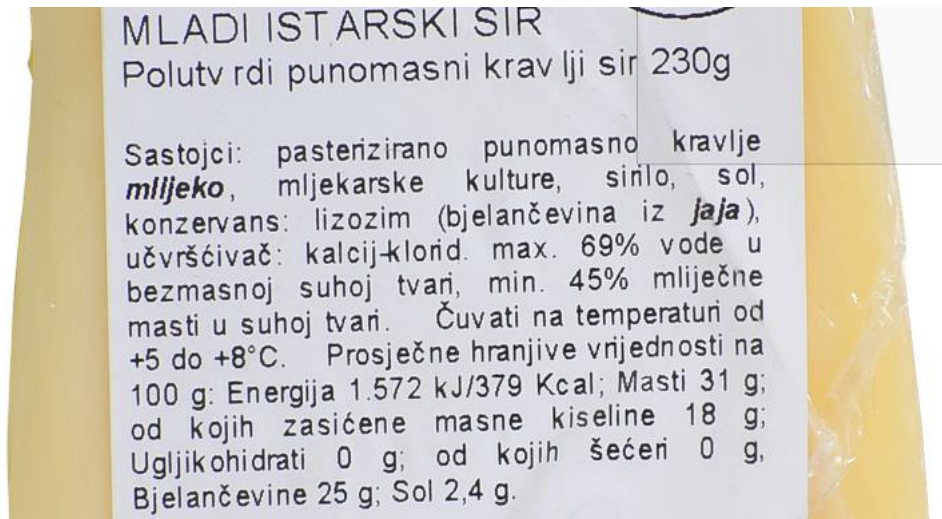
Tablica 5.6.1. Molekularne i biološke osobine identificiranih alergena iz jaja

| Bjelančevine/protein           | Molekularna masa (kDa) | Relativni odnos u masi raspoređen s bjelanjkom (%) | Biološka uloga                                                                                     |
|--------------------------------|------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Bjelančevine bjelanjka:</b> |                        |                                                    |                                                                                                    |
| Ovomukoid                      | 28                     | 11                                                 | -inhibitor aktivnosti                                                                              |
| Ovalbumin                      | 44                     | 54                                                 | -nepoznata                                                                                         |
| Ovotransferin                  | 78                     | 12                                                 | -antimikrobna aktivnost<br>-aktivacija imunog sustava<br>-svojstva antioksidanta<br>-bakteriolitik |
| Lizozim                        | 14                     | 3,4                                                | -antiviralna aktivnost                                                                             |
| Ovomucin                       | 165                    | 3,5                                                | -nepoznata                                                                                         |
| <b>Bjelančevine žumanjka:</b>  |                        |                                                    |                                                                                                    |
| Fosvitin                       | 35                     | 13,4                                               | -svojstva vezanja kationa<br>-antibakterijska aktivnost<br>-antioksidativna aktivnost              |
| Livetin                        | 69                     | 9,3                                                | -albumin                                                                                           |
| Apovitelenin                   | 9,5-170                | 37                                                 | -aktivnost vezanja masti                                                                           |

Izvor: Cukon, Meso (2013)

Lizozim je alergen u kokošnjim jajima, stoga ga je potrebno istaknuti na ambalaži proizvoda. Lizozim je konzervans (E1105) koji je osim u prehrambenim proizvodima također prisutan i u mnogim lijekovima (antisepticima i sprejevima za nos). Pacijenti koji imaju alergiju na jaja često mogu biti nesvjesno izloženi malim količinama lizozima u proizvodima, uključujući

sir, umake i unaprijed zapakirana jela, poput pizze, raviola, salate, ili lijekovi poput Hexalyse i Lyso 6. U jednome istraživanju dokazano je da lizozim može izazvati anafilaksiju kod djece sa alergijom na jaja (Elbany i sur. 2024.).



