



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ

мр Тања Д. Жугић-Петровић

**МИКРОБИОТА АУТОХТОНОГ
ФЕРМЕНТИСАНОГ ПРОИЗВОДА
СЈЕНИЧКА ОВЧИЈА СТЕЉА**

докторска дисертација

Крагујевац, 2022



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF SCIENCE

mr Tanja D. Žugić-Petrović

**MICROBIOTA OF AUTOCHTHONOUS
FERMENTED PRODUCT SJENICA
SHEEP'S HAM**

Doctoral Dissertation

Kragujevac, 2022.

Аутор
Име и презиме: Тања Д. Жугић-Петровић
Датум и место рођења: <i>12. 07. 1976. године, Ниш, Србија</i>
Садашње запослење:
Докторска дисертација
Наслов: <i>Микробиота аутохтоног ферментисаног производа сјеничка овчија стеља</i>
Број страница: <i>164</i>
Број слика: <i>15</i>
Број графика: <i>13</i>
Број табела: <i>24</i>
Број библиографских података: <i>281</i>
Установа и место где је рад израђен: <i>Топличка Академија, Одсек за пољопривредно-прехрамбене студије у Прокупљу; Технолошки факултет Универзитет у Новом Саду.</i>
Научна област (УДК): <i>579.222:602(043.3) (Микробиолошка биохемија, синтеза, акумулација и трансформација различитих супстанци; Процеси и технике у биотехнологији; Микробиологија; Микробиологија хране)</i>
Ментор: <i>др Мирјана Грујовић</i> , научни сарадник, <i>Институт за информационе технологије Крагујевац, Универзитет у Крагујевцу</i>
Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: <i>06.02.2019.</i>
Број одлуке и датум прихватања теме докторске дисертације: <i>IV-01-185/6 од 13. 03. 2019.</i>
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 1. <i>др Љиљана Чомић</i> , редовни професор – председник комисије, <i>Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Микробиологија</i> 2. <i>др Драгутин Ђукић</i> , редовни професор, <i>Агрономски факултет у Чачку, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Микробиологија</i> 3. <i>др Сунчица Коцић-Танацков</i> , доцент, <i>Технолошки факултет Универзитета у Новом Саду, ужа научна област: Прехрамбено инжењерство</i>
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације: 1. <i>др Владимир Томовић</i> , редовни професор, <i>Катедра за инжењерство конзервисане хране, Технолошки факултет, Универзитет у Новом Саду, ужа научна област: Прехрамбено инжењерство, члан комисије</i> 2. <i>др Наташа Јоковић</i> , ванредни професор, <i>Природно-математички факултет, Универзитет у Нишу, ужа научна област: Експериментална биологија и биотехнологија, члан комисије</i> 3. <i>др Олгица Стефановић</i> , ванредни професор, <i>Природно-математички факултет, Универзитет у Крагујевцу, ужа научна област: Микробиологија, члан комисије</i> 4. <i>др Катарина Младеновић</i> , научни сарадник, <i>Институт за информационе технологије Крагујевац, Универзитет у Крагујевцу, научна област: Биологија (микробиологија), председник комисије</i> 5. <i>др Сунчица Коцић - Танацков</i> , доцент, <i>Катедра за инжењерство конзервисане хране, Технолошки факултет, Универзитет у Новом Саду, ужа научна област: Прехрамбено инжењерство, члан комисије</i>
Датум одбране докторске дисертације:

Author
Name and surname: Tanja D. Žugić-Petrović
Date and place of birth: <i>12. 07. 1976, Niš, Serbia</i>
Current employment:
Doctoral Dissertation
Title: <i>Microbiota of autochthonous fermented product sjenica sheep's ham</i>
No. of pages: <i>164</i>
No. of images: <i>15</i>
No. of figures: <i>13</i>
No. of tables: <i>24</i>
No. of bibliographic data: <i>281</i>
Institution and place of work: <i>Toplica Academy, Department of Agricultural and Food Science in Prokuplje; Faculty of Technology, University of Novi Sad</i>
Scientific area (UDK): <i>579.222:602(043.3) (Microbiological biochemistry, synthesis, accumulation, and transformation of various substances; Processes and techniques in biotechnology; Microbiology; Food microbiology)</i>
Mentor: <i>Dr. Mirjana Grujović, Research Associate, Institute of Information Technology Kragujevac, University of Kragujevac</i>
Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: <i>06.02.2019.</i>
Decision number and date of acceptance of the doctoral / artistic dissertation topic: <i>IV-01-185/6 from 13. 03. 2019.</i>
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate:
<ol style="list-style-type: none"> <i>1. Dr. Ljiljana Čomić, Full professor - president of the commission, Faculty of Science, University of Kragujevac, narrow scientific field: Microbiology</i> <i>2. Dr. Dragutin Đukić, Full professor, Faculty of Agriculture in Čačak, University of Kragujevac, narrow scientific field: Microbiology</i> <i>3. Dr. Sunčica Kocić-Tanačkov, Assistant professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad, narrow field: Food Engineering</i>
Commission for evaluation and defense of doctoral/artistic dissertation:
<ol style="list-style-type: none"> <i>1. Dr. Vladimir Tomović, Full professor, Department of Food Preservation Engineering, Faculty of Technology, University of Novi Sad, narrow scientific field: Food Engineering, member of the commission</i> <i>2. Dr. Nataša Joković, Associate professor, Faculty of Science, University of Nis, narrow scientific field: Experimental Biology and Biotechnology, member of the commission</i> <i>3. Dr. Olgica Stefanović, Associate professor, Faculty of Science, University of Kragujevac, narrow scientific field: Microbiology, member of the commission</i> <i>4. Dr. Katarina Mladenović, Research Associate, Institute of Information Technology Kragujevac, University of Kragujevac, scientific field: Biology (microbiology), president of the commission</i> <i>5. Dr. Sunčica Kocić-Tanačkov, Assistant professor, Department of Food Preservation Engineering, Faculty of Technology, University of Novi Sad, narrow scientific field: Food Engineering, member of the commission</i>
Date of Dissertation Defense:

ЗАХВАЛНИЦА

Желела бих да овом приликом искажем неизмерну захвалност проф. др Љиљани Чомић на великој подршци и помоћи током израде ове докторске дисертације. Посебну захвалност дугујем мојој менторки др Мирјани Грујовић која је испратила сваку етапу у експерименталном раду као и у процесу писања дисертације. Својим знањем и искуством допринела је квалитету ове докторске дисертације.

Велику захвалност упућујем председнику комисије, др Катарини Младеновић, на темељном прегледању писаног материјала, на вредним научним саветима, вредним дискусијама, конструктивној критици и охрабрењу током израде ове докторске дисертације. Поред тога, захваљујем јој се на учешћу и помоћи у експерименталном раду везаном за хигијенски аспект сјеничке овчије стеље.

Од срца се захваљујем проф. др Наташи Јоковић на корисним саветима и сугестијама током писања дисертације као и на помоћи да кроз заједнички рад остварим своје професионалне циљеве.

Захваљујем се проф. др Сунчици Коцић-Танацков на стручној и пријатељској подршци, разумевању, сталној едукацији и посвећености током моје научне каријере. Такође јој се захваљујем на огромној помоћи током изолације и детерминације плесни из узорака стеље.

Посебну захвалност дугујем проф. др Владимиру Томовићу на дивној сарадњи и поверењу, на учешћу и помоћи у сензорној анализи узорака сјеничке овчије стеље.

Захваљујем се и проф. др Олгици Стефановић на корисним саветима у току писања докторске дисертације и презентовања резултата.

Неизмерну захвалност дугујем својим родитељима и сестри Соњи који су ме увек подржавали и веровали у мене. Огромно „Хвала“ Владимиру, Магдалени и Марку.

*За моју породицу...
За снагу и принципе...
За нежне загрљаје, сузе и осмехе...
За корене и крила...*

АПСТРАКТ

Сјеничка овчија стеља је аутохтони ферментисани производ од овчијег меса који се традиционално производи у сеоским домаћинствима на територијама општина Сјеница и Тутин. Производ се припрема према јединственој рецептури и технологији, од искошћених и обликованих овчијих трупова аутохтоне расе оваца сјеничка праменка које су гајене на сјеничко-пештерској висоравни, без додатака стартер култура и адитива. За потребе експеримента је коришћена сјеничка овчија стеља произведена у изабраним домаћинствима села Блато (А), Крајиновиће (Б) и Расно (В) са подручја Пештера у три производне сезоне (2016/17 - 1; 2017/18 - 2; 2018/19 - 3), крајем јесењег и почетком пролећног периода, у току 120 дана зрења. У докторској дисертацији дефинисани су параметри квалитета сјеничке очије стеље кроз испитивање хемијског састава и сензорних карактеристика производа као и кроз испитивање аутохтоне микробиоте производа и поређење свих параметара кроз различите сезоне, периоде зрења и домаћинства. Испитивање састава микробиоте аутохтоног производа сјеничка овчија стеља је подразумевало испитивање присуства и бројности аеробних мезофилних бактерија, бактерија млечне киселине (БМК), коагулаза-негативних стафилокока (КНС), бактерија из фамилија Enterobacteriaceae и Pseudomonadaceae, врста из рода *Salmonella* и *Listeria monocytogenes* као и плесни. Идентификација БМК и КНС је извршена коришћењем биохемијских тестова и МАЛДИ-ТОФ масене спектрофотометрије. Изолација плесни је извршена на Dhloran 18% глицерол агару (DG18) са површине узорака овчије стеље, док је идентификација спроведена према кључевима за детерминацију. Испитане су технолошке особине изолата БМК, КНС и плесни. Антимикробни потенцијал изолата БМК и КНС у односу на раст *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и *Bacillus cereus* ATCC 14579 је испитан методом дифузије из бунарића. Изолати са најбољим антимикробним потенцијалом су одабрани за анализу утицаја ензима, рН, температуре и хемијских једињења на антимикробну активност полупречишћених бактериоцина и кинетике раста и биосинтезе антимикробних једињења. За процену пробиотског потенцијала, одабрано је 42 БМК изолата. Изолати су испитани на способност толеранције на услове ГИТ-а (толеранција на ниску рН, присуство пепсина, панкреатина и жучних соли, присуство фенола), хидрофобност, способност аутоагрегације и коагрегације и урађена је безбедносна процена изолата кроз испитивање способности хемоллизе на крвном агару и резистенције на антибиотике.

Хемијском анализом сјеничке овчије стеље утврђено је да узорци испуњавају захтеве који дефинишу прописи о квалитету производа од меса, као и елабората о заштити географског порекла сјеничка очија стеља у погледу садржаја воде, масти, протеина меса, соли и пепела. Промене рН вредности током технолошког процеса су одговарале врсти производа. На крају зрења рН вредности су се кретале у интервалима од 5,15 до 5,6, што указује на одговарајућу зрелост производа. Током зрења сјеничке овчије стеље дошло је до промене a_w вредности у производу које су указивале на микробиолошку стабилност традиционалног проивода. Сензорном анализом нису забележена општећења, мрље и дисколорације производа, при чему је истакнута специфичност производа по свим истраживаним сензорним параметима

Резултати испитивања микробиоте истакли су доминацију БМК, које је пратило присуство КНС и плесни. Присусто бактерија из фамилије Enterobacteriaceae и Pseudomonadaceae је потрђено у току процеса производње, док на крају процеса зрења нису детектоване. Присуство врста из рода *Salmonella* и *Listeria monocytogenes*, није детектовано ни у једној фази производног процеса овчије стеље у свим испитиваним

узорцима из свих сезона. Од укупно 432 БМК изолата, идентификовано је укупно 6 врста, од којих је 3,83% припадало роду *Leuconostoc*, 8,35% роду *Enterococcus*, 2,03% роду *Lactiplantibacillus*, а највећи проценат (87,58%) је припадао роду *Lactobacillus*. Од укупно 376 изолата КНС идентификовано је 152 изолата (40,42%) као *Staphylococcus equorum*, 103 изолата (27,39%), као *Staphylococcus xylosus*, 64 изолата (17,2%) као *Staphylococcus carnosus* и 46 изолата (12,23%) је идентификовано као *Staphylococcus saprophyticus*. Значајан део микробиоте сјеничке очије стеље су чиниле плесни, укупно 221 изолата, при чему је карактеризацијом и идентификацијом детерминисано укупно 4 рода: *Aspergillus* (2,71%), *Eurotium* (10,86%), *Penicillium* (83,71%) и *Mucor* (2,71%). Раст плесни из овчије стеље је био под директним утицајем активности воде у супстрату.

Технолошком карактеризацијом изолата је утврђено да изолати из рода *Lactobacillus* показују способност раста на температури до 45°C као и на свим тестираним концентрацијама соли и различитим рН вредностима, без протеолитичке и липолитичке активности. Изолати *L. plantarum* и *L. mesenteroides* су успешно расли на температури до 15°C, концентрацијама соли до 6,5% и при рН вредностима изнад 5. Изолати *L. mesenteroides* су показали протеолитичку активност. Изолати који су припадали врстама *E. faecium* и *E. faecalis* су расли на температурама до 15°C и на свим концентрацијама соли, и показали су протеолитичку и липолитичку активност. *E. faecium* изолати су расли на свим тестираним рН вредностима, док су изолати *E. faecalis* расли на рН вредностима већим од 6.

Антимикробну активност према тестираним индикаторским врстама показало је 47,61% тестираних БМК изолата, са највећом зоном инхибиције према *E. coli* АТСС 25922. Највећу антилистеријску активност је показао *E. faecium* Ios4 са зоном инхибиције од 25 mm. КНС изолати нису показали антимикробну способност према одабраним индикаторским врстама. Антимикробна активност полупречишћених бактериоцина изолата *L. curvatus* Pos4, *L. curvatus* Pos6, *L. sakei* Pb11, *L. sakei* Pa13, *L. mesenteroides* Pos4i и *E. faecium* Ios4 се потпуно изгубила под деловањем протеолитичких ензима, док се добра антимикробна активност полипептида задржала на рН 7. Присуство хемијских једињења није утицало на антимикробну активност полупречишћених бактериоцина. Производња антимикробних једињења је запажена у експоненцијалној фази раста. Током продужене инкубације у стационарној фази (након 30 h) активност супернатанта је значајно опала, да би након инкубације од 48 h антимикробна активност пречишћених бактериоцина нестала.

Тестирани изолати БМК су показали добар пробиотски потенцијал. Изолати *Lactobacillus* spp. су показали висок ниво толеранције на ниску рН (2 и 3), као и способност раста у присуству жучних соли. Изолати *L. plantarum* и *E. faecalis* су показали слабу толеранцију на ниску рН (2 и 3) и присуство жучних соли. Одабрани изолати су показали добру способност преживљавања у симулираним условима желуца и танког црева и висок ниво способност раста у присуству фенола. Хидрофобност према хлороформу, н-хексадекану и ксилолу се кретала у распону од 5,2% до 80,9%. Способност аутоагрегације и коагрегације са *E. coli* АТСС 25922, тестираних изолата БМК изолата је била изолат специфична. Тестирани изолати нису показали способност синтезе биогених амина као ни хемолизу на крвном агару. Апсолутну резистенцију на антибиотике није показао ни један тестирани изолат. Осетљивост на истраживане антибиотике забележена је код 69,04% тестираних изолата.

Резултати добијени овом дисертацијом указују на чињеницу да се аутохтони ферментисани производ сјеничка очија стеља одликује свим специфичностима квалитета сувомеснатог производа, који у многоме зависи од микробиоте која се у току

ферментације развија у производу. Резултати пробиотских и безбедоносних својстава БМК изолата из сјенчике овчије стеље отварају могућност даљих истраживања потенцијалне примене одређених сојева у месној индустрији као стартера за производњу сувомеснатих производа.

Кључне речи: *сјеничка овчија стеља, ферментисани производ, хемијска анализа, сензорна анализа, аутохтони микроорганизми, пробиотски потенцијал, стартер културе*

SUMMARY

Sjenica's sheep ham is an autochthonous fermented sheep meat product that is traditionally produced in rural households in the municipalities of Sjenica and Tutin. The product is prepared according to a unique recipe and technology, from boneless and shaped sheep carcasses of the indigenous breed of sheep called Sjenička pramenka which were raised on the Sjenica-cave plateau, without the addition of starter cultures and additives. For the purposes of the experiment, Sjenica's sheep ham produced in selected households in the villages of Blato (A), Krajinoviće (B), and Rasno (V) from the Pešter area in three production seasons was used (2016/17 - 1; 2017/18 - 2; 2018/19 - 3), at the end of autumn and the beginning of spring, during 120 days of ripening. This dissertation defines the quality parameters of Sjenica's sheep ham by examining the chemical composition and sensory characteristics of the product as well as by examining the indigenous microbiota of the product and comparing all parameters through different seasons, maturation periods, and households. Examination of the microbiota composition of the autochthonous product Sjenica's sheep ham included examination of the presence and abundance of aerobic mesophilic bacteria, lactic acid bacteria (LAB), coagulase-negative staphylococci (CNS), bacteria from the families Enterobacteriaceae and Pseudomonadaceae, species of the genera *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* as well as molds. Identification of LAB and CNS was performed using biochemical tests and MALDI-TOF mass spectrophotometry. Mold isolation was performed on Dichloran 18% glycerol agar (DG18) from the surface of sheep litter samples, while identification was performed using identification keys. The technological properties of LAB and CNS isolates and molds were examined. The antimicrobial potential of LAB and CNS isolates against the growth of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Bacillus cereus* ATCC 14579 was examined by well diffusion method. Isolates with the best antimicrobial potential were selected to analyze the influence of enzymes, pH, temperature, and chemical compounds on the antimicrobial activity of semi-purified bacteriocins and the kinetics of growth and biosynthesis of antimicrobial compounds. To assess the probiotic potential, 42 LAB isolates were selected. Isolates were tested for their ability to tolerate GIT conditions (tolerance to low pH, presence of pepsin, pancreatin, and bile salts, presence of phenols), hydrophobicity, ability to auto-aggregation and co-aggregation, and safety assessment of isolates was performed by testing blood agar hemolysis and resistance on antibiotics.

Chemical analysis of Sjenica's sheep ham determined that the samples meet the requirements defined by the regulations on the quality of meat products, as well as the study on the protection of geographical origin of Sjenica's sheep ham in terms of water, fat, meat protein, salt, and ash. Changes in pH values during the technological process correspond to the type of product. At the end of ripening, the pH values ranged from 5.15 to 5.6, which indicates the appropriate maturity of the product. During the ripening of the Sjenica's sheep ham, there was a change in a_w value of the product, which indicated the microbiological stability of the traditional product. The sensory analysis did not show damage, stains, and discoloration of the product, emphasizing the specificity of the product for all examined sensory parameters.

The results of microbiota testing highlighted the dominance of LAB, which was accompanied by the presence of CNS and mold. The presence of bacteria from the families Enterobacteriaceae and Pseudomonadaceae was confirmed during the production process, while at the end of the maturation process, they were not detected. The presence of species from the genera *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* was not detected at any stage of the production process of sheep ham in all tested samples from all seasons. Out of a total of 432

LAB isolates, a total of 6 species were identified, of which 3.83% belonged to the genus *Leuconostoc*, 8.35% to the genus *Enterococcus*, 2.03% to the genus *Lactiplantibacillus* and the largest percentage (87.58%) belonged to the genus *Lactobacillus*. Out of a total of 376 CNS isolates, 152 isolates (40.42%) were identified as *Staphylococcus equorum*, 103 isolates (27.39%) as *Staphylococcus xylosus*, 64 isolates (17.2%) as *Staphylococcus carnosus* and 46 isolates (12.23 %) was identified as *Staphylococcus saprophyticus*. A significant part of the microbiota of the Sjenica's sheep ham consisted of molds, a total of 221 mold isolates, with the characterization and identification of a total of 4 genera: *Aspergillus* (2.71%), *Eurotium* (10.86%), *Penicillium* (83.71%) and *Mucor* (2.71%). The growth of mold from sheep ham was directly affected by water activity in the substrate.

Technological characterization of isolates has determined that isolates of the genus *Lactobacillus* show the ability to grow at temperatures up to 45°C as well as at all tested salt concentrations and different pH values, without proteolytic and lipolytic activity. Isolates of *L. plantarum* and *L. mesenteroides* successfully grew at temperatures up to 15°C, salt concentrations up to 6.5%, and pH values above 5. Isolates of *L. mesenteroides* showed proteolytic activity. Isolates belonging to *E. faecium* and *E. faecalis* species grew at temperatures up to 15°C and at all salt concentrations and showed proteolytic and lipolytic activity. *E. faecium* isolates grew at all tested pH values, while *E. faecalis* isolates grew at pH values greater than 6.

Antimicrobial activity according to the tested indicator species was shown by 47.61% of tested LAB isolates, with the highest zone of inhibition according to *E. coli* ATCC 25922. The highest antilisterial activity was shown by *E. faecium* Ios4 with a zone of inhibition of 25 mm. CNS isolates did not show antimicrobial ability according to the selected indicator species. The antimicrobial activity of semi-purified bacteriocins of *L. curvatus* Ios4, *L. curvatus* Ios6, *L. sakei* Iib11, *L. sakei* Iia13, *L. mesenteroides* Ios4i, and *E. faecium* Ios4 isolates was completely lost by proteolytic enzymes, while the good antimicrobial activity of the polypeptide was maintained at pH 7. The presence of chemical compounds did not affect the antimicrobial activity of semi-purifying bacteriocins. The production of antimicrobial compounds was observed in the exponential growth phase. During the prolonged incubation in the stationary phase (after 30 h) the activity of the supernatant decreased significantly, and after the incubation of 48 h, the antimicrobial activity of the purified bacteriocins disappeared.

LAB isolates testing showed good probiotic potential. Isolates of *Lactobacillus* spp. showed a high level of tolerance to low pH (2 and 3), as well as the ability to grow in the presence of bile salts. Isolates of *L. plantarum* and *E. faecalis* showed poor tolerance to low pH (2 and 3) and the presence of bile salts. Selected isolates showed good survival ability in simulated gastric and small intestine conditions and a high level of growth ability in the presence of phenol. Hydrophobicity towards chloroform, n-hexadecane, and xylene ranged from 5.2% to 80.9%. The ability of auto-aggregation and coaggregation with *E. coli* ATCC 25922, tested isolates of LAB isolates was isolate specific. The tested isolates did not show the ability to synthesize biogenic amines or hemolysis on blood agar. None of the tested isolates showed absolute antibiotic resistance. Susceptibility to the studied antibiotics was observed in 69.04% of the tested isolates.

The results obtained by this dissertation indicate the fact that the autochthonous fermented product Sjenica's sheep ham is characterized by all the specifics of the quality of cured meat product, which largely depends on the microbiota that develops in the product during fermentation. The results of probiotics and safety properties of LAB isolates from the shade of sheep litter open the possibility of further research into the potential application of certain strains in the meat industry as a starter to produce meat products.

Keywords: *Sjenica's sheep ham, fermented product, chemical analysis, sensory analysis, indigenous microorganisms, probiotic potential, starter cultures*

САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ.....	4
2.1. Микробиота ферментисаних месних производа.....	5
2.1.1. Бактерије млечне киселине.....	5
2.1.2. Коагулаза-негативне стафилококе.....	9
2.1.3. Квасци и плесни.....	11
2.2. Пробиотици, пребиотици и синбиотици.....	13
2.2.1. Пробиотици.....	13
2.2.2. Пребиотици.....	16
2.2.3. Синбиотици.....	16
2.3. Бактерије млечне киселине као пробиотици.....	17
2.3.1. Антимикробни потенцијал бактерија млечне киселине.....	17
3. ЦИЉЕВИ РАДА.....	20
4. МАТЕРИЈАЛ.....	22
4.1. Аутохтони ферментисани производ сјеничка овчија стеља.....	23
4.2. Микробиолошке подлоге.....	23
4.3. Раствори и реагенси.....	28
5. МЕТОДЕ.....	30
5.1. Узорковање сјеничке овчије стеље.....	31
5.2. Хемијска анализа сјеничке овчије стеље.....	31
5.2.1. Испитивање рН вредности.....	31
5.2.2. Испитивање a_w вредности.....	32
5.2.3. Испитивање садржаја воде.....	32
5.2.4. Испитивање количине укупне масти.....	32
5.2.5. Испитивање количине укупних протеина.....	32
5.2.6. Испитивање укупне количине соли.....	32
5.2.7. Испитивање укупне количине пепела.....	33
5.3. Сензорна анализа сјеничке овчије стеље.....	33
5.4. Микробиолошка анализа сјеничке овчије стеље.....	34
5.4.1. Изолација аутохтоних бактерија.....	34
5.4.2. Изолација и идентификација плесни.....	41
5.5. Технолошке особине аутохтоне микробиоте сјеничке овчије стеље.....	42
5.5.1. Технолошке особине бактерија млечне киселине и коагулаза-негативних стафилокока.....	42
5.5.2. Утицај различитих услова средине на раст аутохтоних изолата плесни.....	43
5.6. Антимикробна активност аутохтоних изолата.....	44
5.6.1. Утицај, ензима, рН, температуре и хемијских једињења на антимикробну активност полупречишћених бактериоцина одабраних изолата.....	44
5.7. Испитивање пробиотског потенцијала бактерија млечне киселине.....	47
5.7.1. Толеранција на услове гастроинтестиналног тракта.....	47
5.7.2. Процена безбедоносног аспекта изолата бактерија млечне киселине.....	50
5.8. Статистичка анализа.....	51
6. РЕЗУЛТАТИ.....	52
6.1. Хемијска анализа сјеничке овчије стеље.....	53
6.2. Сензорна анализа сјеничке овчије стеље.....	53
6.3. Микробиолошка анализа сјеничке овчије стеље.....	57
6.3.1. Испитивање присуства и бројности бактерија у узорцима сјеничке овчије стеље.....	57

6.3.2. Идентификација БМК изолата.....	61
6.3.3. Идентификација коагулаза-негативних стафилокока.....	63
6.3.5. Карактеризација и идентификација плесни изолованих из сјеничке овчије стеље.....	65
6.3.6. Утицај хемијских параметара на развој аутохтоне микробиоте сјеничке овчије стеље.....	68
6.4. Технолошке особине аутохтоне микробиоте сјеничке овчије стеље.....	70
6.4.1. Технолошке особине бактерија млечне киселине и коагулаза-негативних стафилокока.....	70
6.4.2. Утицај различитих услова средине на раст аутохтоних изолата плесни.....	71
6.5. Антимикробна активност изолата.....	76
6.5.1. Утицај, ензима, рН, температуре и хемијских једињења на антимикробну активност полупречишћених бактериоцина одабраних изолата.....	78
6.6. Испитивање пробиотског потенцијала бактерија млечне киселине.....	82
6.6.1. Толеранција на услове гастроинтестиналног тракта.....	82
6.6.2. Безбедоносни аспект изолата бактерија млечне киселине.....	91
7. ДИСКУСИЈА.....	93
8. ЗАКЉУЧАК.....	113
Литература.....	117
Прилози.....	139

1. УВОД

Ферментисана храна има значајну улогу у исхрани људи широм света. Ферментација је један од најстаријих примењених биотехнолошких процеса, који лако кварљиву храну претвара у стабилан конзервиран производ, при чему се сам процес усавршавао кроз развој цивилизације до савремених технологија (Aquilanti et al., 2016).

Улога микроорганизама је од кључног значаја у ферментацији хране и огледа се у низу физичко-хемијских промена производа током процеса ферментације. Растом микроорганизама у храни долази до снижавања рН вредности и активности воде у храни, док су метаболички производи микроорганизама значајни за органолептичке карактеристике хране. Различите интеракције микроорганизама у храни, такође, су значајне за квалитет производа. Сојеви микроорганизама који продукују антимикробна једињења регулишу присуство и бројност непожељних микроорганизама (Mokoena et al., 2016).

Последњих година се значајно повећава интересовање потрошача за разноврсном ферментисаном храном која позитивно утиче на здравље конзумента. Храна која се производи у процесу спонтане ферментације без додавања адитива и конзерванаса, као и бактеријских стартер култура је добар извор изолата са пожељним технолошким и пробиотским карактеристикама, које благотворно утичу на здравље људи, а могу се користити као стартер културе (Grujović et al., 2022).

Традиционални аутохтони ферментисани производи представљају културно наслеђе народа и везани су за географска подручја и регије. Одликују се специфичном технологијом производње као и специфичним саставом микробиоте која је одговорна за настанак специфичних органолептичких карактеристика производа (Todorov et al., 2017; Muruzović et al., 2018).

Традиционални ферментисани сувомеснати производи заузимају значајно место на међународном тржишту. Препознатљиви су и као културолошко наслеђе услед очувања националног идентитета једног народа. Аутентична технологија, препознатљив укус и органолептика аутохтоног сувомеснатог производа данас представља главну гастрономску понуду једне регије, при чему је неопходна „Заштићена ознака Порекла”. Стандардизација традиционално произведеног регионалног прехранбеног производа гарантује потрошачу добру произвођачку и хигијенску праксу и уједначен квалитет производа, као и сигуран опстанак аутохтоних производа на тржишту. Популација микроорганизама присутна у традиционалним месним производима може бити веома разнолика и у функцији је локалне производне технологије и географског порекла производа (Guerrero et al., 2009).

Јединствена сензорна карактеристика и специфична арома и текстура у традиционалним сувомеснатим производима често је последица активности аутохтоних бактерија млечне киселине, које потичу из меса и производне средине. Према томе, микробиота традиционалних ферментисаних производа представља богат извор врста и/или сојева са добрим технолошким и пробиотским својствима (Todorov et al., 2017).

Западни Балкан карактерише велики број аутохтоних сувомеснатих производа који настају у процесу спонтане ферментације. Један од ових производа је слано и сушено овчје месо без костију или унутрашњих мишића бута, које се назива стеља, пастрма или кастрада и карактеристичан је производ за скоро све балканске земље укључујући Босну и Херцеговину, Македонију, Хрватску, Црну Гору и Србију (Stojković et al., 2015).

Услед одређених одступања у традиционалном поступку производње, разликама у квалитету овчијег меса услед географског положаја и микроклиматских услова, долази до формирања специфичних сензорних својстава производа које су карактеристичне за различите регионе западног Балкана (Stojković et al., 2015).

Аутохтони производ од овчијег меса, који се традиционално производи у Западној Србији, на територији општине Сјеница и општине Тутин, је сјеничка овчија стеља (Bauman & Dumić, 2017). За производњу сјеничке овчије стеље користе се товљени мушки кастрати и јалове овце, аутохтоне врсте животиња сјеничка праменка, гајених на локалитету Сјеничко-пештерске висоравни на надморској висини од 1100-1250 m.

Много је фактора који утичу на квалитет овчије стеље, а основни фактори су правилан одабир сировине и фактори прехранбене технологије (Aktaş et al., 2005). Начин производње овог производа је врло специфичан. Користе се цели обликовани трупови оваца са ураслим масним и везивним ткивом, који се диме и суше, а сам процес ферментације траје најмање 5 до 6 месеци (Stamenković & Dević, 2006). Микробиоту овчије стеље чине аутохтони сојеви бактерија и плесни о чијим карактеристикама и потенцијалу готово да нема података. Стога је циљ ове докторске дисертације да дефинише аутохтону микробиоту производа, која утиче на квалитет и органолептику сјеничке овчије стеље.

2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.1. Микробиота ферментисаних месних производа

Различити региони у свету карактеришу се традиционалним ферментисаним месним производима, који поред технолошке и сензорне јединствености, поседују и специфичну микробиоту. Микробиота која се развија у оваквим производима често је специфичана и уско је повезана са дужином и условима зрења. Ферментацијом сувомеснатих производа долази до биохемијских и физичко-хемијских промена у месу, које настају као резултат интеракција између микроорганизама, меса, масноће и технолошког поступка прераде, чиме се обезбеђује стабилност и дуготрајност производа (Vignolo et al., 2010).

Примарна микробиота у традиционалним производима од меса обухвата присуство технолошки значајних микроорганизама и микроорганизама потенцијалних узрочника кварења хране. Узрочници кварења хране углавном обухватају Грам-негативне и оксидаза-позитивне бактерије које потичу са коже или из гастроинтестиналног тракта (ГИТ-а) и мишићног ткива животиња (Žgomba Maksimović, 2019).

На састав примарне микробиоте свежег меса утичу хигијенско-санитарни услови клања животиња и процес прераде меса (Kegalj et al., 2012). Доминантни родови микроорганизама у сировом месу су *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Brochothrix*, *Flavobacterium*, *Psychrobacter*, *Moraxella*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, бактерије из фамилије Enterobacteriaceae (ентеробактерије), бактерије млечне киселине (БМК), коагулаза-негативне стафилококе (КНС), квасци и плесни (Doulgeraki et al., 2012).

Toldrà (2008) истиче да се промена укупног број аеробних мезофилних бактерија у сировом месу креће од 4 до 6 log cfu/g. Lorenzo et al. (2010) су указали да је у унутрашњости свежег меса, које се користи за производњу ферментисаног месног производа „Lacón”, укупан број аеробних мезофилних бактерија око 3 log CFU /g, док је број аеробних мезофилних бактерија на површини меса 5 до 7 log CFU /g. У месу, масном ткиву најева за производњу кобасица забележено је присуство ентробактерија (од 3,47 до 3,54 log₁₀ CFU/g), ентерокока (од 2 до 4,43 log₁₀ CFU/g), кластридија (од 1 до 2 log₁₀ CFU/g) и *Staphylococcus aureus* (од 2,6 до 3,47 log₁₀ CFU/g) (Zdolec et al., 2007). Ентробактерије су присутне у првим данима ферментације. Трећег дана ферментације њихов број се драстично смањује због смањења рН вредности меса услед повећања бројности БМК које поседују способност синтезе антимикробних једињења као што су органске киселине, водоник пероксид и бактериоцини (Zdolec et al., 2008).

2.1.1. Бактерије млечне киселине

Бактерије млечне киселине су хетерогена група микроорганизама са широком употребом у индустрији хране, пољопривреди и медицини. Ову групу бактерија чине Грам-позитивни, каталаза-негативни, анаеробни или аеротолерантни, ацидотолерантни, аспорогени микроорганизми, морфолошки различитих облика (бацили, коке и кокобацили), који не садрже цитохроме. На основу ферментативне способности под дејством лактат-дехидрогеназе, БМК можемо поделити у две групе:

- ❖ Хомоферментативни организми (разграђују глукозу до млечне киселине);
- ❖ Хетероферментативни организми (разграђују глукозу до млечне киселине и еквимоларне количине ацетата, етанола, угљен диоксида (CO₂), мравље киселине или сукцината у анаеробним условима) (Tamang, 2014).

Поред угљених хидрата, за раст БМК неопходне су различите аминокиселине, пептиди, нуклеотиди, соли, масне киселине, естри масних киселина, као и витамини Б групе. Нутритивни захтеви су карактеристика врсте, али често су и карактеристика појединачних сојева (Bergey, 2009).

У већини случајева, ова група бактерија има ГРАС статус (енгл. Generally Recognized As Safe (GRAS)), што значи да су микроорганизми безбедни за употребу од стране животиња и људи. Имају најзначајнији удео у процесима ферментације и сазревања производа од меса, доводе до снижавања рН средине и продукују антимикуробна једињења чиме утичу на смањење бројности патогена и природног конзервирања производа. БМК учествују у развоју сензорних карактеристика меса и сувомеснатих производа кроз процесе протеолизе и липолизе. Синтезом протеолитичких ензима мењају текстуру меса, утичу на укус, нутритивни квалитет и арому ферментисаних сувомеснатих производа. Раст БМК је често повезан са смањењем рН вредности током фазе сазревања производа. На почетку процеса ферментације сувомеснатих производа, бројност БМК се креће од 3,2 до 5,3 log CFU/g, да би на крају ферментације, са променом услова средине, бројност БМК просечно износила од 8-9 log CFU/g, тако да су доминантна група микроорганизма (Comi et al., 2005; Žgomba Maksimović, 2019). Бактерије млечне киселине обухватају велики број родова који се могу изоловати из ферментисане хране: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium*, *Vagococcus* и *Alkalibacterium* (Tamang, 2014). У наставку текста су описани родови који су најчешће идентификовани у месу и месним производима.

Род *Lactobacillus*

Род *Lactobacillus* (фам. Lactobacillaceae) обухвата више од 80 врста бактерија са заједничким карактеристикама: неспорогени штапићи, дужине од < 1,5 μm до 5 μm, па чак и до 10 μm. Расту на температурама од 2°C – 53°C, а оптимална температура њиховог раста је 30°C–40°C. Оптимална рН вредност за њихов раст је од 5,5 до 6,2, док поједине врсте добро расту и када је рН средине 5 или мања од ове вредности. У оквиру овог рода постоје и хомоферментативне и хетероферментативне врсте (Matijević et al., 2009).

За лактобациле су карактеристични високи захтеви у смислу нутритивних компоненти у подлогама за раст. Лактобацили насељавају веома различита станишта. Могу се наћи на биљкама, у млеку, месу, ферментисаним напицима и производима од житарица. Њихов иницијални број на површини свежег меса је 3,2–4,6 log CFU/g, док је у унутрашњости меса ова вредност 0,8–1,5 log CFU/g, при чему се овај број веома брзо повећава са процесом сазревања производа (Lorenzo et al., 2010).

Према Zheng et al. (2020), род *Lactobacillus* је рекласификован у 25 нових родова: *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Amylolactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Holzapfelia*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus* и *Secundilactobacillus*.

Ова нова класификација је извешена на основу молекуларних карактеристика бактерија, физиолошких и метаболичких критеријума као и екологије микроорганизма. Филогенетске анализе бактеријских генома, присуство маркера гена специфичних за класу бактерија, као и анализе секвенци протеина су коришћене у

молекуларним анализама за класификације бактерија. Најчешће детектоване врсте лактобацила у месним производима су *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactiplantibacillus plantarum* (предходно класификован као *Lactobacillus plantarum*) и *Lacticaseibacillus casei* (предходно класификован као *Lactobacillus casei*) (Landeta et al., 2013).

Род *Pediococcus*

Врсте рода *Pediococcus* (фам. Lactobacillaceae) су факултативно анаеробне, непокретне бактерије, сферичног облика. Могу бити у виду парова или тетрада, ретко појединачно и не формирају ланце ни споре. За раст захтевају супstrate богате факторима раста и аминокиселинама. Ферментишу глукозу или L (+) млечне киселине. Оптимална температура раста ових бактерија креће се између 25°C и 40°C. Не показују протеолитичку активност. Род се састоји од седам врста, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus cellicola*, *Pediococcus clausenii*, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus dektrinicus*, *Pediococcus inopinatus*, *Pediococcus parvulus* и *Pediococcus pentosaceus* (Zhang et al., 2005).

P. acidilactici и *P. pentosaceus* се користе у ферментацији поврћа, меса, силаже, као и за производњу сирева. Користе се као пробиотици у храни за животиње. Важни су и као стартер културе у ферментисаним производима од меса (Вајрај et al., 2016). *P. acidilactici* и *P. pentosaceus* поседују способност синтезе педиоцина који се користи у процесу биоконзервирања прехранбених производа (Vaforoulou et al., 1999).

Род *Enterococcus*

Род *Enterococcus* (фам. Enterococcaceae) чине непокретни, факултативно анаеробни организми. Ћелије ентерокока су округлог, мало издуженог облика, углавном се јављају у паровима или краћим ланцима. Расту на температурама од 10°C-45°C, у бујону са 6,5% NaCl, при рН вредностима од 4,0 до 9,6 и преживљавају загревање на 90°C у трајању од 30 минута (Fisher & Phillips, 2009).

Спадају у групу хомоферментативних БМК. Показују способност хидролизе аргинина и ескулина и могу у потпуности да редукују лакмус млеко. За ентерококе је карактеристично да продукују ензим естеразу као и секундарне метаболите попут диацетила и ацетона који учествују у формирању сензорних карактеристика ферментисаних производа. Бактерије овог рода су широко распрострањене и насељавају тло, храну, воду и ГИТ људи и животиња (Fisher & Phillips, 2009).

Употреба ентерокока у индустрији хране изазвала је подељено мишљење стручњака. Разлози за то су многобројни. Врсте бактерија из овог рода имају способност хоризонталног трансфера гена одговорних за резистенцију на антибиотике, нарочито на ванкомицин. Затим, њихово присуство се повезује са недостатком хигијенских услова током процеса производње и прераде меса (Grujović et al., 2021; Suvorov, 2020). Међутим, ове бактерије се спорадично користе у прехранбеној индустрији јер врше млечно-киселинску ферментацију и могу продуковати бактериоцине (Suvorov, 2020). Сојеви појединих врста, као што је *Enterococcus faecium* могу поседовати и добар пробиотски потенцијал (Žugić-Petrović et al., 2020). У процесу ферментације меса, иницијални број ентерокока креће се између 2 и 5 log CFU/g, и углавном се задржава на том нивоу до краја процеса зрења (Talon et al., 2007; Ferreira et al., 2009). Најчешће врсте ентерокока присутне у ферментисаним производима од меса су *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus mundtii* и *Enterococcus thailandicus* (Demirgül & Tuncer, 2017).

Род *Lactococcus*

Бактерије из рода *Lactococcus* (фам. Streptococcaceae) су непатогене, хомоферментативне, непокретне бактерије, округлог или овалног облика, јављају се појединачно или у паровима, односно ланцима. Већина врста добро расте на температури од 10°C, при ниским рН вредностима средине, док на температуру од 45°C ове бактерије не расту. Расту у присуству 4% NaCl, са изузетком *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* који толерише само 2% NaCl. Врсте из овог рода су познате као хомоферментативне бактерије, али њихов хомоферментативни карактер може бити измењен услед способности прилагођавања различитим условима животне средине, попут рН вредности, концентрације глукозе и ограничених нутријената (James, 1992).

Лактококе, као и ентерококе, се могу детектовати у малом броју у традиционалним сувим ферментисаним кобасицама и сматрају се секундарном микробиотом (Dowdell et al., 2020). Иако чине мали, па чак и непожељни део популације БМК у ферментацији меса, поједини сојеви лактокока и ентерокока поседују специфичне и технолошки интересантне особине које би могле да се користе за побољшање производње кобасица, посебно њихове сензорне прихватљивости (Frесе et al., 2014; Dowdell et al., 2020). Учествују у метаболизму угљених хидрата, липида и протеина, у великој мери доприносе безбедности и сензорним својствима финалних производа. Њихове екзогене протеазе и липазе се успешно користе за убрзање сазревања сувих ферментисаних кобасица, са примарним циљем смањења трошкова производње (Fernández et al., 2000). Протеолитички и липолитички сојеви могу значајно утицати на процес зрења и квалитет кобасица готових за јело. Међутим, под одређеним условима, прекомерни продукти протеолизе и липолизе могу довести до горког и металног непријатног укуса због присуства горких пептида или вишка оксидације липида. Најпознатије врсте из овог рода које се користе као стартери у месној индустрији су *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* и *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*. Ове врсте су примарно изоловане као аутохтони сојеви из сирева, а показали су се као добре стартер културе у индустрији меса, за производњу кобасица (Mrkonjić Fuka et al., 2021).

Род *Leuconostoc*

Бактерије које припадају роду *Leuconostoc* (фам. Leuconostocaceae) се карактеришу великим разликама у оквиру групе. Облик ових бактерија може бити округао или сочиваст уколико се гаје на посебним желатинозним подлогама, могу се јавити у паровима или краћим ланцима. Температурни оптимум за раст се креће између 20°C и 30°C, док поједине врсте у оквиру рода могу успешно да расту и на температури од 5°C. Толеришу релативно високе концентрације шећера и соли. Хетероферментативни су, што значи да током ферментације глукозе продукују D (-) млечну киселину, етанол и CO₂. Продуковани CO₂ замењује кисеоник, стварајући анаеробне услове повољне за раст бактерија из рода *Lactobacillus*. Бактерије из рода *Leuconostoc* немају могућности да хидролизују аргинин, не поседују протеолитичку активност и резистентне су на ванкомицин (Björkroth & Holzappel, 2006; Holland & Liu, 2011).

Leuconostoc spp. се могу изоловати из бројних прехранбених производа, као што су расхлађено и ферментисано месо, поврће и млечни производи (Liu, 2016). Најчешће изоловане врсте су *Leuconostoc mesenteroides* spp. *mesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc gelidum* spp. *gasicomitatum* и *Leuconostoc carnosum* (Thangavel & Thiruvengadam, 2019; Candeliere et al., 2021). Ове врсте имају велики

значај у индустрији шећера, вина, у месној и млекарској индустрији због производње ароматичних компоненти у метаболизму цитрата, као и у производњи декстрана који се широко користи у истраживањима, индустрији и медицини (Holland & Liu, 2011).

Род *Weissella*

Филогенија бактерија класификованих у роду *Weissella* (фам. Leuconostocaceae) разјашњена је 1990. године, употребом секвенцирања 16s rRNA, која су показала да је *Leuconostoc paramesenteroides* филогенски удаљен од *L. mesenteroides*, и да заједно са пет врста хомоферментативних бактерија формира род *Weissella*. Оптимална температура за раст ових бактерија је око 25°C, а рН је 6. Расту добро на концентрацији NaCl мањој од 8 – 10%. Имају способност хидролизе аргинина и формирају декстран од сахарозе. Продукују киселину приликом ферментације рибозе, ксилозе и L-арабинозе. Овај род броји осам врста: *Weissella halotolerans*, *Weissella hellenica*, *Weissella kandleri*, *Weissella minor*, *Weissella paramesenteroides*, *Weissella thaliandensis*, *Weissella confuse* и *Weissella viridescens*. По својим особинама бактерије из овог рода су јако сличне са бактеријама из рода *Leuconostoc* и могу се изоловати из различитих извора. *W. halotolerans*, *W. hellenica*, *W. paramesenteroides* и *W. viridescens* су изоловане из свежег меса и сувомеснатих производа (Björkroth & Holzapfel, 2006).

Род *Carnobacterium*

Род *Carnobacterium* (фам. Carnobacteriaceae) чине штапићасте бактерије, повезане у виду кратких ланаца. Расту у опсегу рН од 7 до 9. У највећем броју су хомоферментативне, али постоје и хетероферментативне врсте, као што је *Carnobacterium pleistocenium* (Joborn et al., 1999). Према Leisner et al. (2007), род *Carnobacterium* садржи девет описаних врста (*C. alterfunditum*, *C. divergens*, *C. funditum*, *C. gallinarum*, *C. inhibens*, *C. maltaromaticum*, *C. mobile*, *C. pleistocenium*, *C. viridans*), али се само *C. divergens* и *C. maltaromaticum* (стари назив *C. piscicola*) могу наћи у храни.

Врсте из рода *Carnobacterium* могу се наћи у морској води, млечним производима, као и у производима од рибе и меса. Неки од представника (*C. maltaromaticum*, *C. divergens* и *C. pleistocenium*) имају способност раста и размножавања при температурама од -10°C до +20°C (Leisner et al., 2007).

2.1.2. Коагулаза-негативне стафилококе

Стафилококе су врло значајна група микроорганизама која учествује у ферментацији меса. Показују значајан утицај на развој укуса и стабилност боје, а неке студије указују да су изолати из меса у стању да произведе бактериоцине који доприносе биолошкој заштити против патогена (Ratsimba et al., 2017).

Род *Staphylococcus* (фам. Staphylococcaceae) чине Грам позитивне бактерије лоптастог облика са пречником 1 µm, које су груписане у виду гроздова. Стафилококе су непокретне, факултативно анаеробне, оксидаза-негативне и каталаза-позитивне. Толеришу високе концентрације соли (преко 10%) (Götz et al., 2006). На основу њихове способности да продукују коагулазу, стафилококе се класификују као коагулаза-позитивне или коагулаза-негативне. Производња коагулазе се сматра фактором вируленције код стафилокока. Коагулаза-позитивне стафилококе (КПС) су патогени и/или токсигени микроорганизми који могу изазвати инфекције и тровање храном.

Представник је врста *Staphylococcus aureus* (Hait et al., 2014). Коагулаза-негативне стафилококе (КНС) се генерално сматрају непатогеним, упркос томе што неке врсте (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* и *Staphylococcus saprophyticus*) повремено изазивају опортунистичке инфекције (Нео et al., 2020).

Leroу et al. (2017) су указали да мали број врста/сојева КНС могу да користе шећере за ферментационе процесе. У супстратима сиромашним угљеним хидратима, као што је случај са месним матрицама, КНС могу да користе алтернативне изворе енергије као што су нуклеозиди и аргинин (Stavropoulou et al., 2018). Sánchez Mainar et al. (2017) напомињу да постоје разлике у метаболичким путевима међу различитим врстама и сојевима КНС који могу технолошки помоћи да се одаберу адекватни сојеви који утичу на производњу месних производа дефинисаних квалитета. КНС продукују ензиме, као што је нитрат-редуктаза, који има улогу у редукцији нитрата до нитрита. Такође доприноси и продукцији нитрозилмиоглобина, што утиче на боју сувомеснатог производа. Каталаза помаже у спречавању оксидације липида, доводи до побољшања укуса и стабилности боје производа од меса (Toldra, 2008). Поред наведених ензима, стафилококе продукују и протеазе и липазе, чија активност утиче на текстуру и укус производа услед ослобађања нискомолекуларних једињења (пептиде, аминокиселине, алдехиде, аminer и слободне масне киселине). Ови организми показују толеранцију на високе концентрације соли и ниску температуру, што су услови који се сусрећу током процеса ферментације меса (Semedo-Lemsadek et al., 2016).

У процесима као што су ферментација, сољење и сушење меса, КНС достижу бројност која се креће од 5 до 7 log CFU/g (Leroу et al., 2017). Према Lorenzo et al., (2012) у производњи традиционалног ферментисаног производа од меса „Lacón” број бактерија из фамилија *Micrococcaceae* и *Staphylococcaceae* се значајно повећава током фазе сољења и током првих дана фазе сушења. Максимална бројност је постигнута након седам дана зрења и износила је око 9 log CFU /g на површини и 3-4 log CFU /g у унутрашњости комада меса. Сојеви врста *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus succinus* и *Staphylococcus xylosus* су најчешће изоловани из меса и месних производа (Semedo Lemsaddek et al., 2016; Stavropoulou et al., 2018).

S. carnosus је Грам-позитивна, неспорогена, непокретна, факултативно анаеробна кока, величине приближно 0,5 до 1,5 μm . Оптимална температура раста је од 15°C - 45°C, расте у медијуму који садржи 15% NaCl. Колоније ових бактерија су сивобеле боје, непрозирне и могу створити пигмент током складиштења. Благо су уздигнуте, глатке и благо блиставе. Пречник колоније се креће у опсегу од 1 до 3 mm. Осетљива је на новобиоцин. Део је нормалне микробиоте меса и месних прерађевина, тако да директно дефинише квалитете ових производа. *S. carnosus* subsp. *carnosus* расте на температури од 45°C, и поседује изразиту липолитичку активност, што је добра технолошка особина за месну индустрију (Žugić-Petrović et al., 2016).

S. equorum је Грам-позитивана, коагулаза-негативна, непокретна, неспорогена бактерија, пречника од 0,5 до 1,8 μm . Јавља се појединачно или у паровима, гроздовима или ланцима. Колоније су беле, сјајне, непрозирне, пречника од 4 до 6 mm. Оптимална температура раста је 30°C, без могућности раста на температури од 45°C (Schleifer & Bell, 2009). Отпорна је на новобиоцин. *Staphylococcus equorum* spp. *linens* је подврста *S. equorum* која формира колоније мањег пречника, од 1 до 2 mm. Добро расте у средини са 13% NaCl, у температурном опсегу од 6°C до 40°C и осетљива је на новобиоцин (Place et al., 2003).

S. succinus је Грам-позитивна, аеробна кока сферичног облика, пречника 0,6–1,9 μm . Формирају карактеристичне розете са једном централном ћелијом окруженом са две до пет периферних ћелија. Колоније су издигнуте са подлоге са истакнутим центром, сјајне, непрозирне, беле, храпаве и наборане, димензија 4–6 mm. Оптимална

температура за раст је између 25°C и 40°C, на 42°C не могу да расту. Толеришу висок проценат соли (Nováková et al., 2006).

S. xylosus је, величине од 0,5 - 1,0 µm. Груписане су претежно у паровима или као појединачне ћелије. Формирају на подлогама округле колоније, наранџасто-жуте или жуто-сиве боје, величине од 5 до 10 mm, уздигнутог благо конвексног пречника и равних ивица. Оптимална температура за раст је од 25°C - 35°C. Одликује се високом толеранцијом на присуство соли и показују променљиву активност нитрат-редуктазе. У ферментацијама сувомеснатих производа директно утиче на органолептику производа па се данас све више користи као стартер култура у производњи кобасица (Leroy et al., 2017).

2.1.3. Квасци и плесни

Квасци и плесни се углавном налазе на површини месног производа. Њихова улога је формирање превлаке (филма) која има заштитно дејство против прекомерне дехидратације и оксидације липида услед присуства кисеоника и светлости. Углавном су халотолерантни и ацидотолерантни, што их чини добрим кандидатима за коришћење у стартер културама. Међутим, плесни се ретко користе као стартер културе у месној индустрији, а разлог можемо наћи и у чињеници да неке плесни могу да продукују микотоксине као токсичне секундарне метаболите (Sonjak et al., 2011).

Квасци

У ферментацији хране, квасци се у већина случајева користе као секундарна стартер култура, како би се побољшала органолептика производа или олакшао раст других микроорганизама. Квасци се природно налазе на кожи животиња, са које се у процесу клања лако преносе на свеже месо (Cocolin et al., 2006). У месо и производима од меса, квасци имају важан утицај на развој сензорике, који се огледа кроз смањење киселости производа и развојем специфичне ароме услед липолитичке активности. Бројност квасаца у току ферментације је низак, док у фази сазревања меса њихова бројност се брзо повећава (Cocolin et al., 2006). Интеракције између квасца и БМК у каснијим фазама сазревања производа изгледају синергистички, јер обе популације опстају у великом броју, без ефекта инхибиције (Cocolin et al., 2006). Током производње и зрења суве шунке из Парме (јужна Италија) одређен је број квасаца до $10^5 - 10^7$ CFU/g (Simoncini et al., 2007). Број квасаца изолованих из италијанске саламе „Ciauscolo“ која се производи у централној Италији, варирао је у опсегу 3,10 – 5,89 log CFU /g, достижући максималну бројност након 30 дана (Belleggia et al., 2020).

Најчешће присутни квасци у производима од меса су *Candida utilis* и врсте из рода *Debaryomyces*. Ови квасци током свог метаболизма доприносе продукцији одређених испарљивих компоненти који утичу на арому (Olesen & Stahnke, 2000; Flores et al., 2004). Cocolin et al. (2006) истичу доминацију *Debaryomyces hansennii*, коју су пратиле врсте: *Candida zeylanoides*, *Pichia triangularis* и *Metschnikowia pulcherrima*. Према Rantsiou & Cocolin (2006) у процесу ферментације меса поред *D. hansennii*, могу бити присутни у мањем броју и родови *Candida*, *Rhodotorula*, *Hansenula*, *Yarrowia*, *Torulopsis*, *Trichosporon* и *Cryptococcus*.

D. hansennii представља квасац који се често изолује из ферментисаних сувомеснатих производа. Cano-García et al. (2014) у свом раду о ферментисаним кобасицама су указали да изоловани сојеви *D. hansennii* поседују изузетну липолитичку активност, при чему је у моделу ферментисаних кобасица забележена велика количина

естарских једињења. Систем модела меса био је користан за показивање способности сојева *D. hansenii* да производе ароматична једињења која утичу на сензорне особине производа (Cano-García et al. 2014). У процесу сазревања италијанске кобасице, сојеви *D. hansenii* изоловани у првим фазама процеса су се разликовали од сојева изолованих у завршним фазама са истакнутим гентским разликама између две популације. Ово је халотолерантна и ацидотолерантна врста квасца која захтева супstrate са ниском активношћу воде (Cocolin et al., 2006).

Плесни

Плесни су микроорганизми који су се вековима користили у ферментацији меса. Многи традиционални ферментациони процеси који обухватају ферментацију плеснима заснивају се на инокулацији кућном флором плесни, контаминацијом након клања из ваздуха, из воде, са опреме у којој се изводи ферментација и зрење производа (Соок, 1995).

Плесни утичу на квалитет производа од меса и могу бити одговорни за формирање специфичног укуса и ароме сушеног меса (Ludemann et al., 2004). Услови средине могу убрзати развој доминантних врста плесни (Scolari et al., 2003). Допринос плесни у ферментацији меса се огледа у оксидацији лактата, протеолизи, деградацији аминокиселина, липолизи, липооксидацији, спречавању ужеглости и смањењу губитка влаге услед споријег испаравања (Sunesen & Stahnke, 2003; Sunesen et al., 2004). Протеолитичке промене које се јављају у месу под утицајем плесни, могу довести до повећања количине аминокиселина у слободном облику, који служе као прекурсори испарљивих једињења (Martín et al., 2004). Код неких сувомеснатих производа пожељан је раст плесни на површини производа, и оне се често додају као стартери у производњи (Canel et al., 2013). Martín et al. (2006) су указали да је бројност плесни на површини шунке инокулисана врстом *P. chrysogenum* Pg222 након 6 месеци сазревања била $5,1 \log \text{cfu/cm}^2$, док је на контролним узорцима број изолованих плесни износио $2,0 \log \text{cfu/cm}^2$. У ферментацији традиционалне кобасице „salchichón” промена броја инокулисаних плесни *P. nalgiovense* у производу је била идентична броју плесни изолованих из неинокулисаних производа, и имала је вредност већу од $6,0 \log \text{cfu/cm}^2$ (Bernáldez et al., 2013).

Развој површинске микобиоте на месним прерађевинама се јавља у различитим фазама производње и само под повољним условима (Chávez et al., 2011). Ови услови се разликују за сваку врсту плесни, и њихова прилагодљивост одређује способност колонизације. Раст плесни на површини сувомеснатих производа је резултат њихове добре толеранције на ниске рН вредности и високе концентрације соли производа. Површински раст плесни на сушеном месу је уобичајан начин производње месних прерађевина у појединим деловима Мађарске, Румуније, Бугарске, Француске, Швајцарске, Аустрије, Италије и Шпаније, чинећи на тај начин аутохтону микробиоту производа повезану са географским подручјем (Соок, 1995; Sunesen & Stahnke, 2003). Површинску микобиоту најчешће чине плесни из родова *Penicillium* spp., (*Penicillium nalgiovense*, *Penicillium solitum*, *Penicillium crustosum* и *Penicillium chrysogenum*), *Eurotium* spp., *Aspergillus* spp. и *Cladosporium* spp. (Sonjak et al., 2011; Asefa et al., 2010).

Плесни из рода *Cladosporium* имају ГРАС статус пошто доказано инхибирају токсигене гљивице попут *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* и *Fusarium verticillioides* (Belleggia et al., 2020). Према Pitt & Hocking (2009) у узорцима сушеног говеђег меса врсте *Eurotium* су биле најчешће гљивице кварења, али и *Aspergillus candidus*, рок трајања сувомеснатих производа диктира њихова водена активност, мада постоји додатни фактор кварења услед ужеглости масти, што је изазвано растом

плесни током сушење и складиштења. Неки сојеви из рода *Penicillium* укључени у ферментацију меса могу произвести микотоксине, секундарне метаболите, који имају токсичне ефекате на људе и животиње, док други сојеви могу бити произвођачи пеницилина (Asefa et al., 2010; Sunesen & Stahnke, 2003).

Penicillium spp. је један од економски најважнијих родова међу плеснима (Silva et al., 2018). Врсте рода *Penicillium* су јако распрострањене и у погледу исхране ове плесни су незахтевне могу да расту у скоро сваком окружењу. Познато је да *Penicillium* spp. кваре храну, производе микотоксине и често се јављају као узрочници болести код људи и животиња. Репродуктивна структура *Penicillium* је карактеристична и одређује примарну таксономску поделу рода у подродове (Pitt & Hocking, 2009).

Плесни овог рода продукују велики броја сувих конидиоспора које су сиво-зелене до плаво зелене боје, мада постоје изузеци. Врста *Penicillium camemberti*, формира беле конидиоспоре, док су конидиоспоре врсте *Penicillium humuli*, изразито смеђе боје (Pitt & Hocking, 2009). *Penicillium* spp. се повезују са продукцијом β -лактамских антибиотика. Laich et al. (2003) истичу да је врста *Penicillium nalgiovense* најприсутнија у сувомеснатим производима, данас се ова плесан користи и као стартер за сушено и ферментисано месо. Конидије *P. nalgiovense* се наносе на површини производа на почетку процеса зрења што даје бели изглед и карактеристичан мирис и укус ферментисаним месним производима. Laich et al. (2003) су указали да процес димљења производа нема превентивну улогу на раст ове врсте. Такође су доказали да ова гљива може излучити пеницилин у месном производу при чему висока концентрација соли није ограничавајући фактор за производњу пеницилина.

2.2. Пробиотици, пребиотици и синбиотици

Конзумација пробиотика, пребиотика и синбиотика у основи има исти циљ, а то је побољшање здравља конзумента услед модулације цревне микрофлоре која настаје специфичним механизмима деловања. У даљем тексту је дат приказ на који начин пробиотици, пребиотици и синбиотици утичу на здравље конзумента.

2.2.1. Пробиотици

Термин "пробиотик" потиче од грчке речи „*pro bos*“, што значи "за живот", а употреба пробиотика датира још из најранијег периода људског друштва. Благотворно деловање бактерија на здравље човека први пут се помиње у персијској верзији Старог Завета (Rijkers et al., 2010), а први записи о употреби пића која садрже бактерије стари су преко 2000 година (Gibson, 2004). На могућност употребе пробиотика у лечењу деце први је указао француски педијатар Хенри Тисер (Henri Tissier), који је 1899. године први пут изоловао *Bifidobacterium* sp. (Stanton et al., 2005). Начин деловања пробиотика је први описао руски микробиолог и добитник Нобелове награде за медицину, Иља Мечников (1845-1916), који је указао на благотворно дејство *Lactobacillus bulgaricus*, бактерије изоловане из ферментисаних млечних производа са територије Бугарске, за које је сматрао да су узрок дуговечности бугарских пољопривредника. Мечникова главна идеја је била да употреба живих микроорганизама, који мењају и стабилизују остатак цревне микробиоте, постиже побољшање здравственог стања домаћина (Azizpour et al., 2009). Јапански микробиолог Минору Широа (Minoru Shirota) је први званично употребио пробиотике 1935. године. Он је изоловао *Lactobacillus casei shirota*, сој „добрих“ бактерија које су након ингестије успеле да живе доспеју до

црева, и тако постале први пробиотски сој који се користио у комерцијалне сврхе (Heasman & Mellentin, 2001).

Термин ”пробиотик” у контексту у којем се данас користи у употреби је од 1974. године, када је Кифер (Kiefer) дефинисао пробиотике као организме и супстанце које регулишу баланс цревне микрофлоре (Rogelj, 1994). Данас се пробиотици дефинишу као живи микроорганизми који, када се примењују у адекватним дозама, доприносе здравственом бенефиту конзумента (Hill et al., 2014). Обично се конзумирају као додатци у исхрани и садрже вијабилну, непатогену врсту микроорганизма или мешавину микроорганизама, који показују способност интеракције са гастроинтестиналном микробиотом и утицај на имуни систем (Kook et al., 2019).

Микроорганизми са пробиотским особинама се сада користи не само у храни, већ и у пољопривреди и медицини (Makinen et al., 2012). Неопходно је нагласити да је превентивна улога пробиотика много важнија од терапијске. Благотворни ефекат пробиотских бактерија је вишеструк и огледа се кроз одржавање нормалне микробиоте ГИТ-а, кроз имуностимулацију као и кроз побољшање нутритивне вредности хране. Извор пробиотских сојева може бити различит и они могу бити изоловани из људског организма (дебело црево, танко црево или мајчино млеко), хране животињског порекла (сирово млеко и месо), ферментисане хране или других извора. Истраживање на пољу потенцијалних пробиотика је врло сложено и дуготрајно, а подразумева да се увек говори о живим микроорганизмима (Grujović et al., 2022).

