



УНИВЕРЗИТЕТ У НИШУ  
ТЕХНОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ У ЛЕСКОВЦУ



**Мр Небојша П. Милосављевић**

**БАКТЕРИЈЕ МЛЕЧНЕ КИСЕЛИНЕ  
ПИРОТСКОГ КАЧКАВАЉА**

докторска дисертација

Лесковац, 2015.



UNIVERSITY OF NIŠ  
FACULTY OF TECHNOLOGY



**Nebojša P. Milosavljević, MSc.**

**LACTIC ACID BACTERIA IN  
“PIROT’S KACHKAVAL”**

Doctoral Dissertation

Leskovac, 2015.

Чланови Комисије за одбрану и оцену и одбрану докторске дисертације:

Председник Комисије: Проф. др Предраг Пуђа,  
Универзитет у Београду,  
Пољопривредни факултет у Земуну

Ментор: Проф. др Драгиша Савић,  
Универзитет у Нишу,  
Технолошки факултет у Лесковцу

Члан: др Бојана Даниловић, доцент,  
Универзитет у Нишу,  
Технолошки факултет у Лесковцу

Датум одбране \_\_\_\_\_

*Експериментални део ове докторске дисертације је рађен у лабораторијама Технолошког факултета у Лесковцу, Високе пољопривредно-прехрамбене школе струковних студија у Прокупљу, Департману за хемију Природно-математичког факултета у Нишу и Институту за генетику и генетичко инжењерство у Београду.*

*Овом приликом се захваљујем проф. др Драгиши Савићу, свом ментору, на несебичној помоћи током израде ове дисертације. Професорови савети, људска и стручна помоћ, као и дискусије које смо водили о резултатима експеримената и начинима за превазилажење свих тешкоћа у раду, били су од великог значаја за израду и писање ове дисертације.*

*Велику захвалност дугујем доц. др Бојани Даниловић на помоћи, времену, труду, саветима и сугестијама које су биле неопходне за финално обликовање ове тезе.*

*Такође, захваљујем се доц. др Наташи Јоковић на великој помоћи и саветима током извођења експерименталног дела рада.*

*Посебну захвалност дугујем проф. др Предрагу Пући на критичкој оцени и саветима који су били битни за финално обликовање тезе.*

***Ову тезу посвећујем ћерки Николети.***

## Бактерије млечне киселине Пиротског качкаваља

### РЕЗИМЕ

Пиротски качкаваљ је врста сира која се производи традиционалним поступком на територији општине Пирот и ближој околини. Припада групи сирева пареног теста и производи се од крављега, овчијега или мешавине крављега и овчијега млека.

У циљу утврђивања промене микробиоте бактерија млечне киселине током 60 дана зрења Пиротског качкаваља анализирано је 5 узорака овчијега и 5 узорака крављега качкаваља. Изоловано је укупно је 315 изолата бактерија млечне киселине који су у циљу прелиминарне идентификације и груписања окарактерисани применом физиолошких тестова и FTIR анализе. Представници сваке, на овај начин добијене групе идентификовани су применом молекуларних метода и подвргнути технолошкој карактеризацији. У узорцима качкаваља током првих 30 дана зрења одређен је садржај органских киселина и испарљивих једињења.

Из узорака овчијега качкаваља изоловане су и идентификоване врсте *Streptococcus macedonicus*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei/ rhamnosus*, *Lactobacillus casei* и *Lactobacillus paracasei*, док су у узорцима крављега качкаваља идентификоване врсте *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* и *Lactobacillus casei*. У анализираним узорцима Пиротског качкаваља утврђено је присуство млечне (најзаступљенија у свим узорцима), јабучне, лимунске, сирћетне киселине, док је пирогрожђана киселина детектована у траговима. Детектована испарљива једињења у испитиваним узорцима качкаваља припадају монокарбонским киселинама, алкохолима, кетонима, алдехидима, терпенима и угљоводоницима. Киселине и кетони представљају групе једињења које су највише заступљене, док су естри најбројнија група једињења у узорцима качкаваља. Способност коришћења цитрата показало је 40% изолата, диацетил је продуковало 32%. Такође, 12% изолата је имало способност синтезе егзополисахарида, док је код 7% изолата БМК уочена бактериоцинска активност према тест микроорганизмима *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMNI-596, *Lc. lactis* subsp. *lactis* NP-45 и патогеним сојевима *Listeria* sp. и *Listeria monocytogenes*.

**Кључне речи:** Пиротски качкаваљ, бактерије млечне киселине, молекуларна идентификација, технолошка карактеризација, бактериоцинска активност

**Научна област:** Технолошко инжењерство

**Ужа научна област:** Прехрамбене технологије и биотехнологија

**УДК број:** 667.33:663.18

## Lactic acid bacteria in “Pirot`s kachkaval”

### ABSTRACT

”Pirot`s kachkaval” is a traditional cheese produced only on the territory of Piroto municipality. It belongs to the pasta filata cheeses and can be made of cow`s, ewe`s or the mixture of these milks.

In order to determine the changes in the lactic acid bacteria microbiota during 60 days of the ripening of the ”Piroto`s kachkaval” 5 samples of cow`s milk kachkaval and 5 samples of ewe`s milk kachkaval were analyzed. A total number of 315 LAB strains were isolated and subjected to physiology tests and FTIR analysis for preliminary characterization and grouping. Representatives of each group were identified by the use of molecular methods. Same strains were subjected to technological characterization. Additionally, samples of the kachkaval up to 30 days of ripening were investigated for the concentration of organic acids and volatile compounds.

The lactic acid bacteria strains isolated from ewe`s milk kachkaval belong to the species *Streptococcus macedonicus*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei/ rhamnosus*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus paracasei*, while strains isolated from cow`s milk kachkaval belong to the species *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei*. The presence of lactic (in the highest concentration), malic, citric and acetic acid was confirmed. Also, pyruvic acid was detected in traces. Volatile compounds detected in the samples of kachkaval belonged to monocarboxylic acids, alcohols, ketones, aldehydes, terpenes and hydrocarbons. Acids and ketones were the most abundant, while esters were the most numerous group. Technological characterization of the isolates indicated that 40% of the isolates can use citrates and 32% can produce diacetyl. Also, 12% of the isolates produce exopolysaccharides and 7% produced bacteriocines which were active against used test microorganisms *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMNI-596, *Lc. lactis* subsp. *lactis* NP-45 and pathogenic *Listeria* sp. and *Listeria monocytogenes*.

**Keywords:** ”Piroto`s kachkaval”, lactic acid bacteria, molecular identification, technological characterization, bacteriocin activity.

**Scientific field:** Technical Engineering

**Specific topic:** Food Technology and Biotechnology

**UDC number:** 667.33:663.18

## САДРЖАЈ

<b>1. УВОД</b> .....	1
<b>2. ЛИТЕРАТУРНИ ДЕО</b> .....	3
<b>2.1. Историјат производње качкаваља</b> .....	3
<b>2.2. Карактеристике аутохтоне производње Пиротског качкаваља</b> .....	6
<b>2.3. Микробиота качкаваља</b> .....	9
<b>2.4. Бактерије млечне киселине</b> .....	10
2.4.1. Класификација БМК .....	12
2.4.2. Најзначајнији родови БМК у индустрији млека и млечних производа .....	12
2.4.3. Технолошка својства БМК .....	23
2.4.4. Синтеза бактериоцина .....	25
<b>2.5. Хемијске промене током производње и зрења сирева</b> .....	27
2.5.1. Гликолиза .....	31
2.5.2. Липолиза .....	33
2.5.3. Протеолиза .....	35
2.5.4. Лакоиспарљиве компоненте у сиревима .....	38
<b>2.6. Методе за идентификацију БМК</b> .....	39
2.6.1. Фенотипске методе .....	39
2.6.2. Молекуларне методе .....	40
2.6.3. Фуријеова трансформациона инфрацрвена спектроскопија .....	42
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b> .....	45
<b>3.1. Материјал</b> .....	45
3.1.1. Узорци качкаваља .....	45
3.1.2. Медијуми за гајење микроорганизама .....	46
<b>3.2. Методе</b> .....	46
3.2.1. Изолација и одређивање броја БМК.....	46
3.2.2. Фенотипска карактеризација БМК изолата .....	47
3.2.3. FTIR спектроскопска анализа изолата БМК.....	48
3.2.4. Молекуларна идентификација изолата .....	49
3.2.5. Хемијске анализе.....	50
3.2.6. Технолошка и антимикробна карактеризација селектованих изолата БМК .....	51
<b>3.3. Статистичка анализа</b> .....	52

<b>4. РЕЗУЛТАТИ</b> .....	53
<b>4.1. Пиротски качкаваљ израђен од овчијег млека</b> .....	53
4.1.1. Одређивање броја мезофилних и термофилних бактерија .....	53
4.1.2. Идентификација изолата БМК из овчијег качкаваља .....	54
4.1.3. Промена микробиоте током зрења Пиротског качкаваља израђеног од овчијег млека .....	58
4.1.4. Хемијска анализа узорака качкаваља израђеног од овчијег млека .....	59
4.1.5. Хемијска анализа лакоиспарљивих компоненти Пиротског качкаваља израђеног од овчијег млека .....	59
<b>4.2. Пиротски качкаваљ израђен од крављег млека</b> .....	63
4.2.1. Одређивање броја мезофилних и термофилних бактерија током зрења Пиротског качкаваља израђеног од крављег млека .....	63
4.2.2. Идентификација изолата БМК из крављег качкаваља .....	65
4.2.3. Промена микробиоте током зрења Пиротског качкаваља израђеног од крављег млека .....	68
4.2.4. Хемијска анализа узорака качкаваља израђеног од крављег млека .....	69
4.2.5. Хемијска анализа лакоиспарљивих компоненти Пиротског качкаваља израђеног од крављег млека .....	69
<b>4.3. Технолошке карактеристике изолата БМК</b> .....	73
<b>4.4. Синтеза бактериоцина</b> .....	75
<b>5. ДИСКУСИЈА</b> .....	77
<b>5.1. Микробиота Пиротског качкаваља</b> .....	78
<b>5.2 Хемијски састав качкаваља</b> .....	86
<b>5.3 Технолошке карактеристике изолата БМК</b> .....	94
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ</b> .....	96
<b>7. ЛИТЕРАТУРА</b> .....	98
<b>БИОГРАФИЈА</b> .....	127



## 1. УВОД

Производња сира спада у један од најстаријих начина прераде млека. Сматра се да је настала на подручју некадашње Асирије пре 7000 - 8000 година. Данас на тржишту постоји више од хиљаду врста сирева. Ова разноврсност условљена је различитим аспектима производње сирева, али и географским пореклом и културним наслеђем.

Процес производње сира заснива се на променама које су условљене узајамном повезаношћу хемијских промена и микробиолошке активности. Микробиота присутна у сиревима може потицати из самих сировина или бити додата у виду стартера. Примарну улогу током производње сира имају бактерије млечне киселине (БМК) које, пре свега, врше ферментацију лактозе и протеолитичку разградњу казеина млека. Поред тога, услед сложеног метаболизма, БМК синетишу једињења која утичу на формирање специфичне ароме, текстуре и квалитета ферментисаних производа.

Пиротски качкаваљ је карактеристичан за просторе Источне Србије и производи се од крављег, овчијег или мешавине крављег и овчијег млека. Пиротски качкаваљ припада групи сирева пареног теста која се карактерише специфичном глатком и делимично лиснатом структуром, а у стручној литератури се назива “*pasta filata*” (итал. “упредено тесто”), “*r te fil *” (франц. “упредено тесто”) или “*plastic curd*” (енгл. “пластични груш”). Основна карактеристика производње Пиротског качкаваља је производња од непастеризованог млека и без додатка стартер култура, услед чега се ферментација и биохемијски процеси током зрења сира одвијају под утицајем аутохтоне микробиоте.

Сиреви произведени на традиционалан начин, без додатка стартера, представљају богат природни извор различитих врста и сојева БМК. Познато је, такође, да се током периода зрења мењају састав, и однос врста ових микроорганизама. Селекцијом природних изолата могу се издвојити врсте које поседују жељене карактеристике и применити као стартер културе у циљу стандардизације и побољшања квалитета традиционалних производа.

Основни циљ овог рада је праћење промене популације БМК у току зрења Пиротског качкаваља произведеног од овчијег и крављег млека. Поред тога, овај рад има следеће циљеве:

- одређивање броја БМК и укупног броја мезофилних бактерија у току зрења Пиротског качкаваља,
- изоловање БМК из узорак Пиротског качкаваља,
- груписање и прелиминарна идентификација изолата на основу фенотипске карактеризације и FTIR спектроскопије,
- молекуларна идентификација представника сваке групе изолата до нивоа врсте,
- одређивање промене садржаја лакоиспарљивих компоненти значајних за сензорна својства производа и
- технолошка карактеризација одређених изолата БМК и одређивање сојева са потенцијалном применом у стартер културама за производњу Пиротског качкаваља.

## 2. ЛИТЕРАТУРНИ ДЕО

### 2.1. Историјат производње качкаваља

Према историјским подацима (Пејић, 1956), претпоставља се да је производња качкаваља донета на Балканско полуострво од номадских племена са истока. Технологија прављења сира се, углавном, проширила на Балканско полуострво и Италију, као и јужне регионе Русије, Украјине, Турску, Алжир, Тунис, Египат и Мароко, дакле на регионе са топлем и сувом климом, брдовитим рељефом и развијеним овчарством (Мијачевић и сар., 2005а, б, Morea *et al.*, 2007, Шутић, 1964, Пејић, 1956).

Назив качкаваљ (итал: casiocavallo, сицилиански: casiuscavaddu) потиче од специфичног облика и буквално преведено значи "сир на коњу" (итал. casio-сир, cavallo-коњ). Верује се да је први сир тог типа направљен од кобиљег млека, иако нема историјских доказа за то. Назив потиче, највероватније, од чињенице да је сирна грудa остављана да се осуши висећи на хоризонталној грани или штапу (слика 2.1) који је коришћен код јахања коња. Овај сир у Италији има доста различитих варијанти које се производе искључиво од крављег млека (Anonymous 1).



Слика 2.1. Најчешћи облик италијанског качкаваља (Anonymous 2)

Према римском писцу Колумели, сир по имену *"manum pressum"* производио се у Римском царству по поступку сличном за качкаваљ. У време римског царства, током владавине Јулија Цезара, технологија производње је пренета из Италије до Велике Британије, прилагођена тамошњим условима, а касније модификована настајањем новог типа сира по имену Чедар, једним од данас у свету најпопуларнијих сирева (Kindstedt *et al.*, 2004, Мијачевић и Булајић, 2004).

Од средине XVI века, качкаваљ се јавља као нова врста сира на балканским просторима. Овај сир је на Стару планину стигао са реформама Селима II (око 1558. год.). Према неким ауторима (Остојић и сар., 2011), поступак израде качкаваља донели су људи са Јадранског приморја познати као „Талијанци“. Они су успели да остваре султанову намеру да направи трајан, за транспорт и трговину погодан производ, као и да се производња качкаваља укорени на Старој планини и одатле прошири на цело Балканско полуострво. У пиротском крају прерада овчијег млека у качкаваљ уведена је седамдесетих година XIX века. Производња је повезана са овчарењем Цинцара по пашњацима Балкана и интересовањем трговаца из Солуна за пласман производа од овчијег млека (Остојић и сар., 2011).

Каракачани (Саракачани) су били пастирски народ у подручју бугарског дела Старе планине, Грчке и Македоније. Посеђивали су велика стада краткорепе каракачанске овце црног руна, која се данас налази на прагу изумирања. Каракачани су млеко прерађивали у качкаваљ и сматра се да су управо они крајем XIX до око треће декаде XX века пренели технологију производње качкаваља пастирима села Дојкинци и осталим старопланинским сточарима (Петровић, 1997, Иванов, 2006). Качкаваљ је у то време прављен од маја до августа од мешавине овчијег и незнатне количине козјег млека. Сољен је морском сољу и уз свакодневно окретање „одлежавао“ најмање пола године.

Пиротски качкаваљ је обележје простора источне Србије. Овчари на Сувој и Старој планини научили су качкаваљцијски занат крајем XIX века. Друштвени услови и прилике у том раздобљу погодиле су развоју овчарства. Данас се у Србији веома често срећу разни сиреви који носе назив качкаваљ. Међутим, они су само преузели име веома квалитетног сира какав се прави у Пироту и његовој околини.

Према историјским подацима, на лето 1903. године извезено је 160 вагона Пиротског качкаваља Дунавом у Будимпешту (Мијачевић и Булајић, 2004). У раздобљу

од 1933. до 1941. године производило се годишње преко 70 вагона Пиротског качкаваља. Роба је углавном продавана у Солуну и Египту, а касније и у САД (Манчић, 1994). Качкаваљ је био пакован у ланене цакове, при чему је десет котурова сира паковано у један цак (Остојић и сар., 2011). У пиротском селу Станичење, 1953. године за потребе Пиротске млекаре за дозревање качкаваља преуређена је и адаптирана локална пећина. У овом подземном објекту било је могуће складиштење око 16 вагона качкаваља који је дозревао на константној температури од 6 °С. Качкаваљ је чуван до 90 дана, а након тога је железницом транспортован до крајњих купаца.

За производњу качкаваља коришћено је овчије млеко, највише пиротске праменке, у то време доминантне расе оваца. Мужа је вршена у дрвене музлице, без цедила и трајала је око 5 минута по овци. Трократном мужом добијало се дневно око 600 ml млека по овци. После муже, млеко се преносило на бачије (склониште за овце где се прерађивало млеко) у дрвеним кантама званим "вучије". Млеко је преношено после подневне муже, након мешања са млеком јутарње и муже од предходне вечери. Квалитет млека се одређивао пробањем укуса. Млеко неодговарајућег укуса (прокисло) враћало се музачу, који је од свог дела најчешће правио урду (врста албуминско-глобулинског сира растресите структуре). Примљено млеко на бачији сипано је у каце различитих величина (200, 300, 500 или 700 l), чији је доњи део био ужи, а горњи шири. Преко каце су стављане цедиљке које су везиване ужетом да би била затегнуте. Стављано је укупно 10 слојева белих цедиљки, при чему је прва задржавала највећи део нечистоће, а задња је било потребно да остане чиста. Затим је вршено мерење температуре млека за подсиравање, која се подшавала на 30-32°C. Ако је температура била нижа, онда се део млека догревао до 60°C и мешао са осталим млеком до постизања жељене температуре. Догревање млека је вршено индиректно у води друге каце. Вода је грејана ложењем ватре испод каце (Остојић и сар., 2011).

За подсиравање млека се користило домаће сирило произведено на посебан начин. Јагње или јаре за клање, старо око месец дана, храњено је млеком и делимично кукурузом. После клања издвајало се сириште, које се благо испирало, надувало, везивало и сушило на промаји у хладовини. Пре коришћења, сириште је резано на комаде и стављано у лонац са посољеном водом. Тако је стајало 10 дана, а затим је цеђено и пресипано у боце из којих се користило за згрушавање млека. Сирило добијено из желуца јарета било је јаче него оно добијено од јагњета. Коришћена маја била је јачине 1 : 5.000 (Остојић и сар., 2011).

Припремање сира данас представља сложен процес. Такође, на карактеристике сира утиче човек, сирар, а пре свега сва природа околине у којој се прави. Вода, клима, земљиште и ароматично биље дају сиру природни печат квалитета по коме се препознаје, па се зато чувеним сиревима добро зна географско порекло (Остојић и сар., 2011).

## 2.2. Карактеристике аутохтоне производње Пиротског качкаваља

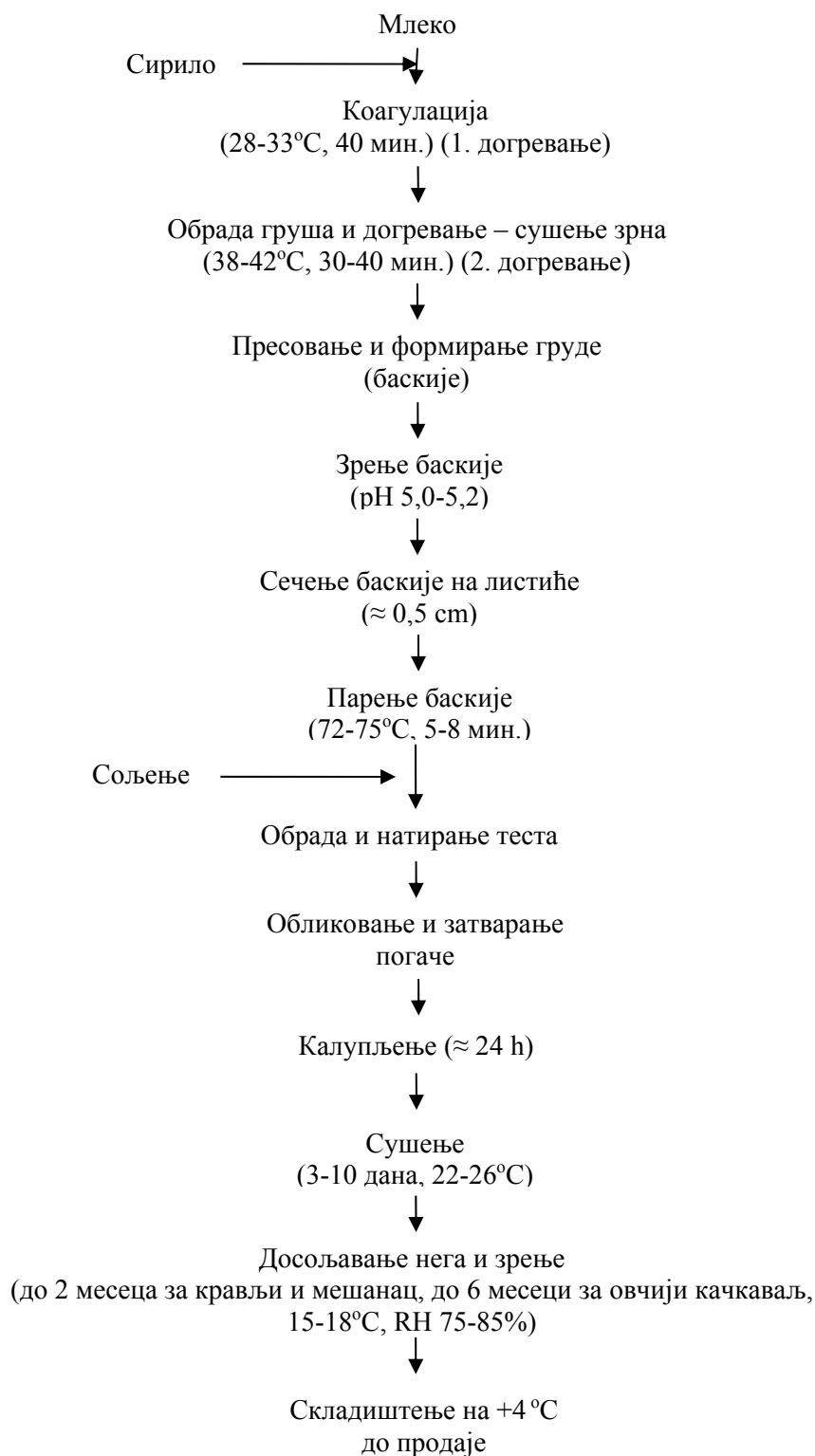
Пиротски качкаваља се може производити од крављег, овчијег или мешавине ових млека, иако се може користити и козје млеко у мешавини са крављим и овчијим (Шутић, 1964, Бараћ и др., 1996). Најквалитетнији качкаваљ се добија из овчијег, а нешто мање квалитетан из мешавине овчијег и крављег млека (крсташ - слика 2.2). Качкаваљ од овчијег млека је мекше конзистенције, боље ароме и пикантнијег укуса (Манчић, 1994). Маса готовог производа (погаче) је просечно од 5-10 kg, иако се формирају и мањи комади истог облика масе до 3 kg.



Слика 2.2. Изглед пакованог Пиротског качкаваља – мешанца

(фото - Н. Милосављевић)

Технолошки процес производње качкаваља (слика 2.3) може се састојати од две (Kindstedt *et al.* 2004) или три (Манчић и Манчић, 2005) независне фазе.



Слика 2.3. Технолошки процес производње Пиротског качкавала

(Манчић и Манчић, 2005)

## **Прва фаза**

### **Добијање и делимично сазревање сирне масе – баскије (чедаризација).**

У овој фази се, најпре врши одабир млека (кравље или овчије или мешавине ова два, киселости мање од 8,5°SH за кравље и 10°SH за мешано млеко). Млеко се затим пречишћава и стандардизује, без пастеризације, а уколико се очекује слабије подсиравање, додаје се калцијум-хлорид (највише 200 mg/l). Затим се млеко загрева на 28-33°C и додаје сирило. Подсиравање траје до 40 мин, након чега се груш обрађује резањем до величине кукурузног зрна, одваја сурутка, а маса очвршћава. Након тога, следи друго догревање на 38-42°C у току 30-40 мин и одвајање преостале сурутке од груша, при чему се груш пресује 35-40 мин са притиском 5-10 kg на 1 kg сирне масе. Сирна маса се након пресовања сече на комаде тежине од 5 до 10 kg, и подвргава зрењу. Зрење баскије траје неколико часова лети и 1-3 дана зими до постизања вредности киселости од 140-160 °SH или 160-200 °SH за производе од мешаног или овчијег млека, респективно.

## **Друга фаза**

### **Термичка обрада (парење) баскије и пуњење калупа**

Зрела баскија се у овој фази производње сече на листиће дебљине око 0,5 cm а затим се листићи убацују на парење 5-8 мин на температури од 72-75°C, при чему се врши гњечење и цеђење сурутке. Након парења, врши се натирање (гњечење и мешање) уз додатак око 2% соли. Сирна маса се затим увија и извлачи "пупак" (ђубек), а маса спушта у калуп уз откидање "пупка". Калуп са масом се повремено окреће и оставља до следећег дана ( $\approx$  24 h). Након вађења из калупа, сирна маса се суши у сушарама 3-10 дана на температури од 22-26 °C, уз садржај влаге у ваздуху од 65-75% и уз појачану циркулацију ваздуха.

## **Трећа фаза**

### **Досољавање, зрење и нега качкаваља**

Досољавање се врши сувом сољу до 40. дана, при чему се калупи качкаваља слажу на почетку у један ред, а како време одмиче у два, три и четири реда. Качкаваљ зри на просечној температури од 15-18 °C, при садржају влаге у ваздуху од 75-85%. За време зрења (2-3 месеца за крављи и мешанац, и до 6 месеци за овчији качкаваљ), врши се нега качкаваља која се састоји у брисању, благом стругању плесни и премештању



качкаваља. Може се вршити и заштита премазивањем, парафинирањем или вакумирањем уз зрење на нижим температурама.

### 2.3. Микробиота качкаваља

Формирање сензорних својстава ферментисаних производа од млека настаје као последица метаболичке активности присутне микробиоте (Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996, Venito de Cardenas *et al.*, 1990). Због тога, специфичне карактеристике качкаваља произилазе из јединствене микробиоте која се углавном састоји од бактерија млечне киселине (БМК) (Zamfir *et al.*, 2006, Dewan and Tamang, 2007).

Различите врсте традиционалних сирева израђених од млека поседују јединствену и различиту микробиоту у зависности од поступка израде, као и еколошке карактеристике места у којима су произведени. Посебно, сиреви произведени од непастеризованог млека традиционалним поступком садрже веома разноврсну и богату микробиоту (Prodromou *et al.*, 2001, Florez *et al.*, 2006, Terzić-Vidojević *et al.*, 2007, Duan *et al.*, 2008). Тај биодиверзитет може се сматрати главним фактором у формирању типичних карактеристика традиционалних сирева (Serhan *et al.*, 2009).

Парењем баскије у топлој води на 72-75°C врши се знатан утицај на њену микробиоту. Термичка обрада баскије може се сматрати неком врстом пастеризације теста сира, која обезбеђује одређени ток биохемијских и микробиолошких процеса. За време термичке обраде баскије долази до значајног смањења укупног броја бактерија и квасаца који се налазе у зрелој груди пре термичке обраде. Ово показује да је термичка обрада од пресудног значаја при преради млека у качкаваљ у областима где није увек могуће добити млеко доброг квалитета и када се не примењује пастеризација млека (Alrubai, 1979).

Када је у питању избор сојева за производњу качкаваља на нашим просторима, треба истаћи да апсолутну предност морају имати хомоферментативне термофилне БМК (Илић и сар., 1996). Међутим, у нашим условима производња варира од региона до региона, па је полазна основа за примену култура присутна микробиота која се јавља у фазама производње и зрења качкаваља. Како се микробиота качкаваља састоји од, углавном, сојева *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. helveticus*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus* (Илић и сар., 1996, Обрадовић и сар., 2006), очигледно

је да изолати који припадају наведеним врстама БМК представљају потенцијалне стартере.

У литератури се могу наћи подаци о примени наведених микроорганизама као стартер културе у производњи сличних производа, као што су на пример сиреви Моцарела и Сасиокавалло Пуглисе (Coppola *et al.* 1997, Corbo *et al.* 2001, Gobbetti *et al.* 2002). У узорцима италијанског качкаваља „Сасиокавалло Молисе“ произведеног додатком стартера, идентификоване су бактерије *Lb. paracasei* ssp. *paracasei*, *Lb. pentosus*, *Lb. coryneformis* ssp. *torquens*, *Lb. plantarum* и *Lb. brevis*, као и *Lb. casei*, *Lb. mali*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. sakei* и *Lb. coryneformis* ssp. *coryneformis* (Coppola *et al.*, 2003).

Термофилне БМК, као што су *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lb. delbrueckii* ssp. *lactis* и *Lb. delbrueckii* ssp. *delbrueckii*, лактококе (*Lc. lactis* ssp. *lactis* и *Lc. plantarum*) и ентерококе (*Enterococcus faecalis* и *E. faecium*) изоловане су, такође током зрења качкаваља „Сасиокавалло Молисе“ (Morandi *et al.*, 2005). Ентерококе могу бити доминантне БМК у многим Медитеранским сиревима овог типа (Morea *et al.*, 2007), као и у другим сиревима израђеним од сировог млека у којима се бактерије млечне киселине јављају као доминантна микробиота (Silveti *et al.*, 2014).

БМК изоловане из наших аутохтоних сирева, карактеришу се добрим технолошким својствима и способношћу формирања специфичног укуса карактеристичног за одговарајуће врсте сирева (Terzić-Vidojević *et al.*, 2007, Вељовић и сар., 2007, Strahinjić *et al.*, 2005). Због тога, ради се на стандардизовању производње аутохтоних сирева уз помоћ домаћих стартер култура (Остојић и Тописировић, 2006). У литератури се могу наћи подаци о дефинисаним стартер културама за производњу сирева са територија Златара (Остојић, 2006), Жабљака, Копаника и Голије (Остојић, 2010), док су у перспективи сиреви са Старе планине. На ширем подручју територије општине Пирот вршена су истраживања различитих врста сирева и изолован је и идентификован значајан број БМК (Табела 2.1.).

#### **2.4. Бактерије млечне киселине**

БМК су припадници групе најстаријих живих организама, појавиле су се на земљи пре 3 милијарде година, вероватно пре фотосинтетских цијанобактерија. Њихово ширење почиње пре продукције млека код сисара, пре око 65 милиона година. Ипак, прва забележена производња ферментисаних производа коришћењем БМК

повезана је са открићем малих рупичастих посуда у близини Нешателског језера у Швајцарској, за које се претпоставља да потичу из времена око 3000 година п.н.е. Сматра се да су људи још тада могли да контролишу процес згрушавања млека. Убрзо након тога почиње производња различитих ферментисаних производа у којима учествују БМК, као што су сир, хлеб, ферментисани производи од рибе, меса итд. (Champomier -Verge`s et al., 2002).

Табела 2.1. Микробиота сирева са територије општине Пирот

Врста БМК	Врста сира	Референца
<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus durans</i> <i>Leuconostoc garlicum</i>	Бели сир у кришкама од крављег млека	Terzić-Vidojević et al., 2009.
<i>Lactococcus</i> spp. <i>Streptococcus</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp.	Пиротски качкавал од овчијег млека	Radulović et al., 2011.
<i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus casei/rhamnosus</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Enterococcus faecium</i>	Пиротски качкавал од крављег млека	Милосављевић и др. 2013.
<i>Enterococcus</i> spp. <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> / <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus paracasei/Lb. casei</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Streptococcus macedonicus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	Пиротски качкавал од крављег млека	Остојић, 2012.

БМК представљају хетерогену групу бактерија које су обједињене на основу њихових морфолошких, метаболичких, физиолошких и генетичких особина. Ове бактерије су грампозитивне коке или бацили који не формирају споре, каталаза су негативне, немају цитохроме, анаеробне су и факултативно анаеробне, а производе

млечну киселину као један од крајњих продуката разлагања угљених хидрата. Могу да расту само на богатим подлогама уз додатак витамина (рибофлавина, пантотенске и фолне киселине, биотина и тиамина) и аминокиселина (Salminen and von Wright, 1998).

БМК се углавном налазе у стаништима која су богата хранљивим материјама, као што су различите намирнице (млеко, месо, нека пића), а распрострањене су у природи као нормална епифитна микробиота биљака, док су неке део нормалне микробиота уста, гастроинтестиналног тракта и вагине сисара (Stiles and Holzapfel, 1997).

#### 2.4.1. Класификација БМК

Назив бактерије млечне киселине у раним фазама микробиологије углавном се односио на микроорганизме који грушају млеко. Прву чисту културу БМК изоловао је Ј. Листер, 1873. године и означио је као врсту *Bacterium lactis* (вероватно *Lactococcus lactis*). Даљи напредак у класификацији ових бактерија направљен је када су пронађене сличности између бактерија које грушају млеко и других бактерија које производе млечну киселину (Champomier -Verge`s et al., 2002).

На основу диференцијације молекуларним методама, БМК су сврстане у 16 родова: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Glaticatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* и *Weussella* (Axelsson, 1998). У Табели 2.2. приказане су физиолошке разлике појединих родова БМК.

#### 2.4.2. Најзначајнији родови БМК у индустрији млека

У индустрији млека и производњи ферментисаних млечних производа, најзначајније и најчешће коришћене врсте БМК припадају родовима *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* и *Streptococcus*.

##### ***Enterococcus* spp.**

Ентерококе су широко распрострањене бактерије које се налазе као нормална интестинална микробиота људи и животиња. Врсте овог рода су уобичајено присутне у срединама контаминираним људским и животињским фекалним материјама (градска

канализација, отпадне воде и земљишта ђубрена ђубривом животињског порекла), као и неким прехранбеним производима животињског порекла (Franz *et al.*, 1999). У табели 2.3. су представљене врсте рода *Enterococcus* и њихова физиолошка својства.

Табела 2.2. Физиолошке разлике различитих родова БМК (Axelsson, 1998)

Карактеристике	Штапићи		Коке								
	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Vagococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Oenococcus</i> <i>Leuconostoc</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weissella</i>
Тетраде	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	- <sup>a</sup>
СО <sub>2</sub> из глукозе	- <sup>б</sup>	+/-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
Раст на 10°C	+	+/-	+	+	+	+	+	В	-	+	+
Раст на 45°C	-	+/-	-	+	-	-	-	В	В	-	-
Раст на 6,5% NaCl	Н.О	+/-	+	+	-	-	В	В	-	+	В
Раст на 18% NaCl	.	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Раст на рН 4.4	Н.О	+/-	-	+	В	В	+	+	-	-	В
Раст на рН 9.6	.	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-
Млечна киселина	L	D, L, DL <sup>в</sup>	L	L	L	D	D	L, DL <sup>в</sup>	L	L	D, DL <sup>в</sup>

„+“ – присутан раст „-“ - нема раста, „в“ - варијабилно, „но“ - није одређено,  
 а - неки сојеви врста из рода *Weissella* могу бити штапићасти облика,  
 б - мала количина СО<sub>2</sub> може бити произведена у зависности од подлоге,  
 в - производња D -, L - или DL - млечне киселине је различита између врста

Ентерококе у храни представљају велику загонетку са аспекта безбедности хране (Franz *et al.* 2003). Неколико студија је показало да поједини сојеви ентерокока играју важну улогу у сазревању неких традиционалних сирева (Ogier and Serror, 2008, Foulquie Moreno *et al.*, 2006, Franz *et al.*, 1999, Giraffa, 2003), вероватно кроз протеолизу, липолизу и разлагање цитрата и тако доприносе њиховом типичном укусу и ароми (Dušinský *et al.*, 2008, Sarantinopoulos *et al.*, 2001). Због тога, у неким европским земљама, представнике рода *Enterococcus* сматрају значајном микробиотом млечних производа јер доприносе формирању сензорних својстава производа. Већина

земаља Северне Европе више је фокусирана на негативне аспекте, па присуство ентерокока сматрају последицом лоших хигијенских услова у производњи. Ова дивергентна гледишта поједини аутори објашњавају културолошким разликама (Ogier and Serror, 2008). Поред наведеног, неке врсте ентерокока се истражују као потенцијални пробиотици (Holzapfel *et al.*, 2001).

Табела 2.3. Физиолошке карактеристике ентерокока (Franz *et al.* 2003)

Врста	Раст на:		Раст у присуству:				Хидролиза ескулина	Антиген Д групе
	10°C	45°C	pH 9,6	6,5 NaCl	40% Жучи	0,04% Na-азида		
<i>En. asini</i>	(+)	(+)	н.о.	-	+	н.о.	+	+
<i>En. avium</i>	в	+	+	в	в	н.о.	+	+
<i>En. casseliflavus</i>	+	+	+	в	+	+	+	+
<i>En. cecorum</i>	-	+	(+)	-	(+)	-	+	-
<i>En. columbae</i>	-	н.о.	н.о.	-	(+)	-	+	-
<i>En. dispar</i>	+	-	н.о.	р	+	-	+	-
<i>En. durans</i>	+	+	+	+	+	+	+	(+)
<i>En. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>En. faecium</i>	+	+	+	+	+	+	+	в
<i>En. flavescens</i>	в	в	н.о.	+	+	+	+	+
<i>En. gallinarum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>En. haemoperoxidus</i>	+	-	н.о.	+	+	+	+	+
<i>En. hirae</i>	+	+	+	+	+	+	+	в
<i>En. malodoratus</i>	+	-	+	+	+	н.о.	+	+
<i>En. moraviensis</i>	+	-	н.о.	+	+	+	+	+
<i>En. mundtii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>En. porcinius</i>	+	+	н.о.	+	н.о.	н.о.	+	+
<i>En. pseudoavium</i>	+	+	+	р	в	н.о.	+	-
<i>En. raffinosus</i>	(+)	+	+	+	в	н.о.	+	н.о.
<i>En. ratti</i>	+	+	н.о.	+	н.о.	н.о.	+	(+)
<i>En. saccharolyticus</i>	+	+	н.о.	(+)	+	н.о.	+	-
<i>En. solitarius</i>	+	+	н.о.	+	+	н.о.	+	+
<i>En. sulfureus</i>	+	-	н.о.	+	+	н.о.	+	-
<i>En. villorum</i>	н.о.	н.о.	н.о.	+	+	+	+	н.о.

„+“ - присутан раст; „-“ - нема раста; „н.о.“ - није одређено; „(+“ - слаб раст;  
 „в“ - варијабилно; „р,, - различити литературни подаци

Таксономија ентерокока је дуго била нејасна. Нема јасне фенотипске карактеристике којом се овај род може одвојити од других грампозитивних, каталаза-негативних кока (Devriese *et al.*, 1995). Ентерококе је описао Sherman (1937) наводећи разлику у односу на друге грампозитивне, каталаза негативне коке по томе што расту на температурама од 10°C и 45°C, у бујону са 6,5% NaCl, при рН 9,6 и преживљавају загревање на 60°C у трајању од 30 мин. Неколико врста овог рода не испуњава све ове критеријуме (Devriese *et al.*, 1995, Hardie and Whiley, 1997).