Slika 5.6.1. Primjer ambalaže sira sa navedenim alergijskim sastojkom lizozimom

## 5.7. Upravljanje rizikom alergena jaja

Danas se mnogi proizvođači prehrambenih proizvoda susreću sa problemima alergije na hranu. Konzumacija odgovarajućih bjelančevina iz hrane može uzrokovati ozbiljne zdravstvene posljedice kod pojedinca, uključujući i smrt. Svrhu upravljanja alergenima potkrjepljuju zahtjevi zakonske legislative, zahtjevi standarda sustava sigurnosti hrane i poboljšanje sustava te zaštita zdravlja potrošača. Prevenciju alergije na hranu čini odgovornost proizvođača hrane te potrošača koji mora konzumirati hranu u skladu sa svojim dijetnim preporukama te prema informacijama koje se nalaze na deklaraciji proizvoda. S obzirom da je alergija na konzumna kokošja jaja jedna od najčešćih alergija na hranu, rizikom alergena jaja u sustavu sigurnosti hrane brine se multidisciplinarni tim u pojedinim tvrtkama koji uključuje stručnjake iz kontrole kvalitete, osobe za razvoj, djelatnike iz nabave te poslovne kvalitete. Jaja mogu biti dodana u proizvod namjerno ili slučajno. Ukoliko su ona dodana namjerno, kao u slučaju proizvodnje polutvrdih i tvrdih sireva, a želimo dobiti proizvod bez alergena podrijetlom iz jaja, moramo mu pronaći alternativu, a to je u industriji sira baktofugacija kojom otklanjamo spore klostridija. Reakciju alergena na jaja možemo izbjeći uključivanjem toplinske obrade hrane koja sadrži jaja ili upotrebljavanjem enzimatske fragmentacije, zračenja ili kombinacijom navedenih metoda. Takvim postupcima možemo smanjiti rizik od reakcije s alergenima, ali ih ne možemo eliminirati u cijelosti. Odgovornost proizvođača hrane je razumijevanje sastava proizvoda radi identifikacije alergenskih sastojaka. Također, važan je postupak kontrole radi verifikacije podataka na deklaraciji (Cukon, 2013.).

## 6. Zaključak

Kasno nadimanje sira je čest oblik kvarenja tvrdih sireva te je ono karakteristična mikrobna pogreška teksture polutvrdih i tvrdih sireva. Ono se javlja tijekom zrenja sireva i to djelovanjem mikroorganizama koji stvaraju plinove i tvari neugodnog mirisa i okusa.

Glavni uzročnik kasnog nadimanja sira je bakterija *Clostridium tyrobutyricum* čije spore najčešće dospijevaju u mlijeko iz tla, silaže, životinjskog fecesa, ili od nečiste opreme te uslijed preranog ili preniskog hlađenja mlijeka.

Kontaminacija sirnog gruša klostridijama može se spriječiti odgovarajućom i pravilnom higijenom, uklanjanjem spora iz mlijeka postupcima baktofugacije ili mikrofiltracije te prevencijom njihova rasta dodatkom kalijeva nitrata ( $\text{KNO}_3$ ) ili lizozima u mlijeko za sirenje. Lizozim je enzim koji se u mljekarskoj proizvodnji sira koristi kao dodatak za sprječavanje pogreške ranog i kasnog nadimanja sira. Pritom je potrebno voditi računa s obzirom da se proizvodi iz bjelanjka jajeta da se na deklaraciji sira istakne kao alergena.

Osobe alergične na bjelanjak jajeta trebale bi izbjegavati konzumaciju polutvrdih i tvrdih sireva u čijoj se proizvodnji dodaje lizozim podrijetlom iz bjelanjka jajeta. Stoga je potrebno istaknuti lizozim na deklaraciji sira drugačijim tipom slova. U tom smislu danas se kravljem mlijeku tijekom procesa proizvodnje dodaje dio magarećeg mlijeka koje sadrži visok udio lizozima (1,0-3,7 mg/mL). Sirevi tvrdih tekstura dobiveni mješavinom kravljeg i magarećeg mlijeka inovativan su prijedlog u sektoru mliječnih proizvoda. Preporučuje se korištenje magarećeg mlijeka kao nove tehnološke strategije u proizvodnji tvrdih sireva s ciljem izbjegavanja kasnog nadimanja sira.

Lizozim magarećeg mlijeka preporučuje se kao održiva alternativa lizozimu iz jaja za kontrolu kasnog nadimanja sira. Upotreba lizozima može se uspješno koristiti u proizvodnji sira dodatkom magarećeg mlijeka tijekom proizvodnje. Osim toga, potrebna su daljnja istraživanja kako bi se procijenila korisnost mliječnog lizozima u kontroli rasta štetnih mikroorganizama poput *Bacillus* i *Listeria*, te time produljila trajnost svježeg voća i povrća, morskih plodova, mesa i kobasica, pa tako i sireva.