Потенцијални пробиотик треба да покаже метаболичку активност која промовише здравље конзумента и способност да колонизује ГИТ. Безбедност и функционална својства сојева, као што су антимикуробна резистенција и адхезија на ћелије цревне слузокоже, као и могућност имуномодулације, веома су важни параметри за избор потенцијалних пробиотика и треба их проучавати коришћењем поузданих *in vitro* метода скрининга (Kook et al., 2019; Grujović et al., 2022).

Избор микроорганизма који ће се користити у храни захтева приступ међународним базама података у којима се наводе безбедни микроорганизми. Овај концепт, познат као „GRAS“ у Сједињеним Америчким државама или КПС (енгл. *QPS-Qualified Presumption of Safety*) је фундаменталан током рада у науци о храни (Grujović et al., 2022).

Што се тиче Европе, микроорганизам мора испунити следеће критеријуме да би добио статус КПС:

- 1) његов таксономски идентитет мора бити добро дефинисан;
- 2) расположиво знање мора бити довољно да се утврди његова безбедност;
- 3) недостатак патогених својстава мора бити утврђен;
- 4) његова предвиђена употреба мора бити јасно описана (EFSA, 2020).

Истраживање безбедносног аспекта потенцијалног пробиотика мора укључити процену способности врсте/соја да синтетише екстрацелуларне протеинске токсине и резистенцију на антимикуробне лекове, како на фенотипском тако и на генотипском нивоу (Grujović et al., 2022). Најчешћи екстрацелуларни протеински токсин који се испитује је из породице хемолизина. Ови токсини изазивају оштећење различитих ћелијских елемената, посебно лизу еритроцита и ослобађање хемоглобина. Способност хемолизе на плочи са крвним агаром је критеријум који се односи на безбедносни аспект потенцијалног пробиотског соја (Yasmin et al., 2020). Европска агенција за безбедност хране (EFSA) успоставила је ажуриране смернице за процену

антимикробне резистенције (EFSA, 2018). Одређивање профила антимикробне резистенције заснива се на:

- 1) фенотипском тестирању и одређивању минималних инхибиторних концентрација (МИК),
- 2) секвенцирању целог генома, уз анализу и хромозомских и екстрахромозомских генетских елемената за детекцију познатих одредница антимикробне резистенције (AMP).

Сојеви бактерија који носе мобилне генетичке елементе који кодирају отпорност на антибиотике не би требало да се користе у људској или животињској исхрани, нити као пробиотици (EFSA, 2018). Такође, неки сојеви БМК синтетишу декарбоксилазе које производе биогене аminer из доступних аминокиселина, што је такође негативна карактеристика (Alfaia et al., 2018).

Процена пробиотског потенцијала соја се састоји од *in vitro* и *in vivo* истраживања. *In vitro* испитивање треба да пружи основна сазнања о пробиотском соју и његовом механизму деловања и служи да се установе потенцијални благотворни ефекти на здравље конзумента. Такође је важно у овом кораку извршити процену безбедности потенцијалног пробиотског соја. Тестови *in vivo* се често врше на лабораторијским животињама, а затим се добијени резултати додатно потврђују у клиничким испитивањима на људима. Када су у питању *in vivo* тестови на људима, неопходно је урадити плацебо контролисане студије са довољним бројем испитаника да би се обезбедила статистичка значајност (Andersson et al., 2001). Према Radulović et al. (2012), критеријуми који су кључни за одабир пробиотских сојева су следећи:

- 1) толеранција на ниску рН, присуство пепсина, панкреатина и жучних соли,
- 2) способност адхезије за интестиналне ћелије и колонизација ГИТ-а човека,
- 3) способност супресије раста патогена услед производње антимикробних супстанци и колонизације црева,
- 4) продукција пожељних метаболичких продуката,
- 5) процена безбедности,
- 6) преживљавање услова различитих технолошких поступака у производњи хране,
- 7) клинички потврђен позитиван утицај на здравље.

Међународна млекарска федерација (*The International Dairy Federation*) препоручила је да пробиотска млечна храна треба да садржи најмање 10^6 до 10^7 CFU/ml пробиотика у време конзумирања, како би се гарантовали одговарајући корисни ефекти (Halim et al., 2017). Препоручује се да пробиотска храна која није на бази млека садржи између 10^4 и 10^{10} CFU/ml или CFU/g пробиотика, у зависности од врсте производа (Ranadheera et al., 2017). Одрживост микроорганизама током прераде и складиштења има важну улогу у одржавању здравствених својстава. Ефекат пробиотика на људско здравље зависи од соја, дозе и компоненти које се користе за производњу датог пробиотског производа (Grujović et al., 2022). Иако пробиотичке бактерије обично имају благотворно дејство на пробавни систем, у случају предозирања или употребе од стране имунокомпромитованих појединаца, може доћи до појаве инфекције. Обзиром на постојање извештаја о штетним ефектима пробиотика, неопходно је у потпуности истражити и разумети њихове механизме деловања и интеракцију са микробиотом домаћина пре употребе (Markowiak & Śliżewska, 2017; Grujović et al., 2022).

2.2.2. Пребиотици

Пребиотици су недавно дефинисани као супстрати које микробиота домаћина селективно користи са корисним здравственим ефектима (Gibson et al., 2017). Ова комбинација обезбеђује опстанак пробиотика у цревима и олакшава њихов транзит у дебело црево, али и стимулацију раста и активност пробиотика у цревној микробиоти. Пребиотике чине дијетална влакна или угљени хидрати који нису сварљиви у танком и дебелом цреву (фруктоолигосахариде, инулин, лактозу, лактитол, малтоолигосахариде, ксилоолигосахариде, сахарозу, мелитрозу и други) (Grujović et al., 2020; 2022).

Први пребиотици који се уносе у организам су пре свих олигосахарида мајчиног млека, који имају важну улогу у развоју здравог имуног система беба и селективно промовишу *in vitro* раст и активност бифидобактерија (Anandharaj et al., 2014). Фруктоолигосахариди (ФОС) су пребиотици који такође стимулишу раст бифидобактерија (које постају доминантне у људским фекалијама после кратког времена конзумирања) утичу на метаболизам липида највероватније путем ферментације хране (Grujović et al., 2020). Неки пребиотици могу смањити раст појединих патогена. На пример, целобиоза може ублажити раст *Listeria monocitogenes* (Lenoir-Wijnkoop et al., 2007).

Ефекат инулина и ФОС утиче на апсорпцију хранљивих састојака, нарочито угљених хидрата, док утицај на ниво глукозе у крви и инсулина није дефинитивно разјашњен при чему постоје значајне контрадикторности, што указује да ови ефекти зависе од физиолошког стања или присуства дијабетеса (Flesch et al., 2014). Показало се да употреба аутохтоних БМК као пробиотика заједно са пребиотцима, као што је инулин, има утицај на сензорну анализу. Инулин се често користи као пребиотик, такође због своје добро познате улоге која утиче на укус, текстуру и влагу у многим намирницама (Shirrangama et al., 2022).

2.2.3. Синбиотици

Синбиотици се дефинишу као производи који истовремено садрже пробиотик и пребиотик. Већина традиционалних ферментисаних намирница, као што су ферментисане каше на бази житарица, пића, ферментисано воће и поврће (укључујући корење или кртоле), ферментисани млечни производи и ферментисани производи од меса, савршено се уклапају у дефиницију синбиотика, јер садрже остатке полисахарида који се не варе у желудцу али и БМК, које су одговорне за ферментацију и здравствени бенефит овакве хране. Стога, употреба природних пробиотика нуди иновативан приступ за развој формулација које се примењују као функционална храна (Mokoena et al., 2016).

Здравствени бенефити услед конзумације функционалне хране која садржи пробиотске микроорганизме и пребиотике су бројне. Сојеви који толеришу киселу средину и присуство жучних соли обично показују способност декоњугације жучи преко ензима хидролазе жучне соли, што се повезује са смањењем нивоа холестерола у серуму у организму домаћина (Leeuwendaal et al., 2021). Присуство пробиотика у ферментисаној храни такође доприноси нормалном функционисању ГИТ-а (Leeuwendaal et al., 2021), антивирусној активности (Whaling et al., 2012), антитуморским својствима (Aragón et al., 2014) и многим другим здравственим бенефитима (Mokoena et al., 2016).

2.3. Бактерије млечне киселине као пробиотици

Бактерије млечне киселине су микроорганизми који се најчешће користе као пробиотици (Shokryazdan et al., 2014). Међутим, иако већина БМК има ГРАС статус, добро је познато да неке БМК (укључујући *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG (предходно класификован као *Lactobacillus rhamnosus* GG)) могу деловати као инфективни микроорганизми, посебно код особа са ослабљеним имунитетом (Kochan et al., 2011). Осим БМК, као пробиотици се користе одређени бактеријски сојеви врсте *Escherichia coli* и неколико врста из рода *Bacillus*, као и сојеви квасца *Saccharomyces cerevisiae* (Song et al., 2012; Grujović et al., 2022). Употреба ентерокока као пробиотика је контраверзно питање из много разлога. Ипак, различити сојеви ентерокока се користе као пробиотици у Европи. Успешни комерцијални примери који долазе из различитих земаља укључују Линекс (ЛЕК, Словенија), Симбиофлор® (Симбиофарм, Немачка) и Ламиналакт (Авена, Русија) (Suvorov, 2020). *E. faecalis* (Симбиофлор®) се продаје као фармацеутски пробиотик више од 50 година, без икаквих извештаја или документације о инфекцијама или нежељеним ефектима (Vaccour et al., 2019).

Благотворни ефекат пробиотских БМК огледа се кроз одржавање нормалне микробиоте ГИТ-а, кроз имуностимулацију као и кроз побољшање нутритивне вредности хране. Изолати БМК из аутохтоне хране се данас истражују на пољу потенцијалних пробиотских култура са добрим технолошким особинама (Grujović et al., 2022).

Пробиотске карактеристике врста из фамилије Lactobacillaceae су доста истражене и велики број врста/сојева из ове фамилије се већ користи. Њихови здравствени бенефити су дефинисани клиничким подацима и указују на утицај у превенцији и третману дијареје, спречавању системских инфекција, превенцији и лечењу алергија, третману повишеног холестерола, ублажавање ефеката код интолеранције на лактозу као и антиканцерогеним ефектима (Mokoena et al., 2016).

2.3.1. Антимикробни потенцијал бактерија млечне киселине

Продукција антимикробних једињења је део сложеног метаболичког механизма који се кроз еволуцију БМК развијао као последица живота са другим бактеријским врстама. Главна метаболичка особина БМК је производња млечне киселине ферментацијом угљених хидрата, што је процес познат као ацидификација хране или процес примарног закишељавања (Vintsis, 2018a, 2018b). Киселина коју продукују БМК ствара стресне услове за патогене микроорганизме или микроорганизме узрочнике кварења хране услед смањења рН вредности, чиме се продужава безбедно складиштење финалних производа (Paradimitriou et al., 2016). С друге стране, рН од 5,1 до 5,3 има позитиван ефекат на влажност ферментисаних намирница, јер ниска рН доводи до смањеног задржавања воде, па се процеси сазревања убрзавају (Todorov et al., 2017).

Поред млечне киселине, хетероферентативне БМК кроз ферментацију продукују и друге органске киселине (сирћетну, проприонску, и др.), али и угљен-диоксид, водоник-пероксид, диацетил и бактериоцине. Метаболички производи БМК са антимикробним дејством се акумулирају у медијуму за раст у количинама које зависе од врсте БМК које их продукује и хемијског састава супстрата (Šuškić et al., 2001).

Акумулацију млечне киселине прати смањење рН вредности средине, што доводи до инхибиције раста широког спектра Грам-позитивних и Грам-негативних

бактерија. Naidu et al. (1999) су указали да сирћетна киселина доводи до већег смањења рН средине од млечне киселине и показује веће антимикробно деловање. Млечна и сирћетна киселина продиру кроз ћелијску мембрану бактерија у свом недисосованом облику и тако доводе до инхибиције раста других микроорганизама у окружењу (Naidu et al., 1999).

Антимикробни ефекат водоник-пероксида (H_2O_2) настаје услед његовог снажног оксидативног деловања на ћелије бактерија. На тај начин, долази до денатурације бројних ћелијских ензима, протеина и мембранских липида чиме се повећава пермеабилност ћелијске мембране. Водоник-пероксид може бити и прекурсор за производњу слободних радикала, који могу оштетити ДНК и тако проузроковати инхибицију раста многих патогена (Kong & Davison, 1980; Grujović, 2019).

Угљен-диоксид продукују хетероферментативне БМК. Његова продукција доводи до стварања анаеробних услова за раст, што инхибира раст аеробних микроорганизама. Такође може да инхибира ензимску декарбоксилацију и омогући накупљање гасова у липидном двослоју ћелијских мембрана, који ремете дифузност мембране (Eklund, 1984; Grujović, 2019).

Диацетил настаје као крајњи производ у метаболизму цитрата код појединих врста БМК. Дијацетил инхибира раст Грам-негативних бактерија ступајући у реакцију са протеином који веже аргинин, што утиче на искоришћење аргинина (Grujović, 2019).

Бактериоцини су антимикробни пептиди или протеини, који толеришу посттранслационе модификације, и показују способност да инхибирају раст друге бактеријске врсте (Alvarez et al., 2011). Бактериоцини које продукују БМК имају широк спектар деловања против Грам-позитивних и Грам-негативних бактерија (Кешка et al., 2017). Механизам деловања бактериоцина се углавном своди на деполаризацију и утицај на пермеабилност ћелијске мембране услед формирањем пора, што доводи до брзог излучивања једињења мале молекулске масе из ћелије (Кешка et al., 2017).

Због све већег броја окарактерисаних бактериоцина, њихова класификација је склона променама. Према Grujović et al. (2022), бактериоцини се могу сврстати у три класе:

- 1) Бактериоцини класе I - посттранслационо модификовани пептиди или лантибиотици са мање од 28 аминокиселина мали мембрански активни пептиди (<5 kDa), линеарни или глобуларни пептиди који садрже лантионин, β -метил лантионин и дехидро-амино киселине. Пептиди са линеарном структуром нарушавају интегритет ћелијске мембране а они са глобуларном структуром функционишу као ензими. Бактериоцини класе I се даље деле на:
 - ✓ Подкласа Ia - лантибиотике, као што је линеарни пептид низин (продукује га *Lactococcus lactis*)
 - ✓ Подкласа Ib – лабиринтопептиди, као што је глобуларни пептид мерсацидин (продукује га *Bacillus* sp.)
 - ✓ Подкласа Ic – саркобиотици, као што је глобуларни пептид субтилозин А (кога продукује *Bacillus subtilis*)
- 2) Бактериоцини класе II - имају 30–60 аминокиселина, мале су молекулске тежине (<10 kDa), показују јединствена својства топлотне толеранциј и позитивног су наелектрисања. Бактериоцини класе II су подељени у четири подкласе:
 - ✓ Подкласа IIa – бактериоцини слични педиоцину. Представник је педиоцин ПА (продукује га *Pediococcus acidilactici*)
 - ✓ Подкласа IIb – двопептидни бактериоцини, захтевају синергију два комплементарна пептида. Представник је лактацин Ф (продукује га *Lactobacillus acidophilus*)

- ✓ Подкласа Пц – циркуларни катјонски пептиди, термостабилни, не подлежу протеолитичкој деградацији и показују антилистеријску активност. Представник је лактокоцин Б (продукује га *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*)
 - ✓ Подкласа Пд - линеарни бактериоцини који нису слични педиоцину, појединачни пептиди. Представник је леукоцин Б (продукује га *Leuconostoc pseudomesenteroides*).
- 3) Бактериоцини класе III - (бактериолозини) су термонестабилни пептиди велике молекуларне масе (>30 kDa). Деле се у две подкласе:
- ✓ Подкласа IIIа - Бактериолотички бактериоцини. Представник је лизостафин (продукује га *Staphylococcus simulans* subsp. *staphylolyticus*).
 - ✓ Подкласа IIIб – Небактериолотички бактериоцини, осетљиви на протеолитичке ензиме и на високу температуру. Представник је хелветицин J (продукује га *Lactobacillus helveticus*)

Поред наведених група бактериоцина, описана је нова класа антимикробних пептида, бактериолизини. Они су описани као хидролитички полипептиди (Güllüce et al., 2013). Гликоцин Ф је најпроучаванији бактериолизин, продукује га *Lactiplantibacillus plantarum* и показује бактерицидно дејство против широког спектра Грам-позитивних бактерија (Amso et al., 2018).

Познато је да се бактериоцини користе у биоконзервацији хране. Најчешће коришћени бактериоцини су низин, педиоцин и сакацин (Abriouel et al., 2011; Alvarez-Sieiro et al., 2016). Бактериоцини имају својства која су од значаја за медицинску употребу:

- ✓ испољавају добру активност у ниским концентрацијама и
- ✓ показују специфичне механизме деловања и високо специфичну активност, што су показала *in vivo* истраживања.

Неки бактериоцини су већ достигли стадијум клиничких испитивања. Међутим, упркос њиховом потенцијалу, постоје нека ограничења као што су биорасположивост, стабилност, растворљивост у физиолошким условима, осетљивост на протеолитичке ензиме, високи трошкови производње и недостатак процене цитотоксичности, која ограничавају експлоатацију бактериоцина за клиничке студије и њихову комерцијалну употребу у будућности. Сматра се да би примена биоинжењеринга могла довести до побољшања физичко-хемијских и биолошких карактеристика бактериоцина (Soltani et al., 2021).

Традиционално ферментисана храна је природни извор аутохтоних микроорганизама који имају мултифункционалну улогу у ферментацији хране, повезану углавном са безбедношћу и метаболичким карактеристикама, као што су производња киселине и бактериоцина. Због таквих особина, ови аутохтони сојеви доприносе побољшању рока трајања производа, успостављању специфичних/карактеристичних органолептичких карактеристика, и извор су потенцијалних пробиотских особина. Имајући у виду да аутохтона заједница микроорганизама у сјеничкој овчијој стељи до сада није истражена и да се о њој мало зна, постоји потреба за интензивирањем истраживања о својствима ове групе бактерија, јер могу поседовати особине значајне за прехранбену биотехнологију или потенцијалну примену изолата као пробиотика.

3. ЦИЉЕВИ РАДА

Циљ истраживања ове докторске дисертације је да се у условима *in vitro* утврди квалитативни и квантитативни састав микробиоте аутохтоног ферментисаног производа сјеничка овчија стеља, изврши евалуација њихових биохемијских и физиолошких карактеристика и процене њихови биотички потенцијали. Из дефинисаног општег циља, произилазе посебни циљеви, а то је да се:

- Испита хемијски састав аутохтоног производа сјеничка овчија стеља.
- Испита сензорни квалитет производа.
- Испита квалитативни и квантитативни састав микробиоте сјеничке овчије стеље.
- Изврши карактеризација и идентификација доминантне микробиоте са посебним аспектом на бактерије млечне киселине (БМК), коагулаза-негативне стафилококе (КНС) и плесни.
- Изврши упоредна анализа традиционално ферментисаног производа сјеничка овчија стеља узоркованог у три различита домаћинства из три различите производне сезоне. Хемијски, сензорни и микробиолошки параметри ће се пратити кроз процес сазревања производа.
- Испитају технолошке особине аутохтоних изолата из сјеничке овчије стеље.
- Испита антимикуробна способност изолата БМК и КНС у односу на одабране патогене и стабилност продукованих антимикуробних једињења у односу на промену температуре, рН, утицаја ензима и хемијских једињења.
- Испита пробиотски потенцијал одабраних изолата БМК. Добијени подаци ће указати на потенцијал аутохтоних изолата за употребу као стартер култура или пробиотка, али и на могућност коришћења у биоконзервацији ферментисане хране.

4. МАТЕРИЈАЛ

4.1. Аутохтони ферментисани производ сјеничка овчија стеља

Пештерска висораван је препознатљива по аутохтоном ферментисаном производу сјеничка овчија стеља, у чијој производњи се као сировина користе јалове овце и товљени мушки кастрати, аутохтоне врсте животиња Сјеничко пештерска праменка. У домаћинствима око Сјенице (Блато - А, Крајиновиће - Б и Расно - В) након операције на линији клања и примарне обраде и хлађења (4°C током 24 сата), откоштавање трупова се спроводи у целисти (осим унутрашњег дела бута-шола) и са изузетком дисталних делова костију коленице и подлактице (*Os tibia* и *Os fibula*) у дужини до 5 cm. Производ се усољава сувим поступком, при чему се месо посипа чистом кухињском соли у количини од 3 - 3,5%, со се утрљава руком у месо и оставља на пресољавање 5-8 дана на температури од 4°C - 7°C, и релативној влажности RH 80 - 90%, где долази до издвајања месног сока који скоро у потпуности прекрива комаде меса.

Пре процеса димљења, осољени трупови се одсољавају, што подразумева одстрањивање сувишних количина соли се површине трупова. Одсољени трупови се каче на штапове и уносе у просторији са добром циркулацијом ваздуха и цеде 2-3 сата, или се поступак убрзава брисањем чистим крпама. Процес димљења се спроводи коришћењем хладног буковог дима у температурном опсегу од 16°C - 18°C и влажности од RH 65-80%, у трајању од 15 дана. Током процеса димљења важно је да се трупови који висе не додирују како би се равномерно димили. Процес сушења стеље се изводи на температури од 4°C - 10°C и влажности од RH 60-70%, у зависности од временских услова. Период зрења овчије стеље траје најмање 5 до 6 месеци. Најбољи квалитет сјеничке овчије стеље постиже се након 10 - 12 месеци.

4.2. Микробиолошке подлоге

За потребе истраживања ове дисертације су коришћене дехидратисане подлоге (Торлак, Београд, Србија; Merck GmbH, Darmstadt, Germany; Himedia, Mumbai, India; Oxoid, Hampshire, United Kingdom), које су према инструкцијама произвођача растваране у дестилованој води (dH₂O). Након растварања, проверавана је рН сваке подлоге и вршена је стерилизација подлога на 121°C при притиску од 1,5 bar-a, у трајању од 15-20 минута.

Подлога за укупан број бактерија (Торлак, Београд, Србија); рН 7,0 ± 0,2; подлога за култивацију бактерија и бројање аеробних мезофилних микроорганизама

- Пептон од казеина Торлак 5,0 g
- Екстракт квасца 2,5 g
- Декстрога 1,0 g
- Агар 15,0 g
- H₂O 1000 mL

Хранљиви агар (Торлак, Београд, Србија); рН 7,3 ± 0,2; подлога за диференцијацију бактерија

- Пептон Торлак 15,0 g
- Месни екстракт 3,0 g

- Натријум-хлорид 5,0 g
- Калијум-хидрогенофосфат 0,3 g
- Агар 18,0 g
- H₂O 1000 mL

MRS бујон (Торлак, Београд, Србија); рН 6,4 ± 0,2; подлога за култивисање и умножавање *Lactobacillus* spp.

- Пепрон Торлак 10,0 g
- Месни екстракт 10,0 g
- Екстракт квасца 5,0 g
- Декстрога 20,0 g
- Калијум-хидрогенофосфат 2,0 g
- Натријум-хлорид 5,0 g
- Натријум-ацетат 2,5 g
- Магнезијум-сулфат 1,1 g
- Манган-сулфат 0,2 g
- H₂O 1000 mL

MRS агар (Торлак, Београд, Србија); рН 6,4 ± 0,2; подлога за изоловање и одржавање *Lactobacillus* spp.

- Пепрон Торлак 10,0 g
- Месни екстракт 10,0 g
- Екстракт квасца 5,0 g
- Декстрога 20,0 g
- Калијум-хидрогенофосфат 2,0 g
- Натријум-хлорид 5,0 g
- Натријум-ацетат 2,5 g
- Магнезијум-сулфат 1,1 g
- Манган-сулфат 0,2 g
- Агар 12,0 g
- H₂O 1000 mL

Ескулин жучни агар или Рошера (Rochaix) подлога (Торлак, Београд, Србија); рН 7,1 ± 0,2; подлога за идентификацију ентерокока

- Пептон Торлак 10,0 g
- Говеђа жуч 20,0 g
- Ескулин 1,0 g
- Гвожђе (III)-амонијумцитрат 1,0 g
- Агар 16,0 g
- H₂O 1000 mL

Љубичастоцрвени жучни (VRB) агар (Торлак, Београд, Србија); рН 7,4 ± 0,2; подлога за детекцију и изоловање ентеробактерија

- Пептон Торлак 7,0 g
- Екстракт квасца 3,0 g
- Жучне соли бр. 3 1,5 g
- Лактоза 10,0 g
- Натријум-хлорид 5,0 g

- Агар 15,0 g
- Неутрално црвено 0,03 g
- Кристал виолет 0,002 g
- H₂O 1000 mL

Пептонска вода (Торлак, Београд, Србија); рН 7,5 ± 0,2 подлога за обогаћење

- Пептон Торлак 10,0 g
- Натријум хлорид 5,0 g
- H₂O 1000 mL

Ксилоза лизин дезоксихолат (XLD) агар (HiMedia, Mumbai, Indija); рН 7,4 ± 0,2; подлога за изоловање *Salmonella* spp.

- Екстракт квасца 3,0 g
- Л-лизин 5,0 g
- Лактоза 7,5 g
- Сахароза 7,5 g
- Ксилосе 3,5 g
- Натријум хлорид 5,0 g
- Натријум деоксихолат 2,5 g
- Натријум тиосулфат 6,8 g
- Гвожђе амонијум цитрат 0,8 g
- Фенолно црвено 0,08 g
- Агар 15,0 g
- H₂O 1000 mL

Брилијант зелени агар (Торлак, Београд, Србија); рН 6,9 ± 0,2; селективна подлога за изоловање *Salmonella* spp.

- Пептон Торлак 13,0 g
- Екстракт квасца 3,0 g
- Лактоза 10,0 g
- Сахароза 10,0 g
- Натријум-хлорид 5,0 g
- Агар 15,0 g
- Фенол црвено 0,08 g
- Брилијант зелено 0,0125 g
- H₂O 1000 mL

Листериа Фрасер бујон (Titan Biotech L, Delhi, Indija); рН 7,2 ± 0,2; подлога за детекцију *Listeria* spp.

- Пептон 5,00 g
- Триптон 5,0 g
- Говеђи екстракт 5,0 g
- Екстракт квасца 5,0 g
- Натријум хлорид 20,0 g
- Дехидрирани динатријум хидрогено фосфат 9,5 g
- Калијум дихидрогено фосфат 1,35 g
- Ескулин 1,0 g
- Литијум хлорид 3,0 g

- Акрифлавин HCl 0,025 g
- Налидиксична киселина 0,02 g
- H₂O 1000 mL

Листериа агар (Agar Listeria to Otaviani and Agosti) (Merck, Darmstadt, Germany); pH 7,0 ± 0,5; подлога за изолацију *Listeria monocytogenes*

- Ензими дигестије животињских ткива 18,0 g
- Ензими дигестије казеина 6,0 g
- Екстракт квасца 10,0 g
- Натријум пируват 2,0 g
- Глукоза 2,0 g
- Магнезијум глицерофосфат 1,0 g
- Магнезијум сулфат (безводни) 0,5 g
- Натријум хлорид 5,0 g
- Литијум хлорид 10,0 g
- Динатријум хидрогенфосфат (безводни) 2,5 g
- 5-бромо-4 хлоро-3-индолил-β-Д-глукопиранозид 0,05 g
- Агар 13,5 g
- H₂O 1000 mL

Pseudomonas агар база (HiMedia, Mumbai, Indija); pH 7,1 ± 0,2; подлога за изолацију бактерија из фамилије Pseudomonadaceae.

- Триптон 10,0 g
- Желатин пептон 16,0 g
- Калијум сулфат 10,0 g
- Магнезијум хлорид, анхидровани 1,40 g
- Агар 11,0 g
- H₂O 1000 mL

Baird Parker агар (Торлак, Београд, Србија), pH 7,2 ± 0,2; подлога за изолацију и диференцијацију стафилокока.

- Пептон од казеина Торлак 10,0 g
- Месни екстракт 5,0 g
- Екстракт квасца 1,0 g
- Глицин 12,0 g
- Натријум-пируват 10,0 g
- Литјум-хлорид 5,0 g
- Агар 20,0 g
- H₂O 1000 mL

Крвни агар (Oxoid, Hampshire, United Kingdom); pH 7,4 ± 0,2; подлога за испитивање потенцијалне патогености изолованих бактерија

- Хранљиви супстрат (екстракт срца и пептони) 20,0 g
- Натријум-хлорид 5,0 g
- Агар 15,0 g
- Дефибринисана овчија крв 50 – 80 mL
- H₂O 1000 mL

Шарман-ова подлога (Торлак, Београд, Србија), рН $7,4 \pm 0,2$; подлога за диференцијацију стафилокока.

- Пептон Торлак 10,0 g
- Месни екстракт 1,0 g
- Манитол 10,0 g
- Натријум-хлорид 75,0 g
- Агар 15,0 g
- Фенол црено 0,025 g
- H₂O 1000 mL

Ескулин бујон (Торлак, Београд, Србија); рН $7,5 \pm 0,2$; подлога за детекцију способности ентерокока да хидролизују ескулин

- Хранљиви бујон Торлак 15,0 g
- Ескулин 1,0 g
- Декстрога 1,0 g
- H₂O 1000 mL

Аргинин бујон (Торлак, Београд, Србија); рН $7,5 \pm 0,2$; подлога за детекцију способности хидролизе аргинина

- Триптон Торлак 5,0 g
- Екстракт квасца 5,0 g
- L-аргинин 3,0 g
- Декстрога 0,5 g
- Калијум-хидрогенофосфат 2,0 g
- H₂O 1000 mL

Подлога са обраним млеком рН $6,6 \pm 0,2$; подлога за прелиминарно испитивање протеолитичке активности

- Обрано млеко у праху 44,0 g
- Натријум-цитрат 8,0 g
- Екстракт квасца 1,0 g
- Декстрога 5,0 g
- Агар 15,0 g
- H₂O 1000 mL

Трибутирин агар (Merck, Darmstadt, Germany); рН $7,4 \pm 0,2$; подлога за прелиминарно испитивање липолитичке активности

- Специјални пептон 5,0 g
- Екстракт квасца 3,0 g
- Агар 12,0 g
- H₂O 1000 mL

Сладни екстракт квасац екстракт 50% глукоза агар (MY50G) рН $5,3 \pm 0,2$; подлога за одређивање утицаја активности воде на раст изолованих плесни

- Екстракт слада 10,0 g
- Екстракт квасца 2,5 g
- Агар 10,0 g
- Глукоза 500,0 g

- H₂O до 500,0 mL

Дихлоран 18% глицерол агар (DG18) (HiMedia, Mumbai, Indija); pH 5,6 ± 0,2; подлога за изоловање, култивисање, бројање и одржавање плесни

- Пептон 5,0 g
- Глукоза 10,0 g
- Калијум-хидрогенофосфат 1,0 g
- Магнезијум-сулфат 0,5 g
- Дихлоран (0,2% у етанолу) 1,0 mL
- Глицерол 220,0 g
- Хлорамфеникол 0,1 g
- Агар 15,0 g
- H₂O 1 000 mL

Czapek Yeast Autolysate агар (CYA) (Merck, Darmstadt, Germany); pH 6,0 ± 0,5; подлога за изолацију и бројање плесни

- Натријум-нитрат 3,0 g
- Калијум-хидрогенофосфат 1,0 g
- Калијум хлорид 0,5 g
- Магнезијум-сулфат 0,5 g
- Гвожђе-сулфат 0,01 g
- Екстракт квасца 5,0 g
- Сахароза 30,0 g
- Раствор микроелемента Л 1,0 mL
- Агар 20,0 g
- H₂O 1 000 mL

Сабуро малтозни агар (SMA) (Торлак, Београд, Србија); pH 5,6 ± 0,2; подлога за изолацију и бројање плесни

- Пептон 10,0 g
- Малтоза 40,0 g
- Агар 15,0 g
- H₂O 1000 mL

4.3. Раствори и реагенси

Фосфатни пуфер – PBS (10 ×) (Alfa Aesar GmbH & Co KG, Karlsruhe, Germany); pH 7,4

- Натријум хидрогенофосфат Na₂HPO₄ 80 m M
- Натријум хидрогенофосфат 20 m M
- Натријум хлорид 100 m M

Водоник пероксид (3%) – H₂O₂ (Зорка Шабац, Шабац, Србија)

Тетраметил–П-фенилендиамин -дихидрохлорид (Tokyo Chemical Industry CO, Јапан)

Минерално уље (Галафарм, Скопље, Македонија)

Физиолошки раствор

- Натријум хлорид 8, 9 g
- H₂O 1000 mL

Зечија плазма у ЕДТА (Brain Heart Infusion, Merck, Germany)

7% раствор гвожђе (III)-хлорида – за испитивање способности коришћења ескулина

- Гвожђе (III)-хлорид 7,0 g
- H₂O 100 mL

Фенил црвено, индикатор за испитивање способности коришћења аргинина. Поступак растварања: 0,2 g индикатора фенил црвено се дода у 1 mL етил алкохола уз мешање до потпуног растварања, након чега се додаје дестилована вода до 10 mL раствора. Добро хомогенизирани раствор се чува у тамној стакленој боци до употребе.

AGF (Artificial Gastric Fluid, вештачки желудачни сок, pH 2,0)

- Пепсин 0,22%
- Натријум хлорид 0,5%
- Калијум хлорид 0,7 mM
- Натријум хидрогенкарбонат 0,45 mM
- H₂O 100 mL

AIF (Artificial Intestinal Fluid, вештачки интестинални сок, pH 8,0)

- Панкреатин USP 0,2 %
- Жучне соли 0,4 %
- Натријум хлорид 0,5 %
- H₂O 100 mL

Реагенси за испитивање утицаја ензима, pH, температуре и хемијских једињења на антимикробну активност изолата, као и за кинетику раста и биосинтеза антимикробних једињења.

- 1 N Натријум хидроксид
- 1 N Хлороводонична киселина
- Проназа Е 1 mg/mL
- Протеиназа К 1 mg/mL
- Амилаза 1 mg/mL
- Натријум додецил сулфат (СДС) 1%
- Trypton X-20 1mM 1%
- Trypton X-80 1mM 1%
- Trypton X-100 1mM 1%
- β-меркаптоетанол,
- Етилен-диамин тетра сирћетна киселина (Na-EDTA) 1mM
- Натријум хлорид 6,5%

5. МЕТОДЕ

5.1. Узорковање сјеничке овчије стеље

За потребе експеримента је коришћена сјеничка овчија стеља (Слика 1) произведена у изабраним домаћинствима села Блато (А), Крајиновиће (Б) и Расно (В) са подручја Пештера у три производне сезоне (2016/17 - 1; 2017/18 - 2; 2018/19 - 3) крајем јесењег и почетком пролећног периода. Производ је припреман на исти начин у свим изабраним домаћинствима у којима се стеља традиционално припрема. Узорци овчије стеље, тежине 300 g, узорковани су под асептичним условима, ради утврђивања физичко-хемијских параметара квалитета као и изолације и идентификације аутохтоне микробиоте стеље. За сензорну анализу одабрани су делови трупа у количини од 2000 g. За потреба наведених испитивања узорци су транспортовани мобилним фрижидерима до лабораторије Одсека за пољопривредно-прехранбене студије у Прокупљу, где су чувани на температури од 4°C. Истраживање је спроведено након 24 сата од узорковања („Sl. glasnik RS“, br. 73/2010; Vodić за primenu mikrobioloških kriterijuma za hranu, 2011).



Слика 1. Изглед аутохтоног производа сјеничка овчија стеља (Фото: Т. Ж. П)

5.2. Хемијска анализа сјеничке овчије стеље

Хемијска анализа производа аутохтонох производа је обухватала испитивање рН вредности, испитивање количине воде и активности воде (a_w вредност), количине укупних масти и протеина, соли и пепела.

5.2.1. Испитивање рН вредности

Одређивање рН вредности производа вршено је помоћу преносног рН метра (Testo 150, Немачка) за директно одређивање рН вредност у месо и производима од меса. Калибрација рН метра је спроведена стандардним фосфатним пуферима (рН 4 и 7 на 20°C). Вредност је одређена према референтној методи SRPS ISO 2917 (2004).

5.2.2. Испитивање a_w вредности

Испитивање активности воде (a_w) вршено је помоћу мобилног уређаја a_w – метар (LabSwift – Novasina, Lachen, Switzerland). Одређивање a_w вредности је спроведено уситњавањем узорака и пуњењем мерне посуде до 2/3 висине, а затим постављањем посуде у мерни део сонде на собној температури (од око 20°C) до успостављања равнотеже мерења.

5.2.3. Испитивање садржаја воде

Садржај воде одређиван је референтном методом SRPS ISO 1442 (1998). Поступак одређивања је спроведен потпуним мешањем 3 g \pm 0,001 g. узорака са кварцним песком, при чему је сушење до константне масе спроведено на температури од 103 \pm 2°C. Разлика између два узастопна мерења није била већа од 1 mg.

5.2.4. Испитивање количине укупне масти

Испитивање укупне масти у производу је спроведено референтном методом SRPS ISO 1443 (1992). Метода је заснована на хидролизи дела узорка са разблаженом хлороводоничном киселином и филтрирању добијене масе уз испирање врућом дестилованом водом до неутралне реакције. По завршеном филтрирању спроведено је сушење заостале масти на филтер папиру а затим екстракцији петролетром у апаратури по *Soxhletu* у трајању од 5h. Екстраховани узорак је сушен у сушници до константне масе на температури од 103°C \pm 2°C.

5.2.5. Испитивање количине укупних протеина

Укупани протеини су одређивани референтном методом по *Kjeldahl*-у, SRPS ISO 937 (1992). Садржај протеина у стељи је утврђен на основу садржаја укупног азота, множењем са фактором 6 - 25. Метода је подразумеала дигестију узорка у концентрованој сумпорној киселини, уз коришћење бакар (II)-сулфата као катализатора како би се укупни азот превео у амонијум јоне ((NH₄)₂SO₄). Алкализација је спроведена уз помоћ натријум-хидроксида, дестилација ослобођеног амонијака у вишак раствора борне киселине, а затим титрација хлороводоничном киселином за одређивање амонијака везаног за борну киселину.

5.2.6. Испитивање укупне количине соли

Одређивање количине соли је спроведено стандардном методом SRPS ISO 1841-1 (1999). Метода је заснована на екстракцији узорка врућом водом и таложењу протеина. У добијени екстракт је додат раствор сребро нитрата у вишку. Титрација је извршена раствором калијум тиоцијаната.

5.2.7. Испитивање укупне количине пепела

Укупан пепео у узорцима је одређиван методом SRPS ISO 936 (1999), која је заснована на сушењу, угљенисању и жарењу при температури од $550^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$. Маса сиво-белог остатка је мерена након хлађења.

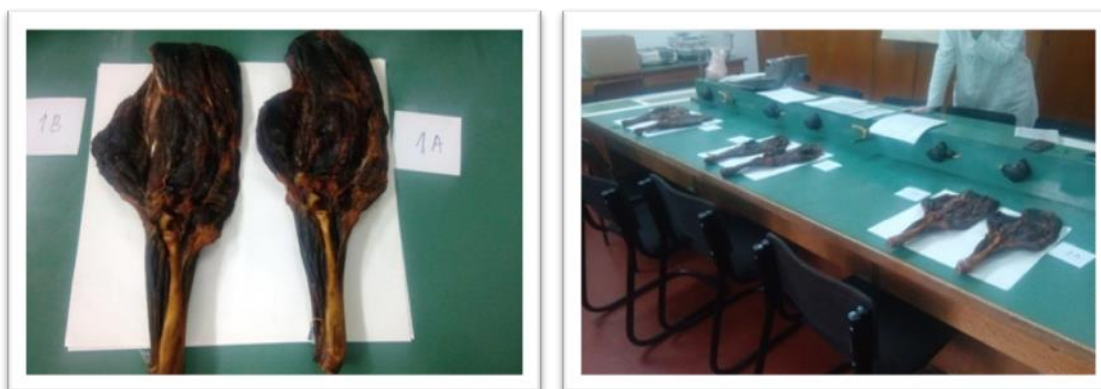
5.3. Сензорна анализа сјеничке овчије стеље

Испитивање сензорских својстава сјеничке овчије стеље обухватило је квантитативну дескриптивну анализу, која је подразумевала употребу квантитативног дескриптивног теста (ISO 6564:1985) од стране осмочлане комисије коју су чинили изабрани и обучени оцењивачи (ISO 8586-2:2008). Оцењивање је спроведено у просторијама за сензорну анализу, пројектоване према захтевима стандарда SRPS EN ISO 8589 (2012).

Сензорна анализа (слика 2) је подразумевала оцењивање: спољашњег изгледа, изгледа пресека, боје и одрживости боје, мириса и укуса, текстуре и сочности. За анализу је коришћен бод систем аналитичких дескриптивних тестова са скалом од 0 до 5, где је свака оцена представљала одређени ниво квалитета према Radovanović & Porov-Raljić (2001).

Оцена на скали 0, указује на уочљива механичка оштећења и/или на уочљиву микробиолошку неисправност; оцена 1 представља нетипичну и измењену боју производа, односно неко својство производа, неприхватљив производ; оцена 2 указује на изражене до веома изражене мане и недостатке у боји, или другог својства производа, односно квалитету производа; оцена 3 представља одређене мане и недостатке боје, или другог својства производа, односно квалитета производа; оцена 4 представља уочљива одступања или незнатне недостатке у боји, или другог својства производа, односно квалитету производа; оцена 5 представља оптималан квалитет, односно изузетна, типична сензорна својства производа.

У докторској дисертацији су приказане средње вредности сензорних оцена за спољашњи изглед; изглед пресека; боје и одрживости боје; мириса и укуса; текстуре и сочности стеље. Пондерисана оцена укупног сензорног квалитета производа је добијена множењем оцене за сваку особину одговарајућим коефицијентом важности (KV), који за поменута сензорна својства износи: 2, 5, 3, 7 и 3, редом и дељењем суме са бројем 20.



Слика 2. Сензорна анализа узорака сјеничке овчије стеље (Фото: Т. Ж. П)

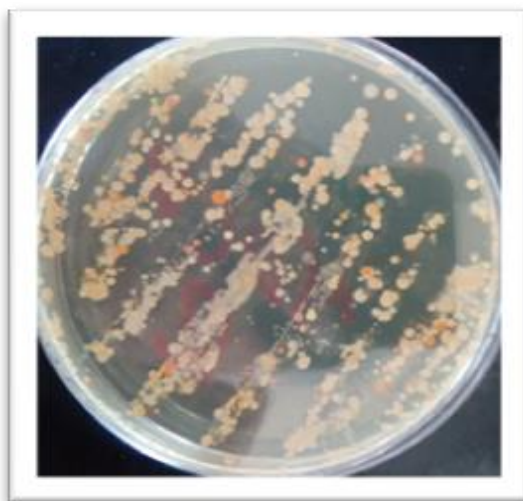
5.4. Микробиолошка анализа сјеничке овчије стеље

5.4.1. Изолација аутохтоних бактерија

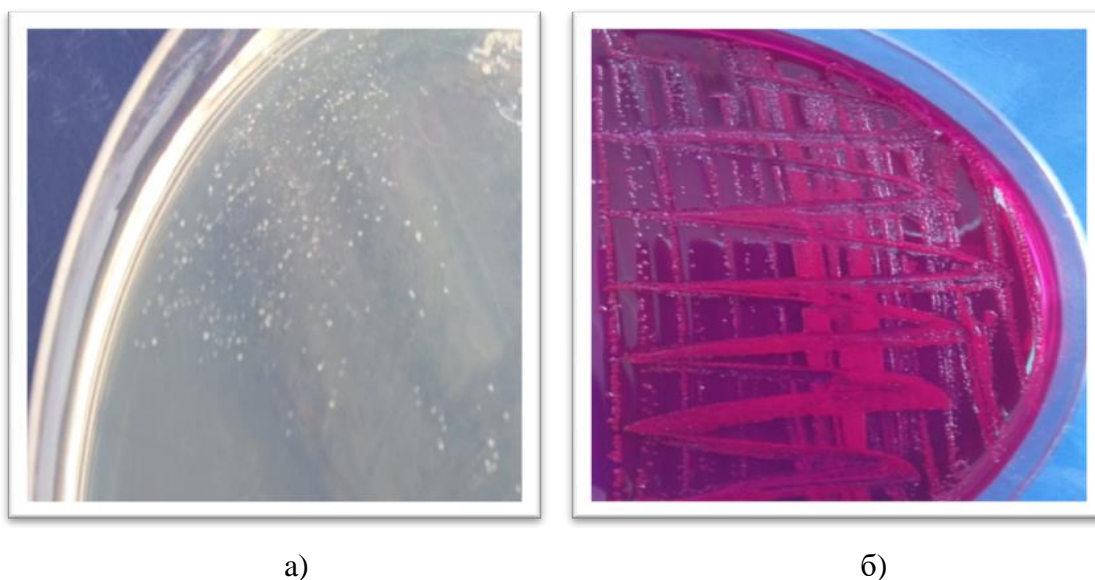
Припрема узорака и изолација аутохтоне микробиоте из производа је спроведена у складу са стандардном методом за припрему узорака (SRPS EN ISO 6887-1:2008). Испитивање броја микроорганизама у сјеничкој овчијој стељи извршено је нултог дана (испитивање сировог овчијег меса), као и након 7, 14, 28, 60, 90 и 120 дана производње аутохтоног производа, по три узорка из сваког домаћинства (А, Б и В), у три различите сезоне. Узорковање је спроведено стерилним инструментима из унутрашњости производа (300 g), након чега је издвојено и уситњено 10 g узорка који је затим асептично пренет у 90 mL стерилног (стерилизација у трајању од 15 - 20 мин на 121°C) физиолошког раствора са пептоном (0,8 g NaCl / mL и 1 g пептона / mL) и мешано 15 минута на вортексу до потпуног хомогенизирања узорка.

Из основног разређења припремана је серија децималних разређења (до 10^{-7}) из којих су у трипликату засејаване плоче са хранљивим поглогама. Одређивање укупног броја аеробних мезофилних бактерија изведено је према стандарду SRPS EN ISO 4833-1:2014 на подлози за укупан број бактерија (PCA). Изолација бактерија из фамилије Enterobacteriaceae је спроведена према стандарду SRPS ISO 21528-2:2009 и 2017, на подлози љубичасто-црвеном глукоза жучном агару (VRBGA). Припремљена разређења су наливена двосртуким слојем VRBGA при чему је потврђивање изведено биохемијским тестовима (оксидаза тест и ферментација глукозе); за бактерије из фамилије Pseudomonadaceae коришћена је pseudomonas агар база. Одређивања укупног броја бактерија млечне киселине и њихова изолација изведена је на de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) подлози, према стандарду ISO 15214:1998. Припремљена разређења су наливена двосртуким слојем MRS агара. За изолацију *Enterococcus* spp. коришћен је ескулин жучни агар (EZA). Одређивање броја коагулаза-позитивних стафилокока изведено је према стандарду SRPS EN ISO 6888-1:2009/A2:2018, на Baird-Parker агару. Потврђивање коагулаза-позитивних стафилокока је изведено коагулаза тестом. Присуство *Salmonella* spp. и *Listeria monocytogenes* утврђено је применом стандардних метода SRPS ISO 6579-1:2010, 2017 и 2017/A1:2020, односно SRPS ISO 11290-1:2010 и 2017.

У зависности од врсте испитиваних микроорганизама инкубација плоча је спроведена на температурама 30°C и 37°C у трајању од 48 h, након чега се приступило бројању израслих колонија на плочама које су садржале просечно више од 20, а мање од 300 колонија.



Слика 3. Изглед колонија аеробних мезофилних бактерија на РСА (фото Т. Ж. П.)



а)

б)

Слика 4. Изглед колонија (а) бактерија млечне киселине и (б) бактерија из фамилије *Enterobacteriaceae* (фото Т. Ж. П.)

5.4.1.1. Прелиминарно груписање изолованих бактерија

Прелиминарно груписање изолованих бактерија је извршено применом тестова: бојење по Граму и каталаза тест, док је морфологија сваког изолата проверена микроскопским посматрањем.

Бојење по Граму

Изучавање морфолошких карактеристика изолата је рађено бојењем ћелија по Граму, које је утемељено на различитом саставу бактеријских ћелијских зидова. Грампозитивне бактерије у саставу својих ћелијских зидова садрже 90% пептидоглюкана и

по Граму се боје у љубичасто, док Грам-негативне садрже: пептидогликан (1-10%), липополисахарде, липопротеине и порин-протеине што условљава да се бојењем по Граму ћелијски зидови ових бактерија боје у црвено.

За овај тест коришћене су преконоћне културе бактерија (37°C / 24 h), при чему је култура директно наношена на чисту микроскопску плочицу са капљицом дестиловане воде и размазивана стерилном бактериолошком езом кружним покретима на површини од око 1 cm². Након сушења и фиксирања препарата приступило се сукцесивном бојењу по Граму по методи описаној од стране Joković & Stojanović-Radić (2015). Грам-позитивне коке, бацили и кокобацили су подвргнути даљем истраживању.

Испитивање активности каталазе

У процесу аеробног дисања долази до ослобађања токсичних продуката као што је водоник пероксид (H₂O₂) и супероксид радикал O₂. Да би се спречила токсичност поменутих једињења бактерије синтетишу ензиме који врше детоксикацију.

- Ензим каталаза катализује ослобађање кисеоника из водоник пероксида.
- Ензим супероксид дисмутаза преводи супероксид радикал у водоник пероксид.
- Пероксидаза преводи водоник пероксид у воду.

Анаеробима углавном недостаје ензим каталаза, што је искоришћено као метода диференцирања бактерија по овој способности. Способност активности каталазе је испитивана наношењем 1 - 2 капи 3% водоник пероксида на размаз културе тест микроорганизама, при чему је праћена појава мехурића кисеоника као индикатора присуства ензима каталазе на микроскопску плочицу (Слика 5).



Слика 5. Пример негативног и позитивног каталаза теста (фото Т. Ж. П.)

Оксидаза тест

Оксидаза тестом се испитују способности бактерија да синтетишу ензим цитохром С оксидазу. Цитохром С је у респираторном ланцу бактерија одговоран за пренос електрона са цитохрома на молекуларни кисеоник као крајњег примаоца у аробним условима (Mladenović, 2019).

Оксидаза тест је спроведен тако што је бактеријска култура пренета на предметницу са филтер папиром. На културу је додато неколико капи реагенса тетраметил – парафенилендиамин – дихидрохлорида. Након 10-так секунди праћено је присуство односно одсуство тамнољубичасте до тамноплаве боје (позитивном реакцијом се сматра појава боје).

Тест ферментације глукозе

Способност разлагања глукозе је испитивана коришћењем две епрувете са глукоза агаром које су засејане преконоћним културама убодом до дна помоћу бактериолошке игле. У једну епрувету је наливено стерилно минерално уље док у другу то није учињено. Обе епрувете су инкубиране 24 h на 37°C. Промена боје из зелене у жуту је детектована као позитивна реакција.

5.4.1.1.1. Фенотипска карактеризација бактерија млечне киселине

Изолати који су били Грам-позитивни и каталаза-негативни су подвргнути даљем испитивању на бази идентификационих шема за родове *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* (Bergey, 2009).

Продукција гаса из глукозе

Преконоћне културе тестираних изолата су инокулисане (1% v/v) у MRS бујон са преврнутим Дурхамовим цевчицама и инкубиране 48 h на 37°C у микроаерофилним условима. Након инкубације, детектовано присуство гаса у Дурхамов цевчицама је указивао на хетероферментативни метаболизам.

Способност хидролизе L-аргинина и ескулина

Тест способности хидролизе L-аргинина је спроведен у бујону, у који су засејане преконоћне културе БМК и инкубиране на температури од 37°C / 24 h. Очитавање резултата је спроведено додатком капи индикатора фенол црвеног, при чему је појава црвене боје у бујону означавала позитивну реакцију, а појава жуте боје негативну реакцију хидролизе аргинина.

Тест способности хидролизе ескулина је спроведен у ескулин бујону у који су засејане преконоћне културе БМК и инкубиране на температури од 37°C / 24 h. Очитавање резултата је спроведено додатком неколико капи 7% раствора гвожђе (III)-хлорида, при чему је појава црног талога представљала позитивну реакцију хидролизе ескулина.

Продукција егзополисахарида

Продукција егзополисахарида детектована је визуелно као појава слузавих колонија након инкубације изолата на модификованом хранљивом агару са 10% сахарозе, фруктозе, лактозе или глукозе на температури од 37°C / 48 h.

Испитивање способности ферментације угљених хидрата

Идентификација изолата БМК до нивоа врсте је спроведена испитивањем способности ферментације угљених хидрата помоћу API CH50 китова (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France). Анализа биохемијских профила изолата извршена је коришћењем софтвера за идентификацију (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France).

5.4.1.1.2. Фенотипска карактеризација коагулаза-негативних стафилокока

Изолати који су били Грам-позитивне коке и каталаза-позитивни су подвргнути испитивању на база идентификационих шема за коагулаза-негативне стафилококе (Krisher et al., 2016).



Слика 6. Изглед колонија стафилокока на *Charman*-овој подлози
(Фото: Т. Ж. П)

Боја колоније и присуство типичне жуте пигментације

Боја колоније тестираних стафилокока је одређивана у односу на присуство интензивног жутог пигмента (Krisher et al., 2016).

Коагулаза тест

У тесту коагулазе плазме на стерилном микроскопском стаклу је додато 50 μ l зечје плазме у коју је унета колонија тест организма растворена у капи физиолошког раствора. Фактор згрушавања плазме је одређен појавом коагулације (макроскопско накупљање) у хомогенизованој зечијој плазми и бактерија је дефинисан је као позитивна реакција. Као позитивна контрола у овом тесту је коришћен *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Quinn et al., 2011).

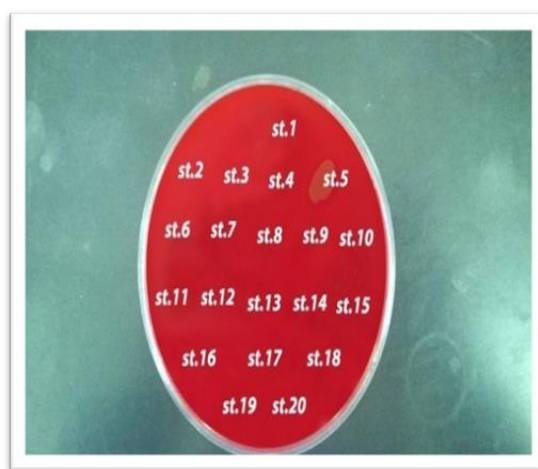
Ферментација манитола

Тест ферментације манитола је спроведен инокулацијом суспензије стафилокока на *Charman*-овој подлози. Након инкубације на температури од 37°C / 24 h праћена је промена боје подлоге из црвене у жуту. Код бактерија које су промениле боју индикатора забележена је способност ферментације манитола.

Способност хемолизе на крвном агару

Хемолитичка активност се утврђује како би се испитала патогеност испитиваних сојева (Ledina et al., 2013). Хемолизин изазива хемолитичку реакцију и он је одговоран за распад црвених крвних зрнаца. Способност хемолизе тестираних организама анализирана је методом коју су дефинисали Foulquié-Moreno et al. (2003). На плоче са крвним агаром (5% овчије крви) засејаване су преконоћне културе и инкубиране на температури од 37°C током 24 h. Након инкубације детектовано је присуство или одсуство светлих зона око колонија (Слика 7).

- α -хемолиза (недовољно бистре зоне око колонија),
- β -хемолиза (јасне зоне око колонија) и
- γ -хемолиза (без ореола око колонија) указују на позитивну хемолитичку активност, односно патогеност испитиваних сојева (Maragkoudakis et al., 2009).

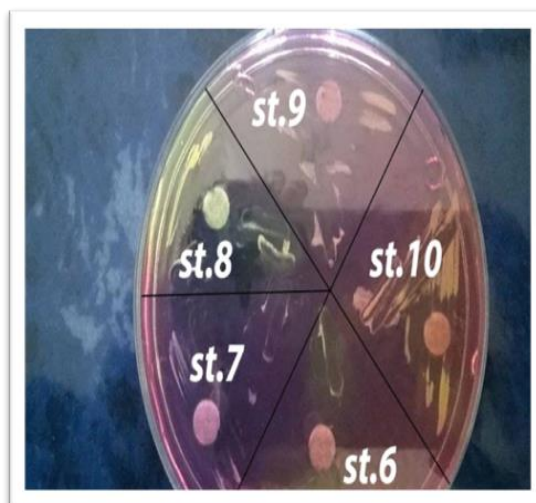


Слика 7. Приказ хемолитичке активност коагулаза-негативних стафилокока на крвној подлози (Фото: Т. Ж. П)

Осетљивост на новобиоцин

Овај тест се користи за диференцијацију КНС и то је једна од особина стафилокока која помаже њиховој идентификацији, а испитује се диск-дифузионим методом (Bauer et al., 1966).

Стандардизација бактеријске суспензије је вршена у физиолошком раствору уз коришћење Mc Farland 0,5 стандарда. Суспензија је пренета стерилним брис штапићем у петри кутију са хранљивим агаром. Асептично су додати дискови новобиоцина (5 μ g) на површину инокулисаног агра. Након инкубације 37°C / 24 h, мерене су зоне инхибиције раста око новобиоцина (Слика 8). Пречник зоне инхибиције мањи од 12 mm указује на резистентност бактерије на антибиотик, док уколико је пречник зоне инхибиције већи или једнак 16 mm, бактерија се сматра осетљивом на новобиоцин.



Слика 8. Приказ осетљивости на новобиоцин коагулаза-негативних стафилокока (Фото: Т. Ж. П)

5.4.1.1.3. Идентификација бактерија млечне киселине и коагулаза-негативних стафилокока МАЛДИ-ТОФ масеном спектрофотометријом

Резултати биохемијске идентификације су потврђени коришћењем МАЛДИ-ТОФ масене спектрофотометрије у Институту за јавно здравље Војводине. За идентификацију су се коришћене преконоћне културе КНС гајене на крвном агару, док су БМК изолати инкубирани у MRS бујону, на температури од 37°C / 24 h.

Узорци прелиминарно идентификованих КНС су анализирани стандардном процедуром (Bruker's direct transfer sample preparation procedure for MALDI-TOF MS) која је подразумевала директно наношење појединачних бактеријских колонија стерилним штапићем, у виду танког филма на 96-МАЛДИ плочу (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Након наношења филма, МАЛДИ плоча је остављена око један минут да се осуши на собној температури, а затим је узорак прекривен са 1 μ L раствора матрикса (Bruker Matrix HCCA; α -цијано-4-хидроксикинаминска киселина). МАЛДИ-ТОФ идентификациони масени спектри су добијени коришћењем Microflex LT/SH BioTyper на спектофотометру (Bruker Daltonics), са азотним ласером (337 nm), који контролише Flexcontrol софтвер, верзија 3.1. (Bruker Daltonics). Под дејством азотног ласера, на танки филм бактерија и матрикса долази до јонизације протеина и њиховог раздвајања у електричном пољу, који се затим усмеравају у вакуум цев и раздвајају у зависности од масе и набоја. Раздвојени протеини у детектор стижу у секвенцама које су обрнуто пропорционалне њиховој маси на тај начин стварајући профил протеина (енгл. *mass spectral fingerprinting*). Формирани пикови на детектору припадају рибозомалним и другим најзаступљенијим протеинима. Резултати масеног спектра идентификованог изолата упоређивани су са масеним спектром познатих микробних изолата из базе података софтвера МАЛДИ-биоТипер. Мера сличност се кретала у опсегу од 0,000 до 3,000, при чему су вредности $\geq 2,000$ (зелена боја) узете као тачна идентификација до нивоа врсте изолата. Вредности између 1,700 и 2,000 (жута боја), су узете као вероватна идентификација рода, док вредност резултата испод 1,700 (црвена боја) су узете као сличност између непознатог профила и било ког у бази података.

Узорци БМК су применом модификоване методе протеинске екстракције припремљени за анализу. 500 μ L преконоћних култура БМК гајених у MRS бујону је

центрифугирано на 12000 rpm / 4°C/пет минута. Супернатант је одбачен, задржан је пелет у који је додато 300 µL дестиловане воде и 900 µL апсолутног етанола. Добијена суспензија је најпре мешана на вортексу један минут, а затим два минута центрифугирана на 13000 rpm / 4°C. Супернатант је одбачен, а пелет је сушен око 30 минута на температури од 55°C, до потпуног испарења воде и етанола. У пелет је додата 70% мравља киселина (50 µL), а затим је извршено мешање и додато 50 µL 50% ацетонитрила након чега је обављено центрифугирање на 13000 rpm /4°C / два минута. Супернатант (1 µL) је пренет директно на 96-МАЛДИ плочу, која је остављена да се осуши 10 минута, након чега је узорак прекривен са 1 µL раствора матрикса. Остатак процедуре је идентичан описаној стандардној процедури (Bruker's direct transfer sample preparation procedure for MALDI-TOF MS).

Иzolоване и идентификоване БМК се чувају у мешавини глицероа (20%) и MRS бујона на температури -80°C у оквиру колекције Лабораторије за микробиологију, ПМФ-а, Универзитета у Крагујевцу.

5.4.2. Изолација и идентификација плесни

Изолација плесни извршена је на Dihloran 18% глицерол агару (DG18) са површине узорака овчије стеље. Узорак стеље је постављен на површину DG18 агра и остављен 30 секунди да би се пренеле споре плесни са површине стеље на површину подлоге. Подлога је остављена да се инкубира на температуру од 25°C у трајању од пет дана. Изолација плесни је изведена по методи коју су описали Pitt & Hocking (2009). Ради добијања чистих монокултура, плесни које су припадале родовима *Aspergillus*, *Eurotium* и *Penicillium* су пресејане на CYA агру, а оне које су припадале роду *Mucor* на SMA. Добијене монокултуре плесни су идентификоване према кључевима за детерминацију коју су описали Samson & Frisvard, 2004a, 2004b; Pitt & Hocking, 2009, при чему су праћене макроморфолошке карактеристике плесни (пречник колоније, боја, текстура, пигментација, наличје колоније, ексудати) и микроморфолошке (метуле, фијалиде, конидије, хифе итд., и њихова дужина, пречник, величина и облик) (Samson & Frisvard, 2004a, 2004b; Pitt & Hocking, 2009).



а)

б)

в)

Слика 9. Изглед чистих култура плесни: а) *P. corneum* б) *E. herbariorum*, в) *M. racemosus* (фото Т. Ж. П)

Изоловане и идентификоване културе плесни се чувају на SMA агару у оквиру колекције Лабораторије за микробиологију хране на Технолошком факултету, Универзитета у Новом Саду, на температури од 4°C.

5.5. Технолошке особине аутохтоне микробиоте сјеничке овчије стеље

Процена технолошких особина одабраних изолата БМК и КНС вршена је како би се испитала њихова потенцијална примена као стартер култура и прехранбеној биотехнологији.

5.5.1. Технолошке особине бактерија млечне киселине и коагулаза-негативних стафилокока

Способност раста на различитим температурама

Способност раста на различитим температурама изолата БМК је испитана засејавањем изолата у MRS бујону док је за изолате КНС раст праћен у хранљивом бујону. Засејане преконоћне културе су инкубиране 24 h на температурама: 4°C, 15°C, 25°C, 45°C и 50°C. Појава раста у виду замућења засејаних изолата након инкубације дефинисана је као позитивна реакција (Reda et al., 2018).