Ентерококе спадају у хомоферментативне БМК и оне ферментацијом глукозе продукују само L (+) облик млечне киселине. Осим тога, врсте овог рода могу да хидролизују аргинин и могу у потпуности да редукују лакмус млеко. Расту у млеку са 0,1%, али не расту и у млеку са 0,3% метиленског плавог. Фенотипске разлике између врста су мале и своде се на разлику у ферментацији појединих шећера. Тако *En. faecalis* продукује киселину из малтозе и сорбитола али не из L-арабинозе, мелибиозе и сорбозе, док је код врсте *En. faecium* обрнуто. Бактерије врсте *En. faecalis* редукују тетразолијум и натријум телурит, док само неки сојеви врсте *En. faecium* могу да редукују натријум телурит (Јоковић, 2010).

### ***Lactobacillus spp.***

Различитост врста у оквиру рода је последица дефиниције овог рода која гласи: бактерије млечне киселине штапићастог облика које не формирају споре. Први опис овог рода дао је Beijerinck 1901. год, а према првој класификацији коју је дао Orla-Jensen 1919. год, род *Lactobacillus* био је подељен на три групе: *Thermobacterium*, *Streptobacterium* и *Betabacterium* (Orla-Jensen, 1919). Ова класификација је и даље прихватљива до одређеног нивоа, мада су извршене неке измене (Bernardeau *et al.*, 2008, Kandler and Weis, 1986, Hammes and Vogel, 1995).

Облик ћелија лактобацила варира од јако издужених и танких штапића до кратких и кокоидних форми. Настањују станишта богата хранљивим материјама, пре свега биљке и материјал биљног порекла, као и слузокожу људи и животиња (усна шупљине, црева и вагина). Представници овог рода играју кључну улогу у производњи ферментисане хране од поврћа и меса, а посебно ферментисаних млечних производа (Bernardeau *et al.*, 2008). Лактобацили могу бити и узрочници кварења пива, воћа, рибе, меса, месних прерађевина, млека и ферментисаних напитака. Ацидофилни или ацидотолерантни су микроорганизми и током раста у супстрату са ферментативним

угљеним хидратима снижавају рН на око 4. Користе се као starter културе у производњи сира, ферментисане биљне хране, ферментисаног меса, киселог теста и сточне хране (Савић, 2007). Током последње деценије, лактобацили, посебно њихов метаболизам и функција су предмет значајног научног проучавања, при чему се отвара пут за поузданију контролу процеса и све ширу примену у индустрији млека као starterа и пробиотика (Chamba and Irlinger, 2004).

Лактобацили се налазе као стална микробиота дигестивног тракта људи. Код здравих људи, лактобацили су нормално присутни у усној дупљи ( $10^3$ - $10^4$  CFU/g), илеуму ( $10^3$ - $10^7$  CFU/g) и дебелом цреву ( $10^4$ - $10^8$  CFU/g), а доминантни су микроорганизми у вагини жена (Hill *et al.*, 1984, Merk *et al.*, 2005).

Према класичним фенотипским карактеристикама, бактерије рода *Lactobacillus* су подељене у три основне групе: хомоферментативне, факултативно хетероферментативне и облигатно хетероферментативне (Таппоск, 2004). Расподела врста у ове три групе приказана је у табели 2.4. Опсег варирања садржаја G+C (гуанин+цитозин) парова у ДНК код овог рода је од 33-55%, док се за добро дефинисане родове прихвата варирање у садржају G+C парова од 10% (Bernardeau *et al.*, 2008, Schleifer and Ludwig, 1995, Vandamme *et al.*, 1996).

### ***Lactococcus* spp.**

Род *Lactococcus* састоји од пет филогенетски различитих врста: *Lactococcus lactis*, *Lc. garviae*, *Lc. piscium*, *Lc. plantarum* и *Lc. raffinolactis* (Слика 2.4) (Hutkins, 2006). Сви представници овог рода су непокретни, облигатни хомоферментативни, каталаза негативни, факултативни анаероби.

Представници овог рода имају ћелије округластог облика, ређе овалног, а јављају се појединачно, у паровима, ланцима и често су издужене у правцу ланца. Обично расту у присуству 4% соли са изузетком неких сојева *Lc. lactis* ssp. *cremoris* који толеришу само 2% NaCl. Главни продукт ферментације глукозе је L-млечна киселина. Оптимална температура раста им је око 30°C, мада могу да расту на температури од 10°C, али не на 45°C.



Табела 2.4. Класификација лактобацила на основу фенотипских карактеристика (Stiles and Holzapfel, 1997)

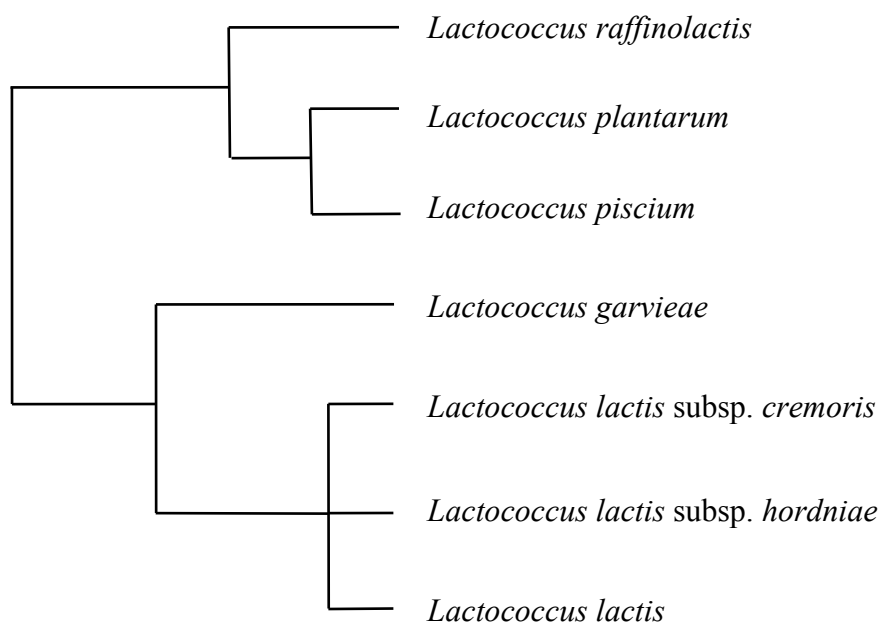
I група	II група	III група
Облигатно хомоферментативни	Факултативно хетероферментативни	Облигатно хетероферментативни
<i>Lb. acidophilus</i>	<i>Lb. acetotolerans</i>	<i>Lb. brevis</i>
<i>Lb. amylophilus</i>	<i>Lb. agilis</i>	<i>Lb. bushneri</i>
<i>Lb. amilovorvus</i>	<i>Lb. alimentarius</i>	<i>Lb. collinoides</i>
<i>Lb. aviarius</i>	<i>Lb. bifementas</i>	<i>Lb. fermentum</i>
ssp. <i>araffinosus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. fructivorans</i>
ssp. <i>aviarius</i>	<i>Lb. coryniformis</i>	<i>Lb. fructosus</i>
<i>Lb. crispatus</i>	ssp. <i>coryniformis</i>	<i>Lb. hilgardii</i>
<i>Lb. delbrueckii</i>	ssp. <i>torquens</i>	<i>Lb. kefir</i>
ssp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lb. curvatus</i>	<i>Lb. malefermentas</i>
ssp. <i>delbrueckii</i>	<i>Lb. graninis</i>	<i>Lb. oris</i>
ssp. <i>lactis</i>	<i>Lb. hamsteri</i>	<i>Lb. panis</i> <sup>a</sup>
<i>Lb. farciminis</i>	<i>Lb. homohiochii</i>	<i>Lb. parabuchneri</i>
<i>Lb. galinarium</i>	<i>Lb. intestinalis</i>	<i>Lb. parakefir</i> <sup>a</sup>
<i>Lb. gasseri</i>	<i>Lb. murinus</i>	<i>Lb. pontis</i> <sup>a</sup>
<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. paracasei</i>	<i>Lb. reuteri</i>
<i>Lb. jensenii</i>	ssp. <i>paracasei</i>	<i>Lb. sanfrancisko</i>
<i>Lb. johnsonii</i>	ssp. <i>tolerans</i>	<i>Lb. suebicus</i>
<i>Lb. kefirnofaciens</i>	<i>Lb. paraplantarum</i> <sup>a</sup>	<i>Lb. vaccinostecus</i>
<i>Lb. kefirgranum</i> <sup>a</sup>	<i>Lb. pentosus</i>	<i>Lb. vaginalis</i>
<i>Lb. mali</i>	<i>Lb. plantarum</i>	
<i>Lb. ruminis</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	
<i>Lb. salivarius</i>	<i>Lb. sake</i>	
ssp. <i>salicinus</i>		
ssp. <i>salivarius</i>		
<i>Lb. sharpeae</i>		

Подебљани називи - лактобацили значајни у индустрији хране и потенцијални пробиотици

<sup>a</sup> - врсте додате након 1994 (Pot *et al.*, 1994)

Врста *Lc. lactis* има велики економски значај и често је била предмет интензивног проучавања биохемијских и физиолошких карактеристика, као и њеног утицаја на храну (Stiles and Holzapfel, 1997, Teuber *et al.*, 1991). Ова врста је често изолована из биљног материјала, иако најчешће станиште лактокока представљају млечни производи (Stiles and Holzapfel, 1997).

Употреба лактокока у индустрији је врло широка, а најдужу традицију има у производњи стартер култура. Генетичке студије о лактококама су фокусиране на млечну ферментацију, производњу диацетила из цитрата и отпорност на напад бактериофага (Stiles and Holzapfel, 1997).



Слика 2.4. Филогенетско стабло рода *Lactococcus* на основу секвенце 16S р РНК анализе (Hutkins, 2006).

Генетичким истраживањима, а примарно хибридизацијом нуклеинских киселина и имунолошким истраживањима, доказано је да су врсте рода *Lactococcus* међусобно блиско сродне, али не и са врстама рода *Streptococcus* и *Enterococcus* (Schleiffer and Kilpper-Balz, 1987). *Streptococcus* и *Enterococcus* се од рода *Lactococcus* разликују према температури раста, јер на 63°C опстају 20 минута, расту на повећаним концентрацијама NaCl од 6,5%, као и према расту у средини са рН 9,6 (Stiles and Holzappel, 1997). У табели 2.5 приказане су разлике у ферментацији шећера и хидролизи аргинина међу врстама и подврстама рода *Lactococcus*.

### ***Leuconostoc* spp.**

Род *Leuconostoc* је дефинисан још 1878. године од стране Van Thieghema. Прву класификацију рода *Leuconostoc* дали су Hucker и Pederson 1931. године, сврставајући их у три групе, и то врсте које (Garvie, 1984, 1986a):

- 1) не ферментишу сахарозу (*Ln. citrivorius*),
- 2) врше ферментацију сахарозе и пентоза (*Ln. mesenteroides*) и
- 3) врше ферментацију сахарозе, али не и пентоза (*Ln. dextranicum*).

Табела 2.5. Способност ферментације шећера и хидролизе аргинине код врста и подврста бактерија рода *Lactococcus* (Schleiffer and Kilpper-Balz, 1987)

Врста и подврста	Шећер						Хидрол. аргинина	
	Галактоза	Лактоза	Малтоза	Мелибиоза	Мелицитоза	Рафиноза		Рибоза
<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	+	+	+	-	-	-	+	+
<i>Lc. lactis ssp. cremoris</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Lc. lactis ssp. hordniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Lc. garviae</i>	+	+	в	в	-	-	+	+
<i>Lc. plantarum</i>	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Lc. raffinolactis</i>	+	+	+	+	в	+	в	в

„+“ – присутан раст „-“ - нема раста, „в“ -варијабилно

У Bergey-евом приручнику за систематику и идентификацију бактерија (2004), род *Leuconostoc* је подељен на 20 врста према критеријумима сличним онима који се користе за разликовање лактобацила (ферментација шећера, потребе за одређеним нутријентима, раст под различитим условима и слично).

У новијим истраживањима неких аутора наводи се 15 врста овог рода (De Bruyne *et al.*, 2007):

<i>Ln. carnosum</i>	<i>Ln. fructosum</i>	<i>Ln. kimchii</i>
<i>Ln. citreum</i>	<i>Ln. gasicomitatum</i>	<i>Ln. lactis</i>
<i>Ln. durionis</i>	<i>Ln. gelidum</i>	<i>Ln. mesenteroides</i>
<i>Ln. fallax</i>	<i>Ln. holzapfelii</i>	<i>Ln. pseudomesenteroides</i>
<i>Ln. ficulneum</i>	<i>Ln. inhae</i>	<i>Ln. pseudoficulneum</i>

Зависно од подлоге на којој расту, облик ћелија леуконостока је најчешће сферичан, али може бити и сочиваст. На чврстим подлогама, ћелије су чешће сферичног облика, а уколико се гаје у желатинозним срединама, углавном су

сочивасте. Ћелије леуконостока се, најчешће, јављају у паровима или у ланцима. Температурни оптимум раста је између 20 °C и 30 °C. За развој им је неопходан богат медијум са комплексим факторима раста и аминокиселинама. Из глукозе стварају CO<sub>2</sub>, етанол и D (-) млечну киселину. Сојеви који имају оксидативне механизме формирају ацетат уместо алкохола. Каталаза су негативни, не врше хидролизу аргинина, а млеко обично не закишељавају и не згрушавају, што говори о слабој ацидогеној способности. Такође, немају изражену протеолитичку активност (Garvie, 1984).

У млеку и производима од млека често се могу наћи врсте рода *Leuconostoc*, и то све осим *Ln. oenos* који је изолован из вина. Улазе у састав многих стартер култура које се комерцијално примењују за производњу сирева, павлаке и маслаца. Осмотолеранција леуконостока на високе концентрације шећера (више од 60% код *Ln. mesenteroides*), омогућава им раст у сирупима и сладоледу. Способност *Ln. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* да синтетише декстран из сахарозе помоћу екстрацелуларне декстрансахаразе, користи се за индустријску производњу декстрана (De Bruyne *et al.*, 2007, Stiles and Holzapfel, 1997).

### ***Streptococcus* spp.**

Прву систематску класификацију стрептокока дао је Sherman 1937. године и у овај род сврстао је велики број различитих врста факултативних анаероба. У своју класификацију укључио је и Lancefield серолошку класификацију која се заснива на присуству антигена на површини ћелија, такозване "C супстанце". Међутим, анализа секвенци 23S рРНК показала је да постоји већа хомологија између стрептокока Lancefield група N и D у односу на остале врсте рода *Streptococcus* (Kilper-Balz *et al.* 1982). На основу анализе 16S рРНК, род *Streptococcus* подељен је на три генетички удаљене групе: *Streptococcus sensu stricto*, *Enterococcus* и *Lactococcus* (Schleifer and Kilper-Balz, 1984, 1987).

У оквиру рода *Streptococcus* једина врста која је важна у индустрији млека и ферментисаних млечних производа је *Streptococcus thermophilus*. Таксономски положај ове врсте још увек није потврђен јер не производи антигене Lancefield групе и припада групи оралних стрептокока. Због високе хомологије ДНК и сличног профила масних киселина дугог ланца са врстом *S. salivarius*, раније се сматрало да је *S. thermophilus* њена подврста (Farrow and Collins, 1984). Методом ДНК хибридизације потврђено је да

*S. thermophilus* представља посебну врсту у оквиру оралних стрептокока (Schleifer *et al.*, 1991).

*S. thermophilus* је термофилна БМК, која расте на 45°C, чак и преко 50°C, док на температури од 15°C не расте. Ћелије су округлог облика и јављају се у пару или дугим ланцима. Уочено је да састав хранљиве подлоге и температура инкубације утичу на морфологију ћелије. У млеку на температури од 45 °C образују краће ланце, док се на 30°C већина ћелија јавља у облику диплокока. Ферментишу лактозу, глукозу и сахарозу, док фруктозу ферментишу слабије или је не ферментишу. Ове бактерије не производе амонијак из аргинина и не расту на бујону са 2% соли. Добро ферментишу лактозу, иако раст у млеку може бити успорен због споре хидролизе казеина. Поједини сојеви ове врсте могу да образују капсулу или синтетишу слузаве материје које нпр. доприносе конзистенцији јогурта. Заједно са врстама *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. lactis* и *Lb. helveticus* користи се као стартер култура у производњи јогурта, швајцарских и италијанских тврдох сирева (Stiles and Holzapfel, 1997).

### ***Pediococcus* spp.**

Као узрочници кварења пива, педиококе су биле међу првим бактеријама које је проучавао Луј Пастер. Формирање тетрада и сферични облик служио је као кључна карактеристика за њихово рано препознавање. Представници овог рода су једине БМК који формирају тетраде. Педиококе су највероватније раније често биле погрешно идентификоване као микрококе због морфолошке сличности, производње псеудокаталазе и толеранције на NaCl.

Педиококе су хомоферментативне јер све врсте производе DL - лактат од глукозе, са изузетком *P. dextranicum* који производи L (+) млечну киселину. Педиококе из пива и биљног порекла биле су сврстане у једне врсту *Pediococcus cerevisiae*, али су студије о изолатима из ова два извора доказала да су то различите врсте, данас познате као *P. damnosus* и *P. pentosaceus*. Такође, већина сојева одређених као *P. cerevisiae* који су коришћени као стартери у производима од меса су рекласификовани као *P. acidilactici*. Врсте рода *Pediococcus* су филогенетски хетерогене (Collins *et al.*, 1990). Врсте рода *Pediococcus* и сродне бактерије које формирају тетраде, као и њихова станишта, приказане су у табели 2.6 (Stiles and Holzapfel, 1997).

Табела 2.6. Врсте рода *Pediococcus* и сродне бактерије које формирају тетраде и њихова станишта (Stiles and Holzapfel, 1997)

Бактерија	Станиште
<i>P. damnosus</i>	Пиваре (замућење пива), вино и цидер
<i>P. dextranicum</i>	Пиво, силажа
<i>P. parvulus</i>	Кисео купус, силажа
<i>P. inopinatus</i>	Кисео купус, пиво
<i>P. pentosaceus</i>	Прерађено поврће, ферментисане кобасице, млеко и млечни производи
<i>P. acidilactici</i>	Биљни материјал, млеко и млечни производи
<i>Aerococcus urinae-equi</i> <sup>a</sup>	Није повезана са храном
<i>Tetragenococcus halophilus</i> <sup>b</sup>	Соја сос, кисели краставци (захтева NaCl за раст)

<sup>a</sup> раније *Pediococcus urinae-equi*

<sup>b</sup> раније *Pediococcus halophilus*

Педиококе се најчешће налазе у малом броју заједно са леуконостоцима и лактобацилима на биљном материјалу и у различитим намирницама, као и узрочници кварења у алкохолним пићима (на пример, пиво). Често представљају битну компоненту starter култура које се користе за производњу ферментисаних кобасица у разним регионима широм света. За врсте *P. acidilactici* и *P. pentosaceus* је доказано да могу имати способност производње бактериоцина (Altuntas *et al.*, 2010, Danielsen *et al.*, 2007, Paragianni *et al.*, 2009, Tankovic *et al.*, 1993). Иако су од економског значаја као starter културе, сви ферментативни путеви код педиокока нису потпуно разјашњени. Педиококе захтевају лако ферментативне угљене хидрате за раст, док у млеку слабо расту јер не користе лако лактозу. Неке врсте показују значајну толеранцију на температуру, рН и садржај NaCl. На пример, врста *P. acidilactici* расте на 50 °C и веома је толерантна на повишену температуру, док су *P. damnosus* и *P. parvulus* ацидотолерантне и расту на ниским температурама, али генерално захтевају анаеробне услове раста више него други сојеви. Производња диацетила је доказана за *P. damnosus*, мада под ограничавајућим условима раста ова врста не може продуковати ацетоин или диацетил. Врсте *P. acidilactici* и *P. pentosaceus* су веома сличне врсте које се не могу јасно разликовати на основу фенотипских карактеристика (Garvie, 1986, Stiles and Holzapfel, 1997).

### 2.4.3. Технолошка својства БМК

Велики број различитих врста БМК, али и сојева у оквиру једне врсте, као резултат своје метаболичке активности условљавају формирање специфичног укуса готовог ферментисаног производа. Метаболитичка активност директно зависи од ензимских система БМК (Весковић-Морачанин и др. 2013). Због тога, технолошком карактеризацијом аутохтоних БМК може се утврдити технолошки потенцијал значајних врста или сојева које могу бити примењени у производњи млечних производа (Радуловић и др. 2008, Мијачевић и Булајић, 2007). Битна својства у селекцији БМК су резистенција на низак рН и присуство жучних соли. Ова својства омогућавају БМК да у вијабилном стању доспевају у интестинални тракт у коме испољавају свој позитиван метаболички ефекат, као и везивање за интестиналну мукозу што потпомаже позитивној промени интестиналне микроекологије (Димитријевић-Бранковић и др., 2003).

#### 2.4.3.1. Раст у присуству жучних соли

Да би пробиотски сој успео да оствари благотворне ефекте по домаћина требало би да преживи услове гастроинтестиналног тракта (Ледина и др. 2013). Код људи, соли таурохолне и гликохолне киселине (деривата холне киселине) чине око 80% свих жучних соли. Две главне жучне киселине су холна киселина, и хенодеоксихолна киселина. Жучне киселине, њихови глицински и таурински коњугати, као и 7-алфа-деhidроксилисани деривати (деоксихолна киселина и литохолна киселина) су нађени у људској интестиналној жучи (Chiang, 2009). Коњуговани и некоњуговани облици жучних киселина показују инхибиторну активност према Грам-позитивним и Грам-негативним бактеријама, при чему су Грам-позитивне бактерије осетљивије на њихово деловање, посебно на деловање некоњугованих облика жучних киселина (Dunne and Mahony, 2001). Осетљивост и толеранција БМК на жучне соли је, због свега наведеног, један од значајних критеријума при селекцији пробиотика. Они сојеви који су толерантни према жучним солима имају и већу могућност преживљавања. С друге стране, неке БМК, као што су *Lb. helveticus* и *En. faecium* (Шушковић, 1997, Kos *et al.*, 2008), имају ензиме (хидролазе жучних соли) који омогућавају декоњугацију жучних соли. Ово директно утиче на успостављање равнотеже цревне микробиоте и доприноси резистенцији БМК на токсичност коњугованих жучних соли у танком цреву, а тиме и

бољу колонизацију (Mathara *et al.*, 2008, Schillinger *et al.*, 2005). Утврђено је, такође, да одређени сојеви БМК могу да снижавају ниво холестерола у крви путем асимилације или декоњугационом активношћу (Nguyen *et al.*, 2007, Maragkoudakis *et al.*, 2006).

#### 2.4.3.2. Синтеза егзополисахарида

Велики број бактерија, укључујући и БМК, има способност синтезе неколико различитих врста полисахарида који су класификовани према њиховом положају у односу на ћелију. Они који се ослобађају ван ћелије, означени су као егзополисахариди (ЕПС) док су полисахариди везани за површину ћелије означени као капсуларни полисахариди (КПС) (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002). Последњих десетак година интензивна су истраживања, али и примена у производњи, БМК које производе егзополисахариде, углавном ради њиховог својства да се користе као средства за побољшање текстуре и вискозитета ферментисаних производа. Такође, истраживањима је потврђено да ЕПС имају имуностимулаторно и антитуморно дејство, утичу на смањење нивоа холестерола у крви и повећање везивања пробиотских бактерија у гастроинтестиналном тракту, док фосфатне групе ЕПС имају улогу у активацији макрофага и лимфоцита (Bauer *et al.*, 2009). Не треба занемарити имунолошка, па ни пробиотичка својства бактерија које производе ЕПС. ЕПС се сматрају сигурним и имају GRAS (Generally Recognized as Safe) статус, па су добра алтернатива за примену стабилизатора (Грегурек и Тонковић, 2008).

БМК производе два типа егзополисахарида: хомополисахариде и хетерополисахариде. Утврђено је да су хомополисахариди састављени од D-глукозе или D-фруктозе, док су хетерополисахариди, који се у производњи јогурта чешће користе, састављени су од D-галактозе, D-глукозе и L-рамнозе (De Vuyst *et al.* 2003). Током ферментације, БМК могу у производу да продукују између 50 и 600 mg/l ЕПС, зависно од састава стартера и услова ферментације (pH, време инкубације, присуство кисеоника, температура). Праћењем примене култура које производе ЕПС потврђено је повољно дејство на текстуру ферментисаних млечних производа које се огледа у повећању вискозности производа и знатно мањем степену синерезе (Hassan *et al.*, 2003).



#### 2.4.4. Синтеза бактериоцина

Биолошку заштиту БМК, као природно присутна и/или селекционисана и додата микробиота, остварују кроз продукцију метаболита: неспецифичних (млечна, сирћетна и друге органске киселине, H<sub>2</sub>O, диацетил, итд.) и специфичних (посебно бактериоцина) (Весковић-Морачанин, 2010, Klaenhammer, 1988,1993, Jack *et al.*, 1995).

Бактериоцини су синтетизовани рибозомални катјонски пептиди који имају ужи спектар антимикробне активности него већина антибиотика (Kaewsrichan *et al.* 2004). Они су обично активни против сојева блиско повезаних са организмом који их продукује или против бактерија истог еколошког система. Најчешће су састављени од 20 до 60 аминокиселинских остатака. Бактериоцини који су састављени једино од D - аминокиселина имају антибактеријску активност, али показују већу отпорност према протеолитичким ензимима и мање су цитотоксични у поређењу са бактериоцинима који су састављени искључиво од L-аминокиселина (Ryadnov *et al.*, 2002, Zasloff *et al.*, 2002).

Упркос напретку технологије, очување хране је и даље предмет великог броја дебата, и то не само за земље у развоју (где је примена различитих технологија чувања хране неопходна), већ и у високо индустријализованом свету. Знатна законска ограничења у коришћењу хемијских конзерванаса код већине прехранбених ферментисаних производа условљавају све већи развој истраживања алтернативних начина спречавања кварења готових производа од меса (Весковић-Морачанин, 2010) и млека (Rodriguez *et al.*, 2000), као и продужавања трајности истих производа. Због тога, прибегава се биопрезервацији која подразумева коришћење микробиолошких култура продуцентата бактериоцина одабраних на основу њихове способности да контролишу раст непожељних микроорганизама (Mills *et al.*, 2011, Delavenne *et al.*, 2013).

Неколико бактериоцина БМК има потенцијал примене у очувању хране, тако да се коришћењем бактериоцина у прехранбеној индустрији може смањити додавање конзерванаса и примене интензивних топлотних третмана, а што би резултирало храном која је природнија и са израженијим сензорним и нутритивним својствима. То може бити једна од алтернатива којом се могу задовољити све већи захтеви потрошача за безбедном, свежом, готовом и минимално-процесуираном храном, а такође и развити нови прехранбени производи (Gálvez *et al.*, 2007). Иако је проучавање употребе бактериоцина за заштиту хране обиман и дугорочан посао, у последњих

неколико година велики број истраживања посвећен је овој проблематици (Ansari *et al.* 2012, Consetino *et al.*, 2012, Todorov *et al.*, 2011).

Бактериоцини које производе БМК имају неколико пожељних својстава која их чине погодним за очување хране (Gálvez *et al.* 2007):

- (1) општеприхваћени су као безбедне супстанце,
- (2) неактивни су и нетоксични према еукариотским ћелијама,
- (3) постају инактивни под дејством дигестивних протеаза, имају мало утицаја на микробиоту црева,
- (4) обично су толерантни на промену рН и температуре,
- (5) имају релативно широк антимикуробни спектар, против многих патогена хране и бактерија изазивача кварења хране,
- (6) показују бактерицидан начин деловања, обично делујући на бактеријску цитоплазматичну мембрану и
- (7) њихова генетска структура омогућава генетичке манипулације.

Међутим, ефикасност бактериоцина у храни у великој мери зависи од низа фактора (табела 2.7.).

Мањи број до сада окарактерисаних бактериоцина грампозитивних бактерија инхибира широк спектар несродних бактерија. Изузетак су лантибиотици, низин и мутацин В-Ну266 који делују на врсте из родова *Actinomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Gardnerella*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* и *Staphylococcus*, а испољавају дејство и на патогене бактерије као што су *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Helicobacter* и *Neisseria* (Mota-Meira *et al.*, 2005).

Највећи број бактериоцина БМК има узак антимикуробни спектар деловања, тако да је њихова употреба ограничена. Даља изучавања механизма биосинтезе бактериоцина, као и клонирање гена одговорних за њихову синтезу дају могућност генетичке манипулације и конструкције химерних бактериоцина са ширим спектром антимикуробног деловања (Остојић, 2005).

Табела 2.7. Ограничавајући фактори везани за ефикасност бактериоцина у храни  
(Gálvez *et al.*, 2007)

---

**Фактори везани за храну**

- Начин прераде хране
- Температура чувања
- рН хране и стабилност бактериоцина при промени рН вредности
- Инактивација дејством ензима присутних у храни
- Интеракција са адитивима/састојцима хране
- Адсорпција бактериоцина на компоненте хране
- Слаба растворљивост и неравномерна расподела у матриксу хране
- Ограничена стабилност бактериоцина током рока трајања хране

---

**Фактори везани за микробиоту хране**

- Број микроорганизама
- Врсте микроорганизама
- Осетљивост бактериоцина
- Микробне интеракције у храни

---

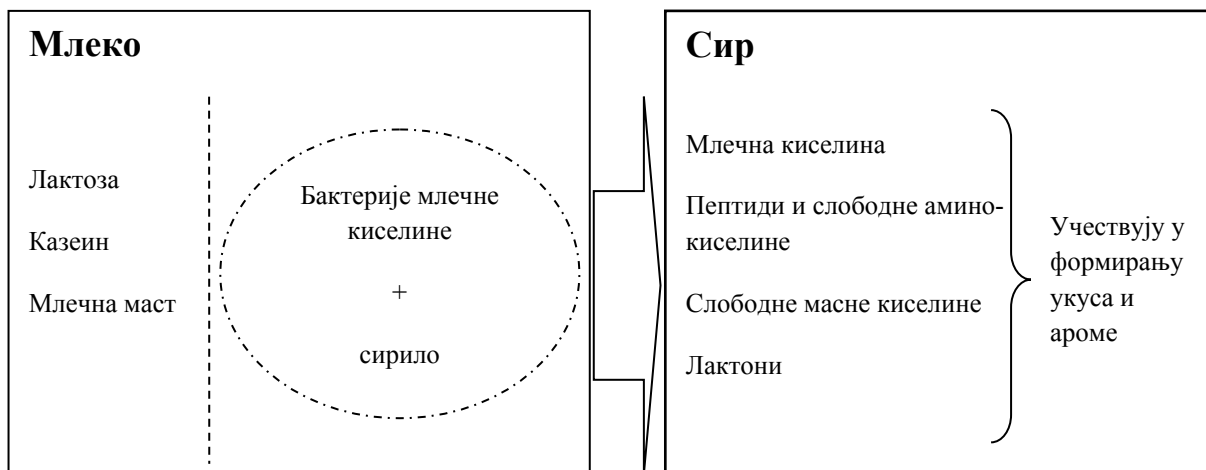
**Фактори везани за циљне бактерије**

- Број микроорганизама
  - Осетљивост бактериоцина (тип по Граму, род, врста, сој)
  - Физиолошко стање: фаза раста (стационарна фаза, фаза одумирања), виабилне бактерије без способности размножавања, ћелије под дејством стреса или сублетално оштећене ћелије, ендоспоре...
  - Заштита од физичко-хемијских баријера (микроколоније, биофилмови, талог)
  - Развој резистентности/адаптација
- 

## 2.5. Хемијске промене током производње и зрења сирева

Сиреви се производе у скоро свакој земљи света. При томе се, у зависности од поднебља, користи млеко неколико врста сисара, а сам процес производње може бити индустријски или традиционалан. Изразито велики диверзитет који карактерише породицу сирева је резултат утицаја великог броја фактора који проистичу из различитости климатског, географског, демографско културолошког и економског карактера. Веома изражене различитости међу бројним врстама и варијететима сирева су резултат утицаја бројних фактора као што су: структура и динамика развоја микробиоте, ниво суве материје сирева, киселости сирног теста, садржај соли у воденој фази сира, заступљеност минералног комплекса, варијације у пуферном капацитету, различитост облика, димензија и периода зрења. Појединачно посматрано,

најзначајнији део дивергенције у сирарству потиче од изузетно велике разноликости микробиоте присутне током израде и зрења сирева. Сиреви се могу посматрати као својеврсни биореактори које одликује константност промена. Зрење сирева карактерише изузетна комплексност која се одликује истовременим одвијањем бројних и међусобно усклађених хемијских и биохемијских, физичких и микробиолошких процеса (слика 2.5). При томе долази до квалитативног преображаја груша у зрео сир који има укус, арому и текстуру карактеристичну за одређену врсту сира (Бараћ и др. 2006). Продукти гликолизе, протеолизе казеина и липолизе масти, као производи основних метаболичких функција БМК, у великој мери утичу на формирање укуса сирева. Међутим, и друга једињења која се у сиру налазе у изразито малим концентрацијама, а производ су одређених метаболичких путева БМК, доприносе развоју специфичне ароме сирева (Marshall, 1987, Ziino *et al.*, 2005, Randazzo *et al.*, 2008). У формирању укуса и мириса одређене врсте сира не учествује само један састојак својим присуством и одређеном концентрацијом, већ најчешће мешавина састојака различитих концентрација. Хемијске промене састојака млека током зрења сирева свакако не протичу једна за другом по реду, већ неке од њих претходе, а друге се дешавају истовремено у паралелним неповезаним или спрегнутим хемијским реакцијама (McSweeney and Sousa, 2000, Fox and Wallace, 1997).



Слика 2.5. Поједностављени приказ биохемијских промена које доводе до промена текстуре, ароме и укуса сирева (Kongo, 2013).

Произвукција млечне киселине од стране БМК игра битну улогу у производњи сирева типа качкаваља. Овај процес почиње још у првим фазама производње и наставља се током зрења. Млечна киселина у сиру настаје углавном

хомоферментативним разлагањем лактозе. Уколико су у сиру присутне хетероферментативне БМК, поред млечне киселине долази до стварања сирћетне киселине,  $\text{CO}_2$  и етанола. Интензивна ферментација траје до сољења сирева. У овом периоду стартери представљају доминантну микробиоту сирева. Након тога, због присуства соли и ниже температуре сирева ацидификација је веома успорена и углавном представља резултат активности нестартерских БМК (Пуђа, 2009). У каснијим фазама, млечна киселина се разграђује до сирћетне киселине, пропионата, а у неким случајевима до бутирата. Створена млечна киселина знатно снижава рН вредност сира и на тај начин спречава раст других микроорганизама који би могли да доведу до кварења сира, а такође утиче директно на укус, арому и структуру сира (Јоковић, 2004).

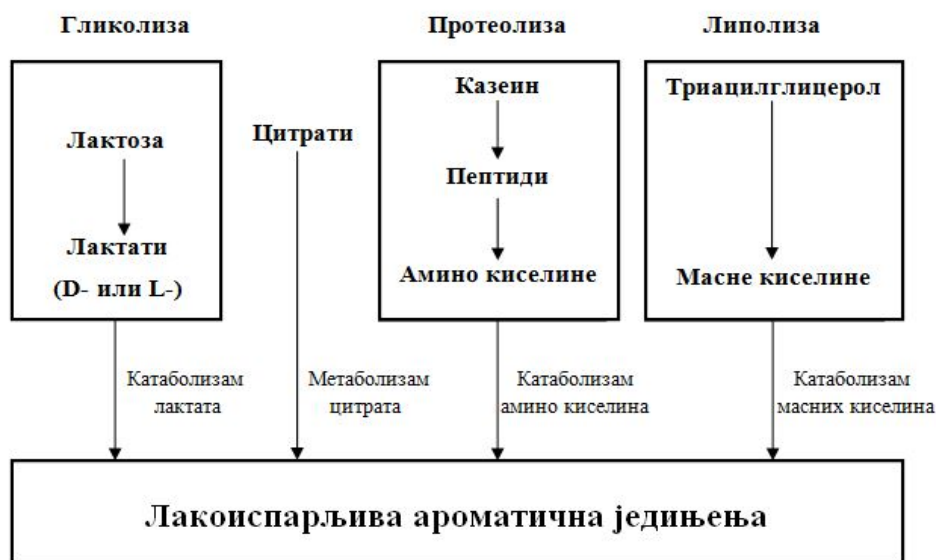
Разлике у сензорним карактеристикама Пиротског качкаваља и осталих сличних производа настају услед присуства природне микробиоте која зависи од великог броја фактора, као што су клима, регион, годишње доба и ниво хигијене. Ови фактори се углавном тешко контролишу, што у великој мери отежава стандардизацију овог производа (Пуђа и Никетић, 1998).

Основна карактеристика производње Пиротског качкаваља је да се млеко не пастеризује и да се не додају стартер културе, већ се ферментација и биохемијски процеси током зрења сира одвијају под утицајем аутохтоне микробиоте, као и ензима млека присутних у сирном тесту, на првом месту плазмина. Овакав начин производње сирева је још увек заступљен у неразвијеним крајевима и представља обележје одређене географске области. Термичка обрада груге у току производње качкаваља значајно умањује ресурсе зрења, што се пре свега огледа у термичкој инактивацији ензима сирила додатих у млеко пре коагулације и значајног смањења броја бактерија у сиру које не могу да преживе температурни режим примењен током процеса парења баскије. С тим у вези, као директан резултат утицаја термичке обраде сирне груге, уочава се да сир качкаваљ има успорени ток зрења у почетном периоду и са тим повезано спорије омекшавање сирног теста. Одложено омекшавање је првенствено условљено мање обимним променама на  $\alpha_{s1}$ -казеину, што је директна последица инактивације резидуалног коагуланта током парења груге. Присутна микробиота БМК у сиревима произведеним на традиционалан начин представља најважнији ресурс зрења. Утицај микробиоте на ток зрења је посебно значајан у каснијој фази и манифестује се значајним порастом дубљих продуката разградње казеина што снажно

доприноси изузетном укусу и мирису зрелог качакаваља произведеног традиционалним поступком. (Илић и др., 1996, Обрадовић и Радин, 2006).

Микроорганизми и њихови ензими имају кључну и вишеструку улогу у процесу производње сирева. Најзначајнија и примарна је ацидогена активност (трансформација лактозе у млечну киселину) којом присутна микробиота утиче на повећање киселости, потпомаже процес коагулације, регулише садржај воде чиме утиче и на текстуру и сензорна својства сира. Код сирева са зрењем, додате мезофилно-термофилне стартер културе (у зависности од типа сира) утичу и на разградњу протеина и млечних масти на примарне и секундарне продукте (Вогојеvски, 2011).

Сложени процеси који се одвијају током израде и зрења сирева, усмеравају се и контролишу са циљем добијања готовог производа са формираним жељеним сензорним карактеристикама. Хемијске промене се дешавају на угљеним хидратима (лактоза), протеинима (казеин) и млечној масти (слика 2.6.), а физичке промене су изражене кроз процес дехидратације, сушења и формирања коре сирева, омекшавања сирног теста, а код појединих сирева и стварања шупљика на пресеку сира. Све наведене промене морају бити синхронизоване како би резултирале стварањем одговарајућег сензорног профила производа: боје, изгледа пресека, мириса, укуса и конзистенције сира (Јованов и др., 2006).



Слика 2.6. Преглед биохемијских путева у сазревању сира (McSweeney *et al.*, 2006)

### 2.5.1. Гликолиза

Ферментација лактозе у млечну киселину помоћу БМК је основна карактеристика производње већине сирева (Fox *et al.*, 1996). Разградња лактозе деловањем БМК одвија се у току производње и у фази зрења сирева. Осим млечне киселине, која је најзначајнији производ гликолизе, настају и друге органске киселине и аромогена једињења, која имају важну улогу у формирању сензорних и реолошких карактеристика зрелих сирева (Бараћ и др., 2006).