## 7. Popis literature

1. Àvila C.L.S., Carvalho B.F. (2019). Silage fermentation-updates focusing on the performance of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology*. 128(4): 966-984.
2. Calzada, J., Avila, M., Munoz-Tebar, N., Sanchez, C., Elguea-Culebras, G. O., Carmona, M., Molina, A., Berruga, M. I., Garde, S. (2023). Inhibitory activity of aromatic plant extracts against dairy-related *Clostridium* species and their use to prevent the late blowing defect of cheese. *Food Microbiology*. 110: 2-10.
3. Cocolin, L., Innocente, N., Biasutti, M., Comi, G. (2004). The late blowing in cheese: A new molecular approach based on PCR and DGGE to study the microbial ecology of the alteration process. *International Journal Food Microbiology*. 90(1-2): 83-91.
4. Cosentino, C., Paolino, R. Valentini, V., Musto, M., Ricciardi, A., Adduci, F., D'Adamo, C., Pecora, G., Freschi, P. (2015). Effect of jenny milk addition on the inhibition of late blowing in semihard cheese. *Journal of Dairy Science*. 98(8): 5133-5142.
5. Cukon, N. (2013). Upravljanje rizikom alergena jaja u sustavu sigurnosti hrane. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu*. 15(3): 475-479.
6. Driehuis F., Wilkinson J.M., Jiang Y., Ogunade I., Adesogan, A.T. (2018). Silage review: Animal and human health risks from silage. *Journal of Dairy Science*. 101(5): 4093-4110.
7. Driehuis, F., Elferink, S. J. O. (2000). The impact of the quality of silage on animal health and food safety: a review. *Veterinary Quarterly*. 22(4): 212-216.
8. Drouin, P., Lafranière, C. (2012). Clostridial Spores in Animal Feeds and Milk. U: Chaiyabutr, N. (ur.), *Milk Production - An Up-to-Date Overview od Animal Nutrition. Management and Health*. IntechOpen Limited. London. 375-394.
9. Duniere, L., Sindou, J., Chaucheyras-Durand, F., Chevallier, I., Thevenot-Sergentet, D. (2013). Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. *Animal Feed Science and Technology*. 182(1-4): 1-15.
10. Elbany, C., Boissieu, D., Karila, C., Alyanakian, M.A., Ponvert, C., Lageix, F., Lezmi, G. (2024). A rare case of lysozyme-induced anaphylaxis in a child with egg allergy. *Archives de Pediatrie*. 31(3): 209-211.
11. Exquisite Biochemical (2024). Što je proces fermentacije? Global Chem Mall. <https://ba.ebiochemical.com/info/what-is-the-process-of-fermentation--92858604.html> - pristup 29.5.2024.
12. Gaoyuan (2023). Za što se koristi lizozim? Gao Yuan Bio.
13. *Gospodarski list* (2012). Nepoželjne pojave pri zimskoj upotrebi silaže. <https://gospodarski.hr/rubrike/nepozeljne-pojave-pri-zimskoj-upotrebi-silaze/> - pristup 6.3.2024.
14. Havranek, J., Kalit, S., Antunac, N., Samaržija, D. (2014). Dodatci mlijeku za sirenje. U: *Sirarstvo. Hrvatska mljekarska udruga*. Zagreb. 74-77.

15. Horvatić, K. (2020). Metode detekcije i kvantifikacije lizozima u prehrambenim proizvodima (Završni rad). Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Repozitorij Pravnog fakulteta u Osijeku.
16. Liu, J., Yang, Z., Yang, L., Zhu, L., Zhu, Z., Jiang, L. (2022). Advances in the development of *Clostridium tyrobutyricum* cell factories driven by synthetic biotechnology. *Synthetic Biology Journal*. 3(6): 1174-1200.
17. Marino, V. M., Schadt, I., La Terra, S., Caccamo, M., Caggia, C. (2024). Lysozyme sources for disease prevention and health promotion-Donkey milk in alternative to hen egg-white lysozyme. *Future Foods*. Elsevier. 9(7).
18. Martinis, I. (2004). Dijetetika. U: *Nutritivna alergija*. Pedijatrija. Medix, Specijalizirani medicinski dvomjesečnik. Klinička bolnica Dubrava. Zagreb. 52: 86-88.
19. Matijević, B. (2015). Dodatci u proizvodnji sira i njihov značaj. U: *Sirarstvo u teoriji i praksi*. Veleučilište u Karlovcu. Karlovac. 103-112.
20. Matijević, B., Kalit, S., Božanić, R., Barukčić, I., Stručić, D., Rogelj, I., Perko, B., Magdić, V., Lisak Jakopović, K. (2015). *Sirarstvo u teoriji i praksi*. Priručnik. Veleučilište u Karlovcu, Karlovac.
21. Morandi, S., Battelli, G., Silvetti, T., Tringali, S., Nunziata, L., Villa, A., Acquistapace, A., Brašca, M. (2021). Impact of salting and ripening temperatures on late blowing defect in Valtellina Casera PDO cheese. *Food Control*. 120.
22. N1 Info (2023). Maslačna kiselina: Dobra je za zdravlje crijeva, ali ima i neke nuspojave. N1 Info. <https://n1info.hr/zdravlje/maslacna-kiselina-dobra-je-za-zdravlje-crijeva-ali-ima-i-neke-nuspojave/> – pristup 25.4.2024.
23. Niro, S., Fratianni, A., Colavita, G., Galassi, L., Zanazzi, M., Salimei, E. (2017). Technological use of donkey milk in cheesemaking. *International Journal of Dairy Technology*. 70(3): 439-442.
24. Novak, L. (2020). Utvrđivanje prisutnosti lizozima u prehrambenim proizvodima ELISA tehnikom (Specijalistički diplomski stručni studij). Sveučilište u Zagrebu.
25. Ogunade I. M., Martinez-Tupppia, C., Queiroz O. C. M., Jiang, Y., Drouin, P., Wu, F., Vyas, D., Adesogan, A.T. (2018). Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation. *Journal of dairy science*. 101(5): 4034-4059.
26. Pahlow, G., Muck, R., E. Driehuis, F., Oude Elferink, S., Spoelstra, S. F. (2003). *Microbiology of ensiling*. U: *Silage science and technology*, ur. D.R. Buxton, R. Muck, J.H. Harrison. American Society of Agronomy. Madison. Wisconsin, SAD. 42: 31-93.
27. Sabadoš, D. (1952). Uzroci i sprječavanje nadimanja sireva. *Mljekarstvo*. 21(5): 15-19.
28. Samaržija, D. (2015). *Fermentirana mlijeka*. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb.
29. Samaržija, D. (2021). *Mljekarska mikrobiologija*. Hrvatska mljekarska udruga. Zagreb.