Способност раста на различитим рН вредностима медијума

Способност раста тестираних сојева бактерија у срединама са различитим рН вредностима испитиван је засејавањем преконоћних култура у модификованим MRS и хранљивим бујонима. рН бујона су подешене помоћу хлороводоничне киселине, на вредност од: 4, 5, 6, 7 и 8. Бујони су инкубирани у микроаерофилним условима 24 h на 37°C, након чега је праћена појава раста засејаних изолата (Reda et al., 2018).

Способност раста на различитим концентрацијама NaCl

Тест толеранције на различите концентрације NaCl, спроведен је на чврстим MRS подлогама за БМК и хранљивом агару за КНС, које су модификоване додатком 4, 6,5 и 8% NaCl. Преконоћне културе тест организама су засејане на чврсту MRS или НА подлогу са одговарајућом концентрацијом соли и инкубиране 24 h на температури од 37°C. Појава колонија засејаних изолата након инкубације дефинисана је као позитивна реакција (Reda et al., 2018).

Протеолитичка активност

Протеолитичка активност бактерија је испитивана на подлози добијеној мешањем хранљивог агара и млека (1,6% млечне масти) у односу 1:1. Бактерије су асептично пренешене на подлогу и остављене на инкубацију (37°C / 24 h). Након инкубације, појава прозирне зоне око бактеријских колонија, дефинисана је као протеолитичка активност. За позитивну контролу у овом тесту коришћена је врста *Bacillus subtilis* ATCC 6633, док је као негативна контрола коришћена врста *E. coli* ATCC 25922 (Abubakr & Al-adiwish, 2017).

Липолитичка активност

Липолитичка активност бактерија је испитивана на трибутирин агра, при чему су преконоћне културе асептично пренешене езом на подлогу и остављене на инкубацију 24 часа на температури од 37°C. Појава прозирних зона око формираних колонија, је дефинисана као липолитичка активност. Као позитивна контрола у тесту је коришћена врста *B. subtilis* ATCC 6633, док је као негативна контрола коришћена врста *E. coli* ATCC 25922 (Akabanda et al., 2014).

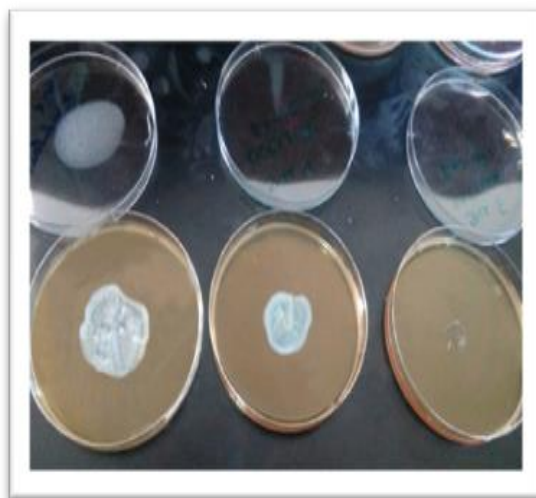
5.5.2. Утицај различитих услова средине на раст аутохтоних изолата плесни

Испитивање услова средине на радијални раст плесни је подразумевало евалуацију њихове толеранције на различите температуре (5°C, 15°C и 37°C), различите рН средине (4, 7 и 10) као и на различите концентрације соли (4, 6,5 и 8%). Испитиване плесни су инкубиране седам дана након чега су очитани резултати.

Утицај активности воде на радијални раст плесни

За *in vitro* проверу утицаја активности воде на радијални раст плесни одабрано је седам врста плесни изолованих из сјеничке овчје стеље: *P. crustosum*, *P. polonicum*, *A. nidulans*, *A. niger*, *E. herbariorum*, *E. chevalieri* и *M. plumbeus*. Културе тестираних плесни су најпре гајене на косој SMA подлози седам дана на температури од 25°C.

Подлоге са различитим вредностима a_w су припремане коришћењем основног MУ50G агра уз додатак глукозе за подешавање тестираних вредности a_w (0,85; 0,87; 0,97) у супстрату (Beuchat & Hocking, 1990). Вредности активности воде припремљених подлога тестирани су помоћу уређаја Meter group INC 40515. Инокулација је изведена на петри плочама, инокулацијом зрелих спора иглом у центар подлоге у три понављања. Раст колоније праћен је током 15 дана на температури од 25°C, трећег, петог, седмог, десетог, дванаестог и петнаестог дана, је мерен пречник колонија помоћу лењира у три понављања (Слика 10).



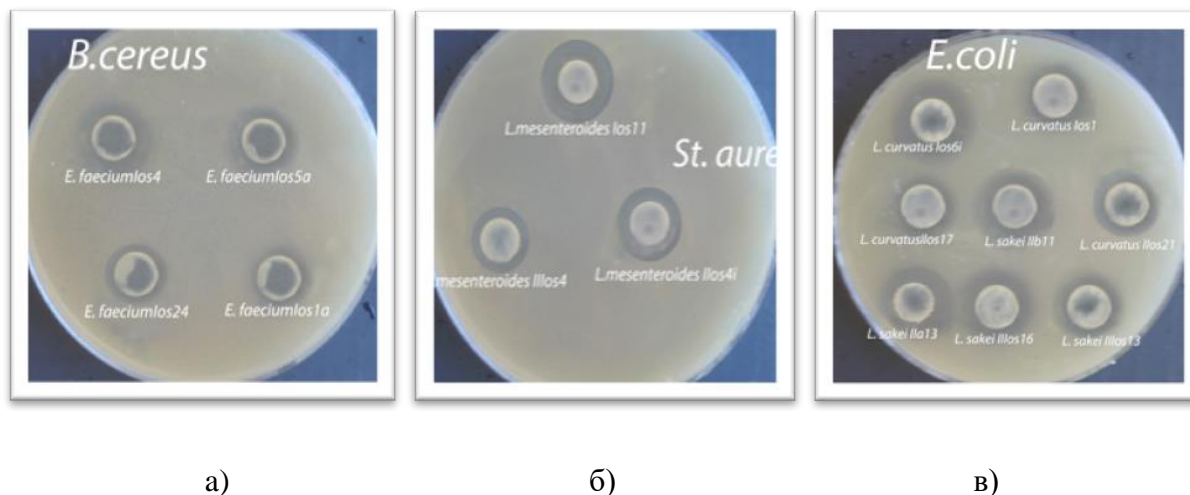
Слика 10. Утицај активности воде на радијални раст плесни изолованих из сјеничке овчје стеље (фото: Т. Ж. П.)

5.6. Антимикробна активност аутохтоних изолата

Антимикробна активност аутохтоних изолата БМК и КНС је испитана применом методе описане у Vesković-Moračanin et al. (2010), са модификацијама. На MRS агар (за БМК) (Слика 10), односно хранљиви агар (за КНС) је наливено 5 mL софт (0,7%) НА у који је инокулисано 10^5 CFU/ml индикатор соја (*S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и *Bacillus cereus* ATCC 14579). У софт агару су формиран бунарићи пречника 5 mm у које је сипано 100 μ l делимично пречишћеног бактериоцина.

Делимично пречишћавање бактериоцина је вршено на следећи начин: Преконоћне културе (18 h) су центрифугиране на 10000 обртаја 30 минута при температури од 4°C. Издвојени супернатант је неутрализован на вредност рН= 6,5 - 7,0 помоћу 10 M NaOH. Таложење бактериоцина вршено је помоћу амонијум сулфата (472,2 g/l) до добијања засићеног раствора. Одвојени бактериоцин у облику белог талоба је растваран у 25 ml 0,05 M PBS пуферу (рН 7). Стерилизација делимично пречишћеног бактериоцина је вршена филтрирањем кроз 0,22 μ m микрофилтер (Acrodisc, Germany).

Антимикробна активност тест организама је детектована на основу појаве светле зоне око бунарића као последица инхибиције раста сензитивног бактеријског соја, а дефинисана је као зона инхибиције раста.



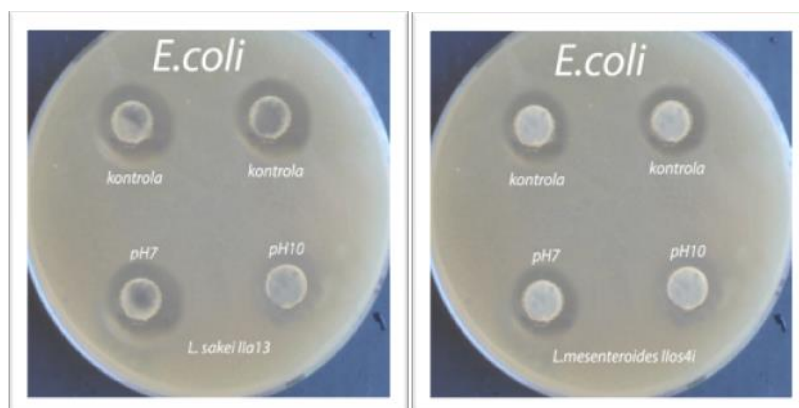
Слика 11. Антимикробна активност бактерија млечне киселине према: а) *B. cereus* ATCC 14579, б) *S. aureus* ATCC 25923, в) *E. coli* ATCC 25922 (фото Т. Ж. П)

5.6.1. Утицај, ензима, рН, температуре и хемијских једињења на антимикробну активност полупречишћених бактериоцина одабраних изолата

За анализу утицаја ензима, рН, температуре и хемијских једињења на антимикробну активност полу-пречишћених бактериоцина, одабрани су изолати *L. curvatus* Ios4, *L. curvatus* Ios6, *L. sakei* Ios11, *L. sakei* Ios13, *L. mesenteroides* Ios4i и *E. faecium* Ios4.

Утицај рН на антими­кробну активност полупречишћених бактериоци­на

Утицај различитих рН вредности на антими­кробну активност полупречишћеног бактериоци­на је процењена подешавањем рН вредности основног супернатанта у интервалу између 3 и 10 коришћењем 1 М NaOH или 1 М HCl. Након инкубације од 2 h на 37°C, рН средине тестираног супернатанта је подешена на вредности од 6,5 до 7, при чему је као контрола коришћен не третиран делимично пречишћени бактериоци­н. Преостала активност третираног основног супернатанта је тестирана тестом дифузије помоћу бунарића против индикаторског соја *E. coli* ATCC 25922, по методи описаној у одељку 5.6 (Антими­кробна активност аутохтоних изолата), (Слика 12).



а)

б)

Слика 12. Утицај рН на антими­кробну активност полупречишћених бактериоци­на синтетисаних од стране: а) *L. sakei* Pa13, б) *L. mesenteroides* Pos4i (фото Т. Ж. П)

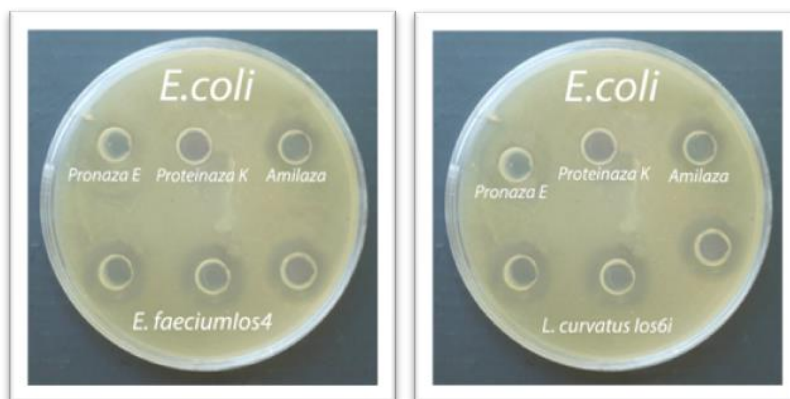
Утицај температуре на антими­кробну активност полупречишћених бактериоци­на

Температурна стабилност активних супстанци основног супернатанта је тестирана загревањем 1 mL полупречишћеног бактериоци­на (за сваки тестирани сој) на температурама од 50°C током 30 минута, 100°C током 5, 15 и 30 минута и на 121°C у аутоклаву 15 минута, при чему је као контрола коришћен термички нетретиран делимично пречишћен бактериоци­н (Vesković-Mogačanin et al., 2010). Антими­кробна активност једињења је затим тестирана по методи по методи описаној у одељку 5.6 (Антими­кробна активност аутохтоних изолата).

Утицај ензима на антими­кробну активност полупречишћених бактериоци­на

За испитивање утицаја ензима на активност полупречишћених бактериоци­на, синтетисаних од стране тестираних изолата, коришћени су ензими проназа Е, протеиназа К, каталаза, липаза и α-амилаза. У основни супернатант додати су ензими у крајњој концентрацији од 1 mg/ml. Након инкубације од 30 min на 37°C, активност ензима је заустављена загревањем на температури од 100°C, 10 min, након чега је проверен утицај ензима на активност једињења. Као контрола коришћен је нетретиран делимично пречишћени бактериоци­н (Vesković-Mogačanin et al., 2010). Активност третираног основног супернатанта је тестирана тестом дифузије помоћу

бунарића на индикаторску врсту *E. coli* ATCC 25922, по методи описаној у одељку 5.6 (Антимикробна активност аутохтоних изолата) (Слика 13).



а)

б)

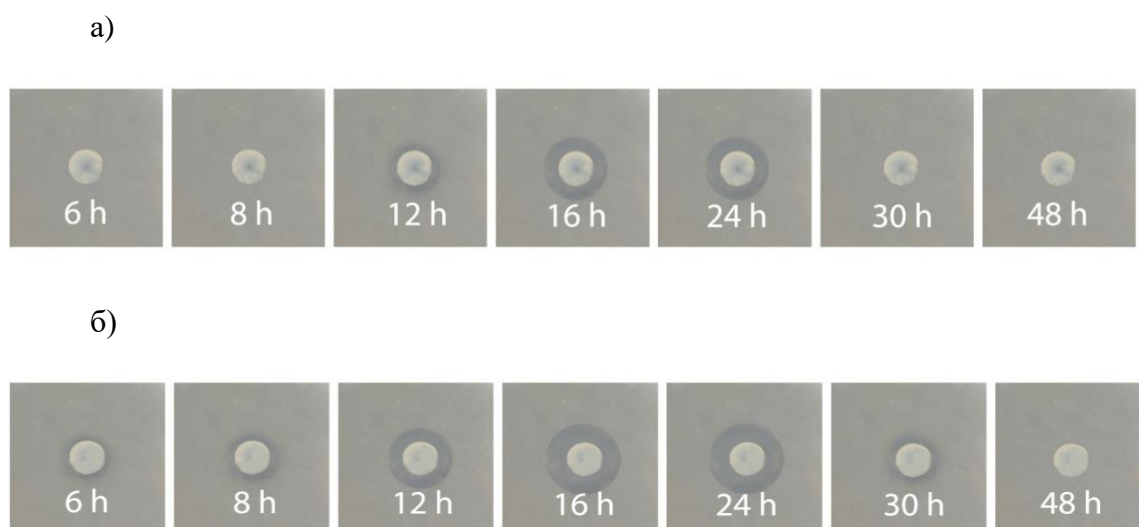
Слика 13. Утицај ензима на антимикробну активност полупречишћених бактериоцина синтетисаних од стране: а) *E. faecium* Ios4, б) *L. curvatus* Ios6i (фото Т. Ж. П)

Утицај хемијских једињења на антимикробну активност полупречишћених бактериоцина

За испитивање утицаја хемијских једињења на стабилност полупречишћених бактериоцина коришћена су следећа једињења: СДС (натријумдодецилсулфат) у крајњој концентрацији од 1% (v/v), Trypton X-20, Trypton X-80 и Trypton X-100 у крајњој концентрацији од 1% (v/v), β -меркаптоетаноли Na-EDTA (етилен-диамин тетрасирћетна киселина) у крајњој концентрацији од 1 mM, NaCl у крајњој концентрацији од 6,5% (w/v). Активност бактериоцина је тестирана након инкубације одређеног хемијског једињења и полупречишћеног бактериоцина 30 минута на 37°C, при чему је као контрола коришћен нетретирани, делимично пречишћени бактериоцин. Активност третираног супернатанта је тестирана тестом дифузије помоћу бунарића на индикаторску врсту *E. coli* ATCC 25922, по методи описаној у одељку 5.6 (Антимикробна активност аутохтоних изолата).

Кинетика раста одабраних изолата и биосинтеза бактериоцина

За истраживање кинетике раста и биосинтезе антимикробних једињења одабрани су изолата: *L. curvatus* Ios6 (слика 14б), *L. sakei* Pa13, *L. mesenteroides* Ios4i и *E. faecium* Ios4 (Слика 14а). Кинетика производње антимикробних једињења одређена је у MRS бујону током ферментације у трајању од 48 часова. MRS бујон је инокулисан преконоћним културама (1% (v/v)) и инкубиран на 37°C. Производња бактериоцина је праћена мерењем оптичке густине на ELISA читачу микротитар плоча ($\lambda = 600 \text{ nm}$) у интервалима током: 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 30, 48 сата. У дефинисаним временским интервалима узимани су узорци којима је тестирана антимикробна активност по методи описаној у одељку 5.6 (Антимикробна активност аутохтоних изолата).



Слика 14. Кинетика раста и биосинтезе бактериоцина

а) *E. faecium* Ios4, б) *L. curvatus* Pos6 (фото Т. Ж. П.)

5.7. Испитивање пробиотског потенцијала бактерија млечне киселине

Испитивање пробиотског потенцијала БМК подразумева евалуацију толеранције на услове ГИТ-а (толеранција на ниску рН, присуство пепсина, панкреатина и жучних соли, присуство фенола), њихову хидрофобност, способност аутоагрегације и коагрегације, евалуацију њихове антимикробне активности и безбедности коришћења.

5.7.1. Толеранција на услове гастроинтестиналног тракта

Способност раста у киселој средини

Преконоћне БМК културе су узгајане у MRS бујону (1:10) чија је рН подешена на вредности од 3 и 2. Подешавање киселости медијума је спроведено пре стерилизације помоћу концентроване HCl. Толеранција на киселу средину је евалуирана читавањем оптичке густине на ELISA читачу микротитар плоча ($\lambda = 600$ nm) сваког сата у интервалу од 3 h на температури од 37°C (Radulović et al., 2010). Као контрола у експерименту је коришћен стандардни пробиотски сој *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. Тест је рађен у трипликату.

Способност раста у присуству жучних соли

Преконоћне БМК културе су узгајане у MRS бујону (1:10) са различитим концентрацијама жучних соли (0,5 и 1%) пре стерилизације. Толеранција на присуство жучних соли је евалуирана читавањем оптичке густине на ELISA читачу микротитар плоча ($\lambda = 600 \text{ nm}$) сваког сата у интервалу од 3 h на температури од 37°C (Radulović et al., 2010). Као контрола у експерименту је коришћен стандардни пробиотски сој *L. acidophilus* ATCC 4356. Тест је рађен у трипликату.

Способност раста изолата у симулираним условима желудачног сока - Гастро тест

Симулација услова желудачне средине је рађена према методи Radulović et al. (2010) уз модификације. Преконоћне културе изолата БМК су инокулисане у односу 1:10 у вештачки направљеном желудачном соку (одељак Раствори и реагенси), Инкубација је спроведена на температури од 37°C у трајању од 1 h и 2 h, након чега је читавана апсорбанца раста на ELISA читачу микротитар плоча (600 nm). Као контрола у експерименту је коришћен стандардни пробиотски сој *L. acidophilus* ATCC 4356. Тест је рађен у трипликату

Способност раста изолата у присуству жучних соли

Преконоћне БМК културе су узгајане у MRS бујону (1:10) у коме је концентрација жучних соли била 0,5 и 1%. Толеранција на повећану концентрацију жучних соли је евалуирана читавањем оптичке густине на ELISA читачу микротитар плоча ($\lambda = 600 \text{ nm}$) сваког сата у интервалу од 3 h на температури од 37°C (Radulović et al., 2010). Као контрола у експерименту је коришћен стандардни пробиотски сој *L. acidophilus* ATCC 4356. Тест је рађен у трипликату.

Способност раст на подлогама са различитом количином фенола

Тест раста на подлогама са фенолом је важан код идентификације потенцијалних пробиотика. Фенол делује антимикуробно и један је од интермедијера путрефактивних процеса у дебелом цреву, а настаје бактеријском деаминацијом ароматичних аминокиселина (Šusković et al., 2000). Веома је важна резистенција потенцијалних пробиотских сојева према фенолу како би они успешно преживели услове у пробавном систему.

Способност раста изолата у присуству фенола праћена је засејавањем преконоћних култура изолата на модификоване плоче са MRS агром у које је додат фенол, тако да је финална концентрација истог на плочама износила: 0,1%, 0,2% и 0,3%. Појава колонија после 48 h инкубације на 37°C указивала је на способност преживљавања изолата у одређеној концентрацији фенола (Šusković et al., 2001).

Бактеријска адхезија за угљоводонике (хидрофобност)

Способност адхезије је испитана према методи коју су описали Fortina et al., (2008). Преконоћне културе испитиваних изолата су центрифугиране на 5000 rpm у трајању од 15 минута, а затим су испране два пута у PBS пуферу и ресуспендоване у 0,1 M KNO₃, pH 6,2. Апсорбанца на 600 nm се кретала између 0.5 - 0.6 (Ao). Потом је 3 mL ћелијске суспензије измешано са 1 ml n-хексадекана. Смеша је инкубирана на

собној температури 10 минута и добро измешана на вортексу два минута. Након 20 минута инкубације на собној температури, водена фаза је пажљиво издвојена и мерена је апсорбанца на 600 nm (A_t). Поступак је поновљен са хлороформом и ксиленом како би се испитала хидрофобност у њиховом присуству.

Процент хидрофобности израчуната је на основу формуле:

$$\% \text{ адхезије} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100$$

Способност аутоагрегације и коагрегације

Агрегација има значајну улогу у дефинисању пробиотских сојева, она се може дефинисати као груписање бактеријских ћелија. Уколико се ради о груписању истих бактеријских ћелија онда је реч о аутоагрегацији, уколико имамо груписање ћелија различитих врста бактерија у том случају говоримо о коагрегацији (Осања & Nader-Macías, 2002). Коагрегацијом између пробиотских сојева и интестиналних патогена доводи до уклањања штетних микроорганизама из ГИТ-а (Осања & Nader-Macías, 2002).

Способност аутоагрегације потенцијалних пробиотских сојева, као и коагрегација са патогенима (*Escherichia coli* ATCC 25922) је одређена модификованом методом коју су описали Осања & Nader-Macías (2002). Ћелије преконоћних култура су центрифугиране на 5000 rpm у трајању од 15 минута, након чега су два пута испране у PBS пуферу (pH 7,5), а затим су ресуспендоване у 4 ml истог пуфера тако да су садржале приближно 10^8 CFU/ml ћелија (апсорбанца суспензије на 600 nm око 0,5-0,6, A_0). Суспензија је добро хомогенизована на вортексу, 100 μ l са површине суспензије је пребачено у микротубу са 900 μ l PBS пуфера, након чега је мерена апсорбанца. Процент аутоагрегације израчунат је према следећој формули:

$$\% \text{ аутоагрегације} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100$$

A_t представља апсорбанцу супернатанта након 1 и 4 h.

За испитивање способности коагрегације, ћелије тестираних изолата и патогена су припремане на идентичан начин као у предходној методи, а затим су ресуспендоване у PBS пуферу по 2 ml суспензије обе врсте бактерија за које се прати коагрегација. Суспензије су добро измешане на вортексу, након чега је мерена апсорбанца. Процент коагрегације израчунат је према следећој формули:

$$\% \text{ коагрегације} = (A_0 - A_t) / A_0 \times 100$$

A_t представља апсорбанцу супернатанта A_{600nm} након 2 и 4 h.

Синтеза биогених амина

Способност изолата да синтетишу биогене аminer анализирана је по методи коју су описали Мајјала & Eerola (1993). Преконоћне културе БМК су засејане на модификоване подлоге у које су појединачно додате аминокиселине хистидин и тирозин. Пурпурна боја колонија изолата засејаних на подлози са хистидином или

појава седимента око колонија изолата засејаних на подлози са тирозином потврђује присуство декарбоксилазе. Овај тест је рађен у трипликату.

5.7.2. Процена безбедоносног аспекта изолата бактерија млечне киселине

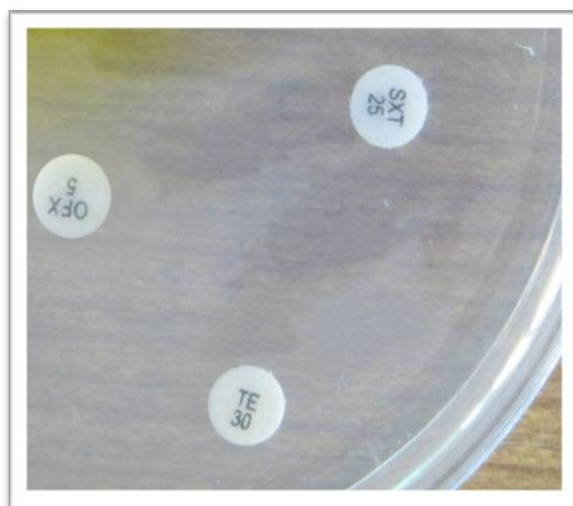
Безбедоносни аспект изолата БМК евалуиран је коришћењем две методе за процену потенцијалне патогености: испитивање способност хемолизе на крвном агару и процена резистенције на антибиотике.

Способност хемолизе на крвном агару

Испитивање хемолитичке активности је описано у одељку 5.4.1.1.2. (Фенотипска карактеризација изолата коагулаза-негативних стафилокока).

Испитивање осетљивости изолата на антибиотике - диск-дифузиони тест

Осетљивост изолованих сојева на антибиотике је испитивана помоћу диск дифузионе методе (Bauer et al., 1966). Направљена је бактеријска суспензија McFarland стандардом 1 од преконоћне културе испитиваних изолата у 5 ml стерилног физиолошког раствора. Инокулација испитиваног изолата на површину MRS агара је извршена применом бриса који је након потапања у припремљени инокулум равномерно провучен преко површине подлоге (Ledina et al., 2013). Након nanoшења суспензије културе на површину плоче, стерилном пинцетом су нанесени BBL дискови са антибиотцима (Офлоксацин (ofx 5 µg), Азитромицин (azm 15 µg), Клиндамицин (da 2 µg), Триметоприн (sxt 25 µg), Еритромицин (e 15 µg) и Тетрациклин (te 30 µg)). Након инкубације на 37°C / 24 часа, измерен је пречник зоне инхибиције раста око антибиотика (Слика 14). Пречник зоне инхибиције већи од 20 mm указивао је да је изолат осетљив на тестирани антибиотик (CLSI, 2011).



Слика 15. Осетљивост изолованих БМК сојева на антибиотике (фото Т. Ж. П.)

5.8. Статистичка анализа

Једнофакторска анализа варијансе (ANOVA) је спроведена у циљу тестирања једнакости аритметичких средина испитиваних скупова. За накнадна поређења свих резултата коришћен је Данканов тест. У свим тестирањима коришћен је 5%-ни ниво значајности ($p < 0,05$).

У циљу утврђивања квантитативног слагања (јачине везе) између варијација испитиваних појава спроведена је корелациона анализа.

Да би се идентификовале групе чији су елементи слични један другом примењена је метода Кластер анализе. За израчунавање матрице сличности (одстојања) коришћена је функција Euklidskog одстојања. Након избора и формирања матрице сличности одабран је Wardov метод груписања.

Статистичка обрада података обављена је у софтверу SPSS 26.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) док је конструкција дендограма обављена у софтверу XLSTAT (version 2014, Addinsoft).

6. РЕЗУЛТАТИ

Истраживањем аутохтоне сјеничке овчије стеље са простора западне Србије утврђени су хемијски и сензорни параметри производа и испитан је састав аутохтоне заједнице микроорганизама која директно утиче на квалитет производа. Извршена је карактеризација БМК као доминантне заједнице у производу, КНС и плесни. Испитане су технолошке особине и антимикуробни потенцијал изолата БМК и КНС, као и пробиотски потенцијал одабраних БМК изолата. Резултати спроведених физичко-хемијских, сензорних и микробиолошких истраживања сјеничке овчије стеље приказани су у Табелама 1 - 36 и Графицима 1 – 13.

6.1. Хемијска анализа сјеничке овчије стеље

Хемијска анализа сјеничке овчије стеље је обухватала испитивање рН вредности, активности воде (a_w), садржаја воде, масти, протеина, соли и пепела у 9 узорак стеље. На основу увида у резултате може се запазити да су истраживани параметри квалитета производа били поприлично уједначени код свих произвођача у свим истраживаним периодима. Резултати испитивања хемијских карактеристика сјеничке овчије стеље су приказани у Табели 1.

Табела 1. Хемијске карактеристике сјеничке овчије стеље

Хемијске карактеристике	рН	a_w	Садржај воде (%)	Садржај масти (%)	Садржај протеина (%)	Садржај соли (%)	Садржај пепела (%)	
Узорак	A1	5,47 ± 0,20 ^a	0,82 ± 0,01 ^a	43,70 ± 1,10 ^{ab}	10,70 ± 0,10 ^c	33,90 ± 1,60 ^{abc}	5,30 ± 0,20 ^{abc}	9,80 ± 0,50 ^{ab}
	A2	5,43 ± 0,19 ^a	0,80 ± 1,00 ^a	46,1 ± 0,60 ^c	7,25 ± 0,04 ^a	37,00 ± 0,50 ^{acd}	5,00 ± 0,14 ^a	9,17 ± 0,04 ^a
	A3	5,44 ± 0,04 ^a	0,82 ± 0,50 ^a	45,6 ± 0,60 ^{bc}	7,60 ± 0,07 ^{ab}	36,30 ± 0,60 ^{bc}	5,20 ± 0,06 ^{ab}	9,30 ± 0,09 ^a
	B1	5,58 ± 0,03 ^a	0,80 ± 0,01 ^a	42,9 ± 0,10 ^a	11,60 ± 0,10 ^d	34,20 ± 0,70 ^{abc}	5,10 ± 0,10 ^{ab}	9,10 ± 0,00 ^a
	B2	5,15 ± 0,13 ^a	0,81 ± 0,01 ^a	42,5 ± 0,40 ^a	13,30 ± 0,29 ^e	32,60 ± 1,10 ^a	5,50 ± 0,00 ^c	10,90 ± 0,30 ^b
	B3	5,42 ± 0,21 ^a	0,79 ± 0,01 ^a	44,1 ± 0,00 ^{ab}	7,90 ± 0,10 ^{ab}	38,50 ± 0,50 ^d	5,28 ± 0,00 ^{ab}	9,30 ± 0,00 ^a
	V1	5,60 ± 0,12 ^a	0,83 ± 0,03 ^a	44,2 ± 1,30 ^{ab}	10,90 ± 0,50 ^c	32,90 ± 2,50 ^{ab}	5,20 ± 0,20 ^{abc}	9,30 ± 1,30 ^a
	V2	5,51 ± 0,50 ^a	0,80 ± 0,01 ^a	47,1 ± 0,10 ^c	8,00 ± 0,00 ^b	33,25 ± 0,60 ^{ab}	5,50 ± 0,10 ^{bc}	10,50 ± 0,00 ^{ab}
	V3	5,5 ± 0,01 ^a	0,80 ± 0,01 ^a	46,9 ± 0,30 ^c	7,53 ± 0,30 ^{ab}	35,50 ± 0,30 ^{abc}	5,33 ± 0,0 ^{ab}	9,50 ± 0,20 ^{ab}

*Средње вредности ± СД; А-село Блато; Б-село Крајиновиће; В-село Расно; 1-2016/17; 2-2017/18; 3-2018/19

Просечне вредности означене истим словима у оквиру исте колоне (варијабле), не разликују се статистички значајно ($p < 0,05$).

6.2. Сензорна анализа сјеничке овчије стеље

Резултати сензорног квалитета узорка сјеничке овчије стеље узорковани у три домаћинства (А, Б, В), у три производна периода (2016/17 - 1; 2017/18 - 2; 2018/19 - 3) приказани су у Табели 2.

Сензорном анализом испитаних узорак у првом истраживаном периоду (1), нису забележена оштећења, мрље и дисколорације производа. Просечна средња оцена спољашњег изгледа (типичност облика/форме) износила је 6,86, код произвођача из села Блато (А) и Расно (В), док је производ домаћинства из Крајиновићи (Б) оцењен средњом оценом 6,75, при чему није утврђена статистички значајна разлика у оценама између узорак ($p > 0,05$). Интензитет боје на пресеку узорак у првој производној години је оцењен у интервалу средњих оцена од 3,78 – 4,5, са статистички значајном разликом код узорак из села Блато (А) ($p < 0,05$). Боја масног ткива овчије стеље је оцењена просечном средњом оценом од 6,06 - 6,22 код узорак В1, и ускладу је са Елаборатом за заштиту ознаке географског порекла. Оцена за интермускуларну

масноћу је била нешто нижа за тестиране узорке при чему се кретала од 2,81-3,67, при чему су статистички значајну разлику код поменуте особине показали узорци А1 и В1 ($p < 0,05$). Типичност мириса производа је потврђена високом оценом сензорске анализе која се кретала преко 6, средњом оценом 6,53 за узорак произвођача В1. Жвакљивост, текстура производа је оцењена средњим оценама у интервалу од 5,81 - 6,14, при чему је узорак домаћинства В био сочнији током жвакања. Сјеничка овчија стеља је производ који се одликује сланијим укусом, сензорном анализом је оцењена и ова особина у интервалу средњих оцена од 4,06 - 4,11, док је укус производа оцењен као типичан средњим оценама од 6,19 - 6,36, са статистичком разликом код узорка А1 ($p < 0,05$). Сензорном анализом је утврђено да код тестираних узорака овчије стеље у производној 16/17 години није детектована ужеглост ($X_{sr}=1$).

Сензорна анализа узорака производа друге производне године (17/18), је била ускладу са Елаборатом за заштиту ознаке географског порекла сјеничка овчија стеља. Оцена спољашњег изгледа-типичност облика/форме стеље, је била најнижа код произвођача Б2 ($X_{sr}=5,53$) код кога је $p < 0,05$, док је највишу средњу оцену добио производ из домаћинства А2 ($X_{sr}=6,50$). Боја масног ткива овчије стеље је добила средњу вредност оцене од 6,00 – 6,31, при чему није утврђена статистички значајна разлика код узорака ($p > 0,05$). Мраморираност узорака није задовољила укус оцењивача, пошто је ова особина добила нешто ниже осене у сензорној анализи ($X_{sr}=2,11 - 2,58$), док је повезаност на пресеку производа оцењен код свих узорака високом оценом преко 6, при чему је најбоље оцењен узорак А2 ($X_{sr}=6,78$).

Типичност мириса производа, жвакљивост производа и натапање пљувачком (сувоћа) су оцењене релативно високим средњим оценама у сензорној анализи друге производне године ($X_{sr} > 5,81$), уз статистичку разлику за особину типичност мириса код узорака Б2 и В2, и код узорака А2 и В2 за особину жвакљивост производа ($p < 0,05$). Укус производа оцењен сензорном анализом као типичан за производ ($X_{sr}=5,83 - 6,44$), уз статистичку разлику код узорака А2 и Б2. Мирис и укус дима у производу је био најинтензивнији код узорка А2 ($X_{sr}=4,29$), при чему је присуство ужелости у производу оцењено највишом оценом ($X_{sr}=2$) код узорка Б2, код којих бележимо и статистички значајну разлику ($p < 0,05$).

У трећој производној години (18/19), сензорном анализом узорака производа, утврђена је средња оцена спољашњег изгледа-типичност облика/форме, као најнижа код произвођача Б3 ($X_{sr}=6,02$), и највиша за узорак А3 ($X_{sr}=6,85$), са статистичком разликом и код једног и другог произвођача ($p < 0,05$). Интензитет боје на пресеку је оцењен најнижом оценом код узорака А3 ($X_{sr}=4,56$) где је $p < 0,05$, док је узорак В3 оцењен највишом оценом ($X_{sr}=5,50$). Треба напоменути да је ова оцена узорка В3 била највиша за сва три периода анализе за особину интензитета боје производа. Боја масног ткива је најбоље оцењена код узорка А3 ($X_{sr}=6,41$), док је узорак Б3 добио најгору оцену ($X_{sr}= 5,06$) и статистички се значајно разликовао од осталих узорака. Оцена за интермускуларну масноћу је била нешто нижа за узорак из домаћинства А ($X_{sr}=2,85$), док је узорак В3 оцењен највишом оценом ($X_{sr}=4,39$), код овог узорка $p < 0,05$. У сензорној анализи треће производне сезоне мраморираност узорака је добила нешто ниже оцене, као и у предходним анализама ($X_{sr}=1,74 - 5,08$) и сви упоређивани узорци су се статистички значајно разликовали. Типичност мириса производа, жвакљивост производа и натапање пљувачком (сувоћа) су оцењене високим средњим оценама преко 6, у сензорној анализи треће производне године, са статистички значајном разликом код узорка А3 ($p < 0,05$) за особине мириса и жвакљивости. Сланост је најлошије оцењена код узорака А3 ($X_{sr}=3,97$) код кога је $p < 0,05$, док су узорци Б3 и В3 оцењени од 5,64 – 5,89. Највећу оцену за укус производа је имао узорак А3 ($X_{sr}= 6,65$) ($p < 0,05$), док је најнижу оцену за мирис и укус дима у производу имао производ из

домаћинства Б3 ($X_{sr}=3,89$), при чему је и у овом случају присуство ужеглости у производу оцењено најнижом оценом ($X_{sr}< 1,50$), а резултати узорка Б3 се се статистички значајно разликовали од осталих узорака ($p<0,05$).

Табела 2. Сензорни квалитет узорака сјеничке овчије стеље

Тест група	Спољни изглед	Хомогеност боје на Пресеку	Интензитет боје на пресеку	Боја масног ткива	Интермускуларна масноћа	Мрамораност	Повезаност на пресеку	Мирис (типичност)	Жвакљивост (текстура)	Нагатање плувачком (сувоћа)	Слањост	Укус (типичност)	Мирис и укус дима	Ужгелост
A1	6,86±0,28 ^a	6,25±0,42 ^a	4,50±0,80 ^b	6,06±0,80 ^a	2,81±0,91 ^a	2,14±1,00 ^a	6,72±0,38 ^a	6,42±0,58 ^a	5,83±0,75 ^a	6,19±0,65 ^a	4,11±0,46 ^a	6,19±0,65 ^b	4,22±0,63 ^a	1,00±0,00 ^a
B1	6,75±0,38 ^a	5,89±0,52 ^a	3,78±0,45 ^a	6,17±0,62 ^a	3,39±0,76 ^{a,b}	2,39±0,86 ^a	6,81±0,3 ^a	6,22±0,61 ^a	5,81±1,11 ^a	6,33±0,62 ^a	4,08±0,25 ^a	6,36±0,62 ^a	4,36±0,36 ^a	1,00±0,00 ^a
B1	6,86±0,22 ^a	6,0±0,37 ^a	3,78±0,48 ^a	6,22±0,65 ^a	3,67±0,55 ^b	2,81±0,53 ^a	6,78±0,34 ^a	6,53±0,39 ^a	6,14±0,64 ^a	6,44±0,64 ^a	4,06±0,23 ^a	6,31±0,56 ^a	4,53±0,51 ^a	1,00±0,00 ^a
A2	6,50±0,57 ^b	6,00±0,54 ^b	4,56±0,80 ^a	6,18±0,77 ^a	2,56±0,92 ^a	2,47±0,96 ^a	6,79±0,25 ^a	6,59±0,39 ^{a,b}	6,53±0,40 ^b	6,29±0,52 ^a	4,59±0,55 ^a	6,44±0,58 ^b	4,29±0,67 ^b	1,21±0,46 ^a
B2	5,53±1,20 ^a	5,03±1,16 ^a	4,81±0,65 ^a	6,00±1,03 ^a	3,11±1,21 ^{a,b}	2,58±1,10 ^a	6,17±1,05 ^a	6,36±0,49 ^a	5,92±0,53 ^{a,b}	6,28±0,56 ^a	4,75±0,56 ^a	5,83±0,96 ^a	4,08±0,48 ^{a,b}	2,00±0,50 ^b
B2	6,47±0,61 ^b	5,95±0,67 ^b	4,89±0,74 ^a	6,31±0,65 ^a	3,89±0,61 ^b	2,11±0,59 ^a	6,53±0,72 ^a	6,78±0,29 ^b	5,81±0,73 ^a	6,31±0,67 ^a	4,78±0,89 ^a	6,39±0,57 ^{a,b}	3,64±0,52 ^a	1,14±0,28 ^a
A3	6,85±0,29 ^b	6,41±0,46 ^a	4,56±0,8 ^a	6,41±0,81 ^b	2,85±1,12 ^a	1,74±0,57 ^a	6,65±0,64 ^a	6,47±0,63 ^b	6,53±0,47 ^b	6,32±0,78 ^a	3,97±0,12 ^a	6,65±0,41 ^b	4,24±0,49 ^a	1,15±0,41 ^a
B3	6,02±0,77 ^a	6,08±0,69 ^a	5,42±0,63 ^b	5,06±1,43 ^a	3,50±0,53 ^a	5,08±0,75 ^c	5,81±1,24 ^a	6,00±1,05 ^a	6,00±0,47 ^a	6,00±0,75 ^a	5,64±0,64 ^b	5,25±1,07 ^a	3,89±0,59 ^a	1,47±0,49 ^b
B3	6,41±0,65 ^{a,b}	6,31±0,45 ^a	5,50±0,88 ^b	5,94±0,52 ^b	4,39±1,01 ^b	3,69±0,63 ^b	5,94±1,07 ^a	6,03±1,25 ^a	6,00±0,62 ^a	6,11±0,66 ^a	5,89±0,36 ^b	5,78±0,73 ^a	4,19±0,50 ^a	1,11±0,21 ^a

*Средње вредности ± СД; А-село Блато; Б-село Крајиновиће; В-село Расно; 1-2016/17; 2-2017/18; 3-2018/19

Просечне вредности означене истим словима у оквиру исте колоне (варијабле), не разликују се статистички значајно ($p < 0,05$).

6.3. Микробиолошка анализа сјеничке овчије стеље

Микробиолошка анализа узорака сјеничке овчије стеље подразумевала је карактеризацију, идентификацију и утврђивање квалитативног и квантитативног састава микробиоте производа са посебним аспектом на испитивање БМК, КНС и плесни. Резултати истраживања су представљени у Табелама од 3 до 16.

6.3.1. Испитивање присуства и бројности бактерија у узорцима сјеничке овчије стеље

Промена бројности аеробних мезофилних бактерија током технолошког процеса зрења производа и у различитим сезонама сакупљања је приказана у Табели 3. Узорци производа из сва три села у трећој сезони сакупљања су на почетку процеса зрења имали већи број мезофилних бактерија, при чему се оваква тенденција раста наставила и након стабилизације процеса ферментације када се запажа значајно повећање бројности аеробних мезофилних бактерија код свих испитиваних узорака. Повећање броја мезофилних бактерија се може уочити код свих узорака до 90-тог дана процеса зрења, након чега се запажа опадање броја аеробних мезофилних бактерија у узорцима стеље.

Резултати промене бројности бактерија из фамилије *Enterobacteriaceae* су представљени у Табели 4. Запажена је значајна разлика у бројности бактерија у процесу зрења код узорака стеље, при чему се број бактерија код свих узорака у првим данима ферментације повећава након чега полако опада до 28-ог дана и касније се присуство бактерија из фамилије *Enterobacteriaceae* у узорцима не детектује.

Микробиолошка анализа је указала на одсуство врста из рода *Salmonella* и *Listeria monocytogenes* током свих истраживачких сезона и процеса зрења у свим испитиваним домаћинствима.

Резултати промене бројности бактерија из фамилије *Pseudomonadaceae* су представљени у Табели 5. Значајна разлика броја бактерија у процесу зрења производа је примећена код свих узорака, при чему се број повећава у првим данима ферментације а након 14-тог дана присуство бактерија из фамилије *Pseudomonadaceae* у узорцима се не детектује.

Резултати бројности БМК током процеса зрења сјеничке овчије стеље су приказани у Табели 6. Значајно већи број БМК на почетку ферментације (7 дана) забележен је код узорака А3, В3 и Б2, док се код свих узорака број БМК удвостручио и наставио да расте током целог процеса зрења производа до 90 тог дана када долази до пада броја БМК у свим узорцима.

Бројност бактерија из рода *Enterococcus* током процеса зрења узорака сјеничке овчије стеље су приказани у Табели 7. У узорцима стеље долази до смањења броја ентерокока у првим данима зрења, при чему се тренд смањења наставља током читавог технолошког процеса зрења. Код узорака из села Крајиновиће (узорци В1 и Б3) и села Расно (узорак В3), 120-тог дана зрења број ентерокока пао је испод 1 log CFU/g узорка.

Промена бројности КНС у узорцима производа је приказана у Табели 8. На почетку процеса зрења запажа се значајна разлика у броју стафилокока између узорака при чему је највећи број КНС детектован нултог дана у узорку из села Блато (А1). Бројност КНС-а се повећава до 90-тог дана након чега полако опада.

Табела 3. Укупан број аеробних мезофилних бактерија

Дан зрења	Узорак								
	A1	B1	B1	A2	B2	B2	A3	B3	B3
0	5,62±0,58 ^A	6,06±1,06 ^A	6,033±0,24 ^A	6,05±0,14 ^A	5,72±0,19 ^A	5,63±0,61 ^A	6,22±0,18 ^A	6,13±0,16 ^A	6,26±0,34 ^A
7	6,94±0,03 ^A	7,09±0,12 ^{AB}	7,00±0,12 ^A	6,98±0,02 ^A	6,79±0,04 ^A	6,76±0,19 ^A	7,14±0,21 ^{AB}	7,05±0,11 ^{AB}	7,43±0,24 ^B
14	7,88±0,1 ^A	7,90±0,29 ^A	8,05±0,05 ^A	7,95±0,12 ^A	7,73±0,11 ^A	7,76±0,1 ^A	8,11±0,09 ^A	8,08±0,17 ^A	8,14±0,14 ^A
28	8,03±0,1 ^A	8,09±0,13 ^A	8,12±0,2 ^A	8,04±0,06 ^A	8,19±0,0 ^A	8,24±0,04 ^A	8,33±0,15 ^A	8,33±0,05 ^A	8,28±0,02 ^A
60	8,29±0,11 ^{AB}	8,31±0,17 ^{AB}	8,4±0,04 ^{AB}	8,20±0,080 ^A	8,68±0,0 ^B	8,41±0,06 ^{AB}	8,54±0,16 ^{AB}	8,62±0,12 ^B	8,59±0,28 ^B
90	8,48±0,08 ^B	8,50±0,08 ^B	8,49±0,03 ^B	7,99±0,09 ^A	8,64±0,05 ^B	8,48±0,13 ^B	8,59±0,04 ^B	8,66±0,04 ^B	8,54±0,12 ^B
120	8,22±0,06 ^B	8,23±0,2 ^B	8,33±0,05 ^B	7,88±0,02 ^A	8,42±0,03 ^B	8,12±0,07 ^{AB}	8,32±0,09 ^B	8,36±0,09 ^B	8,41±0,17 ^B

*Средње вредности (log CFU/g узорка) ± СД; А-село Блато; Б-село Крајиновиће; В-село Расно; 1-2016/17; 2-2017/18; 3-2018/19, Просечне вредности означене истим словима у оквиру истог дана зрења, неразликују се статистички значајно (p<0,05).

Табела 4. Укупан број бактерија из фамилије Enterobacteriaceae

Дан зрења	Узорак								
	A1	B1	B1	A2	B2	B2	A3	B3	B3
0	3,21±0,01 ^C	3,13±0,02 ^C	2,98±0,02 ^{AB}	3,39±0,05 ^D	2,88±0,02 ^A	3±0,05 ^B	3,38±0,02 ^D	2,96±0,02 ^{AB}	3,36±0,02 ^D
7	3,4±0,08 ^{AB}	3,33±0,02 ^A	3,34±0,07 ^A	3,53±0,03 ^{BC}	3,35±0,03 ^A	3,88±0,07 ^D	3,97±0,02 ^D	3,42±0,06 ^{AB}	3,6±0,05 ^C
14	2,56±0,02 ^C	2,18±0,05 ^A	2,51±0,05 ^C	2,44±0,04 ^{BC}	2,17±0,06 ^A	2,35±0,17 ^{ABC}	2,56±0,02 ^C	2,25±0,10 ^{AB}	2,45±0,04 ^{BC}
28	1,51±0,02 ^{AB}	1,26±0,22 ^{AB}	1,33±0,28 ^{AB}	1,46±0,04 ^{AB}	1,38±0,05 ^{AB}	1,16±0,14 ^A	1,65±0,15 ^B	1,17±0,02 ^A	1,51±0,09 ^{AB}
60	< 1 ^A	< 1 ^A	< 1 ^A	< 1 ^A	< 1 ^A	< 1 ^A	< 1 ^A	< 1 ^A	< 1 ^A
90	< 1 ^A	< 1 ^A	< 1 ^A	< 1 ^A	< 1 ^{aA}	< 1 ^A	< 1 ^A	< 1 ^A	< 1 ^A
120	< 1 ^A	< 1 ^A	< 1 ^A	< 1 ^A	< 1 ^A	< 1 ^A	< 1 ^A	< 1 ^A	< 1 ^A

*Средње вредности (log CFU/g узорка) ± СД; А-село Блато; Б-село Крајиновиће; В-село Расно; 1-2016/17; 2-2017/18; 3-2018/19, Просечне вредности означене истим словима у оквиру истог дана зрења, неразликују се статистички значајно (p<0,05).

Табела 5. Укупан број бактерија из фамилије Pseudomonadaceae

Дан зрења	Узорци								
	A1	B1	B1	A2	B2	B2	A3	B3	B3
0	2,25±0,22 ^A	2,31±0,01 ^A	2,38±0,01 ^A	2,28±0,04 ^A	2,45±0,04 ^A	2,46±0,02 ^A	2,38±0,06 ^A	2,34±0,11 ^A	2,3±0,09 ^A
7	2,48±0,02 ^A	2,57±0,02 ^{AB}	2,84±0,05 ^{CD}	2,51±0,01 ^A	2,93±0,02 ^{DE}	3±0,04 ^E	2,79±0,03 ^C	2,54±0,01 ^{dAB}	2,62±0,02 ^B
14	1,36±0,19 ^{ABC}	1,23±0,1 ^{AB}	1,5±0,04 ^{BC}	1,13±0,02 ^A	1,62±0,14 ^C	1,57±0,07 ^C	1,26±0,10 ^{AB}	1,15±0,02 ^A	1,49±0,12 ^{BC}
28	<1 ^A	<1 ^A	<1 ^A	<1 ^{aA}	<1 ^A	<1 ^A	<1 ^A	<1 ^A	<1 ^A
60	<1 ^A	<1 ^A	<1 ^A	<1 ^{aA}	<1 ^A	<1 ^A	<1 ^A	<1 ^A	<1 ^A
90	<1 ^A	<1 ^A	<1 ^A	<1 ^{aA}	<1 ^A	<1 ^A	<1 ^A	<1 ^A	<1 ^A
120	<1 ^{aA}	<1 ^{aA}	<1 ^{aA}	<1 ^{aA}	<1 ^A	<1 ^A	<1 ^A	<1 ^A	<1 ^A

*Средње вредности (log CFU/g узорка) ± СД; А-село Блато; Б-село Крајиновиће; В-село Расно; 1-2016/17; 2-2017/18; 3-2018/19
 Просечне вредности означене истим словима у оквиру истог дана зрења, неразликују се статистички значајно (p<0,05).

Табела 6. Укупан број бактерија млечне киселине

Дан зрења	Узорци								
	A1	B1	B1	A2	B2	B2	A3	B3	B3
0	3,12±0,33 ^A	2,73±0,21 ^A	3,06±0,06 ^A	3,06±0,23 ^A	3,11±0,14 ^A	2,97±0,02 ^A	3,37±0,41 ^A	3,14±0,15 ^A	3,13±0,15 ^A
7	5,97±0,04 ^{AB}	5,59±0,51 ^A	5,97±0,51 ^{AB}	5,77±0,33 ^{AB}	6,28±0,57 ^B	5,67±0,11 ^{AB}	6,00±0,17 ^{AB}	5,99±0,01 ^{AB}	6,09±0,17 ^{AB}
14	7,81±0,17 ^{BC}	7,25±0,15 ^A	7,82±0,16 ^{BC}	7,75±0,27 ^{BC}	7,91±0,01 ^C	7,41±0,10 ^{AB}	8,05±0,13 ^C	8,05±0,05 ^C	8,04±0,07 ^C
28	8,12±0,11 ^A	8,04±0,09 ^A	8,14±0,12 ^A	8,16±0,10 ^A	8,27±0,06 ^A	8,01±0,02 ^A	8,26±0,06 ^A	8,22±0,20 ^A	8,24±0,07 ^A
60	8,23±0,02 ^{AB}	8,20±0,00 ^A	8,32±0,04 ^{AB}	8,22±0,07 ^{AB}	8,29±0,01 ^{AB}	8,23±0,09 ^{AB}	8,37±0,03 ^{AB}	8,39±0,10 ^B	8,39±0,06 ^B
90	8,38±0,02 ^A	8,35±0,04 ^A	8,34±0,17 ^A	8,22±0,07 ^A	8,41±0,10 ^A	8,36±0,11 ^A	8,45±0,04 ^A	8,44±0,08 ^A	8,45±0,06 ^A
120	8,21±0,20 ^A	8,15±0,05 ^A	8,27±0,02 ^A	8,14±0,12 ^A	8,15±0,13 ^A	8,21±0,05 ^A	8,36±0,04 ^A	8,35±0,08 ^A	8,32±0,04 ^A

*Средње вредности (log CFU/g узорка) ± СД; А-село Блато; Б-село Крајиновиће; В-село Расно; 1-2016/17; 2-2017/18; 3-2018/19
 Просечне вредности означене истим словима у оквиру истог дана зрења, не разликују се статистички значајно (p<0,05).

Табела 7. Укупан број врста из рода *Enterococcus*

Дан зрења	Узорци								
	A1	B1	B1	A2	B2	B2	A3	B3	B3
0	3,25±0,06 ^A	3,29±0,29 ^A	3,33±0,33 ^A	3,55±0,05 ^A	3,04±0,11 ^A	3,00±0,09 ^A	3,31±0,32 ^A	3,42±0,07 ^A	3,35±0,04 ^A
7	3,16±0,16 ^A	3,00±0,05 ^A	2,95±0,00 ^A	3,14±0,30 ^A	2,80±0,11 ^A	2,94±0,35 ^A	2,88±0,09 ^A	2,99±0,01 ^A	3,19±0,40 ^A
14	3,00±0,05 ^A	2,56±0,03 ^A	2,82±0,04 ^A	2,95±0,05 ^A	2,63±0,24 ^A	2,72±0,12 ^A	2,68±0,36 ^A	2,5±0,43 ^A	2,82±0,32 ^A
28	2,86±0,03 ^C	2,24±0,08 ^{AB}	2,14±0,03 ^A	2,60±0,35 ^{BC}	2,27±0,02 ^{AB}	2,38±0,12 ^{AB}	2,4±0,08 ^{AB}	2,23±0,04 ^{AB}	2,24±0,07 ^{AB}
60	2,55±0,03 ^D	2,15±0,08 ^{ABC}	2,06±0,07 ^{AB}	2,32±0,02 ^C	2,00±0,05 ^A	2,13±0,02 ^{AB}	2,22±0,04 ^{BC}	2,00±0,02 ^A	2,00±0,13 ^A
90	2,24±0,28 ^D	2,00±0,10 ^{BCD}	1,84±0,12 ^{BC}	2,14±0,01 ^{CD}	2,00±0,02 ^{CD}	1,93±0,07 ^{BCD}	2,14±0,01 ^{CD}	1,44±0,17 ^A	1,63±0,07 ^{BA}
120	2,12±0,17 ^C	1,93±0,05 ^{BC}	<1 ^A	2,00±0,13 ^{BC}	1,95±0,02 ^{BC}	1,80±0,08 ^B	1,94±0,1 ^{BC}	<1 ^A	<1 ^A

*Средње вредности (log CFU/g узорка) ± СД; А-село Блато; Б-село Крајиновиће; В-село Расно; 1-2016/17; 2-2017/18; 3-2018/19
 Просечне вредности означене истим словима у оквиру истог дана зрења, не разликују се статистички значајно (p<0,05).

Табела 8. Укупан број врста из рода *Staphylococcus*

Дан Зрења	Узорци								
	A1	B1	B1	A2	B2	B2	A3	B3	B3
0	3,61±0,01 ^B	3,58±0,32 ^B	3,05±0,13 ^A	3,27±0,02 ^{AB}	3,13±0,05 ^A	3,05±0,13 ^A	3,51±0,01 ^B	3,35±0,0 ^{AB}	3,33±0,05 ^{AB}
7	3,94±0,03 ^A	4,03±0,10 ^A	3,86±0,27 ^A	3,86±0,02 ^A	3,82±0,15 ^A	3,88±0,07 ^A	3,97±0,02 ^A	3,98±0,00 ^A	3,95±0,04 ^A
14	4,03±0,10 ^A	4,29±0,04 ^C	4,17±0,00 ^{ABC}	4,24±0,04 ^{BC}	4,14±0,09 ^{ABC}	4,09±0,01 ^{AB}	4,17±0,04 ^{ABC}	4,25±0,05 ^{BC}	4,18±0,04 ^{ABC}
28	4,85±0,05 ^A	4,96±0,02 ^A	4,81±0,16 ^A	4,95±0,03 ^A	5,05±0,13 ^A	5,01±0,14 ^A	4,98±0,02 ^A	5,03±0,13 ^A	5,02±0,12 ^A
60	4,21±0,01 ^C	3,94±0,09 ^{AB}	4,06±0,07 ^{ABC}	3,93±0,02 ^{AB}	4,00±0,05 ^{ABC}	3,80±0,08 ^A	4,00±0,05 ^{ABC}	4,21±0,2 ^C	4,00±0,00 ^{ABC}
90	3,61±0,03 ^{ABC}	3,50±0,01 ^{AB}	3,85±0,13 ^C	3,50±0,01 ^{AB}	3,71±0,02 ^{BC}	3,33±0,07 ^A	3,68±0,27 ^{BC}	3,78±0,05 ^{BC}	3,71±0,05 ^{BC}
120	3,43±0,01 ^A	3,39±0,30 ^A	3,65±0,14 ^A	3,18±0,20 ^A	3,65±0,00 ^A	3,08±0,48 ^A	3,26±0,02 ^A	3,33±0,14 ^A	3,51±0,10 ^A

*Средње вредности (log CFU/g узорка) ± СД; А-село Блато; Б-село Крајиновиће; В-село Расно; 1-2016/17; 2-2017/18; 3-2018/19
 Просечне вредности означене истим словима у оквиру истог дана зрења, не разликују се статистички значајно (p<0,05).

6.3.2. Идентификација БМК изолата

Из 9 испитиваних узорака сјеничке овчије стеље изоловано је 432 Грам-позитивних и каталаза-негативних изолата који су припадали групи БМК. Идентификација изолата до нивоа рода урађена је применом стандардних физиолошких и биохемијских тестова. Након идентификације бактерија до нивоа рода, извршена је прелиминарна идентификација до нивоа врсте уз помоћ система за идентификацију API CH50 (за врсте из родова *Lactobacillus* и *Leuconostoc*) (Табела 9) и API 20 STREP (за врсте из рода *Enterococcus*) (Табела 10).

Хомоферментативне штапићасте бактерије са негативном реакцијом на аргинин су најпре детерминисани као *Lactobacillus* spp., а затим су према обрасцу ферментације шећера (без ферментације ескулина, манитола, и ксилозе), идентификовани као *L. curvatus* и *L. sakei*. Хомоферментативни лактобацили са способношћу ферментације манитола и лактозе детерминисани су као *L. plantarum*. Сви *L. curvatus* изолати су имали позитивну реакцију ферментације сахарозе и целобиозе, нису ферментисали салицин и арабинозу. *L. sakei* сојеви су показали позитивне тестове ферментације салицина и негативан тест ферментације лактозе. Хетероферментативни кокобацили са позитивном реакцијом синтезе ЕПС, најпре су идентификовани *Leuconostoc* sp., а према обрасцима ферментације шећера као *L. mesenteroides*.

Табела 9. Прелиминарна идентификација врста из родова *Lactobacillus* и *Leuconostoc*

Врсте	<i>L. curvatus</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. mesenteroides</i>
Број тестираних изолата	213	175	9	17
Морфологија	Бацил	Бацил	Бацил	Кокобацил
Производња гаса из глукозе	-	-	-	+
Производња егзополисахарида	-	-	-	+
Хидролиза аргинина	-	-	-	-
Хидролиза ескулина	-	-	-	-
Раст на ескулин жучном агару	-	-	-	-
D-рибоза	+	+	+	+
Галактоза	+	+	+	+
Глукоза	+	+	+	+
Фруктоза	+	+	+	+
D-маноза	+	+	+	+
D-манитол	-	-	+	+
D-трехалоза	-	+	+	+
D-лактоза	+	-	+	+
D-малтоза	+	+	+	+
D-целобиоза	+	+	+	+
D-тагатоza	-	-	-	+
D-фукоза	+	+	-	-
L-фукоза	+	+	-	-
D-арабитол	-	-	-	-
L-арабитол	-	-	-	-
D-арабиноза	-	-	-	-
L-арабиноза	-	+	+	+
D-ксилоза	-	-	-	+
L-ксилоза	-	-	-	-

D-сорбоза	-	-	-	-
L-рамноза	-	-	-	+
Галактитол	-	-	-	-
Амигдалин	-	-	+	+
Салицин	-	+	+	+
Инулин	-	-	-	-
Амодон	-	-	-	+
Гликоген	-	-	-	-
Индоситол	-	-	-	-
Ксилитол	-	-	-	-
Глицерол	-	-	-	-
Еритритол	-	-	-	+
К-глукокат	-	-	+	-
К-2-кетоглукокат	-	-	-	-
К-5-кетоглукокат	-	-	-	-

„+“ – позитивна реакција; „-“ – негативна реакција; „+/-“ – делимично позитивна реакција

Изолати који су добро расли на ескулин жучном агару са црним колонијама и са позитивном реакцијом ферментације аргинина и ескулина, прелиминарно су идентификовани као *Enterococcus* spp. Према обрасцима ферментације шећера даља идентификација ентерокока до нивоа врсте се свела на детерминацију *E. faecium* и *E. faecalis*.

Табела 10. Прелиминарна идентификација врста из рода *Enterococcus*

Врста		<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
Број тестираних изолата		30	7
Морфологија		Кока	Кока
Продукција гаса из глукозе		-	-
Продукција егзополисахарида		+/-	-
Хидролиза аргинина		+	+
Хидролиза ескулина		+	+
Продукција егзополисахарида		+/-	-
Раст на ескулин жучном агару		+	+
API 20 STREP тест	Рибоза	+	+
	Арабиноза	+	-
	Манитол	+	-
	Сорбитол	-	-
	Лактоза	+	+
	Трехалоза	+	-
	Инулин	-	-
	D-рафиноза	-	-
	Скроб	+	-
	Гликоген	-	-

„+“ – позитивна реакција; „-“ – негативна реакција; „+/-“ – делимично позитивна реакција

Прелиминарна идентификација изолата БМК потврђена је применом МАЛДИ ТОФ масене спектрофотометрије. Вредности оцена $\geq 2,000$ (зелена боја) узете су као тачна идентификација до нивоа врсте (видети прилоге). За сваки одабрани изолат је потврђена предходно урађена идентификација преко биохемијских система за идентификацију.

Резултати заступљености изолата БМК у узорцима овчије стеље и разлике у саставу заједнице у односу на произвођаче и сезоне су представљени у Табели 11.