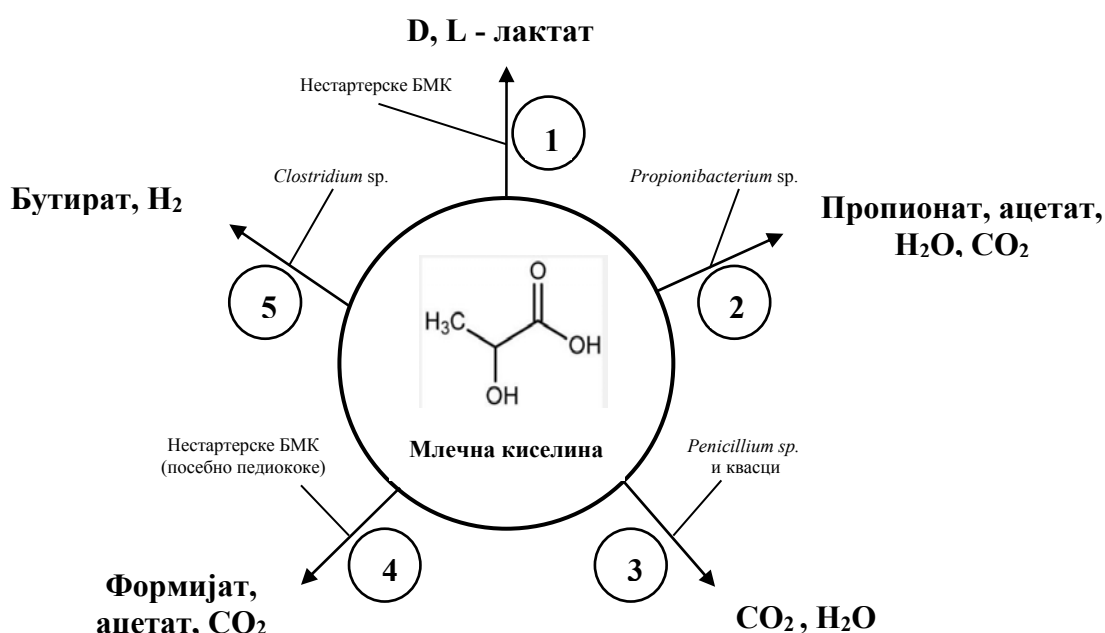
Брзина синтезе и количина настале млечне киселине је карактеристика појединих врста сирева. Тако, током производње сирева типа Чедар највећи део киселине се продукује пре обликовања, док се код већине других сирева интензивнија ацидификација јавља углавном после обликовања (Shakeel-Ur-Rehman *et al.*, 2004). Садржај млечне киселине је различит код појединих врста сирева и зависи од већег броја фактора као што су: количина инокулума, технолошка зрелост млека, температура обраде груша, присуство бактериофага, антибиотика и других инхибиторних супстанци (Fox *et al.*, 1990).

Просечан садржај лактозе у млеку (крављем, овчијем или козијем) је 4,3-4,8 % (Fox *et al.*, 1990, Wong *et al.*, 1988). Током израде сира мањи део лактозе се трансформише до млечне киселине и других продуката млечне ферментације. Највећи део преостале лактозе одлази са сурутком, тако да се у сиру задржава веома мала количина (Пуђа, 2009). На пример, код производње сира Чедар, приликом дробљења садржај лактозе износи од 0,8-1% (Huffman and Kristoffersen, 1984), док се у првим данима зрења код неких италијанских качкаваља од крављег млека креће око 0,15 % (Niro *et al.*, 2014).

Потпуна ферментација лактозе је веома значајна, с обзиром да се на тај начин спречава развој непожељне секундарне микробиоте у сиревима. Заостала лактоза брзо метаболизује у L-лактат током раних фаза зрења. Брзина синтезе лактата одређена је температуром, садржајем соли у воденој фази груша и дејством стартер култура (Parente and Kogan 2004). Лактоза која евентуално остаје неферментисана од стартера метаболише, вероватно од нестартерских БМК (McSweeney and Fox, 2004). У присуству бројније популације нестартерских БМК, знатне количине D-лактата се формирају спонтаном ферментацијом заостале лактозе или рацемизацијом L-лактата до D-лактата (Turner and Thomas 1980).

Метаболизам лактата код производње швајцарског сира је прилично комплексан (слика 2.7). Након обликовања комада, заосталу лактозу у групу брзо метаболише *S. thermophilus*, уз истовремену разградњу глукозе до L-лактата. Галактоза се акумулира у почетку, али се касније, заједно са преосталом лактозом метаболише дејством лактобацила присутних у стартеру дајући мешавину D - и L - лактата (Turner *et al.*, 1983, Fox *et al.* 1990, McSweeney and Fox 2004). Касније, током зрења, лактат се метаболише бактеријама пропионске киселине у пропионат, ацетат, H<sub>2</sub>O и CO<sub>2</sub>. Рацемизација или метаболизам лактата може дати процену старости сира, али се ови параметри не користе као основа за класификацију сира (Fox *et al.*, 1993).

Садржај млечне киселине у сиревима значајно варира. Код Португалског овчијег сира Serra da Estrela у зависности од периода зрења садржај млечне киселине се креће од 0,05-2,1% (Macedo and Malcata, 1997). Код других сирева садржај млечне киселине је знатно већи, тако нпр. код Пармезана се креће од 0-7%, Чедра од 1-3%, Тилситера 0-1%, Кварка 0-7%, Плавих сирева 0-6%, Ементалера, 0-4%, Cotagge од 0-3% (Fox *et al.*, 1999).



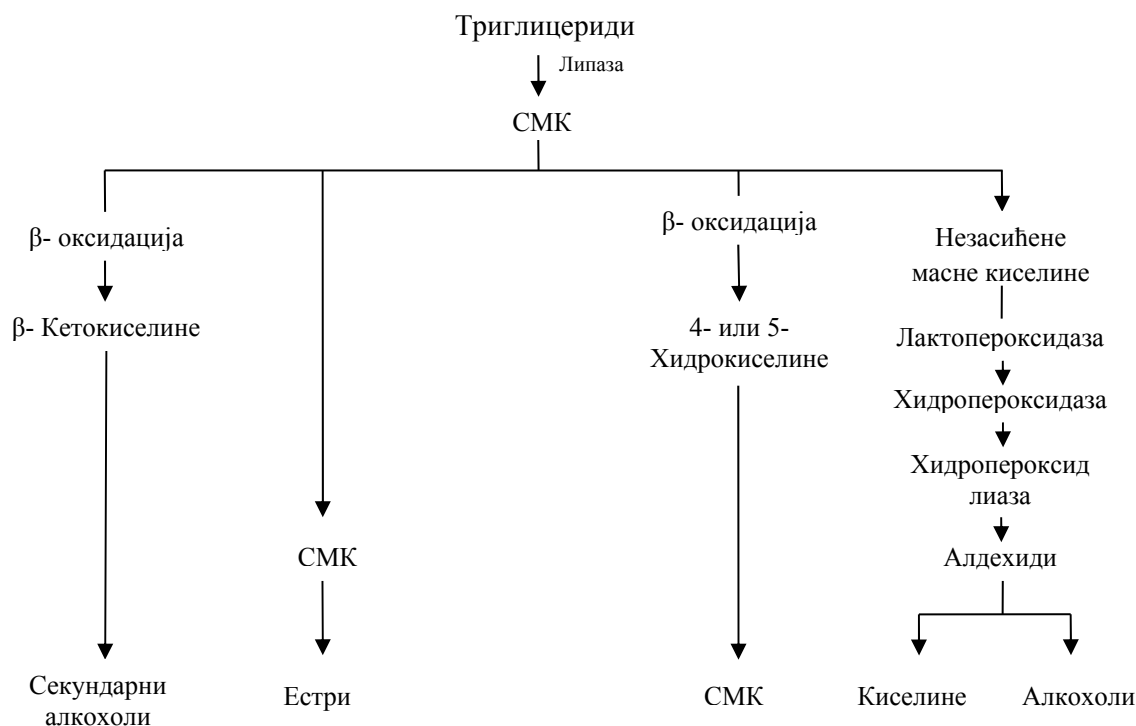
Слика 2.7. Пuteви по којима лактат метаболише у сиревима за време зрења:

1) Рацемизација, 2) Метаболизам *Propionibacterium freudenreichii* код Швајцарског сира, 3) Оксидациони метаболизам лактата, 4) Конверзија у формијате, етанол и ацетате, и 5) Анаеробни метаболизам лактата до бутирата и H<sub>2</sub>, уз касније ослобађање гаса (McSweeney, 2004).



## 2.5.2. Липолиза

Липолиза у млечним производима је предмет бројних истраживања, с обзиром да овај процес игра важну улогу у формирању сензорних и нутритивних карактеристика сирева (Collins *et al.*, 2003, Dherbécourt *et al.*, 2010, Freitas and Malcata, 1998). Ова биохемијска промена се дешава током зрења сирева, а процес липолизе представља степенасту хидролизу триглицерида до диглицерида и моноглицерида и у веома малом обиму потпуне хидролизе, а што за резултат има настајање слободних масних киселина (СМК). СМК утичу на укус сирева и служе као супстрат за стварање других једињења као што су алкохоли, естри, алдехиди, кетони и лактони (слика 2.8). СМК настају хидролитичком активношћу бактерија и дејством липаза, као и метаболизмом угљених хидрата и аминокиселина, а генерално је прихваћено да је липаза, у највећој мери одговорна за ослобађање СМК које садрже више од С-4 атома (Бараћ и др., 2006).



Слика 2.8. Трансформација слободних масних киселина (СМК) и формирање компонената битних за укус сирева (Molimard and Spinnler, 1996).

Липазе у сиру могу потицати из шест могућих извора (Deeth and Fitz-Gerald, 1995, Fox and Wallace, 1997, McSweeney and Sousa, 2000):

- (1) из млека,
- (2) из сирила у облику пасте,
- (3) из стартер култура,
- (4) из допунских стартер култура,
- (5) из нестартерских бактерија и
- (6) додате као егзогене липазе.

Истраживања (McSweeney and Fox, 2004, Fox and Wallace, 1997, McSweeney and Sousa, 2000) која су спроведена код сирева са плавим плеснима и италијанских тврдих сирева (Романо и Пармезан) доказују да липолиза код ових врста сирева достиже висок ниво и представља главни процес којим се формирају сензорне карактеристике, нарочито укус. Степен липолизе код сирева са плеснима се креће у границама од 5 до 20 %, а код Камамбера, који се у Нормандији израђује од сировог млека, од 6 до 10 % укупних масних киселина (Gripou *et al.*, 1991, Gripou, 1993). Такође, висок ниво липолизе (18-25 %) утврђен је и код Данских Плавих сирева (Anderson and Day, 1966). Међутим, у случају сирева као што су Чедар, Гауда или Гројер у којима је липолиза слабо изражена током зрења, степен липолизе не прелази 2 % (Collins *et al.*, 2003, McSweeney and Sousa, 2000). Липолитичке промене су више изражене на површинском слоју сира, мада процес липолизе може бити инхибиран високом концентрацијом соли (Cruz *et al.*, 2011).

Иако интензивне, липолитичке промене код сирева са плеснима углавном не доводе до појаве ужеглог укуса, што се објашњава неутрализацијом СМК као резултат високе рН вредности карактеристичне за ове врсте сирева (Бараћ и др., 2006). Међутим, у неконтролисаним условима зрења, промене на СМК могу да изазову појаву ужеглог укуса (Бараћ и др., 2006, Lemieux and Simard, 1992).

СМК су важни прекурсори катаболичких реакција којима се производе лако испарљива једињења значајна за сензорна својства сирева. Међутим, ове катаболичке реакције и даље нису довољно добро разјашњене (McSweeney and Sousa, 2000).

Микроорганизми имају веома значајну улогу у процесу липолизе. Квасци, посебно врсте *Candida lipolytica* и *Cryptococcus laurentii* показују значајну липолитичку активност током зрења сирева (Lee and Lim, 1988a, b). Такође, квасац *Debaryomyces hansenii* се често налази у сиревима и замрзнутој храни (Freitas *et al.*, 1999, Fleet, 1990,

Guerzoni *et al.*, 1993). Липолитичком активношћу посебно се истиче квасац *Yarrowia lipolytica* (Freitas *et al.*, 1999). У већем броју сирева (Münster, Limburger, Armada, Camembert и др.) плесни *Geotrichum candidum* и *Penicillium camemberti* су означене као носиоци процеса липолизе (Boutrou and Guéguen, 2005, Ayati *et al.*, 2010).

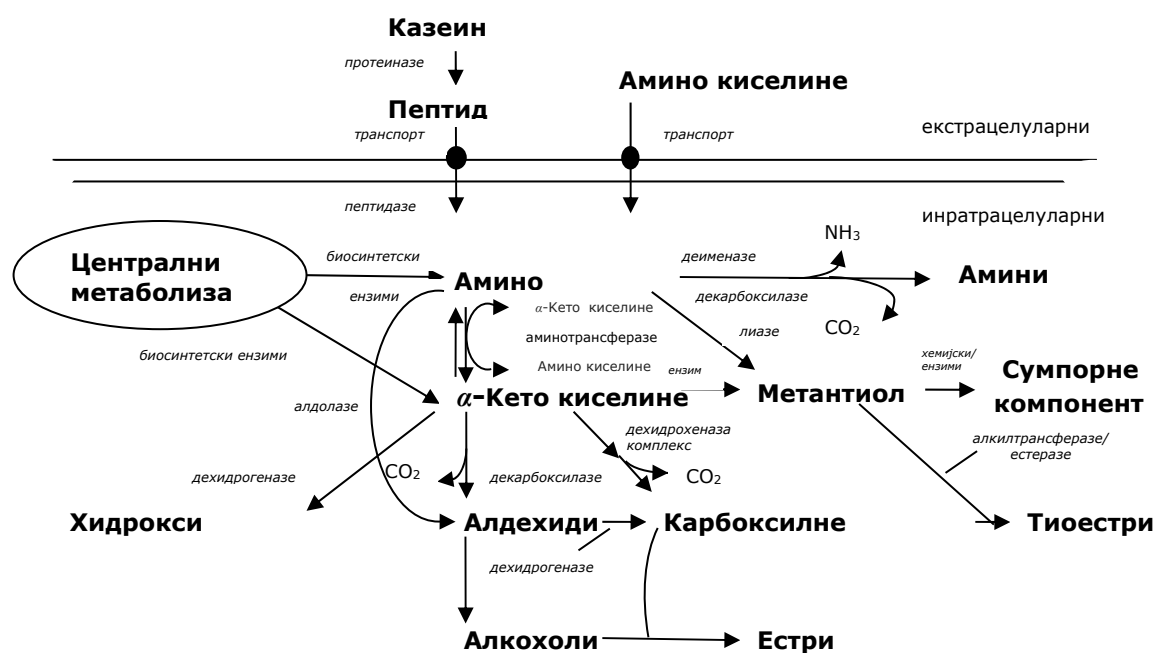
Неки пробиотски сојеви бактерија родова *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* и *Bifidobacterium* показују способност липолизе и производње коњуговане линолне киселине (CLA) у млечним производима укључујући и сиреве (Coakley *et al.*, 2003, Rodriguez-Alcala *et al.*, 2011, Rodriguez *et al.*, 2012). CLA настају природним путем преко бактеријске биохидрогенације линолне киселине у румену преживара помоћу више врста микроорганизама (Grinari *et al.*, 2000, Ha *et al.*, 1987). CLA имају антиканцерогено дејство, смањују могућност настајања артеросклерозе, побољшавају рад имуног система, убрзавају раст и утичу на смањење садржаја масног и повећање мишићног ткива код више животињских врста и представљају додатну корист за здравље потрошача (Pariza and Hargaves, 1985, Park, 1997; 2006).

Бактеријске врсте *E. faecium*, *E. faecalis*, *Lb. plantarum* и *Lb. paracasei* код сирева произведених од овчијег и козијег млека значајно доприносе високом нивоу липолизе (Freitas *et al.*, 1999, Macedo *et al.*, 1997). Липолитичка активност микроорганизама је у значајној вези са концентрацијом соли у воденој фази сирева, тако да је липолитичка активност по садржају и обиму интензивнија у распону од 0 до 7%, у односу на концентрацију NaCl од 7 до 14% (Freitas *et al.*, 1999).

### 2.5.3. Протеолиза

Протеолиза је сигурно најсложенија биохемијска промена која се одвија у току сазревања већине врста сирева и утиче, у великој мери, на развој текстуре разградњом казеина (слика 2.9) и формирање укуса настајањем прекурсора који се даље конвертују у испарљива ароматична једињења (Fox and McSweeney, 1996, Sousa *et al.*, 2001, Farkye and Fox, 1990, Fox *et al.*, 1999, Martinez-Cuesta *et al.*, 2001). У променама које се дешавају у сиру током зрења, промене на протеинима и њиховим продуктима разградње су најзначајније, па се под зрењем сирева у ужем смислу подразумевају промене настале на протеинима. Карактеристике протеолитичких промена су повезане са поступком израде сирева, условима зрења и активношћу микроорганизама, па су ове промене карактеристичне за поједине врсте сирева и имају одлучујући значај у

формирању сензорних карактеристика, конзистенције и реолошких карактеристика сирева (Бараћ и др., 2006, Јованов и др., 2006).



Слика 2.9. Преглед општих путева синтезе једињења одговорних за укус сирева (Kranenburg *et al.*, 2002)

У активне протеолитичке чиниоце спадају ензими (протеиназе и пептидазе) који потичу из пет различитих извора: из млека (плазмин), коагуланата-сирила (пепсин и химозин), стартерских, нестартерских или допунских ("adjunct") стартер култура (Hayaloglu *et al.*, 2004, Sousa *et al.*, 2001). Протеолитичке промене у сиревима се одвијају у три фазе: протеолиза у млеку, протеолиза ензимском коагулацијом млека и протеолиза током зрења сирева. У сиревима се протеолиза манифестује на најмање четири начина (Бараћ и др., 2006, Fox *et al.*, 1993):

- 1) утицајем на формирање ароме сира образовањем аминокиселина и пептида, од којих неки могу да изазову мане укуса (на пример, горак укус) или индиректно катаболичким процесима разградње аминокиселина до амина, киселина, тиола и тиоестара,
- 2) ослобађањем компонената укуса за време жвакања,
- 3) променом рН услед образовања амонијака и
- 4) променом текстуре која настаје изменама на протеинском матриксу уз повећање рН и способности везивања воде због новоформираних аминок и карбоксилних група.

Протеолитичке трансформације у процесу зрења сирева се јављају као примарна протеолиза (основно зрење) или секундарна протеолиза (допунско зрење). Примарна протеолиза јавља се код већине сирева, нарочито код којих се формира кора, а резултира формирањем великих пептида, од којих се даље разградњом добијају мањи пептиди и слободне аминокиселине. Примарна протеолиза је последица активности два протеолитичка ензима, заосталог сирила и плазмина за који се сматра да има најважнију улогу у зрењу различитих врста сирева. Биохемијске промене код овог начина зрења одвијају се истовремено у читавој сирној маси, изузимајући кору где су ови процеси веома спори или се не одвијају због смањеног садржаја воде и већег садржаја соли.

Код секундарне протеолизе главну улогу играју ензими протеиназа и пептаза, који су пореклом од стартерских БМК. Ова врста биохемијске промене карактерише зрење код полутврдих и меких сирева, а најинтензивније промене се дешавају управо на површини сирева. Током овог процеса образује се читав низ ароматичних једињења која су својствена одређеној врсти сира и дају спектар сензорних својстава сиру. Ова ароматична једињења продиру у унутрашње структуре сирева и дају допринос специфичној ароми преврелих-зрелих сирева (Бараћ и др., 2006).

Иако су БМК слаби протеолити, имају протеиназа/пептидаза систем способан да хидролизује олигопептиде у мање пептиде и аминокиселине (Fox and McSweeney, 1996, Kunji *et al.*, 1996, Law and Naandrikman, 1997).

#### **2.5.4. Лакоиспарљиве компоненте у сиревима**

Током зрења сира, бројне биохемијске реакције учествују у формирању ароме поједине врсте сира. Ароматична једињења у сиревима (табела 2.8.) су продукти разградње три главна конституента млека: лактозе, липида и протеина (Smit *et al.*, 2002).

Сир је биохемијски динамичан производ и подлеже значајним променама током његовог периода зрења. Код највећег броја младих сирева, тесто је најчешће благог и веома сличног укуса. Током периода зрења мења се укус, јер се код сваке врсте продукују карактеристична једињења која дају особеност појединој врсти сира (McSweeney, 2004).

Табела 2.8. Лакоиспарљива ароматична једињења изолована из различитих сирева (Marilley and Casey, 2004).

<b>Акохоли</b>	изохексанал	<b>Естри</b>	метилсулфид
1,2-бутандиол	2-метилбутанал	етил етаноат	хексантиол
2-бутанол	3- метилбутанал	етил бензоат	<b>Азотне компоненте</b>
етанол	2-метилпропанал	етил бутаноат	2-ацетил-1-пиридин
2-етил-1-бутанол	нонанал	етил хексаноат	<b>Пиразини</b>
2-етилхексанол	( <i>E,E</i> )-2,4-нонадиенал	етил изобутаноат	2,3-диетил-5-метилпиразин
2-хептаноол	( <i>Z</i> )-2-ноненал	етил октаноат	2-етил,3-5-диметил-пиразин
хексанол	( <i>E</i> )-2-ноненал	етил 2-метилбутаноат	2-метокси-3-изопропилпиразин
изобутанол	октанал	етил 3- метилбутаноат	<b>Фурани</b>
2-метилбутанол	пентанал	изобутил бутаноат	2-етил-4-хидрокси-5-метил-3-(2H)фуранон
3- метилбутанол	пропанал	3-метилбутил ацетат	3-хидрокси-4,5-диметил-2-(5H)фуранон
2-метилпропанол	пропенал	метил-2-метилбутаноат	4-хидрокси-2,5-диметил-3-(2H)фуранон
2-нонанол	тиофен-2-алдехид	3-октилацетат	тетрахидрофуран
( <i>Z</i> )-1,5-октадиен-3-ол	<b>Кетони</b>	пентил ацетат	<b>Фенолне компоненте</b>
2-октанол	ацетоин	фенилетил ацетат	<i>p</i> -крезол
1-октен-3-ол	ацетон	пропил бутаноат	<b>Масне киселине</b>
2- пентанол	2,3-бутандион (диацетил)	<b>Лактони</b>	бутерна киселина
фенилетанол	2-бутанон	$\delta$ -декалактон	хексанска киселина
2- фенилетанол	$\beta$ -дамасценон	$\gamma$ -декалактон	деканска киселина
1-пропанол	2-хептанон	$\delta$ -додекалактон	изобутанска киселина
2- пропанол	2-хексанон	$\delta$ -окталактон	2-метилбутанска киселина
<b>Алдехиди</b>	3-метил-2-бутанон	( <i>Z</i> )-6-додецен- $\gamma$ -лактон	3- метилбутанска киселина
ацеталдехид	2-нонанон	<b>Сумпорне компоненте</b>	октанска киселина
деканал	3-октанон	диметил дисулфид	пропионска киселина
хептанал	1-октен-3-он	димети сулфид	валеријанске киселина
( <i>Z</i> )-4-хептанал	2-пентанон	диметил трисулфид	
хексанал	2-тридеканон	метантиол	
2- хексанал	2-ундеканон	метионал	

Развој сензорних карактеристика сир(ев)а је сложен процес у коме су укључени ензими из млека, сирило, стартер културе и нестартерске микробиота (Dumont and Adda, 1979).

### 2.5.5. Органске киселине у сиревима

Органске киселине се јављају у млечним производима као резултат метаболичких процеса и трансформације протеина, масти, лактозе и цитрата у току производње и складиштења. Органске киселине играју важну улогу у стварању ароме млечних производа и тако доприносе квалитету сирева. Многи истраживачи наводе ниво неких органских киселина као показатељ активности стартер култура и неких БМК током зрења сирева (Cargeri *et al.*, 1996; Califano and Bevilacqua, 1999).

Садржај органских киселина може указивати на правилан ток ферментације, врсту ферментације и може бити индикатор одступања од очекиваног тока сазревања, и потенцијалних дефеката код сирева (Cargeri *et al.*, 1996; De Liano *et al.*, 1996). Утврђено је да се профили органских киселина разликују код различитих врста сирева, јер су поједине органске киселине значајне за типичан укус појединих сирева

(Monalaki *et al.*, 2006; Abd El-Salam and Alichanidis, 2004). У сиревима могу бите присутне млечна, лимунска, сирћетна, јабучна, пропионска и друге органске киселине (Park and Haenlein, 2006).

## **2.6. Методе за идентификацију БМК**

Поуздане и селективне методе за идентификацију микроорганизама имају посебну улогу у праћењу промена микробиоте ферментисаних производа. Поред тога, ове методе су важне и у избору одговарајућих стартер култура. Развијен је велики број метода (табела 2.9) које се могу користити за идентификацију БМК, при чему се последњих година највећа пажња поклања молекуларним методама.

### **2.6.1. Фенотипске методе**

Фенотипска идентификација БМК заснива се на физиолошким, метаболичким/биохемијским и хемотаксономским методама. Ове методе се користе за рутинску анализу БМК у храни, а довољне су за грубу карактеризацију, али не и за идентификацију бактерија (González *et al.*, 2000; Montel *et al.*, 1991). Истраживања углавном показују да фенотипске методе имају своја ограничења због релативно слабе репродуктивности и ниске таксономске резолуције која често омогућава само диференцијацију до нивоа рода, тако да се данас углавном користе за прелиминарну идентификацију и груписање БМК. Предност ових метода је у ниској цени и једноставности (Temmerman *et al.*, 2004).

Табела 2.9. Методе за идентификацију БМК (Temmerman *et al.*, 2004)

Техника	Принцип	Ниво осетљивости	Моћ раздвајања	Поновљивост
<b>Фенотипске методе</b>				
Морфолошке анализе	Микроскопске анализе	Н	Ниво рода или мање	С
Физиолошке анализе	Карактеристике раста	С		Н
Биохемијска карактеризација	Асимилациони и ферментациони модели (API, BIOLOG,...)	Н	Ниво рода или мање	С
Протеински профил	SDS-PAGE целоуларних протеина	В	Ниво врсте	В
<b>Генотипске методе</b>				
Специфични прајмери	PCR са специфичним прајмерима	Н	Зависи од прајмера	В
Секвенцирање	Одређивање генске секвенце (16S rDNK)	В	Ниво рода или врсте	В
RFLP	Рестрикционе ензимске анализе (PEA) ДНК или PCR ампликона	С	Ниво врсте или соја	В
AFLP	Комбинација REA и PCR умножавања	В	Ниво врсте или соја	В
RAPD-PCR	PCR са случајним прајмерима	Н	Ниво врсте или соја	Н
Rep-PCR	PCR са понављајућим интергенским секвенцама	Н	Ниво врсте или соја	В
PFGE	PEA и pulsed-field гел електрофореза	В	Ниво соја	В
Риботајпинг	PEA и детекција са олигонуклеотидним пробама	В	Ниво врсте или соја	В
Хибридизационе пробе	ДНК- ДНК хибридизација са обележеним пробама	В	Ниво рода или врсте	В

(Н- ниска, С- средња, В- висока)

### 2.6.2. Молекуларне методе

Предности примене молекуларних метода су брзина, поновљивост и поузданост, као и независност од промена услова раста микроорганизама. Такође, једна од веома битних предности је омогућавање прецизног разликовања блиско повезаних врста, што



је иначе немогуће учинити само на основу фенотипских тестова (Temmerman *et al.*, 2004). Молекуларне методе показују различите нивое селективности, од врсте до нивоа диференцијације појединачних сојева (типизација).

Многе генотипске методе засноване су на принципу полимераза ланчане реакције (PCR- Polymerase Chain Reaction), који омогућава селективну амплификацију од посебно циљаних ДНК фрагмената кроз употребу олигонуклеотидних прајмера под контролисаним условима реакције. Метода ланчане реакције полимеризације ДНК састоји се у умножавању ДНК између инсерционих секвенци или репетитивних генетичких елемената. Реакција користи два олигонуклеотида (прајмера) који су комплементарни крајевима секвенце која се умножава и који су међусобно супротно орјентисани. Синтеза ДНК је катализована термостабилном ДНК полимеразом. Понављање циклуса, од којих се сваки састоји од денатурације ДНК, хибридизације прајмера и екстензије хибридизованих прајмера од стране термостабилне ДНК полимеразе, за резултат има експоненцијално умножавање специфичног ДНК фрагмента. Крајеви умноженог фрагмента су дефинисани 5' крајевима прајмера, а њихова величина одређена је растојањем између секвенци које прајмери „препознају“ (Даниловић, 2012).

Rep-PCR геномски ”fingerprinting” (од: Repetitive Extragenic Palindromic) је метода идентификације БМК заснована на умножавању конзервисаних репетитивних секвенци ДНК које су присутне у више копија у геному код већине грамнегативних и неколико грампозитивних бактерија (Lupski and Weinstock, 1992). Код бактеријског генома пронађене су и дефинисане три фамилије репетитивних секвенци: 35-40 базних парова (bp) репетитивне екстрагенске палиндромске секвенце (REP), 124-127 bp ентеробактеријске репетитивне интрагенске концензус секвенце (ERIC) и 154 bp BOX елемент (Versalovic *et al.*, 1994).

Репетитивне секвенце су присутне у различитом броју копија у геному. Међутим, њиховим раздвајањем, тј. раздвајањем умножених фрагмената на агарозном гелу добија се карактеристичан распоред трака у зависности од бактеријске врсте. Даљим упоређивањем добијеног ”fingerprinting” непознате врсте са подацима у бази података може се идентификовати непозната бактеријска врста. У ту сврху је најчешће коришћен (GTG)<sub>5</sub> прајмер кога чине пет пута понављајуће интрагенске GTG секвенце које су у геному бактерија. При идентификацији ентерокока и лактобацила, уколико се упореде резултати добијени Rep-PCR са BOX, REP и (GTG)<sub>5</sub> прајмерима, доказано је

да се са (GTG)<sub>5</sub> прајмером добијају продукти са највећим бројем трака (Gevers *et al.*, 2001).

Rep-PCR са (GTG)<sub>5</sub> прајмером коришћен је код идентификације БМК изолованих из већег броја сирева и млечних производа (Kagkli *et al.*, 2007, Terzić-Vidojević *et al.*, 2007, Nikolić *et al.*, 2008). Ова метода је у односу на друге PCR методе поузданија, има високу моћ раздвајања, поновљивости, брзине и примене на већем броју бактеријских врста (Gevers *et al.*, 2001).

За идентификацију БМК изолованих из сирева могу се користити различите методе, али најчешће коришћена метода је умножавање и секвенцирање дела 16S рДНК (Terzić-Vidojević *et al.*, 2009). Секвенце се по добијању упоређују са секвенцама у одговарајућим базама података од којих су најпопуларније EMBL и Genbank. Ова метода и тип секвенцирања највише зависи од поузданости и таксономске тачности коришћене базе података (Nübel *et al.*, 1996). Такође, ова метода није прецизна код разликовања одређених сродних бактерија, нарочито врста које имају велику хомологију секвенци у овире овог региона. Неки сродни лактобацили (на пример, *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum* и *Lb. pentosus*) (Singht *et al.*, 2009) и неки представници рода *Enterococcus* (на пример, *E. gallinarum* и *E. casseliflavus*) (Ogier and Serror, 2008) не могу бити детерминисани на основу секвенцирања 16S r ДНК.

### **2.6.3. Фуријеова трансформациона инфрацрвена спектроскопија**

Фуријеова трансформациона инфрацрвена спектроскопија (FTIR) се користи за идентификацију бактерија од 80. година прошлог века. Овом техником мери се укупан састав бактерија без разарања ћелије, врши се снимање IR спектра са опсезима из свих ћелијских компонената, као што су ћелијска мембрана, ћелијски зид, протеини и нуклеинске киселине. Снимљени IR спектар може се сматрати својеврсним отиском микроорганизама (Naumann *et al.*, 1991).

Различите студије су показале да се FTIR спектри могу користити за разликовање и идентификацију већег броја микроорганизама на различитим таксономским нивоима (Mariey *et al.*, 2001). Предности ове методе су брзина, једноставност, поновљивост, релативно ниска цена, поузданост и могућност за комплетну компјутеризацију (Dziuba and Nalera, 2012, Maity *et al.*, 2013). Техника има велики потенцијал за идентификацију и класификацију БМК изолованих из различитих прехранбених производа, као што су

пиво (Hugas *et al.*, 1993), млеко (Weinrichter *et al.*, 2001), сиреви (Amiel *et al.*, 2000, Weinrichter *et al.*, 2001, Oust *et al.*, 2004, Savić *et al.*, 2008), кефир (Bosch *et al.*, 2006), производи од меса (Oust *et al.*, 2004, Mouwen *et al.*, 2011). Развој FTIR спектроскопије и статистичка обрада података омогућили су бољу карактеризацију микроорганизама математичким поређењем и анализом њихових FTIR спектара (Helm *et al.*, 1991).

Инфрацрвено зрачење може побудити одређене молекулске групе, при чему као резултат побуђивања настају вибрације на тачно одређеним таласним дужинама. Озрачивањем узорка континуалним спектром IR зрачења настају карактеристичне апсорпционе траке (Mouwen *et al.*, 2011). FTIR спектар бактерија је специфичан за одређену врсту и показује спектралне карактеристике ћелијских компонената. Тако, FTIR спектри микробних ћелија се састоје од конгломерата широких апсорпционих трака које се преклапају што отежава интерпретацију спектара (Dziuba *et al.*, 2007).

Припрема узорка се најчешће врши припремом KBr пастила (Savić *et al.*, 2008) или наношењем на ZnSe плоче (Maity *et al.*, 2013, Oust *et al.*, 2004). Снимљени FTIR спектри се даље обрађују стандардизацијом спектара да би се они касније упоређивали. Стандардизација спектара се може урадити на неколико начина, али већи број аутора наглашава да је најбољи начин израчунавање првог или другог извода спектра (Bosch *et al.*, 2006).

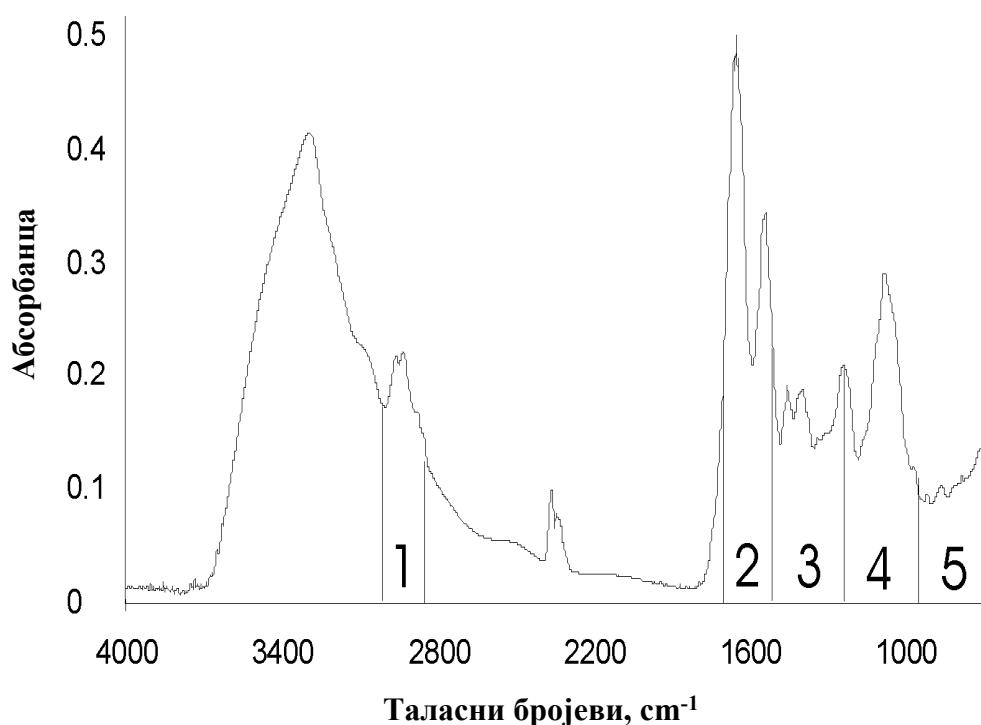
Због уочавања разлике код спектара различитих узорака, потребно је трансформисати IR спектре и извршити њихову анализу применом различитих статистичких метода као што су: хијерархијска кластер анализа (Bosch *et al.*, 2006, Helm *et al.*, 1991), дискриминациона анализа (Maquelin *et al.*, 2003, Mouwen *et al.*, 2005), анализа главних компоненти (Kansiz *et al.*, 1999), кореспонденциона анализа (Naumann *et al.*, 1988), каноничка анализа (Lefier *et al.*, 1997) или вештачке неуронске мреже (Mouwen *et al.*, 2006, Godacre *et al.*, 1996).

Карактеристичан FTIR спектар лактобацила и поједини спектрални региони приказани су на слици 2.9. На спектру се издваја пет региона, и то:

- **регион 1** - ( $3100-2800\text{ cm}^{-1}$ ), садржи информације о масним киселинама ћелијске мембране (Dziuba *et al.*, 2007),
- **регион 2** ( $1800-1500\text{ cm}^{-1}$ ) пружа информације о амидним везама које потичу из протеина и пептида,

- **регион 3** ( $1500-1200\text{ cm}^{-1}$ ) у коме се налазе информације о протеинима и масним киселинама,
- **регион 4** ( $1200-900\text{ cm}^{-1}$ ) информације о полисахаридима из ћелијског зида и
- **регион 5** ( $900-500\text{ cm}^{-1}$ ) је “прави” фингерпринт регион који садржи траке које не могу бити асигниране специфичним функционалним групама (Oust *et al.*, 2004).

При анализи података користе се само делови спектра који показују карактеристике значајне за дату анализу. Избор региона који ће бити узет у обзир зависи од типа микроорганизама и од сврхе анализе. Тако, за раздвајање и идентификацију лактобацила користи се област између  $720$  и  $1400\text{ cm}^{-1}$  који обухвата мешовиту област и фингерпринт регион (Oust *et al.*, 2004, Savić *et al.*, 2008).



Слика 2.9. Изглед FTIR спектра бактерије *Lb. sakei* 116 са карактеристичним областима (Oust *et al.*, 2004).

За FTIR спектроскопску идентификацију БМК, потребно је формирати одговарајућу базу података са што већим бројем референтних сојева и применити стандардне услове раста. Истраживања су показала да FTIR спектар не зависи од конзистенције подлоге (течна или чврста), количине узорка и примењене спектроскопске технике (Savić *et al.*, 2008).

### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

#### 3.1. Материјал

##### 3.1.1. Узорци качкаваља

Качкаваљ је израђен по традиционалном поступку у Млекарској школи са домом ученика ”Др Обрен Пејић” у Пироту. Као сировина коришћено је пуномасно кравље и пуномасно овчије млеко. Основни физичко-хемијски параметри квалитета крављег и овчијег млека коришћеног за израду крављег качкаваља су приказани табелом 3.1.

Табела 3.1. Параметри квалитета млека коришћеног за израду качкаваља

Параметар	Кравље млеко	Овчије млеко
Садржај млечне масти (%)	3,2-3,8	7,5-8
Садржај суве материје без масти (%)	8,5-9,2	12,5-12,8
Киселински степен (°SH)	6,7-6,8	7-7,5
Густина (g/cm <sup>3</sup> на 20°C)	1,028-1,030	1,030-1,032

Након подсиравања млека издвајана је сурутка, а груш је затим пресован и остављен да сазрева. Зрела сирна грудa (баскија) је парена у казану са врелом водом (72-75°C), а након тога је вршено солјење и калуљење. Зрење качкаваља вршено је традиционално у првој фази на 25 °C, 10-15 дана, а затим на 10°C у расхладној комори у периоду од два месеца.

За праћење микробиолошких и хемијских промена у току зрења качкаваља припремљеног од крављег (КК) и овчијег млека (ОК), анализирани су узорци након 1 (ознака 1), 5 (2), 20 (3), 30 (4) и 60 (S) дана зрења.

Узорци су након узорковања паковани у вакууму, транспортовани и чувани до 3 дана на ≈+5°C до момента вршења микробиолошких анализа. За хемијска истраживања коришћени су исти узорци који су конзервисани дубоким замрзавањем на ≈-20°C.