30. Sorhaug, T., Stepaniak, L. (1997). Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends in Food Science and Technology*. 8(2): 35-41.
31. Tehnologija hrane (2017). Enciklopedija. Mikrobiologija hrane. Fermentacija. <https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/fermentacija> - pristup 29.5.2024.
32. Thpanorama. Fermentacija butirica: Proceso, organismos y productos. Budi bolje danas. <https://hr.thpanorama.com/articles/biologa/fermentacin-butrica-proceso-organismos-y-productos.html> - pristup 6.4.2024.
33. Wan, L., Qin, S., Wei, H., Luo, L., Liu, S. Suo, Y. (2023). Enhanced tolerance of *Clostridium tyrobutyricum* to furan derivatives for efficient butyric acid production by overexpressing native transporter genes. *Industrial Crops and Products*. 206.
34. Wiedmann, M., Ivy, RA (2014). *Clostridium tyrobutyricum*. U: *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition), ur. Batt C.A., Tortorello M.L. Science Direct.
35. Wikipedia (2024). The Free Encyclopedia. *Clostridium tyrobutyricum*. [https://en.wikipedia.org/wiki/Clostridium\\_tyrobutyricum](https://en.wikipedia.org/wiki/Clostridium_tyrobutyricum) - pristup 6.3.2024.
36. Wu, T., Jiang, Q., Wu, D., Hu, Y., Chen, S., Ding, T., Ye, X., Liu, D., Chen, J. (2019). What is new in lysozyme research and its application in food industry? A review. *Food Chemistry*. 274: 698-709.
37. Zhang, Q., Zhao, Y., Yao, Y., Wu, N., Chen, S., Xu, L., Tu, Y. (2024). Characteristics of hen egg white lysozyme, strategies to break through antibacterial limitation, and its application in food preservation: A review. *Food Research International*. Elsevier. 181.
38. Zhao, Q., Ding, L., Xia, M., Huang, X., Isobe, K., Handa, A., Cai, Z. (2021). Role of lysozyme on liquid egg white foaming properties: Interface behavior, physicochemical characteristics and protein structure. *Food Hydrocolloids*. Elsevier. 120(4).

## Životopis

Marija Čevra rođena je 30. srpnja 1999. godine u Livnu, u Bosni i Hercegovini. Pohađala je srednju strukovnu školu u Tomislavgradu, zanimanje ekonomist, od 2014. do 2018. godine. Završila je sveučilišni preddiplomski studij Agrarne ekonomike, te je u rujnu 2022. godine stekla akademski naziv sveučilišna prvostupnica inženjerka agrarne ekonomike. Od izvannastavnih aktivnosti pohađala je školu slikanja i crtanja u Kulturno-informativnom centru u Tomislavgradu. U slobodno vrijeme slika tehnikom akril na platnu, fotografira, volontira, čita knjige i provodi vrijeme u prirodi. Osim certifikata o završenom prvom stupnju škole slikanja i crtanja, ima tri certifikata o završenim online tečajevima Srca (Sveučilište u Zagrebu, Sveučilišni računski centar) i to Obrada teksta (Word 2010, E308), Uporaba baza podataka (Access 2010, E508) te Prezentacije – napredna razina (PowerPoint 2016, E645) u trajanju od 16 školskih sati. Od stranih jezika razumije, govori i piše engleski jezik razine B1.