Табела 11. Заступљеност изолата бактерија млечне киселине у сјеничкој овчијој стељи

Врсте	Произвођачи/сезоне										
	А1	Б1	В1	А2	Б2	В2	А3	Б3	В3	Укупно	(%)
<i>L. curvatus</i>	19	20	22	29	31	28	24	19	21	213	48,21
<i>L. sakei</i>	23	24	20	9	10	9	27	25	28	175	41,76
<i>L. plantarum</i>	2	1	0	0	1	0	0	2	3	9	0,47
<i>L. mesenteroides</i>	3	1	3	0	0	0	4	5	1	17	1,67
<i>E. faecium</i>	4	1	5	2	3	3	2	5	5	30	7,16
<i>E. faecalis</i>	0	2	2	0	0	0	0	1	2	7	0,72
Укупно	51	46	52	40	44	40	57	58	55	443	100,00

*Средње вредности (log CFU/g узорка) \pm СД; А-село Блато; Б-село Крајиновиће; В-село Расно; 1-2016/17; 2-2017/18; 3-2018/19

Од укупног броја изолованих БМК, идентификовано је укупно 6 врста, од којих је 1,67% изолата припадало роду *Leuconostoc*, 7,87% роду *Enterococcus*, и највећи проценат, 90,44% је припадало роду *Lactobacillus*. *L. mesenteroides* (17 изолата) је изолована у првој и трећој истраживачкој години, код свих произвођача, док у другој години истраживања изолати ове врсте нису детектовани. У оквиру рода *Enterococcus*, идентификоване су две врсте: *E. faecium* (30 изолата) у свим истраживачким периодима и код свих произвођача и *E. faecalis* (7 изолата) у првом и трећем периоду истраживања у узорцима из села Крајиновиће и Расно. У оквиру рода *Lactobacillus*, идентификоване су две врсте: *L. curvatus* (213 изолата), *L. sakei* (175 изолата) док је у оквиру рода *Lactiplantibacillus* идентификована врста *L. plantarum* (9 изолата). Највећи број изолата врста *L. curvatus* и *L. sakei* је добијен током свих истраживачких година код свих произвођача, док су изолати врсте *L. plantarum* изоловани и идентификовани код произвођача/сезоне А1, Б1, Б2, Б3 и В3.

6.3.3. Идентификација коагулаза-негативних стафилокока

Из испитиваних узорака сјеничке овчије стеље изоловано је 376 Грам-позитивних и каталаза-позитивних изолата који су припадали групи КНС-а. Карактеризација и прелиминарна идентификација стафилокока је спроведена применом стандардних физиолошких и биохемијских тестова. Резултати су приказани у Табели 12.

Табела 12. Прелиминарна идентификација врста из рода *Staphylococcus*

Врста	<i>S. xylosus</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. epidermidis.</i>	<i>S. equorum</i>
Морфологија	Кока	кока	Кока	кока	Кока
Боја колонија	Наранџаста	сива	тамно жута	сива	Бела
Коагулаза плазме	-	-	-	-	-
Ферментација манитола	+	+	-	-	-
Хемолиза на крвном агару	γ	γ	γ	γ	γ
Осетљивост на новобиоцин	Р	О	Р	О	О

„+“ – позитивна реакција; „-“ – негативна реакција; „R“ – резистентно; „O“ – осетљиво

На основу тестова, прелиминарно је идентификовано пет врста КНС у узорцима сјеничке овчије стеље. Изолати *S. epidermidis* су се одликовали колонијама сиве боје, без ферментације манитола и без хемолитичке активности, са зоном осетљивости на новобиоцин. Изолати *S. saprophyticus* су имали округле колоније тамно жуте боје, без ферментације манитола и без хемолитичке активности, са резистенцијом на новобиоцин. Изолати *S. carnosus* су имали непрозирне сиве сјајне колоније, одликовали су се: добром ферментацијом манитола, без хемолитичке активности на крвним плочама, и зоном осетљивости на новобиоцин. *S. xylosus* изолати су се одликовали жуто-наранџастом бојом колонија, добром ферментацијом манитола, белим колонијама на крвним плочама без хемолитичке активности, и присутном резистенцијом на новобиоцин. *S. equorum* изолати се одликују белим, сјајним и непрозирним колонијама, са добром ферментацијом манитола, без појаве хемоллизе на крвним плочама и зоном осетљивости на новобиоцин.

Прелиминарна идентификација изолата КНС потврђена је применом МАЛДИ ТОФ масене спектрофотометрије. Вредности оцена $\geq 2,000$ (зелена боја) узете су као тачна идентификација до нивоа врсте (видети прилоге). За сваки одабрани изолат је потврђена предходно урађена идентификација преко биохемијских система за идентификацију. Заступљеност изолата је представљена у Табели 13.

Табела 13. Заступљеност изолата *Staphylococcus* spp. у сјеничкој овчијој стељи

	Произвођачи/сезоне									Укупно	(%)
	A1	B1	B1	A2	B2	B2	A3	B3	B3		
<i>S. equorum</i>	17	20	20	19	11	13	15	18	19	152	40,42
<i>S. xylosus</i>	13	5	12	14	12	15	10	10	12	103	27,39
<i>S. carnosus</i>	8	9	10	2	2	5	7	11	10	64	17,02
<i>S. saprophyticus</i>	7	9	2	0	10	5	5	0	8	46	12,23
<i>S. epidermidis</i>	2	1	4	0	0	0	2	2	0	11	2,92
Укупно	47	44	48	35	35	38	39	41	49	376	10,00

*Средње вредности (log CFU/g узорка) \pm СД; А-село Блато; Б-село Крајиновиће; В-село Расно; 1-2016/17; 2-2017/18; 3-2018/19

Врста *S. epidermidis* (11 изолата, 2,92%) је изолована у првој производној години код свих произвођача. У другој години истраживања ова врста није детектована. У трећој години истраживања, изолати ове врсте су детектовани у узорцима из домаћинства села Блато и Крајиновиће. Врста *S. saprophyticus* (46 изолата, 12,23%) је изолована у првој производној години код свих произвођача. Друге производне године, *S. saprophyticus* је изолован код произвођа из села Крајиновиће и Расно. У трећој години истраживања ова врста је детектована код узорака из домаћинства села Блато и Расно. *S. carnosus* (64 изолата, 17,2%), *S. xylosus* (103 изолата, 27,39%) и *S. equorum* (151 изолат, 40,42%) су врсте које су изоловане из узорака стеље свих произвођача у свим истраживачким периодима.

6.3.5. Карактеризација и идентификација плесни изолованих из сјеничке овчије стеље

Промена бројности плесни у процесу производње овчије стеље кроз домаћинства и сезоне је приказна у Табели 14. На почетку зрења производа није утврђено значајно присуство плесни све до 28-ог дана, када се бележи повећање броја плесни у узорцима које се наставља током целог процеса зрења месног производа.

Табела 14. Укупан број плесни

Дан Зрења	Узорци								
	А1	Б1	В1	А2	Б2	В2	А3	Б3	В3
0	<1 ^А	<1 ^А	<1 ^А	<1 ^А	<1 ^А	<1 ^А	<1 ^А	<1 ^А	<1 ^А
7	<1 ^А	<1 ^А	<1 ^А	<1 ^А	<1 ^А	<1 ^А	<1 ^А	<1 ^А	<1 ^А
14	<1 ^А	<1 ^А	<1 ^А	<1 ^А	<1 ^А	<1 ^А	<1 ^А	<1 ^А	<1 ^А
28	1,41±0,05 ^{ABC}	1,61±0,19 ^{BC}	1,58±0,01 ^{BC}	1,27±0,01 ^А	1,65±0,14 ^С	1,5±0,04 ^{ABC}	1,36±0,07 ^{AB}	1,27±0,02 ^А	1,32±0,04 ^А
60	3,66±0,02 ^D	3,83±0,07 ^D	3,28±0,05 ^С	3,18±0,02 ^{BC}	3,95±0,05 ^D	2,82±0,13 ^А	2,9±0,13 ^{AB}	3,34±0,04 ^С	2,93±0,22 ^{AB}
90	4,08±0,07 ^{BC}	4,27±0,06 ^С	3,98±0,07 ^В	4,2±0,01 ^{BC}	4,3±0,1 ^С	4,12±0,11 ^{BC}	3,97±0,13 ^В	3,64±0,15 ^А	4,11±0,02 ^{BC}
120	5,06±0,07 ^{AB}	5,27±0,06 ^{BC}	4,95±0,05 ^А	5,12±0,11 ^{ABC}	5,36±0,03 ^С	5,05±0,08 ^{AB}	5,12±0,17 ^{ABC}	5±0,1 ^{AB}	5,08±0,1 ^{AB}

*Средње вредности (log CFU/g узорка) ± СД; А-село Блато; Б-село Крајиновиће; В-село Расно; 1-2016/17; 2-2017/18; 3-2018/19

Из испитиваних узорака сјеничке овчије стеље изоловано је укупно 221 изолата плесни. Највећи број изолата добијен је код произвођача из села Блато и Крајиновићи у другој производној години, односно код произвођача из села Блато и Расно у трећој производној години. Карактеризацијом и идентификацијом изолованих плесни (табела 15), детерминисано је укупно 4 рода, при чему је најдоминантнији род *Penicillium*.

У оквиру рода *Penicillium* идентификовано је девет врста: *P. carneum* (22 изолата), *P. caseifulvum* (21 изолат), *P. corylophilum* (18 изолата), *P. confertum* (16 изолата), *P. crustosum* (5 изолата), *P. nalgiovense* (46 изолата), *P. rugulosum* (17 изолата), *P. polonicum* (9 изолата) и *P. solitum* (31 изолата). У оквиру рода *Aspergillus*, идентификоване су две врсте: *A. niger* (3 изолата), *A. nidulans* (3 изолата), док су у оквиру рода *Eurotium* идентификоване две врсте: *E. herbariorum* (9 изолата) и *E. chevalieri* (15 изолата). *M. racemosus* (3 изолата) и *M. plumbeus* (3 изолата) су изоловане врсте у оквиру рода *Mucor*.

Табела 15. Карактеризација и идентификација изолованих плесни

Род	Врста	Дијаметар колонија (mm)	Боја колонија	Боја наличја колонија	Боја мицелија	Присуство ексудата	Текстура колоније	Микроскопске карактеристике	Синтеза микотоксина
<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i>	<60	црна	бледо жута	бела	+/-	Велутиозна	Хифе септиране, конидиофоре асексуалне структуре, збијене метуле и фијалиде, везикуле лоптасте, конидије сферичне	нафто- γ -пирон, малформин, охратоксин А (неколико изолата)
	<i>A. nidulans</i> (телеоморф <i>Emericella nidulans</i>)	50-60	маслинасто зелена	браон	бела	+	Флокозна	Хифе септиране, конидиофоре кратке, везикуле поулоптасте са метулама и фијалидама, конидије сферичне	стеригматоцистин
<i>Eurotium</i>	<i>E. herbariorum</i>	3-20 (25)	жуто зелена	жуто браон	сиво бела	+/-	Велутиозна	Хифе септиране, конидиофоре глатких зидова, везикуле лоптасте, конидије сферичне	ехинулин, фискион, стеригматоцистин
	<i>E. chevalieri</i>	16-25	жуто наранџаста	наранџасто браон	светло жута	-	велутиозна до флокозне	Хифе септиране конидиофоре глатких зидова, везикуле лоптасте конидије елипсоидне	ехинулин, неоехинулин, фискион (према неким ауторима)
<i>Mucor</i>	<i>M. racemosus</i>	<40	прљаво бела, светло браон	светло браон	безбојан	-	флокозна, ретка	Хифе несептиране, спорангиофоре кратке, лоптастог облика, спорангија са велики бројем елипсоидних спорангиоспора	/
	<i>M. plumbeus</i>	<50	тамно сива	бледа	бели	-	флокозна, густа	Хифе несептиране, спорангије сиве до браон, спорангиоспоре сферичне	/
<i>Penicillium</i>	<i>P. carneum</i>	35-53	зеленкасто сива	беж до браон	бела	+/-	Велутиозна	Хифе септиране, конидије глатке округле, фијалиде цилиндричне, метуле цилиндричне	Патулин, пенитрем А, микофенолна киселина, пеницилна киселина, рокфортини
	<i>P. caseifulvum</i>	15-24	зеленкасто сива	смеђе жута	бела	+	Флокозна	Хифе септиране, конидиофоре настале из ваздушних хифа, конидије елипсоидне, метуле цилиндричне	ругуловазин А

<i>P. corylophilum</i>	10-20	сивозелене	смеђа	бела	+	Велутиозна	Хифе септиране, конидиофоре глатке, метуле дугачке неједнаке, конидије сферичне	/
<i>P. confertum</i>	22-25	сивозелене	крем до беж	бела	+	Велутиозна	Хифе септиране, конидиофоре тервертицилате, метуле цилиндричне, конидије елипсоидне	астелтоксин
<i>P. crustosum</i>	30-40	сивозелене	бледо жута	бела	+	Велутиозна	Хифе септиране, конидиофоре тервертицилате, метуле цилиндричне, конидије сферичне	пенирем А и рокефортин Ц
<i>P. nalgiovense</i>	28-35	бела до загасито зелена	бледо плава	бела	+	велутиозна	Хифе септиране, конидиофоре настале из површинских хифа, метуле цилиндричне, конидије сферичне	/
<i>P. rugulosum</i>	8-12	сивкасто зеленкаста	браонкаста	прљаво бела	+/-	велутиозна	Хифе септиране, метуле цилиндричне, конидије елипсоидне	руголозин
<i>P. polonicum</i>	24-43	плаво зелена	жуто смеђа	бела	+	велутиозна	Хифе септиране, конидиофоре тервертицилате, метуле цилиндричне, конидије сферичне	пеницилна киселина, нефротоксични гликопептиди, верукозидин, циклопенин, циклопенол
<i>P. solitum</i>	22-28	тамно зелена	крем до светло беж	бела	+/-	велутиозна	Хифе септиране, метуле цилиндричне, конидије сферичне	циклопенин, циклопенол

*Карактеризација и идентификација изолованих плесни је извршена према Pitt & Hocking (2009); Samson & Frisvard (2004a); Kocić-Tanackov, (2012).

Заступљеност и бројност плесни изолованих са узорака од различитих произвођача и у различитим периодима узорковања указују на разлике у саставу заједница (Табела 15). Врста *A. niger* је изолована у свим узорцима из села Крајиновиће (Б), док је *A. nidulans* изолована само у првој сезони истраживања (2016/17) код узорака из села Блато и Расно. Врсте из рода *Eurotium* су детектоване у свим истраживаним производним годинама и код свих произвођача осим код произвођача из села Блато у првој производној години. *M. racemosus* је изолован у две производне године код узорака из села Блато (узорци А1 и А2), док је *M. plumbeus* детектован у код произвођача из села Крајиновиће и Расно (узорци Б2; Б3 и В3). Врсте *P. nalgiovense* и *P. solitum* су детектоване код свих узорака стеље и у свим истраживаним производним годинама. *P. caseifulvum* и *P. corylophilum* нису детектовани у узорцима стеље произвођача из села Блато и Расно (узорак В1, А1, А2). Врсте *P. carneum*, *P. confertum*, *P. crustosum*, *P. rugulosum* и *P. polonicum* су се одликовале јединственим диверзитетом и заступљеношћу у зависности од сезоне и произвођача. Детаљни резултати су приказани у Табели 16.

Табела 16. Заступљеност изолата плесни у сјеничкој овчијој стељи

Врсте	Произвођачи/сезоне										
	А1	Б1	В1	А2	Б2	В2	А3	Б3	В3	Укупно	(%)
<i>A. niger</i>	/	1	/	/	1	/	/	1	/	3	1,35
<i>A. nidulans</i>	1	/	2	/	/	/	/	/	/	3	1,35
<i>E. herbariorum</i>	/	4	/	1	/	1	2	1	/	9	4,07
<i>E. chevalieri</i>	/	/	2	5	1	/	3	2	2	15	6,78
<i>M. racemosus</i>	1	/	/	2	/	/	/	/	/	3	1,35
<i>M. plumbeus</i>	/	/	/	/	1	/	/	1	1	3	1,35
<i>P. carneum</i>	2	/	/	9	3	3	/	5	/	22	9,95
<i>P. caseifulvum</i>	4	3	/	/	1	1	5	2	5	21	9,50
<i>P. corylophilum</i>	/	5	/	1	3	1	2	5	1	18	8,14
<i>P. confertum</i>	/	/	6	/	/	4	4	/	2	16	7,23
<i>P. crustosum</i>	/	1	3	/	/	1	/	/	/	5	2,26
<i>P. nalgiovense</i>	2	2	6	5	9	5	5	7	5	46	20,81
<i>P. rugulosum</i>	6	/	2	/	4	2	/	/	3	17	7,69
<i>P. polonicum</i>	2	/	1	2	2	/	2	/	/	9	4,07
<i>P. solitum</i>	5	3	2	2	2	5	3	3	6	31	14,02
Укупно	23	20	24	27	27	23	27	27	25	221	100

*Средње вредности \pm СД; / - нису детектоване у узорку; А-село Блато; Б-село Крајиновиће; В-село Расно; 1-2016/17; 2-2017/18; 3-2018/19

6.3.6. Утицај хемијских параметара на развој аутохтоне микробиоте сјеничке овчије стеље

Утицај хемијских параметара на развој микробиоте сјеничке овчије стеље је испитан кроз корелациону анализу између броја микроорганизама и хемијских параметара квалитета. Резултати анализе су представљени у Табелама од 1 до 7 (видети прилоге).

Резултати корелационе анализе испитиваних хемијских параметара и бројности аеробних мезофилних бактерија током зрења сјеничке овчије стеље показују статистички негативну колерацију у односу на садржај пепела и броја аеробних мезофилних бактерија

нултог и четрнаестог дана процеса производње ($r=-0,750$, $P<0,05$; $r=-0,763$, $P<0,05$), као и статистички значајну позитивну корелацију између броја аеробних мезофилних бактерија и рН вредности, четрнаестог дана производње ($r=0,705$, $P<0,05$).

Анализом промене бројности бактерија из фамилије *Enterobacteriaceae* и хемијских параметара сјеничке овчије стеље је утврђена позитивна корелација нултог дана истраживања између броја бактерија и рН вредности ($r =0,737$, $P<0,05$); седмог и четрнаестог дана ($r =0,729$, $P<0,05$; $r =0,684$, $P<0,05$) између броја бактерија и садржаја воде, и 28-мог дана између броја бактерија и a_w вредности. Негативна корелација је дефинисана у случају садржаја масти и броја ентеробактерија седмог дана истраживања ($r = -0,678$, $P<0,05$).

Број бактерија из фамилије *Pseudomonadaceae* је био у статистици значајној корелацији седмог и 14-наестог дана истраживања са садржајем пепела и садржајем соли ($r =0,668$, $P<0,05$; $r = 0,677$, $P<0,05$ односно $r =0,777$, $P<0,05$; $r = 0,808$, $P<0,05$). Такође је утврђена статистички негативна корелација између броја бактерија из фамилије *Pseudomonadaceae* и садржаја протеина и рН вредности, 14-наестог дана истраживања ($r = -0,791$, $P<0,05$; $r = -0,697$, $P<0,05$).

Током зрења сјеничке овчије стеље, није утврђена статистичка корелација између броја БМК и хемијских параметара квалитета током 120 дана производног процеса.

Резултати корелационе анализе бројности врста из рода *Enterococcus* и хемијских параметара квалитета током зрења стеље, показују статистички негативну корелацију у садржају пепела и садржају соли нултог дана процеса производње ($r=- 0,874$, $P<0,05$; $r=- 0,852$, $P<0,05$). Статистички значајна корелација између бројности врста из рода *Enterococcus* и количине протеина и рН вредности је детектована нултог дана производње ($r=0,738$, $P<0,05$; $r=0,723$, $P<0,05$).

Током зрења сјеничке овчије стеље утврђена је позитивна корелација у промени бројности врста из рода *Staphylococcus* и садржаја масти, 120-тог производног дана ($r =0,692$, $P<0,05$), док негативна корелација није утврђена ни код једног параметра квалитета и бројности овог рода бактерија.

Значајан утицај параметара квалитета на промену броја плесни је дефинисан кроз статистички позитивну корелацију утврђену кроз период зрења овчије стеље, односно садржаја масти и броја плесни 28-мог и 60-тог дана ($r =0, 863$, $P<0,05$; $r= 0,871$, $P<0,05$). Статистички негативну корелација је детектована између бројности плесни и садржаја протеина (28-мог и 90-сетог дана), воде (60-тог дана) и рН вредности (28-осмог дана истраживања) ($r =-0,863$, $P<0,05$; $r = -0,696$, $P<0,05$; $r =-0,936$, $P<0,05$; $r = -0,777$, $P<0,05$).

6.4. Технолошке особине аутохтоне микробиоте сјеничке овчије стеље

Резултати испитивања технолошких особина изоловане аутохтоне микробиоте сјеничке овчије стеље су приказани у Табелама 17-19.

6.4.1. Технолошке особине бактерија млечне киселине и коагулаза-негативних стафилокока

Испитивање технолошких особина аутохтоних изолата БМК и КНС је подразумевало испитивање способности раста изолата на различитим температурама (4°C, 15°C, 45°C и 50°C), раст на подлогама са различитим вредностима рН (4, 5, 6 и 8), раст на различитим концентрацијама соли (4%, 6,5% и 8%), као и испитивање протеолитичке и липолитичке активности изолата. Технолошке особине су тестиране за 819 бактеријских изолата, односно 443 БМК изолата и 376 КНС изолата.

Изолати из рода *Lactobacillus* су показали способност раста на температури до 45°C као и на свим тестираном концентрацијама соли и различитим рН вредностима, али нису показали протеолитичку ни липолитичку активност. Изолати који су припадали врстама *L. plantarum* и *L. mesenteroides* расли су на температури до 15°C, на концентрацијама соли до 6,5% и рН вредностима изнад 5. Изолати *L. mesenteroides* су показали протеолитичку активност. Изолати који су припадали врстама *E. faecium* и *E. faecalis* су расли на температурама до 15°C и на свим концентрацијама соли. *E. faecium* изолати су расли на свим тестираним рН вредностима, док су изолати *E. faecalis* расли на рН вредностима већим од 6. Изолати обе врсте ентерокока су показали протеолитичку и липолитичку активност. Резултати су приказани у Табели 17.

Табела 17. Технолошке карактеристике бактерија млечне киселине изолованих из сјеничке овчије стеље

Технолошке карактеристике	Врста	<i>L. curvatus</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. mesenteroides</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>
	Број изолата	213	175	9	17	30	7
Температура	4°C	+	+	-	-	+	+
	15°C	+	+	+	+	+	+
	45°C	+	+	-	-	-	-
	50°C	-	-	-	-	-	-
рН вредност	4,0	+	+	-	-	+	-
	5,0	+	+	+/-	+/-	+	-
	6,0	+	+	+	+	+	+
	8,0	+	+	+	+	+	+
% NaCl	4,0%	+	+	+	+	+	+
	6,5%	+	+	+	+	+	+
	8,0%	+	+	-	-	+	+
Липолитичка активност		-	-	-	-	+	+
Протелитичка активност		-	-	-	+	+	+

„ + “- позитивна реакција; „ - “- негативна реакција; „ +/- “- делимично позитивна реакција

Сви тестирани изолати који су припадали групи КНС су показали способност раста на различитим рН вредностима подлога и на свим концентрацијама соли. Сви изолати су показали способност раста на температури до 15°C, док су изолати врста *S. carnosus* и *S. epidermidis* расли и на 45°C. Једино изолати врсте *S. saprophyticus* нису показали протеолитичку и липолитичку активност, док изолати врсте *S. epidermidis* нису показали протеолитичку активност. Резултати су приказани у Табели 18.

Табела 18. Технолошке карактеристике коагулаза-негативних стафилокока изолованих из сјеничке овчије стеље

Технолошке карактеристике	Врста	<i>S. xylosus</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>S. Saprophyticus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. equorum</i>
	Број изолатата	103	64	46	11	152
Температура	4°C	+	+	+	+	+
	15°C	+	+	+	+	+
	45°C	-	+	-	+	-
	50°C	-	-	-	-	-
рН вредност	4,0	+	+	+	+	+
	5,0	+	+	+	+	+
	6,0	+	+	+	+	+
	8,0	+	+	+	+	+
% NaCl	4,0%	+	+	+	+	+
	6,5%	+	+	+	+	+
	8,0%	+	+	+	+	-
Липолитичка активност		+	+	-	+	+
Протеолитичка активност		+	+	-	-	+

„ + “- позитивна реакција; „ - “- негативна реакција

6.4.2. Утицај различитих услова средине на раст аутохтоних изолатата плесни

Утицај различитих услова средине на раст аутохтоних изолатата плесни подразумевало је испитивање способности раста изолатата на различитим температурама (5°C, 15°C и 37°C), раст на различитој рН средине (4, 7 и 10) као и раст на различитим концентрацијама соли (4, 6,5 и 8%). Поред тога, испитан је утицај активности воде на раст одабраних плесни.

На основу резултата се може закључити да су, изолати плесни највише осетљиви на температуру од 37°C, концентрацију соли од 8% и рН 10. Изолати из рода *Penicillium* су показали осетљивост на 37°C и рН 10. Врста *P. solitum* је показао раст на рН 10, док није растао на рН 4. *M. plumbeus* је није показао пораст у средини са рН 4, рН 10, али је успешно растао у средини са 4 и 6,5% соли. *A. niger* и *A. nidulans* су успешно расли на температурама од 15°C и 37°C као и у условима средине са 4 и 6,5% соли. (Табела 19).

Табела 19. Утицај различитих услова средине на раст аутохтоних изолата плесни

Параметри			Температура			NaCl			pH		
Род	Врста	Број изолата	5°C	15°C	37°C	4%	6,5%	8%	4	7	10
<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i>	3	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	<i>A. nidulans</i>	3	-	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>Eurotium</i>	<i>E. herbariorum</i>	9	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	<i>E. chevalieri</i>	15	+	+	+	+	-	-	-	+	+
<i>Mucor</i>	<i>M. racemosus</i>	3	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	<i>M. plumbeus</i>	3	+	+	-	+	+	-	-	+	-
<i>Penicillium</i>	<i>P. carneum</i>	22	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	<i>P. caseifulvum</i>	21	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	<i>P. corylophilum</i>	18	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	<i>P. confertum</i>	16	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	<i>P. crustosum</i>	5	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	<i>P. nalgiovense</i>	46	+	+	-	+	+	+	+	+	-
	<i>P. rugulosum</i>	17	+	+	-	+	+	-	+	+	-
	<i>P. polonicum</i>	9	+	+	-	+	+	-	+	+	-
<i>P. solitum</i>	31	+	+	-	+	+	+	-	+	+	

„+“ – позитивна реакција; „-“ – негативна реакција

Утицај активности воде на радијални раст плесни

Испитивање услова средине на раст плесни подразумевало је евалуацију утицаја активности воде (a_w) на раст плесни из овчије стеље. Одабране су врсте које утичу на органолептику и безбедност производа: *P. crustosum*, *P. polonicum*, *A. nidulans*, *A. niger*, *E. herbariorum*, *E. chevalieri* и *M. plumbeus*. Раст плесни које су изоловане из стеље је била под директним утицајем активности воде, Резултати су приказани на Графицима од 1 до 7.

Плесни *P. crustosum* су добро расле при a_w вредности од 0,85. Дијаметар колонија ове плесни током истраживања се кретао од 1,85 (трећи дан) до 7 cm (дванаести дан), максимални раст од 7,5 cm је постигнут 15-наестог дана истраживања. Са повећањем a_w вредности на 0,89, код ове плесни је запажено значајно смањење величине колонија, дијаметар колонија се кретао од 0,5 (дан 3) до 2,5 cm (дан 15). Седмог дана истраживања разлика у величини колонија *P. crustosum* у односу на величину постигнуту при a_w вредности од 0,85 се кретала око 5 cm, при чему се ова разлика задржала до краја истраживања. Код вредности a_w од 0,97 запажена је инхибиција герминације спора у прва

три дана, да би до краја истраживања плесни имале и значајно смањење спорулације и величину колонија од 1,7 cm (График 1).

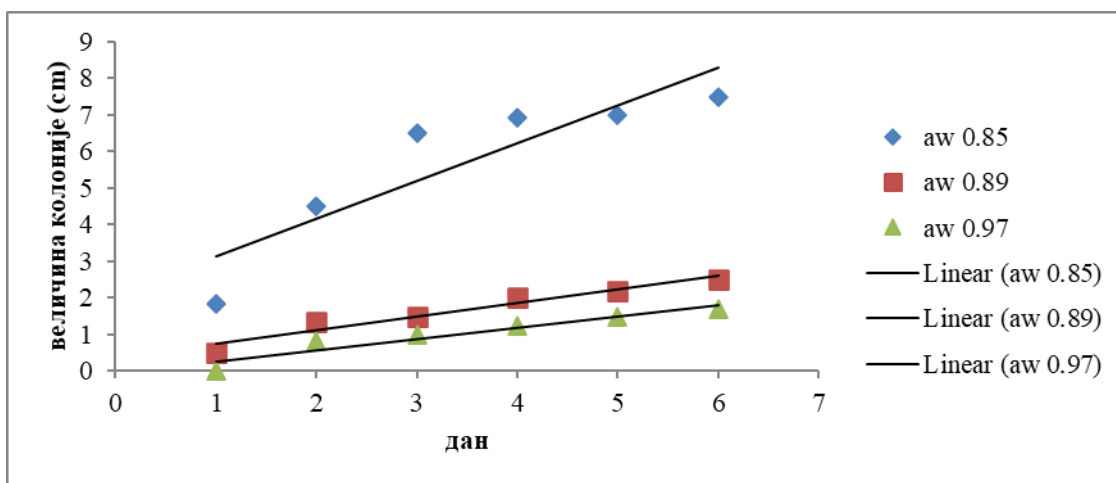


График 1. Утицај активности воде на раст *P. crustosum*

Вредност a_w од 0,85 на раст *P. polonicum* је дефинисана кроз дијаметар колонија који се кретао од 1,5 cm на почетку истраживања до 10 cm, 15-наестог дана. Од десетог до дванаестог дана величина колонија је остала иста на вредности од 9,5 cm. Ефекат a_w вредности од 0,89 је значајније утицао на брзину раста изолота, при овој вредности се и у првим данима раста запажа дијаметар колонија од 0,5 (дан 3) до 0,7 cm (дан 5) . Након 15 дана инкубације при a_w од 0,89 запажа се максимална величина колонија од 3 cm и израженија ралика у дијаметру колоније у односу на a_w од 0,85, која је иносила 7 cm. Ефекат a_w вредности од 0,95 на брзину раста *P. polonicum* се огледа кроз потпун изостанак герминације спора у прва три дана, и максималну величину колонија од 1 cm током већег дела истраживања (График 2).

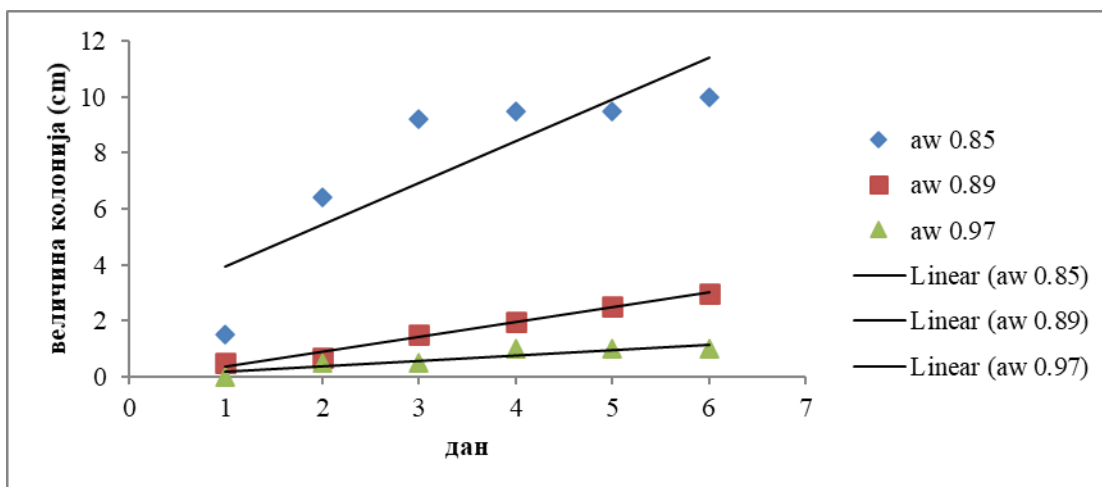


График 2. Утицај активности воде на раст *P. polonicum*

a_w вредност од 0,85 није негативно утицала на брзину раста *A. nidulans*, напротив, дијаметар колонија се кретао од 2 cm трећег дана до 9,5 cm 12-нестог дана истраживања. Повећањем a_w вредности у подлози на 0,89 уочава се видно смањење брзине раста колоније тестиране плесни, при чему величину колонија од 2 cm *A. nidulans* достиже тек десетог дана истраживања. Максималану величину од 3,5 cm *A. nidulans* доситиже 15-нестог дана (График 3).

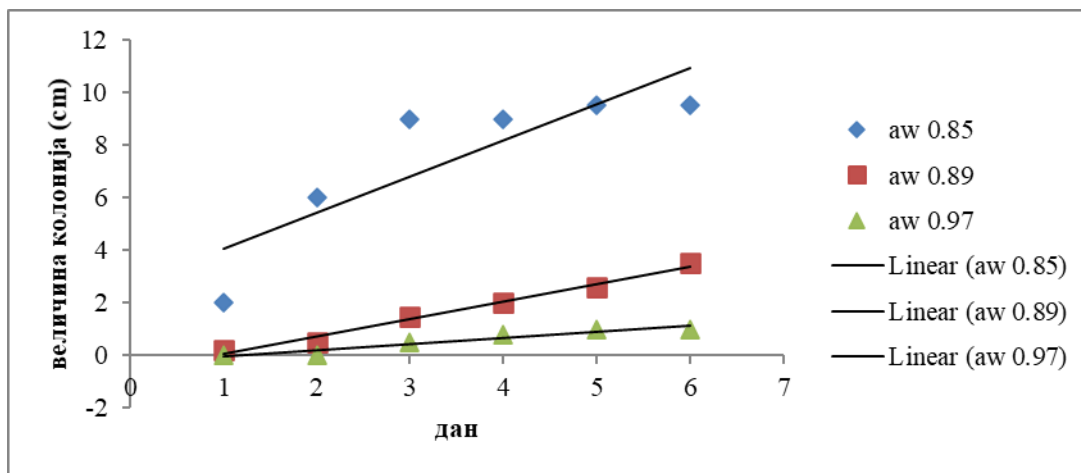


График 3. Утицај активности воде на раст *A. nidulans*

Дијаметар колонија плесни *A. niger* при a_w вредности од 0,85, се кретао од 2,5 (дан 3) до 10 cm (дан 12), при чему је максимални раст од 10 cm задржан до 15-наестог дана истраживања. При a_w вредности од 0,89, код ове плесни је такође запажено значајно смањење величине колонија, дијаметар колонија се кретао од 0,5 (дан 3) до 6,5 cm (дан 15), што је видна разлика у величини колонија *P. crustosum* у односу на величину постигнуту при a_w вредности од 0,85. Вредности a_w од 0,97 је значајно утицала на раст плесни при чему се бележи инхибиција герминације спора у првих пет дана истраживања, са максималном величином колонија од 3,5 cm на крају истраживачког периода (График 4).

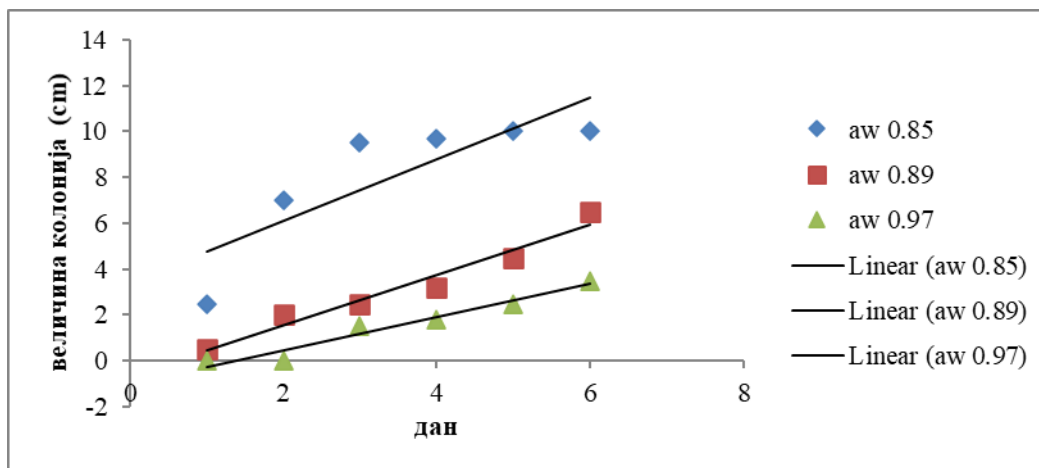


График 4. Утицај активности воде на раст *A. niger*

На брзину раста *E. herbariorum*, a_w вредност од 0,85 није негативно утицала. Дијаметар колонија се кретао од 3,5 cm трећег дана истраживања до 10 cm седмог дана, када величина колонија остаје константна до краја истраживачког периода. Повећањем a_w вредности у подлози на 0,89 уочава се смањење брзине раста колоније тестиране плесни, при чему максималану величину од 6,5 cm *A. nidulans* досиже 15-немог дана. При a_w вредности у подлози од 0,97 уочава се значајно смањење величине колоније, при чему је максимална величина колонија на крају истраживања износила само 3,5 cm. Резултати су представљени на Графику 5.

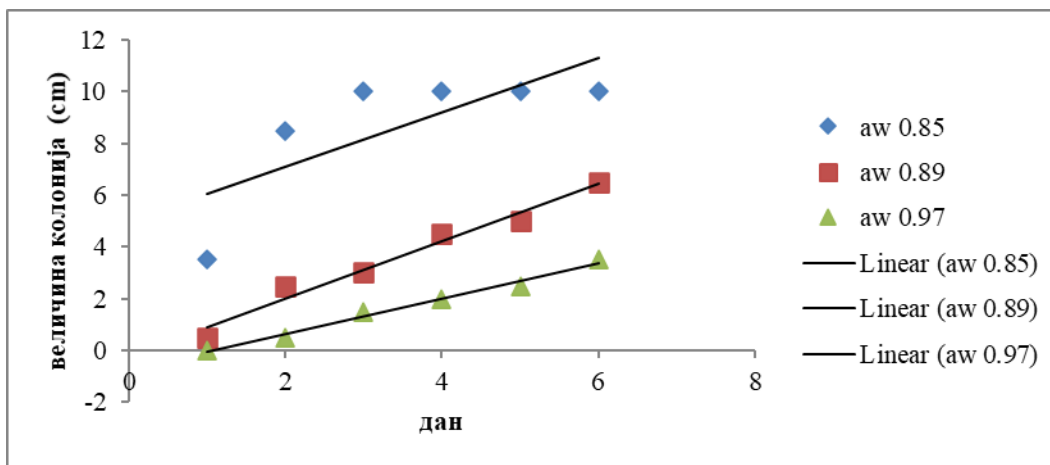


График 5. Утицај активности воде на раст *E. herbariorum*

Дијаметар колонија плесни *E. chevalieri* при a_w вредности од 0,85 се кретао од 3,92 (дан 3) до 10 cm (дан 7), при чему је максимални раст од 10 cm задржан до 15-наестог дана истраживања. При a_w вредности од 0,89, код ове плесни је такође запажено значајно смањење величине колонија, дијаметар колонија се кретао од 0,5 (дан 3) до 5 cm (дан 12). Вредности a_w од 0,97 је још значајније утицала на раст *E. chevalieri* при чему је запажена инхибиција герминације спора у прва три дана истраживања, са максималном величином колонија од 3,3 cm на крају истраживачког периода (График 6).

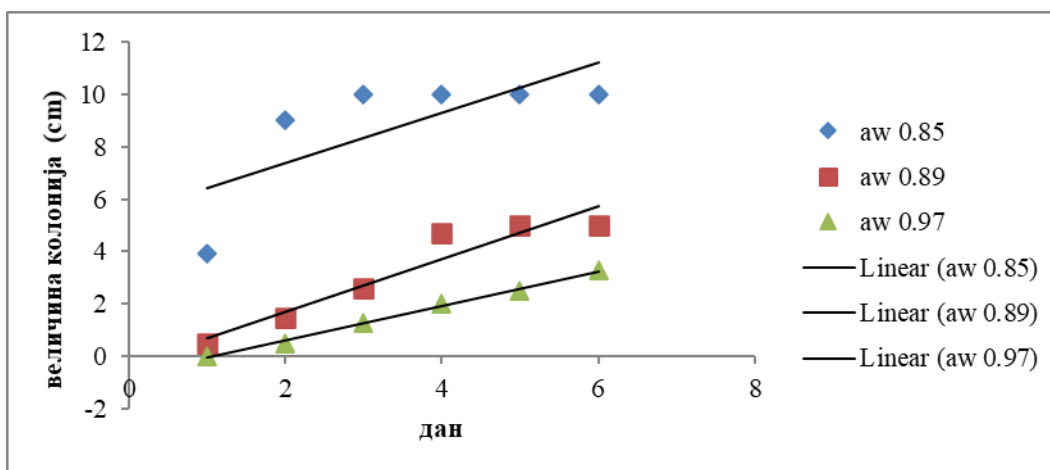


График 6. Утицај активности воде на раст *E. chevalieri*

При a_w вредности од 0,85 величина колонија плесни *M. plumbeus* се кретао од 0,5 (дан 5) до 3,5 cm (дан 15), при чему при се бележи инхибиција герминације спора у прва три дана истраживања. Вредности a_w од 0,89, такође утиче на значајно смањење величине колонија, дијаметар колонија се кретао од 0,5 (дан 3) до 5 cm (дан 15). Вредности a_w од 0,97 је најпозитивније утицала на раст плесни, са максималном величином колонија од 10 cm на крају истраживачког периода (График 7).

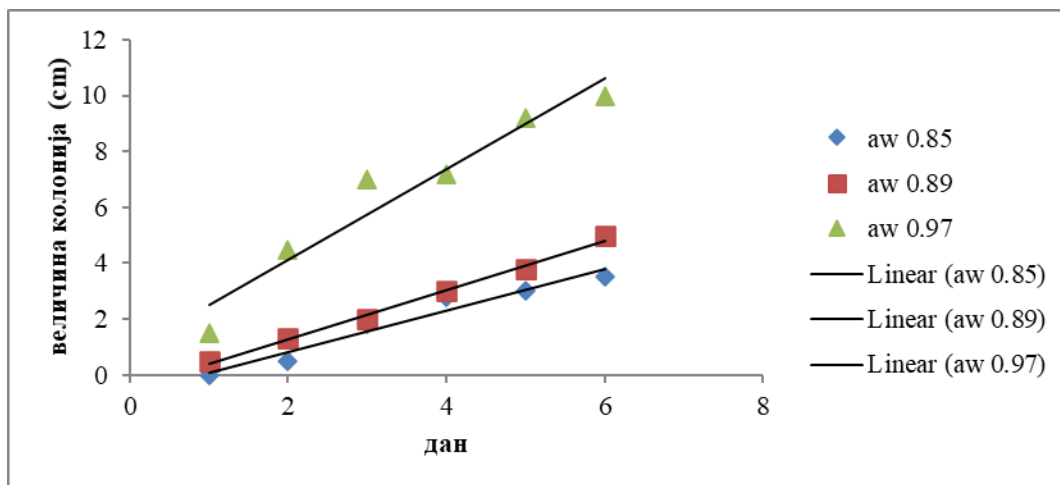


График 7. Утицај активности воде на раст *M. plumbeus*

6.5. Антимикробна активност изолата

Антимикробна активност изолата БМК и КНС је разматрана у односу на индикаторске бактеријске сојеве *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *L. monocytogenes* ATCC 19115, *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *B. cereus* ATCC 14579. Резултати су показали да изолати КНС немају антимикробну активност према коришћеним индикаторским сојевима. 42 изолата БМК који су изоловани из 9 узорака стеле је показало одређене зоне инхибиције (Табела 20).

Добијени резултати показују да је 47,61% тестираних изолата показало зону инхибиције према свим тестираним патогенима. Највећу зону инхибиције изолати су показали према *E. coli* ATCC 25922, где су се средње вредности зоне инхибиције кретале од 10,0 до 25,6 mm. Способност инхибиције раста *L. monocytogenes* ATCC 19115 показало је 71,43% тестираних изолата, највећу антилистеријску активности је показао изолат *E. faecium* Ios4. Инхибиторну способност према *P. aeruginosa* ATCC 27853 је показало 73,81% изолата. Раст *B. cereus* ATCC 14579 је инхибиран од стране 78,58% тестираних изолата, док је 88,1% сојева инхибирало раст *S. aureus* ATCC 25923. Најбољу способност инхибиције раст патогена показали су сојеви: *L. curvatus* Iosби и *L. sakei* Па13. Кластер анализом су дефинисана три кластера на основу антимикробне активност изолата (Прилог 1).

Табела 20. Антимикробна активност изолата у односу на индикаторске бактерије

Изолати	Индикаторски микроорганизми				
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>B. cereus</i> ATCC 14579
<i>L. curvatus</i> Ios1	10,50±0,50 ^B	18,70±1,00 ^D	10,14±0,30 ^B	8,40±0,40 ^C	15,50±0,40 ^A
<i>L. curvatus</i> Ios6i	25,10±0,80 ^B	27,00±0,50 ^B	15,50±1,70 ^A	24,70±0,40 ^B	28,20±0,50 ^C
<i>L. curvatus</i> I7a	20,50±0,10 ^C	25,20±0,90 ^D	0,00±0,00 ^B	10,30±0,50 ^A	25,20±0,15 ^D
<i>L. curvatus</i> Ios18	13,00±0,10 ^A	10,3±0,10 ^A	12,60±0,30 ^A	20,60±4,20 ^D	12,50±0,20 ^A
<i>L. curvatus</i> Iia19	20,10±0,15 ^C	25,4±0,65 ^D	0,00±0,00 ^A	10,50±0,60 ^B	0,00±0,00 ^A
<i>L. curvatus</i> Iios3	16,00±1,70 ^C	12,3±1,50 ^{B,C}	0,00±0,00 ^A	10,00±2,10 ^B	10,00±0,10 ^B
<i>L. curvatus</i> Iib4	25,60±0,20 ^C	20,0±1,80 ^B	18,00±0,50 ^B	0,00±0,00 ^A	0,00±0,00 ^A
<i>L. curvatus</i> Iiosv6	25,60±0,50 ^B	23,3±0,50 ^A	25,00±0,90 ^B	23,0±0,00 ^A	22,00±0,60 ^A
<i>L. curvatus</i> Iia8	0,00±0,00 ^A	0,0±0,00 ^A	0,00±0,00 ^A	10,50±0,6 ^B	0,00±0,00 ^A
<i>L. curvatus</i> Iios11	10,0±1,90 ^B	0,0±0,00 ^A	8,10±0,21 ^B	0,00±0,00 ^A	0,00±0,00 ^A
<i>L. curvatus</i> Iios17	10,20±0,64 ^A	12,0±1,70 ^A	10,30±1,10 ^A	10,00±1,10 ^A	10,30±1,70 ^A
<i>L. curvatus</i> Iios17a	10,00±2,78 ^B	12,3±0,50 ^B	10,00±2,60 ^B	10,00±0,00 ^B	0,00±0,00 ^A
<i>L. curvatus</i> Iios18	0,00±0,00 ^A	16,0±4,10 ^B	15,00±1,57 ^B	0,00±0,00 ^A	16,00±0,55 ^B
<i>L. curvatus</i> Iios19	12,00±1,00 ^B	10,0±2,00 ^B	12,00±0,50 ^B	0,00±0,00 ^A	0,00±0,00 ^A
<i>L. curvatus</i> Iios21	10,30±0,20 ^A	12,0±1,10 ^B	10,20±0,60 ^A	10,00±0,16 ^A	14,50±0,20 ^C
<i>L. curvatus</i> Iios25	15,90±0,06 ^B	18,5±1,40 ^D	10,20±0,10 ^A	10,10±0,70 ^A	14,00±0,90 ^B
<i>L. curvatus</i> IIIos1	15,00±2,17 ^B	13,1±0,20 ^{A,B}	10,00±0,80 ^A	10,00±0,50 ^A	12,00±1,70 ^{A,B}
<i>L. sakei</i> Ia8	14,30±0,10 ^B	20,5±0,50 ^E	0,00±0,00 ^A	15,30±0,20 ^C	18,30±0,40 ^D
<i>L. sakei</i> Ia9	20,30±0,20 ^{B,C}	22,6±2,00 ^C	8,30±0,10 ^A	18,30±0,20 ^B	20,30±0,20 ^{B,C}
<i>L. sakei</i> Ios12	22,00±2,90 ^B	19,5±2,10 ^{A,B}	20,00±1,80 ^{A,B}	15,00±3,20 ^A	20,00±1,30 ^{A,B}
<i>L. sakei</i> Ia22a	12,30±0,10 ^C	25,8±1,00 ^E	0,00±0,00 ^A	10,36±0,10 ^B	18,60±1,10 ^D
<i>L. sakei</i> Iib1	22,20±0,20 ^C	26,7±0,10 ^D	17,70±0,90 ^{F,A}	20,70±0,20 ^B	25,90±0,00 ^D
<i>L. sakei</i> Iib1a	0,0±0,00 ^A	8,2±0,90 ^B	0,00±0,00 ^B	0,00±0,00 ^B	0,00±0,00 ^B
<i>L. sakei</i> Iib2	22,00±0,00 ^C	23,0±0,40 ^D	10,00±0,00 ^A	19,50±0,50 ^B	25,50±0,20 ^E
<i>L. sakei</i> Iia2a	0,00±0,00 ^A	20,4±1,0 ^B	0,00±0,00 ^A	0,00±0,00 ^A	0,00±0,00 ^A
<i>L. sakei</i> Iib3	12,30±0,20 ^B	25,6±0,1 ^C	8,20±0,20 ^A	8,70±0,00 ^A	25,60±0,20 ^C
<i>L. sakei</i> Iia6	0,00±0,00 ^A	0,0±0,00 ^A	0,00±0,00 ^A	0,00±0,00 ^A	10,30±0,20 ^B
<i>L. sakei</i> Iib11	25,50±0,00 ^D	15,3±1,9 ^B	18,20±0,30 ^C	10,20±0,20 ^A	8,50±0,50 ^A
<i>L. sakei</i> Iia13	23,10±0,50 ^B	28,0±0,0 ^D	18,00±0,10 ^A	22,50±0,10 ^B	25,60±0,00 ^C
<i>L. sakei</i> Iia14	22,30±0,80 ^C	0,0±0,00 ^A	10,30±0,20 ^B	10,50±0,00 ^B	0,00±0,00 ^A
<i>L. sakei</i> Iios15	0,00±0,00 ^A	22,3±1,7 ^C	8,00±0,00 ^B	0,00±0,00 ^A	20,60±0,10 ^C
<i>L. sakei</i> Iib21	14,00±0,80 ^{B,C}	16,5±0,8 ^D	0,00±0,00 ^A	13,50±0,20 ^B	15,20±0,10 ^{C,D}
<i>L. sakei</i> Iia22	10,60±0,20 ^B	0,0±0,00 ^A	14,40±0,60 ^D	12,60±0,00 ^C	12,00±0,10 ^C
<i>L. sakei</i> IIIos13	15,00±1,90 ^A	13,0±0,10 ^A	14,00±0,00 ^A	15,00±2,25 ^A	14,00±0,00 ^A
<i>L. sakei</i> IIIos16	20,00±1,73 ^A	18,3±0,57 ^A	18,00±1,70 ^A	20,00±0,80 ^A	20,00±0,30 ^A
<i>L. mesenteroides</i> Ios11	11,50±0,80 ^B	25,8±1,40 ^D	0,00±0,00 ^A	10,50±0,40 ^B	23,50±0,40 ^C
<i>L. mesenteroides</i> Iios4i	15,70±0,40 ^B	15,4±1,00 ^B	10,00±0,00 ^A	14,30±0,60 ^B	15,40±0,10 ^B
<i>L. mesenteroides</i> IIIos4	13,00±2,70 ^A	18,0±2,20 ^B	12,40±0,10 ^A	10,00±0,00 ^A	19,30±0,40 ^B
<i>E. faecium</i> Ios1a	10,00±4,50 ^B	8,0±1,70 ^B	0,00±0,00 ^A	0,00±0,00 ^A	8,00±2,00 ^B
<i>E. faecium</i> Ios4	23,00±1,70 ^{B,C}	23,0±1,70 ^{B,C}	25,00±0,00 ^B	20,00±3,00 ^{A,B}	18,00±0,20 ^A
<i>E. faecium</i> Ios5a	20,00±1,73 ^C	18,0±0,00 ^C	20,00±0,00 ^C	0,00±0,00 ^A	14,00±0,80 ^B
<i>E. faecium</i> Iios24	0,00±0,00 ^A	14,0±0,10 ^C	10,00±3,00 ^B	0,00±0,00 ^A	10,00±0,05 ^B

Резултати су приказани као средња вредност ±СД и изражени у милиметрима (mm), представљају пречник зоне инхибиције

Просечне вредности означене истим словима, у оквиру истог изолата, не разликују се статистички значајно (p<0.05).

6.5.1. Утицај, ензима, рН, температуре и хемијских једињења на антими­кробну активност полупречишћених бактериоци­на одабраних изо­лата

Истраживање утицаја ензима, рН, температуре и хемијских једињења на антими­кробну активност продукованих полупречишћених бактериоци­на одабраних изо­лата, је рађено како би се утврдила хемијска природа антими­кробног једињења. За ово истраживање је одабрано шест изо­лата из сваке тестиране групе БМК са највећим зонама инхибиције према *E. coli* АТСС 25922: *L. curvatus* Пб4, *L. curvatus* Посв6, *L. sakei* Пб11, *L. sakei* Па13, *L. mesenteroides* Пос4и и *E. faecium* Iос4.

Утицај ензима на антими­кробну активност полупречишћених бактериоци­на

Резултати истраживања показују да третирање пречишћених бактериоци­на протеолитичким ензимима, проназа Е и протеиназа К при рН вредности 7, након једног сата инкубације, искључује антибактеријску активност код свих одабраних изо­лата (Табела 21). Добијени резултати показују да је бактериоцидна активност одабраних сојева потпуно нестала деловањем протеолитичких ензима, што потврђује протеинску природу полупречишћеног бактериоци­на. Ензими каталаза, липаза и α-амилаза нису утицали на антими­кробну способност полупречишћених бактериоци­на синтетисаних од стране одабраних сојева према *E. coli* АТСС 25922. Величине зона инхибиције код свих испитиваних сојева биле су на нивоу величине зона контроле.

Утицај температуре на антими­кробну активност полупречишћених бактериоци­на

Утицај температуре на антибактеријску активност супернатанта након термичке обраде на температурама од: 50°C, 30 минута; 100°C, 5 минута; 100°C, 15 минута; 100°C, 30 минута и 121°C, 15 минута је приказан у Табели 21. Антими­кробна способност тестираних изо­лата је била стабилна на свим температурама чак и на температури стерилизације (121°C 15 минута). Изолати *L. curvatus* Пос4, *L. curvatus* Пос6, *L. sakei* Пб11, *L. sakei* Па13 и *E. faecium* Iос4 на температурама 50°C (30 минута) и 100°C (5 минута) су задржали величину зоне инхибиције преко 20 mm, на нивоу контроле. Изолат *L. mesenteroides* Пос4и на температури 50°C (30 минута) је такође показао величину зоне која се подудара са контролом. Смањење величине зона у температурном интервалу од 100°C (15 минута), 100°C (30 минута) и 121°C (15 минута) код тестираних изо­лата је присутно са повећањем топлоте деловања и највеће смањење се бележи управо на температури стерилизације, што је и очекивано код свих тестираних изо­лата. Термостабилност полупречишћених бактериоци­на је јако значајно за њихову примену као конзерванса хране.

Утицај рН на антими­кробну активност полупречишћених бактериоци­на

На антибактеријску активности полупречишћених бактериоци­на значајно је утицао и рН, као што је приказано у Табели 21. Резултати показују да је антибактеријска активност супернатанта при рН 5, 6, 7 и 8 знатно већа од активности при рН 9 и 10. Инхибиторни ефекат киселине на раст *E. coli* АТСС 25922 је познат тако да су повећане зоне инхибиције код свих тестираних изо­лата на рН 3 и 4 биле очекиване. Примећена је и

изражена антимикуробна активност на рН 7, што сугерише да супернатант није органска киселина која има улогу да инхибира раст тестираних патогена.

Утицај хемијских једињења на антимикуробну активност полупречишћених бактериоцина

Присуство различитих хемикалија не утиче на активност бактериоцина у проучаваним супернатантима тестираних изолата, што је потврђено скоро идентичним зонама инхибиције са контролама. Додавање СДС, Trypton X-20, Trypton X-80, Trypton X-100, β-меркаптоетанол, Na-EDTA и NaCl у пречишћене супернатанте није утицало на пречнике зона инхибиције на индикатор сојевима. Резултати показују да је бактериоцин отпоран на тензиоактивна једињења и соли, што указује на добар потенцијал за преживљавање у условима гастроинтестиналног тракта (Табела 21).

Табела 21. Утицај ензима, температуре, рН, и различитих хемикалија на антибактеријску активност полупречишћених бактериоцина

Третман		Изолати					
		<i>L. curvatus</i> Пос4	<i>L. curvatus</i> Пос6	<i>L. sakei</i> Пб11	<i>L. sakei</i> Па13	<i>L. mesenteroides</i> Пос4и	<i>E. faecium</i> Јос4
Ензими	Проназа Е	-	-	-	-	-	-
	Протеиназа К	-	-	-	-	-	-
	Каталаза	+++	+++	+++	+++	++	+++
	Липаза	+++	+++	+++	+++	++	+++
	α-амилазе	+++	+++	+++	+++	++	+++
Температура	50°C 30 min	+++	+++	+++	+++	++	+++
	100°C 5 min	+++	++	+++	+++	+	+++
	100°C 15 min	++	++	++	++	+	++
	100°C 30 min	++	++	++	++	+	++
	121°C 15 min	+	+	+	+	+	+
рН	3	+++	+++	+++	+++	++	+++
	4	+++	+++	+++	+++	++	+++
	5	+++	+++	+++	+++	++	+++
	6	+++	+++	+++	+++	++	+++
	7	+++	+++	+++	+++	++	+++
	8	+++	+++	+++	+++	+	+++
	9	++	++	++	++	+	++
Хемикалије	СДС	++	++	++	++	+	++
	Tripton X-20	++	++	++	++	+	++
	Tripton X-80	++	++	++	++	+	++
	Tripton X-100	++	++	++	++	+	++
	β-меркаптоетанол	++	++	++	++	+	++
	Na-EDTA	++	++	++	++	+	++
	NaCl	+++	++	++	++	+	+++
Контрола без третмана		+++	+++	+++	+++	++	+++

Мерена зона инхибиције од ивице бунарића до ивице зоне инхибиције: + до 10 mm; ++ од 10 до 20 mm; +++ већа од 20 mm

Кинетика раста одабраних изолата и биосинтеза бактериоцина

Кинетика раста и биосинтеза бактериоцина у присуству индикаторског соја *E. coli* ATCC 25922 је праћена код одабраних изолата: *L. curvatus* Pos6, *L. sakei* Pa13, *L. mesenteroides* Pos4i и *E. faecium* Ios4. Резултати су показали да се биосинтеза антимикробних супстанци запажа код свих испитиваних изолата у раној експоненцијалној фази раста (График 8).

L. curvatus Pos6 је продуковао антимикробно једињење у максималном нивоу од 12 до 24 h раста у MRS бујону на 37°C. Антимикробна активност против индикатор соја је била најизраженија у овом временском интервалу са зонама инхибиције полупречишћеног бактериоцина већим од 25 mm. Током продужене инкубације у стационарној фази, након 30 h, активност бактериоцина је значајно опала, а самим тим и густина ћелија (0,15). Након 48 h инкубације, антимикробна активност супернатанта није забележена.

Биосинтеза антимикробних једињења од стране *L. sakei* Pa13 је започета након 6 h раста у MRS бујону на 37°C. Антимикробна активност против индикатор соја је била најизраженија у временском интервалу од 12 до 24 h са зонама инхибиције већим од 25 mm.

Резултати раста и биосинтеза бактериоцина од стране *L. mesenteroides* Pos4i, су показали сличности са изолатима *L. curvatus* Pos6 и *L. sakei* Pa13. *L. mesenteroides* Pos4i је произвео полипептид од 12 до 16 h раста у MRS бујону на 37°C. Антимикробна активност против индикатор соја је била најизраженија у овом временском интервалу са зонама инхибиције већим од 16 mm. Током инкубације од 24 h се бележи смањење антимикробне активности, да би у стационарној фази, након 30 h активност бактериоцина значајно опала.

Код изолата *E. faecium* Ios4, прва синтеза антимикробног једињења започиње након 12 h раста у MRS бујону на 37°C. Кинетика производње бактериоцина је настављена са приближно сличном густином ћелија у наредна 4 h раста (0,882 OD), након чега активност супернатанта опада у интервалу од 24 h раста. Након 30 h инкубације, антимикробна активност једињења није забележена. Зона инхибиције пречишћеног пептида је била 24 mm.

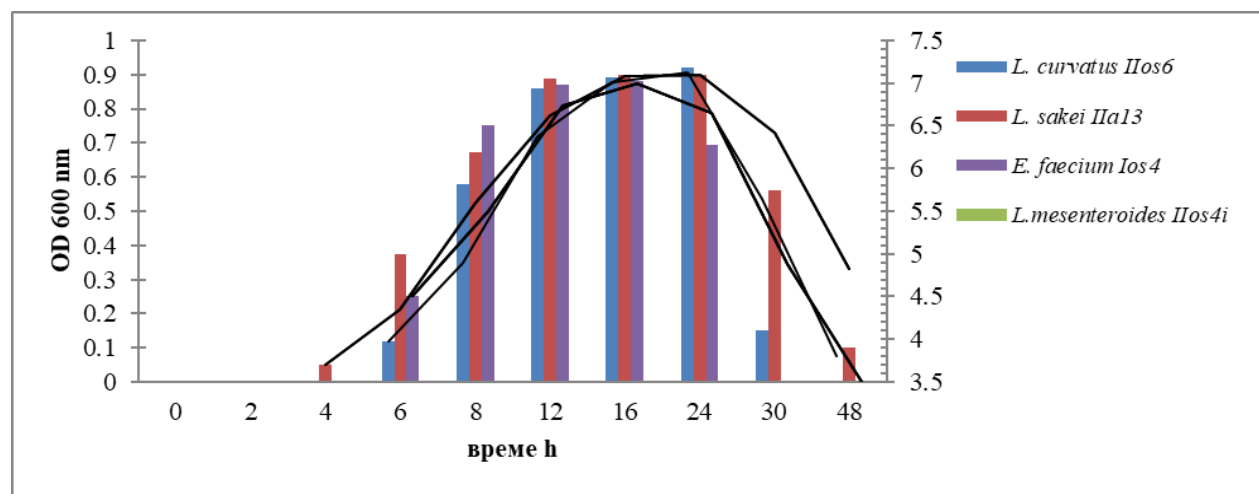


График 8. Кинетика раста одабраних изолата и биосинтеза бактериоцина

6.6. Испитивање пробиотског потенцијала бактерија млечне киселине

За истраживање пробиотског потенцијала *in vitro* је одабрано 42 аутохтона БМК изолата из овчије стелје који су идентификовани као: *L. curvatus* (17 изолата), *L. sakei* (18 изолата), *L. mesenteroides* (3 изолата) и *E. faecium* (4 изолата). Као позитивна контрола коришћен је сој *L. acidophilus* ATCC 4356. Обзиром да нису показали антимикуробну активност, изолати КНС нису даље истраживани.