### 3.1.2. Медијуми за гајење микроорганизама

Микробиолошка истраживања овог рада су обављена на следећим хранљивим подлогама:

1. M17 агар (Merck, Немачка)
2. MRS агар (Торлак, Београд, Србија)
3. MSE агар (триптон 10 g/l, желатин 2,5 g/l, екстракт квасца 5 g/l, сахароза 100 g/l, глюкоза 5 g/l, Na-цитрат 1 g/l, Na-азид 0,075 g/l и агар 13 g/l).
4. Хранљиви агар (Торлак, Београд, Србија)
5. Цитратни агар (обрано млеко 10 g/l, хидролизат казеина 2,5 g/l, глюкоза 5 g/l и агар 18 g/l рН 6,6. Након завршене стерилизације у подлогу је додавано по 10 ml стерилног раствора А (10%  $K_3Fe(CN)_6$ ) и раствора В (0,025 g/ml Fe-цитрат и 0,025 g/ml Na-цитрат)
6. Ентеро агар (HiMedia, Mubai, India).
7. Ескулин бујон (Торлак, Београд, Србија)
8. Аргинин бујон (Триптофан 5 g/l, L-аргинин 3 g/l, глюкоза 0,5 g/l и  $K_2HPO_4$  2 g/l)
9. LАРТg подлога (15 g/l пептон, 10 g/l триптон, 10 g/l екстракт квасца, 10 g/l глюкоза, 15 g/l агар, 0,01 ml/l tween 80 и 3 g/l говеђа жуч).

### 3.2. Методе

#### 3.2.1. Изолација и одређивање броја БМК

Узорци качкаваља (по 10 g) су асептично пренети у 90 ml 2% Na-цитрата ( $t= 45$  °C), и хомогенизовани у трајању од 30 минута. Изолација БМК извршена је методом сукцесивног разређења. Након преношења 1 ml одговарајућег разређења у петри плоче са хранљивим подлогама и очвршћавања првог слоја, за раст БМК у плоче је наливан додатни слој исте подлоге како би се постигли микроаерофилни услови. За одређивање укупног броја бактерија преко 1 ml одговарајућег разређења наливан је један слој одговарајуће подлоге. Обележене плоче су инкубирани на одговарајућим оптималним температурама (30 и 45 °C) раста.

За испитивање присуства термофилних и мезофилних *Lactobacillus* врста, коришћен је MRS агар (Торлак), и температуре инкубације 30 и 45°C у анаеробним условима (BBL GasPak System, USA). Присуство термофилних и мезофилних *Lactococcus* врста праћено је на M17 агару. *Leuconostoc* врсте су издвајане на MSE (Mayeux, Sandine, Elliker) агару који је припреман по одговарајућој рецептури (Annonymous 3).

Укупан број мезофилних бактерија одређен је бројањем израслих колонија након 48 h инкубације на плочама са хранљивим агаром (Торлак, Београд, Србија). Број БМК одређен је након инкубације (48 h, 30 и 45 °C) на плочама са MRS и M17 агаром и инкубације (48 h, 30 °C) на плочама са MSE агаром.

Након инкубације, издвајано је минимално 30 колонија из сваког узорка. Пречишћавање изолованих бактерија извршено је стандардном методом исцрпљивања езе. Прелиминарна идентификација изолата извршена је бојењем по Граму и тестом на каталазу, док је чистоћа сваког изолата и облик ћелија проверен микроскопским посматрањем. Бактеријске културе су чуване у одговарајућим микротубама са пуферисаним течним подлогама (MRS и M17 бујону), уз додатак 20 % глицерола, у смрзнутом стању на  $\approx - 20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.2. Фенотипска карактеризација БМК изолата

Грампозитивни и каталаза-негативни изолати су подвргнути даљем испитивању на основу идентификационих шема за родове *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* и *Leuconostoc* (Bergey`s Manuel, 1986).

Примењени су следећи тестови за карактеризацију:

- Раст у бујону на 45 °C и 15 °C,
- Раст у млеку,
- Продукција CO<sub>2</sub>,
- Способност хидролизе аргинина,
- Способност хидролизе ескулина,
- Раст у медијуму са 6,5 % NaCl, и
- Раст на ентеро агару

Раст у млеку праћен је у 10% суспензији реконструисаног обраног млека које је стерилисано 15 минута на 121 °С.

Тестирање продукције CO<sub>2</sub> из глукозе рађено је у реконституисаном MRS медијуму (бакто-протеиназни пептон, 10 g/l; месни екстракт, 8 g/l; екстракт квасца, 4 g/l; Tween 80, 1 ml; NH<sub>4</sub>-цитрат, 2 g/l; Na-ацетат, 5 g/l; Mg-сулфат, 0,2 g/l; Mn-сулфат, 0,04 g/l; Na-фосфат, 2 g/l и глукоза, 20 g/l) са Durham-овим цевчицама.

За тестирање способности хидролизе аргинина коришћен је аргинин бујон, док је за утврђивање способности хидролизе ескулина коришћен ескулин бујон (Торлак, Београд, Србија). Након инкубације, аргинин бујону је додато неколико капи фенил-црвеног (појава црвене боје означава позитивну реакцију, а жута боја негативну), док је ескулин бујону додато неколико капи 2% раствора FeCl<sub>3</sub> (позитивна реакција је појава црног талога).

Раст у медијуму са 6,5 % NaCl праћен је у MRS бујону са додатком 6,5 % NaCl. Замућење ове подлоге након инкубације је потврда раста одговарајућег изолата.

За прелиминарну идентификацију ентерокока коришћен је ентеро агар (ескулин жучни агар) (HiMedia, Mubai, India). Појава црних колонија указује на присуство ентерокока.

### **3.2.3. FTIR спектроскопска анализа изолата БМК**

За FTIR спектроскопску анализу изолати БМК су гајени на MRS агару током 48 ± 1h на температури од 30°C. Пастиле за анализу су припремане са око 3 mg биомасе колонија, које су хомогенизоване са 150 mg KBr (Merck, Germany), а затим у вакууму компримоване током 5 минута под притиском од 200 MPa у танак диск пречника 13mm.

IR спектри испитиваних изолати БМК снимани су на FTIR уређају BOMEM MB-100 Spectrometer (Hartmann & Braun, Quebec, Canada) опремљеним DTGS детектором модела D31B, док је за добијање података коришћен софтвер Win-Bomem Easy 3.1. Спектри изолати снимани су у области таласних дужина између 4000 - 400 cm<sup>-1</sup>, при чему је сваки узорак сниман 3 пута са спектралном резолуцијом 4 cm<sup>-1</sup>.

Због минимизирања утицаја количине узорка, спектрима је подешавана базна линија и израчунаван први извод по Savitzki-Golay алгоритму смутовањем са 9 тачака.



Израчунавање извода је урађено у РС програму Origin 5.0 (Microcal Softwer. SAD). Обрађени спектри су, затим, пребачени у РС програм Statistica 7.0 (StatSoft, SAD). У одређивању степена сродности између бактеријских спектра коришћена је хијерархијска кластер анализа (НСА), где су апсорбационе јединице спектра изолата представљале променљиве, а таласни бројеви случајеве. За груписање спектра примењен је Ward-ов метод, док је Pearson-ов корелациони коефицијент коришћен за израчунавање сличности између спектра.

#### **3.2.4. Молекуларна идентификација изолата**

Идентификација изолата БМК извршена је на Институту за молекуларну генетику и генетичко инжењерство у Београду. Екстракција укупне ДНК из чистих култура БМК, умножавање њихових ДНК фрагмената PCR реакцијом са (GTG)<sub>5</sub>-прајмером и електрофореза извршени су по већ описаној методи (Nikolić *et al.*, 2008). Груписање је извршено у програму Statistica 7.0 (StatSoft Inc. USA) употребом алгорита “Unweighed Pair-Group Average Linkage Analysis”. Растојање између кластера одређено је на основу процента неслагања.

Код секвенцирања 16S rRNK гена умножавање фрагмената је вршено помоћу U968 (5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3') и L1401 (5'-GCGTGTGTACAAGACCC-3') прајмера (Zoetendal *et al.*, 1998; Randazzo *et al.*, 2002) употребом Taq DNK полимеразе. Реакција је изведена у PCR System-у 2700 (Applied Biosystems) са следећим параметрима у програму: почетна денатурација ДНК током 5 мин. на 94 °C, 30 циклуса од 30 s на 94°C, 30 s на 55 °C, 30 s на 72 °C и 7 мин. на 72 °C. Електрофореза умножених продуката рађена је на 1% агарозном гелу са додатком етидијум бромида. Умножени фрагменти су пречишћени коришћењем QIAquick PCR Purification KIT/250 (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) док је њихово секвенцирање извршено у Макрогену у Сеулу, Јужна Кореја. BLAST алгоритам (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) је коришћен за одређивање најсличније секвенце из NCBI базе.

### 3.2.5. Хемијске анализе

#### 3.2.5.1. Одређивање органских киселина HPLC анализом

Екстракција органских киселина из узорака рађена је раствором  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 5mM. Узорак качкаваља (4 g) је хомогенизован са 10 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 5mM мешањем на магнетној мешалици у трајању од 1 сата. Након одвајања горњег масног слоја додавано је 100  $\mu\text{l}$  Carrez-a I ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 150 g/l) и Carrez-a II ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 300 g/l) за обарање протеина, а узорци су затим центрифугирани 15 мин на 5000 rpm (Biofuge, Thermo Scientific, USA). Након центрифугирања супернатант је филтриран кроз микрофилтере са порама величине 0,45  $\mu\text{m}$ .

Детекција органских киселина извршена је на Aminex HPLC-87H колони (7,8 x 300 mm, Biorad Laboratories) на хроматографу Agilent 1100 Series. Након наношења 20  $\mu\text{l}$  узорка, елуција је извршена са  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 5mM на температури од 50°C и протоку од 0,6 ml/мин. Органске киселине су детектоване на UV детектору на апсорбанци од 214 nm на основу ретенционих времена стандарда.

#### 3.2.5.2. Одређивање испарљивих једињења GC-MS анализом

Испарљиве компоненте из узорака качкаваља одређене су гасно-масеном спектрометријом (GC/MS) након екстракције испарљивих једињења у ваздушном слоју изнад узорка, техником без растварача помоћу микровлакана обложених полимерима која апсорбују испарљива једињења (HS-SPME - headspace solid-phase microextraction).

Узорак качкаваља (2 g) пренет је у стаклени суд од 50 ml који је затим, затворен силиконским затварачем и термостатиран 10 мин на 40°C у воденом купатилу. Након термостатирања, суд је пребачен на магнетну мешалицу, а влакно је убачено у простор изнад узорка. Адсорпција испарљивих једињења рађена је уз лагано мешање на магнетној мешалици на температури од 40°C у трајању од 20 мин. Испарљива једињења су екстрахована са два типа комерцијалних влакана (Supelco, Bellefonte, PA, USA) активним слојем:

1. полидиметилсилоксана (PDMS - 100 $\mu\text{m}$ ) и
2. полиакрилата (PA - 85 $\mu\text{m}$ ).

GC/MS анализе су рађене на уређају Hewlett-Packard 6890N са капиларном колоном HP-5MS (5% фенилметилсилоксан, 30m×0,25 mm, дебљина филма 0,25 µm) и масеним селективним детектором (Agilent Technologies, USA). Влакна засићена екстрахованим испарљивим једињењима излагана су 10 мин у ињектору уређаја на 250°C, а у циљу десорпције испарљивих једињења. Температура идентификације је била 45°C у року 5 мин, затим повећавана до 250°C брзином 10°C/мин и одржавана следећих 10 мин на тој температури. Проток гаса (хелијум) кроз уређај је одржаван константним 1 ml/min.

### **3.2.6. Технолошка и антимикробна карактеризација селектованих изолата БМК**

За технолошку карактеризацију издвојено је 107 изолата од укупно изолованих 315 (173 из овчијег и 142 из крављег качкаваља). Критеријуми на основу којих су издвајани изолати обухватили су пропорционалну заступљеност сваке врсте, а код изолата исте врсте са већом учесталашћу изоловања, издвајани су сојеви који су показивали незнатну физиолошку разлику од сојева исте врсте.

Технолошка карактеризација је извршена у циљу потенцијалног коришћења сојева у стартер културама за производњу качкаваља. За карактеризацију БМК извршени су следећи тестови:

- продукција диацетила,
- раст на цитратном агару,
- раст у присуству жучних соли и
- продукција егзополисахарида на: глюкози, малтози, лактози, сахарози, галактози и фруктози.

Продукција диацетила је испитивана након 24 ч инкубације изолата у млеку. Квалитативно одређивање диацетила вршено је додавањем 1 ml 30% NaOH и 1-2 mg креатинина у 1 ml згрушаног млека. Резултати су очитани након 1 сата, при чему је појава црвенкастог прстена означавала позитивну реакцију.

Способност коришћења цитрата рађена је на индикатор цитратном агару. Тамно плаве колоније указују да одговарајући сој може да користи цитрате (Kempler and McKay, 1980).

Раст изолата у присуству жучних соли праћен је на LAPТg подлози.

За детекцију и доказивање антимикробне активности изолата коришћене су две методе (Harris *et al.*, 1989), метод искапавања и дифузиона метода у бунарчићима.

Метод искапавања изведен је тако да се на добро осушене петри плоче искапавало 10  $\mu$ l преконоћне културе тестираног соја, а касније је остављено да се кап осуши на собној температури. После сушења петри плоче су преливане са 5 ml софт (0,7 %) MRS или M17 агара охлађеног на 42°C, који садржи  $10^5$ - $10^6$  ћелија индикаторског соја/ml медијума. Петри плоче су инкубирани преко ноћи на 30 °C или 37°C, а антимикробна активност је детектована појавом зоне инхибиције раста индикаторског соја у софт-агару, која се види као светла зона око колоније продуцента.

Дифузни метод у бунарчићима је рађен тако што су петри плоче са чврстим MRS или M17 подлогама преливане са 5 ml софт (0,7 %) HA или MRS агара у који је инокулисано  $10^5$ - $10^6$ /ml медијума ћелија индикатор соја (*Listeria* sp., *Listeria monocytogenes*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* BGMNI-596, *Lc. lactis* subsp. *lactis* NP-45). У софт агару су прављени бунарчићи пречника 5 mm у које је сипано 100  $\mu$ l преконоћне културе потенцијалног продуцента бактериоцина. Присуство антимикробних супстанци је детектовано на основу појаве светле зоне око бунарчића, као последица инхибиције раста осетљивог бактеријског соја.

Да би се потврдило да је бактериоцин протеинске природе, додаван је кристал проназе Е на саму ивицу бунарчића. Појава полумесечасте светле зоне инхибиције на месту додавања кристала проназе Е указује на протеинску природу бактериоцина.

### 3.3. Статистичка анализа

За обраду експерименталних резултата коришћене су технике мултиваријационе анализе у рачунарском програму Statistica 7.0 (StatSoft Inc. USA) за Windows, и то за експерименталне податке:

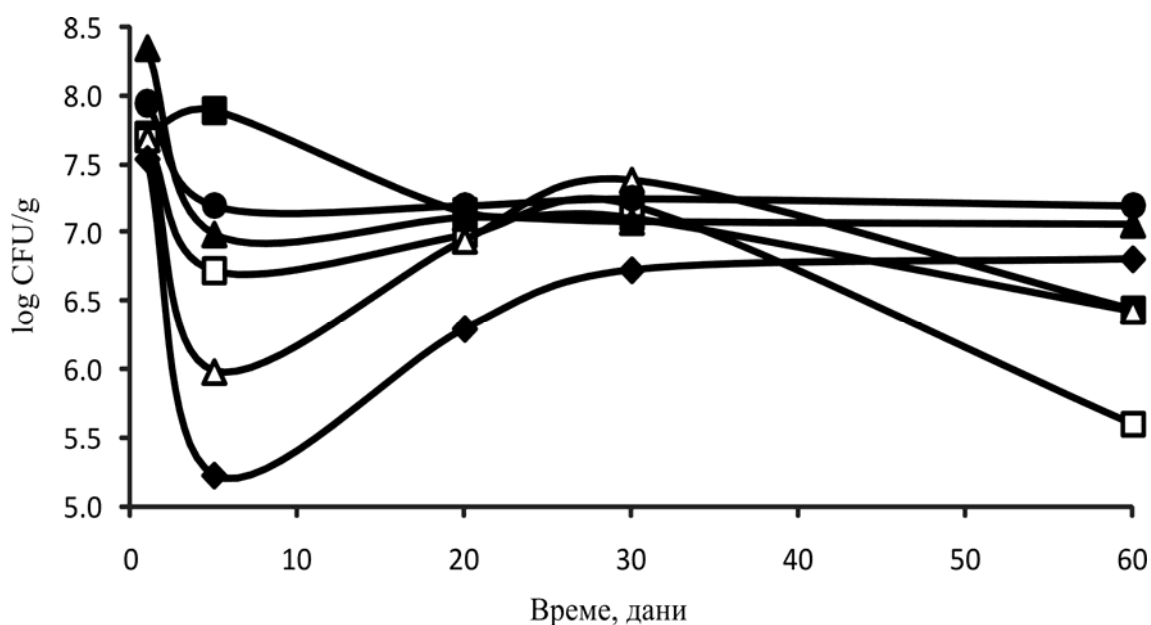
- FTIR спектра изолата - хијерархијска метода груписања (груписање извршено променом Ward-овог метода, а мера одстојања између спектра су израчуната применом Pearson-овог корелационог коефицијента),
- (GTG)<sub>5</sub> – PCR finger-принтова БМК - хијерархијска метода груписања (груписање извршено применом методе просечног повезивања, а мера одстојање између група је одређено на основу процента неслагања) и
- испарљивих компоненти добијених GCMS анализом - анализа главних компоненти.

## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1. Пиротски качкаваљ израђен од овчијег млека

#### 4.1.1. Одређивање броја мезофилних и термофилних бактерија

Промена укупног броја БМК у анализираним узорцима качкаваља припремљених од овчијег млека током зрења у трајању од 60 дана приказана је на слици 4.1. Укупан број бактерија одређен је у узорцима након 1, 5, 20, 30 и 60 дана зрења. Број мезофилних бактерија одређиван је на подлогама MRS, M17, MSE и HA, док је број термофилних одређиван на подлогама MRS и M17.



Слика 4.1. Промена броја бактерија током зрења Пиротског качкаваља произведеног од овчијег млека на плочама са MRS (■), M17 (▲), MSE (◆) и HA (●), инкубираним на 30 (пуни симболи) и 45°C (празни симболи)

У првих 5 дана зрења качкаваља, једино долази до благог повећања укупног броја мезофилних бактерија одређених на плочама са MRS агаром, са 7,7 на 7,8 log CFU/g, након чега до краја зрења, број опада до 6,4 log CFU/g (слика 4.1). Код свих

осталих анализа, број микроорганизама у првих 5 дана зрења опада. Тако, број мезофилних кокоидних бактерија гајених на M17 подлози у првих пет дана опада са 8,3 на 6,9 log CFU/g, након чега остаје релативно константан са вредношћу око 7,1 log CFU/g. Независно од подлоге на којима су гајене (MRS, M17), број термофилних бактерија опада у првих пет дана зрења, да би се након тога повећавао до 30. дана, а касније број континуално опадао до краја зрења. Укупан број мезофилних бактерија инкубираних на HA у првих пет дана се смањује од 7,9 на 7,2 log CFU/g, а та вредност се задржава до 60. дана зрења. Укупан број мезофилних бактерија инкубираних на MSE агару опада у првих пет дана од 7,5 до 5,2 log CFU/g, након чега се број у каснијим фазама зрења повећава до 6,8 log CFU/g (слика 4.1).

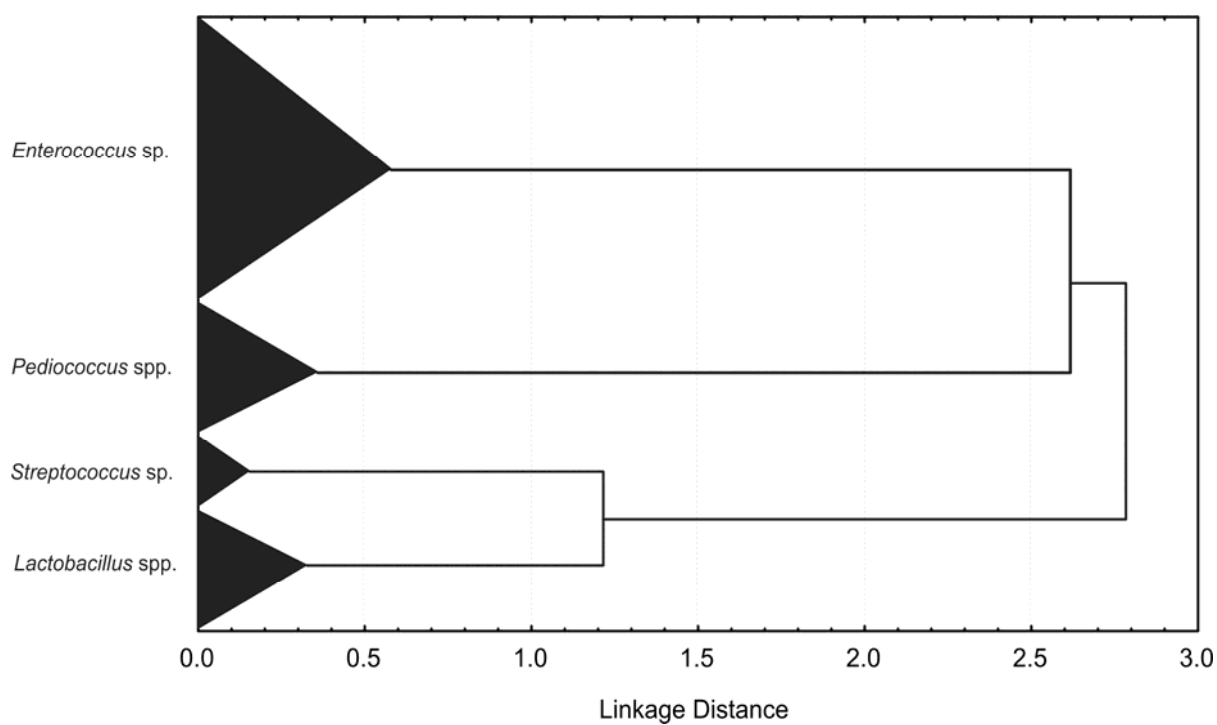
#### 4.1.2. Идентификација изолата БМК из овчијег качкаваља

Током зрења из 5 различитих узорак Пиротског качкаваља изоловано је укупно 173 изолата БМК. На основу морфолошке и физиолошке карактеризације (табела 4.1), као и ФТИР анализе (слика 4.2), изолати су груписани, а представници сваке групе су подвргнути молекуларним методама идентификације до нивоа врсте (слика 4.3).

Применом физиолошких тестова и анализом морфолошких особина сви изолати подељени су у 9 група. Већина изолата (130) припада кокама, док мањи број (43) по морфолошким карактеристикама припада бацилима. Применом FTIR анализе није било могуће извршити раздвајање изолата БМК припадника рода *Lactobacillus*. Такође, FTIR анализом није била могућа појединачна диференцијација у оквиру рода *Pediococcus*, јер су у оквиру кластера *Pediococcus* молекуларним методама идентификоване две врсте, *Pd. acidilactici* и *Pd. pentosaceus*. Током праћеног периода од 60 дана зрења доминирају врсте *Enterococcus faecium* (50%) и *Pediococcus acidilactici* (16%), док су најмање заступљене врста *Lactobacillus fermentum* (1%) и *Lactobacillus paracasei* (0,5%) (табела 4.1).

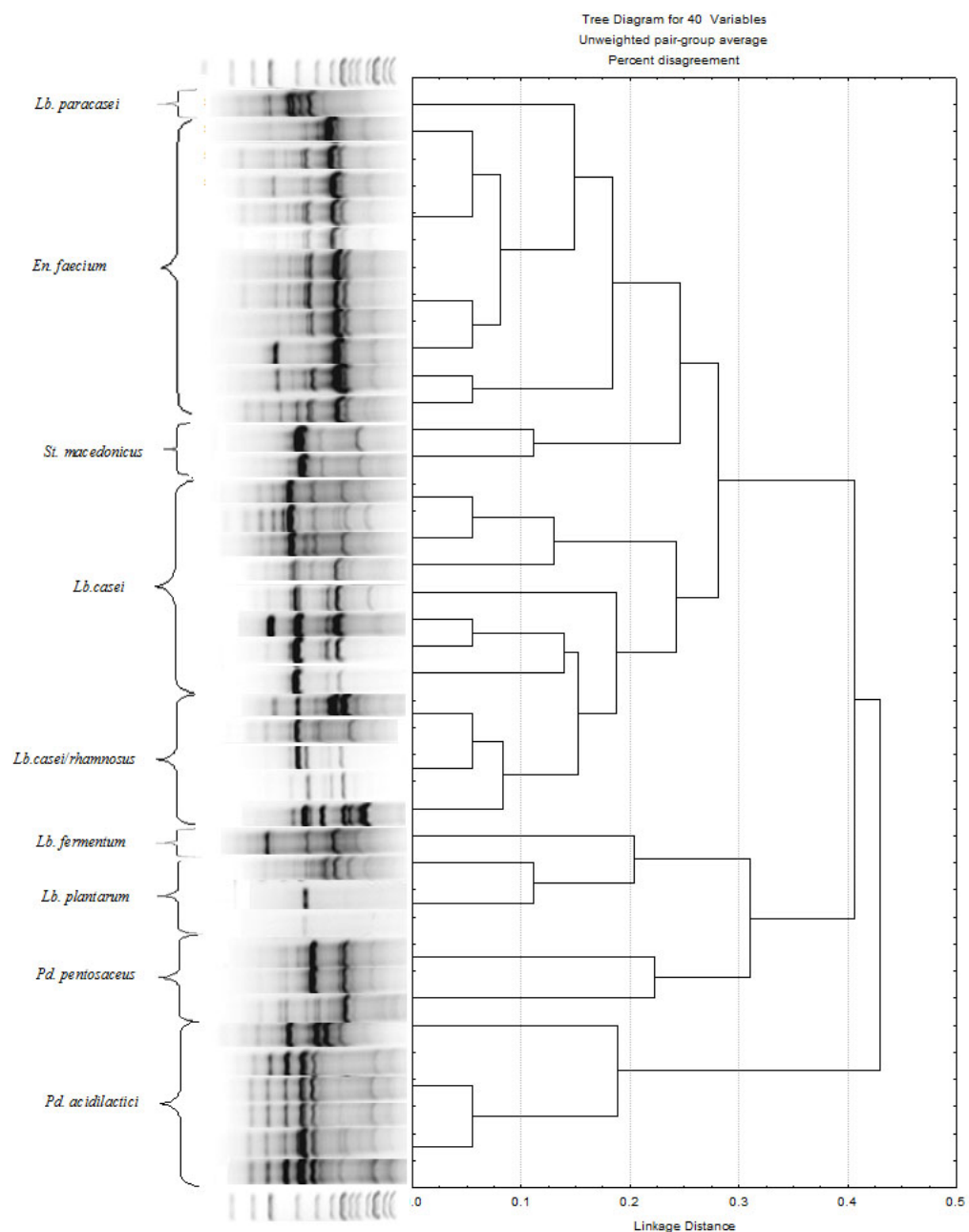
Табела 4.1. Диференцијација и идентификација изолата БМК изолованих из Пиротског качкаваља израђеног од овчијег млека

Група	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Број изолата	10	87	27	6	5	2	18	17	1
Морфологија ћелија	коке	коке	кокоид.	кокоид, тетраде	бацили	бацили	бацили	бацили	бацили
Формирање CO <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Хидролиза аргинина	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Хидролиза ескулина	-	-	-	+	-	+	-	+/-	-
Раст на 6,5% NaCl	+	+	-	-	+	-	-	-	+
Раст на Ентеро агару	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Идентификација 16S rDNA секвенцирањем	<i>St. macedonicus</i>	<i>En. faecium</i>	<i>Pd. acidilactici</i>	<i>Pd. pentosaceus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. casei/ rhamnosus</i>	<i>Lb. casei</i>	<i>Lb. paracasei</i>



Слика 4.2. Дендрограм статистичке анализе FTIR спектра БМК изолованих током зрења Пиротског качкаваља израђеног од овчијег млека. Груписање је извршено хијерархијском методом груписања применом Ward-овог метода, а мера одстојања између спектра су израчуната применом Pearson-овог корелационог коефицијента

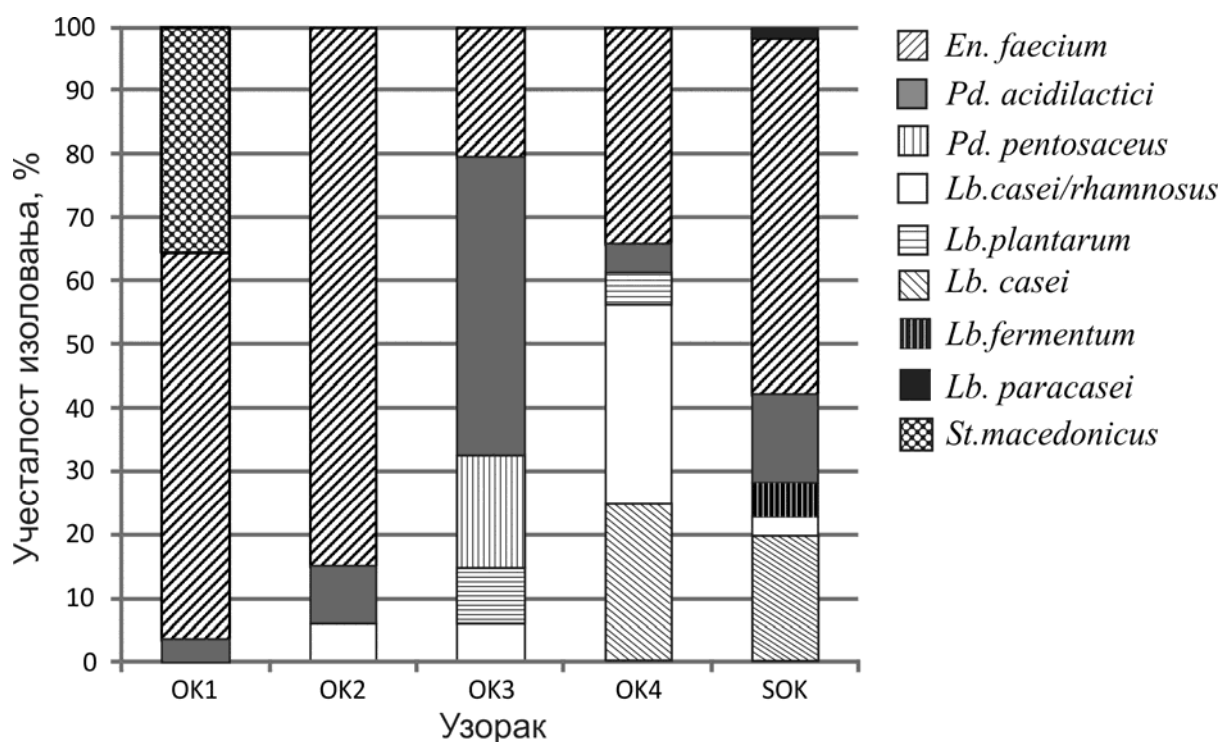




Слика 4.3. Дендрограм статистичке анализе (GTG)<sub>5</sub> – PCR finger-принтова БМК изолованих током зрења Пиротског качкаваља израђеног од овчијег млека. Груписање је извршено хијерархијском методом груписања уз примену методе просечног повезивања, а мера одстојање између група је одређено на основу процента неслагања

#### 4.1.3. Промена микробиоте током зрења Пиротског качкаваља израђеног од овчијег млека

Резултати праћења промене микробиоте током зрења качкаваља од овчијег млека приказани су на слици 4.4. Након 24 часа зрења (узорак ОК1), најзаступљенија је врста *En. faecium* (60%), док су изоловане и врсте *St. macedonicus* (36%) и *Pd. acidilactici* (4%). У узорку ОК2 (након 5 дана зрења) популација ентерокока *En. faecium* се повећава (85%), као и педиокока (9%), при чему нису изоловане стрептококе, али се по први пут јављају лактобацили, и то *Lb. casei/rhamnosus* (6%). Удео ентерокока значајно опада након 15 дана зрења (ОК3), при чему се значајно повећава учешће педиокока (*Pd. acidilactici* - 47% и *Pd. pentosaceus* -18%) и лактобацила (*Lb. casei/rhamnosus* 6% и *Lb. plantarum* 9%). У узорку ОК4 (након 30 дана зрења), идентификоване су *En. faecium* (34%), *Pd. acidilactici* (5%) и лактобацили, *Lb. plantarum* (5%), *Lb. casei/rhamnosus* (32%) и *Lb. casei* (24%). У узорку старом 60 дана (SOK), доминирају ентерококе *En. faecium* (55%), а такође, заступљени су *Lb. casei* (20%), *Pd. acidilactici* (14%) и *Lb. casei/rhamnosus* (3%). Једино у овом узорку идентификоване су врсте *Lb. fermentum* (5%) и *Lactobacillus paracasei* (3%).



Слика 4.4. Учесталост изолације различитих врста БМК током зрења Пиротског качкаваља израђеног од овчијег млека

#### 4.1.4. Хемијска анализа узорака качкаваља израђеног од овчијег млека

HPLC анализом, а на основу ретенционих времена стандарда органских киселина одређених на UV детектору при апсорбанси од 214 nm, у узорцима качкаваља детектоване су млечна, јабучна, лимунска и сирћетна киселина (табела 4.2). Пирогрожђана киселина је детектована само у траговима.

Табела 4.2. Концентрације детектованих органских киселина у узорцима овчијег качкаваља

Детектоване киселине (mg/g)	Период зрења			
	1 дан	5 дан	20 дан	30 дан
Лимунска	0,38	0,24	0,18	0,13
Јабучна	0,20	0,65	0,71	0,39
Млечна	3,57	6,35	6,52	4,32
Сирћетна	0,03	0,14	0,18	0,09

Концентрација млечне киселине нагло се повећава од 1 до 5. дана зрења са 3,57 на 6,35 mg/g, у периоду до 20. дана бележи се благо повећање до 6,52, а након тог периода вредност млечне киселине се смањила на 4,32 mg/g. Јабучна киселина се током зрења јавља у мањој концентрацији, а тренд повећања концентрације је сличан као код млечне киселине. Концентрација јабучне киселине се повећава у периоду од 1 до 20. дана са 0,20 на 0,71, а касније опада до 0,39 mg/g. Лимунска и сирћетна киселина су детектоване у ниској (од 0,03 до 0,38 mg/g) концентрацији и њихове вредности незнатно варирају током анализираног периода зрења.

#### 4.1.5. Хемијска анализа лакоиспарљивих компоненти Пиротског качкаваља израђеног од овчијег млека

Хемијска анализа узорака Пиротског качкаваља обухватала је одређивање испарљивих једињења GC-MS анализом. За екстракцију испарљивих једињења из узорака качкаваља коришћена је метода микроекстракције са полиакрилним (РА) и полидиметилсилоксанским (PDMS) влакнима. Упоредивањем ретенционих времена екстрахованих једињења на хроматограму са подацима из базе података

идентификовано је 56 испарљивих једињења која припадају различитим органским класама једињења (табела 4.3). Резултати за GC-MS анализе узорака Пиротског качкаваља приказани су као процентуални удео одређеног једињења у односу на укупно екстрахована једињења.

У узорцима качкаваља од овчијег млека детектоване су монокарбонске киселине средње дужине ланаца (табела 4.3). Сирћетна, бутерна, хексанска (капронска) и октанска киселина присутне су током свих фаза зрења, док су 2-метил бутанска, 3-метил бутанска и деканска киселина присутне у каснијим (5., 20. и 30. дан зрења) фазама зрења. Остале монокарбонске киселине екстраховане су из појединачних узорака качкаваља. Највећи број различитих монокарбонских киселина детектован је у узорку качкаваља ОК2 након 5 дана зрења.

Естри су екстраховани и детектовани у свим узорцима качкаваља, осим у узорку ОК1. Из узорака ОК2, ОК3 и ОК4 екстрахован је највећи број различитих естара док је у осталим узорцима детектовано од једне до три врсте естара.

Алкохоли су, након естара, најзаступљенија једињења у узорцима качкаваља. Етанол и 3-метил-1-бутанол су детектовани у свим узорцима качкаваља док су 2-пентанол, 2-метил-1-бутанол, 2-хептанол и фенил-етил алкохол екстраховани из већег броја узорака. Од ароматичних алкохола, детектован је бензил алкохол.

Алдехиди и кетони представљају процентуално нешто мање заступљена једињења у узорцима качкаваља, при чему је заступљеност алдехида мања у односу на кетоне. Кетони су екстраховани из свих узорака, а процентно су најзаступљенији у узорцима ОК2, ОК3 и ОК4. Од алдехида, бензалдехид је детектован у свим узорцима, 3-метил-бутанал детектован је само код узорака ОК2 и ОК3, док је бензен-ацеталдехид детектован у траговима, само код узорка ОК4. Алифатични и ароматични угљоводоници детектовани су у свим узорцима качкаваља. Од ароматичних угљоводоника детектовани су толуен, у три узорка, и р-ксилен, у траговима, у два узорка. Лимонен је једини терпен који је екстрахован и то само у узорцима ОК2 и ОК4.

Табела 4.3. Лакоиспарљиве компоненте идентификоване SPME-GC/MS анализом узорака Пиротског качкаваља од овчијег млека из четири различите фазе зрења (ОК1-1 дан; ОК2-5 дан; ОК3-20 дан; ОК4-30 дан зрења). Микроекстракција је извршена влакнима од полидиметилсилоксана (PDMS) и полиакрила (РА).