6.6.1. Толеранција на услове гастроинтестиналног тракта

Толеранција изолата на услове гастроинтестиналног тракта подразумевала је испитивање способности раста на ниским рН вредностима средине, у присуству желудачног сока и жучних соли, као и у присуству фенола. Такође је испитана и хидрофобност изолата, способност аутоагрегације и коагрегације, као и способност продукције биогених амина.

Способност преживљавања изолата на ниским рН вредностима

Одабрани изолати из родова *Lactobacillus*, *Leuconostoc* и *Enterococcus* су показали способност преживљавања ниских рН вредности сустрата. Резултати истраживања су представљени на Графицима 9 и 10.

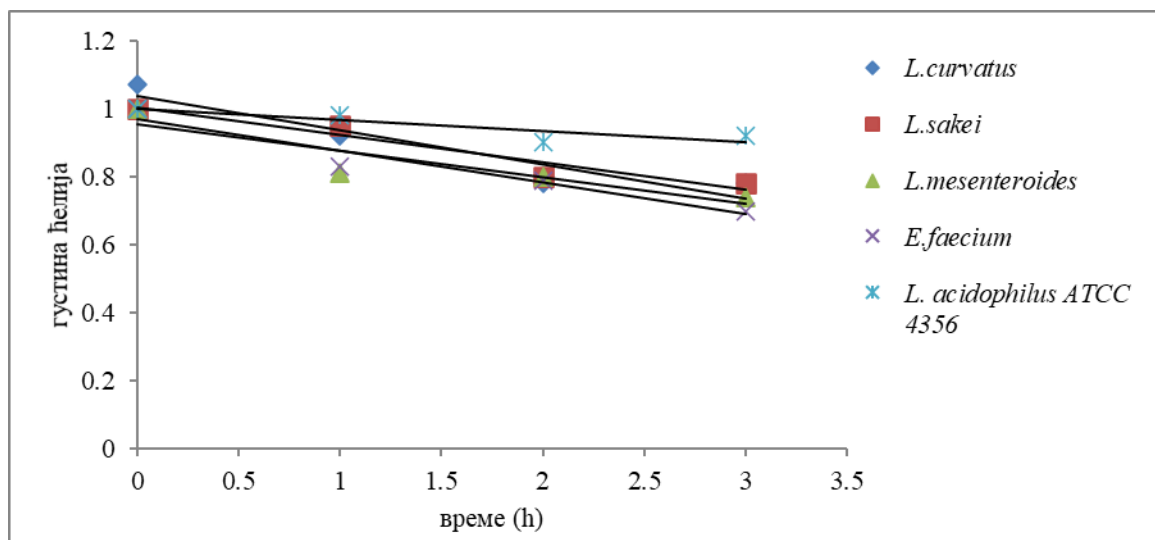


График 9. Способност раста изолата у медијуму при вредности рН 3

Промена оптичке густине ћелија истраживаних бактеријских изолата у условима средине рН 3, на 37°C приказана је на Графику 9. Оптичка густина ћелија *L. acidophilus* ATCC 4356 износила је $X_{sr} = 1,12$ након првог сата инкубације. У поређењу са овим резултатом, изолати *L. curvatus* и *L. sakei* су показали добру способност толеранције

(оптичка густина ћелија $X_{sr} = 0,95 - 0,98$). У другом и трећем сату истраживања, способност преживљавања је остала скоро непромењена ($X_{sr} = 0,88 - 0,9$). Изолати *L. mesenteroides* и *E. faecium* су показали смањену толеранцију у односу на *L. acidophilus* ATCC 4356.

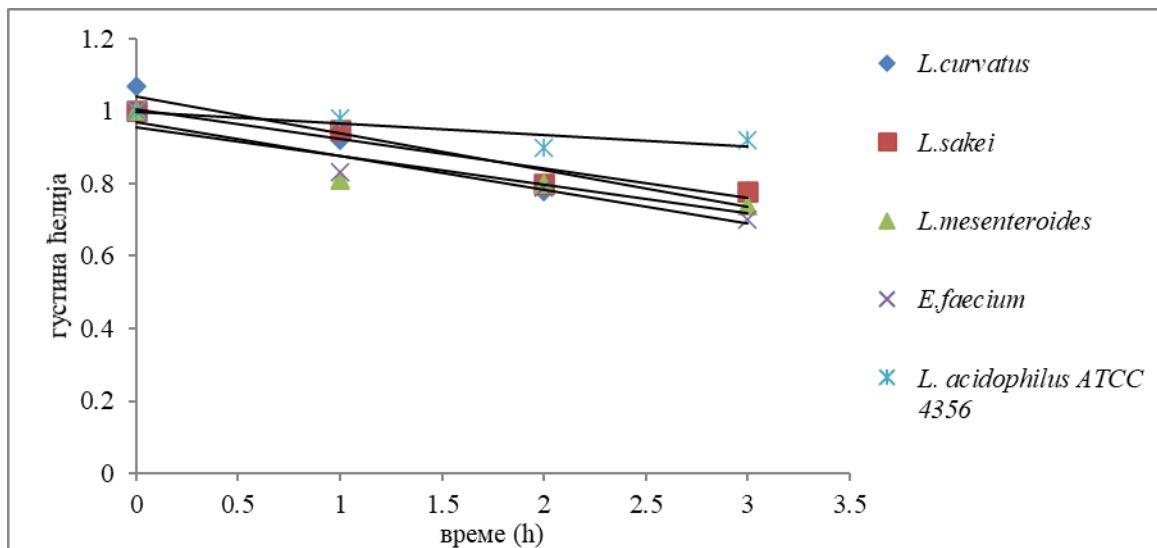


График 10. Способност раста изолата у медијуму при вредности рН 2

Просечна оптичка густина ћелија испитиваних изолата при вредности рН 2 се кретала од $X_{sr} = 0,65 - 0,95$ у првом сату до $X_{sr} = 0,28 - 0,78$ у трећем сату истраживања. У односу на *L. acidophilus* ATCC 4356, Сви тестирани изолати су показали смањену вредност оптичке густине ћелија, при чему су тестирани изолати *Lactobacillus* spp. показали бољу способност преживљавања у медијуму рН 2 у поређењу са тестираним изолатима из родова *Leuconostoc* и *Enterococcus* (График 10).

Толеранција на присуство жучних соли

Способност изолата да преживе услове средине са повећаном концентрацијом жучних соли је кључна особина приликом одабира стартера и пробиотских сојева за месну индустрију. Испитивање ове способности је спроведено праћењем раста БМК у медијуму са 0,5% и 1% жучних соли. Резултати истраживања показују добру способност тестираних БМК изолата да преживе услове средине са концентрацијом жучних соли од 0,5%. Просечна оптичка густина ћелија БМК у првом сату инкубације се кретала од $X_{sr} = 0,93 - 0,61$, док се у трећем сату истраживања ова вредност кретала од $X_{sr} = 0,32 - 0,82$ (Графици 11 и 12).

Смањење оптичке густине ћелија изолата *L. curvatus* и *L. sakei* у односу на комерцијални пробиотски сој је било мање изражено. Вредност оптичке густине изолата *E. faecium* и *L. mesenteroides* након првог и другог сата истраживања у условима средине са концентрацијом жучних соли од 0,5%, се кретала у опсегу средњих вредности од $X_{sr} = 0,71 - 0,79$. Оптичка густина ћелија након трећег сата истраживања код споменутих изолата се смањила, посебно у случају *L. mesenteroides* ($X_{sr} = 0,64$).

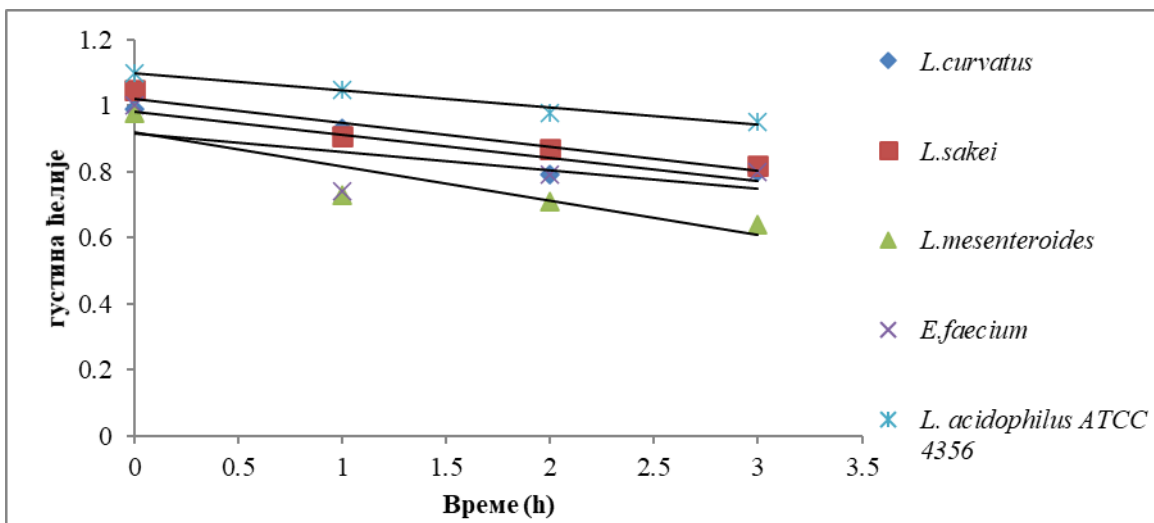


График 11. Способност преживљавања изолата присуству 0,5% жучних соли

Промена оптичке густине ћелија тестираних бактеријских изолата у условима средине са 1% жучних соли (График 12) указује на већи пад густине ћелија у односу на средину са 0,5% жучних соли, што је и очекивано. Оптичка густина ћелија у првом сату истраживања код изолата *L. curvatus* и *L. sakei* је имала средњу вредност од $X_{sr} = 0,79-0,83$, у односу на комерцијални пробиотски сој ($X_{sr} = 0,95$). У другом сату истраживања густина ћелија *L. sakei* је остала скоро непромењена ($X_{sr} = 0,79$), док је код изолата *L. curvatus* густина опала до $X_{sr} = 0,75$. Густина ћелија изолата *E. faecium* и *L. mesenteroides* након другог сата у условима средине са 1% жучних соли је имала исту средњу вредност од $X_{sr} = 0,73$ за обе врсте, док је након трећег сата густина ћелија наставила тренд смањења.

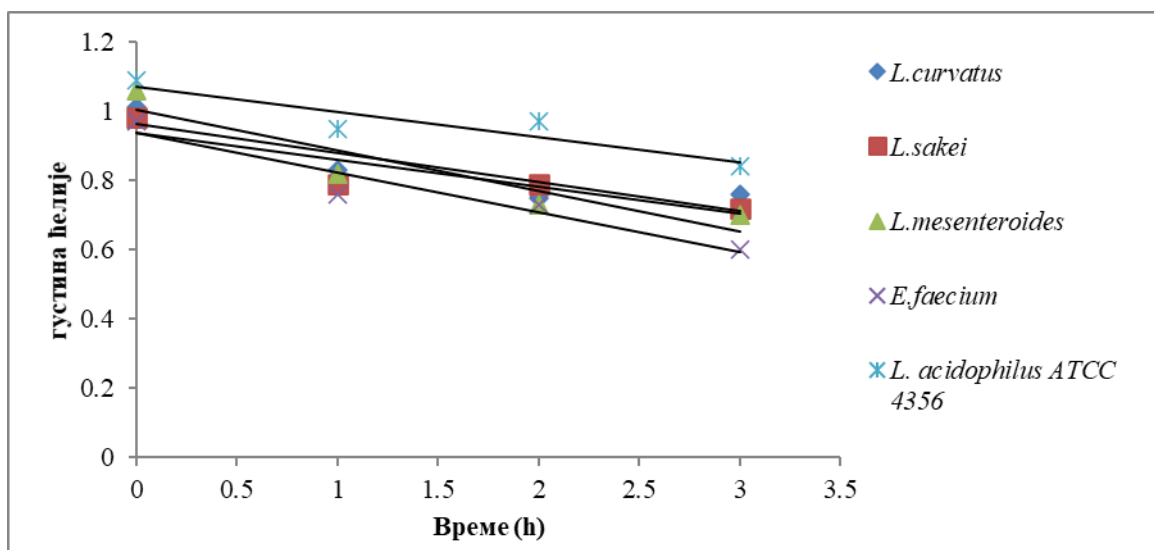


График 12. Способност преживљавања изолата присуству 1% жучних соли

Способност преживљавања изолата у симулираним условима желуца и дуоденума

Тестирани изолати БМК показали су добру способност преживљавања у симулираним условима желуца и дуоденума. Резултати су представљени у Табели 22.

Густина ћелија *L. curvatus* и *L. sakei* након првог сата инкубације у односу на почетни број ћелија у условима желуца (присуство желудачне киселине и пепсина), опада код већине тестираних изолата осим код изолата *L. curvatus* Pos19, где је густина ћелија након првог сата истраживања остаје приближна оној са почетка експеримента (контролом раста). Након другог сата инкубације, оптичка густина изолата *L. curvatus* и *L. sakei* се не смањује у односу на први сат, чак се код неких изолата задржава на приближно сличном нивоу као и првог сата, док се код врста *L. curvatus* (изолати Ios6i, I7a, Pos4, Posv6, Па8, Pos18 и Pos25) и *L. sakei* (изолати Ia9, Ios12, Ia22a, Пб3, Пб11, Па14 и Шos16), благо повећава након другог сата инкубације. Оптичка густина ћелија изолата *E. faecium* и *L. mesenteroides* је била смањена у односу на њихов почетни број након првог сата инкубације у симулираним условима желуца, док у другом сату инкубације, густина ћелија *E. faecium* и *L. mesenteroides* изолата остаје скоро на истом нивоу као у првом сату са изузетком изолата *E. faecium* Pos24 и *L. mesenteroides* Шos4, код којих се густина ћелија незнатно повећава.

Након раста у условима желуца, изолати су изложени симулираним условима дуоденума (присуство жучних соли и панкреатна). Инкубација изолата је спроведена у интервалу од 4-6 часова при чему је мерена промена густине ћелија (OD).

Изолати *L. curvatus* су у навећем броју случајева показали благи пад густине ћелија или су приближно задржали ист у густину ћелија као у симулираним условима желуца. Изузетци су били *L. curvatus* Pos1 и *L. curvatus* I7a, који су показали пораст густине ћелија у условима дуоденума, и *L. curvatus* Pos4, који је имао највећи пораст густине ћелија након шест сати инкубације. Изолати *L. curvatus* Па18 и *L. curvatus* Шos1 су имали смањену густину ћелија након шест сати инкубације. Изолати *L. sakei* су задржали или повећали густину ћелија у условима дуоденума у односу промену броја ћелија у условима желучаног сока. *L. sakei* (изолати Ios12, Пб1и Шos13) су најзначајније повећали густину ћелија у условима дуоденума. Смањење густине ћелија у односу на густину у условима желуца су показали изолати *L. sakei* Пб2 и *L. sakei* Па14.

Густина ћелија ентерокока у симулираним условима дуоденума након инкубације од 4 и 6 сати, је била повећана код изолата *E. faecium* Ios5a, док се код *E. faecium* Pos24 запажа значајно смањење густине ћелија у односу на густину у условима желуца. Нагоре резултате преживљавања услова дуоденума су показали изолати *L. mesenteroides* код којих густина ћелија опада или остаје на приближном нивоу условима желуца. Кластер анализом су дефинисана три кластера у која су распоређени изолати на основу способности преживљавања гастроинтестиналних услова средине (Прилог 2).

Табела 22. Густина ћелија одабраних изолата у симулираним условима желуца и дуоденума

Врсте	Почетна густина ћелија	Желудачни сок			Жучни сок	
	0 h	1 h	2 h	4 h	6 h	
<i>L. curvatus</i> Ios1	1,00 ±0,03 ^C	0,64±0,02 ^{A,B}	0,56±0,01 ^A	0,69±0,08 ^{A,B}	0,77±0,13 ^B	
<i>L. curvatus</i> Ios6i	1,03±0,05 ^C	0,41±0,02 ^A	0,50±0,02 ^{A,B}	0,50±0,06 ^{A,B}	0,60±0,03 ^B	
<i>L. curvatus</i> I7a	1,00±0,04 ^C	0,68±0,08 ^A	0,76±0,02 ^{A,B}	0,80±0,02 ^B	0,80±0,05 ^{A,B}	
<i>L. curvatus</i> Ios18	1,01±0,01 ^C	0,50±0,14 ^A	0,50±0,08 ^A	0,51±0,03 ^A	0,50±0,03 ^A	
<i>L. curvatus</i> Iia19	1,00±0,06 ^C	0,50±0,03 ^B	0,51±0,03 ^B	0,40±0,00 ^A	0,51±0,02 ^B	
<i>L. curvatus</i> IIos3	0,90±0,00 ^C	0,50±0,02 ^A	0,50±0,03 ^A	0,50±0,04 ^A	0,60±0,03 ^B	
<i>L. curvatus</i> IIos4	1,02±0,05 ^B	0,70±0,00 ^A	0,71±0,05 ^A	0,80±0,01 ^A	1,03±0,06 ^B	
<i>L. curvatus</i> IIosv6	1,01±0,06 ^B	0,80±0,03 ^A	0,81±0,01 ^A	0,80±0,04 ^A	0,80±0,01 ^A	
<i>L. curvatus</i> IIa8	1,01±0,02 ^D	0,51±0,050 ^{A,B}	0,61±0,05 ^C	0,60±0,00 ^{B,C}	0,42±0,03 ^A	
<i>L. curvatus</i> IIos11	1,01±0,01 ^B	0,81±0,07 ^A	0,80±0,00 ^A	0,70±0,03 ^A	0,70±0,06 ^A	
<i>L. curvatus</i> IIos17	1,12±0,08 ^B	0,70±0,01 ^A	0,70±0,01 ^A	0,70±0,00 ^A	0,71±0,01 ^A	
<i>L. curvatus</i> IIos7a	1,05±0,05 ^A	0,90±0,04 ^A	0,81±0,09 ^A	0,80±0,13 ^A	0,80±0,12 ^A	
<i>L. curvatus</i> IIa18	1,00±0,01 ^B	0,80±0,18 ^{A,B}	0,90±0,00 ^B	0,90±0,00 ^B	0,61±0,01 ^A	
<i>L. curvatus</i> IIa19	1,00±0,06 ^C	1,00±0,02 ^C	0,91±0,01 ^C	0,80±0,03 ^B	0,50±0,03 ^A	
<i>L. curvatus</i> IIos21	1,01±0,02 ^B	0,80±0,04 ^A	0,79±0,05 ^A	0,68±0,06 ^A	0,69±0,12 ^A	
<i>L. curvatus</i> IIos25	0,97±0,06 ^C	0,60±0,05 ^{A,B}	0,67±0,03 ^B	0,49±0,02 ^A	0,61±0,04 ^B	
<i>L. curvatus</i> IIIos1	1,00±0,01 ^A	0,90±0,02 ^A	0,90±0,29 ^A	0,90±0,14 ^A	0,80±0,04 ^A	
<i>L. sakei</i> Ia8	1,00±0,01 ^A	0,90±0,02 ^A	0,90±0,29 ^A	0,90±0,14 ^A	0,80±0,04 ^A	
<i>L. sakei</i> Ia9	1,01±0,05 ^B	0,41±0,02 ^A	0,45±0,22 ^A	0,51±0,03 ^A	0,46±0,03 ^A	
<i>L. sakei</i> Ios12	1,01±0,06 ^B	0,70±0,03 ^A	0,80±0,03 ^A	0,81±0,09 ^A	1,00±0,04 ^B	
<i>L. sakei</i> Ia22a	1,01±0,06 ^B	0,37±0,02 ^A	0,49±0,05 ^A	0,41±0,08 ^A	0,47±0,01 ^A	
<i>L. sakei</i> IIb1	1,00±0,05 ^{A,B}	0,91±0,01 ^{A, B}	0,90±0,03 ^A	1,01±0,06 ^B	0,91±0,02 ^{A,B}	
<i>L. sakei</i> IIb1a	1,01±0,06 ^D	0,35±0,04 ^{A,B}	0,32±0,02 ^A	0,41±0,01 ^{B,C}	0,48±0,00 ^C	
<i>L. sakei</i> IIb2	1,01±0,02 ^B	0,52±0,00 ^A	0,51±0,06 ^A	0,45±0,03 ^A	0,47±0,05 ^A	
<i>L. sakei</i> IIa2a	1,01±0,06 ^B	0,42±0,03 ^A	0,40±0,00 ^A	0,38±0,06 ^A	0,41±0,05 ^A	
<i>L. sakei</i> IIb3	1,01±0,05 ^C	0,37±0,02 ^A	0,40±0,00 ^A	0,41±0,00 ^A	0,50±0,05 ^B	
<i>L. sakei</i> IIa6	1,01±0,06 ^C	0,37±0,02 ^A	0,32±0,05 ^A	0,50±0,00 ^B	0,49±0,05 ^B	
<i>L. sakei</i> IIb11	1,00±0,00 ^B	0,41±0,05 ^A	0,45±0,13 ^A	0,30±0,06 ^A	0,40±0,03 ^A	
<i>L. sakei</i> IIa13	1,02±0,03 ^B	0,61±0,06 ^A	0,53±0,05 ^A	0,54±0,07 ^A	0,56±0,02 ^A	
<i>L. sakei</i> IIa14	1,01±0,01 ^B	0,75±0,05 ^A	0,79±0,09 ^{A,B}	0,58±0,13 ^A	0,58±0,12 ^A	
<i>L. sakei</i> IIos15	1,00±0,01 ^C	0,47±0,02 ^B	0,47±0,01 ^B	0,44±0,01 ^A	0,48±0,01 ^B	
<i>L. sakei</i> IIb21	0,99±0,01 ^C	0,38±0,01 ^A	0,41±0,02 ^A	0,61±0,06 ^B	0,61±0,06 ^B	
<i>L. sakei</i> IIa22	1,00±0,05 ^B	0,90±0,06 ^{A,B}	0,90±0,03 ^{A,B}	0,90±0,05 ^{A,B}	0,80±0,02 ^A	
<i>L. sakei</i> IIIos13	1,00±0,00 ^A	0,90±0,02 ^A	0,80±0,21 ^A	1,02±0,03 ^A	1,03±0,29 ^A	
<i>L. sakei</i> Ios16	0,81±0,05 ^C	0,50±0,00 ^A	0,51±0,02 ^A	0,60±0,00 ^B	0,60±0,00 ^B	
<i>L. mesenteroides</i> Ios11	1,00±0,03 ^B	0,42±0,03 ^A	0,40±0,00 ^A	0,40±0,05 ^A	0,40±0,00 ^A	
<i>L. mesenteroides</i> IIos4i	1,00±0,06 ^C	0,52±0,01 ^B	0,55±0,03 ^B	0,33±0,02 ^A	0,45±0,05 ^B	
<i>L. mesenteroides</i> IIIos4	1,10±0,00 ^C	0,55±0,04 ^{A,B}	0,64±0,05 ^B	0,51±0,08 ^A	0,56±0,02 ^{A,B}	
<i>E. faecium</i> Ios1a	1,00±0,06 ^C	0,60±0,04 ^A	0,60±0,01 ^A	0,60±0,10 ^A	0,80±0,02 ^B	
<i>E. faecium</i> Ios4	1,02±0,03 ^C	0,91±0,01 ^B	0,90±0,03 ^B	0,91±0,03 ^B	0,80±0,05 ^A	
<i>E. faecium</i> Ios5a	1,10±0,00 ^B	1,00±0,05 ^{A,B}	0,90±0,05 ^A	1,00±0,08 ^{A,B}	0,90±0,03 ^A	
<i>E. faecium</i> IIos24	0,91±0,02 ^C	0,60±0,02 ^B	0,70±0,10 ^{B,C}	0,60±0,16 ^B	0,31±0,11 ^A	

Резултати су приказани као средња вредност ±СД; OD на 620 nm у различитим временским интервалима
Просечне вредности означене истим словима, у оквиру истог изолата, не разликују се статистички значајно (p<0.05).

Способност раст на подлогама са различитом количном фенола

Анализа осетљивости на присуство фенола је једна од важнијих анализа која се врши при одабиру пробиотских сојева. Најчешће се користе концентрације од 0,1%, 0,2% и 0,3% фенола, јер је садржај фенола у цревима људи низак, али свакако има врло негативан утицај на здравље. Истраживани изолати БМК су показали изузетну способност преживљавања услова средине са 0,1, 0,2 и 0,3% фенола, осим изолата *L. curvatus* Pos11 и *L. curvatus* Шos1, који нису показали способност раста у тестираним концентрацијама фенола.

Бактеријска адхезија за угљоводонике (хидрофобност)

Хидрофобност ћелијске површине бактерија утиче на везивање микроорганизама за епителне ћелије црева. Одабрани изолати БМК су показали значајну разлику у хидрофобности у распону од 5,2% до 80,9%. Хидрофобност аутохтоних БМК у присуству различитих угљоводоника представљена је на Графику 13.

Хидрофобност у присуству хлороформа била је много нижа за аутохтоне изолате од добијених вредности у присуству ксилена и н-хексадекана. Хидрофобност бактеријских ћелија у присуству хлороформа била је најизраженија код изолата *L. sakei* Pos15 и *L. sakei* Пb1 (28,55%), док је најмању способност хидрофобности (5,2%) показао изолат *L. mesenteroides* Шos 4. Највећи афинитет за н-хексадекан показали су изолати *L. curvatus* Pos25, *L. sakei* Пb11, *L. sakei* Пb3 и *L. sakei* Па14, чија је способност хидрофобност премашила 79%.

Афинитет према ксилолу показали су *L. sakei* Па22, *L. sakei* Па14, *L. sakei* Пb11 и *L. curvatus* Шos1 (преко 67%), док су *L. sakei* Шos13 и *L. curvatus* Pos 18 показали хидрофобност од 30,5%. Најмањи афинитет према тестираном растварачу је показао *L. sakei* Шos16 (21,21%). Резултати истраживања показују да код 71,42% тестираних изолата хидрофобност према ксилолу премашује 40%, што се сматра добрим резултатом.

Кластер анализом добијена су три кластера, *L. sakei* Пb21 и *L. curvatus* Pos6 су чинили један од добијених класера хидрофобности према различитим угљоводоникима (Прилог 3).



График 13. Хидрофобност аутохтоних бактеријских пробиотика према различитим угљоводоницима

Способност аутоагрегације и коагрегације

Способност аутоагрегације је веома важна карактеристика приликом одабира пробиотских сојева. Резултати истраживања аутоагрегације и коагрегације тестираних изолата БМК и *E. coli* АТСС 25922 приказани су у Табели 23.

Најбољу способност аутоагрегације је показао изолат *E. faecium* Ios5a (66,5% након 1 h и 78,5% након 4 h), са статистички значајном разликом између првог и четвртог сата ($P < 0,05$), док је најнижи ниво аутоагрегације показао изолат *E. faecium* Pos24 (6,9% након 1 h и 18,5% након 4 h, $P < 0,05$). Изолати *L. curvatus* Шos1, *L. sakei* Ia8 и *L. mesenteroides* Шos4 су такође показали добру способност аутоагрегације при чему се ниво агрегације кретао изнад 50% код изолата БМК.

Веома слични резултати примећени су и код теста коагрегације између испитиваних БМК изолата и *E. coli* АТСС 25922. Вредности коагрегације које су показали тестирани изолати кретале су се у распону од 17,2% до 65,6%. Изолати *L. sakei* Ia9, *L. curvatus* Pos3 и *L. mesenteroides* Шos4 показали су највиши степен коагрегације, при чему се статистички значајна разлика јавља код соја *L. curvatus* Pos3 ($P < 0,05$). *E. faecium* Pos24 је показао веома слабу коагрегацију у другом сату истраживања (15,6%) са статистички значајном разликом између другог и четвртог сата ($P < 0,05$). На основу добијених резултата, можемо закључити да су сви тестирани изолати показали добру способност ауто- и коагрегације.

Кластер анализом су дата три кластера у која су распоређени изолати на основу способности аутоагрегације (Прилог 4), и коагрегације (Прилог 5). Један од добијених кластера коагрегације чинили су изолати *L. curvatus* Шos1, *L. sakei* Pos3, *L. sakei* Pos6, *L. sakei* Ia8, *L. sakei* Ia9 и *L. mesenteroides* Шos4.

Синтеза биогених амина

У процесу ферментације традиционалних сувомеснатих произода може доћи до акумулације биогених амина који се формирају услед декарбоксилације одговарајућих аминокиселина под утицајем аутохтоне микробиоте која се развија у производу. Истраживање способности продукције биогених амина тестираних БМК изолата на подлогама са хистидином и тирозином (описано у поглављу методе), је дало негативне резултате. Тестирани организми нису показали способност синтезе биогених амина.

Табела 23. Способност аутоагрегације и коагрегације испитиваних изолата

Врсте	Аутоагрегација (%)		Коагрегација (%)	
	1h	4h	2h	4h
<i>L. curvatus</i> Ios1	40,00±2,00 ^A	45,00±3,00 ^A	32,30±5,10 ^A	36,00±4,00 ^A
<i>L. curvatus</i> Ios6i	58,30±3,00 ^A	50,60±3,00 ^B	48,10±1,00 ^A	49,10±1,00 ^A
<i>L. curvatus</i> I7a	41,00±22,00 ^A	45,50±2,00 ^A	50,90±5,00 ^A	46,00±2,00 ^A
<i>L. curvatus</i> Ios18	57,30±2,00 ^A	56,60±4,00 ^A	42,30±1,00 ^A	35,00±2,00 ^B
<i>L. curvatus</i> Iia19	57,50±2,00 ^A	52,50±3,00 ^A	42,10±0,00 ^A	47,30±1,00 ^B
<i>L. curvatus</i> IIos3	59,00±3,00 ^A	54,00±4,00 ^A	65,60±3,00 ^A	59,10±2,00 ^A
<i>L. curvatus</i> IIos4	62,50±1,00 ^A	53,30±5,00 ^B	55,30±0,00 ^A	50,20±5,00 ^A
<i>L. curvatus</i> IIos6	56,90±3,00 ^A	52,70±2,00 ^A	51,90±3,00 ^A	56,90±1,00 ^A
<i>L. curvatus</i> Ila8	28,00±5,00 ^A	39,30±5,00 ^A	46,10±0,00 ^A	22,50±2,00 ^B
<i>L. curvatus</i> IIos11	44,80±1,00 ^A	1,50±1,00 ^B	51,70±1,00 ^A	49,20±6,00 ^A
<i>L. curvatus</i> IIos17	21,60±1,00 ^A	31,40±1,00 ^B	43,20±1,00 ^A	45,20±0,00 ^A
<i>L. curvatus</i> IIos17a	16,70±0,70 ^A	30,80±0,20 ^B	24,60±0,70 ^A	35,50±0,10 ^B
<i>L. curvatus</i> Ila18	51,30±1,00 ^A	58,60±5,00 ^A	33,50±4,00 ^A	40,90±0,00 ^B
<i>L. curvatus</i> Ila19	21,60±0,30 ^A	40,50±0,60 ^B	43,60±0,50 ^A	51,90±3,00 ^B
<i>L. curvatus</i> IIos21	45,50±0,00 ^A	52,00±2,00 ^B	30,80±1,00 ^A	29,60±1,00 ^A
<i>L. curvatus</i> IIos25	50,30±4,00 ^A	55,40±3,00 ^A	48,50±2,00 ^A	41,60±0,00 ^B
<i>L. curvatus</i> IIIos1	55,50±2,50 ^A	74,40±2,90 ^B	51,90±0,90 ^A	58,90±0,00 ^B
<i>L. sakei</i> Ia8	60,90±2,00 ^A	68,10±7,00 ^A	57,00±3,00 ^A	58,50±0,00 ^A
<i>L.sakei</i> Ia9	52,50±1,00 ^A	68,10±2,00 ^B	39,50±5,00 ^A	65,50±4,00 ^B
<i>L.sakei</i> Ios12	17,30±1,00 ^A	34,00±0,80 ^B	34,30±1,00 ^A	50,80±3,00 ^B
<i>L. sakei</i> Ia22a	45,50±4,00 ^A	51,50±1,00 ^A	35,90±9,00 ^A	38,20±1,00 ^A
<i>L. sakei</i> IIb1	47,80±1,00 ^A	50,40±2,90 ^A	51,50±0,00 ^A	50,50±2,00 ^A
<i>L. sakei</i> IIb1a	28,00±5,00 ^A	39,30±5,00 ^A	46,10±0,00 ^A	22,50±2,00 ^B
<i>L. sakei</i> IIb2	52,00±0,00 ^A	55,20±5,00 ^A	44,80±2,00 ^A	47,50±5,00 ^A
<i>L. sakei</i> Ila2a	42,10±2,00 ^A	40,50±3,00 ^A	38,00±5,00 ^A	40,50±5,00 ^A
<i>L. sakei</i> IIb3	62,10±2,00 ^A	24,50±3,00 ^B	29,00±4,00 ^A	41,00±4,00 ^B
<i>L. sakei</i> Ila6	37,10±2,00 ^A	32,90±5,00 ^A	32,60±0,00 ^A	38,00±5,00 ^A
<i>L. sakei</i> IIb11	41,50±5,00 ^A	45,50±2,00 ^A	30,90±5,00 ^A	40,50±2,00 ^A
<i>L. sakei</i> Ila13	60,50±5,00 ^A	53,60±5,00 ^A	44,50±4,00 ^A	46,50±2,00 ^A
<i>L. sakei</i> Ila14	45,30±4,00 ^A	59,00±9,00 ^A	37,00±3,00 ^A	38,50±2,00 ^A
<i>L.sakei</i> IIos15	47,20±1,00 ^A	47,10±5,00 ^A	44,50±1,00 ^A	48,40±4,00 ^A
<i>L. sakei</i> IIb21	38,20±1,00 ^A	41,90±5,00 ^A	51,00±6,00 ^A	41,90±5,00 ^A
<i>L. sakei</i> Ila22	37,50±2,00 ^A	49,00±5,00 ^B	41,00±8,00 ^A	46,00±5,00 ^A
<i>L. sakei</i> IIIos13	15,60±4,00 ^A	32,80±0,60 ^B	17,20±1,50 ^A	36,00±0,10 ^A
<i>L. sakei</i> IIIos16	52,50±0,80 ^A	64,00±4,00 ^B	47,00±1,70 ^A	42,50±6,30 ^A
<i>L. mesenteroides</i> Ios11	42,90±2,00 ^A	50,50±7,00 ^A	40,20±4,00 ^A	33,50±0,00 ^B
<i>L. mesenteroides</i> IIos4i	52,00±1,00 ^A	65,00±3,00 ^B	32,00±2,00 ^A	45,50±4,00 ^B
<i>L. mesenteroides</i> IIIos4	55,50±40 ^A	63,80±5,00 ^A	50,50±7,00 ^A	65,20±2,00 ^B
<i>E. faecium</i> Ios1a	14,60±0,70 ^A	30,60±0,70 ^B	24,80±0,70 ^A	40,60±1,20 ^B
<i>E. faecium</i> Ios4	60,00±0,21 ^A	71,80±0,20 ^B	40,30±0,60 ^A	45,30±0,20 ^B
<i>E. faecium</i> Ios5a	66,50±0,80 ^A	78,50±0,50 ^B	42,30±0,50 ^A	50,30±0,20 ^B
<i>E. faecium</i> IIos24	6,90±1,30 ^A	18,50±0,00 ^B	15,60±0,80 ^A	23,00±0,10 ^{a.B}

Резултати су приказани као средња вредност ±СД; OD на 600 nm у различитим временским интервалима. Просечне вредности означене истим словима, у оквиру истог изолата, не разликују се статистички значајно (p<0.05).

6.6.2. Безбедоносни аспект изолата бактерија млечне киселине

Безбедоносни аспект изолата БМК је процењен испитивањем способности хемолизе на крвном агару и осетљивости на антибиотике.

Хемолиза на крвном агару

Хемолитичка активност одабраних изолата који припадају врстама *L. curvatus*, *L. sakei*, *L. mesenteroides* и *E. faecium* је испитана како би се проверила њихова могућа патогенеза и утврдила безбедност за коришћење. Сви тестирани изолати су показали γ -хемолизу на крвном агару, што је пожељна карактеристика.

Испитивање осетљивости изолата на антибиотике - диск-дифузиони тест

Осетљивост тестираних изолата на антибиотике процењена је применом диск дифузне методе у складу са смерницама Института за клиничке лабораторијске стандарде (CLSI, 2011). За овај тест су коришћени дискови са импрегнираним антибиотикима: офлоксацин (ofx5), азитромицин (azm15), клиндамицин (da2), триметоприм (sxt25), еритромицин (e15), тетрациклин (te30).

Тестирани изолати БМК су показали значајну осетљивост на комерцијалне антибиотике (Табела 24). Апсолутну резистенцију на антибиотике није показао ниједан испитивани изолат, док је осетљивост на све истраживане антибиотике забележена код 69,04% изолата. Резистенцију на еритромицин је показало 19,04% изолата, на офлоксацин 11,9%, на азитромицин 4,76% и на клиндамицин 4,76% истраживаних изолата, док резистенција на тетрациклин и триметоприм није забележена. Кластер анализом су дата три кластера у која су распоређени сојеви на основу њихове осетљивости на антибиотике (Прилог 6).

Табела 24. Осетљивост изолата на антибиотици

Врсте	Антибиотици					
	OFX5	AZM15	DA2	SXT25	E15	TE30
<i>L. curvatus</i> Ios1	23,00±1,00(C)	28,40±0,69(C)	31,00±1,00(C)	29,00±1,00(C)	24,00±0,86(C)	24,50±1,32(C)
<i>L. curvatus</i> Ios6i	25,50±0,50(C)	28,00±1,40(C)	33,00±0,88(C)	31,50±0,50(C)	29,00±0,50(C)	24,00±0,30(C)
<i>L. curvatus</i> I7a	30,00±1,75(C)	29,50±1,80(C)	24,00±1,00(C)	27,50±1,32(C)	30,00±1,00(C)	13,00±1,00(C)
<i>L. curvatus</i> Ios18	19,50±0,50(P)	23,00±1,00(C)	22,00±0,00(C)	28,50±0,50(C)	17,00±0,00(P)	28,00±0,50 (C)
<i>L. curvatus</i> Iia19	26,00±0,00(C)	28,00±0,00(C)	20,50±0,50(C)	20,30±0,26(C)	21,40±0,36(C)	25,00±0,00 (C)
<i>L. curvatus</i> IIos3	21,50±0,00(C)	25,00±0,00 (C)	23,00±0,00(C)	25,50±0,00(C)	28,00±0,00(C)	21,00±0,00 (C)
<i>L. curvatus</i> IIos4	24,00±0,00(C)	28,00±0,00(C)	26,50±0,50(C)	22,00±0,00(C)	18,00±0,00(P)	22,50±0,00(C)
<i>L. curvatus</i> IIosv6	25,00±0,00(C)	25,00±0,00(C)	24,00±0,00(C)	22,50±0,00(C)	26,00±0,00(C)	29,00±0,00(C)
<i>L. curvatus</i> IIa8	20,00±0,00(C)	22,50±0,00(C)	25,00±0,00(C)	20,00±0,00(C)	21,00±0,00(C)	20,50±0,00(C)
<i>L. curvatus</i> IIos11	21,40 ±0,00(C)	24,00±0,00(C)	26,40±0,00(C)	25,00±0,00(C)	21,50±0,00(C)	31,00±0,00(C)
<i>L. curvatus</i> IIos17	23,30±0,00(C)	20,50±0,00(C)	21,00±0,00(C)	24,00±0,00(C)	22,00±0,00(C)	28,00±0,00(C)
<i>L. curvatus</i> I7a	26,00±0,00(C)	28,40±0,00(C)	23,00±0,00(C)	29,00±0,00(C)	24,00±0,00(C)	20,50±0,00(C)
<i>L. curvatus</i> IIa18	30,50±0,00(C)	24,00±0,00(C)	23,00±0,20(C)	24,00±0,00(C)	25,50±0,00(C)	25,50±0,00(C)
<i>L. curvatus</i> IIa19	22,00±0,00(C)	21,50±0,00(C)	22,00 ±0,00(C)	25,00±0,00(C)	25,00 ±0,00 (C)	27,00 ±0,00(C)
<i>L. curvatus</i> IIos21	30,00±0,00(C)	27,00±0,00(C)	16,00±0,20(P)	22,50±0,00(C)	25,00±0,00 (C)	22,00±0,00(C)
<i>L. curvatus</i> IIos25	30,00±0,00(C)	26,00±0,00(C)	30,00±0,00(C)	27,20±0,00(C)	26,50±0,00 (C)	25,50±0,00(C)
<i>L. curvatus</i> IIIos1	24,00±0,00(C)	21,50±0,00(C)	26,30±0,00(C)	24,00±0,00(C)	20,50±0,00 (C)	26,00±0,00(C)
<i>L. sakei</i> Ia8	22,50±0,00(C)	24,00±0,00(C)	30,00±0,00(C)	29,50±0,50(C)	30,00±0,00(C)	22,00±0,00(C)
<i>L. sakei</i> Ia9	29,50±0,00(C)	26,00±0,00(C)	29,50±0,00(C)	30,00±0,00(C)	24,00±0,00(C)	24,00±0,00(C)
<i>L. sakei</i> Ios12	21,40±0,00(C)	27,20±0,20(C)	24,00±0,00(C)	27,40±0,00(C)	26,50±0,00(C)	20,50±0,00(C)
<i>L. sakei</i> Ia22a	15,50±0,00(P)	18,00±0,00(P)	26,00±0,00(C)	30,00 ±0,00(C)	26,00±0,00(C)	26,00±0,00(C)
<i>L. sakei</i> IIb1	24,60±0,00(C)	23,00±0,00(C)	25,50±0,00(C)	24,5±0,00(C)	28,00±0,00(C)	28,50±0,00(C)
<i>L. sakei</i> IIb1a	24,00±0,00(C)	23,00±0,00(C)	26,50±0,50(C)	21,00±0,00(C)	16,00±0,00(P)	21,00±0,00(C)
<i>L. sakei</i> IIb2	18,60±0,00(P)	22,00±0,00(C)	26,00±0,00(C)	30,00±0,00(C)	23,00±0,00(C)	30,00±0,00(C)
<i>L. sakei</i> IIa2a	16,00±0,00(P)	16,00 ±0,00(P)	20,00±1,00(C)	20,50±0,00(C)	21,50 ±0,00(C)	21,00±0,00(C)
<i>L. sakei</i> IIb3	29,50±0,00(C)	25,00 ±0,00(C)	25,50 ±0,00(C)	23,00 ±0,00(C)	26,00±0,00(C)	25,00±0,00(C)
<i>L. sakei</i> IIa6	21,00±0,00 (C)	24,50±0,00(C)	23,00±0,30(C)	25,00±0,00(C)	17,50±0,00(P)	23,00±0,00(C)
<i>L. sakei</i> IIb11	25,00 ±0,00(C)	30,50±0,00(C)	25,00±0,20(C)	28,50±0,00(C)	29,00±0,00(C)	25,00±0,00(C)
<i>L. sakei</i> IIa13	25,00±0,00(C)	29,00±0,00(C)	31,00±0,00(C)	30,00±0,50(C)	30,00±0,00(C)	27,00±0,00(C)
<i>L. sakei</i> IIa14	26,00±0,00(C)	26,50±0,00(C)	29,50±0,00(C)	30,00±0,00(C)	30,00±0,00(C)	25,00±0,00(C)
<i>L. sakei</i> IIos15	29,00 ±0,00(C)	28,00 ±0,00(C)	26,00 ±0,50(C)	30,00±0,00(C)	26,00±0,00(C)	26,60±0,00(C)
<i>L. sakei</i> IIb21	17,50 ±0,00(P)	24,00±0,00(C)	28,50±0,50(C)	26,00±0,00 (C)	18,00±0,50(P)	26,00±0,00(C)
<i>L. sakei</i> IIa22	24,00±0,00(C)	28,50±0,50(C)	30,00±0,00(C)	28,50±0,00(C)	24,50±0,00(C)	23,00±0,00(C)
<i>L. sakei</i> IIIos13	23,50 ±0,50(C)	26,20±0,20(C)	25,40±0,40(C)	26,00±0,00(C)	22,00±0,00(C)	27,40±0,40(C)
<i>L. sakei</i> IIIos16	22,20±0,00(C)	20,00±0,00(C)	20,60±0,00(C)	24,00±0,00(C)	23,00±0,00(C)	26,30±0,00(C)
<i>L. mesenteroides</i> Ios11	25,4±0,40(C)	24±0,00(C)	22±0,00(C)	21±0,00(C)	22±0,00(C)	20,5±0,50(C)
<i>L. mesenteroides</i> IIos4i	25±0,00(C)	22±0,00(C)	30±0,00(C)	28±0,00(C)	15±0,00(P)	23±0,00(C)
<i>L. mesenteroides</i> IIIos4	26±0,00(C)	25±0,00(C)	23±0,00(C)	28±0,00(C)	28±0,00(C)	21±0,00(C)
<i>E. faecium</i> Ios1a	24,2±0,20(C)	21±0,00(C)	21,6±0,10(C)	22±0,00 (C)	17±0,00 (P)	22,4±0,00 (C)
<i>E. faecium</i> Ios4	21±0,00(C)	20,8±0,00(C)	24±0,00(C)	25,3±0,10 (C)	17±0,00 (P)	21±0,00 (C)
<i>E. faecium</i> Ios5a	20,5±0,50(C)	23±0,00(C)	24,5±0,00(C)	26,2±0,20 (C)	23,3±0,30 (C)	24±0,00 (C)
<i>E. faecium</i> IIos24	20,8±0,00(C)	21,4±0,00(C)	15±0,00(P)	20±0,00 (C)	21±0,00 (C)	21±0,00 (C)

Резултати су приказани као средња вредност ±СД; С-сензитивно; Р-резистентно; офлоксацин (ofx5), азитромицин (azm15), клиндамицин (da2), триметоприм (sxt25), еритромицин (e15), тетрациклин (te30)

7. ДИСКУСИЈА

Сјеничка овчија стеља је традиционални сувомеснати производ заштићен ознаком географског порекла, који се карактерише квалитетном сировином са подручја Пештера на коме се производи специфичном технологијом производње. Према *Bauman & Dumić (2017)* производи који воде порекло са одређеног географског подручја најчешће се одликују специфичном технологијом производње, микробиотом, карактеристичним сензорним својствима и врхунским квалитетом. У овој докторској дисертацији први пут је урађена потпуна анализа аутохтоног сувоместантог производа сјеничка очија стеља, кроз хемијску, сензорну и микробиолошку анализу. Физиолошком карактеризацијом БМК, КНС и плесни, по први пут је анализирана аутохтона микробиота производа, са посебним освртом на технолошки и пробиотски потенцијал изолованих аутохтоних бактеријских сојева.

Хемијска анализа сјеничке овчије стеље

Тестиране хемијске карактеристике сјеничке овчије стеље кроз трогодишњи период истраживања су показале да међу тестираним узорцима код одређених параметара квалитета постоји статистички значајна разлика.

pH вредност производа код свих произвођача је врло слична. Такви резултати су се очекивали с обзиром да су се узорци производили идентичним технолошким поступком и у истим микроклиматским условима.

Резултати активности воде у тестираним узорцима су показали да међу њима не постоје статистички значајне разлике ($p > 0,05$). Садржај воде у узорцима стеље током истраживања је био уједначен код узорака из села Блато и Крајиновиће у првој и другој производној сезони узорковања, као и у селима Крајиновиће и Расно у трећој производној сезони узорковања ($p > 0,05$). Садржај воде у стељи, који се кретао у распону од 42,5 - 47,2%, је сличан садржају воде у овчијој стељи са подручја Босне и Херцеговине (*Ganić et al., 2013*). *Krvavica et al. (2009)* истражујући проивод врло сличан стељи, су указали да је средња вредност садржаја воде присутне у далмантинској краштини била 31,23%, што је мање него у узорцима сјеничке овчије стеље. Количина воде у сјеничкој овчијој стељи зависи од процеса сољења и сушења, и врло је слична шункама са италијанског и хрватског подручја које су истраживали аутори *Vogdanović et al. (2017)*, иако се ради о производу код кога је сировина друга животињска врста.

Садржај масти у узорцима стеље из домаћинства сва три села у трећој производној сезони (А3, Б3 и В3) није био статистички различит (вредности од 7,53 - 7,9%) ($p > 0,05$), док је код осталих узорака забележена статистички значајна разлика. *Krvavica et al. (2009)* су утврдили да је проценат масти у каштрадини износио 39,21%, што је значајно више од добијених вредности сјеничке овчије стеље.

Значајна разлика у односу на остале узорке у садржају протеина је забележена код узорка из села Крајиновиће (Б3), док код узорака А1, Б1 и В3, нису забележене значајне статистичке разлике ($p > 0,05$). *Gajić (2000)* истиче да је проценат протеина у стељи са подручја Босне и Херцеговине био 29,04% на 5,34% NaCl, што су ниже вредности садржаја протеина од добијених вредности код сјеничке овчије стеље. *Čaušević et al. (1984)* су указали да је проценат протеина у узорку (узета из ребара и бубрега) код произведене овчије стеље износио 21,25%, тако да и у овом истраживању је указано на ниже вредности протеина у односу на резултате добијене приликом израде ове дисертације, што се објашњава чињеницом да садржај протеина сушених шунки варира у зависности од степена сушења и садржаја масти (*Toldrá, 2002*). Према *Teixeira et al. (2020)*

висок проценат протеина (46,2% и 38,4%) и низак проценат масти (5,3% и 8,7%) показују да ефекат процеса сољења и сазревања чини суво козије и овчије месо занимљивим и нутритивно уравнотеженим производом.

Садржај соли у производу директно утиче на процесе липолизе, протеолизе и оксидације, при чему у процесу производње стеље је дозвољена искључиво примена сувог сољења, крупном морском сољу у количини од 3,5 - 5% (Bauman & Dumić, 2017). У крајњем производу је забележен садржај соли преко 5%, при чему код узорака А1; А3; Б3, В1 и В3 нису забележене значајне статистичке разлике ($p > 0,05$).

Садржај пепела испитиваних узорака се кретао од 9,1-10,5%, ($p > 0,05$), са изузетком код узорка из села Крајиновиће у другој производној сезони (10,9%) ($p > 0,05$). Према Ganić et al. (2013), проценат пепела у узорцима овчије стеље са подручија Босне и Херцеговине се кретао у опсегу од 1,76% до 2,31%.

Сензорна анализа сјеничке овчије стеље

Сензорни квалитет ферментисаних месних производа зависи од адекватности одабраних сензорних особина које укључују укус (укус, арому или мирис), изглед и текстуру. Главни чулни атрибути описани су широким спектром специфичних дескриптора (Bogdanović et al., 2017). Према Stamenković & Dević (2006) сјеничка овчија стеља је описана као производ смеђе боје, мекане и еластичне текстуре, благо мраморирана са жутим масним ткивом, благо киселог укуса са аромом дима, умерено до изразито сољена и сушена. Stojković et al. (2015), истражујући квалитет и разлике овчије стеље са подручја Западног Балкана, напомињу да разлике у органолептичким својствима производа пре свега потичу од примењене технологије производње и зачина који се у истој примењују. 25% српских овчјих стеља случајно узоркованих на изложби, имало је интензиван мирис и укус дима, при чему су се неки узорци одликовали и високим степеном сланости (6,2 - 6,7% v/v соли) (Stojković et al., 2015).

Током сензорске анализе узорака очије стеље утврђено је да су испитивани узорци у потпуности одговарали опису производа, без видљивих мана и недостатака. Узорци су оцењивани високим средњим оценама у складу са проценом оцењивача при чему параметри квалитета (спољни изглед, боја масног ткива, мраморираност, повезаност на пресеку, мирис, жвакљивост, натапање пљувачком, сланост, мирис и укус дима и ужегlost) нису показали статистички значајну разлику у сензоричким оценама ($p > 0,05$). Статистички значајна разлика је утврђена код узорака из села Блато у првој производној сезони (А1) када су у питању интензитет боје на пресеку, интермускуларна масноћа и укус, при чему треба напоменути да су тестирани узорци овчије стеље испунили све захтеве прописане елаборатом који су написали Bauman & Dumić (2017) у погледу сензорских карактеристика производа.

Микробиолошка анализа сјеничке овчије стеље

Сложен начин производње и ферментације сјеничке овчије стеље утиче на разнолоност микробиоте која се развија у производу, при чему састав микробне популације потиче од микроорганизама који се природно налазе у месу или од оних који доспеју у производ контаминацијом у току производног процеса (Žugić-Petrović et al., 2016).

Микробиолошком анализом стеље током процеса производње и зрења је утврђена промена бројности аеробних мезофилних бактерија у узорцима производа у току све три

истраживачке сезоне. Промена бројности се кретала од најниже вредности у домаћинству села Блато у првој производној сезони (А1) 5,62 log CFU/g нултог дана зрења, до највише вредности од 8,66 log CFU/g забележеној у селу Крајиновиће у трећој производној сезони (Б3) деведесетог дана зрења. Статистички значајна разлика бројности аеробних мезофилних бактерија код узорака стеље на почетку и током процеса ферментације није забележена до 60 дана када се у узорцима из села Крајиновиће (Б2 и Б3) бележи статистичка разлика ($p < 0.05$), као и 90 и 120 дана ферментације у узорцима из села Блато (А2 и А3). Резултати корелационе анализе између хемијских параметара и броја аеробних мезофилних бактерија током зрења сјеничке овчије стеље показују статистички негативну колерацију између броја аеробних мезофилних бактерија и садржаја пепела и позитивну између броја аеробних мезофилних бактерија и рН вредности. Промена бројности аеробних мезофилних бактерија у узорцима *Khyoreh*-а (традиционалног сувомеснатог производа од меса јака) се кретала у оквиру вредности од 6-7 log CFU/g (Bhutia et al., 2019). Укупан број бактерија у узорцима *Kitoza* (сувомеснатог производа са Мадагаскара) кретао се у просеку око 7,0 log CFU/g, и повезује се са високим бројем БМК и КНС-а (Ratsimba et al., 2019).

Током производног процеса и зрења овчије стеље, бројност бактерија из фамилије Pseudomonadaceae и Enterobacteriaceae се смањивао до 28-мог дана након чега присуство бактеријских врста из ових фамилија није забележено. Највећа бројност врста из фамилије Enterobacteriaceae детектована је у сировом месу (бројност бактерија креће у распону од 2,88 log CFU/g (Б2) до 3,39 log CFU/g (А2). До седмог дана ферментације бројност ентеробактерија наставља раст, након чега опада до најниже вредности у узорку Б2 од 2,17 log CFU/g. Најниже вредности бактерија из фамилије Enterobacteriaceae се бележе 28-мог дана ферментације у свим истраживаним узорцима стеље (број бактерија пада испод 2 log CFU/g), без статистички значајне разлике осим код узорака из села Крајиновиће и Расно у другој производној сезони. Примећена је негативна корелација у односу садржаја масти и броја Enterobacteriaceae седмог дана истраживања, док је позитивна корелација утврђена између броја поменутих бактерија и рН вредности и a_w вредности. Сличне вредности бројности бактерија из фамилије Enterobacteriaceae (2 log CFU/g) су добили Fettahoğlu et al. (2019) услед опадања вредности активности воде у производу *pastirma* током производног процеса. Бројност бактерија из фамилије Pseudomonadaceae током процеса производње и зрења сјеничке овчије стеље је била различита код већине узорака. Бројност бактерија је била повећана у сировом месу. Након 14 дана, присуство бактерија из фамилије Pseudomonadaceae у узорцима није забележено. Бројност бактерија из фамилије Pseudomonadaceae је био у статистички позитивној корелацији седмог и 14-наестог дана истраживања са садржајем пепела и садржајем соли, док је у негативној колерацији са садржајем протеина и рН вредности 14-наестог дана истраживања. Присуство патогених бактерија попут врста из рода *Salmonella* и *L. monocytogenes* није забележено ни у једној фази производње овчије стеље испитиване у овој дисертацији што указује на микробиолошку исправност производа. У истраживању лемешког кулена Vuković et al. (2012) нису детектовали присуство бактерија рода *Salmonella* и *L. monocytogenes*.

Ratsimba et al. (2019) су показали да су БМК најбројнија група бактерија доминантна у свим фазама производње стеље, праћене микрококама и ентерококама у значајно мањем броју. Промена БМК у тестираним узорцима стеље нултог дана истраживања се кретала од 2,97 log CFU/g (Б2) до 3,37 log CFU/g (А3), без статистички значајних разлика међу узорцима по годинама производње. Према Talon & Leroy (2011)

бројност БМК у свежему месу на почетку ферментације има вредност од 3 до 5 log CFU/g, док се у току ферментације број БМК драстично увећава достижући вредност од 8 до 9 log CFU/g, што је потврђено и резултатима ове дисертације. Током процеса зрења стеље, бројност БМК се постепено повећавала у свим узорцима до 90-тог дана зрења када се запажа благи пад броја БМК, од вредности 8,45 log CFU/g (B3) до 8,36 log CFU/g (A3) 120-тог дана зрења стеље. Добијени резултати промене броја БМК су нешто виши од резултата истраживања сремског и лемешког кулена, где се бројност БМК кретала у распону од 6.94 log CFU/g до 7.18 log CFU/g (Vasilev et al., 2015). Број изолованих БМК у пастрми *Şekerpare* је износио 7.30 log CFU/g (Akköse et al., 2019). Comi et al. (2005) и Samelis et al. (1998) напомињу да, у процесу ферментације меса услед изузетне прилагођености и брзе стопе умножавања, БМК чине најбројнију групу микроорганизама већ трећег дана од почетка ферментације са бројношћу од 8 до 9 log CFU/g. Током процеса производње овичије стеље није утврђена статистичка колерација између хемијских карактеристика стеље и бројности БМК.

Бројност бактерија из рода *Enterococcus* током процеса зрења узорака сјеничке овчије стеље се одликује уједначеном редукцијом броја поменутих бактерија од нултог до 28-мог дана зрења стеље без статистичке разлике међу узорцима у различитим производним годинама. Број ентерокока на почетку зрења је имао вредност од 3 log CFU/g (B2) до 3,55 log CFU/g (A2), да би се на крају зрења бројност кретала од 1,8 log CFU/g (B3) до 2,12 log CFU/g (A1). Број ентерокока драстично опада 28-мог дана зрења, што је у складу са истраживањем које су спровели Vuković et al. (2012). Они су указали да је бројност ентерокока током процеса ферментације лемешког кулена, у распону на почетку зрења (2,50 log CFU/g), након 3 месеца (1,03 log CFU/g) и на крају процеса зрења производа (1,34 log CFU/g). С обзиром на чињеницу да *Enterococcus* spp. утиче на развијање ароме код сувомеснатих производа, можемо слободно рећи да је присуство овог бактеријског рода веома значајано до самог краја производног процеса. Корелационом анализом потврђена је позитивна корелација садржаја протеина и рН вредности са бројем ентерокока и негативна корелација броја ентерокока и садржаја пепела и соли стеље.

Бројност стафилокока у овчијој стељи се повећава од почетка ферментације до готовог производа и креће се у опсегу највиших вредности у узорцима од 3,05 log CFU (A1) нултог дана процеса, 5,03 log CFU (B2 и B3) 28-мог дана, до 3,65 log CFU (B1) у готовом производу. Током седмог, 28-мог и 120-ог дана се не бележи статистички значајна разлика у броју стафилокока у узорцима стеље, док је 60-тог дана ферментације присутна статистичка разлика у резултатима код свих узорака стеље. Корелационом анализом потврђена је позитивна корелација код промене бројности врста из рода *Staphylococcus* и садржаја масти. Akköse et al. (2019) су указали да долази до промене броја стафилокока у распону од 6,02 log CFU/g до 7,05 log CFU/g у пастрми. Стафилококе су једна од доминантних микробних група у пастрми (Fettahoğlu et al., 2019). Број стафилокока у традиционалном производу са Мадагаскара *Kitoze* је просечно износила 6,4 log CFU/g (Ratsimba et al., 2019). Cocolin et al. (2001) у свом раду истичу да су КНС од великог значаја за последњу фазу ферментације сувомеснатих производа кад се формирају органолептичке карактеристике производа. Wang et al. (2021) својим радом потврђују директну повезаност *S. saprophyticus* и *S. equorum* са високим активностима протеаза и липаза што доводи до формирања карактеристичног ароматичног укуса *Jinhuah* шунке.

Присуство плесни је детектовано у касним фазама зрења стеље, што је и очекивано с обзиром на резултате истраживања који потврђује чињеницу да је присуство плесни пре

свега директно везано за активност воде у производу. Промена бројности плесни у стељи, током трогодишњег истраживачког периода, се кретала у опсегу од 1,27 log CFU/g до 1,65 log CFU/g након 28 дана истраживања без статистички значајне разлике код узорка прве производне године. Након завршеног производног процеса, присуство плесни је порасло до највише вредности од 5,36 log CFU/g код узорка Б2. Статистички позитивна корелација је утврђена кроз период зрења овчије стеље, односно садржаја масти и броја плесни 28-мог и 60-тог дана, док је негативна корелација дефинисана између садржаја протеина (28-мог и 90-сетог дана), воде (60-тог дана) и рН вредности (28-осмог дана истраживања) и броја плесни.

Улога плесни у ферментацији сувог меса је веома значајна и огледа се у оксидацији лактата, протеолизи, деградацији аминокиселина, липолизи, липооксидацији, спречавању ужеглости и смањењу губитка влаге услед споријег испаравања (Sunesen & Stahnke, 2003; Sunesen et al., 2004). У спонтаној ферментацији и сазревању аутохтоних производа инокулација плесни потиче пре свега од „кућне флоре“ повезане са простором и опремом која се користи у производном процесу (Hammes et al., 2005). Неки услови у процесу производње могу да одреде и поспеше развитак доминантних врста плесни (Scolari et al., 2003). Núñez et al. (2007) у свом раду истичу да плесни не расту као изоловани ентитети на сушеној шунки већ расту у конкуренцији са бактеријама, и оваква интеракција може смањити производњу штетних метаболита. Према Laranjo et al. (2017; 2019) плесни се ређе користе као почетне културе у ферментацији меса. Међутим, засејавање плесни на површини производа понекад може допринети повећању безбедност производа. На површини сувог меса плесни формирају баријеру која спречава продирање светлости и кисеоника у дубље слојеве производа чинећи га на тај начин стабилнијим (Sonjak et al., 2011).

Идентификација доминантне микробиоте сјеничке овчије стеље

МАЛДИ-ТОФ идентификација је једна од метода која би могла на основу поузданости и брзине добијања резултата, заменити технике молекуларне идентификације у блиској будућности. Применом овог типа идентификације, изолати добијени из овчије стеље идентификовани су као представници шест врста у оквиру групе БМК и четири врсте у оквиру групе КНС.

Из аутохтоног производа сјеничка овчија стеља, изоловано је 443 изолата који су на основу бојења по Граму и негативног каталаза теста сврстани у БМК. Изолати идентификовани као *L. curvatus* (213 изолата) и *L. sakei* (175 изолата), били су најдоминантнији у стељи у свим производним годинама и код свих произвођача. Врсте *E. faecium* (30 изолата), *E. faecalis* (7 изолата), *L. plantarum* (9 изолата) и *L. mesenteroides* (17 изолата) изоловане су у значајно мањем броју.

Најчешће идентификоване БМК врсте у традиционалним ферментисаним сувомеснатим производима као што су кобасице су *L. sakei*, *L. curvatus* и *L. plantarum* (Aumerich et al., 2006; Fontán et al., 2007). Према Reckem et al. (2019) *L. sakei* је доминантна врста у ферментисаним месним производима са подручја Француске, Италије и Шпаније док су врсте *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. alimentarius* и *Pediococcus pentosaceus* изоловане само спорадично. Врста *L. sakei* је детектована у месној матрици, што указује на чињеницу да се месо „контаминира“ овом врстом лактобацила веома рано, у самом процесу клања. Контаминација сировине вероватно потиче са коже или измета животиње, а касније и из

производних објеката за прераду (Chiaramonte et al., 2009). *L. curvatus* је бактерија добро прилагођена за раст у месу, изолована је из великог броја традиционалних месних производа у којима се њена улога огледа у убрзању процеса ферментације и побољшању органолептике производа. Сојеви *L. curvatus* и *L. sakei* су фенотипски уско повезани и разликују се у хидролизи аргинина, ферментацији мелибиозе, ксилозе и присуства хем зависне каталазе (Belfiore et al., 2019). Изолати идентификовани као *L. plantarum* изоловани су из свих узорака *Alheira*, ферментисане кобасице произведене у Португалу, при чему је оптимална температура за раст ове врсте између 30 и 35°C, што одговара температури производног процеса великог броја сувомесних производа. *E. faecalis* је изолован из већине узорака производа *Alheira* (Albano et al., 2009). *L. sakei* доминира у ферментацији сувомеснатих производа, и врло често се може изоловати из хладно складиштеног сировог меса и меса упакованог у вакуум амбалажу (Zagorec & Champomier-Verges, 2017). Присуство *L. sakei* је детектовано у месној матрици, што указује на чињеницу да се месо „контаминира“ овом врстом лактобацила веома рано, у самом процесу клања. Контаминација сировине вероватно потиче са коже или измета животиње, а касније и из производних објеката за прераду (Chiaramonte et al., 2009). *L. curvatus* је бактерија добро прилагођена за раст у месу, изолована је из великог броја традиционалних месних производа у којима се њена улога огледа у убрзању процеса ферментације и побољшању органолептике производа. Сојеви *L. curvatus* и *L. sakei* су фенотипски уско повезани и разликују се у хидролизи аргинина, ферментацији мелибиозе, ксилозе и присуства хем зависне каталазе (Belfiore et al., 2019).

Идентификацијом изолованих бактерија из групе *Micrococcus/Staphylococcus* из узорака сјеничке овчије стеље, дошло се до закључка да су најдоминантније врсте изоловане у свим истраживачким периодима код свих произвођача биле *S. xylosus*, *S. carnosus*, *S. epidermidis*. *S. saprophyticus* је изолована само у првој производној години код свих произвођача, док је у другој години изолована у домаћинствима из села Крајиновиће и Расно, а и трећој години из узорака из села Блато и Расно. Истражујући биодиверзитет стафилокока у пастирми, Fettahoğlu et al. (2019) истичу присутност *Staphylococcus vitulinus*, као најдоминантније врсте коју прате *S. equorum*, *S. saprophyticus* и *S. xylosus*. У популацији КНС-а изолованих из сузук, иберијске пршуте, и туниског сланог меса, *S. xylosus* је изолована као најдоминантнија врста (Rodriguez et al., 1996; Essid et al., 2007; Kaban & Kaaya, 2009). У аутохтоним сувомеснатим производима са подручја Шпаније превладала је врста *S. equorum*, док је *S. xylosus* била доминантна у већини француских и италијанских ферментисаних месних производа (Reckem et al., 2019). У ферментисаним месним производима са подручја Немачке и Белгије доминирала је врста *S. carnosus*, затим *S. xylosus* и, мањој мери, *S. equorum*, *S. saprophyticus* и *Staphylococcus succinus* у неким узорцима. *S. succinus* је идентификована као доминантна КНС врста само у једном белгијском месном производу (Reckem et al., 2019). Доминантну микробиоту аутохтоног производа *Pastrima* чиниле су врсте *Staphylococcus vitulinus*, *S. equorum*, *S. saprophyticus* и *S. xylosus* (Fettahoğlu et al., 2019). КНС изоловане из традиционалног производа „Сузук“ су чиниле врсте *S. xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. equorum*, и *Staphylococcus carnosus* (Kaban & Kaaya, 2009). Fontán et al., (2007) су указали да изоловане стафилококе осетљиве на новобиоцин у месним производима потичу са коже људи и животиња у процесу манипулације сировинама и током производње. Присуство резистенције код стафилокока изолованих из хране анималног порекла може се објаснити честим давањем антибиотика животињама у терапеутске сврхе или раста (de Mesquita Souza Saraiva et al., 2022).

Квалитативни и квантитативни састав плесни које расту на поршини сјеничке овчије стеље директно зависи од квалитета сировине и хигијенских услова у производном окружењу (Žugić-Petrović et al., 2018). Током истраживања у оквиру ове докторске дисертације, врсте из рода *Penicillium* су изоловане као доминантне код свих узорака у све три производне године. Изоловане су врсте *P. carneum*, *P. caseifulvum*, *P. corylophilum*, *P. confertum*, *P. crustosum*, *P. nalgiovense*, *P. rugulosum*, *P. polonicum* и *P. solitum*. Ове врсте плесни су доминантне и другим врстама сувомесних производа (Asefa et al., 2009; Sonjak et al., 2011; Lešić et al., 2020).

У хрватским традиционалним сувим ферментисаним кобасицама произведеним у домаћинствима без употребе стартер култура, 71% идентификованих плесни било је из рода *Penicillium*, 18% из рода *Mucor* и 11% из рода *Aspergillus* (Lešić et al., 2020). Sonjak et al. (2010) у свом раду истичу род *Penicillium* као доминантни део површинске микробиоте код свих истраживаних сувомеснатих производа. Врсте из рода *Penicillium* су такође у великом проценту (88,3%) изоловане у норвешким сувомеснатим производима, при чему је *P. nalgiovense* најдоминантнија врста (Asefa et al., 2009). Toledano et al., (2011) су у свом раду доказали добар протеолитички потенцијал плесни.

У оквиру рода *Aspergillus* изолованих из овчије стеље, идентификоване су две врсте: *A. niger* и *A. nidulans* док су код рода *Eurotium* идентификоване врсте *E. herbariorum* и *E. chevalieri*. *M. racemosus* и *M. plumbeus* су изоловане врсте у оквиру рода *Mucor*. Плесни присутне на овчијој стељи спадају у групу најчешће изолованих плесни сувог меса, што потврђују и радови других аутора (Rojas et al., 1991; Comi et al., 2004; 2013). Микробиоту пршуте *San Daniele* су углавном чинила два рода (*Penicillium* и *Aspergillus*), који су изоловани током трајања процеса зрења (Comi et al., 2013). Rojas et al. (1991) су анализирали 65 узорака шунки и утврдили доминацију родова *Aspergillus* и *Penicillium*, при чему је идентификацијом потврђено да су *Aspergillus* spp. пре свега чинили: *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus fumigatus*, *A. niger* и *Aspergillus flavus*. У истраживању плесни истарске пршуте, Comi et al. (2004) су идентификовали пет родова, при чему су *Eurotium* spp., *Aspergillus* spp. и *Penicillium* spp. били најчешће изоловани из узорка пршуте.

Технолошке особине аутохтоне микробиоте сјеничке овчије стеље

Технолошке особине изолата/соја су кључне при селекцији стартер култура за употребу у ферментисаним месним производима. Употреба аутохтоних сојева као стартер култура у месним производима захтева добру прилагођеност одабраних сојева на услове месног матрикса како би се добио производ уједначених сензорних и хемијских карактеристика.

Имплементација *L. sakei* у хрватским традиционалним ферментисаним кобасицама довела је до смањења бројности и присуства непожељне микробиоте, при чему су сачуване сензорне карактеристике производа (Zdolec et al., 2008). У току конзервације *L. sakei* успешно расте при већој концентрацији NaCl, смањеној активности воде, ниским температурама и ниској рН, што се објашњава адаптацијом овог организма на стресне услове животне средине и високом толеранцијом на услове производног процеса. Данас се овај лактобацил врло често користи као стартер култура за производњу сувомеснатих производа, због својих добрих технолошких карактеристика. *L. sakei* поседује две подврсте: *L. sakei* subsp. *carneus* и *L. sakei* subsp. *sakei* и одликује се великом генетском разноликошћу унутар врсте (Zagorec & Champomier-Verges, 2017).

L. curvatus се користи као стартер култура у производњи великог броја производа од меса и одговоран је за брзо закишељавање производњом млечне киселине из угљених хидрата у производу. Поседује способност толеранције ниске киселости средине, развијеним системима глутамат декарбоксилазе или аргинин деиминаза који штите *L. curvatus* од произведених киселина (Wang et al., 2018). Механизми реакције на стрес код *L. curvatus* су регулисани на различитим нивоима, подносе високе садржаје соли и температурне промене у супстрату. Оптимална температура за раст овог организма је од 30-40°C, психотрофан је и може толерисати високе концентрације соли и различите неповољне услове у процесу производње и прераде меса.

L. plantarum показује способност толеранције на рН 2,0 и 3,0 (кисела средина) и присуство жучних соли концентрације до 0.7% (Soliman et al., 2015). Wang et al. (2016) указују да *L. plantarum* ATCC 14917 може да расте у присуству 6% NaCl у подлози. Grujović (2019) указује да *L. plantarum* KGPMF62 (изолат из сира) толерише присуство соли до 6%, али показује умерен раст и на 8% соли. Исти изолат је показао толеранцију на широк опсег рН (од 5,5 до 8,5), с тим што је бољи проценат раста забележен у киселој средини. Изолати *L. plantarum* изоловани из узорака овчије стеље су показивали раст у условима средине рН од 6 и 8, док пораст није забележен при вредности рН од 4. Повећана концентрација NaCl у распону од 4 до 6,5% није значајно утицала на раст ових сојева, док повећање концентрације од 8%, је зауставило пораст *L. plantarum* изолата.

Утицај различитих услова средине на раст аутохтоних изолата плесни

Интеракција између фактора животне средине и компоненти хране могу да обезбеде потребне услове за раст и развој филаментозних гљива, што може бити праћено потенцијалном производњом токсичних метаболита (Gresco et al., 2018). Да би спречили нежељени раст плесни јако је важно утврдити утицај оних фактора средине који директно утичу на њихов раст (Gresco et al., 2018). У нашем истраживању осетљивост на температуру од 37°C је показала већина истраживаних плесни посебно изолати из рода *Penicillium*. Према Косић- Танасков (2012) за већину *Penicillium* spp. оптимална температура раста је између 25 и 30°C, док је за *Aspergillus* spp. између 30 и 40°C. Повећана концентрација соли је имала утицај на раст плесни само у оним случајевима када је концентрација исте износила више од 8%, осим у случају *E. chevalieri* која није показивала раст у условима средине где је количина соли износила 6,5%. *P. solitum* је показао раст на рН 10, за разлику од *E. chevalieri*, *M. racemosus* и *M. plumbeus* који нису расли у условима рН 4. Резултати истраживања утицаја услова средине на раст изолованих плесни показују да је дириговање услова средине од великог значаја за спречавање раста плесни на површини производа што је велики проблем у месној индустрији.

Утицај активности воде на радијални раст плесни

Núñez et al. (2007) истичу да се одабране нетоксичне плесни могу користити као стартер културе за производњу месних производа како би се неутралисали опасни метаболити уз задржавање благотворног доприноса гљива у сазревању сувомеснатих производа. Истраживање утицаја a_w на раст плесни из овчије стеље имало је за циљ да пружи детаљније знање о технолошким захтевима ових врста при колонизацији самог производа. Одабране су врсте плесни (*P. crustosum*, *P. polonicum*, *A. nidulans*, *A. niger*, *E. herbariorum*, *E. chevalieri* и *M. plumbeus*) које утичу на органолептику и безбедност

производа и које, као такве, могу имати позитиван или негативан утицај у месној индустрији. Одабране a_w вредности истраживане у оквиру ове дисертације су се кретале у интервалима просечне вредности параметра који је владао у сировом овчијем месу (0,97), у процесу производње стеље (0,89) и у готовом производу (0,85). Према Косић-Танасков (2012) биосинтеза микотоксина од стране плесни је под директним утицајем a_w средине. Суво овчије месо се одликује ниском активношћу воде (a_w) и високом концентрацијом соли, при чему су то добри услови за развитак ксерофилних плесни (Sonjak et al., 2011). Многи аутори напомињу да неповољни услови средине у којима расту плесни могу директно утицати на синтезу микотоксина, што чини храну небезбедном за хуману употребу. Врсте из родова *Aspergillus* и *Penicillium* су способне да производе низ секундарних метаболита у широком спектру супстрата, укључујући сушену шунку, током различитих фаза производње шунке. Услови животне средине и микробиолошки састав значајно варирају и може бити неповољна за синтезу секундарних метаболита (Montanha et al., 2018). Према Duduk et al. (2014) секундарни метаболити *P. polonicum* укључују штетне микотоксине, пеницилну киселину, верукозидин и нефротоксичне гликопептиде, који штетно утичу на здравље конзументата. Núñez et al. (2000) у свом раду истичу да је температура најважнији фактор који утиче на раст мицелија, док на акумулацију верукозидина највише утиче a_w .

Резултати добијени у оквиру ове дисертације су потврдили да је раст одабраних плесни из узорака сјеничке овчије стеље под директним утицајем a_w . Према Žugić-Petrović et al. (2018) смањење брзине раста плесни изолованих из овчије стеље је под директним утицајем активности воде. Žugić-Petrović et al. (2018) истичу да је на раст *E. herbariorum* најмање утицала a_w вредност, и да су 12-тог, односно 15-ог дана истраживања, величине колонија достигле исту вредност без обзира на a_w вредност подлоге. *Penicillium italicum* је растао у условима a_w од 0,87, при чему се ова врста показала као најприлагођаванија на промену a_w вредности у истраживаним условима (Plaza et al., 2003).

Активност воде од 0,89 је различито утицала на брзину раста изолата, па при овој вредности се у првим данима раста запажа дијаметар колонија од 0,2 cm код *A. nidulans* да би се након 15 дана инкубације дијаметар колонија кретао од 2,2 cm код *P. crustosum* до 6,5 cm код изолата *A. niger* и *E. herbariorum*. На основу представљених резултата запажа се да је дијаметар колонија *A. niger*, *E. herbariorum* при a_w од 0,89 је за 3,5 cm мањи у односу на величину колонија истих плесни при a_w од 0,85. Gibson et al. (1994) су истраживали утицај a_w на раст на плесни *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. parasiticus* и *A. nomius* при температури од 30°C при a_w вредност од 0,810 до 0,995 и доказали да се дијаметар колонија истраживаних плесни за сваку различиту a_w вредност мења просечно за 3 mm. Изолат *M. plumbeus* је показао добар раст при a_w вредности од 0,97, максимални раст од 10 cm је постигнут 15-тог дана инкубације, док су изолати *P. polonicum* и *A. nidulans* јако споро расли и максималану величину колонија од 1 cm су постигли тек након 10 односно 12 дана инкубације. Gibson et al. (1994) у свом истраживању долазе до опсега a_w вредности за раст *A. flavus* који се кретао од 0,81 до 0,95.

Антимикробна активност тестираноих изолата

Антимикробна активност пробиотских бактерија према патогену се може остварити уз помоћ неколико механизма који укључују производњу антимикробних једињења, конкуренцију за супстрат и коагрегацију са патогеном (Todorov et al., 2011).

Истраживање антимикробних пептида које продукују БМК данас све више добија на значају, при чему се антимикробна једињења могу користити у прехранбеној индустрији уместо хемијских конзерванса за производњу органске хране (Dejene et al., 2021). У данашње време, све се више истражују нове класе природних антимикробних полипептида способних да инхибирају раст и развој бактерија које могу проузроковати кварење хране. Према Vargasenilla et al. (2022), пречишћени, односно полупречишћени бактериоцини или други метаболити бактеријског порекла се могу користити за контролу нежељених бактерија у месним производима. Директна инокулација БМК са изразитим антибактеријским способностима у току процеса производње такође може бити врло ефикасан начин заштите хране (Perez et al., 2014; Silva et al., 2018). Биоконзервацијом хране се може спречити контаминација патогеним микроорганизмима, који поседују отпорност на комерцијалне антибиотике (Вајрај et al., 2016). Casaburi et al. (2016) истичу да су, међу БМК сојевима пронађеним у месу и месним производима, *L. sakei* и *L. curvatus* окарактерисани као главни произвођачи антимикробних једињења, који су одговорни за производњу бактериоцина сакацина, односно курвацина. Низин је један од бактериоцина који се користи у прехранбеној индустрији као биоконзерванс, међутим, овај полипептид није пронашао велику примену у месној индустрији (Vargasenilla et al., 2022). За разлику од њега, педиоцин, поред сакацина, има широку примену у индустрији меса (Grujović et al., 2022).

Резултати ове докторске дисертације су показали да тестирани изолати КНС нису показали антимикробну активност према тестираним индикаторским врстама. Изолати БМК тестирани у оквиру ове докторске дисертације показали су највећу зону инхибиције према *E. coli* ATCC 25922 (средње вредности зоне инхибиције од 25,6 до 10,03 mm). Изолати *L. curvatus* Pos6, *E. faecium* Ios4, *L. sakei* Pos16, *L. sakei* Ios12, *L. curvatus* Pos17, *L. curvatus* Pos1 и *L. sakei* Pos13 су показали зону инхибиције према свим испитиваним патогенима. Сличне резултате у односу на раст *E. coli* су добили Brink et al. (2006), истражујући антимикробни потенцијал БМК сојева изолованих из фекалија деце са ХИВ/АИДС-ом. У случају *L. monocytogenes* ATCC 19115, истраживани изолати су показали добра антимикробна својства, а нарочито се истакао изолат *L. curvatus* Pos6 је (зона инхибиције 25 mm). Venito et al. (2007) у својој студији истичу антимикробно деловање изолата БМК из иберијских ферментираних кобасица против *L. monocytogenes*. *L. curvatus* Pos11 имао је најмању антимикробну активност, без зоне инхибиције на *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 и *B. cereus* ATCC 14579. *P. aeruginosa* ATCC 27853 је патоген за који највећи број испитиваних изолата БМК (43,75%) нису показали зону инхибиције. Антагонистички ефекат на раст *B. cereus* ATCC 14579 није показало 25% изолата БМК. *L. sakei* R1333 изолован из димљеног лососа је продуцент сакацина Г, који се може користити за конзервацију меса и рибе (Todorov et al., 2011). Делимично пречишћени бактериоцин BacFL31 синтетисан од стране *E. faecium* изолован и ћурећег млевеног меса може успешно продужити рок употребу млевеног меса до 10 дана (Chakchouk-Mtibaa et al., 2017). Међутим, и поред бројних предности и бенефита употребе

бактериоцина у прехранбеној индустрији, Varcenilla et al. (2022) указују на чињеницу да се утицај на нутритивна и сензорна својства месних производа мора узети у обзир.

Утицај ензима, температуре, рН и хемијских једињења на антимикуробну активност полупречишћених бактериоцина

На продукцију и антимикуробну активност полупречишћених бактериоцина могу утицати бројни фактори, као што су интеракција са другим микроорганизмима и њиховим метаболичким продуктима у окружењу у ком живе, рН вредност медијума у коме се налазе, као и температура на којој се производ чува, обзиром да су бактериоцини протеинске природе.

Испитивањем утицаја ензима на антимикуробну способност супернатанта доказана је протеинска природа антимикуробног једињења које су синтетисали сојеви *L. curvatus* Пб4, *L. curvatus* Посв6, *L. sakei* Пб11, *L. sakei* Па13, *L. mesenteroides* Пос4и и *E. faecium* Иос4. Третирање добијеног супернатанта проназом Е и протеиназом К потпуно је искључило антимикуробну способност наведених организама према *E. coli* АТСС 25922. Добијени резултати су у складу са резултатима аутора Vesković-Mogačanin et al. (2010), који доказују утицај протеолитичких ензима на активност изолованог бактериоцина (сакацина), при чему је одсуство антилистеријског ефекта потврђена протеинска природа бактериоцина. Након третирања супернатанта седам истраживаних сојева лактобацила протеиназом К, пепсином и папаином, њихов антибактеријски ефекат је скоро нестао што је потврдило протеинску природу супернатанта (Ren et al., 2018). Devi Avaiyarasi et al. (2016) су доказали да бактериоцин произведен од стране *L. sakei* GM3 изолован из козјег млека, губи антимикуробну способност након примене пепсина, трипсина, папаина и протеиназе, што указује на то да његова антимикуробна активност не потиче од протеинске компоненте.

Присуство ензима каталазе, липазе и α -амилазе није утицало на антимикуробну способност свих истраживаних сојева сјеничке очије стелје код којих су зоне инхибиције остале скоро идентичне зонама добијеним у позитивној контроли. Добијени резултати су у складу са резултатима који су добили Dejene et al. (2021), који истичу да је инхибициона супстанца потпуно инактивирана протеолитичким ензимима. Todorov et al. (2013) су указали на смањење антимикуробне активности након третмана протеолитичким ензимима бактериоцина који продукује *L. sakei* (изолати ST22Ch, ST153Ch и ST154Ch) изоловани из свињског меса, али не и када су били изложени деловању α -амилазе, што сугерише да нису гликолизовани. Према резултатима које су добили İşleroglu et al. (2012), ентероцин који је синтетисао *E. faecalis* КР показао је отпорност на ензиме трипсин, пепсин, липазу, каталазу и амилазу. Инхибиторна активност ентероцина је изгубљена након два часа третмана протеиназом К, трипсином и α -хемотрипсином док на њега нису утицали лизозим и каталаза. Оваква инактивација сугерише да је инхибиција била последица протеинског агенса (Belgacem et al., 2008).

Способност антимикуробног деловања полупречишћеног бактериоцина од стране тест организама је била мање или више стабилна на свим тестираним температурама укључујући и температуру стерилизације (121°C) у трајању од 15 минута. Полупречишћени бактериоцини добијени од стране изолата *L. curvatus* Пос4, *L. curvatus* Пос6, *L. sakei* Пб11, *L. sakei* Па13, *E. faecium* Иос4 и *L. mesenteroides* Пос4и су остали стабилни на температурама 50°C (30 минута) и 100°C (5 минута), при чему је величина зона инхибиције остала на нивоу величине зона контроле. Сличне резултате су

представили и други истраживачи указујући на изузетну термостабилност бактериоцина. Према Ren et al. (2018), бактериоцини које су производили *L. bulgaricus* BV18 и *Lactococcus lactis* BCM5 били су стабилни на високим температурама, а њихова антимикробна активност је задржана на 100°C након 60 минута. Већина ентероцина је отпорна на високе температуре и задржава своју биолошку активност након термичке обраде од 60-90°C током 30 минута (İşleroglu et al., 2012). Значајно смањење величине зона инхибиције код тестираних изолата у овој докторској дисертацији се бележи у температурном интервалу од 100°C (15 минута), 100°C (30 минута) и 121°C (15 минута), што је и очекивано и у складу са резултатима других аутора (Vesković-Mogačanin et al., 2010; Ren et al., 2018). Dejene et al. (2021) су указали да четири изолата који су припадали родовима *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Weisellia* и *Pediococcus*, изоловани из узорака ферментисане рибе, синтетишу умерено стабилна антимикробна једињења на високим температурама, при чему није забележено смањење активности након загревања на 60°C и 100°C, 10 минута. Третирање бактериоцина температурама изнад 100°C доводи до губитка антимикробне активности. Према Vesković-Mogačanin et al. (2010) топлотна стабилност бактериоцина индиректно открива њихову природу. Заправо, бактериоцини које продукује *L. sakei* углавном припадају I и IIa класи малих глобуларних протеина високе термостабилности, што објашњава задржавање антимикробне способности и на температурама изнад 100°C. Разлике у антимикробном потенцијалу након топлотне обраде између бактериоцина из различитих извора могу се приписати варијацијама у еколошкој адаптацији и условима животне средине у којој живе изолати БМК, при чему је својство отпорности на топлоту кључно и може проширити потенцијалну примену таквих једињења као биоконзерванса за прехранбене производе који су подвргнути пастеризацији, хлађењу, стерилизацији и другим третманима топлотне обраде (Ouissal et al., 2012).

Резултати дисертације показују да је инхибиторни ефекат супернатанта свих тестираних изолата БМК на раст *E. coli* ATCC 25922 остао стабилан при рН вредности у распону од 3 до 8, док се смањење активности бележи у интервалу рН од 9 до 10. Доказана је и изражена антимикробна активност при вредности рН 7, што сугерише да супернатант није органска киселина која има улогу да инхибира раст тестираних патогена, већ су то антимикробни пептиди који су остали потпуно активни. Добијени резултати у оквиру ове докторске дисертације су у складу са резултатима које су објавили Dejene et al. (2021), који су показали да су све анализирани антимикробне супстанце остале потпуно активне у рН опсегу од 2 до 8, при чему је значајно смањење активности забележено на рН 12. Бактериоцини ST22Ch, ST153Ch и ST154Ch које су продуковали изолати *L. sakei* изоловани из сувомеснатог производа *Salpicão*, поред високе термостабилности, одликовали су се и високом стабилности у широком опсегу рН који се кретао у интервалима од 2 до 10 (Todorov et al., 2013). *L. sakei* MBSa1 је произвео сакацин А, бактериоцин класе II, са активношћу против *L. monocytogenes*, при чему је доказана његова стабилност у односу на рН (од 2 до 6), што указује на могућност коришћења у ферментисаној храни са ниском рН (Barbosa et al., 2014). На антилистеријску активност ентероцина које су продуковали *E. faecalis* L3A21M3 и L3B1K3 изоловани из свежег сира, нису утицале рН вредности медијума у распону од 2 до 12. Ови резултати сугеришу да тестирани сојеви имају велики потенцијал да се користе као биоконзерванси у прехранбеној индустрији и као пробиотици, са потенцијалом да спрече гастроинтестиналну инфекцију (Ribeiro et al., 2017). Стабилност четири изолована

ентероцина није промењена у широком опсегу рН вредности од 3 до 9, а своју максималну активност постиже при рН 6 и 7 (Belgacem et al., 2008). Антибактеријска активност *L. mesenteroides* QZ1178 је значајно опала са повећањем рН вредности медијума (од 5,5– 6), што је потврдило утицај млечне и сирћетне киселине на природу инхибиције супернатанта (Zhang et al., 2021). Gutiérrez-Cortés et al. (2018) сугеришу да су, због модификације, јонизације или делимичне денатурације молекула полипептида, бактериоцини веома осетљиви на варијације рН медијума, и значајно су активнији при киселом рН него при неутралном или алкалном рН.

Полупречишћени бактериоцини су показали толеранцију на присуство тензиоактивних једињења и соли, попут: СДС, Tripton X-20, Tripton X-80, Tripton X-100, β-меркаптоетанол, Na-EDTA и NaCl. Хемијска једињења нису утицали на инхибиторну способност полупречишћених бактериоцина према *E. coli* ATCC 25922. Према Todorov et al. (2013), третман са 1% Tripton X-100, Tween 20, Tween 80, СДС, NaCl, уреом и EDTA није утицао на активност бактериоцина произведеног од стране *L. sakei*. İşleroglu et al. (2012) су указали да третман супернатанта без ћелија (ентероцина КР) органским растварачима и детерџентима попут Tween 20, Tween 80, Tripton X-100 и СДС, EDTA или урее, није изазвала губитак његове антибактеријске активности. *L. lactis* subsp. *lactis* 69, изолован из ферментисаног производа од меса, је синтетисао стабилан бактериоцин чија активност није била смањена под утицајем хемијских агенаса као што су СДС, EDTA, Tween 80 или уреа (Biscola et al., 2013). Тестирани адитиви су показали различите ефекте на активност бактериоцина произведеног од стране *L. sakei/curvatus* ACU-1, при чему је повећана концентрација NaCl негативно деловала на активност бактериоцина, док је у присуству EDTA дуплирана вредност титра бактериоцина против *S. aureus* (Castro et al., 2011).

Кинетика раста и биосинтеза антимикуробних једињења

У спроведеном истраживању, код свих тестираних изолата (*L. curvatus* Pos6, *L. sakei* Pa13, *L. mesenteroides* Pos4i и *E. faecium* Ios4) је запажена производња антимикуробних једињења у експоненцијалној фази раста (након 12 до 16 h раста у MRS бујону на температури до 37°C). Током продужене инкубације у стационарној фази (након 30 h) активност супернатанта је значајно опала, да би након инкубације од 48 h антимикуробна активност пречишћених супернатанта потпуно нестала код свих истраживаних изолата. Aasen et al. (2000) указују да се губитак активности бактериоцина може приписати протеолитичкој деградација ендогеним екстрацелуларним протеазама, агрегацијом са другим протеинима или адсорпцијом на ћелијама под сличним условима. Слични резултати су добијени за синтезу бактериоцина које су продуковали *L. mesenteroides* L124 и *L. curvatus* L442 који су синтетисани у раној фази експоненцијалног раста бактерија (Mataragas et al., 2003). Бактериоцидна активност је показала максималан ниво на крају фаза експоненцијалног раста и током почетка стационарне фазе раста (Mataragas et al., 2003). Производња бактериоцина од стране *E. faecium* КР је била повезана са раном фазом експоненцијалног раста. Ентероцин је произведен на максималним нивоима након 12 до 15 h раста у MRS бујону (İşleroglu et al., 2012). Резултати истраживања које су спровели Mareková et al. (2003) показују да је инхибиторна активност *E. faecium* EK13 последица два топлотно стабилна пептида, чија синтеза започиње након седам, односно 10 h раста у MRS медијуму. Abitayeva et al. (2021) указују

да је крива раста *L. sakei* 0559 је достигла максимум за око двадесет сати и трајала је до око 28 h раста ћелије, након чега се крива смањила. Антимикробна активност *L. sakei* 0559 је детектована у касној фази логаритамског раста након 12 h и достигла је максималну величину у стационарној фази раста након 24 h. Према резултатима ове студије, биосинтеза антимикробних једињења од стране *L. sakei* Па13 је започела нешто раније од осталих изолата и то након 6 h раста у MRS бујону на 37°C. De Vuyst & Leroy (2007) напомињу да је производња бактериоцина физиолошка особина зависна од раста и услова средине, што утиче на кинетику примарног метаболита.

Употреба сојева који синтетишу бактериоцине у производњи ферментисаног месног производа може значајно допринети безбедности производа, под условом да се еко-физиолошки фактори и друге методе конзервирања одржавају на нивоима потребним за инхибицију патогена у контролисаним условима. Бактериоциногени сојеви БМК, као и њихови бактериоцини, могу бити корисни као конзерванси у сушеним и ферментисаним месним производима и могу се користити као технолошке алтернативе хемијским конзервансима, задовољавајући повећану потражњу за храном са мало или чак без хемијских додатака (Keşka et al., 2017).

Пробиотски потенцијал изолата бактерија млечне киселине

Данас је доказано да пробиотски сојеви позитивно утичу на организам конзумента, при чему је дефиниција соја као потенцијалног пробиотика је сложена и исти мора испуњавати велики број услова да би могао имати хуману употребу.

Способност преживљавања на ниским рН вредностима средине

Један од врло важаних критеријума за одабир пробиотских сојева је способност толеранције на ниску рН вредност медијума. Бактеријска толеранција на ниску рН је важан фактор који обезбеђује мањи транзитни стрес кроз ГИТ, пошто је у ГИТ-у човека опсег киселости у рангу од 1.5 до 3.0 (Shin et al., 2008; 2012). Ацидотолерантни бактеријски изолати се могу успешно користити и као додатци у храни која има виши степен киселости. Резултати истраживања толеранције БМК изолата на ниску рН вредност средине (рН 2 и 3) су указали на висок ниво ацидотолеранције исказану кроз оптичку густину ћелија, која је била висока у односу на стандардни пробиотски сој *L. acidophilus* ATCC 4356. Garcia et al. (2016) су указали да је одрживост виталних ћелија *Lactobacillus* spp. на рН вредности између 2 и 4 важан показатељ потенцијалног пробиотског соја. Способност преживљавања услова средине при вредности рН 2 су најбоље исказали изолати идентификовани као *L. curvatus* и *L. sakei* (78%), док се густина ћелија изолата из родова *Leuconostoc* и *Enterococcus* у значајној мери смањила у односу на комерцијални пробиотски *L. acidophilus* ATCC 4356 сој. У свом истраживању, Mandal et al. (2006) указују на смањење броја виталних ћелија бактерија када су исте изложене симулираним условима желуца где је рН 1,5 после периода инкубације од три сата.

У условима средине рН 3, тестирани изолати показују боље резултате густине ћелија у односу на средину са рН 2. Високи степен преживљавања у првом сату истраживања од преко 95% показали су изолати *L. curvatus* и *L. sakei*, док је у другом и трећем сату истраживања способност преживљавања остала скоро непромењена. Brink et al. (2006) у свом раду истичу добру ацидотолеранцију испитиваних сојева лактобацила на

pH 3, где је забележен раст од 100%. Добру способност преживљавања 9 изолата *L. curvatus* у срединама у којима се киселост креће у распону од 3 до 5 истичу у свом раду Žugić-Petrović et al. (2021). Према Liong & Shah (2005) способност преживљавања киселе средине pH 3, је постављен као стандард за избор пробиотских култура. Процент густине ћелија након три сата инкубације код изолата *L. mesenteroides* и *E. faecium* се кретао преко 70%, што указује на високи степен ацидотолеранције. Hosseini et al. (2009) истичу да испитивани сојеви *E. faecium* могу да преживе окружење са pH 4, као и да долази до благог смањења броја ћелија на pH 3, при чему се степен преживљавања испитиваних ентерокока повећава са повећањем pH средине.

Способност преживљавања БМК изолата у присуству жучних соли

Отпорност на средину са повећаном концентрацијом жучних соли је важна карактеристика коју треба узети у обзир при избору пробиотских сојева као додатака храни. Прецизан степен толеранције на средину са повећаном концентрацијом жучних соли није познат, али се препоручује да се изабере управо они сојеви који се одликују високим степеном толеранције. Жуч која се лучи у танком цреву смањује преживљавање бактерија дезоорганизујући ћелијску мембрану променом састава липида и масних киселина. Испитивање ове способности изолата из сјеничке овије стелје је спроведено праћењем раста БМК у медијуму са 0,5% и 1% жучних соли. У оквиру дисертације, сви сојеви су показали високу толеранцију услова средине са концентрацијом жучних соли од 0,5%. Високу одрживост броја виталних ћелија преко 65%, показали су изолати *L. curvatus* и *L. sakei* у односу на комерцијални пробиотски *L. acidophilus* ATCC 4356 сој, док су изолати *E. faecium* и *L. mesenteroides* након првог и другог сата истраживања такође показали високу одрживост броја виталних ћелија већу од 70%.

Kurdi et al. (2006) указују да у средини са 0,3% жучних соли може доћи до озбиљних оштећења на ћелијској мембрани, што доводи до цурења ћелијског садржаја и смрти ћелија. Повећање концентрације жучних соли од 1%, утиче на већи пад бројности виталних ћелија у односу на средину са 0,5% жучних соли, што је у складу са студијом коју су спровели Angmo et al. (2016), која указује на добре резултате отпорности изолата на концентрацију жучи од 0,5%, и значајно смањење исте са повећањем концентрације жучи од 1%.

Способност преживљавања одабраних изолата у симулираним условима желуца и танког црева

Још један од неопходних услова који треба да испуни потенцијални пробиотски сој је способност да се прилагоде окружењу домаћина, односно да преживе транзит кроз ГИТ. Испитивани БМК изолати пореклом из сјеничке очије стелје показали су добру стопу преживљавања у симулираним условима желудачног и жучног сока. У симулираним условима желудачног сока, густина ћелија после првог сата инкубације се смањује код свих испитиваних *L. curvatus* и *L. sakei* изолата, осим у случају изолата *L. curvatus* Pos19 где је густина ћелија остала на истом нивоу. Žugić-Petrović et al. (2021) истичу да је број ћелија за три анализирана соја (sk1-10, sk2-17 и sk4-15) изолата *L. curvatus* пореклом из сокобањске кобасице, у првом сату инкубације у условима желуца одржан на почетном нивоу. Након другог сата инкубације, број ћелија изолата *L. curvatus* (сојеви Ios6i, I7a, Pos4, Posv6, Pa8, Pos18 и Pos25) и *L. sakei* (сојеви Ia9, Ios12, Ia22a, Pb3, Pb11, Pa14 и

Шос16), био је благо повећан, што указује на високи степен преживљавања лактобацила (40%). Добијени резултати су у складу са резултатима који су добили Vacha et al. (2009). Изолати ентерокока и леуконостока показали су смањење густине ћелија у првим сатима инкубације у односу на њихов почетни број у симулираним условима желудачног сока. У другом сату инкубације густина ћелија изолата *E. faecium* и *L. mesenteroides* је остала приближно иста као и током првог сата са изузетком *E. faecium* Шос24 и *L. mesenteroides* Шос4, чији се број ћелија лагано повећавао. Hosseini et al. (2009) истичу да се стопа преживљавања *E. faecium* повећава са повећањем рН окружења.

Klaugaung et al. (2008) указују на чињеницу да не постоји консензус о концентрацији жучних соли на коју би бактеријски сој требало да буде толерантан да би се прогласио пробиотиком. Концентрација жучних соли у танком цреву се креће у границама од 0,1-0,5% (Mathara et al., 2008). Способност сојева да преживе концентрацију од 0,4% жучних соли је у складу са доступним литературним подацима о дигестивном систему људи (Ledina et al., 2013).

Степен преживљавања одабраних БМК изолата је праћен након 4 h и 6 h инкубације у симулираним условима жучног сока, при чему су изолати *L. curvatus* Шос1 и *L. curvatus* 17а показали пораст густине ћелија у условима дуоденума, док су изолати *L. curvatus* Шос4, *L. sakei* Iос12; *L. sakei* Пб1и *L. sakei* Шос13 најинтензивније повећали густину ћелија у условима дуодеума. Žugić-Petrović et al. (2021) указују да три потенцијална пробиотска изолата *L. curvatus* (sk4-3a, sk5-2 и sk6-5) бележе пораст броја виталних ћелија након 4 h у условима дуоденума, да би након 6 h инкубације, број био одржан на истом нивоу или смањен. Magakoudakis et al. (2009) закључују да су сви сојеви који су показали толеранцију на услове дуоденума након 4 h, толеришу и присуство панкреатина. Густина ћелија ентерокока у симулираним условима жучног сока је повећана код изолата *E. faecium* Iос5а, док се у случају *E. faecium* Шос24 запажа значајно смањење густине ћелија у односу на густину у тесту услова у желуцу. Код изолата *L. mesenteroides* Шос4i се запажа повећање густине ћелија након 6 h инкубације у условима дуодеума. Према Ruiz-Moyano et al. (2009), *E. faecium* изолат SE906 из иберских ферментираних кобасица показао је добру способност преживљавања у симулираним условима ГИТ-а, што га карактерише као добар потенцијални пробиотик. Треба напоменути да компоненте хране могу повећати заштиту самих пробиотских култура током тразита кроз ГИТ и тиме повећати њихову активност и живот (Žugić Petrović et al., 2021). Лактобацили у месу и масном матриксу *in vivo* имају већи степен преживљавања током проласка кроз желудац и црева (Erkkilä & Petäjä. 2000).

Толеранција на присуство фенола

Према Šušković et al. (2001), феноли се могу формирати у цревима као продукт бактеријског распадања неких ароматичних аминокиселина добијених из хране или ендогеном продукцијом. Феноли имају бактериостатско својство, тако да бактерије отпорне на феноле имају веће шансе да преживе услове ГИТ-а од оних бактерија које су подложније инхибицији у присуству фенола. Како је физиолошки ниво фенола у људском организму низак, важно је анализирати осетљивост потенцијалних пробиотика на ову супстанцу прецизно у концентрацијама у којима се могу очекивати феноли у људском телу, у распону од 0,1%, 0,2% и 0,3 %. Резултати истраживања раста изолата на медијимима за са различитом количином фенола, показали су добар раст испитиваних изолата у супстратима са фенолном концентрацијом од 0,1%, 0,2% и 0,3%, осим изолата *L.*

curvatus Pos11 и *L. curvatus* Шos1 који нису расли ни на једној тестираној концентрацији фенола. Резултати које су добили Aswathy et al. (2008) указују да су многи истраживани сојеви ентерокока, лактобацила и леуконостока успешно толерисали низак ниво фенола од 0,2-0,3%, што их је квалификовало као могуће пробиотице. Vizoso Pinto et al. (2006) представљају резултате резистенције *L. plantarum* изолата на фенол, истичући да су изолати углавном умерено толерантни на концентрацију фенола од око 0,4%.

Бактеријска адхезија за угљоводонике (хидрофобност)

Способност адхезије бактерија је битна за стимулацију имуног система. Адхезија је уско везана за смањење дужине трајања дијареје, и сваки потенцијални пробиотски сој треба да поседује способност адхезије. Ова особина пробиотских сојева је променљива и може варирати чак у оквиру сојева исте врсте (Tuomola et al., 2001).

Према резултатима ове докторске дисертације, 42 изолата је показало значајну разлику у хидрофобности у распону од 5,2% до 80,9%. Хидрофобност ћелијске површине утиче на адхезију и пролиферацију микроорганизама на ћелијама цревног епитела, што може помоћи у лепљењу, али није основни параметар који указује на способност колонизације црева бактерије (Ramiah et al., 2008; Sourabh et al., 2010). Бактеријске ћелије са јаким хидрофобним својства типично формирају снажне интеракције са ћелијама слузокоже (Žugić Petrović et al., 2019). Степен хидрофобности зависи од састава и структуре ћелијских зидова бактерија и присуства хидрофобних протеина (Pan et al., 2006). Способност хидрофобности може се значајно разликовати код различитих врста микроорганизама, па чак и унутар сојева исте врсте (Tuomola et al., 2001).

Процент бактеријске адхезије у присуству хлороформа добијен у истраживању је био много нижи у односу на добијене вредности у присуству ксилена и н-хексадекана. Резултати су показали да је код 71,42% тестираних сојева бактеријска адхезија према ксилену и н-хексадекану је била већа од 40%. Хидрофобност бактеријских ћелија у присуству хлороформа била је најизраженија код изолата *L. sakei* Pos15 (28,55%), док је најнижи хидрофобни капацитет од 5,2% показао изолат *L. mesenteroides* Шos4. Највећи афинитет према н-хексадекану показао је *L. curvatus* Шos1 чија хидрофобност прелазила 81%. Сојеви чија хидрофобност прелази 40% сматрају се хидрофобним (Abdulla et al., 2014). Према Žugić-Petrović et al. (2019), проценат хидрофобности за девет испитиваних изолата *L. curvatus* из традиционално направљених ферментисаних кобасица кретао се у опсегу од 39% до 81%. Резултати које су добили Sourabh et al. (2010) указују на високу хидрофобност истраживаних сојева према н-хексадекану у распону од 52,66% до 79,69%. Žugić-Petrović et al. (2019) указују да бактеријска адхезија према н-хексадекану и хлороформу изолата *L. curvatus* sk217 има вредности од 66% и 43%. У спроведеном истраживању највишу хидрофобност у присуству ксилена показује *L. sakei* Па14 (69,9%), док је најнижу хидрофобност показао *L. sakei* Шos16 (21,21%). Abdulla et al. (2014) у свом раду представљају резултате хидрофобности тестираних *Lactobacillus* spp. изолата која се кретала између 29,5% и 77,4%.

Способност аутоагрегације и коагрегације

Способност аутоагрегације је веома важна карактеристика пробиотских сојева и она је дефинисана као груписање ћелија исте врсте за цревни епител у ГИТ-у, док коагрегација представља груписање ћелија различитих врста на цревни епител. Пробиотски сојеви пријањају за ћелије цревног епитела и коагрегацијом са патогенима спречавају њихову репродукцију (Aslim et al., 2007). Kos et al. (2008) указују на значај коагрегације БМК сојева са ентеропатогеним *E. coli*, указујући на значај стварања коагрегата као механизма за одбрану ГИТ-а и урогениталног тракта од инфекција код људи. Tuо et al. (2013) истичу да својство аутоагрегације и коагрегације БМК сојева може бити специфично за врсте или сојева. На основу приказаних резултата у овој докторској дисертацији, можемо закључити да су сви тестирани изолати показали добру способност аутоагрегације (6,9-78,5%) и коагрегације (17,2% до 65,6%). Најбољу способност аутоагрегације је показао изолати *E. faecium* Ios5a, док је најнижи ниво коагрегације показао изолат *E. faecium* Pos24. Изолати *L. sakei* Ia9, *L. curvatus* Pos3 и *L. mesenteroides* Pos4 показали су највиши степен коагрегације. Процент коагрегације тестираних лактобацила леуконостока и *E. coli* ATCC 25922, кретале су се у распону од 24,5 до 68,1% (Žugić-Petrović et al., 2022). Према резултатима које су добили Moјgani et al. (2015), способност коагрегације је директно повезана са фенотипом аутоагрегације, јер је већи проценат коагрегације уочен управо код сојева који су показали већу способност аутоагрегације.

Синтеза биогених амина

Биогени амини могу настати као производ ензимске активности микроорганизама у процесу ферментације меса и месних производа (Žugić-Petrović et al., 2021). У ферментисаним месним производима синтеза биогених амина од стране појединих микроорганизама је већа због високог садржаја протеина и високе протеолитичке активности током дуготрајног зрења ових производа (Freitas de Macedo et al., 2012). Биогени амини се сматрају непожељним метаболичким производима микроорганизама. Сојеви који поседују способност њихове синтезе не могу се користити као стартер културе, а још мање као пробиотици (Ammor & Maio, 2007). Највећи број истраживања способности синтезе биогених амина потенцијалних стартер и пробиотских култура урађен је са аминокиселинама тирозином и хистидином (Belicová et al., 2013; Tuörpönen et al., 2003; Vacha et al., 2009).

Резултати испитивања синтезе биогених амина изолата овчије стеље показују да не постоји синтеза биогених амина из хистидина и тирозина код одабраних БМК изолата, што није у сагласности са резултатима које су представили Landeta et al. (2013) који указују на то да је већина *E. faecium* и *L. sakei* сојева показала производњу тирамина. Слични резултати производње тирамина код ентерокока су представили Muñoz-Atienza et al. (2011). Већина *L. curvatus* изолата из сокобањске кобасице не испољава способност синтезе биогених амина у медијумима са тирозином и хистидином, осим *L. curvatus* sk1-10 који је имао позитивну реакцију на хистидин (Žugić-Petrović et al., 2021). Tomé et al. (2008), у свом раду истичу да је *L. curvatus* ET30 продуковао декарбоксилазу и довео до формирања тирамина.

Безбедоносни аспект изолата бактерија млечне киселине

Безбедоносни аспект одабраних изолата БМК, изолованих из аутохтоног произода сјеничка овчија стеља, је први пут истраживан у оквиру ове докторске дисертације. Потрага за новим сојевима данас је одређена све већом потребом за пробиотском функционалном храном и порастом здравствене свести потрошача.

Резултати су показали да аутохтони изолати нису показали способност хемоллизе на крвном агару, што искључује потенцијалну патогеност и потврђује могућност њихове безбедне употребе у месној индустрији. Овакве резултате у својим радовима износе Pavli et al. (2016) и Žugić-Petrović et al. (2021), који такође нису детектовали хемолитичку способност изолата БМК из хране. Miranda et al. (2014) указује да изолати лактобацила изоловани из меса најчешће не показују хемолитичку реакцију, што је у складу са резултатима добијеним у истраживању у оквиру ове докторске дисертације.

Отпорност микроорганизама на антибиотике данас представља све већи проблем. Резистенција на антибиотике се може дефинисати као природна и стечена (генотипска или фенотипска) а њени механизми су различити (Courvalin, 2007). Циљано истраживање отпорности на клинички примењиване антибиотике приликом испитивања потенцијалних стартера и пробиотичких култура, је јако важно јер истраживани сојеви у коначном производу могу достићи високе стопе раста (Babić et al., 2011). Употреба небезбедних БМК сојева отпорних на антибиотике у исхрани људи и животиња представља озбиљну претњу по здравље јер би овакви организми могли да пренесу своје резистентне гене на друге присутне организме, што даје микроорганизмима способност да колонизују и изазивају болести (Lucumi-Banguero et al., 2021; Hummel et al., 2007).

Испитивани БМК изолати овчије стеље показали су значајну осетљивост на истраживане комерцијалне антибиотике, при чему апсолутну резистенцију није показао ни један изолат. Осетљивост на све испитиване антибиотике примећена је код 69,04% изолата, а разлог за тако високу осетљивост на антибиотике је у чињеници да је сјеничко-пештерска праменка, чије се месо користи за производњу стеље, на испашама на надморској висини од око 1150 m и ретко се лечи антибиотском терапијом. Babić et al. (2011) су истакли су да сви лактобацили и већина стафилокока изолованих из славонског кулена, показали осетљивост на све тестиране антибиотике. Антибиотик на који је већина изолата показала резистентност је еритромицин (19,04%), што је у складу са резултатима које су представили Dias et al. (2015), који су у свом раду указали на висок проценат резистенције на еритромицин од 94% код истраживаних БМК сојева. Изолати *L. curvatus* Ios18 и *L. sakei* Pb21 су показали резистенцију на офлоксацин и еритромицин. Тестирани изолати нису показали позитиван тест резистенције на тетрациклин и триметоприм што је јако важно, јер је резистенција на тетрациклин често присутна код клиничких изолата. AlKalbani et al. (2019) истичу ниску осетљивост *Enterococcus* spp. (изолати из рибље кобасице) на клиндамицин, еритромицин и триметоприм. Према Žugić-Petrović et al. (2021), 11,1% изолата БМК из спонтано ферментисане кобасице показало је отпорност на тетрациклин и еритромицин. Изолат *L. sakei* (SB3) је показао отпорност на тетрациклин, а преосталих осам сојева је било осетљиво на све тестиране антибиотике (Lucumi-Banguero et al. 2021). Сојеви *L. sakei* Ia22a, и *L. sakei* Pa2a показали су резистенцију на офлоксацин и азитромицин, али су били осетљиви на остале антибиотике. Потенцијални пробиотици из сокобањске кобасце *L. curvatus* sk1-8 и *L. curvatus* sk4-3a показали су резистенцију на офлоксацин (Žugić-Petrović et al., 2021).

8. ЗАКЉУЧАК

На основу резултата представљених у овој докторској дисертацији, могу се извести следећи закључци:

- Хемијском анализом сјеничке овчије стеље утврђено је да узорци испуњавају захтеве који дефинишу прописи о квалитету производа од меса, као и елабората о заштити географског порекла сјеничке очије стеље у погледу садржаја воде, масти, протеина меса, соли и пепела.
 - ❖ Промене рН вредности током технолошког процеса су одговарале врсти производа, на крају зрења рН вредности се се кретале у интералима од 5,15 до 5,6, што указује на одговарајућу зрелост производа и у складу су са прописима о квалитету производа од меса, као и елаборатом о заштити географског порекла сјеничке овчије стеље.
 - ❖ Током зрења сјеничке овчије стеље дошло је до промене a_w вредност у производу које су указивале на микробиолошку стабилност традиционалног производа.
- Сензорном анализом нису забележена оштећења, мрље и дисколорације производа, при чему је истакнута специфичност производа по свим истраживаним сензорним параметима.
- Квалитативни и квантитативни састав микробиоте аутохтоног производа сјеничка овчија стеља је представљен кроз испитивање укупног броја аеробних мезофилних бактерија, бројности врста из фамилија Enterobacteriaceae и Pseudomonadaceae, бројности бактерија млечне киселине, врста из рода *Enterococcus* и *Staphylococcus*, присуство врста из рода *Salmonella* и *Listeria monocytogenes* као и бројности плесни. Извршена је изолација бактерија млечне киселине и плесни, као и врста из рода *Staphylococcus*.
 - ❖ Бројност аеробних мезофилних бактерија се кретао од 5,62 log CFU/g нултог дана истраживања до 8,42 log CFU/g, 120-тог дана. БМК су пронађене на нивоу од 2,73- 8,36 log CFU/g, КНС на нивоу од 3,05–3,65 log CFU/g, такође су откривени у узорцима производа и плесни на нивоу мањем од 1 log CFU/g на почетку производног процеса, да би 120-тог дана истраживања њихов број достигао максималну вредност од 5,36 log CFU/g.
 - ❖ Присуство врста из рода *Salmonella* и *Listeria monocytogenes* током истраживања није забележено у узорцима стеље ни у једном узорку из све три сезоне.
 - ❖ У све три истраживачке сезоне из сва три домаћинства, укупно је изоловано 432 Грам-позитивна и каталаза-негативна БМК изолата, а идентификацијом је детерминисано укупно 6 врста које су припадале родовима *Leuconostoc* (3,83%), *Enterococcus* (8,35%), *Lactiplantibacillus* (2,03%) и роду *Lactobacillus* (87,58%).
 - ❖ Врста *L. mesenteroides* (17 изолата) је изолована у првој и трећој истраживачкој години код свих произвођача.
 - ❖ У оквиру рода *Enterococcus*, идентификоване су две врсте: *E. faecium* (30 изолата) у свим истраживачким периодима и код свих произвођача и *E. faecalis* (7 изолата) у првом и трећем периоду истраживања у узорцима из села Крајиновиће (Б) и Расно (В).
 - ❖ У оквиру рода *Lactobacillus*, идентификоване су две врсте: *L. curvatus* (213 изолата) и *L. sakei* (175 изолата)

- ❖ У оквиру рода *Lactiplantibacillus*, идентификована је врста *L. plantarum* (9 изолата).
- ❖ Идентификовано је пет врста КНС у узорцима сјеничке овчије стеље.
 - ❖ Врсте *S. epidermidis* (11 изолата) је изолована у првој и трећој производној години код свих произвођача.
 - ❖ Врста *S. saprophyticus* (46 изолата) је изолована у првој производној години код свих произвођача, друге производне године, *S. saprophyticus* је изолована код произвођа из села Крајиновиће и Расно; у трећој години истраживања ова врста је детектована код узорака из домаћинства села Блато и Расно.
 - ❖ *S. carnosus* (64 изолата) и *S. xylosus* (103 изолата) су изоловане код свих произвођача у свим производним сезонама.
- ❖ Значајан део микробиоте сјеничке очије стеље су чиниле плесни. Укупно је изолован 221 изолат плесни; највећи број изолата добијен је у другој и трећој производној години код произвођача из села Блато и Крајиновиће.
 - ❖ Карактеризацијом и идентификацијом изолованих плесни, детерминисано је укупно 4 рода: *Aspergillus* (2,71%), *Eurotium* (10,86%), *Penicillium* (83,71%) и *Mucor* (2,71%).
 - ❖ Раст плесни изолованих из овчије стеље је био под директним утицајем активности воде у супстрату.
- Технолошком карактеризацијом изолата бактерија утврђено је да:
 - ❖ Изолати из рода *Lactobacillus* су показали способност раста на температури до 45°C као и на свим тестираном концентрацијама соли и различитим рН вредностима, али нису показали протеолитичку и липолитичку активност.
 - ❖ Изолати *L. plantarum* и *L. mesenteroides* су успешно расли на температури од 15°C, и концентрацијама соли до 6,5% као и при рН вредностима изнад 5.
 - ❖ Изолати *L. mesenteroides* су показали протеолитичку активност.
 - ❖ Изолати који су припадали врстама *E. faecium* и *E. faecalis* су расли на температури од 15°C и на свим концентрацијама соли, са позитивним протеолитичким и липолитичким тестом.
 - ❖ *E. faecium* изолати су расли на свим тестираним рН вредностима, док су изолати *E. faecalis* расли на рН вредностима већим од 6.
 - ❖ На основу добрих технолошких карактеристика велики број *L. curvatus* и *L. sakei* изолата су показали потенцијал за примену као стартер културе у месној индустрији.
- Антимикробну активност према свим тестираним индикаторским врстама показало је 47,61% тестираних изолата.
 - ❖ Изолати КНС нису показали антимикробну активност према одабраним индикаторским врстама.
 - ❖ Највећу зону инхибиције изолати БМК су показали према *E. coli* ATCC 25922 (средње вредности зоне инхибиције од 10 до 25 mm).
 - ❖ Највећу антилистеријску активност је показао *E. faecium* Ios4 (зона инхибиције 25 mm).
 - ❖ Антимикробна активност одабраних изолата (*L. curvatus* П056, *L. sakei* П113, *L. mesenteroides* П054i и *E. faecium* Ios4) се потпуно изгубила под деловањем протеолитичких ензима.

- ❖ Антимикробна активност полупречишћених бактериоцина је била стабилана на свим тестираним температурама укључујући и температуру аутоклавирања (121°C/15 минута).
- ❖ Антимикробна активност полупречишћених бактериоцина је била стабилна на рН 7, док хемијска једињења нису утицала на антимикробну способност.
- ❖ Производња антимикробних једињења је запажена у експоненцијалној фази раста. Током продужене инкубације у стационарној фази (након 30 h) активност супернатанта је значајно опала, да би након инкубације од 48 h антимикробна активност пречишћених бактериоцина нестала.
- Тестирани изолати БМК су показали добар пробиотски потенцијал.
 - ❖ Изолати *L. curvatus* и *L. sakei* су показали висок ниво толеранције на ниску рН (2 и 3), као и способност раста у присуству жучних соли. Изолати *L. plantarum* и *E. faecalis* су показали слабу толеранцију на ниску рН (2 и 3) и присуство жучних соли.
 - ❖ Одабрани изолати показали су добру способност преживљавања у симулираним условима желуца, при чему су изолати *L. curvatus* (Pos7a, Pa18, Pa19, Pos1), *L. sakei* (Ia8, Ib1, Pa22, Pos13), *E. faecium* (Ios4 и Ios5a) показали најбоље резултате.
 - ❖ Изолати *L. curvatus* (I7a, Pos4, Posv6, Pos7a, Pos1), *L. sakei* (Ia8, Ios12, Ib1, Pa22, Pos13), *E. faecium* (Ios4 и Ios5a) су показали најбоље резултате преживљавања услова танког црева.
 - ❖ Изолати БМК (осим изолат *L. curvatus* Pos11 и *L. curvatus* Pos1) су показали способност раста у присуству 0,1%, 0,2% и 0,3% фенола.
 - ❖ Изолати су показали хидрофобност према хлороформу, н-хексадекану и ксилолу у распону од 5,2% до 80,9%.
 - ❖ Способност аутоагрегације изнад 50% су показали изолати *L. curvatus* Pos1, *L. sakei* Ia8 и *L. mesenteroides* Pos4. Најјачу способност аутоагрегације је показао изолат *E. faecium* Ios5a.
 - ❖ Изолати *L. sakei* Ia9, *L. curvatus* Pos3 и *L. mesenteroides* Pos4 показали су највиши степен коагрегације са *E. coli* ATCC 25922.
 - ❖ Тестирани изолати нису показали способност синтезе биогених амина.
 - ❖ Тестирани изолати нису показали хемолизу на крвном агару.
 - ❖ Апсолутну резистенцију на антибиотике није показао ни један испитивани изолат. Осетљивост на све истраживане антибиотике забележена код 69,04% тестираних изолатата.
 - ❖ Резистенцију на еритромицин је показало 19,04% изолатата; на офлоксацин 11,9%; на азитромицин 4,76% и на клиндамицин 4,76% истраживаних изолатата, док резистенција на тетрациклин и триметоприм није забележена.
 - ❖ Изолати са посебним потенцијалом за употребу као пробиотици: *L. curvatus* Posv6, *L. curvatus* Pos1, *L. sakei* Ios12, *L. sakei* Ib1 и *L. sakei* Pos13.
- Резултати добијени у оквиру ове дисертације могу бити значајни за дефинисање нових сојева као потенцијалних стартера за месну индустрију.