RT (мин)	Компонента	Мирис <sup>а</sup>	Садржај компоненти (%)							
			ОК1		ОК2		ОК3		ОК4	
			PD MS	РА	PD MS	РА	PD MS	РА	PD MS	РА
<b>КИСЕЛИНЕ</b>										
1,73	Сирћетна	сирће, опор укус	нд	тр	2,5	4,0	1,6	7,1	3,4	14,7
4,97	2-Метил пропанска		нд	нд	тр	1,2	нд	тр	нд	нд
5,78	Бутанска	ужегао сир, трулеж	0,5	7,5	6,4	35,5	14,3	42	4,1	28,4
7,66; 7,99	2-Метил бутанска		нд	нд	0,1	0,5	тр	0,3	нд	тр
7,42; 7,82	3-Метил бутанска	труло воће, слаткасто, зној	нд	нд	тр	1,6	0,3	0,8	нд	0,7
10,64	Хексанска	оштар, плави сир, павлака	тр	6,5	6,2	15,6	12,2	17,6	4,6	21,1
13,86	Октанска	на козу, на восак, ужегла маст	тр	тр	3,4	1,7	4,5	1,6	тр	3,2
16,61	Деканска	ужегла маст, на козу	нд	нд	0,6	0,9	тр	тр	нд	тр
		<b>Укупно (%)</b>	<b>0,51</b>	<b>14,1</b>	<b>19,3</b>	<b>61,0</b>	<b>32,9</b>	<b>69,4</b>	<b>12,1</b>	<b>68,1</b>
<b>АЛКОХОЛИ</b>										
1,55	Етанол	алкохол	6,1	11,7	1,4	1,8	2	2,2	8,4	2,2
1,65	2-Пропанол	алкохол, слатко	нд	нд	тр	нд	тр	тр	тр	тр
2,11	2-Бутанол	слатко, воће	нд	нд	нд	1,4	нд	нд	нд	1,2
2,31	2-Метил-1-пропанол		0,9	нд	1,3	нд	нд	нд	нд	нд
3,20	2-Пентанол	воће, ацетон, слатко	тр	нд	6,6	5,1	1,8	1,4	4,7	2,3
3,88	3-Метил-1-бутанол	воће, алкохол	9,1	8,4	3,3	3,0	2,2	1,6	7,8	4,7
3,99	2-Метил бутандиол	на црни тартуф	нд	нд	1,5	1,5	тр	тр	тр	тр
5,44	DL-2,3-Бутандиол		нд	нд	0,4	0,4	нд	нд	нд	нд
5,73	Бутандиол		нд	нд	тр	2,3	нд	нд	нд	нд
6,18	(±)-2,3-Бутандиол		нд	нд	0,4	0,4	нд	нд	нд	нд
8,65	2-Хептанол	на земљу, уље, сладуњав мирис	1,1	нд	2,9	2,1	1,0	0,4	нд	0,4
11,59	Бензил аколхол	слаткаст, на бадем	нд	нд	нд	0,1	нд	тр	нд	тр
12,63	2-Ноналол	красавац	нд	нд	0,4	0,2	0,4	0,2	нд	нд
12,95	Фенил етил- алкохол	цветни мирис	нд	нд	тр	0,2	тр	тр	нд	тр
		<b>Укупно (%)</b>	<b>17,2</b>	<b>20,1</b>	<b>18,2</b>	<b>18,5</b>	<b>7,4</b>	<b>5,8</b>	<b>20,9</b>	<b>10,8</b>

Табела 4.3 (наставак)

RT (мин)	Компонента	Мирис <sup>a</sup>	Садржај компоненти (%)							
			ОК1		ОК2		ОК3		ОК4	
			PD MS	PA	PD MS	PA	PD MS	PA	PD MS	PA
<b>ЕСТРИ</b>										
2,20	Етил ацетат	растварач, ананас, воћкаст	2,7	нд	тр	тр	1,6	тр	4,8	нд
5,88	Етил бутаноат	ананас, јагода, слаткаст	тр	нд	тр	тр	0,5	2,2	тр	тр
8,04	3- Метил бутил естар	на банану	нд	нд	0,2	нд	нд	нд	нд	нд
9,20	Метил хексаноат		нд	нд	0,1	тр	тр	тр	нд	нд
9,80	Етил 3-оксо- бутанат		нд	нд	тр	0,1	нд	тр	нд	0,3
9,86	2-Метил-пропил- бутарат		нд	нд	0,5	0,1	тр	нд	нд	тр
10,78	Етил хексаноат		1,1	нд	2,8	нд	5,7	2,4	1,2	тр
11,49	Изопроил- хексаноат		нд	нд	тр	нд	0,2	нд	нд	нд
11,83	2-Метилпропил-3- метилбутаноат		нд	нд	0,7	0,1	0,3	нд	тр	тр
11,88	3-Метил-бутил бутарат		тр	нд	тр	0,1	тр	нд	нд	нд
13,02	Метил октаноат		нд	нд	тр	тр	тр	тр	нд	нд
13,43	2-Метил-пропил хексаноат		нд	нд	0,6	нд	нд	нд	нд	нд
14,17	Етил октаноат	кајсија, вино, цветни	1	нд	0,9	0,2	3,3	0,5	тр	0,3
14,45	2-Метилбутил хексаноат		нд	нд	0,2	нд	тр	нд	нд	нд
14,98	Изопентил хексаноат	воћни, банана, јабука	нд	нд	0,2	нд	0,1	нд	нд	нд
16,97	Метил деканоат		тр	нд	0,2	0,1	1,1	0,2	тр	тр
		<b>Укупно (%)</b>	<b>4,8</b>	<b>0,0</b>	<b>6,4</b>	<b>0,7</b>	<b>12,8</b>	<b>5,3</b>	<b>6,0</b>	<b>0,7</b>
<b>КЕТОНИ</b>										
1,64	Ацетон	етар, воћкаст	3,7	2,5	5,4	тр	3,8	1,5	10,8	2,6
2,99	2-Пентанон	воћкаст, ацетон, слаткаст	4,2	1,5	2,9	1,1	3,4	0,9	4,6	1,1
3,03	2,3-Бутандион	на бутер	нд	нд	тр	тр	тр	тр	нд	тр
3,45	3-Хидрокси-2- бутанон	на бутер	нд	нд	2,2	1,1	1,4	1,6	тр	1,0
4,40	3-Метил-2- пентанон	воћкаст, етар	нд	нд	тр	нд	нд	нд	нд	нд
8,34	2-Хептанон	банана, воћни мирис	13,6	4,8	12,5	4,1	7,8	1,7	3,3	1,0
10,62	2-Октанон		нд	нд	6,2	нд	нд	нд	нд	нд
12,33	8-Нонен-2-он	воћни колач	0,7	нд	0,9	0,4	0,4	тр	нд	тр
12,48	2-Нонанон	воћни, на сиреве	32,3	10,1	22,4	6,6	18,3	3,6	3,2	1,2
15,60	2-Ундеканон		1,4	тр	0,6	0,2	2,1	0,3	нд	тр
		<b>Укупно (%)</b>	<b>55,9</b>	<b>18,9</b>	<b>43,1</b>	<b>13,5</b>	<b>37,2</b>	<b>9,6</b>	<b>21,9</b>	<b>6,9</b>

Табела 4.3 (наставак)

RT (мин)	Компонента	Мирис <sup>а</sup>	Садржај компоненти (%)							
			ОК1		ОК2		ОК3		ОК4	
			PD MS	PA	PD MS	PA	PD MS	PA	PD MS	PA
<b>АЛДЕХИДИ</b>										
2,57	3-Метил-бутанал	зелено, на слад	нд	нд	0,1	0,1	0,4	0,2	нд	нд
2,68	2-Метил-бутанал	оштар мирис	нд	нд	нд	нд	тр	нд	нд	нд
9,97	Бензалдехид	бадем	тр	тр	0,2	0,3	тр	тр	нд	0,2
		<b>Укупно (%)</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,3</b>	<b>0,4</b>	<b>0,4</b>	<b>0,2</b>	<b>0,0</b>	<b>0,2</b>
<b>ОСТАЛА ЈЕДИЊЕЊА</b>										
4,78	Толуен	разређивач	тр	нд	0,4	тр	тр	тр	тр	0,4
11,32	Лимонен	наранџа	тр	нд	0,4	тр	тр	нд	тр	тр
2,08	Хексан	на бензин	3,2	нд	0,5	нд	тр	нд	тр	нд
1,67	Етил етар		тр	нд	тр	3,7	тр	тр	тр	тр
7,77	<i>p</i> -Ксилен		нд	нд	тр	тр	тр	нд	нд	тр
		<b>Укупно (%)</b>	<b>3,2</b>	<b>0,0</b>	<b>1,3</b>	<b>3,7</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,5</b>
<b>Идентификоване компоненте (%)</b>			<b>81,6</b>	<b>53,1</b>	<b>88,6</b>	<b>97,8</b>	<b>90,7</b>	<b>90,3</b>	<b>60,9</b>	<b>87,2</b>
<b>Број идентификованих компонента</b>			<b>27</b>		<b>55</b>		<b>45</b>		<b>38</b>	

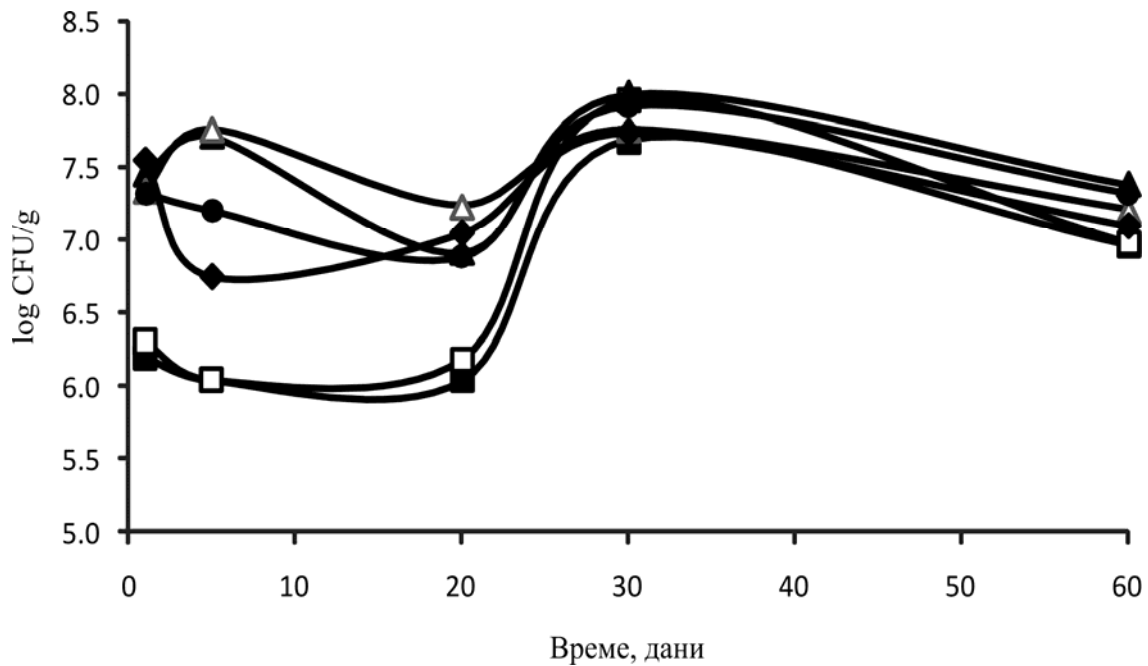
нд - није детектовано, тр - трагови

## 4.2. Пиротски качкаваљ израђен од крављег млека

### 4.2.1. Одређивање броја мезофилних и термофилних бактерија током зрења

#### Пиротског качкаваља израђеног од крављег млека

Укупан број мезофилних бактерија одређиван је на 4 врсте подлога (MRS, M17, MSE и HA), док је број термофилних бактерија одређиван на MRS и M17 подлогама у узорцима након 1 (KK1), 5 (KK2), 15 (KK3), 30 (KK4) и 60 (SKK) дана зрења, а приказан је на слици 4.5.



Слика 4.5. Промена броја бактерија током зрења Пиротског качкаваља произведеног од крављег млека на плочама са MRS (■), M17 (▲), MSE (◆) и HA (●), инкубираним на 30 (пуни симболи) и 45°C (празни симболи)

Раст укупног броја бактерија у почетку зрења (до 5. дана) уочен је једино на подлози M17 агару, независно од температуре инкубације (број мезофилних бактерија се повећао са 7,5 на 7,7, а термофилних са 7,3 на 7,8 log CFU/g). Након тога, у наредних 15 дана зрења, број мезофилних бактерија се смањило на 6,9 log CFU/g, а термофилних на 7,2 log CFU/g. Број бактерија одређених на подлози M17 се након 30 дана зрења благо повећава и остаје на нивоу од око 7,3 log CFU/g до краја праћења процеса зрења.

Укупан број бактерија одређен на MRS агару у првих 5 дана има благи пад од 6,2 за мезофилне и 6,3 код термофилних до 6,0 log CFU/g за обе групе бактерија. Пад укупног броја се наставља као и у претходном случају до 20. дана зрења. Мезофилне и термофилне бактерије достижу максималан број 30. дана зрења. Тренд благог опадања укупног броја бактерија броја карактеристичан је за све анализирание групе бактерија, при чему 60. дана зрења достижу вредности између 7,0 до 7,4 log CFU/g (слика 4.5).

Укупан број мезофилних бактерија одређених на HA смањује се у првих 20. дана од 7,3 на 6,8 log CFU/g, затим расте на 7,9 log CFU/g. На крају периода зрења ова вредност износи 7,3 log CFU/g. Укупан број мезофилних БМК инкубираних на MSE



агару опада у првих пет дана од 7,5 до 6,7 log CFU/g, након тога се број у каснијим фазама зрења повећава до 7,7 да би 60. дана имао вредност од 7,1 log CFU/g (слика 4.5).

#### 4.2.2. Идентификација изолата БМК из крављег качкаваља

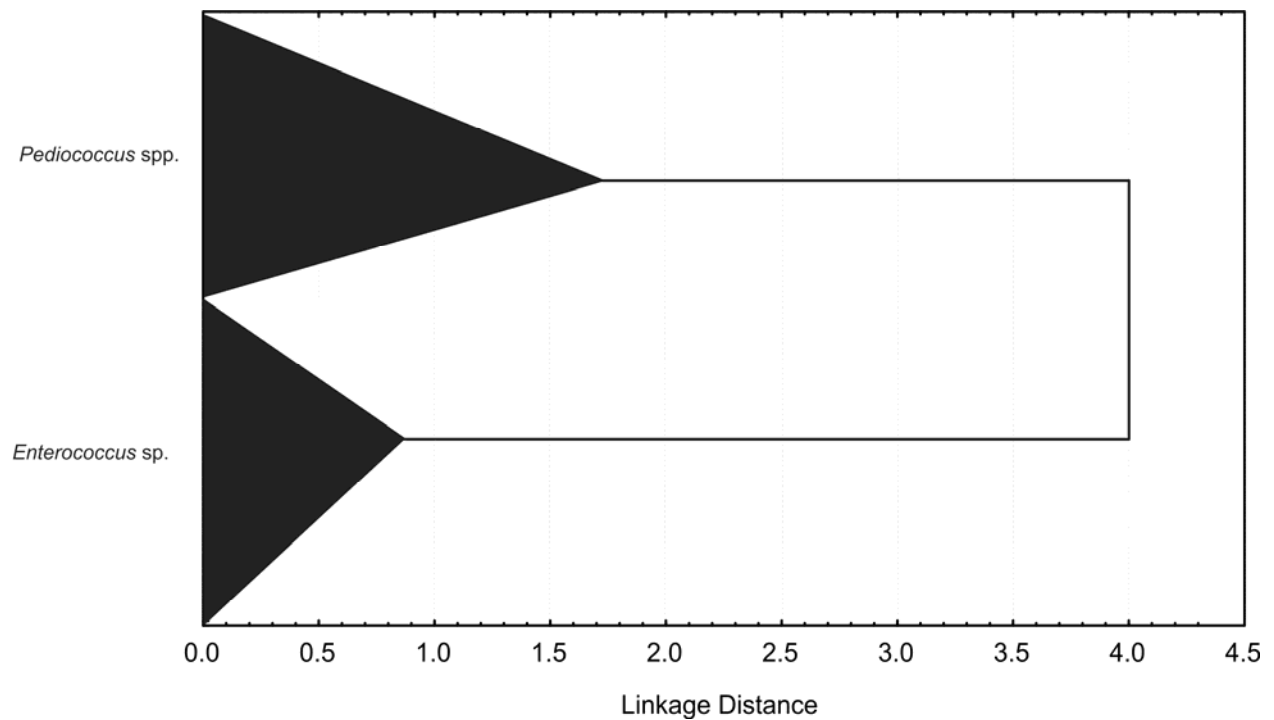
Током 60 дана зрења из 5 различитих узорака Пиротског качкаваља произведеног од крављег млека издвојено је укупно 142 изолата БМК. На основу морфолошке и физиолошке карактеризације (табела 4.4), као и FTIR анализе (слика 4.6), изолати су груписани, а представници сваке групе су подвргнути молекуларним методама идентификације до нивоа врсте (слика 4.7).

Табела 4.4. Диференцијација и идентификација изолата БМК изолованих из Пиротског качкаваља израђеног од крављег млека

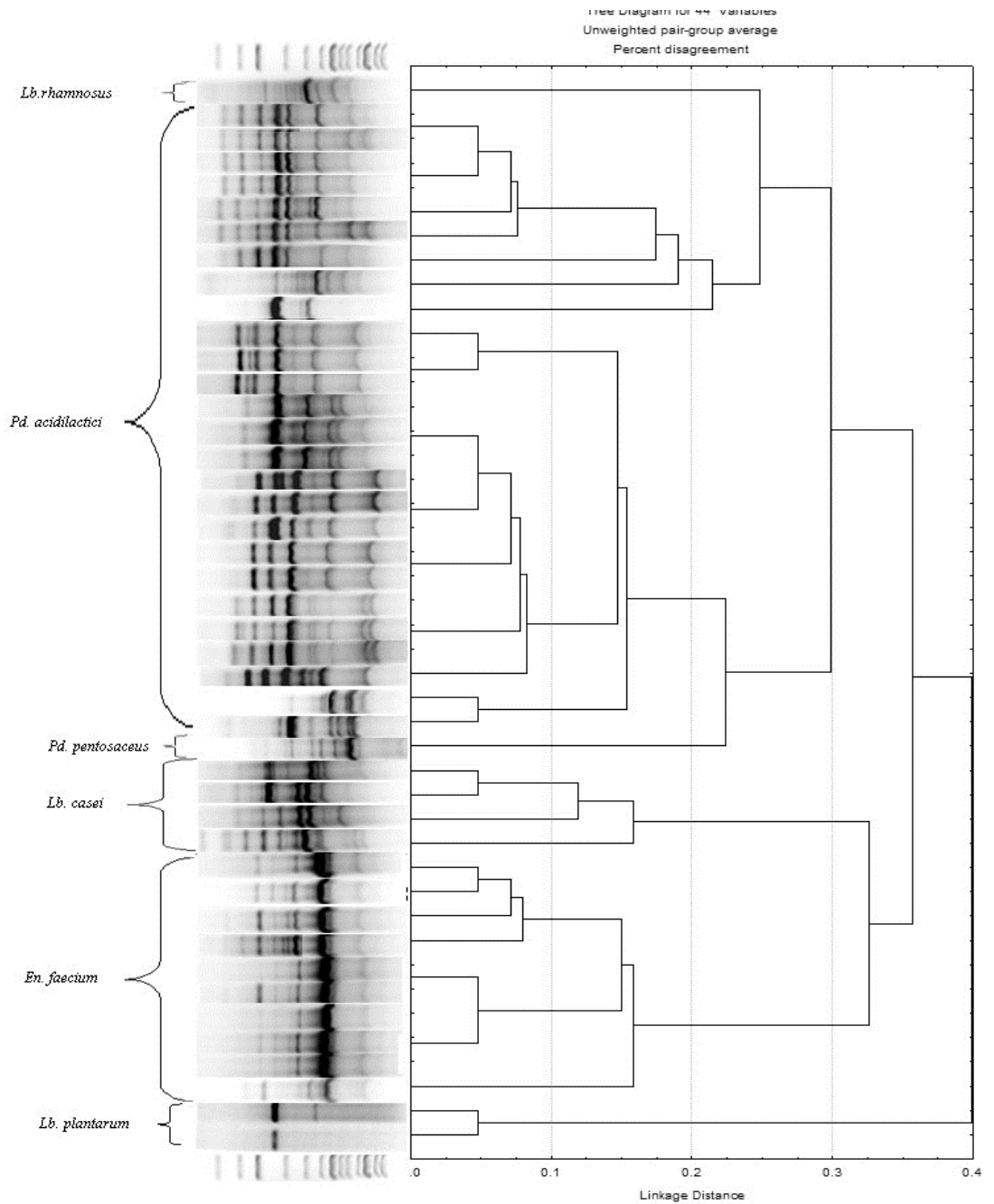
Група	I	II	III	IV	V	VI
Број изолата	63	71	1	2	1	4
Морфологија ћелија	коке	кокоидне	кокоидне, тетраде	бацили	бацили	бацили
Формирање CO <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-
Хидролиза аргинина	-	+	+	-	-	-
Хидролиза ескулина	-	-	+	-	-	+/-
Раст на 6,5% NaCl	+	-	-	+	-	-
Раст на Ентеро агару	+	-	-	-	-	-
Идентификација 16S rDNA секвенцирањем	<i>En. faecium</i>	<i>Pd. acidilactici</i>	<i>Pd. pentosaceus</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. rhamnosus</i>	<i>Lb. casei</i>

На основу морфолошких, физиолошких карактеристика, као и применом молекуларних метода, изолати су подељени у 6 група. Од укупно 142 изолата БМК, 135 (95%) имају кокоидни облик и прелиминарно су идентификовани као представници родова *Pediococcus* и *Enterococcus*. С обзиром на мали број штапићастих

изолата БМК (7 изолата, 5%) није било могуће извршити раздвајање изолата применом FTIR анализе (Слика 4.6).



Слика 4.6. Дендрограм статистичке анализе FTIR спектра БМК педиокока и ентерокока изолованих током зрења Пиротског качкаваља израђеног од крављег млека. Груписање је извршено хијерархијском методом груписања применом Ward-овог метода, а мера одстојања између спектра су израчуната применом Pearson-овог корелационог коефицијента

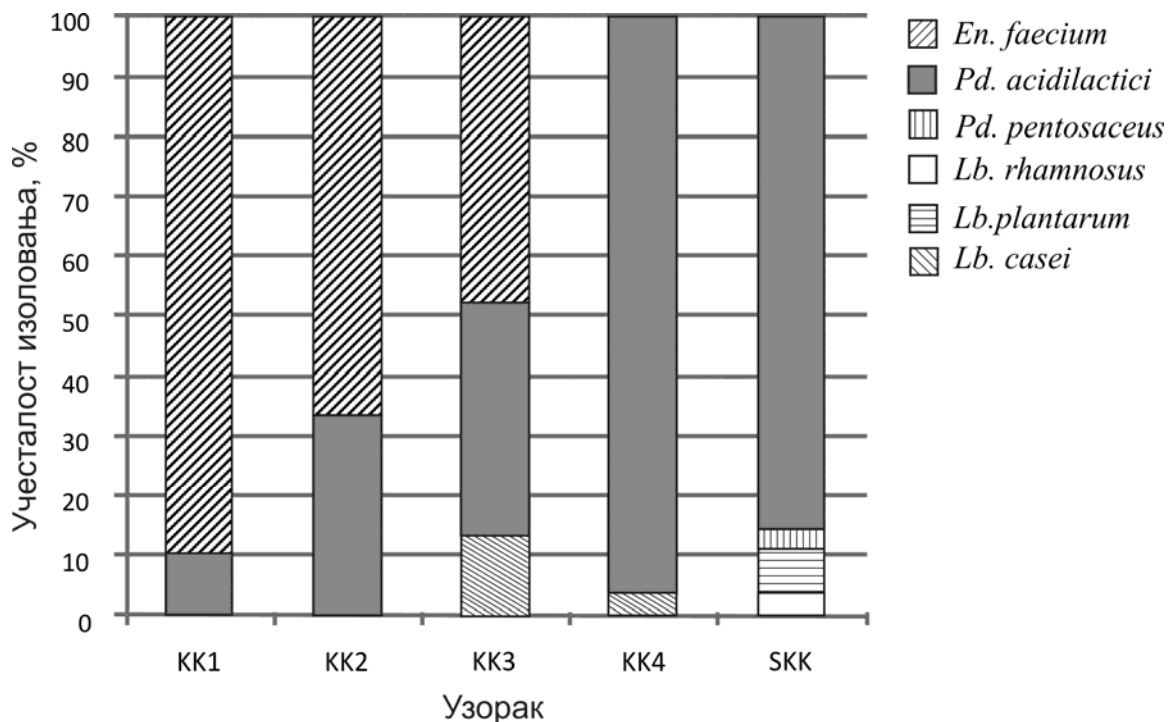


Слика 4.7. Дендрограм статистичке анализе  $(GTG)_5$  – PCR finger-принтова БМК изолованих током зрења Пиротског качкаваља израђеног од крављег млека. Груписање је извршено хијерархијском методом груписања уз примену методе просечног повезивања, а мера одстојање између група је одређено на основу процента неслагања.

#### 4.2.3. Промена микробиоте током зрења Пиротског качкаваља израђеног од крављег млека

Промена микробиоте током 60 дана зрења качкаваља од крављег млека приказана је на слици 4.8. Током праћеног периода од 60 дана зрења доминирају врсте *Enterococcus faecium* (44%) и *Pediococcus acidilactici* (50%).

У узорку качкавања на почетку зрења (КК1) уочене су две врсте БМК, при чему доминира врста *En. faecium* (91%) у односу на *Pd. acidilactici* (9%). У узорку КК2 (након 5 дана зрења) популација ентерокока *En. faecium* се смањује (66%), а повећава удео *Pd. acidilactici* (33%). Након 15 дана зрења (КК3) удео *Pd. acidilactici* (39%) се даље повећава у односу на предходне узорке, док је удео *En. faecium* (47%) на предходном нивоу, при чему се први пут уочава *Lb. casei* у уделу од 13% (слика 4.8). До краја праћења процеса зрења, уочен је и даље доминантан удео *Pd. acidilactici* (у КК4 - 97%, у SKK - 85%), при чему је изолован још један представник педиокока *Pd. pentosaceus*, који учествује са 4% у укупној популацији SKK. Лактобацили учествују у малом уделу у узорцима након 30 (*Lb. casei* - 3%) и 60 (*Lb. rhamnosus* - 4% и *Lb. plantarum* - 7%) дана зрења.



Слика 4.8. Учесталост изолације различитих врста БМК током зрења Пиротског качкаваља израђеног од крављег млека

#### 4.2.4. Хемијска анализа узорака качкаваља израђеног од крављег млека

HPLC анализом, а на основу ретенционих времена стандарда органских киселина одређених на UV детектору при апсорбаци од 214 nm у узорцима качкаваља на основу поређења са добијеним вредностима детектоване су млечна, јабучна, лимунска и сирћетна киселина (табела 4.5). Пирогрођана киселина је детектована само у траговима.

Табела 4.5. Концентрације детектованих органских киселина у узорцима крављег качкаваља

Детектоване киселине (mg/g)	Период зрења			
	1 дан	5 дан	20 дан	30 дан
Лимунска	0,12	0,89	0,34	0,27
Јабучна	0,09	1,17	0,21	0,23
Млечна	0	5,82	4,76	5,51
Сирћетна	0	0	0,08	0,45

Концентрација млечне киселине нагло се повећава од 1. до 5. дана зрења до 5,82 mg/g, у периоду до 20. дана бележи се благи пад садржаја до 4,76 да би се након тог периода вредност млечне киселине повећавала до 5,51 mg/g. Јабучна киселина се током зрења јавља у мањој концентрацији, мада је тренд промене концентрације сличан као код млечне киселине, јер се концентрација јабучне киселине повећава у периоду од 1 до 5. дана са 0,09 до 1,17. До 20. дана се бележи лагани пад концентрације до 0,21 mg/g, а касније ова се вредност задржава до краја. Лимунска киселина прати сличан тренд промене концентрације током зрења, док сирћетна киселина достиже свој максимум (од 0,45 mg/g) на крају истраживаног времена зрења.

#### 4.2.5. Хемијска анализа лакоиспарљивих компонената Пиротског качкаваља израђеног од крављег млека

GC-MS анализом узорака качкаваља од крављег млека, а упоређивањем ретенционих времена екстрахованих једињења на хроматограму са подацима из базе,

идентификовано је 37 испарљивих једињења која припадају различитим класама једињења (табела 4.6). Резултати су приказани као процентуални удео одређеног једињења у односу на укупно екстрахована једињења.

У узорцима качкаваља од крављег млека детектовано је неколико монокарбонских киселина средње дужине ланца (табела 4.6). Сирћетна, бутанска и хексанска (капронска) киселина присутне су током свих фаза зрења, октанска киселина налази се у траговима у првих 20 дана зрења, док је 3-метил бутанска киселина детектована само у траговима у узорку КК3 (20. дан зрења). Највећи број различитих монокарбонских киселина детектован је у узорку качкаваља КК3 старости 20 дана.

Естри су екстраховани и детектовани у свим узорцима крављег качкаваља. Етил ацетат, етил хексаноат и етил октаноат су детектовани у свим узорцима док су етил 3-оксо-бутанат, метил-2-хидрокси-4-метилпентаноат и метил деканоат детектовани само у појединим узорцима. Етил бутаноат, 2 метилпропил-3-метилбутаноат, 2-метилпропил-бутарат и 3-метил бутил естар детектовани су у само у по једном узорку.

Од алкохола су етанол и 3-метил-1-бутанол детектовани у свим узорцима качкаваља док су 2-пентанол, 1-пентанол, ( $\pm$ )-2,3-бутандиол, 2-хептанол и фенил-етил алкохол екстраховани из већег броја узорка.

Ацетон, 2,3-бутандион, 3-хидрокси-2-бутанон и 2-хептанон су кетони који су присутни као лакоиспарљиве компоненте у свим узорцима крављег качкаваља, док је 2-нонанон детектован у три а 2-пентанон само у два узорка.

Кетони су детектовани само у узорцима КК1 (3-метил-бутанал, бензалдехид), КК2 (3-метил-бутанал, бензалдехид и 2-метил-бутанал) и КК3 (бензалдехид).

Од осталих једињења детектовани су толуен, лимонен и хексан, док је једино етил-етар био присутан у сва четири узорка.

Табела 4.6. Лакоиспарљиве компоненте идентификоване SPME-GC/MS анализом узорака Пиротског качкаваља од крављег млека (КК) из четири различитих фаза зрења (КК1-1 дан; КК2-5 дан; КК3-20 дан; КК4-30 дан зрења). Микроекстракција је извршена влакнима од полидиметилсилоксана (PDMS) и полиакрила (РА).

RT (мин)	Компонента	Мирис <sup>а</sup>	Садржај компонената (%)							
			КК1		КК2		КК3		КК4	
			PD MS	РА	PD MS	РА	PD MS	РА	PD MS	РА
<b>КИСЕЛИНЕ</b>										
1,73	Сирћетна	сирће, опор укус	37,6	44,6	22	15,7	2,1	14,3	5,4	12,9
5,78	Бутанска	ужегао сир, трулеж	тр	0,7	тр	1,5	3,2	17,3	2,0	10,1
7,42; 7,82	3-метил бутанска	труло воће, благ, зној	нд	нд	нд	нд	нд	тр	нд	нд
10,64	Хексанска	оштар, плави сир, павлака	1,3	4,8	тр	тр	1,8	11,5	тр	5,3
13,86	Октанска	на козу, на восак, ужегла маст	тр	тр	1,1	нд	тр	тр	нд	нд
		<b>Укупно (%)</b>	<b>38,9</b>	<b>50,1</b>	<b>23,1</b>	<b>17,2</b>	<b>7,1</b>	<b>43,1</b>	<b>7,4</b>	<b>28,3</b>
<b>ЕСТРИ</b>										
2,20	Етил ацетат	растварач, ананас, воћкаст	0,9	0,4	3,0	тр	3,8	тр	тр	2,7
5,88	Етил бутаноат	ананас, јагода, слаткаст	нд	нд	нд	нд	тр	нд	нд	нд
8,04	3-Метил бутил естар	на банану	нд	нд	нд	нд	нд	нд	тр	нд
9,73	Метил-2-хидрокси- 4-метилпентаноат		тр	0,5	нд	нд	нд	тр	нд	нд
9,80	Етил 3-оксо-бутанат		3,7	2,7	0,4	нд	нд	0,7	нд	тр
9,86	2-Метил-пропил- бутарат		нд	нд	нд	нд	нд	нд	тр	нд
10,78	Етил хексаноат		0,5	нд	тр	нд	0,5	0,3	тр	нд
11,83	2 метилпропил-3- метилбутаноат		нд	нд	нд	нд	нд	нд	1,9	нд
14,17	Етил октаноат	кајсија, вино, цветни	тр	нд	тр	нд	тр	тр	тр	нд
16,97	Метил деканоат		тр	нд	тр	нд	тр	тр	тр	нд
		<b>Укупно (%)</b>	<b>5,1</b>	<b>3,6</b>	<b>3,4</b>	<b>0,0</b>	<b>4,3</b>	<b>1,1</b>	<b>2,2</b>	<b>2,7</b>

Табела 4.6. (наставкак)

RT (мин)	Компонента	Мирис <sup>a</sup>	Садржај компонената (%)							
			КК1		КК2		КК3		КК4	
			PD MS	PA	PD MS	PA	PD MS	PA	PD MS	PA
<b>АЛКОХОЛИ</b>										
1,55	Етанол	алкохол	15,2	10,3	18	23,4	7,4	8,3	16,9	9,2
3,20	2-Пентанол	воће, ацетон, слатко	нд	нд	нд	нд	2,5	2,7	4,7	3,7
3,88	3-Метил-1-бутанол	воће, алкохол	7,0	8,6	17,5	18,9	8,9	10,2	6,5	7,9
4,05	1-Пентанол		5,3	нд	нд	нд	нд	нд	нд	нд
6,18	(±)-2,3-Бутандиол		3,0	9,5	нд	нд	нд	нд	нд	нд
8,65	2-Хептанол	на земљу, уље, сладуњав	нд	нд	нд	нд	нд	0,6	нд	нд
12,95	Фенил етил- алкохол	цветни мирис	тр	0,6	тр	тр	нд	тр	нд	тр
		<b>Укупно (%)</b>	<b>30,5</b>	<b>29,0</b>	<b>35,5</b>	<b>42,3</b>	<b>18,8</b>	<b>21,8</b>	<b>28,1</b>	<b>20,8</b>
<b>КЕТОНИ</b>										
1,64	Ацетон	етар, воћкаст	5	1,8	1,8	2,8	9,0	4,4	9,0	3,7
2,99	2-Пентанон	воћкаст, ацетон, слаткаст	нд	нд	нд	нд	16,5	6,7	4,6	1,7
3,03	2,3-Бутандион	на бутер	тр	тр	тр	тр	нд	тр	нд	тр
3,45	3-Хидрокси-2- бутанон	на бутер	3,1	3,9	14,7	7,5	3,1	4,3	9,2	4,3
8,34	2-Хептанон	банана, воћни мир,	тр	тр	тр	нд	8,0	3,9	8,3	2,5
12,48	2-Нонанон	воћни, на сиреве	тр	нд	нд	нд	1,5	0,7	4,7	1,0
		<b>Укупно (%)</b>	<b>8,1</b>	<b>5,7</b>	<b>16,5</b>	<b>10,3</b>	<b>38,1</b>	<b>20,0</b>	<b>35,8</b>	<b>13,2</b>
<b>АЛДЕХИДИ</b>										
2,57	3-Метил-бутанал	green, на слад	0,2	нд	0,9	тр	нд	нд	нд	нд
2,68	2-Метил-бутанал	оштар мирис	нд	нд	0,5	нд	нд	нд	нд	нд
9,97	Бензалдехид	бадем	0,9	1,0	тр	тр	нд	тр	нд	нд
		<b>Укупно (%)</b>	<b>1,1</b>	<b>1,0</b>	<b>1,4</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>	<b>0,0</b>
<b>ОСТАЛА ЈЕДИЊЕЊА</b>										
4,78	Толуен	на разређивач	нд	нд	тр	нд	нд	нд	нд	нд
11,32	Лимонен	наранџа, лимун	нд	нд	нд	нд	нд	нд	1,6	тр
2,08	Хексан	на бензин	тр	нд	нд	нд	2,7	нд	5,4	нд
1,67	Етил етар		тр	тр	0,7	тр	тр	тр	тр	тр
1,76	Дихлор-метан	слаткаст	0,4	0,6	1,8	3,3	3,4	3	4,1	4,5
		<b>Укупно (%)</b>	<b>0,5</b>	<b>0,7</b>	<b>2,5</b>	<b>3,3</b>	<b>6,1</b>	<b>3,1</b>	<b>11,1</b>	<b>4,6</b>
<b>Идентификоване компоненте (%)</b>			<b>84,2</b>	<b>90,1</b>	<b>82,4</b>	<b>84,3</b>	<b>73,1</b>	<b>89,1</b>	<b>84,6</b>	<b>69,6</b>
<b>Број идентификованих компонената</b>			<b>24</b>		<b>22</b>		<b>27</b>		<b>21</b>	
нд - није детектовано, тр - трагови										



### 4.3. Технолошке карактеристике изолатата БМК

Од укупно анализираних 315 изолатата (173 из овчијег и 142 из крављег качкаваља), за даљу технолошку карактеризацију издвојено је 107 изолатата (58 из овчијег и 49 из крављег качкаваља). Критеријуми на основу којих су издвајани изолати обухватала је пропорционалну заступљеност сваке врсте, а код изолатата исте врсте са већом учесталашћу изоловања, издвајани су сојеви који су показивали незнатну физиолошку разлику од сојева исте врсте. Резултати истраживања приказани су у табели 4.7.

Од укупно 107 изолатата БМК способност коришћења цитрата има 43 изолатата. Већина изолованих врста БМК су способни да користе цитрате, сем изолатата који су идентификовани као *Lb. casei/rhamnosus*, *Lb. plantarum* и *Str. macedonicus*. Више од половине изолованих *Pd. acidilactici* (59 %), око половине *Lb. casei* и трећина ентерокока користи цитрате, док је код осталих изолатата тешко извести анализу због малог броја издвојених изолатата.

Диацетил продукује 34 изолатата (31% од укупног броја анализираних), од тога 6 представника *Pd. acidilactici*, 1 представник *Pd. pentosaceus*, 6 представника *En. faecium* (16%), 2 представника *Lb. fermentum* (100%), 11 представника *Lb. casei* (73%), 5 изолатата детерминисаних као *Lb. casei/rhamnosus*, 1 представник врсте *Lb. paracasei*, 1 представник врсте *Lb. rhamnosus* и 2 изолатата *Lb. plantarum*. Већина изолатата БМК расте у присуству 0,3% жучних соли осим изолатата представника врсте *Str. macedonicus*.

Способност продукције егзополисахарида је детектовано код 13 изолатата БМК. На глукози ово својство испољава 3 изолатата идентификованих као *Pd. acidilactici*, *En. faecium* и *Lb. plantarum*. На малтози ово својство испољава 4 изолатата, и то су 2 представника врсте *Pd. acidilactici* и 2 представника *En. faecium*. На лактози ЕПС продукује такође 4 изолатата, 3 представника *Pd. acidilactici*, 1 *Pd. pentosaceus* и 1 *Str. macedonicus*. Продукцију ЕПС на сахарози има само 1 изолат, детерминисан као *Pd. acidilactici*. Изолати који синтетишу ЕПС на више подлога припадају врстама *Pd. acidilactici* (на глукози, малтози, лактози и сахарози) и *En. faecium* (на глукози, малтози).

Табела 4.7. Технолошке карактеристике 107 изолата БМК изолованих током зрења Пиротског качкаваља изражене као број (процент) изолата који поседују дату карактеристику

Технолошка карактеристика	Врста (број) изолата									
	<i>Pd. acidilactici</i> (32)	<i>Pd. pentosaceus</i> (4)	<i>En. faecium</i> (37)	<i>Lb. fermentum</i> (2)	<i>Lb. casei</i> (15)	<i>Lb. casei / rhamnosus</i> (5)	<i>Lb. paracasei</i> (1)	<i>Lb. rhamnosus</i> (1)	<i>Lb. plantarum</i> (5)	<i>Str. macedonicus</i> (5)
Коришћење цитрата	19 (59%)	1 (25%)	13 (35%)	1 (50%)	7 (46%)	0	1 (100%)	1 (100%)	0	0
Продукција диацетила	6 (18%)	1 (25%)	6 (16%)	2 (100%)	11 (73%)	5 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	2 (40%)	0
Раст у присуству 0,3% жучних соли	5 (16%)	2 (50%)	32 (84%)	2 (100%)	15 (100%)	5 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	5 (100%)	0
Продукција егзополисахарида на:										
глукози	1 (3%)	0	1 (3%)	0	0	0	0	0	1 (20%)	0
малтози	2 (6%)	0	2 (6%)	0	0	0	0	0	0	0
лактози	3 (9%)	1 (25%)	0	0	0	0	0	0	0	1 (20%)
сахарози	1 (3%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
галактози	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
фруктози	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Укупан број изолата са позитивним резултатом	43	34	76							

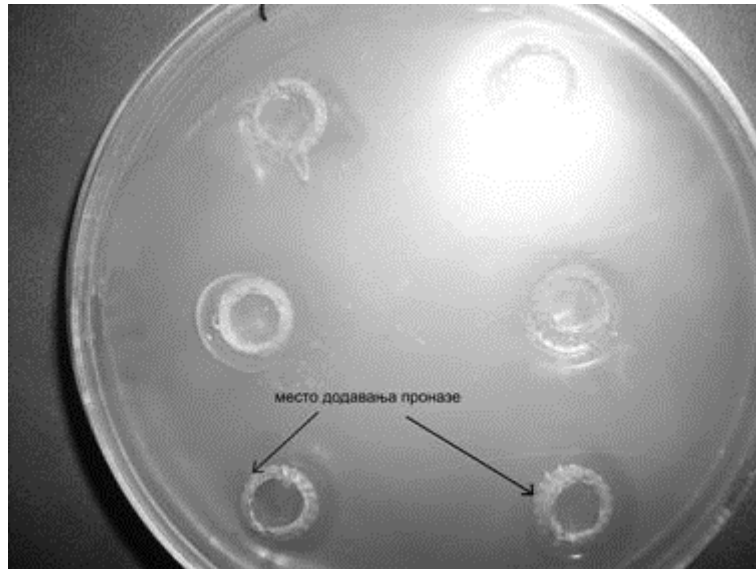
#### 4.4. Синтеза бактериоцина

Антимикробна активност свих 107 изолата испитана је на сродне тест микроорганизме *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGMNI-596, *Lc. lactis* subsp. *lactis* NP-45, као и патогене врсте *Listeria* sp. и *Listeria monocytogenes*. Од анализираних изолата, само код 8 је уочена антимикробна активност према тест сојевима. Резултати антимикробне активности приказани су у табели 4.8.