Литература

1. „Službeni glasnik Republike Srbije“ (73/2010): Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa. Vodič za primenu mikrobioloških kriterijuma za hranu, 2011
2. Aasen, I.M., Moretro, T., Katla, T. Axelsson, L., Storro, I. (2000). Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53, 159–166. <https://doi.org/10.1007/s002530050003>
3. Abdulla, A.A., Abed, T.A., Saeed, A.M. (2014). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of six *Lactobacillus* strains. *British Journal of Biomedical Sciences*, 4 (4), 381–39. <https://doi.org/10.9734/BMRJ/2014/6462>
4. Abitayeva, G., Urazova, S.M., Abilkhadirov, S.A., Sarmurzina, S.Z., Shaikhin, M.S. (2021). Characterization of a new bacteriocin-like inhibitory peptide produced by *Lactobacillus sakei* B-RKM 0559. *Biotechnology Letters* 43, 2243–2257 <https://doi.org/10.1007/s10529-021-03193-z>
5. Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Omar, B. N., Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*, 35, 201–232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
6. Abubakr, M.A.S., Al-adiwish, W.M. (2017). Isolation and identification of lactic acid bacteria from different fruits with proteolytic activity. *International Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2(2), 58-64. <https://doi.org/10.11648/j.ijmb.20170202.12>
7. Akabanda F, Owusu-Kwarteng J, Tano-Debrah K, Parkouda C, Jespersen L. (2014). The use of lactic acid bacteria starter culture in the production of nunu, a spontaneously fermented milk product in Ghana. *International Journal of Food Science*. 721067. <https://doi.org/10.1155/2014/721067>.
8. Akköse, A., Güzin, K., Karaoğlu, M., Kaya, M. (2019). Characteristics of Pastırma types produced from water buffalo meat. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24 (2), 179-185. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2017.18551>
9. Aktaş, A.H., Dursun, Ş., Dögan, Ş., Kiyma, Z., Demirci, U., Halıcı, I. (2015). Effects of ewe live weight and age on reproductive performance, lamb growth, and survival in central anatolian merino sheep. *Archives Animal Breeding*, 58, 451–459. <https://doi.org/10.5194/aab-58-451-2015>
10. Albano, H., Van Reenen, C., Todorov, S., Cruz, D, Fraga, L., Hogg, T., Dicks, L., Teixeira, P. (2009). Phenotypic and genetic heterogeneity of lactic acid bacteria isolated from “Alheira”, a traditional fermented sausage produced in Portugal. *Meat Science*, 82. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.02.009>
11. Alfaia, C.M., Gouveia, I.M., Fernandes, M.H., Fernandes, M.J., Semedo-Lemsaddek, T., Barreto, A.S., Fraqueza, M.J. (2018). Assessment of coagulase-negative staphylococci and lactic acid bacteria isolated from Portuguese dry fermented sausages as potential starters based on their biogenic amine profile. *Journal of Food Science*, 83(10), 2544-2549. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14298>
12. AlKalbani, N.S., Turner, M. S., Ayyash, M.M. (2019). Isolation, identification, and potential probiotic characterization of isolated lactic acid bacteria and *in vitro* investigation of the cytotoxicity, antioxidant, and antidiabetic activities in fermented

- sausage. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 188. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1239-1>
13. Alvarez-Cisneros, Y.M., Sáinz Espuñes, T.R., Wachter, C., Fernandez, F.J., Ponce-Alquicira, E. (2011). Enterocins: bacteriocins with applications in the food industry. In: *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*. Méndez-Vilas, A. (ed.), Formatex Research Center, Badajoz, Spain, 1330-1341.
 14. Ammor, M.S., Mayo, B. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science*, 76, 138-146. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.10.022>
 15. Amso, Z., Bisset, S.W., Yang, S.H., Harris, P.W.R., Wright, T.H., Navo, C.D., Patchett, M.L., Norris, G.E., Brimble, M.A. (2018). Total chemical synthesis of glycocin F and analogues: S-glycosylation confers improved antimicrobial activity. *Chemical Science*, 9(6), 1686-1691. <https://doi.org/10.1039/c7sc04383j>
 16. Anandharaj, M., Sivasankari, B., dan Rani, R.P. (2014). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on hypercholesterolemia: A review. *Chinese Journal of Biology*, 7 572754. <https://doi.org/10.1155/2014/572754>
 17. Andersson, H., Asp, N-G., Bruce, A., Roos, S., Wadstrom, T., Wold, A.E. (2001). Health effects of probiotics and prebiotics: A literature review on human studies. *Scandinavian Journal of Food & Nutrition*, 45, 58-75.
 18. Angmo, K., Kumari, A., Savitri and Bhalla T.C. (2016). Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT - Food Science and Technology*, 66,428-435. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.057>
 19. Aquilanti, L., Garofalo, C., Osimani, A. Clementi, F. (2016). Ecology of lactic acid bacteria and coagulase negative cocci in fermented dry sausages manufactured in Italy and other Mediterranean countries: an overview. *International Food Research Journal*, 23(2), 429-445.
 20. Aragón, F., Perdigón, G., de Moreno de LeBlanc, A. (2014). Modification in the diet can induce beneficial effects against breast cancer. *World Journal of Clinical Oncology*, 5(3), 455-464. <https://doi.org/10.5306/wjco.v5.i3.455>
 21. Asefa, D.T., Gjerde, R.O., Sidhu, M.S., Langsrud, S., Kure, C.F., Nesbakken, T., Skaar, I. (2009). Moulds contaminants on Norwegian dry-cured meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 128 (3), 435-439. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.024>
 22. Asefa, D.T., Kure, C.F., Gjerde, R.O., Omer, M.K., Langsrud, S., Nesbakken, T. Skaar, I. (2010). Fungal growth pattern, sources and factors of mould contamination in a dry-cured meat production facility. *International Journal of Food Microbiology*, 140 (2-3), 131-135. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.008>
 23. Aslim, B., Onal, D., Beyatli, Y. (2007). Factors influencing auto-aggregation and aggregation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* isolated from handmade yogurt. *Journal of Food Protection*, 70, 223-227. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.1.223>
 24. Aswathy, R.G., Ismail, B., John, R.P., Nampoothiri, K.M. (2008). Evaluation of the probiotic characteristics of newly isolated lactic acid bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151(2-3), 244-255. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8183-6>

25. Aymerich, T., Martìn, B., Garriga, M., Vidal-Carou, M. C., Bover-Cid, S., Hugas, M. (2006). Safety properties and molecular strain typing of lactic acid bacteria from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 100 (1), 40-49. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02772.x>
26. Azizpour, K., Bahrambeygi, S., Mahmoodpour, S., Azizpour, A. (2009). History and basic of probiotics. *Research Journal of Biological Sciences*, 4, 409–426
27. Babić, I., Markov, K., Kovačević, D., Trontel, A., Slavica, A., Đugum, J., Čvek, D., Svetec, I.K., Posavec, S., Frece, J. (2011). Identification and characterization of potential autochthonous starter cultures from a Croatian “brand” product “Slavonski kulen”. *Meat Science*, 88, 517–524. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.02.003>
28. Baccouri, O., Boukerb, A. M., Farhat, L. B., Zébré, A., Zimmermann, K., Domann, E., Cambronel, M., Barreau, M., Maillot, O., Rincé, I., Muller, C., Marzouki, M. N., Feuilloley, M., Abidi, F., Connil, N. (2019). Probiotic potential and safety evaluation of *Enterococcus faecalis* OB14 and OB15, isolated from traditional Tunisian testouri cheese and rigouta, using physiological and genomic analysis. *Frontiers in Microbiology*, 10, 881. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00881>
29. Bacha, K., Mehari, T., Ashenafi, M. (2009). *In vitro* probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from ‘Wakalim’, a traditional Ethiopian fermented beef sausage. *Ethiopian Journal of Health Science*, 19 (1), 21-29.
30. Bajpai, K.V., Han, H.J., Rather, A.I., Park, C., Lim, J., Paek, K. W., Lee, S.J., Yoon I.J., Park, H.Y. (2016). Characterization and Antibacterial Potential of Lactic Acid Bacterium *Pediococcus pentosaceus* 4I1 Isolated from Freshwater Fish *Zacco koreanus*. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02037>
31. Barbosa, M.S., Todorov, S.D., Belguesmia, Y., Choiset, Y., Rabesona, H., Ivanova, I.V., Franco, B.D.G.M. (2014). Purification and characterization of the bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* MBSa1 isolated from Brazilian salami. *Journal of Applied Microbiology*, 116 (5), 1195–1208. <https://doi.org/10.1111/jam.12438>
32. Barcenilla, C., Ducic, M., López, M., Prieto, M., Álvarez-Ordóñez, A. (2022). Application of lactic acid bacteria for the biopreservation of meat products: A systematic review. *Meat Science*, 183, 108661. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108661>.
33. Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493–496.
34. Bauman, F., Dumić, S. (2017). Elaborat za zaštitu oznake geografskog porekla “Sjenička Stelja” Agencije za privredne registre (APR) 2011 dana 17. 05. 2011. godine./ 8644:Republike Srbije pod brojem BU 2011/ 8644.
35. Belfiore, C., Raya, R.R., Vignolo, G.M. (2013). Identification, technological and safety characterization of *Lactobacillus sakei* and *Lactobacillus curvatus* isolated from Argentinean anchovies (*Engraulis anchoita*). *SpringerPlus* 2, 257. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-257>
36. Belgacem, Z., Ferchichi, M., Prévost, H., Xavier, D., Manai, M. (2008). Screening for anti-listerial bacteriocin-producing lactic acid bacteria from “Gueddid” a traditionally Tunisian fermented meat. *Meat science*, 78, 513-21. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.07.021>

37. Belicová, A., Mikulášová, M., Dušínský, R. (2013). Probiotic Potential and Safety Properties of *Lactobacillus plantarum* from Slovak Bryndza Cheese. *BioMed Research International*, 8. <https://doi.org/10.1155 / 2013/760298>
38. Belleggia, L., Milanović, V., Ferrocino, I., Cocolin, L., Naceur Haouet, M., Scuota, S., Maoloni, A., Garofalo, C., Cardinali, F., Aquilanti, L., Mozzon, M., Foligni, R., Pasquini, M., Federica Trombetta, M., Clementi, F., Osimani, A. (2020). Is there any still undisclosed biodiversity in Ciauscolo salami? A new glance into the microbiota of an artisan production as revealed by high-throughput sequencing. *Meat Science*, 108128. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03835-6>
39. Benito, M.J., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Navado, F., Ruiz-Moyano, S., Córdoba M.G. (2007). Characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional Iberian dry-fermented salchichón and chorizo sausages. *Journal of Food Science*, 72(6), 193-200. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00419.x>.
40. Bergey, D. (2009). *Bergeys manual of systematic bacteriology 3*. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, London, Los Angeles, Sydney.
41. Bernáldez, V., Córdoba, J.J., Rodríguez, M., Cordero, M., Polo, L., Rodríguez, A. (2013). Effect of *Penicillium nalgiovense* as protective culture in processing of dry - fermented sausage "salchichón". *Food Control*, 32, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.018>
42. Beuchat, L.R., Hocking, A.D. (1990). Some considerations when analyzing foods for the presence of xerophilic fungi. *Journal of Food Protection*, 53, 109–116. DOI:10.4315/0362-028X-53.11.984
43. Bhutia, M.O., Thapa, N., Tamang, J.P. (2020). Khyopeh a traditional fermented yak meat product of Sikkim. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 19 (1), 187-191.
44. Bintsis, T. (2018a). Lactic acid bacteria: their applications in foods. *Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access*. 6. <https://doi.org/10.15406/jbmoa.2018.06.00182>.
45. Bintsis, T. (2018b). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiology*, 4 (4), 665–684. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.4.665>
46. Biscola, V., Todorov, S.D., Capuano, V.S., Abriouel, H., Gálvez, A., Franco, B.D.G.M. (2013). Isolation and characterization of a nisin-like bacteriocin produced by a *Lactococcus lactis* strain isolated from charqui, a Brazilian fermented, salted and dried meat product. *Meat Science*, 93 (3), 607–613. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.11.021>
47. Björkroth, J., & Holzapfel, W. (2006). Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: Dvorkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., & Stackebrandt, E. (ed.), *The Prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. 3th edition, New York, Springer, 267 – 319. <https://doi.org/10.4315 / 0362-028X-53.11.984>
48. Bogdanović, T., Pleadin, J., Vahčić, N., Petričević, S. (2017). Chemical and sensorial properties of fermented meat products. In: Zdolec, N. (ed.), *Food Biology Series*, Publisher: CRC Press Taylor&Francis, Boca Raton Florida, USA.
49. Brink, M., Todorov, S.D., Martin, J.H., Senekal, M., Dicks, L.M. (2006). The effect of prebiotics on production of antimicrobial compounds, resistance to growth at low pH and in the presence of bile, and adhesion of probiotic cells to intestinal mucus. *Journal of Applied Microbiology*, 100, 813–820. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02859.x>

50. Candelieri, F, Raimondi, S, Spampinato, G, Tay Moon, YF, Amaretti, A, Schlundt, J, Rossi, M. (2021). Comparative Genomics of *Leuconostoc carnosum*. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.605127>
51. Canel, R., Wagner, J., Steinglein, S., Ludemann, V. (2013). Indigenous filamentous fungi on the surface of Argentinean dry fermented sausages produced in Colonia Caroya (Cordoba). *International Journal of Food Microbiology*, 164, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.022>
52. Cano-Garcia, L., Rivera-Jimenez, S., Belloch, C., Flores, M. (2014). Generation of aroma compounds in a fermented sausage meat model system by *Debaryomyces hansenii* strains. *Food Chemistry*, 151, 364-373. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.051>
53. Casaburi, A., Di Martino, V., Ferranti, P., Picariello, L. (2016). Technological properties and bacteriocins production by *Lactobacillus curvatus* 54M16 and its use as starter culture for fermented sausage manufacturer. *Food Control* 59, 31–45. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.05.016>
54. Castro, M.P., Palavecino, N.Z., Herman, C., Garro, O.A., Campos, C.A. (2011). Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. *Meat Science*, 87 (4), 321–329. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.11.006>
55. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2011). performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 21st informational supplement. CLSI Document M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne.
56. Čaušević, Z., Milanović, A., Glogovac, Ž., Lelek, M., Rahim, A.A. (1984). Tehnologija proizvodnje ovčije stelje i pastrme sa naglašenim uticajem salamurenja na njihov kvalitet. *Radovi Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Sarajevu*, 36, 127–139.
57. Chávez, R., Fierro, F., García-Rico, R.O., Laich, F. (2011). Mold-fermented foods: *Penicillium* spp. as ripening agents in the elaboration of cheese and meat products. *Mycofactories*, 1, 73-98. Doi: 10.2174/978160805223311101010073
58. Chakchouk-Mtibaa, A., Smaoui, S., Ktari, N., Sellem, I., Najah, S., Karray-Rebai, I., Mellouli, L. (2017). Biopreservative efficacy of bacteriocin BacFL31 in raw ground Turkey meat in terms of microbiological, physicochemical, and sensory qualities. *Biocontrol Science*, 22(2), 67–77. <https://doi.org/10.4265/bio.22.67>.
59. Chiaramonte, F., Blugeon, S., Chaillou, S., Langella, P., Zagorec, M. (2009) Behavior of the meat-borne bacterium *Lactobacillus sakei* during its transit through the gastrointestinal tracts of axenic and conventional mice. *Applied and Environmental Microbiology*, 4498–4505. <https://doi.org/10.1128/AEM.02868-08>
60. Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G. (2001). Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (11), 5113-5121. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5113-5121.2001>
61. Cocolin, L., Urso, R., Rantsiou, K., Cantoni, C., Comi, G. (2006). Dynamics and characterization of yeasts during natural fermentation of Italian sausages. *FEMS Yeast Research*, 6 (5), 692-701. <https://doi.org/10.1111/J.1567-1364.2006.00050.X>
62. Comi, G., Iacumin, L. (2013). Ecology of moulds during the pre-ripening and ripening of San Daniele dry cured ham. *Food Research International*, 54, 1113–1119. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.031>

63. Comi, G., Orlic, S., Redzepovic, S., Urso, R., Iacumin, L. (2004). Moulds isolated from Istrian dried ham at the pre-ripening and ripening level. *International Journal of Food Microbiology*, 96: 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.005>
64. Comi, G., Urso, R., Iacumin, L., Rantsiou, K., Cattaneo, P., Cantoni, C., Cocolin, L. (2005). Characterisation of naturally fermented sausages produced in the Northeast of Italy. *Meat Science*, 69, 381 – 392. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091895>
65. Cook, P. (1995). Fungal ripened meats and meat products. In: Campbell-Platt, G., Cook, P. (ed.), *Fermented Meats*. Chapman & Hall, London, 110–129.
66. Courvalin, P. (2007). Antibiotic resistance: the pros and cons of probiotics. *Digestive and liver disease*, 38(2), 261-265. [https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(07\)60006-1](https://doi.org/10.1016/S1590-8658(07)60006-1)
67. De Mesquita Souza Saraiva, M., Lim, K., do Monte, D.F.M., Givisiez, P.E.N., Alves, L.B.R., de Freitas Neto, O.C., Kariuki, S., Júnior, A.B., de Oliveira, C.J.B., Gebreyes, W.A. (2022). Antimicrobial resistance in the globalized food chain: a One Health perspective applied to the poultry industry. *Brazilian Journal of Microbiology*, 53(1), 465-486. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00635-8>
68. De Vuyst, L., Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(4), 194-199. <https://doi.org/10.1159/000104752>
69. Dejene, F., Dadi, B.R., Tadesse D. (2021). *In vitro* antagonistic effect of lactic acid bacteria isolated from fermented beverage and finfish on pathogenic and foodborne pathogenic microorganism in Ethiopia. *International Journal of Microbiology*, 5370556. <https://doi.org/10.1155/2021/5370556>
70. Demirgöl, F., Tuncer, Y. (2017). Detection of antibiotic resistance and resistance genes in enterococci isolated from sucuk, a traditional Turkish dry fermented sausage. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 37, 670-681. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.5.670>
71. Devi Avaiyarasi, N., Ravindran, A.D., Venkatesh, P., Arul, V. (2016). *In vitro* selection, characterization and cytotoxic effect of bacteriocin of *Lactobacillus sakei* GM3 isolated from goat milk. *Food Control*, 69, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.036>
72. Dias, F.S., Santos, M.R.R.M., Schwan, R.F. (2015). Enumeration, identification and safety proprieties of lactic acid bacteria isolated from pork sausage. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 67,918-926. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8119>
73. Doulgeraki, A.I., Ercolini, D., Villani, F., Nychas, G.J.E. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 130-141. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020>
74. Dowdell P, Chankhamhaengdech S, Panbangred W, Janvilisri T, Aroonnuan A. (2020). Probiotic activity of *Enterococcus faecium* and *Lactococcus lactis* isolated from Thai fermented sausages and their protective effect against *Clostridium difficile*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12, 641–8. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09536-7>
75. Duduk, N., Vasić, M., Vico, I. (2014). First report of *Penicillium polonicum* causing blue mold on stored onion (*Allium cepa*) in Serbia. *Plant Disease*, 98(10), 1440. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-14-0550-PDN>
76. EFSA (European Food Safety Authority) (2018). Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA Journal*, 16 (3), 5206. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5206>

77. EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), Koutsoumanis, K., Allende, A., Alvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., Davies, R., De Cesare, A., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Cocconcilli, P. S., Fernández Escámez, P. S., Maradona, M. P., Querol, A., Suarez, J. E., Sundh, I., Vlak, J., Barizzzone, F., Correia, S., Herman, L. (2020). Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA (2017–2019). *EFSA Journal*, 18(2), 5966. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.5966>
78. Eklund, T. (1984). The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. *International Journal of Food Microbiology*, 1, 179 – 185.
79. Erkkilä, S., Petäjä, E. (2000). Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science*, 55, 297-300. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(84\)90014-X](https://doi.org/10.1016/0168-1605(84)90014-X)
80. Essid, I., Ismail, H.B., Ahmed, S.B.H., Ghedamsi, R., Hassouna, M. (2007). Characterization and technological properties of *Staphylococcus xylosus* strains from a Tunisian traditional salted meat. *Meat Science*, 77, 204-212. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.07.020>
81. Fernández, M., Ordóñez, J.A., Bruna, J.M., Herranz, B., de la Hoz, L. (2000). Accelerated ripening of dry fermented sausages. *Trends in Food Science & Technology*, 11 (6), 201–9. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(00\)00077-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(00)00077-7)
82. Ferreira, V., Barbosa, J., Silva, J., Gibbs, P., Hogg, T., Teixeira, P., 2009, Microbiological profile of *Salpicão de Vinhais* and *Chouriça de Vinhais* from raw materials to final products: Traditional dry sausages produced in the North of Portugal. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 279–283. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.11.001>
83. Fettahoğlu, K., Çinar, K., Kaya, M., Kaban, G. (2019). Biodiversity and characterization of gram-positive, catalase-positive cocci isolated from pastırma produced under different curing processes. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 43, 68-75. <https://doi.org/10.3906/vet-1805-66>
84. Fisher, K., & Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155(6), 1749 – 1757. <https://doi.org/10.1099/mic.0.026385-0>
85. Flesch, A.G.T., Poziomyck, A.K., Damin, D.D.C. (2014). The therapeutic use of symbiotics, ABCD. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*, 27(3), 206-209. <https://doi.org/10.1590/S0102-67202014000300012>
86. Flores, M., Dura, M.A., Marco, A., Toldrá, F. (2004). Effect of *Debaryomyces* spp. on aroma formation and sensory quality of dry-fermented sausages. *Meat Science*, 68, 439–446. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2003.04.001>
87. Fontán, M.C.G., Lorenzo, J.M., Martínez, S., Franco, I., Carballo, J. (2007). Microbiological characteristics of Botillo, a Spanish traditional pork sausage. *LWT – Food Science and Technology*, 40, 1610–1622. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2006.10.007>
88. Fortina, M.G., Ricci, G., Borgo, F., Manachini, P.L., Arends, K., Schiwon, K., Abajy, M.Y., Grohmann, E. (2008). A survey on biotechnological potential and safety of the novel *Enterococcus* species of dairy origin, *E. italicus*. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 204-211. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.01.014>

89. Foulquié-Moreno, M.R., Callewaert, R., Devreese, B., Van Beeumen, J., De Vuyst, L. (2003). Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *Journal of Applied Microbiology*, 94(2), 214-29. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01823.x>
90. Frece, J., Kovačević, D., Kazazić, S., Mrvčić, J., Vahčić, N., Ježek, D., Hruškar, M., Babić, I., Markov, K. (2014). Comparison of sensory properties, shelf-life and microbiological safety of industrial sausages produced with autochthonous and commercial starter cultures. *Food Technology and Biotechnology*, 52(3), 307–16.
91. de Macedo, R.E.F., Pflanzler, S. B., Gomes, C.L. (2012). Probiotic Meat Products'. In: Rigobelo, E.C. (ed.), *Probiotic in Animals*, IntechOpen, London, 85-102. <https://doi.org/10.5772/50057>
92. Gajić, B. (2000). Contamination of meat products' substances harmful to human health. Master's thesis, Faculty of Agriculture, University of Sarajevo, Sarajevo, Bosnia & Herzegovina.
93. Ganić, A., Čaušević, A., Karahmet, E., Stojković, S., Ratković, D. (2013). Contribution to technology and quality ham of sheep. In *Proceedings/International 57th Meat Industry Conference: Meat and meat products-perspectives of sustainable production*. Institute of Meat Hygiene and Technology, Belgrade (Serbia).
94. Garcia, E.F., Luciano, W.A., Xavier, D.E., da Costa, W.C., de Sousa, O.K., Franco, O.L., de Moraes Junior A.M., Lucena, T.L.B., Picao C.R., Magnani M., Saarela, M., de Souza L.E. (2016). Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1371. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01371>
95. Gibson, A.M., Baranyi, J., Pitt, J.I., Eyles, M.J., Roberts, T.A. (1994). Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *International Journal of Food Microbiology*, 23 (3-4), 419-31. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90167-8](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90167-8)
96. Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., Reid, G. (2017). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 14, 491–502. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>
97. Gibson, G.R., Probert, H.M., van Loo, J.A.E., Rastall, R.A. Roberfroid, M.B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17, 259-275. <https://doi.org/10.1079/NRR200479>
98. Götz, F., Bannerman, T., Schleifer, K-H. (2006). The genera *Staphylococcus* and *Macrococcus*. *Prokaryotes*, 4, 5-75. https://doi.org/10.1007/0-387-30744-3_1
99. Greco, M., Pardo, A., Pose, G., Patriarca, A. (2018). Effect of water activity and temperature on the growth of *Eurotium* species isolated from animal feeds. *Revista Iberoamericana de Micología*, 35(1):39–48. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.04.002>
100. Grujović, M. (2019). Fiziološka karakterizacija bakterija mlečne kiseline izolovanih iz autohtonog sira jugoistočne Srbije i evaluacija njihovih biotičkih potencijala. Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, 1–213
101. Grujović, M., Mladenović, K., Čomić, L. (2021). The probiotic potential and evaluation of the safety aspect of *Enterococcus* sp. strains isolated from traditionally made Serbian cheese. *Veterinarski arhiv*, 91(3), 319–328. <https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.0925>

102. Grujović, M., Mladenović, K., Čomić, Lj. (2020). The ability of using sugars and sugar substitutes as prebiotics by autochthonous Serbian lactic acid bacteria. *Kragujevac Journal of Science*, 42, 113–122. [https://doi.org/ 10.5937/KgJSci2042113G](https://doi.org/10.5937/KgJSci2042113G)
103. Grujović, M., Mladenović, K., Semedo-Lemsaddek, T., Laranjo, M., Stefanović, O.D., Kocić-Tanackov, S.D. (2022). Advantages and disadvantages of non-starter lactic acid bacteria from traditional fermented foods: potential use as starters or probiotics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21 (2), 1537–1567. [https://doi.org/ 10.1111/1541-4337.12897](https://doi.org/10.1111/1541-4337.12897)
104. Guerrero, L., Guardia, M.D., Xicola, J., Verbeke, W., Vanhonacker, F., Zakowska-Biemans, S., Sajdakowska, M., Sulmont-Rosse, C., Issanchou, S., Contel, M., Scalvedi, M.L., Granli, B.S., Hersleth, M. (2009). Consumer-driven definition of traditional food products and innovation in traditional foods. A qualitative cross-cultural study. *Appetite*, 52, 345 – 354. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803751-5.00005-2>
105. Güllüce, M., Karadayı, M., Bariş, Ö. (2013). Bacteriocins: Promising antimicrobials. In Mendes-Vilas A. (ed.), *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, Formatex, Madrid, Spain, 1016–1027. <https://doi.org/10.12691/jfs-5-2-1>
106. Gutiérrez-Cortés, C., Suarez, H., Buitrago, G., Nero, L.A. Todorov, S. (2018). Characterization of bacteriocins produced by strains of *Pediococcus pentosaceus* isolated from Minas cheese. *Annals of Microbiology* 68, 383–398. <https://doi.org/10.1007/s13213-018-1345-z>
107. Hait, J., Tallent, S., Melka, D., Keys, C., Bennett, R. (2014). Prevalence of enterotoxins and toxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolates recovered from a bakery involved in a second staphylococcal food poisoning occurrence. *Journal of Applied Microbiology*, 117, (3), 866-875. <https://doi.org/10.1111/jam.12571>
108. Halim, M., Mustafa, N.A.M., Othman, M., Wasoh, H., Kapri, M. R., Ariff, A.B. (2017). Effect of encapsulant and cryoprotectant on the viability of probiotic *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 during freeze-drying and exposure to high acidity, bile salts and heat. *LWT-Food Science and Technology*, 81, 210–216. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.009>
109. Hammes, W.P., Brandt, M.J., Francis, K.L., Rosenheim, J., Seitter, M.F.H., Vogelmann S.A. (2005). Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends in Food Science & Technology*, 16, 4–11. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.010>
110. Heasman, M., & Mellentin, J. (2001). *The Functional Foods Revolution In: Healthy People, Healthy Profits* (1st ed.), Routledge. <https://doi.org/10.4324/9781849776165>
111. Heo, S., Lee, J.H., Jeong, D.W. (2020). Food-derived coagulase-negative *Staphylococcus* as starter cultures for fermented foods. *Food Science and Biotechnology*, 29 (8), 1023–1035. <https://doi.org/10.1007/s10068-020-00789-5>
112. Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Berni Canani, R., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., Sanders, M. E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11, 506–514. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66>
113. Holland, R., Liu, S.Q. (2011). Lactic Acid Bacteria-*Leuconostoc* spp. In: John W. (ed.), *Fuquay, Encyclopedia of Dairy Sciences* (Second Edition), Academic Press, 138-142. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00267-3>.

114. Hosseini, S. V., Arlindo S., Bohme, K. (2009). Molecular and probiotic characterization of bacteriocin producing *Enterococcus faecium* strains isolated from nonfermented animal foods. *Journal of Applied Microbiology*, 107 (4), 1392-403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04327.x>
115. Hummel, A., Hertel, C., Holzappel, W., Franz, C. (2007). Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (3), 730–739. <https://doi.org/10.1128/AEM.02105-06>
116. Illipangama, A.U., Jayasena, D.D., Cheorun, J., Mudannayake, D.C. (2022). Inulin as a functional ingredient and their applications in meat products. *Carbohydrate Polymers*, 275, 118706. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118706>
117. İşleroğlu, H., Yildirim, Z., Tokatli, M., Oncul, N., Yıldırım, M. (2012). Partial characterisation of enterocin KP produced by *Enterococcus faecalis* KP, a cheese isolate. *International Journal of Dairy Technology*, 65. <http://dx.doi.org/doi: 10.1111/j.1471-0307.2011.00723.x>
118. ISO 6564:1985. Sensory analysis - Methodology -Flavour profile methods. International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland.
119. ISO 8586-2:2008. Sensory analysis - General guidance for the selection, training and monitoring of assessors - Part 2: Expert sensory assessors. International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland.
120. ISO 15214:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – Colony-count technique at 30°C.
121. James, M. (1992). *Modern Food Microbiology*. In: James, M. (ed.), *Modern Food Microbiology*, 4th edition, Van Nostrand Reinhold, New York, 701. <http://doi.org/10.1007/978-94-011-6480-1>
122. Joborn, A., Dorsch, M., Christer, O.J., Westerdahl, A., Kjelleberg, S. (1999). *Carnobacterium inhibens* sp. nov., isolated from the intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 1891 – 1898. <https://doi.org/10.1099/00207713-49-4-1891>
123. Joković, N., Stojanović-Radić, Z. (2015). *Praktikum mikrobiologija hrane*. Univerzitet u Nišu
124. Kaban, G., Kaya, M. (2009). Identification of lactic acid bacteria and grampositive catalasepositive cocci isolated from naturally fermented sausage (sucuk). *Journal of Food Science*, 73, 385– 388. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00906.x>.
125. Kegalj, A., Krvavica, M., Ljubičić, I. (2012). Raznolikost mikroflore u mesu i mesnim proizvodima. *Meso*, 14, 234 – 245.
126. Kęska, P., Stadnik, J., Zielińska, D., Kołożyn-Krajewska, D. (2017). Potential of bacteriocins from lab to improve microbial quality of dry-cured and fermented meat products. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 16 (2), 119-126. <http://dx.doi.org/10.17306/J.AFS.2017.0466>
127. Klayraung, S., Viernstein, H., Sirithunyalug, J., Okonogi, S. (2008). Probiotic properties of *Lactobacilli* isolated from Thai traditional food. *Scientia Pharmaceutica*, 76, 485–503. <https://doi.org/10.3797/SCIPHARM.0806-11>
128. Kochan, P., Chmielarczyk, A., Szymaniak, L., Brykczynski, M., Galant, K., Zych, A., Pakosz, K., Giedrys-Kalemba, S., Lenouvel, E., Heczko, P.B. (2011). *Lactobacillus rhamnosus* administration causes sepsis in a cardiosurgical patient-is the time right to

- revise probiotic safety guidelines? *Clinical Microbiology and Infection*, 17 (10), 1589-1592. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03614.x>
129. Kocić-Tanackov, S. (2012). Uticaj ekstrakata začina na rast plesni I biosintezu mikotoksina. *Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Novi Sad*, 1–182.
 130. Kong, S., Davison, A.J. (1980). The role of interactions between O₂, H₂, OH⁻, e⁻ and O₂ in free radical damage to biological systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 204, 1329. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(80\)90003-X](https://doi.org/10.1016/0003-9861(80)90003-X)
 131. Kook, S. Y., Chung, E. C., Lee, Y., Lee, D. W., Kim, S. (2019). Isolation and characterization of five novel probiotic strains from Korean infant and children faeces. *Plos One*, 14(10), 0223913. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223913>
 132. Kos, B., Šušković, J., Beganović, J., Gjuračić, K., Frece J., Inannaccone C., Canganella F. (2008). Characterisation of the three selected probiotic strains for the application in food industry, *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 24, 699-707. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9528-y>
 133. Krisher, K. (2016). Basics of differentiation of gram-positive cocci. *Clinical Chemistry*, 1-5. <https://doi.org/10.15428/CCTC.2015.251116>
 134. Krvavica, M., Friganović, E., Đugum, J., Kegalj, A. (2009). Dalmatinska kaštradina (kšstradina). *Meso*, 11, 285-290 (in Croatian).
 135. Kurdi, P., Kawanishi, K., Mizutani, K., Yokota, A. (2006). Mechanism of growth inhibition by free bile acids in lactobacilli and bifidobacteria. *Journal of Bacteriology*, 188 (5), 1979–1986. <https://doi.org/10.1128/jb.188.5.1979-1986.2006>
 136. Laich, F., Fierro, F., Martin, J.F. (2003). Isolation of *Penicillium nalgiovense* strains impaired in penicillin production by disruption of the pcb AB gene and application as starters on cured meat products. *Mycological Research*, 107 (6), 717. <https://doi.org/10.1017/S095375620300769X>
 137. Landeta, G., Curiel, J.A., Carrascosa, A.V., Muñoz, R., de las Rivas, B. (2013). Technological and safety properties of lactic acid bacteria isolated from Spanish dry-cured sausages. *Meat Science*, 95, 272–280. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.05.019>
 138. Laranjo, M., Elias, M., Fraqueza, M.J. (2017). The use of starter cultures in traditional meat products. *Journal of Food Quality*, 2017, 9546026. <https://doi.org/10.1155/2017/9546026>
 139. Laranjo, M., Potes, M.E., Elias, M. (2019). Role of starter cultures on the safety of fermented meat products. *Frontiers in Microbiology*, 10 (853), 1-11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00853>
 140. Ledina, T., Mijačević, Z., Bulajić, S., Babić, M. (2013). Probiotski stats bakterija mlečne kiseline. *Veterinarski Žurnal Republike Srpske*, 13 (2), 176-192. <https://doi.org/10.7251/vjrs13021761>
 141. Leeuwendaal, N., Stanton, C., O'Toole, P. W., Beresford, T.P. (2021). The potential of non-starter lactic acid bacteria from Cheddar cheese to colonise the gut. *Journal of Functional Foods*, 83. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104425>
 142. Leisner, J.J., Laursen, B.G., Prevost, H., Drider D., Dalgaard P. (2007). *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 31, 592 – 613. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00080.x>

143. Lenoir-Wijnkoop, I., Sanders, M.E., Cabana, M.D., Caglar, E., Corthier, G., Rayes, N., Wolvers, D.A. (2007), Probiotic and prebiotic influence beyond the intestinal tract. *Nutrition Reviews*, 65 (11), 469-489. <https://doi.org/10.1301/nr.2007.nov.469-489>
144. Leroy, S., Vermassen, A., Ras, G. and Talon, R. (2017). Insight into the genome of *Staphylococcus xylosus*, a ubiquitous species well adapted to meat products. *Microorganisms*, 5, 52. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030052>
145. Lešić, T., Vahčić, N., Ivica, K., Zadravec, M., Pulić, B., Bogdanović, T., Petricevic, S., Listeš, E., Škrivanko, M., Pleadin, J. (2020). Characterization of traditional Croatian household-produced dry-fermented sausages. *Foods*, 9, 990. <https://doi.org/10.3390/foods9080990>
146. Liong, M.T., Shah, N.P. (2005). Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *Journal of Dairy Science*, 88, 55-66. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72662-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72662-X)
147. Liu, S.Q. (2016). Lactic acid bacteria: *Leuconostoc* spp. In: Holland S, R., & Liu, Q. (ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Second edition, Elsevier; Amsterdam, The Netherlands. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374407-4.00267-3>
148. Lorenzo, J.M., García Fontán, M.C., Cachaldora, A., Franco I., Carballo, J. (2010). Study of the lactic acid bacteria throughout the manufacture of dry-cured lacón (a Spanish traditional meat product). Effect of some additives. *Food Microbiology*, 27, 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.10.003>
149. Lorenzo, JM., Fontan, MCG., Gomez, M., Fonseca, S., Franco, I., Carballo, J. (2012). Study of the Micrococcaceae and Staphylococcaceae throughout the manufacture of dry cured Lacon (a Spanish traditional meat product) made without or with additives. *Journal of Food Research*, 1, 200-211. <https://doi.org/10.5539/jfr.v1n1p200>
150. Lucumi-Banguero, RS., Ramírez-Toro, C., Bolívar, G.A. (2021). potential use of lactic acid bacteria with pathogen inhibitory capacity as a biopreservative agent for chorizo. *Processes*, 9 (9), 1582. <https://doi.org/10.3390/pr9091582>
151. Ludemann, V., Pose, G., Pollio, M.L., Segura, J. (2004). Determination of growth characteristics and lipolytic and proteolytic activities of *Penicillium* strains isolated from Argentinean salami. *International Journal of Food Microbiology*, 96(1), 13–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.003>
152. Maijala, R.; Eerola, S. (1993). Contaminant lactic bacteria of dry sausages produce histamine and tyramine. *Meat Science*, 35, 387-395. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(93\)90043-H](https://doi.org/10.1016/0309-1740(93)90043-H)
153. Makinen, K., Berger, B., Bel-Rhliid, R., Ananta, E. (2012). Science and technology for the mastership of probiotic applications in food products. *Journal of Biotechnology*, 162 (4), 356-365. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.07.006>
154. Mandal, S., Puniya, A.K. Singh, K. (2006). Effect of alginate concentration on survival of encapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*, 16, 1190-1195. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.005>
155. Maragkoudakis, P.A., Mountzouris, K.C., Psyrras, D., Cremonese, S., Fischer, J., Cantor, M.D., Tsakalidou, E. (2009). Functional properties of novel protective lactic acid bacteria and application in raw chicken meat against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*, 130, 219–226. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.027>

156. Mareková, M., Lauková, A., DeVuyst, L., Skaugen, M., Nes, I.F. (2003). Partial characterization of bacteriocins produced by environmental strain *Enterococcus faecium* EK13. *Journal of Applied Microbiology*, 94(3), 523-530. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01861.x>
157. Markowiak, P., Śliżewska, K. (2017). Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients*, 9(9), 1021. <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
158. Martín, A., Córdoba, J.J., Aranda, E., Córdoba, M.G. Asensio, M.A. (2006). Contribution of a selected fungal population to the volatile compounds on dry-cured ham. *International Journal of Food Microbiology*, 110 (1), 8-18. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.018>
159. Martín, A., Córdoba, J.J., Núñez, F., Benito, M.A.J., Asensio, M. A. (2004). Contribution of a selected fungal population to proteolysis on drycured ham. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2003.12.018>
160. Mataragas, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M., Drosinos, E.H. (2003). Influence of pH and temperature by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Science*, 64 (3), 265–271. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00188-2](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00188-2)
161. Mathara, J.M., Schillinger, U., Guigas, C., Franz, C., Kutima, P.M., Mbugua, S.K., Shin, H.K., Holzapfel, W.H. (2008). Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.027>
162. Matijević, B., Božanić, R., Ljubica, T. (2009). The influence of lactulose on growth and survival of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in reconstituted sweet whey. *Mljekarstvo*, 59 (1), 20-27.
163. Miranda, J.M., Samuel, A., Nebot, C.G., Cepeda, A., Franco, C.M., Calo-Mata, M. P. (2014). Technological characterization of lactic acid bacteria isolated from beef stored on vacuum-packaged and advanced vacuum skin packaged system. *Journal of Food Processing and Technology*, 5(6), 338. <https://doi.org/10.4172/2157-7110.1000338>
164. Mladenović, K. (2019). Karakterizacija enterobacteriaceae poreklom iz autohtonog sira Srbije sa posebnim osvrtom na vrste iz rodova *Klebsiella* i *Serratia* Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu, Kragujevac, 1–161.
165. Mojgani, N., Fatimah, H.F., Vaseji, N. (2015). Characterization of indigenous *Lactobacillus* strains for probiotic properties. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(2), 1-2. <https://doi.org/10.5812/jjm.17523>
166. Mokoena, M.P., Mutanda, T., Olaniran, A.O. (2016). Perspectives on the probiotic potential of lactic acid bacteria from African traditional fermented foods and beverages. *Food & Nutrition Research*, 60, 29630. <https://doi.org/10.3402/fnr.v60.29630>
167. Montanha, F., Anater, A., Burchard, J., Luciano, F., Meca, G., Manyes, L., Pimpão, C. (2018). Mycotoxins in dry-cured meats: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 111, 494-502. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.12.008>
168. Mrkonjić Fuka, M., Kos, I., Maksimovic, A. Z., Bacic, M., Tanuwidjaja, I. (2021). Proteolytic *Lactococcus lactis* and lipolytic *Enterococcus durans* of dairy origin as meat functional starter cultures. *Food Technology and Biotechnology*, 59(1), 63–73. <https://doi.org/10.17113/ftb.59.01.21.6872>
169. Muñoz-Atienza, E., Landeta, G., De Las Rivas, B., Gómez-Sala, B., Muñoz, R., Hernandez, P.E., Cintas, L.M., Herranz, C. (2011). Phenotypic and genotypic evaluation of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from fish and fish products.

- International Journal of Food Microbiology, 146, 212–216.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.024>
170. Muruzović, M., Mladenović, K., Žugić-Petrović, T., Čomić, L. (2018). Characterization of lactic acid bacteria isolated from traditionally made Serbian cheese and evaluation of their antagonistic potential against Enterobacteriaceae. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(4), 1–9. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13577>
 171. Naidu, A.S., Bidlack, W.R., Clemens, A.R. (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38 (1), 13-126. <https://doi.org/10.1080/10408699991279187>
 172. Nováková, D., Sedlacek, I., Pantůček, R., Stetina, V., Švec, P., Petrás, P. (2006). *Staphylococcus equorum* and *Staphylococcus succinus* isolated from human clinical specimens. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 523-528. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46246-0>.
 173. Núñez, F., Díaz, M.C., Rodríguez, M., Aranda, E., Martín, A., Asensio, M.A. (2000). Effects of substrate, water activity, and temperature on growth and verrucosidin production by *Penicillium polonicum* isolated from dry-cured ham. *Journal of Food Protection*, 63(2), 231-6. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2062-4_9
 174. Núñez, F., Westphal, C.D., Bermúdez, E., Asensio, M.A. (2007). Production of secondary metabolites by some terverticillate penicillia on carbohydrate-rich and meat substrates. *Journal of Food Protection*, 70 (12), 2829 - 36. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.025>
 175. Ocaña, V., Nader-Macías, M.E. (2002). Vaginal lactobacilli: self- and co-aggregation ability. *British Journal of Biomedical Sciences*, 59, 183-190. <https://doi.org/10.1080/09674845.2002.11783657>
 176. Olesen, P.T., Stahnke, L.H. (2000). The influence of *Debaryomyces hansenii* and *Candida utilis* on the aroma formation in garlic spiced fermented sausages and model minces. *Meat Science*, 56, 357–368. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00063-2](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00063-2)
 177. Ouissal, B., El Bour, M.C., Calo-Mata, P., Boudabous, A., Barros-Velázquez J. (2012). Discovery of novel biopreservation agents with inhibitory effects on growth of food-borne pathogens and their application to seafood products *Research in Microbiology*, 163, 44-54. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.08.005>
 178. Pan, W.H., Li, P.L., Liu, Z. (2006). The correlation between surface hydrophobicity and adherence of *Bifidobacterium* strains from centenarians' faeces. *Anaerobe*, 12, 148–152. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2006.03.001>
 179. Papadimitriou, K., Alegria, A., Bron, P. A., De Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M., Lemos, J.A., Linares, D.M., Ross, P., Stanton, C., Turrioni, F., van Sinderen, D., Varmanen, P., Ventura, M., Zúñiga, M., Tsakalidou, E., Kok, J. (2016). Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80 (3), 837-890. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00076-15>
 180. Pavli, G.F., Argyri, A.A., Papadopoulou, S.O., Nychas, E.G.J., Chorianopoulos, G.N. Tassou, C.C. (2016). Probiotic potential of lactic acid bacteria from traditional fermented dairy and meat products: assessment by *in vitro* tests and molecular characterization. *Journal of Probiotics & Health*, 4, 157. <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000157>
 181. Perez, R.H., Zendo, T., Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S3>

182. Pitt, I.J., Hocking, D.A. (2009). Methods for isolation, enumeration and identification. In: Pitt, I.J., Hocking, D.A. (ed.): *Fungi and Food Spoilage*. 3rd ed. Springer Science, Busines Media, LLC., Dordrecht Heidelberg, London, New York. 21-57. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6391-4>
183. Place, R.B., Hiestand, D., Gallmann, H.R., Teuber, M. (2003). *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. nov., a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. *Systematic and Applied Microbiology*, 26, 30-37. <https://doi.org/10.1078/072320203322337281>
184. Plaza, P., Usall, J., Teixidó, I., Viñas, I. (2003). Effect of water activity and temperature on germination and growth of *Penicillium digitatum*, *P. italicum* and *Geotrichum candidum*. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 549–554. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01909.x>
185. Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatric, E.S., Fanning, S., Hartigan, P.J. (2011). *Staphylococcus* species. In: Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatric, E.S., Fanning, S., Hartigan, P.J. (ed): *Veterinary microbiology and microbial disease*, 2nd 476 Edition, Wiley-Blackwell, State Avenue, Ames, Iowa 50014-8300, USA. 179-188.
186. Radovanović, R., Popov-Raljić, J. (2001). Sensory analysis of food products. University of Belgrade, Faculty of Agriculture; Belgrade: University of Novi Sad; Novi Sad, Serbia: 2000/2001.
187. Radulović, Z., Petrović, T., Bulajić, S. (2012). Antibiotic Susceptibility of Probiotic Bacteria. In: Pana, M. (ed.): *Antibiotic Resistant Bacteria, A Continuous Challenge in the New Millenium*, 26, InTech publisher, Rijeka, Croatia, 549-576. <https://doi.org/10.5772/28915>
188. Radulović, Z., Petrović, T., Nedović, V., Dimitrijević, S., Mirković, N., Petrušić, M., Paunović, D. (2010). Characterization of autochthonous *Lactobacillus paracasei* strains on potential probiotic ability. *Mljekarstvo*, 60(2), 86-93.
189. Ramiah, K., van Reenen, C.A., Dicks, L.M. (2008). Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum* 423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. *Research in Microbiology*, 159 (6), 470-475. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.06.002>
190. Ranadheera, C.S., Vidanarachchi, J. K., Rocha, R. S., Cruz, A. G., Said Ajlouni, S. (2017). Probiotic delivery through fermentation: Dairy vs. Non-Dairy Beverages. *Fermentation*, 3, 67. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040067>
191. Rantsiou, K., Cocolin, L. (2006). New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: a Review. *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), 255-267. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.013>
192. Ratsimba, A., Leroy, S., Chacornac, J.P., Rakoto, D., Arnaud, E., Jeannoda, V., Talon, R. (2017). Staphylococcal ecosystem of Kitoza, a traditional Malagasy meat product. *International Journal of Food Microbiology*, 246, 20-24. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.001>
193. Ratsimba, A., Rakoto, D., Jeannoda, V., Andriamampianina, H., Talon, R., Leroy, S., Grabulos, J., Arnaud, E. (2019). Physicochemical and microbiological characteristics of kitoza, a traditional salted/dried/smoked meat product of Madagascar. *Food Science & Nutrition*, 7 (8), 2666-2673. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1122>

194. Reckem, E.V., Geeraerts, W., Charmpi, C., Van der Veken, D., De Vuyst, L., Leroy, F. (2019). Exploring the link between the geographical origin of European fermented foods and the diversity of their bacterial communities: The case of fermented meats. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2302. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02302>
195. Reda, F.M., Hussein, B.M., Enan, G. (2018). selection and characterization of two probiotic lactic acid bacteria strains to be used as starter and protective cultures for food fermentations. *Journal Pure Applied Microbiology*, 12(3), 1499-1513. <https://doi.org/10.22207/JPAM.12.3.55>
196. Ren, D., Zhu, J., Gong, S., Liu, H., Yu, H. (2018). Antimicrobial characteristics of lactic acid bacteria isolated from homemade fermented foods, *BioMed Research International*, 9. <https://doi.org/10.1155/2018/5416725>
197. Ribeiro, S.C., Ross, R.P., Stanton, C., Silva, C.C.G. (2017). Characterization and application of antilisterial enterocins on model fresh cheese. *Journal of Food Protection*, 80 (8), 1303–1316. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-031>
198. Rijkers, G.T., Bengmark, S., Enck, P., Haller, D., Herz, U., Kalliomaki, M., Rabot, S. (2010). Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: current status and recommendations for future research. *The Journal of Nutrition*, 140 (3), 671S–676S. <https://doi.org/10.3945/jn.109.113779>
199. Rodriguez, M., Nunez, F., Cordoba, J.J., Bermudez, E., Asensio, M.A. (1996). Gram positive cocci from dry cured ham and their enterotoxigenic potential. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1897-1902. <https://doi.org/10.1128/aem.62.6.1897-1902.1996>
200. Rogelj, I. (1994). Bakterije mliječne kiseline kao probiotici. *Mljekarstvo*, 44 (4), 277-284.
201. Rojas, F.J., Jodral, M., Gosalvez, F., Pozo, R. (1991). Mycoflora and toxigenic *Aspergillus flavus* in Spanish dry-cured ham. *International Journal of Food Microbiology*, 13, 249–255. [https://doi.org/10.1016 / 0168-1605 \(91\) 90082-Z](https://doi.org/10.1016 / 0168-1605 (91) 90082-Z)
202. Ruiz-Moyano, S., Martín, A., Benito, M.J., Aranda, E., Casquete, R., Córdoba, M.D.G. (2009). Safety and functional aspects of preselected *Enterococci* for probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Journal Food Science*, 74, 398-404. <https://doi.org/10.1111 / j.1750-3841.2009.01290.x>
203. Samelis, J., Kakouri, A., Georgiadou, K.G., Metaxopoulos, J. (1998). Evaluation of the extent and type of bacterial contamination at different stages of processing of cooked ham. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 649-660. <https://doi.org/10.1046 / j.1365-2672.1998.00392.x>
204. Samson, R.A., Frisvard J.C. (2004a). *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. *Studies in Mycology*, 49, 1–174.
205. Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C. (2004b). Introduction to foodand airborne fungi. In: Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C.(ed): Introduction to foodand airborne fungi, 7th edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Utrecht, Netherlands, 389.
206. Sánchez Mainar, M., Stavropoulou, D.A., Leroy, F. (2017). Exploring the metabolic heterogeneity of coagulase-negative staphylococci to improve the quality and safety of fermented meats: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 247, 24-37. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.021>

207. Schleifer, K.H., Bell, J.A. (2009). Family VIII. *Staphylococcaceae* fam. nov. In: De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., Whitman, W.B. (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The Firmicutes*, 3, second ed., Springer, Dordrecht, 392–433.
208. Scolari, G., Sarra, P.G., Baldini, P. (2003). Mikrobiologija suhega mesa. In: Bem, Z., Adamic, J., Zlender, B., Smole Mozina, S., Gasperlin L., (ed.), *Mikrobiologija zivil zivalskega izvora*. Biotehniška fakulteta, Oddelek za zivilstvo, Ljubljana, 351–362.
209. Semedo-Lemsaddek, T., Carvalho, L., Tempera, C., Fernandes, M.H., Fernandes, M.J., Elias, M., Barreto, A. S., Fraqueza, M.J. (2016). Characterization and technological features of autochthonous coagulase-negative staphylococci as potential starters for Portuguese dry fermented sausages. *Journal of Food Science*, 81 (5), 1197-1202. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13311>
210. Shin MChoi, H., Jeong, K., Lim, J., Kyeong-Su K., Wan-Kyu, L. (2012). Selection and characterization of bacteriocin-producing *Lactobacillus* sp. AP 116 from the intestine of pig for potential probiotics. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 32(1), 31-39. <https://doi.org/0.5851/KOSFA.2012.32.1.31>
211. Shin, M.S., Han, S.K., Ji A.R., Kim, K.S., Lee, W.K. (2008). Isolation and characterization of bacteriocin-producing bacteria from the gastrointestinal tract of broiler chickens for probiotic use. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 2203–2212. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03935.x>
212. Shokryazdan, P., Sieo, C. C., Kalavathy, R., Liang, J. B., Alithee, N. B., Jahromi, M. F., Ho, Y. W. (2014). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with antimicrobial activity against some human pathogenic strains. *BioMed Research International*, 2014, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2014/927268>
213. Silva, C., Silva, S., Ribeiro, S. (2018). Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in Microbiology*, 9, 594-594. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00594>
214. Simoncini, N., Rotelli, D., Virgili., R. Quintavalla, S. (2007). Dynamics and characterization of yeasts during ripening of typical Italian dry-cured ham. *Food Microbiology*, 24 (6), 577-584. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.01.003>
215. Soliman, A.H.S., Sharoba, A.M., Bahlol, H.E.M., Soliman, A.S., & Radi, O.M.M. (2015). Evaluation of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* for probiotic characteristics. *Middle East Journal of Applied Science*, 5(1), 10 – 18.
216. Soltani, S., Hammami, R., Cotter, P.D., Rebuffat, S., Ben Said, L., Gaudreau, H., Bédard, F., Biron, E., Drider, D., Fliss, I. (2021). Bacteriocins as a new generation of antimicrobials: toxicity aspects and regulations. *FEMS Microbiology Reviews*, 45 (1). <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa039>
217. Song, D., Ibrahim, S., Hayek, S. (2012). Recent application of probiotics in food and agricultural science. In: Rigobelo, E.C. (ed.), *Probiotics*,. InTech Open, London, UK,4-36. <https://doi.org/10.5772/50121>
218. Sonjak, S., Ličen, M., Frisvald, J.C., Gunde-Cimerman, N. (2011). The mycobiota of three drycured meat products from Slovenia. *Food Microbiology*, 28, 373–376. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.09.007>

219. Sourabh, A., Kanwar, S.S., Sharm, P.N. (2010). Diversity of bacterial probiotics in traditional fermented foods of Western Himalayas. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 5 (4), 193-202
220. SRPS EN ISO 6887-1:2008. Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Pripremanje uzoraka za ispitivanje, početne suspenzije i decimalnih razblaženja za mikrobiološko ispitivanje.
221. SRPS EN ISO 8589:2012. Senzorske analize - Opšte uputstvo za projektovanje.
222. SRPS ISO 1442:1998. Meso i proizvodi od mesa - Određivanje sadržaja vlage-Referentna metoda. Institut za standardizaciju Srbije.
223. SRPS ISO 1443:1992. Meso i proizvodi od mesa. Određivanje sadržaja ukupne masti (identičan sa ISO 1443:1973). Institut za standardizaciju Srbije.
224. SRPS ISO 1841-1:1999. Meso i proizvodi od mesa - Određivanje sadržaja hlorida - Deo 1: Metoda po Volhardu. Institut za standardizaciju Srbije.
225. SRPS ISO 2917:2004. Meso i proizvodi od mesa - Merenje pH – Referentna metoda. Institut za standardizaciju Srbije.
226. SRPS ISO 936:1999. Meso i proizvodi od mesa. Određivanje ukupnog pepela. Institut za standardizaciju Srbije
227. SRPS ISO 937:1992. Meso i proizvodi od mesa - Određivanje sadržaja azota (Referentna metoda). Institut za standardizaciju Srbije.
228. Stamenković, T., Dević, B. (2006). Senzorna svojstva ovčije stelje. *Tehnologija mesa*, 47 (3-4), 115-122.
229. SRPS EN ISO 4833-1:2014. Mikrobiologija lanca hrane – Horizontalna metoda za određivanje broja mikroorganizama – Deo 1: Brojanje kolonija na 30°C tehnikom nalivanja ploče.
230. SRPS ISO 21528-2:2009 i 2017. Mikrobiologija lanca hrane – Horizontalna metoda za otkrivanje i određivanje broja *Enterobacteriaceae*– Deo 2: Tehnika brojanja kolonija.
231. SRPS EN ISO 6579-1:2010 i 2017. Mikrobiologija lanca hrane –Horizontalna metoda za otkrivanje, određivanje broja i serotipizaciju *Salmonella*– Deo 1: Otkrivanje *Salmonella* spp.
232. SRPS EN ISO 6888-1:2009/A2:2018. Microbiology of the food chain – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) – Part 1: Method using Baird-Parker agar medium.
233. SRPS EN ISO 11290-1:2010 i 2017. Mikrobiologija lanca hrane –Horizontalna metoda za otkrivanje i određivanje broja *Listeria monocytogenes* i *Listeria* spp. – Deo 1: Metoda otkrivanja.
234. Stanton, C., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Van Sinderen, D. (2005). Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites, *Current Opinion in Biotechnology*, 16(2), 198-203. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.02.008>
235. Stavropoulou, D.A., De Vuyst, L., Leroy, F. (2018). Nonconventional starter cultures of coagulase-negative staphylococci to produce animal-derived fermented foods, a SWOT analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 125, 1570–1586. <https://doi.org/10.1111/jam.14054>
236. Stojković, S., Grabež, V., Bjelanović, M., Mandić, S., Vučić, G., Martinović, A., Thauland Håseth, T., Velemir, A., Egelanddal, B. (2015). Production process and quality of two different dry-cured sheep hams from Western Balkan countries. *Food Science and Technology*, 64, 1217–1224. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.07.022>

237. Sunesen, L.O., Stahnke, L.H. (2003). Mould starter cultures for dry sausages - selection, application and effects. *Meat Science*, 65, 935-948. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00281-4](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00281-4)
238. Sunesen, L.O., Trihaas, J., Stahnke, L.H. (2004). Volatiles in a sausage surface model— influence of *Penicillium nagiovense*, *Pediococcus pentosaceus*, ascorbate, nitrate and temperature. *Meat Science*, 66(2), 447-56. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(03\)00133-5](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(03)00133-5)
239. Šušković, J., Kos, B., Goreta, J., Matošić, S. (2001). Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in symbiotic effect. *Food Technology and Biotechnology*, 39, 227-235.
240. Šušković, J., Kos, B., Matošić, S., Besendorfer, V. (2000). The effect of bile salts on survival and morphology of a potential probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16, 673–678. <https://doi.org/10.1023/A:1008909505651>
241. Suvorov, A. (2020). What is wrong with enterococcal probiotics? *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12, 1–4. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09633-y>
242. Talon, R., Leroy, S. (2011). Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. *Meat Science*, 89 (3), 303-309. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.029>
243. Talon, R., Leroy, S., Lebert, I. (2007). Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: the importance of indigenous straters. *Meat Science*, 77, 55–62. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.04.023>
244. Tamang, J.P. (2014). Microfloras of Fermented Foods. In: Batt, A.C., & Tortorello L.M. (ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology-biochemical and modern identification techniques*, Elsevier, 250–258. doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00038-0
245. Teixeira, A., Silva, S., Guedes, C., Rodrigues, S. (2020). Sheep and goat meat processed products quality: A Review. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9 (7), 960. <https://doi.org/10.3390/foods9070960>
246. Thangavel, G., Thiruvengadam, S. (2019). Microorganisms isolated from stored meat in India, with potential antimicrobial activity against food pathogens. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 20 (5), 401-409. <https://doi.org/10.2174/1389201020666190314125534>
247. Todorov, S. D., Stojanovski, S., Iliev, I., Moncheva, P., Nero, L. A., Vitanova Ivanovaa, I. (2017). Technology and safety assessment for lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian fermented meat product “lukanka”. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(3), 576-586. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.02.005>
248. Todorov, S., Rachman, C., Fourrier, A., Dicks, L., van Reenen, C., Prevalence, H., Dousset, X. (2011). Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* R1333 isolated from smoked salmon. *Anaerobe*, 17, 23-31. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.01.004>
249. Todorov, S.D., Ho, P., Vaz-Velho, M., Dicks, L.M. (2010). Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from Beloura and Chouriço, traditional pork products from Portugal. *Meat Science*, 84 (3), 334-43. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.08.053>
250. Todorov, S.D., Vaz-Velho, M., Franco, B.D.G.M., Holzapfel, W.H. (2013). Partial characterization of bacteriocins produced by three strains of *Lactobacillus sakei*, isolated

- from salpicao, a fermented meat product from NorthWest of Portugal. *Food Control*, 30 (1), 111–121. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.07.022>
251. Toldrá, F. (2002). Fermentation and Starter Cultures. In: Toldrá, F. (ed.), *Dry-cured meat products*. 3th edition, Food and Nutrition Press, John Wiley & Sons, 89-112. <https://doi.org/10.1002/9780470385111>
252. Toldrà, F. (2008). Biotechnology of flavor creation in fermented meat. In: Toldrá, F. (ed.), *Meat Biotechnology*. Springer, New York, NY, 199-215. https://doi.org/10.1007/978-0-387-79382-5_9
253. Toledano, A., Jordano, R., López, C., Medina, L.M. (2011). Proteolytic activity of lactic acid bacteria strains and fungal biota for potential use as starter cultures in dry-cured ham. *Journal of Food Protection*, 74, 826–829. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-471>
254. Tomé, E., Pereira V.L., Lopes, C.I., Gibbs P. A., Teixeira, P.C. (2008). *In vitro* tests of suitability of bacteriocin-producing lactic acid bacteria, as potential biopreservation cultures in vacuum-packaged cold-smoked salmon. *Food Control*, 19(5), 535-543. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.06.004>
255. Tuo, Y., Yu, H., Ai, L., Wu, Z., Guo, B., Chen, W. (2013). Aggregation and adhesion properties of 22 *Lactobacillus* strains. *Journal of Dairy Science*, 96 (7), 4252–4257. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6547>
256. Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E., Salminen, S. (2001). Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73 (2), 393-398. <https://doi.org/10.1093/ajcn/73.2.393s>
257. Työppönen, S., Petäjä, E., Mattila-Sandholm, T. (2003). Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 83, 233-244. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00379-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00379-3)
258. Vafopoulou, A., Simitsopoulou, M., Choli-Papadopoulou, T. Alichanidis, E. (1999). Partial purification and characterization of an aminopeptidase from *Pediococcus pentosaceus* K9. 2. *Milchwissenschaft*, 54, 499–502.
259. Vasilev, D., Aleksic, B., Tarbuk, A., Dimitrijevic, M., Karabasil, N., Cobanovic, N., Vasiljevic, N. (2015). Identification of lactic acid bacteria isolated from serbian traditional fermented sausages sremski and lemeski kulen. *Procedia Food Science*, 5, 300-303. <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.09.071>
260. Vesković-Moračanin, S., Obradović, D., Velebit, B., Borović, B., Škrinjar, M., Turubatović, L. (2010). Antimicrobial properties of indigenous *Lactobacillus sakei* strain. *Acta Veterinaria (Belgrade)*, 60 (1), 59-66. <https://doi.org/10.2298/AVB1001059V>
261. Vignolo, G., Fontana, C., Fadda, S. (2010). Semidry and dry fermented sausages. In: Toldrá, F. (ed.), *Handbook of meat processing*, 379-398. <https://doi.org/10.1002/9780813820897.CH22>
262. Vizoso Pinto, G.M., Charles, M.A.P., Schillinger, F.U., Holzappel, H.W. (2006). *Lactobacillus* spp. with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *International Journal of Food Microbiology*, 109, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.029>
263. Vuković, I., Vasilev, D., Saičić, S., Ivanković, S. (2012). Investigation of major changes during ripening of traditional fermented sausage Lemeski kulen. *Meat Technology*, 53 (2), 140-147. <https://doi.org/10.5937/TEHMESA1202140V>

264. Wang, P., Wu, Z., Wu, J., Pan, D., Zen, X., & Cheng. (2016). Effects of salt stress on carbohydrate metabolism of *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *Current Microbiology*, 73 (4), 491-497. DOI: 10.1007/s00284-016-1087-8
265. Wang, W., He, J., Pan, D., Wu, Z., Guo, Y., Zeng, X., Lian, L. (2018). Metabolomics analysis of *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 adhesion activity under initial acid and alkali stress. *PLoS One*, 13, 0196231. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196231>.
266. Wang, Y., Li, F., Chen, J., Sun, Z., Wang, F., Wang, C., Fu, L. (2021). High-throughput sequencing-based characterization of the predominant microbial community associated with characteristic flavor formation in Jinhua Ham. *Food Microbiology*, 94, 103643-103643. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103643>
267. Whaling, M.A., Luginaah, I., Reid, G., Hekmat, S., Thind, A., Mwanga, J., Changalucha, J. (2012). Perceptions about probiotic yogurt for health and nutrition in the context of HIV/AIDS in Mwanza, Tanzania. *Journal of Health, Population and Nutrition*, 30 (1), 31–40. <https://doi.org/10.3329/jhpn.v30i1.11273>
268. Yasmin, I., Saeed, M., Khan, W. A., Khaliq, A., Chughtai, M., Iqbal, R., Tehseen, S., Naz, S., Liaqat, A., Mehmood, T., Ahsan, S., Tanweer, S. (2020). *In vitro* probiotic potential and safety evaluation (hemolytic, cytotoxic activity) of *Bifidobacterium* strains isolated from raw camel milk. *Microorganisms*, 8 (3), 354. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030354>
269. Zagorec, M., Champomier-Vergès, M.C. (2017). *Lactobacillus sakei*: A starter for sausage fermentation, a protective culture for meat products. *Microorganisms*, 5(3), 56. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030056>
270. Zdolec, N., Hadžiosmanović, M., Kozačinski L., Cvrtila, Ž., Filipović, I., L Leskovar, K. Vragović, N., Budimir. D. (2007). Fermentirane kobasice proizvedene u domaćinstvu-mikrobiološka kakvoća. *Meso*. 9, 318-324.
271. Zdolec, N., Hadžiosmanović, M., Kozačinski, L., Cvrtila, Ž., Filipović, I., Škrivanko, M., Leskovar, K. (2008). Microbial and physicochemical succession in fermented sausages produced with bacteriocinogenic culture of *Lactobacillus sakei* and semi-purified bacteriocin mesenterocin Y. *Meat Science*, 80, 480–487. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.01.012>
272. Žgomba Maksimović, A., (2019). Microbiota of spontaneously fermented game meat sausages. Doctoral thesis, Faculty of Agriculture, University of Zagreb, Zagreb, 1-196.
273. Zhang, B., Tong, H., Dong, X. (2005). *Pediococcus cellicola* sp. nov., a novel lactic acid coccus isolated from a distilled-spirit-fermenting cellar. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55, 2167-2170. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63778-0>
274. Zhang, H., HePing, H., Wang, X., ShanShan Z., Yuan, L., Haoxin, L., Guangyong, Q., Zhongfang, T. (2021). Antibacterial activity of lactic acid producing *Leuconostoc mesenteroides* QZ1178 against pathogenic *Gallibacterium anatis*. *Frontiers in Veterinary Science*, 8. 630294. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.630294>
275. Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M., Harris, H.M., Mattarelli, P., Watanabe, K.A (2020). Taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70, 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