Табела 4.8. Антимикробна активност појединих изолата БМК

Врста БМК	Ознака изолата	Ширина зоне према тест микроорганизмима (mm)			
		<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BGMNI-596	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NP-45	<i>Listeria</i> sp.	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	SOK-35	-	-	5	-
	SOK-13	5,5	4	7	3
	OK1-7	3	-	6	3
	SOK-5	-	-	-	-
	OK2-16	-	4	5	-
<i>Pediococcus acidilactici</i>	KK4-17	4	-	-	3
<i>Lactobacillus casei</i>	OK4-17	-	-	3	-
<i>Lactobacillus paracasei</i>	SOK-14	-	-	7	-

Изолат SOK-13 (*En. faecium*) једини показује антимикробну активност према свим тест микроорганизмима, док изолат KK4-17 (*P. acidilactici*) антимикробно дејство испољава према *Lc. lactis* subsp. *lactis* BGMNI-596 и *Listeria monocytogenes*. На тест бактерију *Listeria* sp. антимикробно дејство испољавају SOK-35, SOK-13, OK1-7, OK2-16 (*En. faecium*), изолати OK4-17 (*Lb. casei*) и SOK-14 (*Lb. paracasei*). На врсту *Listeria monocytogenes* дејство испољавају изолати *En. faecim* SOK-13 и OK1-7, као и KK4-17 изолат детерминисан као *P. acidilactici*. Бактериоцинска активност изолата и протеинска природа бактериоцина потврђена је коришћењем Е проназе (Слика 4.9).



Слика 4.9. Антимикробно деловање (зоне инхибиције) изолата према *Listeria* sp.  
(стрелицама означена места довања пронaзе)

Изолати из различитих фаза зрења Пиротског качкаваља идентификовани као *En. faecium*, *Lb. casei* и *Pd. acidilactici* су најчешће изоловани из узорака и, поред тога, показали су способност формирања диацетила и синтезу бактериоцина, па се могу препоручити за даља детаљнија проучавања као потенцијалне културе у стартерима. Врста *Lb. casei* се често препоручује као допунска култура за убрзавање и интензивирање развоја ароме код сирева (Hosseini Nezhad *et al.*, 2014), као и за смањење непожељне микробиоте (Christiansen *et al.*, 2005). Изолати из Пиротског качкаваља врсте *Lb. casei* због значајног учешћа у микробиоти зрелог сира представљају добру основу за проучавање могућности коришћења у стартер културама.

## 5. ДИСКУСИЈА

Пиротски качкаваљ је аутохтони млечни производ који се производи по специфичној технологији која је заступљена у Пироту и широј околини. Ова врста сира карактерише се светло до интензивно жутом бојом, монолитном, делимично лиснатом и еластично-пластичном структуром и конзистенцијом теста. Пиротски качкаваљ на пресеку нема шупљике, али може имати мањи број ситних пукотина насталих током обраде. Укус Пиротског качкаваља је пријатан, благо кисео и пикантан, специфичан и зависи од врсте употребљеног млека (Остојић и сар., 2012).

Својства качкаваља условљене су специфичностима млека и његове даље обраде. Сазревање ове врсте сира уз додавање соли, у климатским условима Старе планине резултирало је препознатљивим укусом и аромом Пиротског качкаваља (Мијаћевић *et al.*, 2005).

Пиротски качкаваљ, као и највећи број сирева, представља комплексни екосистем подложен сталним променама повезаним са еколошком заједницом живих организама у којој микробиолошке активности утичу али и зависе од хемијских промена. Производња сирева обухвата две међусобно повезане фазе: прва фаза представља развој одговарајућег хемијског састава и рН вредности, а друга развој жељене ароме и физичких карактеристика. Прва фаза се контролише путем састава млека и производног процеса, нарочито регулисањем брзине и степена синтезе киселине од стране микробиоте. Друга фаза зависи од прве фазе, као и од метаболизма присутних микроорганизама и одвијања хемијских и ензимских реакција. Овај процес је познат под називом зрење сира и, у зависности од врсте сира, може трајати до неколико месеци (Johnson, 2001). Микроорганизми су битна компонента свих врста сирева и играју важну улогу током оба процеса, производње и сазревања сирева. Могу се додати у виду стартер култура или бити присутни као природна-аутохтона микробиота. Стартери, као што су *Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* и *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, користе се сваки појединачно или у различитим комбинацијама зависно од врсте сира, а одговорни су за развој киселине током производње сира (Beresford *et al.*, 2001). Међутим, у постојећем

процесу производње и зрења Пиротског качкаваља главну улогу игра аутохтона микробиота. Услед прилагођености ових бактеријских врста условима у сиревима, њихова примена је погоднија од примене комерцијалних стартер култура. Предности аутохтоне микробиоте огледају се у брзини раста и међусобним интеракцијама, као и развоју и продукцији специфичних сензорних карактеристика производа. Због тога, утврђивање састава микробиоте представља веома важан корак у анализирању традиционалних ферментисаних млечних производа. За изолацију и карактеризацију БМК присутних током процеса зрења Пиротског качкаваља у овом раду проучавано је укупно је 10 узорака качкаваља произведеног од крављег и овчијег млека у току зрења након 1, 5, 15, 30 и 60 дана.

С обзиром да присуство одређене микробиоте у качкаваљу условљава специфична сензорна својства производа, овај рад обухвата и анализу хемијских промена током зрења. Формирање сензорних својстава ферментисаних производа од млека, укључујући и сиреве, настаје као последица метаболичке активности присутне микробиоте (Benito de Cardenas *et al.*, 1990, Cocaign-Bousquet *et al.*, 1996, Mustafa, 2006, Duan *et al.*, 2008). Продукти гликолизе, протеолизе казеина и липолизе масти, као главни производи метаболичких функција бактерије млечне киселине (БМК), у великој мери утичу на формирање укуса сирева.

### **5.1. Микробиота Пиротског качкаваља**

Број микроорганизама одређен на различитим врстама подлога, а у анаеробним условима (обезбеђени инкубирањем узорка између два слоја чврсте подлоге) у узорцима качкаваља током зрења креће се у границама 6-8 log CFU/g. Подлога Хранљиви агар је коришћена да би указала на укупан број анаеробних и факултативно анаеробних мезофилних микроорганизама. Међутим, код узорака обе врсте качкаваља, број одређен на НА је био незнатно већи (чак мањи у односу на број мезофилних микроорганизама одређен на подлози М17) од броја одређеног на осталим врстама подлоге које су предвиђене за раст БМК. Овај резултат потврђује да БМК доминирају у микробној популацији качкаваља у свим фазама зрења.

У узорцима качкаваља произведеног од овчијег млека током првих 5 дана зрења бележи се значајан пад укупног броја мезофилних и термофилних бактерија, осим броја мезофилних БМК одређених на плочама са MRS агаром. Овај пад у броју

бактерија БМК на већини хранљивих подлога је сагласности са објављеним резултатима већег броја аутора (Alrubai, 1979, Baruzzi *et al.*, 2002; Gobbetti *et al.*, 1997) да се парењем баскије значајно утиче на микробиоту тако што долази до знатног смањења укупног броја бактерија који се налазе у баскији пре термичке обраде.

Број мезофилних и термофилних микроорганизама на почетку зрења стагнира независно од врсте млека које је коришћено за припрему сира, а због прилагођавања постојеће микробиоте на услове у сиру. Благи раст и незнатна стагнација броја се једино уочава код термофилних бактерија, што је и разумљиво јер су оне лакше поднеле стрес термичког третмана у току парења баскије.

Стагнација броја бактерија и успостављање сталног броја код зрења качкаваља од крављег млека траје дуже (30 дана, слика 4.5) у односу на узорке припремљене од овчијег млека (20 дана, слика 4.1). Након тога се, вероватно, успоставља стална микробиота од 6,5-7,4 log CFU/g, независно од врсте качкаваља. Код обе врсте качкаваља, уочен је најмањи број термофилних лактобацила на крају процеса зрења, при чему је код овчијег качкаваља тај број за 1 log јединицу мањи у односи на мезофилне лактобациле. Овај податак је очекиван, јер због услова зрења (температура 10°C) у микробиоти качкаваља преовладавају мезофилне бактерије.

Вредности укупног броја БМК на свим хранљивим медијумима за анализирани период кретале су се у распону од 5,6 до 8,3 log CFU/g, што је у сагласности са ранијим истраживањима вршеним на Пиротском качкаваљу (Мијаћевић *et al.*, 2005а, 2005б), италијанским качкаваљима Pugliese, Silano и Molise, израђеним од пастеризованог крављег млека (Coppola *et al.*, 2003, Gobbetti *et al.*, 2002, Piraino *et al.*, 2005), Моцарели од крављег млека из региона Апулиа у Јужној Италији (De Candia *et al.*, 2007) или Taleggio сиру од крављег млека из Ломбардије у Италији (Gobbetti *et al.*, 1997).

Велики број микроорганизама, пре свега БМК, налази се у сиревима током зрења и има веома значајну улогу у процесу сазревања (Cogan, 2000). Доминантност одређене врсте БМК директно зависи од врсте млека, порекла животнње, начина исхране, врсте и квалитета пашњака, надморске висине, начина производње, услова чувања сирева и др. (Тописировић и др., 2006).

Међу изолованим БМК из Пиротског качкаваља доминирају родови *Enterococcus* и *Pediococcus*, док су у мањој мери присутне врсте рода *Lactobacillus* и *Streptococcus*. Резултати добијени истраживањем микробиоте ове врсте сира су у

сагласности са литературним подацима по којим БМК изоловане из сирева припадају родовима *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* и *Lactococcus* (Giraffa, 1995, Giraffa, *et al.*, 1997, Fleet, 1999, Coppola *et al.* 2003, Остојић, 2012, Fitzimons *et al.* 1999, Tzanetakis and Litopoulou-Tzanetaki, 1992, Fontecha *et al.*, 1990, Cocconcelli, 1996a, Cocconcelli, 1996b, Poznanski *et al.*, 2004.)

У табели 5.1. приказани су литературни подаци о заступљености БМК у појединим традиционалним сиревима. Ентерококе су процентуално најбројније БМК у Пиротском качкаваљу, тако, врста *En. faecium* чини око 50 % укупно идентификоване микробиоте у качкаваљу од овчијег и 44 % у качкаваљу израђеном од крављег млека.

Ова врста је идентификована у свим фазама зрења код качкаваља од овчијег млека, а највећу бројност достиже у узорку ОК2 (5 дан зрења) и чини 85% бактеријске популације тог узорка. У каснијим фазама зрења у узорцима ОК3 и ОК4 број *En. faecium* се смањује до 55% од укупног броја изолованих БМК.

У узорцима качкаваља израђеног од крављег млека, *En. faecium* доминира у почетним фазама зрења и чини око 90% БМК у узорку КК1, да би се у каснијим фазама зрења код КК2 и КК3 се удео ове врсте смањује, док у узорцима КК4 и СКК (30 и 60 дан) није изолована. Ова врста је откривена код већина сирева у различитом уделу, независно од поднебља и врсте коришћеног млека (табела 5.1).



Табела 5.1. БМК и њихов садржај у традиционалним сиревима

Назив сира	Земља порекла	БМК изоловане из производа	Садржај БМК (%)	Референца
Пиротски качкаваљ од овчијег млека	Србија	<i>Str. macedonicus</i>	5,7%	овај рад
		<i>En. faecium</i>	50,2%	
		<i>Pd. acidilactici</i>	15,6%	
		<i>Pd. pentosaceus</i>	3,4%	
		<i>Lb. plantarum</i>	2,8%	
		<i>Lb. fermentum</i>	1,1%	
		<i>Lb. casei/rhamnosus</i>	10,4%	
		<i>Lb. casei</i>	9,8%	
Пиротски качкаваљ од крављег млека	Србија	<i>Lb. paracasei</i>	0,5%	овај рад
		<i>En. faecium</i>	44,3%	
		<i>Pd. acidilactici</i>	50%	
		<i>Pd. pentosaceus</i>	0,7%	
		<i>Lb. plantarum</i>	1,4%	
		<i>Lb. rhamnosus</i>	0,7%	
Пиротски качкаваљ од крављег млека	Србија	<i>Lb. casei</i>	2,8%	Остојић, 2012.
		<i>Enterococcus sp.</i> ,		
		<i>Lc. lactis subsp. lactis</i>		
		<i>Lb. plantarum, Lc. lactis subsp. lactis, Lb. paracasei</i>		
		<i>Lb. delbrueckii subsp. delbrueckii/Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus, Lb. fermentum, Str. macedonicus</i>	н.о.	
		<i>Lb. rhamnosus, Lb. casei</i>		
		<i>Lb. paracasei/Lb. casei</i>		
		<i>Str. thermophilus</i>		
		<i>Lc. lactis ssp. lactis</i>	42%	
		<i>Lc. garviae</i>	3,1%	
		<i>Lactococcus spp.</i>	2%	
Златарски сир	Србија	<i>En. faecalis</i>	35,4%	Весковић – Морачанин и др., 2013.
		<i>Lb. plantarum</i>	11,4%	
		<i>Lb. sakei/Lb. curvatus</i>	2%	
		<i>Le. mesenteroides ssp. mesenteroides</i>	3,1%	
		<i>Str. thermophilus, Lc. lactis, Lc. raffinolactis, Lb. delbrueckii</i>	н.о.	
		<i>Lb. helveticus, Enterococcus. spp.</i>		
		<i>Lb. brevis, Lb. delbruecki, Lb. fermentum, Lb. gasseri, Lb. helveticus, Lb. parabuchneri, Lb. paracasei subsp. paracasei, En. durans, En. faecalis, Pd. pentosaceus, Str. thermophilus, Weissella viridiscens</i>	н.о.	
Casu Axedu	Италија	<i>Lb. plantarum, Lb. paracasei</i>	н.о.	Ledda, 1996.
		<i>Lb. plantarum</i>	н.о.	
Fontina	Италија	<i>Lb. paracasei</i>	н.о.	Cocconcelli, 1996 a.
		<i>Lb. fermentum</i>	н.о.	
Toma	Италија	<i>Lb. plantarum</i>	н.о.	Cocconcelli, 1996 b.
		<i>Lb. plantarum</i>	н.о.	

н.о. – није одређено

Табела 5.1. (наставак)

Назив сира	Земља порекла	БМК изоловане из производа	Садржај БМК (%)	Референца
Сациоcavallo Molise	Италија	<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	20,8%	Coppola <i>et al.</i> 2003.
		<i>Lb. pentosus</i>	6,7%	
		<i>Lb. coryneformis</i> subsp. <i>torquens</i>	4,6%	
		<i>Lb. plantarum</i>	3,7%	
		<i>Lb. brevis</i>	3%	
		<i>Lb. casei</i>	2,2%	
		<i>Lb. mali</i>	0,7%	
		<i>Lb. rhamnosus</i>	0,5%	
		<i>Lb. sakei</i>	0,5%	
		<i>Lb. coryneformis</i> subsp. <i>coryneformis</i>	0,3%	
		<i>Lb. helveticus</i>	16,9%	
		<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	3,1%	
		<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	0,9%	
		<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	0,5%	
		<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	13,3%	
Montasio	Италија	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	2,9%	Marino <i>et al.</i> , 2003.
		<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	5,8%	
		<i>Lc. plantarum</i>	0,7%	
		<i>En. durans</i>	0,4%	
		<i>En. faecalis</i>	7,6%	
		<i>En. faecium</i>	3,3%	
		<i>En. gallinarum</i>	1,4%	
		<i>Str. thermophilus</i>	44,6%	
		<i>Lb. bif fermentans</i>	0,7%	
		<i>Lb. casei</i>	9,8%	
		<i>Lb. fermentum</i>	1,1%	
		<i>Lb. helveticus</i>	1,4%	
		<i>Lb. paracasei</i>	12,7%	
		<i>Lb. plantarum</i>	4%	
		<i>Lb. rhamnosus</i>	3,3%	
Тома piemontese	Италија	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	18,8%	Zeppa <i>et al.</i> , 2004.
		<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	7,8%	
		<i>Lc. garvieae</i>	34,6%	
		<i>Str. suis</i>	4,7%	
		<i>Str. agalactiae</i>	1,5%	
		<i>Str. dysgalactiae</i>	1,5%	
		<i>Str. macedonicus</i>	4,7%	
		<i>Str. thermophilus</i>	2,3%	
		<i>Str. uberis</i>	0,7%	
		<i>En. faecium</i>	7%	
		<i>En. durans</i>	3,1%	
		<i>En. faecalis</i>	1,5%	
		<i>Enterococcus</i> spp.	3,1%	
		<i>Lb. fermentum</i>	2,3%	
		<i>Lb. coryniformis</i>	0,7%	
<i>Lb. paracasei</i>	1,5%			
<i>Lb. curvatus</i>	1,5%			
<i>Lb. rhamnosus</i>	1,5%			

Табела 5.1. (наставак)

Назив сира	Земља порекла	БМК изоловане из производа	Садржај БМК (%)	Референца
Nostrano di Primiero	Италија	<i>Str. macedonicus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>Pd. pentosaceus</i> , <i>Str. thermophilus</i> , <i>Lc. lactis ssp.</i> <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis ssp. cremoris</i> , <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. paracasei ssp. paracasei</i> , <i>Lb. zaeae</i> , <i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. pentosus</i>	н.о.	Poznanski <i>et al.</i> , 2004.
Каџар	Турска	<i>Lb. casei</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. coryniformis subsp. torquens</i> <i>Lb. reuteri</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> <i>Lb. paracasei</i> <i>Lb. sakei</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. paracasei subsp. paracasei</i> <i>Str. thermophilus</i> <i>En. faecium</i> <i>En. durans</i> <i>Ln. lactis</i> <i>Ln. mesenteroides</i> <i>Ln. spp.</i> <i>Lc. lactis subsp. lactis</i> <i>Lc. lactis subsp. cremoris</i> <i>Weissella halotolerans</i> <i>W. paramesenteroides</i> <i>Pd. pentosaceus</i> <i>Pd. acidilactici</i>	41,58% 12,96% 2,86% 2,36% 1,85% 1,01% 0,84% 0,67% 0,17% 0,17% 5,89% 3,87% 3,37% 1,68% 0,17% 0,34% 0,17% 1,35% 0,84% 0,51% 9,76% 0,84%	Aydemir <i>et al.</i> , 2015.
Гауда	Шведска	<i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. casei</i> <i>Lb. paracasei/Lb. casei</i>	н.о.	Linberg, <i>et al.</i> , 1996.
Чедар	Ирска	<i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. curvatus</i>	н.о.	Fitzimons <i>et al.</i> 1999.
Kefalotyri	Грчка	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. paracasei</i>	н.о.	Litopoulou- Tzanetaki, 1990.
Afuega'l Pitu	Шпанија	<i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. brevis</i>	н.о.	Cuesta, <i>et al.</i> , 1996.
Majorero	Шпанија	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. paracasei</i> <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. fermentum</i>	н.о.	Fontecha <i>et al.</i> , 1990.

н.о. – није одређено

Табела 5.1. (наставкак)

Назив сира	Земља порекла	БМК изоловане из производа	Садржај БМК (%)	Референца
Cabrales (сир од крављег уз додатак козјег и овчјег млека)	Шпанија	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	38%	Belén Flórez <i>et al.</i> , 2006.
		<i>Lb. plantarum</i> / <i>Lb. paraplantarum</i>	12%	
		<i>Lb. casei</i> / <i>Lb. paracasei</i>	6%	
		<i>Lb. kefir</i>	1%	
		<i>Lb. brevis</i>	0,7%	
		<i>Lb. farcinum</i>	0,2%	
		<i>Lb. spp.</i>	2,8%	
		<i>Ln. mesenteroides</i>	16,6%	
		<i>Ln. citreum</i>	7%	
		<i>Ln. pseudomesenteroides</i>	3,5%	
		<i>Ln. lactis</i>	1,5%	
		<i>En. durans</i>	2,5%	
		<i>En. faecium</i>	1,7%	
<i>Enterococcus spp.</i>	2,8%			
		<i>Str. parauberis</i>	2%	

н.о. – није одређено

Ентерококе су присутне код многих занатски произведених сирева посебно у земљама Медитерана (Fontecha *et al.* 1990; Cogan *et al.* 1997; Morea *et al.* 1999). Присуство ентерокока (нарочито *E. faecalis* и *E. faecium*) је посебно карактеристично за сиреве произведене од сировог или пастеризованог овчијег или козјег млека. Такође, ове две врсте имају веома значајну улогу у липолизи, протеолизи и продукцији диацетила код сирева (Giraffa, 2002). Ентерококе добро преживљавају благе термичке третмане, док у сиреве доспевају контаминацијом из животне средине или од сировог млека (Cogan *et al.* 1997; Garcia-Armesto *et al.*, 1993). Због утицаја на зрење, текстуру, развој мириса и осталих сензорних карактеристика сирева (Abeijón *et al.* 2006; Giraffa *et al.* 1997; Fuller, 1989), велики број здравствено безбедних сојева са бактериоцинском активношћу је могуће применити у стартер културама (Abeijon *et al.* 2006; Bulajic and Mijačević, 2003; Bhardwaj *et al.* 2008; Crow *et al.* 2002; Ogier and Serror, 2008; Favaro *et al.* 2014).

Педиококе представљају, такође, део аутохтоне микробиоте сирева и имају значајан удео у зрењу многих сирева (Bhowmik and Mart, 1990). У Пиротском качкаваљу су изоловане врсте *Pd. acidilactici* и *Pd. pentosaceus*. Код качкаваља израђеног од овчијег млека *Pd. acidilactici* је присутан у свим фазама зрења, а највећи удео (47%) је изолован у узорку након 20 дан зрења. У истом узорку изолована је и врста *Pd. pentosaceus*. Такође, код качкаваља израђеног од крављег млека *Pd. acidilactici* је изолован током свих фаза зрења, док је *Pd. pentosaceus* изолован само у

узорку након 60 дана зрења. Генерално, ове две врсте педиокока су идентификоване у неким врстама сирева који се производе на Медитерану (Morea *et al.* 2007; Poznanski *et al.*, 2004; Aydemir *et al.*, 2015), док код зрелог Италијанског сира Parmigiano Reggiano представљају преовлађујућу популацију (Gobbetti *et al.*, 2002). Са друге стране, у новијим истраживањима Пиротског качкаваља израђеног од крављег млека (Остојић, 2012), нису идентификоване врсте овог рода. Коришћење комбинованог стартера ове две врсте педиокока у комбинацији са врстом *Lactobacillus helveticus* поједини аутори препоручују за решавање проблема са бактериофагама у стартерима који се користе у сирској производњи у Италији (Caldwell *et al.*, 1996).

Остале БМК које су идентификоване у Пиротском качкаваљу припадају популацији лактобацила (*Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. casei/ rhamnosus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. casei* и *Lb. paracasei*) и стрептококама (*St. macedonicus*). Ове врсте представљају доминантну популацију БМК изолата у нестартерској микробиоти многих сирева где имају значајан ефекат на формирање ароме сирева (Beresford *et al.*, 2001; Wouters *et al.*, 2002). Врста *Lb. plantarum* изолована је Bryndza Словачком сиру (Belicová *et al.*, 2013), Бугарском белом сиру у саламури (Georgieva *et al.*, 2008), Италијанским и Аргентинским сиревима (Zago *et al.*, 2011) и Француским меким сиревима (Mills *et al.*, 2011). *Lb. fermentum* је изолован из Турског сира Tulum (Tulumoğlu *et al.*, 2014), Египатских сирева Domiatti и Ras (El-Ghaish *et al.*, 2010), Естонских меких сирева (Järvenpää *et al.*, 2007), белог сира од крављег млека у саламури (Terzić –Vidojević *et al.*, 2014). У сиревима Parmigiano Reggiano (Coppola *et al.*, 2005; Succi *et al.*, 2005; De Dea Lindner *et al.*, 2008; Vove *et al.*, 2011) и Ирском Cheddar сиру (Mlalazi *et al.*, 2011) изолована је и идентификована врста *Lb. rhamnosus*. Врсте БМК *Lb. casei* и *Lb. paracasei* изоловане су и идентификоване у Шпанском сиру Cabrales (Belén Flórez *et al.*, 2006), Турском сиру Kaşar (Aydemir *et al.*, 2015) и Италијанском сиру Montasio (Marino *et al.*, 2003). Представнике ових врста лактобацила карактерише добар пробиотски потенцијал и продукција различитих класа бактериоцина (Mlalazi *et al.*, 2011; Tulumoğlu *et al.*, 2014; Zago *et al.*, 2011; Milićević *et al.*, 2014).

Код Пиротског качкаваља израђеног од овчијег млека идентификована је и популација *Str. macedonicus*. Ова врста је првобитно изолована и идентификована у Грчком сиру Kasserı (Tsakalidou *et al.*, 1998; Georgalaki *et al.*, 2000), а такође је идентификована у Италијанским сиревима од сировог млека: Asiago, Montasio, Monte Veronese, Morlacco, Sprezza, Fontina, Ragusano, Mozzarella (Lombardi *et al.* 2004),

Nostrano di Primiero (Poznanski *et al.*, 2004), Toma piemontese (Zeppa *et al.*, 2004), као и у Пиротском качкаваљу израђеним од крављег млека (Остојић и сар., 2012). Ова врста стрептокока има добра ацидификациона, протеолитичка и бактериоцинска својства, па је неки аутори карактеришу као мулти-функционалну и веома погодну за млекарску производњу (De Vuyst and Tsakalidou, 2008).

Микробиолошки профил популације БМК сличан Пиротском качкаваљу забележен је код традиционално произведених сирева у области Медитерана: Casiocavallo Molise (Coppola *et al.* 2003), Casiocavallo Pugliese (Morea *et al.* 2007), Montasio (Marino *et al.*, 2003), Toma piemontese (Zeppa *et al.*, 2004), Nostrano di Primiero (Poznanski *et al.*, 2004) и Kaşar (Aydemir *et al.*, 2015).

## 5.2 Хемијски састав качкаваља

Током прераде и зрења сирева, уз сложене биохемијске и хемијске процесе, као што су липолиза, протеолиза и ферментација, формира се типичан укус, текстура и изглед карактеристичан за сваку врсту сира. Дакле, јединствени укус одређене врсте сира је резултат комплексног баланса између испарљивих и неиспарљивих хемијских једињења која се јављају током процеса зрења од млечне масти и протеина и угљених хидрата (Fox and Wallace, 1997).

Хемијска анализа узорака качкаваља обухватала је анализу органских киселина на течној хроматографији високих перформанси (HPLC анализе) и анализу испарљивих једињења гасном хроматографском масеном спектрометријом (GC-MS анализа).

Анализом органских киселина присутних у анализираним узорцима Пиротског качкаваља утврђено је присуство млечне, јабучне, лимунске и сирћетне киселине. Такође, у траговима је детектована и пирогрожђана киселина. Ове органске киселине су продукти активности специфичне микробиоте, пре свега доминанте популације хомоферментативних *Pd. acidilactici* и *En. faecium* које су одговорне за продукцију најзаступљеније млечне киселине, чија се концентрације креће у опсегу 0,4-0,6%, зависно од фазе зрења. Добијене вредности садржаја органских киселина су у складу са литературним подацима (Perko *et al.*, 1990, Lues & Bekker, 2002, DeLiano *et al.*, 1996).

За одређивање испарљивих једињења из узорака качкаваља коришћена је метода микроекстракције са полиакрилним (РА) и полидиметилсилоксанским (PDMS) влакнима. Неполарна PDMS влакна показују задовољавајуће резултате за једињења

ниског до средњег поларитета док су се PA влакна, напротив, показала веома погодна за високо поларна једињења ширег опсега испарљивости (Mondello *et al.*, 2005). Влакна са PDMS и PA слојем су често коришћена за екстракцију испарљивих једињења код различитих врста сирева: Камембера, Чедра, Немачких, Швајцарских, Романо, и Сицилијанских козјих сирева (Chin *et al.*, 1996; Peres *et al.*, 2001; Mondello *et al.*, 2005).

Детектована испарљива једињења у испитиваним узорцима качкаваља припадају естрима, монокарбонским киселинама, алкохолима, кетонима, алдехидима, терпенима и угљоводоницима. Једињења идентификована у Пиротском качкаваљу од овчијег млека током зрења су познате компоненте идентификоване у сиревима. Органске киселине и кетони формирају најважније групе по проценту учешћа у свим једињењима.

Укупан садржај карбонских киселина има тенденцију повећања током зрења. Од свих киселина, бутерна киселина показује највећу вредност у свим узорцима и у свим фазама зрења, док су у опадајућем редоследу заступљене и хексанска, сирћетна и октанска киселина. Заступљеност сирћетне, бутанске и хексанске киселине има растући тренд у току зрења.

У узорцима овчијег и крављег качкаваља идентификоване су компоненте које су груписане према својој природи: 8 киселина, 17 естара, 15 алкохола, 9 кетона, 3 алдехида и 6 компоненти које нису могле бити сврстане у поменуте групе. Свака од поменутих компоненти има карактеристичну мирисну ноту и учествује у формирању специфичне ароме сирева. Запажене су значајне разлике у садржају испарљивих једињења током зрења, при чему се концентрације неких једињења повећавају, док се концентрације других смањују. При поређењу хроматограма овчијег и крављег качкаваља, 30 пикова је заједничко за обе врсте качкаваља. Осим тога, утврђено је да се при зрењу овчијег качкаваља развија више испарљивих компоненти (укупно 55 различитих једињења). Око 90% испарљивих једињења детектованих у качкаваљу потичу из узорака овчијег качкаваља.

Може се претпоставити да главна арома ових сирева потиче од линеарних zasiћених слободних масних киселина кратких и средње дугих ланаца које су најзаступљеније компоненте у испарљивој фракцији свих узорака. Осим што представљају компоненте ароме, ова једињења су и прекурсори за добијање других једињења, као што су метил кетони, алкохоли, лактони, алдехиди и естри (Collins, McSweeney, & Wilkinson, 2003). Естри представљају најбројнију али не и

најзаступљенију групу једињења. Додатно, према великом проценту површине њихових пикова, алкохоли и кетони учествују у формирању профила испарљивих једињења током зрења сирева.

Једињења која су идентификована у овчијем качкаваљу представљају добро познате компоненте ароме сирева. Киселине и кетони представљају групе које су највише заступљене у суми површина пикова.

Укупан садржај карбоксилних киселина повећава се током зрења. Највеће вредност површине пика у свим узорцима и свим фазама зрења уочена је код бутанске киселине, а након ње, по опадајућем редоследу, следе хексанска, сирћетна и октанска киселина. Вредности површине сирћетне, бутанске и хексанске киселине показују тренд раста. Сматра се да карбоксилне киселине кратких и средње дугих ланаца највише доприносе профили ароме различитих врста овчијих сирева: Шпанског меког сира PDO Tortosa de Casar (Delgado *et al.*, 2010), тврдог сира Pecorino Siciliano (Randazzo *et al.*, 2008), Terincho сира (Pinho *et al.*, 2003) и Idiazabal сира (Baron *et al.*, 2007).

Током различитих фаза зрења Пиротског качкаваља произведеног од овчијег млека естарске групе су детектоване код 16 компоненти, при чему је 8 детектовано у завршној фази зрења након 30 дана. Од детектованих естара најбројнији су етил естри (ацетат, бутаноат, хексаноат, октаноат, деканоат). Осим тога детектовани су и два метил естра (хексаноат, октаноат), три метипропил естра (бутаноат, хексаноат, метилбутират) два метилбутил естри (хексаноат, бутаноат) и метилетил естар (хексаноат) који је присутан само у узорцима након 5 и 10 дана зрења. Етил естри имају значајну улогу у формирању укуса на воће у сиру (Randazzo *et al.*, 2008). Присуство значајних количина слободних масних киселина и етанола у свим фазама зрења може бити повезано са формирањем етил естара. Према резултатима Делгада и сарадника (2010), смањење количине неких алкохола и киселина током зрења може бити повезано са формирањем естара у овчијем сиру Torta del Casar. Висок ниво етил естара је утврђен и код других врста сирева од овчијег млека (Baron *et al.*, 2007; Carbonell *et al.*, 2002; Delgado *et al.*, 2010; Randazzo *et al.*, 2008).

Алкохоли су у великом броју (13) присутни у овчијем качкаваљу, али су само алкохоли са мањим бројем угљеникових атома детектовани у значајнијој количини. Од алифатичних алкохола детектовани су примарни (само етанол), секундарни и разгранати облици. Етанол, 2-пропанол, 2-пентанол, 3-метил 1-бутанол и 2-хептанол су



детектовани у свим узорцима сира, док се 2-бутанол, 2-метил-1-бутанол и фенил-етил алкохол јављају након 5 дана зрења. Значајно присуство 2-пентанола и 3-метил-1-бутанола доприноси пријатној ароми сира с обзиром да се ове компоненте сматрају значајним за формирање ароме и повезане су са воћним укусом. Једињења 2-метил-1-пропанол и бутандиол детектована су само на почетку зрења (након 1 и 5 дана зрења) и немају утицај на формирање коначне ароме готовог производа. Од ароматичних алкохола, детектован је бензил алкохол који доприноси слаткастој ароми сира. С обзиром да процес пастеризације млека негативно утиче на формирање алкохола током зрења сирева (Ortigosa *et al.*, 2005), алкохоли представљају главну групу испарљивих једињења у сиревима произведеним од овчијег сировог млека: сир Pecorino Romano (Di Cagno *et al.*, 2003), La Serena сир (Carbonell *et al.*, 2002) и Castellano сир (Fernández-García, *et al.*, 2004). Смањење количине алкохола током зрења и њихова мала количина у коначном производу примећена је једино код Torta del Casar сира и може се објаснити различитим начином зрења које доводи до одвијања различитих метаболичких путева који су укључени у процес формирања алкохола у сиру.

Кетони су друга група по заступљености и њихова укупна количина се смањује на крају периода зрења. С обзиром да поседују типичне ароме, они могу имати значајну улогу у коначној ароми Пиротског качкаваља од овчијег млека. Вредности површина пикова за појединачне кетоне прате различите трендове током зрења. Варијације концентрације кетона током зрења могу бити последица конверзије неких 2-алканона у одговарајуће 2-алканоле помоћу ензима оксидоредуктазе (Barbieri *et al.*, 1994). Слични резултати добијени су и за друге овчије сиреве произведене од сировог млека. Висок ниво метил кетона детектован је у испарљивој фракцији сира Parmigiano, са преовлађујућим 2-пентаноном и 2-хептаноном (Barbieri *et al.*, 1994, Bellesia *et al.*, 2003). Такође, кетони су главне компоненте одговорне за арому других врста сирева као што су Fiore Sardo (Di Cagno *et al.*, 2003) и Idiazabal (Barron *et al.*, 2007). Низак садржај кетона детектован је у сиревима Torta del Casar, La Serena и Pecorino Siciliano (Delgado *et al.*, 2010, Carbonell *et al.*, 2002, Randazzo *et al.*, 2008).

У Пиротском качкаваљу произведеном од овчијег млека детектована су три алдехида (3-метилбутанал, 2-метилбутанал и ароматични бензалдехид), док је само бензалдехид идентификован у свим узорцима. Бензалдехид потиче из Strecker реакције и доприноси ароматичној ноти горког бадема (Molimard and Spinnler, 1996). Једињење 3-метилбутанал је детектовано у узорцима након 5 и 20 дана зрења, док је 2-

метилбутанал пронађен у траговима само у узорку након 20 дана зрења. Алдехиди представљају нестабилна једињења која се у условима који владају у сиру лако редукују до алкохола или оксидују до киселина, па се у ниским концентрацијама јављају у испарљивим фракцијама већине сирева (Fernandez-Garcia et al., 2004). Низак ниво алдехида је индикатор оптималног процеса зрења јер високе концентрације могу изазвати недостатке у ароми (Moio & Addeo, 1998).

Од осталих компоненти у овчијем качкаваљу су детектовани један алифатични (хексан) и ароматични (толуен, р-ксилен) угљоводоник и терпен (лимонен). Угљоводоници могу потицати директно из хране (Viallon et al., 1999) или настати током зрења као резултат аутооксидације липида (Barbieri et al., 1994). Неки аутори су показали да бензил једињења, укључујући толуене, настају разградњом каротена у млеку (Johnson, Nursten and Self, 1969). Лимонен је детектован у свим узорцима овчијег качкаваља и потиче од сточне хране (Viallon et al., 1999). Присуство лимонена је утврђено и у другим италијанским сиревима од овчијег млека: La Serena, Pecorino Siciliano и Idiazabal (DiCagno et al, 2003, Carbonell et al, 2003, Randazzo et al, 2008, Barron et al., 2007). Хексан, толуен и р-ксилен су такође детектовани у сиру Idiazabal (Barron et al., 2007), хексан је у траговима детектован у сиру Pecorino Siciliano (Randazzo et al, 2008), док су Fernandez-Garcia и сар. (2004) утврдили присуство толуена у сиру Castellano.

Током зрења крављег качкаваља идентификоване су сирћетна, бутанска и хексанска киселина, док је октанска киселина присутна у траговима. На почетку зрења сирћетна киселина је представљала главну компоненту, али је током ферментације имала је тренд опадања. Вредности површине пикова бутанске и хексанске киселине повећавају се 20. дана зрења, након чега се до 30. дана смањују услед, вероватно трансформисања у друге компоненте. Висока количина сирћетне киселине повезана је са опорим и мирисом на сирће који може бити повезан и са слабо киселим укусом ових сирева. Литературни подаци указују да су SPME-GC/MS анализом добијени различити резултати за различите врсте сирева од крављег млека. Профил испарљивих компоненти у сиру “Provola dei Nebrodi” (Ziino et al., 2005), сличан је као код Пиротског качкаваља, указујући да су главне компоненте током зрења масне киселине (преко 50% идентификованих компоненти) али са најзаступљенијом хексанском киселином. Такође, хексанска и бутанска киселина су најзаступљеније слободне масне киселине у сиру Parmigiano (Bellesia et al., 2003).

Естри су у ниским концентрацијама идентификовани у пиротском качкаваљу од крављег млека. Од девет идентификованих естара већина (6) су етил естри присутни у скоро свим узорцима. Остали идентификовани естри су детектовани само у једном узорку у коначној фази зрења и то у веома малој концентрацији: 1-бутанол-3-метил-ацетат, 2-метилпропил-бутаноат и 2-метилпропил-3-метилбутират. Метил-2-хидрокси-4-метилпентаноат представља једини естар који је у значајној количини детектован у крављем качкаваљу, али само на почетку зрења, па се може сматрати да нема утицаја на коначни профил испарљивих компоненти у Пиротском качкаваљу од крављег млека. Према доступним литературним подацима овај естар није раније изолован из других крављих сирева.

Алкохоли су у Пиротском качкаваљу од крављег млека детектовани у високим концентрацијама. Етанол, 2-пентанол и 3-метил-1-бутанол чине једну трећину испарљивих компоненти на крају процеса зрења и доприносе воћној, алкохолној и слаткој ноти ароме сира. Алкохоли 1-пентанол и 2,3-бутандиол су идентификовани само на почетку зрења (након 1 и 5 дана зрења), док је фенил-етил алкохол идентификован у свим узорцима. Једињење 2-хептанол који је идентификован у овчијем качкаваљу, детектован је само у узорку након 20 дана зрења. Етанол је најзаступљенији алкохол у свим фазама зрења, што је у сагласности са подацима за сир Cheddar (Aroga *et al.*, 1995). Алкохоли су, такође, детектовани у великим количинама у неким крављим сиревима као што су Cheddar (Barlow *et al.*, 1989; Shakeel-Ur-Rehman *et al.*, 2000) и сиреви типа Camembert (Peres *et al.*, 2001). С друге стране, алкохоли су у малој количини нађени у сиревима Parmigiano (Bellesia *et al.*, 2003) и Provola dei Nebrodi (Ziino *et al.*, 2005).

Ниво кетона се повећао током 20 дана зрења крављег качкаваља, а затим благо опада. Најзаступљенији кетони су ацетон, 2-пентанон, 3-хидрокси-2-бутанон, 2-хептанон и 2-нонанон. Утврђено је да су метил кетони главне компоненте одговорне за арому различитих врста крављег сира: Cheddar (Shakeel-Ur-Rehman *et al.*, 2000), Camembert (Peres *et al.*, 2001), Provola dei nebrodi (Ziino *et al.*, 2005) и сир Parmigiano (Bellesia *et al.*, 2003). Као и код овчијег качкаваља, утврђено је присуство три алдехида (3-метилбутанал, 2-метилбутанал и ароматични бензалдехид) у узорцима на почетку зрења (након 1 и 5 дана зрења). У узорку након 30 дана зрења нису детектовани алдехиди, што указује на оптимални процес зрења. Иако алдехиди не представљају главне компоненте и не акумулирају се у значајној количини током зрења, детектовани

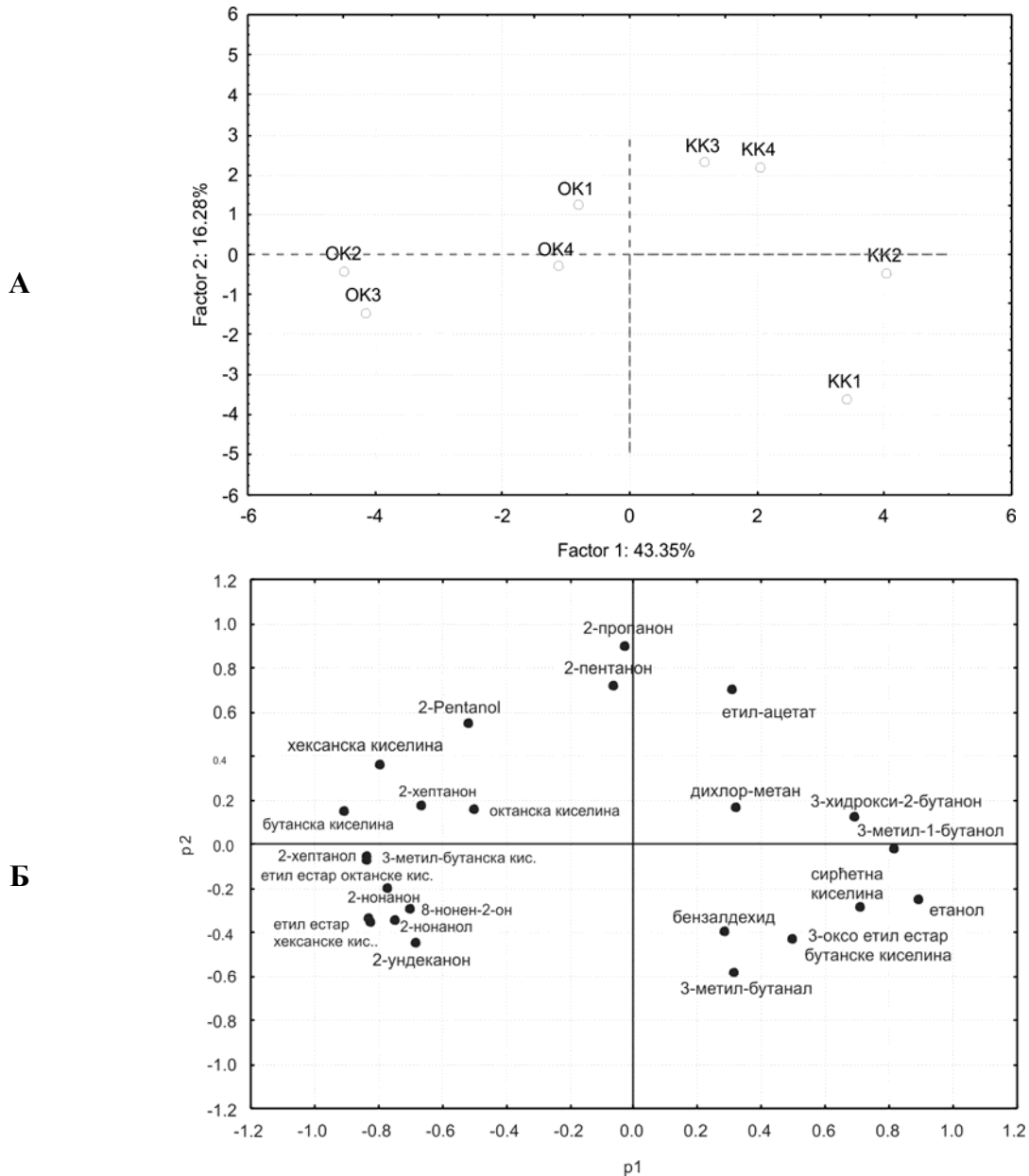
су у сиревима *Provola dei Nebrodi* (Ziino *et al.*, 2005), *Cheddar* (Shakeel-Ur-Rehman *et al.*, 2000) и *Swiss Gruyere* (Rychlik and Bosset, 2001).

У узорцима крављег качкаваља, са изузетком *p*-ксилена и толуена (детектовани у траговима у узорку након 5 дана зрења), детектована су иста једињења која припадају осталим групама једињења као у овчијем качкаваљу. Лимонен је често детектован у крављим сиревима као што су *Provola dei nebrodi* (Ziino *et al.*, 2005), *Camembert* (Peres *et al.*, 2001), и неким узорцима сира *Parmigiano* (Bellesia *et al.*, 2003), док је толуен присутан у сиревима *Camembert* и *Provola dei nebrodi* (Peres *et al.*, 2001, Ziino *et al.*, 2005). Мада лимонен потиче са биљака које се користе као сточна храна (Viallon *et al.*, 1999) и на тај начин се преноси у млеко, његово присуство и утицај на формирање ароме сира остаје контраверзно (Randazzo *et al.*, 2008).

У циљу одређивања најважнијих испарљивих једињења у свакој фази зрења, као и анализе разлика између качкаваља направљених од овчијег и крављег млека, примењена је статистичка техника Анализа главних компоненти. Статистичком анализом је обухваћено 24 једињења које су се јавила у значајној количини у свим узорцима качкаваља независно од врсте млека које је коришћено за припрему. Ова једињења су показала да 3 главне компоненте објашњавају 76% варијанси. Дијаграм конструисан од прве две главне компоненте (фактора) одваја узорке качкавања у две групе (слика 5.1А).

Прва главна компонента (ГК1) која објашњава 43% укупних варијанси, јасно раздваја узорке качкаваља припремљене од овчијег и крављег млека, док ГК2 (објашњава 16% укупних варијанси) одваја узорке из ранијих фаза зрења од зрелог качкаваља (слика 5.1А). На позитивној области ГК1 лоцирана су испарљива једињења одређена у већем степену код крављег качкаваља (етанол, 3-метил-1-бутанол, сирћетна киселине и 3-хидрокси-2-бутанон) (слика 5.1Б). У негативном опсегу ГК1 налазе се једињења која узрокују арому овчијег качкаваља, пре свега киселине (бутанска, хексанска и октанска), алкохоли (2-нонанол и 2-хептанол) и естри (етил-естри октанске и хексанске киселине) (слика 5.1Б). Сиреви у каснијим фазама зрења (овчији качкаваљ након 30 дана и кравњи качкаваљ након 20 и 30 дана зрења) су лоцирани на позитивној ГК2 оси, док су остали узорци у доњем делу слике 5.1А. Оба узорка зрелог сира карактеришу се високим уделом ацетона, 2-пентанона, етил-ацетата и 2-пентанола. Испарљива једињења постављена у доњем левом делу слике 5.1Б (етил естри октанске

и хексанске киселине, 2-нонанол, 2-хептанол, 2-нонанон, 8-нонен-2-он и 2-ундеканон) указују на профил испарљивих једињења овчијег качкаваља након 1, 5 и 20 дана зрења. У доњем десном делу слике 5.1.А лоцирани су узорци крављег качкаваља након 1 и 5 дана зрења који се карактеришу већим уделом 3-метил-бутанала, 3-етил естром бутанске киселине, бензалдехида, сирћетне киселине и етанола.



Слика 5.1 Дијаграм скора (А) и оптерећења (Б) добијени анализом главних компоненти испарљивих једињења овчијег (ОК) и крављег (КК) качкаваља у току зрења (ОК1, КК1 након 1 дан; ОК2 и КК2 након 5 дана; ОК3 и КК3 након 20 дана; ОК4 и КК4 након 30 дана)

### 5.3 Технолошке карактеристике изолата БМК

Производња аутохтоних стартер култура, састављених од добро истражених природних изолата БМК, основа је за добијање производа са декларацијом специфичног географског порекла (Остојић и Тописировић, 2006). Коришћење аутохтоних сојева као стартер култура захтева испуњавање одређених критеријума везаних за функционалност и пробиотске карактеристике. У ту сврху извршене су додатне анализе 107 селектованих представника изолованих БМК. Пре свега, проучавана је способност преживљавања у подлози са 0,3% жучне соли, продукција диацетила, способност коришћења цитрата, синтеза полисахарида и антимикробна активност свих изолата.

Већина селектованих изолата (71%) расте у присуству 0,3% жучних соли. Највећу способност преживљавања у присуству жучних соли утврђена је код лактобацила с обзиром да 100% припадника овог рода показују раст у подлози са 0,3% жучних соли (табела 4.7). Такође, добра способност преживљавања уочена је код *En. faecium* (где 84% популације преживљава) и *Pd. pentosaceus* (50%). Најосетљивија на присуство жучних соли је врста *Str. macedonicus*, док је код врсте *Pd. acidilactici* уочена резистентност на жучне соли код 16% анализираних изолата. Ови резултати су у складу са досадашњим истраживањима (Ripamonti *et al.*, 2007; Zoumproulou *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2014; Sukumar and Ghosh 2010; Sahar *et al.*, 2012).

Коришћење цитрата забележено код 43 изолата што представља 40% од свих селектованих изолата. Око 31 % селектованих изолата има способност стварања диацетила. Диацетил продукују *Pd. acidilactici* (6 изолата), *Pd. pentosaceus* (1), *En. faecium* (6), *Lb. fermentum* (2), *Lb. casei* (11), *Lb. casei / rhamnosus* (5), *Lb. paracasei* (1), *Lb. rhamnosus* (1) и *Lb. plantarum* (2). Литературни подаци такође потврђују способност педиокока (Paragianni и Anastasiadou, 2009) и ентерокока (Pakdeeto *et al.*, 2003) да продукују диацетил. Продукција диацетила је најизраженија код лактобацила што је у складу са литературним подацима према којима је способност продукције диацетила потврђена за сојеве *Lb. rhamnosus* (Medina de Figueroal *et al.*, 2001), *Lb. casei* (Hussain *et al.*, 2009) и *Lb. paracasei* (Aunsbjerg *et al.*, 2015) изоловане из сирева и ферментисаних млечних производа. Способност синтезе диацетила је битна за формирање ароме већине ферментисаних млечних производа, тако да изолати који синтетишу диацетил могу ући у састав мешаних стартера култура за индустријску производњу (Randazzo *et al.*, 2006).

Егзополисахариде су способни да продукују укупно 6 изолата, од тога на глюкози 3, на малтози 4, на лактози 5 и на сахарози 1 изолат. Међу изолатима који поседују способност синтезе егзополисахарида, најбројнији су представници врсте *Pd. acidilactici*. Егзополисахариди, осим значаја код постизања одговарајућих технолошких особина код ферментисаних производа од млека (Ruas-Madiedo *et al.*, 2002), имају улогу у подизању имуног статуса код људи (Hosono *et al.*, 1997), снижавању холестерола (Nakajima *et al.*, 1992), а поједина истраживања указују и на антитуморско деловање (Kitazawa *et al.*, 1991). Код бактерија, ЕПС имају улогу у заштити од неповољних чиниоца као што је сушење, мањак хранљивих материја, присуство токсичних једињења, бактериофаге, осмотски стрес и антагонисти (Patel *et al.*, 2012).

Антимикробна активност на бактеријске тест културе *Lc. lactis* subsp. *lactis* BGMNI-596, *Lc. lactis* subsp. *lactis* NP-45, *Listeria* sp. и *Listeria monocytogenes* утврђена је код 8 од 107 изолата. Најизраженије дејство изолати су показали према *Listeria* sp. Сви изолати припадају врстама које су познати продуценти бактериоцина (Minervini *et al.*, 2009; Ahmadova *et al.*, 2013; Klare *et al.*, 2007). Ови изолати могу бити веома ефикасно средство за контролу патогена у сиревима или се могу користити у комбинацији са другим познатим представницима БМК као дефинисане стартер културе у производњи сирева типа качкаваља.

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу спроведених истраживања промене популације БМК у току зрења Пиротског качкаваља произведеног од овчијег и крављег млека, може се закључити следеће:

- број микроорганизама у узорцима качкаваља припремљеног од овчијег и крављег млека током зрења креће се у границама 6-8 log CFU/g,
- бактерије млечне киселине доминирају у микробној популацији у свим фазама зрења, независно од врсте млека од којег је припремљен качкаваљ,
- током зрења из узорака качкаваља изоловано је укупно 315 сојева БМК (173 изолата из овчијег и 142 изолата из крављег качкаваља),
- у току зрења, у узорцима качкаваља доминирају родови *Enterococcus* и *Pediococcus*, док су у мањој мери присутне врсте рода *Lactobacillus* и *Streptococcus*, при чему су ентерококе процентуално најбројније БМК (*En. faecium* чини око 50 % укупно идентификоване микробиоте у качкаваљу од овчијег, а 44 % у качкаваљу припремљеног од крављег млека),
- бактерија *En. faecium* је идентификована у свим фазама зрења код качкаваља од овчијег млека (највећу бројност достиже у узорку у почетним фазама зрења - 85% бактеријске популације, док у каснијим фазама зрења удео се смањује до 55% од укупног броја изолованих БМК), док код узорака крављег качкаваља, доминира у почетним фазама зрења (око 90%), док у узорцима након 30 и 60 дана зрења није изолована,
- две врсте педиокока је изоловано из узорака качкаваља (*Pd. acidilactici* и *Pd. pentosaceus*), при чему *Pd. acidilactici* присутан у свим фазама зрења код качкаваља израђеног од овчијег и крављег млека, док је *Pd. pentosaceus* изолован само у узорку након 20 дана зрења овчијег, а након 60 дана зрења крављег качкаваља,
- у узорцима качкаваља у мањој учесталости изоловане су врсте рода *Lactobacillus* (*Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. casei/rhamnosus*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. casei* и *Lb.*



*paracasei*) и *Streptococcus macedonicus* (једино код качкаваља од овчијег млека на почетку зрења),

- у анализираним узорцима качкаваља утврђено је присуство млечне (доминантна са уделом 0,4-0,6%), јабучне, лимунске и сирћетне киселина, као и пирогрожђане киселине у траговима,
- детектована испарљива једињења у испитиваним узорцима качкаваља припадају естрима (17), монокарбонским киселинама (8), алкохолима (15), кетонима (9), алдехидима (3), терпенима и угљоводонцима, при чему се током зрења концентрације неких једињења повећавају, док се концентрације других смањују,
- 30 једињења је заједничко за обе врсте качкаваља, при чему се при зрењу овчијег качкаваља развија више испарљивих компоненти (укупно 55 различитих једињења),
- линеарне засићене слободне масне киселине кратких и средње дугих ланаца су најзаступљеније компоненте у испарљивој фракцији свих узорака качкаваља, док органске киселине и кетони формирају најважније групе по проценту учешћа у свим једињењима (бутерна киселина показује највећу вредност у свим узорцима и у свим фазама зрења, док су у опадајућем редоследу заступљене и хексанска, сирћетна и октанска киселина),
- од 107 издвојених представника изолата БМК за проучавање испуњавања критеријума функционалности и пробиотских карактеристика, већина (71%) расте у присуству 0,3% жучних соли, при чему је највећа способност преживљавања утврђена код лактобацила (сви представници овог рода показују раст у присуству жучних соли) и код *En. faecium* (84% популације преживљава),
- коришћење цитрата забележено код 40% од свих селектованих изолата, око 32 % селектованих изолата има способност стварања диацетила, а 12% изолата је имало способност синтезе егзополисахарида,
- антимикуробна активност на бактеријске тест културе утврђена је код 8 изолата, при чему је једино изолат *En. faecium* изолован из овчијег качкаваља показао антимикуробну активност према свим тест микроорганизмима, и
- изолати из Пиротског качкаваља врсте *Lb. casei* представљају добру основу за даље проучавање могућности коришћења у стартер културама.

## 7. ЛИТЕРАТУРА

- Abd El-Salam, M.H., Alichanidis, E.: Cheese varieties ripened in brine (3rd ed. In P.F. Fox, P.L.H., McSweeney T.M. Logan and T.P. Guince) (2004) Cheese: Chemistry, Pyhsics and Microbiology, Amsterdam:Elsevier, Vol. 2, pp. 227-249.
- Abeijón, M. C., Medina, R. B., Katz, M. B., González, S. N. (2006) Technological properties of *Enterococcus faecium* isolated from ewe's milk and cheese with importance for flavour development, *Canadian Journal of Microbiology*, 52(3): 237-245.
- Ahmadova, A., Todorov, S. D., Choiset, Y., Rabesona, H., Mirhadi Zadi, Kuliyeu, T. M. (2013) Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese, *Food Control*, 30 (2), 631-641.
- Alrubai, Abdulah (1979) Promene belančevina u toku zrenja kačkavalja proizvedenog različitim proteolitičkim fermentima, doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet-Zemun, Univerzitet u Beogradu.
- Altuntas, E.G., Cosansu, S., Ayhan, K. (2010) Some growth parameters and antimicrobial activity of a bacteriocin-producing strain *Pediococcus acidilactici* 13, *International Journal of Food Microbiology*, 141:28-31.
- Amiel, C., Mariey, L., Curk-Daubie, M.C., Pichon, P., Travert, J. (2000) Potentiality of Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) for discrimination and identification of dairy Lactic acid bacteria, *Le Lait*, 80, 445-459.
- Anderson, D. F., & Day, E. A. (1966) Quantitation, evaluation and effect of certain microorganisms on flavour components of Blue cheese, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 14, 241–245.
- Annonymous 1 (2013) <http://en.wikipedia.org/wiki/Caciocavallo>
- Annonymous 2 (2011) [http://www.caciocavallosilano.net/home\\_uk.htm](http://www.caciocavallosilano.net/home_uk.htm)
- Annonymous 3 (2013) [www.biokar-diagnostics.com/solabia/...nsf/0/.../TDS\\_BK087\\_v6.pdf](http://www.biokar-diagnostics.com/solabia/...nsf/0/.../TDS_BK087_v6.pdf)
- Ansari, A., Aman, A., Siddiqui, N. N., Iqbal, S., & Qader, S. A. (2012). Bacteriocin (BACIB17): screening, isolation and production from *Bacillus subtilis* KIBGE IB-17, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 125, 195-201.

- Arora, G., Cormier, F. and Lee, B. (1995) Analysis of odor-active volatiles in Cheddar cheese headspace by multidimensional GC/MS/sniffing, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43,748-752.
- Aunbjerg , S.D., Honoré, A.H., Marcussen , J., Ebrahimi , P., Vogensen, F.K., Benfeldt, C., Skov, T., Knøchel, S. (2015) Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yogurt, *International. Journal of Food Microbiology* 194, 46-53.
- Axelsson, L. (1998) Lactic Acid Bacteria: Clasification and Physiology, In Lactic Acid Bacteria-Microbiology and Functional Aspects, Marcel Dekker, USA, p. 1-72.
- Ayati, F., Aziza, M., Maachi, R. and Amrane, A. (2010) The Substrate Carbon Consumption and Metabolite Production to Describe the Growth of *Geotrichum candidum* and *Penicillium camemberti* on Glucose and Amino Acids, *Food Technol. Biotechnol.* 48 (1) 79-85.
- Aydemir, O., Harth, H., Weckx, S., Dervişoğlu, M., De Vuyst, L. (2015) Microbial communities involved in Kaşar cheese ripening, *Food Microbiology* 46, 587-595.
- Бараћ, М., Јовановић, С., Мађеј, О. (2006) Протеолитичке промене током зрења аутохтоних белих сирева у саламури, у: Аутохтони бели сиреви у саламури, Дозет, Н., Мађеј, О. (уредници), монографија, Пољопривредни факултет - Земун, Универзитет у Београду, 65-86.
- Barbieri, G., Bolzoni, L., Careri, M., Mangia, A., Parolari, G., Spagnoli, S., & Virgili, R. (1994) Study of the volatile fraction of Parmesan cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 1170-1176.
- Barlow, I., Lloyd, G. T., Ramshaw, E. H., Miller, A. J., McCabe, G. P. and McCabe, L. (1989) Correlations and changes in flavours and chemical parameters of Cheddar cheese during maturation, *Australian Journal of Dairy Technology*, 44, 7-18.
- Barron, L. J. R., Redondoa, Y., Aramburu, M., Gil, P., Perez-Elortondo, F. J., Albisu, M., Najera, A. I., de Renobales, M. and Fernandez-Garcia, E. (2007) Volatile composition and sensory properties of industrially produced Idiazabal cheese, *International Dairy Journal*, 17, 1401-1414.
- Baruzzi, F., Matarante, A., Morea, M., Cocconcelli, P. S. (2002) Microbial Community Dynamics during the Scamorza Altamura Cheese Natural Fermentation, *Journal of Dairy Science*, 85,6, 1390-1397.

- Bauer, R., Bekker, J.P., van Wyk, N., du Toit, C., Dicks, L.M.T. and Kossmann, J. (2009) Exopolysaccharide production by lactose-hydrolyzing bacteria isolated from traditionally fermented milk, *International Journal of Food Microbiology*, 131: 260-264.
- Belén-Flórez, A., López-Díaz, T. M., Álvarez-Martín, P., Mayo, B. (2006) Microbial characterisation of the traditional Spanish blue-veined Cabrales cheese: identification of dominant lactic acid bacteria, *European Food Research Technology*, 223: 503-508.
- Belicová, A., Mikulášová, M. and Dušinský, R. (2013) Probiotic Potential and Safety Properties of *Lactobacillus plantarum* from Slovak Bryndza Cheese, *BioMed Research International*, Vol. 2013, 1-8.
- Bellesia, F., Pinetti, A., Pagnoni, U., Rinaldi, R., Zucchi, C., Caglioti, L., and Palyi, G. (2003). Volatile components of Grana Parmigiano-Reggiano type hardcheese, *Food Chemistry*, 83, 55-61.
- Benito de Cardenas, L. I., Cerutti de Gugliemone, G., Lesdema, O., Oliver, G. (1990) Diacetyl and acetoin production from pyruvate by cell suspensions of lactobacilli, *Milchwissenschaft*, 45, 775-777.
- Beresford, P. T., Fitzsimons, A.N., Brennan, L. N., Cogan, M. T. (2001) Recent advances in cheese microbiology, *International Dairy Journal*, 11, 259-274.
- Bergy's Manual of Systematic Bacteriology (2004) Edited by Garrity, G.M., Bell, J.A. and Lilburn, T.G. Springer, New York-Berlin-Heidelberg, Second Edition, p.199.
- Bernardeau, M., Vernoux, J. P., Henri-Dubernet, S., Guéguen, M. (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus, *International Journal of Food Microbiology*, 126, 278-285.
- Bhardwaj, A., Malik, R.K., Chauhan, P. (2008) Functional and safety aspects of enterococci in dairy foods, *Indian Journal of Microbiology*, 48, 317-325.
- Bhowmik, T. and Mart E. H. (1990) Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* Species in Cheese Ripening: A Review, *Journal of Dairy Science*, Vol. 73, 4, 859-866.
- Bogojevski, T. (2011) Uticaj tipa starter kulture na fizičko-hemijska i senzorna svojstva belog sira, *Journal of Engineering & Processing Management*, Vol 3, 1, 101-115.
- Bosch, A., Golowcycz, M.A., Abraham, A.G., Garrote, G.L., De Antoni, G.L. and Yantorno, O. (2006) Rapid discrimination of lactobacilli isolated from kefir grains by FT-IR spectroscopy, *International Journal of Food Microbiology*, 11: 280-287.

- Boutrou, R. and Guéguen, T, M. (2005) Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology, *International Journal of Food Microbiology*, 102, 1-20.
- Bove, C.G., De Dea Lindner, J., Lazzi, C., Gatti, M., Neviani, E. (2011) Evaluation of genetic polymorphism among *Lactobacillus rhamnosus* non-starter Parmigiano Reggiano cheese strains, *International Journal of Food Microbiology*, 144, 569-572.
- Bulajić, S., Mijačević, Z., (2003) The technological acceptability of enterococci isolated from cheeses. In: FEMS Congress of European Microbiologists, Abstract Book, Elsevier, 106.
- Caldwell, S. L., McMahan, D. J., Oberg, C. J. and Broadbent, J. R. (1996) Development and Characterization of Lactose-Positive *Pediococcus* Species for Milk Fermentation, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 62, No. 3, 936-941.
- Califano, A.N., Bevilacqua, A.E. (1999): Freezing low-moisture Mozzarella cheese: changes in organic acid content, *Food Chemistry* 64 (2), 193-198.
- Carbonell, M., Nunez, M., Fernandez-Garcia, E. (2002) Evolution of the volatile components of ewe raw milk La Serena cheese during ripening. Correlation with flavour characteristics, *Le Lait*, 82, 683-698.
- Careri, M., Spagroli, S., Panori, G., Zannoni, M., Barbieri, G. (1996): Chemical parameters of the non-volatile fraction of ripened Parmigiano-Reggiano Cheese, *International Dairy Journal* 6 (2), 147-155.
- Chamba, J.F. and Irlinger, F., (2004) Secondary and adjunct cultures. In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (Eds.), *Cheese, Chemistry, Physics and Microbiology, General Aspects*, vol. 1. Elsevier Academic Press, London, pp. 191-206.
- Champomier-Verge's , M.-C., Maguin , E., Mistou, M.-Y., Anglade, P., Chich, J.-F. (2002) Lactic acid bacteria and proteomics: current knowledge and perspectives, *Journal of Chromatography B*, 771, 329-342.
- Chiang, J.Y. L. (2009) Bile acids: regulation of synthesis, *Journal of Lipid Research*, Vol.50, 1955-1966.
- Chin, H.W., Bernhard, R.A. and Rosenberg, M. (1996) Solid Phase Microextraction for Cheese Volatile Compound Analysis, *Journal of Food Science* 61(6) 1118-1123.
- Christiansen, P., Petersen, M. H., Kask, S., Møller, P. L., Petersen, M., Nielsen, E.W., Vogensen, F. K. and Ardö, Y. (2005) Anticlostridial activity of *Lactobacillus* isolated from semi-hard cheeses, *International Dairy Journal*, 15, 901-909.

- Coakley, M., Ross, R. P., Nordgreen, M., Fitzgerald, G., Devery, R., & Stanton, C. (2003) Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species, *Journal Applied Microbiology*, 94, 138-145.
- Coccagn-Bousquet, M., Garrigues, C., Loubiere, P., Lindley, D. N. (1996) Physiology of piruvate metabolism in *Lactococcus lactis*, *Antonie van Leeuwenhoek* 70, 253-267.
- Cocconcelli, P.S. (1996a) Fontina cheese, in, *Artisan European Cheeses*, Cogan, T.M. and Rea, M.C., eds., European Commission, Brussels, 41-44.
- Cocconcelli, P.S. (1996b) Toma cheese, in, *Artisan European Cheeses*, Cogan, T.M. and Rea, M.C., eds., European Commission, Brussels, 45-48.
- Cogan, T. M. (2000) Cheese microbiology. In P. F. Fox, T. Guinee, T. M. Cogan, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg: Aspen Publishers.
- Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P.S., Fernandez, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rca, M.C., & Rodriguez, E. (1997) Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products, *Journal of Dairy Research*, 64, 409-421.
- Collins, M.D., Willams. A.M. and Walbanks, S. (1990) The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov, *FEMS Microbiology Letters*, 70, 255-262.
- Collins, Y. F., McSweeney, P. L. H., & Wilkinson, M. G. (2003) Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: A review of current knowledge, *International Dairy Journal*, 13, 841-866.
- Coppola, R., Nanni M., Iorizzo M., Sorrentino A., Sorrentino E., Grazia L. (1997) Survey of lactic acid bacteria during the advanced stages of the ripening of Parmigiano Reggiano cheese, *Journal of Dairy Research*, 64, 305-310.
- Coppola, R., Succi, M., Sorrentino, E., Iorizzo, M., Grazia, L. (2003) Survey of lactic acid bacteria during the ripening of Caciocavallo cheese produced in Molise, *Lait*, 83, 211-222.
- Coppola, R., Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Salzano, G., Sorrentino, E. (2005) Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese, *Lait* 85, 193-204.

- Corbo M.R., Albenzio M., De Angelis M., Sevi A., Gobbetti M., (2001) Microbiological and biochemical properties of Canestrato Pugliese hard cheese supplemented with bifidobacteria, *Journal of Dairy Science*. 84, 551-561.
- Cosentino, S., Fadda, M. E., Deplano, M., Melis, R., Pomata, R., Pisano, M. B. (2012) Anti-listerial activity of nisin-like bacteriocin producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from traditional Sardinian dairy products, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 10, 11-55.
- Crow, V., Curry, B., Christison, M., Hellier, K., Holland, R., Liu, S.Q. (2002) Raw milk flora and NSLAB as adjuncts, *Australian Journal of Dairy Technology*, 57, 99-105.
- Cruz, A. G., Faria, J. A. F., Pollonio, M. A. R., Bolini, H. M. A., Celeghini, R. M. S., Granato, D., Shah, N. P. (2011) Cheeses with reduced sodium content: Effects on functionality, public health benefits and sensory properties, Review Article, *Trends in Food Science & Technology*, 22, 276-291.
- Cuesta, P., Fernandez-Garcia, E., Llano, D.G.D., Montilla, A., Rodriguez, A. (1996) Evolution of the microbiological and biochemical characteristic of Afuega's Pitu cheese during ripening, *Journal of Dairy Science*, 79, 1693-1698.
- Danielsen, M., Simpson, P., O'Connor, E., Ross, R., Stanton, C. (2007) Susceptibility of *Pediococcus* spp. to antimicrobial agents, *Journal of Applied Microbiology*, 102:384-389.
- Даниловић, Бојана (2012) Промена популације бактерија млечне киселине у току зрења Петровачке кобасице (Petrovska klobasa), докторска дисертација, Технолошки факултет у Лесковцу, Универзитет у Нишу.
- De Bruyne, K., Schillinger, U., Caroline, L., Boehringer, B., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., De Vuyst, L., Franz, C. M. A. P. and Vandamme, P. (2007) *Leuconostoc holzapfelii* sp. nov., isolated from Ethiopian coffee fermentation and assessment of sequence analysis of housekeeping genes for delineation of *Leuconostoc* species, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2952-2959.
- De Candia, S., De Angelis, M., Dunlea, E., Minervini, F., McSweeney, P.L.H., Faccia, M., Gobbetti, M. (2007) Molecular identification and typing of natural whey starter cultures and microbiological and compositional properties of related traditional Mozzarella cheeses, *International Journal of Food Microbiology*, 119, 182-191.

- De Dea Lindner, J., Bernini, V., De Lorentiis, A., Pecorari, A., Neviani, E., Gatti, M. (2008) Parmigiano Reggiano cheese: evolution of cultivable and total lactic microflora and peptidase activities during manufacture and ripening, *Dairy Science & Technology*, 88: 511-523.
- De Liano, D.G., Rodriguez, A., Cuesta, P. (1996): Effect of lactic starter cultures on the organic acid composition of milk and cheese during ripening analysis by HPLC, *Journal of Applied Bacteriology* 80 (5), 570-576.
- De Vuyst, L. and Tsakalidou, E. (2008) *Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations, *International Dairy Journal*, Vol. 18, 5, 476-485.
- De Vuyst, L., Zamfir, M., Mozzi, F., Adriany, T., Marshall, V., Degeest, B., Vaningelgem, F. (2003) Exopolysaccharide – producing *Streptococcus thermophilus* strains as functional starter cultures in the production of fermented milks, *International Dairy Journal*, 13, 707-717.
- Deeth, H. C., & Fitz-Gerald, C. H. (1995) Lipolytic enzymes and hydrolytic rancidity in milk and milk products. In P. F. Fox (Ed.), *Advanced dairy chemistry-2-Lipids* (pp. 247-308). London: Chapman & Hall.
- Delavenne, E., Ismail, R., Pawtowski, A., Mounier, J., Barbier, G., Le Blay, G. (2013) Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures, *Food Control*, 30, 206-213.
- Delgado, F.J., González-Crespo, J., Cava, R., García-Parra, J., Ramírez, R. (2010) Characterisation by SPME–GC–MS of the volatile profile of a Spanish soft cheese P.D.O. Torta del Casar during ripening, *Food Chemistry* 118, 182-189.
- DeLiano, D. G., Rodriguez, A. and Cuesta, P. (1996) Effect of lactic starter cultures on the organic acid composition of milk and cheese during ripening-analysis by HPLC, *Journal of Applied Bacteriology*, 80 (5), 570-576.
- Devriese, L.A. and Pot, B. (1995) The genus *Enterococcus*., In: B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel (editors), *The Lactic Acid Bacteria, The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Vol. 2., Blackie Academic, London, pp. 327-367.
- Dewan S. and Tamang, J.P. (2007) Dominant lactic acid bacteria and their technological properties isolated from the Himalayan ethnic fermented milk products, *Antonie van Leeuwenhoek* 92, 343-352.



- Dherbécourt, J., Bourlieu, C., Maillard, M. B., Aubert-Frogerais, L., Richoux, R., & Thierry, A. (2010) Time course and specificity of lipolysis in Swiss cheese, *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 58, 11732-11739.
- Di Cagno, R., Banks, J., Sheehan, L., Fox, P. F., Brechany, E.Y., Corsetti, A., Gobbetti, M. (2003) Comparison of the microbiological, compositional, biochemical, volatile profile and sensory characteristics of three Italian PDO ewes' milk cheeses, *International Dairy Journal* 13, 961-972.
- Димитријевић-Бранковић, С., Барас, Ј., Турубатовић, Л. (2003) Испитивање пробиотичких својстава потенцијаних биопротективних култура из родова *Lactobacillus* sp. и *Bifidobacterium* sp. намењених производима од меса, *Технологија меса* 44, 1-2, 17-31.
- Duan, Y., Zhongfang, T., Yanping, W., Zongwei, L., Zongyi, L.,Guangyong, Q., Yuping, H., and Yimin, C. (2008). Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from Tibetan Qula cheese, *Journal of General and Applied Microbiology*, 44, 311-316.
- Dumont, J.P., Adda, J. (1979) Flavour formation in dairy products. In: Land, D.G., Nursten, H.E. (Eds.), *Progress in Flavour Research*. Aspen Publishers, New York, pp. 245-262.
- Dunne, C.O. and Mahony, L. (2001) In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation in vivo findings, *American Journal of Clinical Nutrition*, 73: 386-392.
- Dušinský, R., Belicová, A., Ebringer, L., Jurkovič, D., Križková, L., Mikulášová, M. and Krajčovič, J. (2008) Genetic Diversity of Enterococci in Bryndza Cheese, *Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on Detection of Bacteria, Viruses, Parasites and Fungi*, Magni, M.V. (ed.), Perugia, Italy, November 18-21, p. 87-124.
- Dziuba, B., Babuchowski, A., Nalecz, D. and Niklewicz, M. (2007) Identification of lactic acid bacteria using FTIR spectroscopy and cluster analysis, *International Dairy Journal* 17: 183-189.
- Dziuba, B., Nalepa, B. (2012) Identification of lactic acid bacteria and propionic acid bacteria using FTIR spectroscopy and artificial neural networks, *Food Technology and Biotechnology*, 50:399–405.
- El-Ghaish, S., Dalgalarondo, M., Choiset, Y., Sitohy, M., Ivanova, I., Haertlé, T., Chobert, J.M. (2010) Characterization of a new isolate of *Lactobacillus fermentum* IFO

3956 from Egyptian Ras cheese with proteolytic activity, *Euopian Food Research and Technology*, 230, 4, 635-643.

- Ercolini, D., Frisso, G., Mauriello, G., Salvatore, F., Coppola, S. (2008) Microbial diversity in natural whey cultures used for the production of Caciocavallo Silano PDO cheese, *International Journal of Food Microbiology*, 124(2):164-170.
- Farkye, N.Y. and Fox, P.F. (1990) Objective indices of cheese ripening, *Trends in Food Science Technology*, 1 (2): 37-40.
- Favaro, L., Basaglia, M., Casella, S., Hue, I., Dousset, X., Gombossy de Melo Franco, B. D., Todorov, S. D. (2014) Bacteriocinogenic potential and safety evaluation of non-starter *Enterococcus faecium* strains isolated from home made white brine cheese, *Food Microbiology* 38, 228-239.
- Fernández-García, E., Gaya, P., Medina, M., Nunez, M. (2004) Evolution of the volatile components of raw ewes' milk Castellano cheese: seasonal variation, *International Dairy Journal*, 14 (1) 39-46.
- Fitzsimons, N.A., Cogan, T.M., Condon, S. and Beresford, T. (1999) Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature Cheddar cheese, *Applied Environmental Microbiology*, 65, 3418-3426.
- Fleet G.H. (1999) Microorganisms in food ecosystems, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 50, 1-2, 101-117.
- Fleet, G.H. (1990) Yeasts in dairy products - a review, *Journal of Applied Bacteriology* 68:199-211.
- Florez, A. B., Lopez-Diaz, T. M., Alvarez-Martin, P., and B. Mayo (2006) Microbial characterization of the traditional Spanish blue-veined Cabrales cheese: identification of dominant lactic acid bacteria, *European Food Research Technology*, 223, 503-508.
- Fontecha, J., Peláez, C., Juárez, M., Requena, T., Gómez, C., Ramos, M. (1990) Biochemical and Microbiological Characteristics of Artisanal Hard Goat's Cheese, *Journal of Dairy Science*, 73, 5, 1150-1157.
- Foulquie Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2006) The role and application of enterococci in food and health, *International Journal of Food Microbiology* 106, 1-24.
- Fox P F, Law J, McSweeney P L H and Wallace J (1993) Biochemistry of cheese ripening. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 1: *General Aspects*, 2nd ed, pp 389-438. Fox P F, ed. London: Chapman & Hall.

- Fox, P. F. and Wallace, J. M. (1997) Formation of flavour compounds in cheese, *Advances in Applied Microbiology*, 45, 17-85.
- Fox, P. F., & McSweeney, P. L. H. (1996) Proteolysis during ripening, *Food Reviews International*, 12, 457-509.
- Fox, P. F., Lucey, J. A. and Cogan, T. M. (1990) Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 29, 237-253.
- Fox, P. F., O' Connor, T. P., McSweeney, P. L. H., Guinee, T. P., & O'Brien, N. M. (1996). Cheese; physical, biochemical and nutritional aspects, *Advances in Food and Nutrition Research*, 39, 163-328.
- Fox, P.F. and Wallace, J.M. (1997) Formation of flavour compounds in cheese, *Advance in Applied Microbiology*, 45, 17-85.
- Fox, P.F., Law, J., McSweeney, P.L.H. and Wallace, J. (1999) Biochemistry of cheese ripening, In: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. In: Fox PF (ed.), Aspen Publishers Inc., Maryland, pp. 389-438.
- Franz, C.M.A.P., Holzappel, W.H., Stiles, M.E. (1999) Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology* 47, 1- 24.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M. E., Schleifer, K.H., Holzappel, W. H. (2003) Enterococci in foods - a conundrum for food safety, *International Journal of Food Microbiology*, 88, 105-122.
- Freitas, A. C., & Malcata, F. X. (1998) Lipolysis in Picante cheese: Influence of milk type and ripening time on the free fatty acid profile, *Lait*, 78, 251-258.
- Freitas, C., Pintado, A. E., Pintado, M. E., Malcata, F. X. (1999) Role of dominant microflora of Picante cheese on proteolysis and lipolysis, *International Dairy Journal* 9, 593-603.
- Fuller R. (1989) Probiotics in man and animals, *Journal Applied Bacteriology*, 66, 365-378.
- Gálvez, A., Abriouel, H., López, R. L., Ben Omar, N. (2007) Bacteriocin-based strategies for food biopreservation, *International Journal of Food Microbiology* 120, 51-70.
- Garcia-Armesto, M.R., Prieto, M., Alonso, C., Garcia-Lopez, M.L., Garcia-Fernández, M.C., & Otero, A.. (1993) Numerical taxonomy of psychrotrophic bacteria isolated from raw ewe's milk, *Journal Dairy Research*, 60, 371-383.