276. Žugić-Petrović T, Muruzović M, Mladenović K, Ilić P, Kocić Tanackov S, Čomić Lj (2016). Characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from dried meat of sheep carcase – Sjenica sheep prosciutto. *Veterinary Journal of Republic of Srpska (Бања Лука-Banja Luka)*, 01, 26-38.
277. Žugić-Petrović T., Ilić P., Muruzović M., Mladenović K., Stanisavljević D., Čomić Lj. 2019. Dry-fermented sausage as probiotic carrier food. *Fleischwirtschaft*, 99(2), 100-103.
278. Žugić-Petrović T., Ilić P., Grujović, M., Mladenović, K., Kocić-Tanackov, S., Čomić, Lj. (2021). *Lactobacillus curvatus* from fermented sausages as new probiotic functional foods. *Food Science and Technology*, 1-9. <https://doi.org/10.1590/fst.17121>
279. Žugić-Petrović, T., Ilić, P., Mladenović, K., Djilas, M., Kocić-Tanackov, S., Čomić, Lj. (2022). Probiotic potential of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* strains isolated from traditional spontaneously fermented sheep ham. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 32 (3). <http://doi.org/10.36899/JAPS.2022.3.0487>
280. Žugić-Petrović, T., Ilić, P., Mladenović, K., Grujović, M., Kocić Tanackov, S., Čomić, Lj. (2020). Probiotic potential of autochthone microbiota from dry-cured sheep ham. *Journal of Food Safety and Food Quality* 71, 6 (138), 146-151. <https://doi.org/10.1590/fst.17121>
281. Žugić-Petrović, T., Stanisavljević, D., Ilić, P., Mladenović, K., Muruzović, Kocić-Tanackov, S., Čomić, Lj. (2018). Effect of water activity on the radial growth of fungi isolated from dry-cured sheep ham, *in vitro*. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*, 134, 65-75. <https://doi.org/10.2298/ZMSPN1834065Z>

Прилози

Прилог 1. Корелациона анализа

Табела 1. Корелациона анализа укупног броја аеробних мезофилних бактерија и хемијских параметара сјеничке овчије стеље

	Садржај воде (%)	Садржај протеина (%)	Садржај масти (%)	Садржај пепела (%)	Садржај NaCl (%)	a_w	pH
0	0,220	0,631	-0,470	-0,750*	-0,566	0,105	0,568
7	0,282	0,422	-0,410	-0,641	-0,422	0,095	0,524
14	0,303	0,637	-0,558	-0,763*	-0,503	0,297	0,705*
28	0,328	0,398	-0,428	0,114	0,408	-0,039	0,094
60	-0,102	0,105	0,081	0,401	0,643	0,080	-0,403
90	-0,359	-0,116	0,327	0,304	0,582	0,231	-0,392
120	-0,357	-0,106	0,352	0,198	0,481	0,318	-0,398

*корелације су статистички значајне, $p < 0,05$

Табела 2. Корелациона анализа укупног броја бактерија из фамилије Enterobacteriaceae и хемијских параметара сјеничке овчије стеље

	Садржај воде (%)	Садржај протеина (%)	Садржај масти (%)	Садржај пепела (%)	Садржај NaCl (%)	a_w	pH
0	0,520	0,329	-0,592	-0,539	-0,581	0,191	0,737*
7	0,729*	0,169	-0,678*	0,032	0,104	0,108	0,474
14	0,684*	-0,273	-0,409	0,330	0,341	-0,226	0,174
28	0,151	0,018	-0,155	-0,193	-0,235	0,681*	0,326
60	-	-	-	-	-	-	-
90	-	-	-	-	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-	-

*корелације су статистички значајне, $p < 0,05$

Табела 3. Корелациона анализа укупног броја бактерија из фамилије Pseudomonadaceae и хемијских параметара сјеничке овчије стеље

	Садржај воде (%)	Садржај Протеина (%)	Садржај масти (%)	Садржај пепела (%)	Садржај NaCl (%)	a_w	pH
0	-0,136	0,654	-0,209	-0,060	0,153	-0,238	0,034
7	0,122	-0,570	0,219	0,668*	0,677*	0,027	-0,519
14	0,037	-0,791*	0,424	0,777*	0,808*	-0,013	-0,697*
28	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-
90	-	-	-	-	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-	-

*корелације су статистички значајне, $p < 0,05$

Табела 4. Корелациона анализа укупног броја бактерија млечне киселине и хемијских параметара сјеничке овчије стеле

	Садржај воде (%)	Садржај отенна (%)	Садржај масти (%)	Садржај пепела (%)	Садржај NaCl (%)	a_w	pH
0	0,257	0,344	-0,384	0,034	0,167	0,611	0,280
7	-0,228	-0,023	0,237	0,370	0,486	0,452	-0,394
14	0,093	0,456	-0,273	-0,057	0,131	0,470	0,162
28	-0,081	0,367	-0,080	0,019	0,133	0,433	-0,043
60	0,188	0,483	-0,352	-0,165	0,166	0,270	0,196
90	-0,081	0,098	0,012	0,195	0,509	0,257	-0,137
120	0,319	0,524	-0,525	-0,329	0,031	0,328	0,482

*корелације су статистички значајне, $p < 0,05$

Табела 5. Корелациона анализа укупног броја врста из рода *Enterococcus* и хемијских параметара сјеничке овчије стеле

	Садржај воде (%)	Садржај протеина (%)	Садржај масти (%)	Садржај пепела (%)	Садржај NaCl (%)	a_w	pH
0	0,134	0,738*	-0,480	-0,874*	-0,852*	0,086	0,723*
7	0,376	0,278	-0,419	-0,459	-0,452	-0,230	0,534
14	0,341	-0,222	-0,160	-0,062	-0,210	0,223	0,278
28	0,089	-0,012	-0,124	0,045	-0,147	0,202	0,269
60	-0,005	-0,070	-0,051	-0,158	-0,353	0,334	0,365
90	-0,127	-0,455	0,253	0,126	-0,180	0,427	-0,003
120	-0,157	-0,347	0,235	0,309	-0,004	0,106	-0,145

*корелације су статистички значајне, $p < 0,05$

Табела 6. Корелациона анализа укупног броја врста из рода *Staphylococcus* и хемијских параметара сјеничке овчије стеле

	Садржај воде (%)	Садржај протеина (%)	Садржај масти (%)	Садржај пепела (%)	Садржај NaCl (%)	a_w	pH
0	-0,257	0,290	-0,031	-0,482	-0,467	0,307	0,410
7	-0,084	0,425	-0,212	-0,596	-0,416	0,003	0,480
14	-0,128	0,537	-0,146	-0,620	-0,606	-0,300	0,241
28	0,182	0,277	-0,214	0,372	0,427	-0,508	-0,237
60	-0,468	0,372	0,142	-0,251	-0,092	0,456	0,098
90	-0,364	0,221	0,190	-0,220	-0,008	0,551	-0,067
120	-0,596	-0,380	0,692*	0,127	0,198	0,391	-0,555

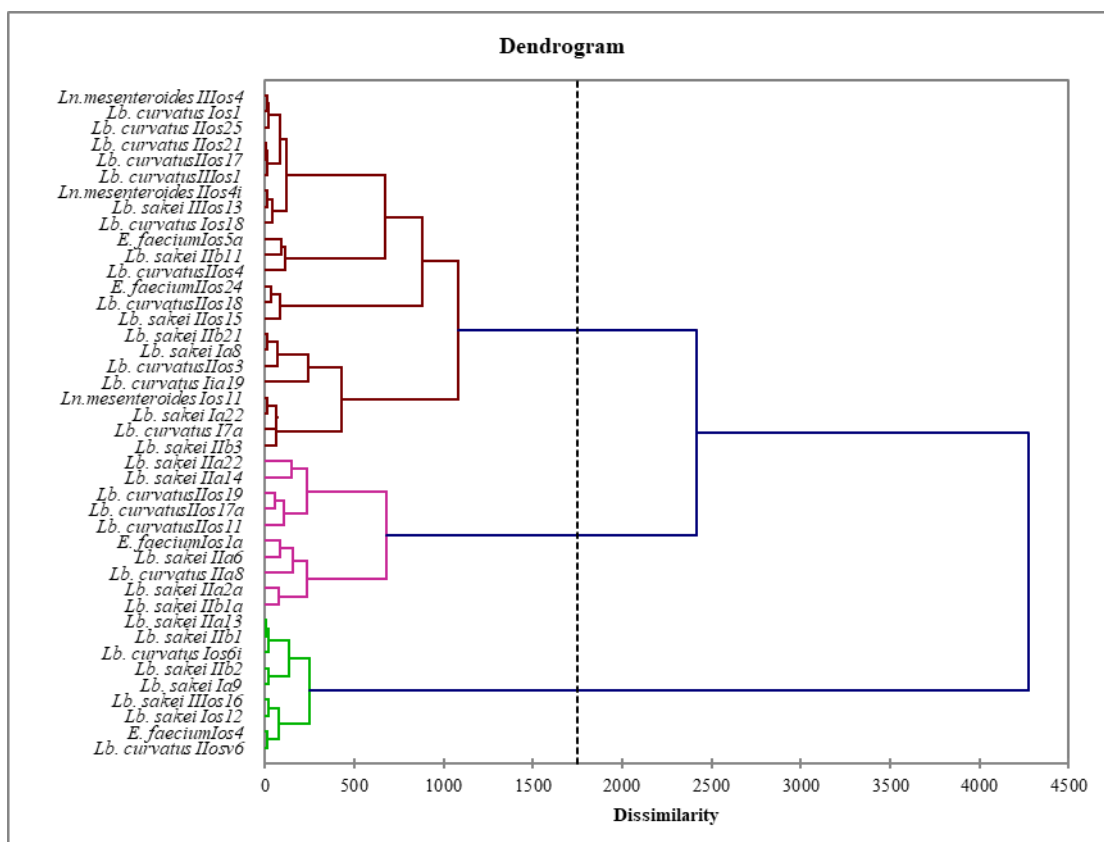
*корелације су статистички значајне, $p < 0,05$

Табела 7. Корелациона анализа укупног броја плесни и хемијских параметара параметара сјеничке овчије стеље

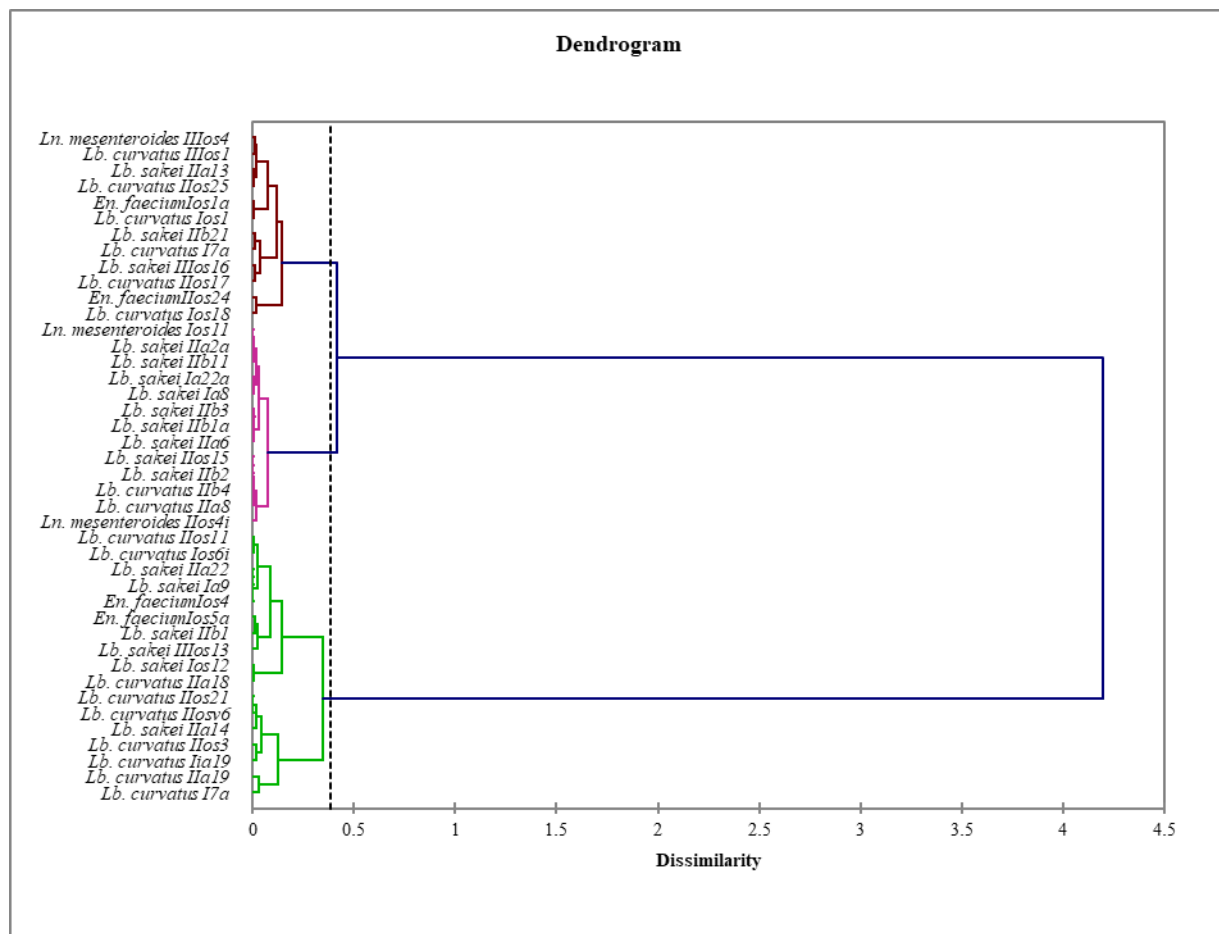
	Садржај воде (%)	Садржај протеина (%)	Садржај масти(%)	Садржај пепела(%)	Садржај NaCl (%)	a _w	pH
0	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-
28	-0,573	-0,838*	0,863*	0,470	0,362	0,079	-0,777*
60	-0,936*	-0,311	0,871*	0,194	0,038	0,107	-0,638
90	-0,108	-0,696*	0,459	0,365	0,071	-0,150	-0,458
120	-0,479	-0,346	0,564	0,390	0,179	-0,071	-0,602

*корелације су статистички значајне, $p < 0,05$

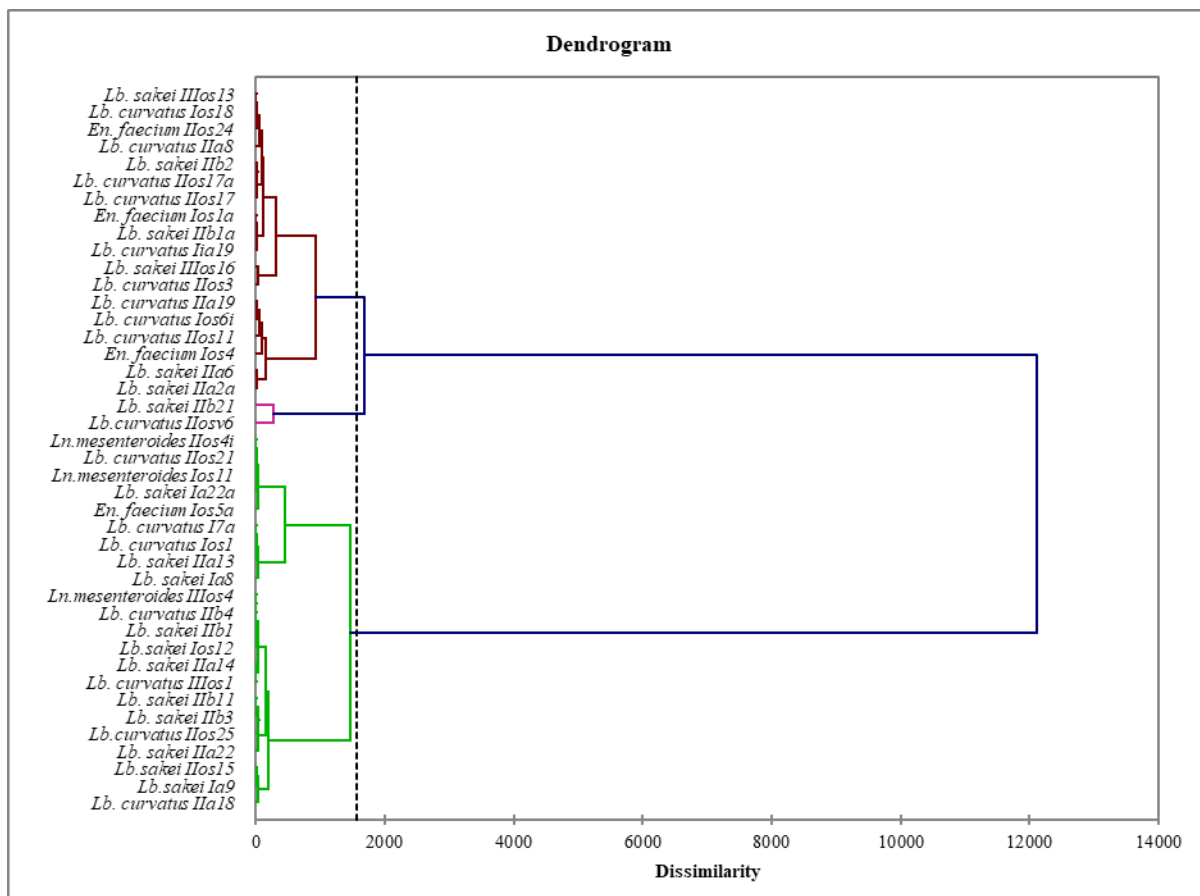
Прилог 2. Кластер анализа антимикробне активности изолата БМК против патогених бактерија



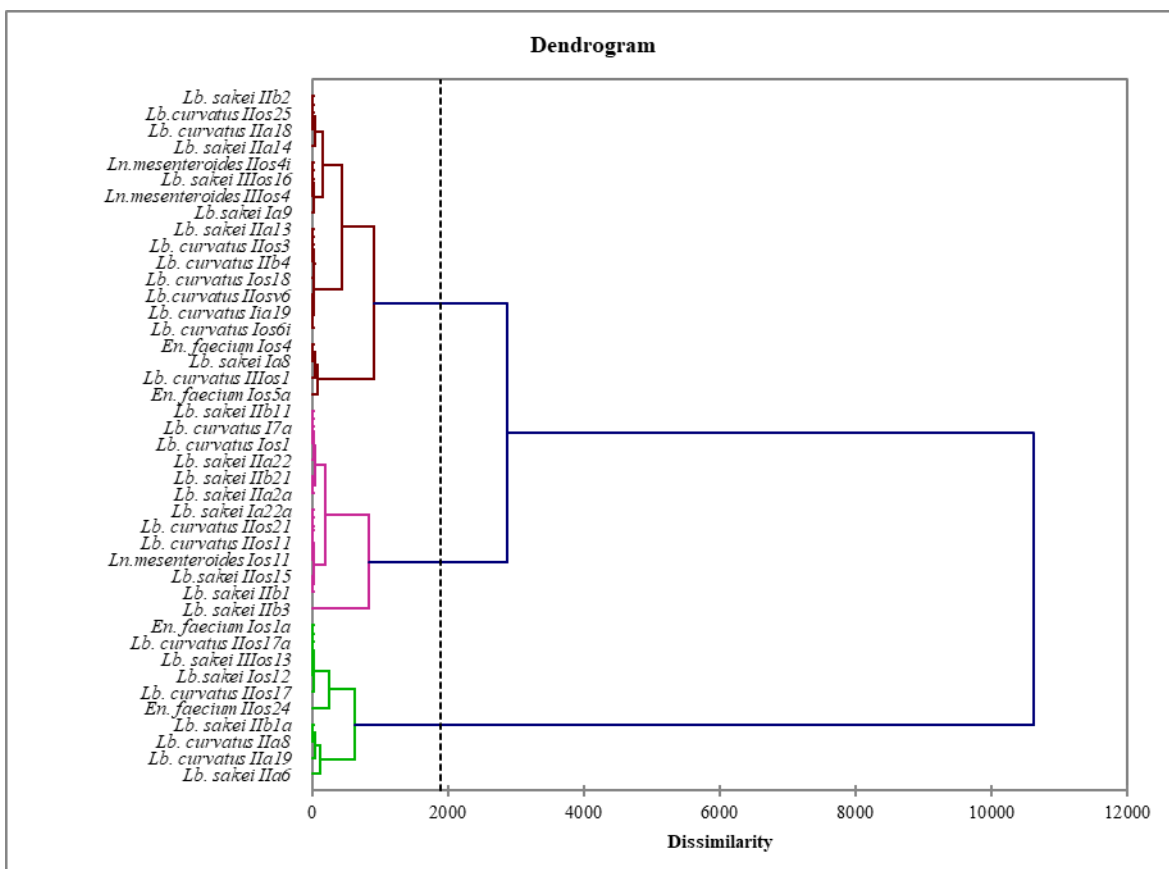
Прилог 3. Кластер анализа стопе преживљавања одабраних сојева у симулираним условима желучаног и жучног сока



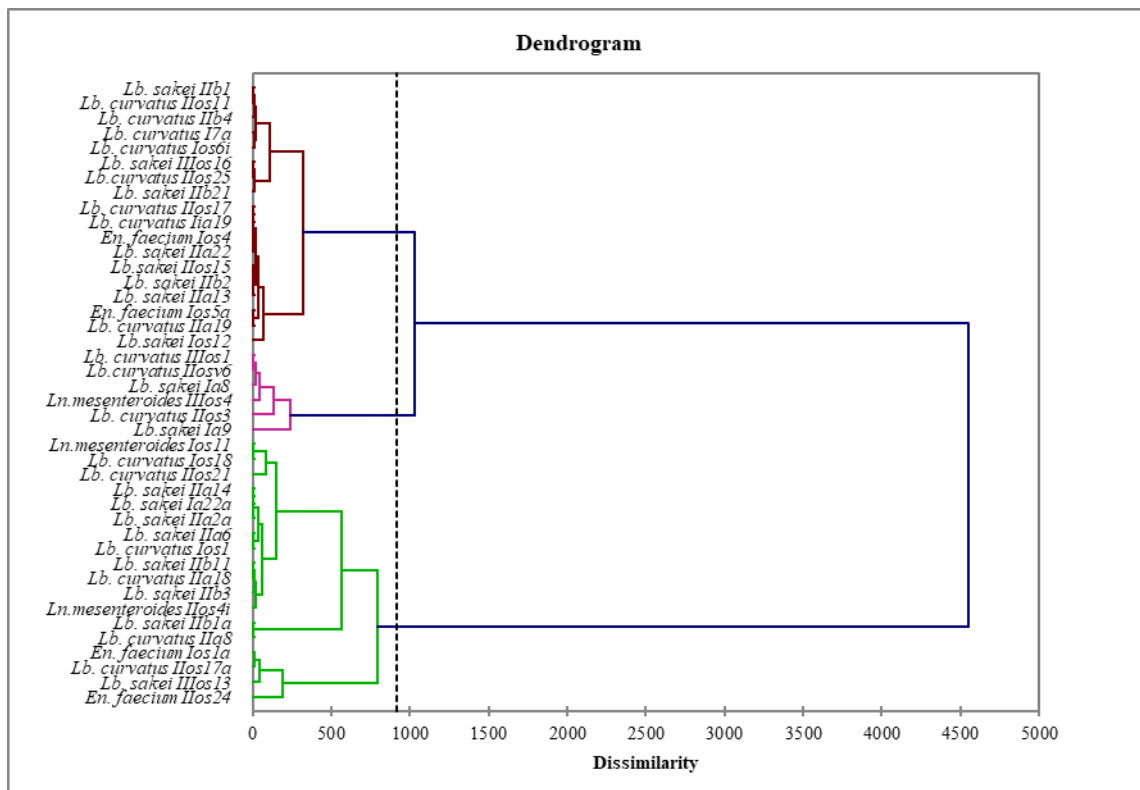
Прилог 4. Кластер анализа бактеријске адхезије за угљоводонике (хидрофобност)



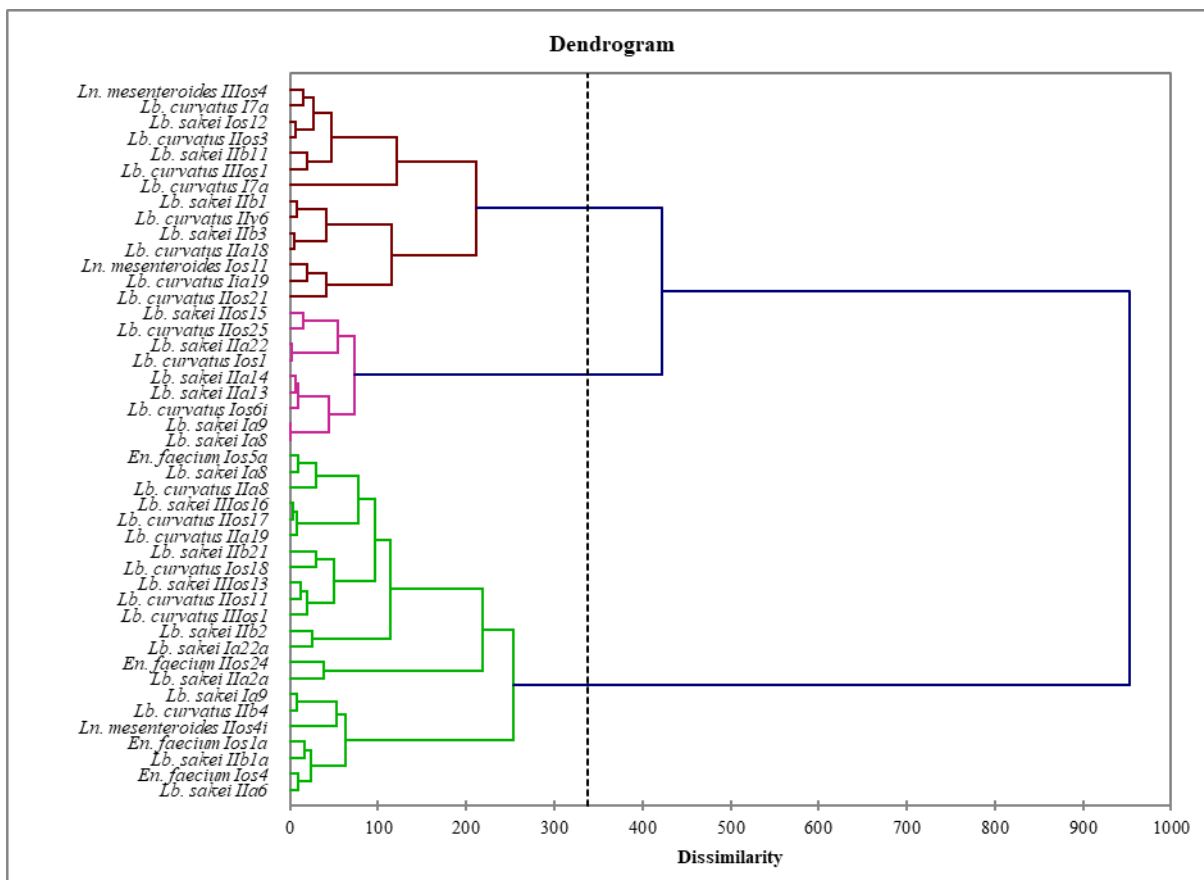
Прилог 5. Кластер анализа способности ауто-агрегације одабраних сојева



Прилог 6. Кластер анализа ко-агрегације одабраних сојева са *E.coli*



Прилог 7. Кластер анализа осетљивости изолата на антибиотике - диск-дифузни тест



Прилог 8.

Bruker MALDI Biotyper Identification Results



Run Info:

Run Identifier: 180917-1737-1011019864
Comment:
Operator: tof-user@FLEX-PC
Run Creation Date/Time: 2018-09-17T18:07:04.508
Number of Tests: 10
Type: Standard
BTS-QC: not present
BTS-QC Position:
Instrument ID: 8269944.03696
Server Version: 4.1.90 (PYTH) 116 2018-04-96_09-21-47

Result Overview

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
F1 (+++)(A)	IIb-3 (Standard)	Lactobacillus sakei	2.08	Lactobacillus sakei	2.08
F2 (+)(B)	IIa-13 (Standard)	Lactobacillus sakei	1.91	Lactobacillus sakei	1.80
F3 (+)(B)	II OS 61 (Standard)	Lactobacillus curvatus	1.75	Lactobacillus curvatus	1.73
F4 (+)(B)	II OS 21 (Standard)	Lactobacillus curvatus	1.89	Lactobacillus curvatus	1.86
F5 (+)(B)	IIa 22 (Standard)	Lactobacillus sakei	1.93	Lactobacillus sakei	1.91
F6 (+++)(A)	II6 - 1 (Standard)	Lactobacillus sakei	2.15	Lactobacillus sakei	2.12
F7 (+++)(A)	IIa 6 (Standard)	Lactobacillus sakei	2.00	Lactobacillus sakei	1.97

Result overview table—continued on next page

Прилог 9.

**Bruker MALDI Biotyper
Identification Results**



Run Info:

Run Identifier: 190516-1455-1001003432
Comment:
Operator: tof-user@FLEX-PC
Run Creation Date/Time: 2019 05-16T15:12:43.452
Number of Tests: 27
Type: Standard
BTS-QC: not present
BTS-QC Position:
Instrument ID: 8269944.03696
Server Version: 4.1.90 (PYTH) 116 2018-04-96_09-21-47

Result Overview

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second-best match)	Score Value
C1 (+++)(A)	I St 15 (Standard)	Staphylococcus equorum	2.00	Staphylococcus equorum	2.00
C2 (+++)(A)	III St 4 (Standard)	Staphylococcus xylosus	1.98	Staphylococcus xylosus	1.90
C3 (+++)(A)	VI St 1 (Standard)	Staphylococcus equorum	1.95	Staphylococcus equorum	1.91
C4 (+)(B)	IV St 9 (Standard)	Staphylococcus epidermidis	1.98	Staphylococcus epidermidis	1.96
C5 (+++)(A)	V St 10 (Standard)	Staphylococcus carnosus	1.93	Staphylococcus carnosus	1.91
C6 (-)(C)	II St 22 (Standard)	Staphylococcus xylosus	2.15	Staphylococcus xylosus	2.12
C7 (-)(C)	III St 2 (Standard)	Staphylococcus xylosus	2.10	Staphylococcus xylosus	2.00
C8 (-)(C)	I St 15 (Standard)	Staphylococcus carnosus	2.00	Staphylococcus carnosus	1.85

Result overview table--continued on next page

Прилог 10. Упитник за сензорну процену узорака сјеничке овчије стеле

Име и презиме:	Датум:	Šифра:
----------------	--------	--------

SUVOMESNATI PROIZVODI

Spoljni izgled – tipičnost oblika/forme

1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7
EKSTREMNO NEPRAVILAN LOŠ											EKSTREMNO PRAVILAN OPTIMALAN	

Homogenost boje na preseku

1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7
EKSTREMNO NEHOMOGENA LOŠA											EKSTREMNO HOMOGENA OPTIMALNA	

Intezitet boje na preseku

1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7
EKSTREMNO SVETLA						OPTIMALNA BOJA						EKSTREMNO TAMNA

Boja masnog tkiva

1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7
EKSTREMNO LOŠA											EKSTREMNO DOBRA OPTIMALNA	

Intermuskularna masnoća

1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7
PRAKTIČNO BEZ											OBILNA	

Mramoriranost

1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7
PRAKTIČNO BEZ											OBILNA	

Povezanost na preseku

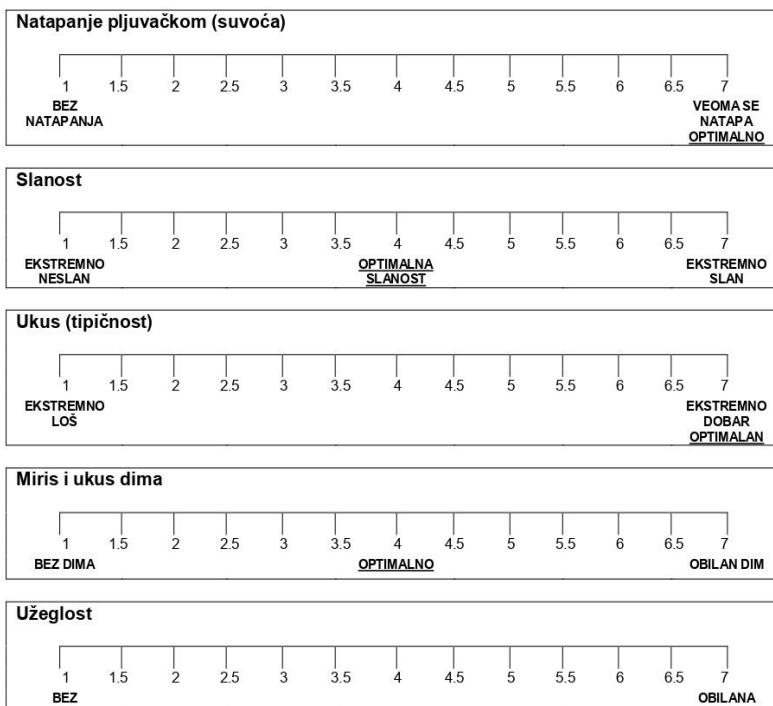
1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7
EKSTREMNA NEPOVEZANOST											POTPUNA POVEZANST OPTIMALNA	

Miris (tipičnost)

1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7
EKSTREMNO LOŠ											EKSTREMNO DOBAR OPTIMALAN	

Žvkljivost (tekstura)

1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7
EKSTREMNO NEŽVAKLJIVO											VEOMA ŽVAKLJIVO OPTIMALNA	



Quality and autochthonous microbiota of dry-cured sheep ham from western Balkans

By Tanja Žugić Petrović, Predrag Ilić, Mirijana Grujović, Vladimir Tomović, Suncica Kocić Tanackov and Ljiljana Čomić

Dry-cured sheep ham is a traditional product of Western Balkans. It is prepared by dry curing specially treated whole sheep carcasses which are smoked for a short time and spontaneously fermented in air under uncontrolled conditions. Lactic acid bacteria (LAB) play a key role in defining the quality and organoleptic characteristics of dry-cured sheep ham. The aim of this research was to investigate the chemical parameters of dry-cured sheep ham quality as well as the isolation and preliminary categorization of LAB. To this end, samples of dry-cured sheep ham were obtained from nine sheep of average age of about five years, from three households from the geographical area Sjenica (Western Serbia). Physico-chemical analysis has determined the content of water, protein, fat, mineral matter, water activity and pH values in the product. Phenotypic characterization of LAB isolated from dry-cured sheep ham was based on the general morphology of the cell, physiological tests and sugar fermentation patterns of LAB isolates. 124 isolates of LAB were preliminary identified as *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus sakei* and *Enterococcus faecium*. Chemical analysis confirmed a harmonious relationship between the quality parameters of dry-cured sheep ham.

Sheep meat has characteristic smell and taste, light red to dark red color and yellowish fat, densely compacted muscle fibers and is firmly enveloped in, not interwoven, by fat (DOS SANTOS RODRIGUES et al., 2014). Dry-cured sheep ham is produced in the territory of Bosnia and Herzegovina (B&H) and during its production process specific spices and garlic are added to give the product specific flavor for which it is famous (GANIĆ and SMAJIĆ, 2013). The former Yugoslav Republic of Macedonia has traditionally produced dry-cured sheep ham by dry salting without smoke and long air fermentation. In Croatia, dry sheep meat called kaš-tradina is produced, a product very similar to dry-cured sheep ham.

There are many factors that affect the quality of dry-cured sheep ham, and the main are proper selection of raw materials and food technology factors (ČAUŠEVIĆ et al., 1984). Dry-cured sheep ham or Sjenica (Western Serbia) sheep ham is produced in a very complex manner, and a prerequisite for the production of meat is the sanitary safety of raw materials which meet veterinary and sanitary conditions of production. Dry-cured sheep ham or Sjenica sheep ham is produced in a very complex manner, and a prerequisite for the production of meat is the sanitary safety of raw materials which meet veterinary and sanitary conditions of production. Production of dry-cured sheep ham includes several stages: selection of raw materials, salting and brining, smoking, drying and ripening, in which the product remains sustainable and receives characteristic smell, consistency, and texture (STAMENKOVIĆ and DEVIĆ, 2004).

Few authors have dealt with the research of dry-cured sheep ham to Western Balkans, so this type of product has not been explored thoroughly. The research that has been conducted focuses on the traditional production of dry-cured sheep ham from the Sjenica area, during the winter and spring seasons. Physico-chemical analysis of dry-cured sheep ham aims to define the quality of the product and to provide the missing data. Microbiota that develops during the process of fermentation of dry-cured sheep ham consists of lactic acid bacteria (LAB), and coagulase-negative staphylococci (CNS). LAB affects the acidification of the product to a level that inhibits the growth of pathogenic bacteria and allow the solubilization of proteins and gel formation by myofibrillar proteins (MPs) of sarcoplasm, degradation of proteins and lipids, and

KEYWORDS

- » Dry-cured sheep ham
- » Lactic acid bacteria
- » Preliminary categorization
- » Physicochemical parameters

dehydration (HAMMES et al., 2008). The composition of microbial populations originates from microorganisms naturally found in meat or appearing there due to the production process (ŽUGIĆ PETROVIĆ et al., 2016). The aim of this study was the isolation and identification of LAB from dry-cured sheep ham.

Materials and methods

Nine sheep of Sjeničko-peštarska Pramenka were taken from the three producers (A, B, and C) from the territory of Sjenica. On average, the animals were approximately five years old, weighing 47 to 60 kg.

Raw materials and processing

After slaughtering (at 5–10 °C), the carcasses were chilled at 4 °C for 24 h. Then the sheep carcasses were opened by longitudinal cuts in the middle of the pectoral bone and the pelvic joint, and all the bones from the inside of the carcass were removed, taking care not to disturb the outer appearance of the meat (STAMENKOVIĆ and DEVIĆ, 2006). Bones remaining on the product are the bones of the shingles and fibula (*Ovis tibia* et *Ovis fibula*), which, together with the tendons, serve as a suspension for smoking and drying. Meat from the inside of the leg (*sol*) is most often used for making dry-cured sheep ham (STAMENKOVIĆ and DEVIĆ, 2006).

Salting process is conducted by rubbing table salt in an amount of 3–3.5% and kept in containers for 5–8 days (4–7 °C, RH 80–90%). After the salting process is finished, squeezing of extra liquid and air drying are carried out. After that, dry-cured sheep ham is smoked in cold beech smoke at the temperatures of 16–18 °C, RH 65–80% for a period of 15 days. During the smoking process, it is important that the hanging carcasses do not touch each other in order to get evenly cured.

Curing of the product is carried out in the temperature range of 4–10 °C, RH 60–70%, depending on weather conditions. In order to determine physicochemical quality parameters and microbiota of dry-cured sheep ham samples from the anatomical positions on the product, ham and shoulder, were taken for the examination. The sampling method of dry-cured sheep ham was conducted according to the regulation of

The contents are protected by copyright. The distribution by unauthorized third parties is prohibited.

Arch Lebensmittelhyg 71,
146–151 (2020)
DOI 10.2376/0003-925X-71-146

© M. & H. Schaper GmbH & Co.
ISSN 0003-925X

Korrespondenzadresse:
tanja.zugicpetrovic@yahoo.com

Summary

¹⁾ Faculty of Science, University of Kragujevac, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia; ²⁾ College of Agriculture and Food Technology, Ćirila and Metodija 1, 18400 Prokuplje, Republic of Serbia; ³⁾ Faculty of Technology, University of Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1, 21 000 Novi Sad, Republic of Serbia

Probiotic potential of autochthone microbiota from dry-cured sheep ham

Probiotisches Potenzial der autochthonen Mikrobiota aus trocken gereiftem Schafschinken

Tanja Žugjić-Petrović¹⁾, Predrag Ilić²⁾, Katarina Mladenović¹⁾, Mirjana Grujović¹⁾, Sunčica Kocić-Tanackov³⁾, Ljiljana Čomić¹⁾

This study assessed the potential of probiotic characteristics of bacterial strains isolated from dry-cured sheep ham. It is one of the most common autochthonous processed meat products made in a traditional way on the Pešter plateau (Western Serbia). Isolates were identified as *Lactobacillus curvatus* (9 strains), *Lactobacillus sakei* (3 strains), and *Enterococcus faecium* (4 strains) using MALDI-TOF mass spectrophotometry. The study of probiotic characteristics of 16 dry-cured sheep ham isolates included survival rate through the gastrointestinal tract (GI), the possibility of biogenic amine synthesis, growth on medium with different concentrations of phenol, and antimicrobial activity. The results showed that in simulated gastric juice conditions, the cell number decreased after the first hour of incubation in the tested strains of *Lb. curvatus*, *Lb. sakei* and *En. faecium* except in the case of *Lb. curvatus* Ilos19 where the number of cells remained approximately the same. After the second hour of incubation, the number of cells generally remained at the level of the first hour except in the case of the following isolates: *Lb. sakei* Ios12, *Lb. curvatus* Ilos18 and *En. faecium* Ilos24, where an increase in the number of cells was noticed after the second hour of incubation.

In simulated small intestine conditions, an increase in the number of vital cells after 4 and 6 hours of incubation was observed in the isolates *Lb. curvatus* Ilos4, *Lb. sakei* (Ios12, Ilos13), and *En. faecium* Ios1a. Synthesis of biogenic amines was not observed in investigated lactobacilli and enterococci. Analyzed isolates exhibited growth on media with 0.1% and 0.2% phenol, while 5 isolates exhibited decarboxylase activity. Six *Lactobacillus* strains, *Lb. curvatus* (Ilos6, Ilos17, and Ilos1), *Lb. sakei* (Ilos16, Ios12, and Ilos13) and *En. faecium* Ios4 inhibited the growth of tested pathogens, including *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Bacillus cereus* ATCC 14579.

Keywords: Lactic acid bacteria (LAB), probiotic properties, simulated gastric juice conditions, bile salt tolerance

PROBIOTIC POTENTIAL OF *LACTOBACILLUS* AND *LEUCONOSTOC* STRAINS ISOLATED FROM TRADITIONAL SPONTANEOUSLY FERMENTED SHEEP HAM

T.Ž.Petrović^{1*}, P.Ilić¹, K.Mladenović², M.Djilas³, S.K.Tanackov⁴ and L.Čomic²

¹College of Agriculture and Food Technology, Department of Food Science and Technology, Ćirila and Metodija 1, 18400 Prokuplje, Serbia;

²University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, Radoja Domanovića 12, 3400 Kragujevac, Serbia;

³Institute for Public Health of Vojvodina, Novi Sad, Serbia;

⁴University of Novi Sad, Faculty of Technology, Department of Food Preservation Engineering, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia

*Corresponding author's email: tanja.zugicpetrovic@yahoo.com

ABSTRACT

This paper examined the probiotic characteristics of 29 lactic acid bacteria isolated from traditional sheep ham. The research included isolation and identification of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* strains. *In vitro* tests related to their probiotic potential included auto-aggregation and co-aggregation, antibiotic resistance, and hemolysis tests. Auto-aggregation values of the tested strains ranged from 24.5 to 68.1%, co-aggregation values of *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, and ATCC strain of *Escherichia coli* ranged from 22.5 to 65.5% after four hours. The isolates showed a significant difference in the hydrophobic ability of the tested hydrocarbons, n-hexadecane, xylene, and chloroform, ranging from 5.25% to 80.9%. All of the isolates have shown high sensitivity to most analyzed antibiotics, while *Lactobacillus* and *Leuconostoc* strains had no positive hemolysis. The zone of inhibition against all tested pathogens was demonstrated by 55.1% of strains. The most significant inhibition zones were exhibited against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Bacillus cereus* ATCC 14579, while 31.03% of strains did not show a zone of inhibition towards *Listeria monocytogenes* ATCC 19115.

Keywords: Lactic acid bacteria, sheep ham, probiotic potential.

Published first online October 20, 2021

Published final May 30, 2022.

INTRODUCTION

The area of western Balkans is characterized by a large number of autochthonous spontaneously fermented dry-cured meat products. One of these products is dry-cured sheep ham which is produced using a complex production method. Salted and dried sheep meat without bones is called Stelja (Stojković *et al.*, 2015). Fattened male castrates and barren ewes of autochthonous animal species Sjeničko-Pešterska pramenka are used in the production of dry-cured sheep ham from the Pešter plateau (Western Serbia). During the ripening period, which lasts at least 5 to 6 months, dry-cured sheep meat develops unique microbiota that directly defines the quality of the product and its organoleptic characteristics. The dominant population of dry-cured sheep ham consists of lactic acid bacteria (LAB) that control the entire flow of fermentation and ripening of the product. By synthesizing antimicrobial components, volatile fatty acids, and chemically modifying bile acids, LAB also create an unfavorable local environment to pathogens, known as "colonization resistance" (Radulović *et al.*, 2012; Wan *et al.*, 2015). The new concept of functional food defines the need to choose LAB strains from indigenous microbiota of traditional products, including fermented meat, based

on the most important technological criteria. Another important factor is suitable probiotic properties necessary to obtain strains that are well adapted to the microenvironment and can dominate the microbiota of fermented meat products (Papamanoli *et al.*, 2002). Probiotics in fermented meat products are protected by a layer of fat and meat particles against unfavorable conditions of the human gastrointestinal (GI) tract, and thus in such an environment, they can better exhibit their positive probiotic characteristics (Palamutoğlu and Kasnak, 2014). Defining strains as potential probiotics is complex as they must meet a great number of conditions to be safe for human consumption. Probiotic strains must have the status of "generally recognized as safe" (GRAS) or "qualified presumption of safety" (QPS). They cannot demonstrate pathogenic properties or cause infectious GI tract disorders and not dissolve bile salts, and have good adherence to the intestinal mucosa (Mitropoulou *et al.*, 2013). This study's aims were isolation and identification of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* genera isolated from dry-cured sheep ham, as well as the evaluation of their probiotic characteristics through adhesion, aggregation, hemolysis on blood agar plates, antimicrobial activity and antibiotic resistance ability of the isolated bacteria.

Биографија са библиографијом



Мр Тања Жугић-Петровић је рођена 12.07.1976. године у Нишу, основну школу је завршила у Малошишту, а средњу Пољопривредну школу у Лесковцу. Дипломирала је 1999. године на Високој пољопривредно-прехрамбеној школи струковних студија у Прокупљу, у новембру 2002. године је дипломирала на Природно-математичком факултету на катедри за Хемију, Универзитета у Приштини са оценом 10 на дипломском раду. Магистарске студије је уписала на Технолошком факултету у Лесковцу, Универзитет у Нишу, где је све испите предвиђене програмом положила са просечном оценом 10. Магистарску тезу под називом **"Промена популације бактерија млечне киселине у току сукцесивне ферментације киселог теста"**, одбранила је 2012. године и тиме стекла звање Магистра техничких наука.

Докторске студије је уписала школске 2015/16. године на Природно-математичком факултету Универзитета у Крагујевцу на Институту за Биологију и екологију. Све испите на докторским студијама је положила просечном оценом 10.

Мр Тања Жугић-Петровић се интензивно и успешно бави научно-истраживачким радом при чему је стекла знања и вештине у области микробиологије и микробиологије хране. У току свог рада бавила се изоловањем и идентификацијом аутохтоне микробиоте сјеничке овчије стеље, биохемијским и физиолошким карактеристикама бактерија млечне киселине, коагулаза-негативних стафилокока и плесни. *In vitro* испитивањем биотичких потенцијала изолованих бактерија и испитивањем пробитоских карактеристика одабраних сојева.

Преглед научно-истраживачких резултата

Резултати научно-истраживачког рада кандидата мр Тање Жугић-Петровић публиковани су у виду 43 библиографске јединице: 13 радова у научним часописима са SCI листе (M21 - 1 рад, M22 - 3 рада, M23 - 9 радова), седам радова у националним часописима (M51 - 5 радова, M52 - 2 рада), седам саопштења на међународним скуповима штампана у целини (M33 - 7), шест саопштења на међународним скуповима штампана у изводу (M34 - 6), три саопштења на домаћим скуповима штампаних у целини (M63 - 3), шест саопштења на домаћим научним скуповима штампана у изводу (M64 - 6), и магистарска теза (M72 - 1).

Резултати докторске дисертације публиковани су у виду 7 библиографских јединица, и то: два рада у међународним научним часописима са SCI листе (M23 - 2 рада), два рада у врхунском часопису националног значаја (M51 - 2), два саопштења на међународном скупу штампана у изводу (M34 - 2), једно саопштење са скупа националног значаја штампано у целини (M63 - 1).

Списак публикованих библиографских резултата из докторске дисертације кандидата:

Рад у међународном научном часопису (M23)

1. **Tanja Žugić Petrović**, Predrag Ilić, Katarina Mladenović, Mirjana Grujović, Suncica Kocić Tanackov, Ljiljana Čomić. 2020. Probiotic potential of autochthone microbiota from dry-cured sheep ham. *Journal of Food Safety and Food Quality* 71, Heft 6 (138):146-151. <https://doi.org/10.2376/0003-925X-71-146>
2. **Tanja Žugić Petrović**, Predrag Ilić, Katarina Mladenović, Milan Djilas, Sunčica Kocić-Tanackov, Ljiljana Čomić. 2022. Probiotic potential of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* strains isolated from traditional spontaneously fermented sheep ham. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 32 (3):861- 869. <http://doi.org/10.36899/JAPS.2022.3.0487>

Рад у водећем часопису националног значаја (M51)

3. **Žugić Petrović T**, Stanisavljević D, Ilić P, Mladenović K, Muruzović Kocić Tanackov S, Čomić Lj. 2018. Effect of water activity on the radial growth of fungi isolated from dry-cured sheep ham, *in vitro*. *Matica Srpska Journal for Natural Sciences*, 134, 65-75. DOI: 10.2298/zmspn1834065z
4. **Tanja Žugić Petrović**, Predrag Ilić, Mirijana Grujović, Vladimir Tomović, Suncica Kocić Tanackov and Ljiljana Čomić. 2019. Quality and autochthonous microbiota of dry-cured sheep ham from western Balkans. *Fleischwirtschaft International*, 4 (19): 66-69.

Саопштења на међународним скуповима штампана у изводу (M34)

5. **Žugić Petrović T**, Stanisavljević D, Ilić P, Mladenović K, Muruzović M, Kocić-Tanackov S, Čomić Lj. 2017. Effect of water activity on the radial growth of fungi isolated from dry-cured sheep ham, *in vitro*. The 6th international scientific meeting „Mycology, Mycotoxicology, and Mycoses” Matica Srpska, Novi Sad, Serbia, Book of abstracts, p. 62. ISBN: 978-86-7946-194-0
6. **Tanja Žugić-Petrović**, Zorana Žugić, Mirjana Grujović, Katarina Mladenović, Sunčica Kocić-Tanackov. 2022. Mold contamination in small-scale facilities during the production of traditional dry-cured sheep ham. 7th International Scientific Meeting: „Mycology, Mycotoxicology, and Mycoses” Matica Srpska, Novi Sad, Serbia, Book of abstracts, p. 15. ISBN 978-86-7946-387-6

Саопштења на домаћим научним скуповима штампана у целини (категорија M63)

7. **Žugic-Petrović T**, Ilić P, Muruzović M, Mladenović K, Čomić Lj. 2018. Autohtona mikrobiota sjeničke ovčije stelje. XXIII Savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, Čačak, Zbornik radova, 536–543. ISBN: 978-86-87611-48-1

Преглед осталих научно-истраживачких резултата кандидата

Рад у врхунском међународном научном часопису (M21)

1. Mirjana Grujović, **Tanja D. Žugić Petrović**, Katarina G. Mladenović, Vladimir M. Tomović, Sunčica D. Kocić-Tanackov, Teresa Semedo-Lemsaddek. 2022. Duvan chvarci: Product characterization and comparison between traditional and industrial production. *LWT - Food Science and Technology*, 154, 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112895>

Рад у истакнутом међународном научном часопису (M22)

2. Muruzović M, Mladenović K, **Žugić Petrović T**, Čomić Lj. 2018. Characterization of lactic acid bacteria isolated from traditionally made Serbian cheese and evaluation of their antagonistic potential against Enterobacteriaceae. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42, 4. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13577>
3. Mladenović K, Muruzović M, **Žugić Petrović T**, Stefanović O, Čomić Lj. 2018. Isolation and identification of Enterobacteriaceae from traditional Serbian cheese and their physiological characteristics. *Journal of Food Safety*, 38 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1111/jfs.12387>
4. **Tanja D. Žugić Petrović**, Predrag D. Ilić, Mirjana Z. Grujović, Katarina G. Mladenović, Sunčica D. Kocić-Tanackov, Ljiljana R. Čomic. 2020. Assessment of safety aspect and probiotic potential of autochthonous *Enterococcus faecium* strains isolated from spontaneous fermented sausage. *Biotechnology Letters*, 1513-1525 <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02874-5>

Рад у међународном научном часопису (M23)

5. **Tanja Žugić Petrović**, Predrag Ilić, Mirjana Muruzović, Katarina Mladenović, Dragana Stanisavljević, Ljiljana Čomić. 2018. Dry-fermented sausage as probiotic carrier food. *Fleischwirtschaft* 19(2):100-104.
6. Muruzović M, Mladenović K, **Žugić Petrović T**, Čomić Lj. 2018. In vitro evaluation of the antimicrobial potential of *Streptococcus uberis* isolated from a local cheese from Southeastern Serbia. *Veterinarski arhiv*, 88 (4): 521-534. <https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.0007>
7. Mladenović K, Muruzović M, **Žugić Petrović T**, Stefanović O, Čomić Lj. 2018. Isolation and identification of Enterobacteriaceae from traditional Serbian cheese and their physiological characteristics. *Journal of Food Safety*, 38, 1: 1–9.
8. Mladenović K, Muruzović M, Stefanović O, **Žugić Petrović T**, Čomić Lj. 2018. Effects of some potassium preservatives on physiological activities of selected food borne bacteria. *Acta Alimentaria*, 47 (2): 171–180.
9. Grujović M, Mladenović K, **Žugić Petrović T**, Čomić Lj. 2019. Assessment of the antagonistic potential and ability of biofilm formation of *Enterococcus* spp. isolated from Serbian cheese. *Veterinarski arhiv*, 89 (5), 653–667.

10. **Tanja Žugić Petrović**, Predrag Ilić, Mirjana Grujović, Katarina Mladenović, Ljiljana Čomić. 2021. *Lactobacillus curvatus* from fermented sausages as new probiotic functional foods. *Food Science and Technology*, 1-9. <https://doi.org/10.1590/fst.17121>.
11. Saša Milosavljević, **Tanja Žugić Petrović**, Katarina Mladenović, Mirjana Grujović, Stefan Kolašinac, Dragan Orović. 2021. Quality assessment, antimicrobial activity organic sunflower honey and use of Maldi-tof mass spectrometry for the identification bacteria isolated from honey. *Progress in Nutrition*, 23(2): 1-9. <https://doi.org/10.23751/pn.v23i2.9307>.

Рад у водећем часопису националног значаја (M51)

1. **Žugić-Petrović T.**, Joković N., Savić D. 2009. The evolution of lactic acid bacteria community during the development of mature sourdough. *Acta periodica technologica*, 40, 111-122.
2. Muruzović M, Mladenović K, Stefanović O, **Žugić-Petrović T.**, Čomić Lj. 2017. *In vitro* interaction between *Agrimonia eupatoria* L. extracts and antibiotic. *Kragujevac Journal of Science*, 39: 169-176.
3. Mladenović K, Muruzović M, **Žugić Petrović T.**, Čomić Lj. 2018. The influence of environmental factors on the planktonic growth and biofilm formation of *Escherichia coli*. *Kragujevac Journal of Science*, 40: 205-216.

Рад у часопису националног значаја (M52)

1. **Žugić-Petrović T.**, Muruzović M, Mladenović K, Ilić P, Kocić Tanackov S, Čomić Lj. 2016. Karakterizacija koagulaza negativnih stafilocoka izolovanih iz suvog mesa ovčijeg trupa-Sjenička ovčija stelja. *Veterinarski žurnal Republike Srpske*, 16 (1): 26–38.
2. Muruzović M, Mladenović K, Stefanović O, **Žugić-Petrović T.**, Čomić Lj. 2017. *In vitro* interaction between *Agrimonia eupatoria* L. extracts and antibiotic. *Kragujevac Journal of Science*, 39: 169-176. DOI: 10.5937/kgjsci1739157m ISSN: 1450-9636

Саопштење са међународног скупа штампано у целини (M33)

1. **Žugić-Petrović T.**, Joković N., Savić D. Lactic acid bacteria of mature sourdough. I International Congress "Food technology, quality and safety" Novi Sad, 13-15.11.2007., Zbornik radova: 24-28.
2. Stanisavljević D., **Žugic-Petrović T.**, Veličković D., Miljojković V., Šošević D., Ilić P. 2017. Influence of packagink materijal on dry cured sheep ham sustainability. XXII International symposium in the field of pulp, paper, packagink and graphics. *Proceedings*, 79–85.
3. **Tanja Žugić Petrović**, Dragana Stanisavljević, Predrag Ilić, Katarina Mladenović, Mirjana Muruzović, Ljiljana Čomić. 2018. Effect of different packagink conditions on shelf-life of ham. XXII International eco – conference X Safe food, *Proceedings* 181–188.
4. Dragana Stanisavljević, **Tanja Žugić Petrović**, Predrag Ilić, Violeta Mickovski Stefanović, Dejan Davidović. 2018. Biologically active components in brandy and their effect on human health. XXII International eco – conference X Safe food, *Proceedings* 196–203.

5. Sonja D. Petrović, **Tanja D. Žugić Petrović**. Effect of the internet and other mass media on leisure time of secondary school students. 2018. Science Beyond Boundaries International academic conference Faculty of Philosophy, University of Priština with temporary head office in Kosovska Mitrovica, Proceedings 1–14.
6. **Tanja Žugić-Petrović**, Katarina Mladenović, Mirjana Muruzović, Zorana Žugić, Sunčica Kocić-Tanackov, Vladimir Tomović, Ljiljana Čomić. 2020. Effects of Vacuum and Map packaging on microbiological status and sensory properties of fresh pork. XXIV International eco – conference XI Safe food.
7. Sonja Petrović, **Tanja Žugić Petrović**. 2021. The role of media in young peoples free time. Thematic Collected Papers from the International Interdisciplinary Scientific Conference: „HORIZONS“ Proceedings, 356–363.

Саопштења на међународним скуповима штампана у изводу (М34)

1. **Žugic-Petrović T**, Muruzović M, Mladenović K, Čomić Lj. 2017. Probiotic potential of *Enterococcus faecium* isolated from sokobanja sausage. Internatiol symposium on animal science (ISAS), Book of abstracts, 30.
2. Stanisavljević D., **Žugić-Petrović T.**, Veličković D., Miljojković V., Šošević D., Ilić P. 2017. Influence of packaging material on prosciutto sustainability. Internatiol symposium on animal science (ISAS), Book of abstracts, 31.
3. Mirjana Grujović, Katarina Mladenović, **Tanja Žugić Petrović**. 2020. Microbiological safety and identification of dominant mikrobiota from “Duvan čvarci“. IV SYMPOSIUM OF BIOLOGISTS AND ECOLOGISTS OF REPUBLIC OF SRPSKA with international participation – SBERS2020, Book of abstracts.
4. Sonja D. Petrović, **Tanja D. Žugić Petrović**. 2021. The impact of social networks on a young person's life. 12th International Conference, Burgas, Bulgaria, Book of abstracts.
5. Stefan Kolašinac, Jelena Otašević, **Tanja Žugić-Petrović**, Zorana Žugić. 2022. The impact of oregano and cinnamon essential oils on the growth rate of *Aspergillus niger* strains was evaluated. 7th International Scientific Meeting: „Mycology, Mycotoxicology, and Mycoses” Matica Srpska, Novi Sad, Serbia, Book of abstracts, 14.

Саопштења на националним научним скуповима штампана у целини (категорија М63)

1. Ilić P, Šošević D, **Žugic Petrović T**, Mladenovic K, Grujović M, Čomić Lj. 2017. Characterization and antibiotic sensitivity of coagulase-negative staphylococci from Zlatibor prosciutto. XXII Conference about Biotechnology with international participation, Čačak, Serbia, Conference Proceeding, Vol. 2, p. 667–672. ISBN: 978-86-87611-48-1
2. **Žugic Petrović T**, Ilić P, Muruzović M, Mladenović K, Čomić Lj. 2018. Autochthone microbiota from dry-cured sheep ham. XXIII Conference about Biotechnology with international participation, Čačak, Serbia, Conference Proceeding, p. 536–543. ISBN: 978-86-87611-48-1
3. **Žugic Petrović T**, Muruzović M, Mladenović K, Stanisavljević D, Kocić-Tanackov S, Čomić Lj. 2019. Antifungalni efekat etarskog ulja bosiljka i crnog kima na rast plesni *Penicillium corylophilum* na ovčijoj stelji. XXIV Conference about Biotechnology with international participation, Čačak, Serbia, Conference Proceeding, p. 536–543. ISBN: 978-86-87611-48-1

Саопштења на домаћим научним скуповима штампана у изводу (категорија М64)

1. Савић Д., Јоковић Н., Цветковић Д., **Петровић Т.** Промена микробне популације у току формирања зрелог киселог теста типа I. VII. Симпозијум са меународним учешћем "Савремене технологије и привредни развој", Лесковац, 19-20.10.2007.g. Књига апстраката, 56.
2. Muruzović M, Mladenović K, Stefanović O, Čomić Lj, **Žugić-Petrović T.** 2016. Interaction between *Agrimonia eupatoria* L. extracts and antibiotic and antibiofilm activity of two extracts. 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kopaonik, Serbia. Book of abstracts, 117.
3. Mladenović K, Muruzović M, Stefanović O, Čomić Lj, **Žugić-Petrović T.** 2016 *In vitro* determination of antioxidant and antimicrobial activity of extracts of *Agrimonia eupatoria* L. 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kopaonik, Serbia. Book of abstracts, 116.
4. **Žugić-Petrović T.**, Ilić P, Muruzović M, Mladenović K, Stanisavljević D, Čomić Lj. 2016. Antimicrobial activity of rakija travarica "Sante". 12th Symposium on the Flora of Southeastern Serbia and Neighboring Regions, Kopaonik, Serbia, Book of abstracts, 118.
5. **Žugić-Petrović T.**, Mladenović K, Muruzović M, Čomić Lj. 2017. Probiotic potential of *Enterococcus faecium* isolated from sokobanja sausage. International symposium on animal science (ISAS), Herceg Novi, Montenegro. Book of abstracts, 30.
6. Mladenović K, Muruzović M, **Žugić-Petrović T.**, Stefanović O, Čomić Lj. 2017. Isolation and identification of autochthonous Sokobanja's cheese microbiota. XI Kongres mikrobiologa Srbije - MIKROMED 2017, Beograd, Srbija, Knjiga apstrakata, 203.

Одбрањена магистарска теза (М72=3)

- **Жугић-Петровић Тања.** (2012). Промена популације бактерија млечне киселине у току сукцесивне ферментације киселог теста. Технолошки факултет у Лесковцу, Универзитет у Нишу.

Образац 1

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Микробиота аутохтоног ферментисаног производа сјеничка овчија стеља

представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу, 12.07.2022. године,


потпис аутора

Образац 2

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСЛОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

Микробиота аутохтоног ферментисаног производа сјеничка овчија стеља

исловетне.

У Крагујевцу, 12.07.2022. године,


потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, **Тања Жугић-Петровић**,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Микробиота аутохтоног ферментисаног производа сјеничка овчија стеља

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајнодоступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹


припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално

¹Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У Крагујевцу, 12.07.2022. године,



попис аутора

²Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од понуђених лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: [http://creativecommons.org/rs/](http://creativecommons.org.rs/)