- Garvie, E.I. (1984) Separation of species of the genus *Leuconostoc* and differentiation of the leuconostocs from other lactic acid bacteria, *Methods in Microbiology*, 16, 147-178.
- Garvie, E.I. (1986) Genus *Pediococcus* Claussen 1903. In: P.H.A. Sneats, N.S., Mair, M.E., Sharpe and J.G. Holt (editors), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, MD. pp. 1075-1079.
- Garvie, E.I. (1986a) Genus *Leuconostoc* van Tiegem 1878. In: P.H.A. Sneats, N.S., Mair, M.E., Sharpe and J.G. Holt (editors), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore, MD. pp. 1071-1075.
- Georgalaki, M.D., Sarantinopoulos, P., Ferreira, E.S., De Vuyst, L., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. (2000) Biochemical properties of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from Greek Kasser cheese, *Journal of Applied Microbiology*, 88 (5): 817-825.
- Georgieva, R. N., Iliev, I. N., Chipeva, V. A., Dimitonova, S. P., Samelis, J. and Danova, S. T. (2008) Identification and in vitro characterisation of *Lactobacillus plantarum* strains from artisanal Bulgarian white brined cheeses, *Journal of Basic Microbiology*, vol. 48, 4, 234-244.
- Gevers, D., Huys, G. and Swings, J. (2001) Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species, *FEMS Microbiology Letters*, 205: 31-36.
- Giraffa G., Canniuti D., Neviani E. (1997) Enterococci isolated from dairy products: a review of risks and potential technological use, *Journal of Food Protection*, 60, 732-738.
- Giraffa, G. (1995) Enterococcal bacteriocins: their potential as anti-Listeria factors in dairy technology, *Food Microbiol* 12, 291-299.
- Giraffa, G. (2002) Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews*, 26, 163-171.
- Giraffa, G. (2003) Functionality of enterococci in dairy products, *International Journal of Food Microbiology*, 88, 215-222.
- Gobbetti M., Morea M., Baruzzi F., Corbo M.R., Matarante A., Considine T., Di Cagno R., Guinee T., Fox P.F., (2002) Microbiological, compositional, biochemical and textural characterisation of Caciocavallo Pugliese cheese during ripening, *International Dairy Journal*, 12, 511-523.
- Gobbetti, M., Lowney, S., Smacchi, E., Battistotti, B., Damiani, P., Fox, P. F. (1997) Microbiology and Biochemistry of Taleggio Cheese During Ripening, *International Dairy Journal* 7, 509-517.
- Gobbetti, M., Morea, M., Baruzzi, F., Corbo, M.R., Matarante, A., Considine, T., Di Cagno, R., Guinee, T., Fox, P.F (2002) Microbiological, compositional, biochemical

and textural characterisation of Caciocavallo Pugliese cheese during ripening, *International Dairy Journal* 12, 511-523.

- González, C. J., Encinas, J. P., García-López, M. L., & Otero, A. (2000) Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes, *Food Microbiology*, 17, 383-391.
- Goodacre, R., Timmins, E., Rooney, P., Rowland, J., Kell, D. (1996) Rapid identification of *Streptococcus* and *Enterococcus* species using diffuse reflectance-absorbance Fourier transform infrared spectroscopy and artificial neural networks, *FEMS Microbiology Letters*, 140, 233-239.
- Грегуреќ, Љ., Тонковић, К. (2008) Јогурт – потрошња и трендови, *Прех. инд.* 1-2, 7-9.
- Griinari, J. M., B. A. Corl, S. H. Lacy, P. Y. Chouinard, K. V. Nurmela, and D. E. Bauman (2000) Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by  $\Delta 9$ -desaturase, *Journal of Nutrition*, 130:2285-2291.
- Gripon, J. C. (1993). Mould-ripened cheeses. In P. F. Fox (Ed.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology* (2nd ed.), Vol. 2 (pp. 111-136). London: Chapman & Hall.
- Gripon, J. C., Monnet, V., Lamberet, G., & Desmazeaud, M. J. (1991) Microbial enzymes in cheese ripening. In P. F. Fox (Ed.), *Food enzymology* (pp. 131-168). New York: Elsevier Science Publishing Co., Inc.
- Guerzoni, M. E., Lanciotti, R., Marchetti, R. (1993) Survey of the physiological properties of the most frequent yeasts associated with commercial chilled foods, *International Journal of Food Microbiology* 17 (4):329-41.
- Ha, Y.L., Grimm, N.K., Pariza, M.W. (1987) Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid, *Carcinogenesis*, 8 (12): 1881-1887
- Hammes, W.P., Vogel, R.F. (1995) The genus *Lactobacillus*. In: Wood-Brian, J.B., Holzapfel, W.H. (Eds.), *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Blackie, London, pp. 19-54.
- Hardie, J.M. and Whiley, R.A. (1997) Classification and overview of the genera *Streptococcus* and *Enterococcus*, *Journal of Applied Microbiology*, 83: 1-11.
- Harris, L. J., Daeschel, M. A., Stiles, M. E. and Klaenhammer, T. R. (1989) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*, *Journal of Food Protection*, 52: 384-387.

- Hassan, A. N., Ipsen, R., Janzen, T., Qvist, K. B. (2003) Microstructure and rheology of yoghurt made with cultures differing only in their ability to produce exopolysaccharides, *Journal of Dairy Science*, 86, p. 1632-1638.
- Hayaloglu, A. A., Guven, M., Fox, P. F., Hannon, J. A., McSweeney, P. L. H. (2004). Proteolysis in Turkish white-brined cheese made with defined strains of *Lactococcus*, *International Dairy Journal*, 14, 599-610.
- Helm, D., Labischinski, H., Schallehn, G., Naumann, D. (1991) Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy, *Journal of General Microbiology*, 137, 69-79.
- Hill, G.B., Eschenbach, D.A., Holmes, K.K. (1984) Bacteriology of the vagina, *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* 86, S23-S39.
- Holzapfel, H.W., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J., Schillinger, U. (2001) Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition 1-4, *American Journal of Clinical Nutrition*; (supl): 365S-73S.
- Hosono, A., Lee, J., Ametani, A., Natsume, M., Hirayama, M., Adachi, T., Kaminogawa, S. (1997) Characterization of a water-soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M101-4, *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 61: 312-316.
- Hosseini Nezhad, M., Hussain, M. A. and Britz, M. L. (2014) Stress Responses in Probiotic *Lactobacillus casei*, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55 (6), 740-749.
- Huffman, L. M. and Kristoffersen, T. (1984) Role of lactose in Cheddar cheese manufacture and ripening, *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 19, 151-162.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, T., Monfort, J.M. (1993) Biochemical characterization of lactobacilli isolated from dry sausages, *International Journal of Food Microbiology* 18, 107-113.
- Hutkins, W. R. (2006) *Microbiology and Technology of Fermented Foods*, First edition, Blackwell Publishing, Ames, Iowa, 15-67.
- Иванов, С. (2006) Каракачанска овца, Природњачко друштво "Натура Балканика" Димитровград.

- Илић, С., Ивановић, М., Пуђа, П., Обрадовић, Д. (1996) Селекција сојева за производњу качкаваља, Зборник радова са саветовања: Савремени правци развоја у технологији млека, Технолошки факултет, Нови Сад.
- Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B. (1995) Bacteriocins of grampositive bacteria, *Microbiology Review*, 59, 171-200.
- Järvenpää, S., Tahvonen, R.L., Ouwehand, A.C., Sandell, M., Järvenpää, E., Salminen, S. (2007) A probiotic, *Lactobacillus fermentum* ME-3, has antioxidative capacity in soft cheese spreads with different fats, *Journal of Dairy Science*, 90 (7): 3171-3177.
- Johnson, A. E., Nursten, H. E. and Self, R. (1969) Aromatic hydrocarbons in foodstuffs and related materials, *Chemistry & Industry*, 1, 10-12.
- Johnson, M. E. (2001) Cheese Products, in Applied dairy microbiology, Edited by Marth, E. H. and Steele, J. L. Second Edition, Marcel Dekker, New York, 346-347.
- Јоковић, Наташа (2004) Изолација и карактеризација бактерија млечне киселине из сира са планине Радан, магистарска теза, Биолошки факултет, Универзитет у Београду.
- Јоковић, Наташа (2010) Диверзитет млечно киселинских бактерија изолованих из кајмака, докторска дисертација, Биолошки факултет, Универзитет у Београду.
- Јованов, Г., Ђеровски, Ј., Пуђа, П. (2006) Протеолитичке промене у току зрења белог сира у саламури, Симпозијум "Млеко и производи од млека", Зборник радова, Тара, 21-26 мај, Пољопривредни факултет у Земуну, Универзитет у Београду, "Заједница сточарства" Београд, 74-79.
- Kaewsrichan, J, Douglas, C.W., Nissen-Meyer, J., Fimland, G., Teanpaisan, R. (2004) Characterization of a bacteriocin produced by *Prevotella nigrescens* ATCC 25261, *Letters in Applied Microbiology*, 39 (5) : 451-458.
- Kagkli, D.M., Vancanneyt, M., Hill, C., Vandamme, P. and Cogan, T. (2007) Enterococcus and lactobacillus contamination of raw milk in a farm dairy environment, *International Journal of Food Microbiology*, 114, 243-251.
- Kandler, O., and Weiss, N. (1986) Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 2. P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt (Eds.), Williams and Wilkins Co, Baltimore, 1209-1243.
- Kansiz, M., Heraud, P., Wood, B., Burden, F., Beardall, J., McNaughton, D. (1999) Fourier transform infrared microspectroscopy and chemometrics as a tool for the discrimination of cyanobacterial strains, *Phytochemistry*, 52, 407-417.

- Kempler, M.G. and McKay L.L. (1981) Biochemistry and Genetics of Citrate Utilization in *Streptococcus lactis* ssp. *diacetylactis*, *Journal of Dairy Science*, 64: 1527-1539.
- Kilpper-Bälz, R., Fischer, G. & Schleifer, K.H. (1982) Nucleic acid hybridization of group N and group D streptococci, *Current Microbiology* 7, 245-250.
- Kindstedt, P., Carić, M., Milanović, S. (2004) Pasta Filata Cheeses. Chapter 11., U: Fox, P.F. et al.: Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology, 3rd ed.: Major Cheese Groups - vol. 2, London: Elsevier Science Ltd., 251-277.
- Kitazawa, H., Toba, T., Itoh, T., Kumano, N., Adachi, S., Yamaguchi, T. (1991) Antitumoral activity of slime-forming encapsulated *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* isolated from Scandinavian ropy sour milk, 'viili', *Animal Science and Technology*, 62: 277-283.
- Klaenhammer, T.R. (1988) Bacteriocins of lactic acid bacteria, *Biochimie*, 70 (3) :337-49.
- Klaenhammer, T.R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbiology Review*, 12 (1-3): 39-85.
- Klare, I., Konstabel, C., Werner, G., Huys, G., Vankerckhoven, V., Kahlmeter, G. (2007) Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59 (5), 900-912.
- Kongo, J. M. (2013) Lactic Acid Bacteria as Starter-Cultures for Cheese Processing: Past, Present and Future Developments, in "Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes" edited by Marcelino Kongo, In Tech, Rijeka, Croatia.
- Kos, B., Šušković, J., Beganović, J., Gjurac, K., Frece, J., Iannaccone, C., Canganella, F. (2008) Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 699-707.
- Kranenburg, R., Kleerebezem, M., Vlieg, J. H., Ursing, B., Boekhorst, J., Smit, B. A., Ayad, E.H.E., Smit, G., & Siezen, R. J. (2002) Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: predictions from genome sequence analysis, *International Dairy Journal*, 12, 111-121.
- Kunji, E.R.S., Mierau, I., Hagting, A., Poolman, B. and Konings, W. N. (1996) The proteolytic system of lactic acid bacteria, *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 187-221.
- Law, J. and Haandrikman, A. (1997) Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *International Dairy Journal*, 7, 1-11.



- Ledda, A. (1996). Casu Axedu. In T. M. Cogan, & M. C. Rea (Eds.), *Artisanal European cheeses* (pp. 38–40). Brussels: European Commission, DG XII.
- Ледина, Т., Мијачевић, З., Булајић, С., Бабић, М. (2013) Пробиотски статус бактерија млечне киселине, *Ветеринарски журнал Републике Српске*, Вол. XIII, бр. 2, 176-192.
- Lee, J. T., & Lim, J. W. (1988a). Studies on the ripening of cheese made with lactic acid bacteria and yeasts. I. Changes of physico-chemical composition, *Korean Journal of Animal Science*, 30, 170-177.
- Lee, J. T., & Lim, J. W. (1988b). Studies on the ripening of cheese made with lactic acid bacteria and yeasts. II. Proteolysis of cheese, *Korean Journal of Animal Science*, 30, 258-263.
- Lefier, D., Hirst, D., Holt, C., Williams, A.G. (1997) Effect of sampling procedure and strain variation in *Listeria monocytogenes* on the discrimination of species in the genus *Listeria* by Fourier transform infrared spectroscopy and canonical variates analysis, *FEMS Microbiology Letters*, 147, 45-50.
- Lemieux L., Simard R.E. (1992) Bitter flavour in dairy products. II. A review of bitter peptides from caseins: their formation, isolation and identification, structure masking and inhibition, *Lait*, 72, 335-382.
- Linberg, A.-M., Christiansson, A., Rukke, E.-O., Eklund, T., & Molin, G. (1996) Bacterial flora of Norwegian and Swedish semihard cheese after ripening, with special reference to *Lactobacillus*, *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 50, 563-572.
- Litopolou-Tzanetaki, E., (1990) Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria during ripening of Kefalotyti cheese, *Journal of Food Science*, 73, 111-113.
- Lombardi, A., Gatti, M., Rizzotti, L., Torriani, S., Andrighetto, C., Giraffa, G. (2004) Characterization of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from artisanal Italian rawmilk cheeses, *International Dairy Journal*, 14, 967-976.
- Lues, J. F. R. and Bekker, A. C. M. (2002) Mathematical expressions for organic acids in early ripening of a Cheddar cheese, *Journal of Food Composition and Analysis*, 15 (1), 11-17.
- Lupski, J. R. and Weinstock, G. M. (1992) Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes, *Journal of Bacteriology*, 174: 4525-4529.

- Macedo, A. C. and Malcata, F. X. (1997a) Changes of lactose, lactic acid, and acetic acid content in Serra cheese during ripening, *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 204: 453-455.
- Macedo, A. C., and Malcata, F. X. (1997) Role of adventitious microflora in proteolysis and lipolysis of Serra cheese: preliminary screening, *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 205, 25-30.
- Maity, J.P., Kar, S., Lin. C.M., Chen, C.Y., Chang, Y.F., Jean, J.S., Kulp, T.R. (2013) Identification and discrimination of bacteria using Fourier transform infrared spectroscopy, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 116: 478-484.
- Манчић, Ј., Манчић, А. (2005) Технологија прераде млека, Сирарство, Млекарска школа “Др Обрен Пејић”, Пирот, треће издање, 100-106.
- Манчић, Јован (1994) Технологија прераде млека, Сирарство, Млекарска школа “Др Обрен Пејић”, Пирот, друго издање, 115-122.
- Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L.P., Ngo-Thi, N.A., van Vreeswijk, T., Stämmeler, M., Endtz, H.P., Bruining, H.A., Naumann, D., Puppels, G.J. (2003) Prospective study of the performance of vibrational spectroscopies for rapid identification of bacterial and fungal pathogens recovered from blood cultures, *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (1) 324-329.
- Maragkoudakis, P., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. and Tsakalidou, E. (2006) Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products, *International Dairy Journal*, 16: 189-199.
- Mariey, L., Signolle, J.P., Amiel, C., Travert, J., (2001) Discrimination, classification, identification of microorganisms using FTIR spectroscopy and chemometrics, *Vibrational spectroscopy*, 26, 151-159.
- Marilley, L., Casey, M.G. (2004) Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains, *International Journal of Food Microbiology* 90 139-159.
- Marino, M., Maifreni, M., Rondinini, G. (2003) Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria, *FEMS Microbiology Letters*, 229, 133-140.
- Marshall, M. V. (1987) Lactic acid bacteria: starters for flavour, *FEMS Microbiology Review*, 46, 327-336.

- Martinez-Cuesta, M.C., Fernandez de Palencia, P., Requena, T. and Pelaez, C. (2001) Enzymatic ability of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* IFPL731 for flavour development in cheese, *International Dairy Journal*, 11 (8): 577-585.
- Mathara, J.M., Schillinger, U., Guigas, C., Franz, C., Kutima, P.M., Mbugua, S.K., Shin, H.K. and Holzappel, W.H. (2008) Functional characteristics of *Lactobacillus* spp. from traditional Maasai fermented milk products in Kenya, *International Journal of Food Microbiology*, 126: 57-64.
- McSweeney, P. L. H. (2004) Biochemistry of cheese ripening, *International Journal of Dairy Technology*, Vol 57, No 2/3, 127-144.
- McSweeney, P. L. H. and Fox, P. F. (2004) Metabolism of residual lactose and of lactate and citrate. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 1: *General Aspects*, 3<sup>rd</sup> edn, pp 361–372. Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M. and Guinee, T. P., eds. London: Elsevier.
- McSweeney, P. L. H., Sousa, M. J. (2000) Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening, *Le Lait*, 80, 293-234.
- McSweeney, P.L.H., Hayaloglu, A.A., O'Mahony, J.A., Bansal, N. (2006) Perspectives on cheese ripening, *Australian Journal of Dairy Technology* 61:69-77.
- Medina de Figueroal, R., OliverI, G., Benito de Cardenas, I. L. (2001) Influence of temperature on flavour compound production from citrate by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, *Microbiology Research*, 155, 257-262.
- Merk, K., Borelli, C., Korting, H.C. (2005) Lactobacilli - bacteria - hostinteractions with special regard to the urogenital tract, *International Journal of Medical Microbiology*, 295, 9-18.
- Mijačević, Z. and Bulajić, S. (2004) Traditional manufacturing of hard cheese – kachaval on Stara Planina mountain, *Acta agriculturae slovenica*, 84, 1, 11-15.
- Мијачевић, З., Булајић, С., Божић, Т., Никетић, Г. (2005а) Пиротски качкавал, *Мљекарство* 55 (3) 203-213.
- Mijačević, Z., Petrović, M.P., Bulajić, S. (2005b) The specific characteristics of Pirot kashaval, *Biotechnology in animal husbandry*, 21 (5-6), 375-379.
- Мијачевић З., Булајић С. (2007) Природна микрофлора традиционалних сирева, *Прехрамбена индустрија - млеко и млечни производи*, 18, 1-2, 43-46.
- Miličević, B., Danilović, B., Kocić, M., Džinić, N., Milosavljević, N., Savić, D. (2014) The production and antimicrobial activity of bacteriocin produced by *Lactobacillus*

- paracasei* In: Industrial, medical and environmental applications of microorganisms: current status and trends, Ed: A. Méndez-Vilas, Wageningen Academic Publishers, p. 385-390.
- Mills, S., Serrano, L. M., Griffin, C., O'Connor, P.M., Schaad, G., Bruining, C., Hill, C., Ross, R. P., Meijer, W. C. (2011) Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* LMG P-26358 against *Listeria innocua* when used as an adjunct starter in the manufacture of cheese, *Microbial Cell Factories*, 10 (Suppl 1):S7.
  - Милосављевић, Н., Савић, Д., Даниловић, Б., Јоковић, Н. (2013) Биодиверзитет бактерија млечне киселине пиротског качкаваља од крављег млека, IX Конгрес микробиолога Србије “Микромед 2013” 30. Мај-01. Јун. Хотел М, Београд. Апстракт на CD.
  - Minervini, F., Bilancia, M. T., Sonya Siragusa, S., Gobbetti, M., & Caponio, F. (2009) Fermented goats' milk produced with selected multiple starters as a potentially functional food, *Food Microbiology*, 26 (6), 559-564.
  - Mlalazi, M., Winslow, A. R., Jean-Gilles Beaubrun, J., Eribo, B. E. (2011) Occurrence of Pediocin PA-1/AcH-Like Bacteriocin in Native Non-starter *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* from retail Cheddar cheese, *Internet Journal of Food Safety*, Vol.13, 325-331.
  - Moio, L. and Addeo, F. (1998). Grana Padano cheese aroma. *Journal of Dairy Research*, 65, 317-333.
  - Molimard, P. and Spinnler, H. E. (1996) Review: Compounds involved in the flavour of surface mould-ripened cheeses: Origins and properties. *Journal of Dairy Science*, 79, 169-184.
  - Monalaki, P., Katsiari, M.C., Alichanidis, E. (2006): Effect of commercial adjunct culture on organic acid contents of low-fat Feta type cheese. *Food Chemistry* 98, 658-663.
  - Mondello, L., Costa, R., Tranchida, P. Q., Chiofalo, B., Zumbo, A., Dugo, P. and Dugo, G. (2005) Determination of flavor components in Sicilian goat cheese by automated HS-SPME-GC, *Flavour Fragrance Journal*, 20, 659-665.
  - Montel, M.C., Talon, R., Fournaud, J., Champommier, M.C., (1991) A simplified key for identifying homofermentative *Lactobacillus* and *Carnobacterium* spp. from meat, *Journal of Applied Bacteriology*, 70, 469-472

- Morandi, S., Brasca, M., P., Alfieri, R., Lodi, A., Tamburini (2005) Influence of pH and temperature on the growth of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*, *Lait*, 181-192.
- Morea, M., Baruzzi, F., Coconcelli, P.S. (1999) Molecular and physiological characterization of dominant bacterial populations in traditional Mozzarella cheese processing, *Journal of Applied Microbiology* 87, 574-582.
- Morea, M., Matarantea, A., Di Cagno, R., Baruzzi, F., & Minervini, F. (2007) Contribution of autochthonous non-starter lactobacilli to proteolysis in Caciocavallo Pugliese cheese, *International Dairy Journal*, 17, 525-534.
- Mota-Meira, M., Morency, H., Lavoie, M.C. (2005) In vivo activity of mutacin B-Ny266. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56: 869-871.
- Mouwen, D.J.M, Capita, R., Alonso-Calleja, C., Prieto-Gomez, J., Prieto, M. (2006) Artificial neural network based identification of *Campylobacter* species by Fourier transform infrared spectroscopy, *Journal of Microbiology Methods* 67, 131-140.
- Mouwen, D.J.M., Hörman, A., Korkeala, H., Alvarez-Ordóñez, A., Prieto, M. (2011) Applying Fourier-transform infrared spectroscopy and chemometrics to the characterization and identification of lactic acid bacteria, *Vibrational spectroscopy*, 56, 193-201.
- Mouwen, D.J.M., Weijtens, M.J.B.M., Capita, R., Alonso-Calleja, C., Prieto, M. (2005) Discrimination of enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR types of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* by Fourier transform infrared spectroscopy, *Applied Environmental Microbiology*, 71, 4318-4324.
- Mustafa, S. (2006) Microbiological characterization of Civil cheese, a traditional Turkish cheese: Microbiological quality, isolation and identification of its indigenous lactobacilli, *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 22, 613-618.
- Nadal, I., Rico, J., Pérez-Martínez, G., Yebra, M.J., Monedero, V. (2009) Diacetyl and acetoin production from whey permeate using engineered *Lactobacillus casei*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36 (9):1233-1237.
- Nakajima, H., Hirota, T., Toba, T., Itoh, T., Adachi, S. (1992) Structure of the extracellular polysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495, *Carbohydrate Research*, 224: 245-253.
- Naumann, D., Fijala, V., Labischinski, H. (1988) The differentiation and identification of pathogenic bacteria using FT-IR and multivariate statistical analysis, *Microchimica Acta* 1, 373-377.

- Naumann, D., Helm, D., Labischinski, H., Giesbrecht, P. (1991) The characterization of microorganisms by Fourier-transform infrared spectroscopy. In: Nelson, W.H. (Ed.), *Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis*. VCH, New York, pp. 43-96.
- Nguyen, T.D.T., Kang, J.H. and Lee, M.S. (2007) Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects, *International Journal of Food Microbiology*, 113, 358-361.
- Nikolić, M., Terzić-Vidojević, A., Jovčić, B., Begović, J., Golić, N. and Topisirović, Lj. (2008) Characterization of lactic acid bacteria isolated from Bukuljac, a homemade goat's milk cheese, *International Journal of Food Microbiology*, 122: 162-170.
- Niro, S., Fratianni, A., Tremonte, P., Sorrentino, E., Tipaldi, L., Panfili, G., and Coppola, R. (2014) Innovative Caciocavallo cheeses made from a mixture of cow milk with ewe or goat milk, *Journal of Dairy Science* 97, 3, 1296-1304.
- Nübel, U., Engelen, B., Fleske, A., Snadir, J., Wieshuber, A., Amann, R., Ludwig, W. and Backhaus, H. (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis, *Journal of Bacteriology*, 178, 5636-5643.
- Обрадовић, Д., Радин, Д. (2006) Микрофлора аутохтоних белих сирева, У Мон. Аутохтони бели сиреви у саламури, Пољопривредни факултет-Земун, Универзитет у Београду, 87-98.
- Ogier, J.C. and Serror, P. (2008) Safety assessment of dairy microorganisms: The *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology*, 126: 291-301.
- Orla-Jensen, S., 1919. In: Orla-Jensen, S. (Ed.), *The Lactic Acid Bacteria*. Høst, Copenhagen, pp. 1-196.
- Ortigosa, M., Arizcun, C., Torre, P., Izco, J.M. (2005) Use of wild *Lactobacillus* strains in an adjunct culture for a Roncal-type cheese, *Journal of Dairy Research*, 72, 168-178.
- Остојић, М. (2005) Изолација бактерија млечне киселине у циљу производње ферментисаних млечних напитака, Зборник научних радова са XIX саветовања агронома, ветеринара и технолога-Београд, Вол. 11 бр. 3-4, 15-24.
- Остојић, М. (2006) Златарски сир. Монографија, Институт за економику пољопривреде, Београд
- Остојић, М. (2010) Голијски сир. Монографија, Институт за економику пољопривреде, Београд

- Остојић, М., Лазаревић, В., Релић, Р. (2011) Аутохтони пиротски качкаваљ, Зборник научних радова Института ПКБ Агроекономик, 17, бр. 3-4, 79-84.
- Остојић, М., Лазаревић, В., Тописировић, Љ., Релић, Р. (2012) Главни елаборат о заштити ознаке имена порекла Пиротског качкаваља од крављег млека, Фонд за развој пољопривреде, Пирот.
- Остојић, М., Тописировић, Љ. (2006) Географска ознака порекла аутохтоних сирева. *Економика пољопривреде*, Vol. LIII, 3, 591-604.
- Oust, A., Moretro, T., Kirschner, C., Narvhus, J.A., Kohler, A. (2004) FT-IR spectroscopy for identification of closely related lactobacilli, *Journal of Microbiological Methods* 59, 149-162.
- Pakdeeto, A., Naranong, N., Tanasupawat, S. (2003) Diacetyl of lactic acid bacteria from and fermented foods in Thailand, *Journal of General and Applied Microbiology*, 49, 301-307.
- Papagianni, M. and Anastasiadou, S. (2009) Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications, *Microbial Cell Factories*, 8:3, 1-16.
- Parente, E. and Cogan, T. M. (2004) Starter cultures: general aspects. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol 1: *General Aspects*, 3rd edn, pp 123-148. Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., Cogan, T. M. and Guinee, T. P., eds. London: Elsevier.
- Pariza, M. W. and Hargraves, W. A. (1985) A beef derived mutagenesis modulator inhibits initiation on mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenz(a)anthracene, *Carcinogenesis*, 6, 591-594.
- Park, W. Y. and Haenlein G. F. W. (2006) *Handbook of Milk of Non-Bovine Mammals*, Blackwell Publishing, pp. 98-99.
- Park, Y.S., Behre, R.A., McGuire, M.A., Shultz, T.D., McGuire, M.K. (1997) Dietary conjugated linoleic acid (CLA) and CLA in human milk, *FASEB Journal*, 11:A239.
- Patel, S., Majumder, A., Goyal, A. (2012) Potentials of Exopolysaccharides from Lactic Acid Bacteria, *Indian Journal of Microbiology*, 52 (1): 3-12.
- Пејић, О. (1956) Млекарство II део, Научна књига, Београд
- Pérès, C., Viallon, C. and Berdagué, J.-L. (2001) Solid-phase microextraction-mass spectrometry: A new approach to the rapid characterization of cheeses, *Analytical Chemistry*, 73 (5) 1030 -1036.

- Перко, Б., Хабјан-Пенца, В., Годич, К. (1990) Органске киселине као могући параметри квалитете пармезана, *Мљекарство* 40 (5) 115-122.
- Pinho, O. Ferreira, I.M:P:L:V:O, and Ferreira, M. A. (2003) Quantification of short chain free fatty acids in “Terincho” ewe cheese: intravarietal comparison, *Journal of Dairy Science*, 86, 3102-3109.
- Петровић, М. (1997) Дојкинци, Библиотека “Хроника села”, Београд.
- Piraino, P., Zotta, T., Ricciardi, A., Parente, E. (2005) Discrimination of commercial Casiocavallo cheeses on the basis of the diversity of lactic microflora and primary proteolysis, *International Dairy Journal* 15, 1138-1149.
- Pot, B., Ludwig, W., Kersters, K. and Schleifer, K.H. (1994) Taxonomy of lactic acid bacteria. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Microbiology, genetics and applications, Edited by L. De Vuyst and E. J. Vandamma, London UK, p: 13-90.
- Poznanski, E., Cavazza, A., Cappa, F., Cocconcelli, P.S. (2004) Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park, *International Journal of Food Microbiology*, 92 (2), 141-151.
- Пуђа, П., Никетић, Г. (1998) Значај припреме млека за индустријску производњу сирева пареног теста. У Мон. Сиреви пареног теста, Ур. Никетић, Г., Пуђа, П., Милановић, С., Спасеновић, Н., 7. југословенски млекарски симпозијум, Златибор, 01-05. април, 12-30.
- Пуђа, П. (2009) Технологија млека 1 Сирарство - општи део, Универзитет у Београду, Пољопривредни факултет.
- Prodromou, K., Thasitou, P., Haritonidou, E., Tzanetakis, N., and E. Litopoulou-Tzanetaki (2001) Microbiology of “Orynotyri”, a ewe’s milk cheese from the Greek mountains, *Food Microbiology*, 18, 319-328.
- Radulović, Z., Mirković, N., Petrušić, M., Barać, M., Paunović, D., Obradović, D. (2011) Lactic acid bacteria isolated from artisanal sheep Kashkaval cheese, IDF International Symposium on Sheep, Goat and other non-Cow Milk, Athens, Greece, 16.-18. May, Abstract book on CD.
- Радуловић З., Петровић Т., Пауновић Д., Мирковић Н., Обрадовић Д. (2008) Карактеризација аутохтоног соја *Lactobacillus paracasei* 08 на потенцијалне пробиотске способности, *Прехрамбена индустрија-млеко и млечни производи*, 1-2, 23-27.



- Randazzo, C.L., Vaughan, E.E. and Caggia, C. (2006) Artisan and experimental Pecorino Siciliano cheese: microbial dynamics during manufacture by culturing and PCR-DGGE analyses, *International Journal of Food Microbiology* 109, 1-8.
- Randazzo, C.L., Pitino, I., De Luca, S., Scifò, G.O., Caggia, C. (2008) Effect of wild strains used as starter cultures and adjunct cultures on the volatile compounds of the Pecorino Siciliano cheese, *International Journal of Food Microbiology*, 122, 269-278.
- Randazzo, C.L., Torriani, S., Akkermans, A.D.L., de Vos, W.M. and Vaughan, E.E. (2002) Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis, *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1882-1892.
- Ribeiro, M. Carolina de Oliveira, Vandenberghe, L. Porto de Souza, Spier, M. R., Paludo, K. S., Soccol, C. R., & Soccol, V. T.. (2014) Evaluation of probiotic properties of *Pediococcus acidilactici* B14 in association with *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 for application in a soy based aerated symbiotic dessert, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57 (5), 755-765.
- Ripamonti, B., Rebucci, R., Stella, S., Baldi, A., Savoini, G., Bersani, C., Bertasi, B., Panteghini, C., Cantoni, C. (2007) Screening and selection of lactic acid bacteria from calves for designing a species-specific probiotic supplement, *Italian Journal of Animal Science*, Vol. 6 (SUPPL. 1), 350-352.
- Rodriguez, D., Rocha-Santos, T. A. P., Gomes, A. M. P., Goodfellow, B. J., Freitas, A. C. (2012) Lipolysis in probiotic and synbiotic cheese: The influence of probiotic bacteria, prebiotic compounds and ripening time on free fatty acid profiles, *Food Chemistry*, 131, 4, 1414-1421.
- Rodriguez, E., Gonzales, B., Gaya, P., Nuñez, M., & Madina, M. (2000). Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk, *International Dairy Journal*, 10, 7-15.
- Rodriguez-Alcala, L. M., Braga, T., Gomes, A., Malcata, F. X., & Fontecha, J. (2011) Quantitative and qualitative determination of CLA produced by *Bifidobacterium* and LAB by combining spectrophotometric and Ag<sup>+</sup>-HPLC techniques, *Food Chemistry*, 125, 1373-1378.
- Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. and Zoon, P. (2002) An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria, *International Dairy Journal*, 12: 163-171.

- Ryadnov, M.G., Degtyareva, O.V., Kashparov, I.V., Mitin, Y.U. (2002) A new synthetic all-D-peptide with high bacterial and low mammalian cytotoxicity, *Peptides*, 2: 1869-1871.
- Rychlik, M. and Bosset, J. O. (2001) Flavour and off-flavour compounds of Swiss Gruyère cheese, Identification of key odorants by quantitative instrumental and sensory studies, *International Dairy Journal*, 11 (11-12) 903-910.
- Sahar, A., Joo Shun, T., Tengku, A., Tengku I., Ramakrishnan Nagasundara, R., Faezeh V., Shuhaimi M., Tau Chuan L., Raha Abdul R. and Arbakariya B. A. (2012) Isolation of *Pediococcus acidilactici* Kp10 with ability to secrete bacteriocin-like inhibitory substance from milk products for applications in food industry, *BMC Microbiology* 12:260, 1-12.
- Salminen, S., von Wright, A. (Eds.) (1998) Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. Marcel Dekker Inc., New York.
- Sarantinopoulos, P., Andrighetto, C., Georgalaki, M. D., Rea, M. C., Lombardi, A., Cogan, T. M., Kalantzopoulos, G. and Tsakalidou, E. (2001) Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance, *International Dairy Journal*, 11, 621-647.
- Савић, Д. (2007) Индустриска микробиологија I, Концепти и анаеробни индустриски микробиолошки процеси, Технолошки факултет-Лесковац, Универзитет у Нишу.
- Savić, D., Joković, N., Topisirović, Lj. (2008) Multivariate statistical methods for discrimination of lactobacilli based on their FTIR spectra, *Dairy Science and Technology* 88, 273-290.
- Schillinger, U., Guigas C. and Holzapfel, W.H. (2005) *In vitro* adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products, *International Dairy Journal*, 15: 1289-1297.
- Schleifer, K. H. and Ludwig, W. (1999) Phylogeny of bacteria beyond the 16S rRNA standard, *ASM News*. 65, 752-757.
- Schleifer, K.H. and Kilper-Balz, R. (1984) Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov., *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34, 31-34.

- Schleifer, K.H., Ehrmann, M., Krusch, U. and Neve, H. (1991) Revival of the species *Streptococcus thermophilus* (ex Orla-Jensen, 1919) nom. rev, *Systematic and Applied Microbiology*, 14, 386-388.
- Schleiffer, K. H. and Kilpper-Balz. R. (1987) Molecular and chemotaxonomic approaches to the classification of streptococci, enterococci, and lactococci: a review, *Systematic and Applied Microbiology*, 10, 1-29.
- Serhan, M., Cailley-Grimal, C., Borges, F., Revol-Junelles, A.-M., Hosri, C., Fanni, J. (2009) Bacterial diversity of Darfiyeh, a Libanese artisan raw goat's milk cheese, *Food Microbiology*, 26: 645-652.
- Shakeel-Ur-Rehman, S. U., Banks, J. M., Brechany, E. Y., Muir, D. D., McSweeney, P. L. H., and Fox, P. F. (2000). Influence of ripening temperature on the volatiles profile and flavour of Cheddar cheese made from raw or pasteurised milk, *International Dairy Journal*, 10, 55–65.
- Shakeel-Ur-Rehman, S. U., Waldron, D., Fox, P. F. (2004) Effect of modifying lactose concentration in cheese curd on proteolysis and in quality of Cheddar cheese, *International Dairy Journal*, 14, 591-597.
- Silvetti, T., Morandi, S. and Brasca, M. (2014) Biopreservation potential of *Enterococcus faecalis* isolated from Italian traditional raw milk cheeses, *CyTA – Journal of Food*, 12, 3, 210-217.
- Singht, S., Goswami, P., Singh, R. and Heller, K.J. (2009) Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: A review, *LWT-Food Science Technology*, 42: 448-457.
- Smit, G., van Hylekama Vlieg, J.E.T., Smit, B.A., Ayad, E.H.E., Engels, W.J.M. (2002) Fermentative formation of flavour compounds by lactic acid bacteria, *Australian Journal of Dairy Technology*, 57, 61-68.
- Sousa, M. J., Ardö, Y., McSweeney, P. L. H. (2001) Advances in the study of proteolysis during cheese ripening, *International Dairy Journal*, 11, 327-345.
- Stiles, M. E. and Holzappel, W.H. (1997) Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy, *International Journal of Food Microbiology*, 36, 1-29.
- Strahinić Ivana, Begović Jelena, Fira, Đ., Ostojić, M., Topisirović, Lj. (2005) Analysis of natural isolates of lactobacilli resistant to bacteriocin nisin, *Genetika*, Vol. 37, 1, 77-85.

- Succi, M., Tremonte, P., Reale, A., Sorrentino, E., Grazia, L., Pacifico, S., Coppola, R. (2005) Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese, *FEMS Microbiology Letters* 244 (1): 129-137.
- Sukumar, G. and Ghosh, A. R. (2010) *Pediococcus* spp.–A potential probiotic isolated from Khadi (an Indian fermented food) and identified by 16S rDNA sequence analysis, *African Journal of Food Science*, 4, 597-602.
- Шутић, Марија (1964) Односи и улога појединих група микроорганизама у току зрења качкаваља, докторска дисертација, Пољопривредни факултет - Земун, Универзитет у Београду.
- Шушковић, Ј., Бркић, Б., Матошић, С. (1997) Механизам пробиотиотског дјеловања бактерија млијечне киселине, *Мљекарство*, 47, 107-112.
- Tankovic, J., Leclercq, R., Duval, J. (1993) Antimicrobial susceptibility of *Pediococcus* spp. and genetic basis of macrolide resistance in *Pediococcus acidilactici* HM3020, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 37:789-792.
- Tannock, G. W. (2004) A special fondness for Lactobacilli, *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (6), 3186-3194.
- Temmerman, R., Huys, G. and Swings, J. (2004) Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods, *Trends in Food Science and Technology*, 15: 348-359.
- Terzić -Vidojević, A., Muhajlović, S., Uzelac, G., Golić, N., Fira, Đ. Kojić, M. and Topisirović, Lj. (2014) Identification and characterization of lactic acid bacteria from artisan white brined Golija cow' milk cheeses, *Archive of Biological Science, Belgrade*, 66 (1), 179-192.
- Terzić-Vidojević, A., Lozo, J., Topisirović, Lj.(2009) Dominant lactic acid bacteria in artisanal Pirot cheeses of different ripening period, *Genetika-Belgrade*, Vol. 41, No. 3, 341-352,
- Terzić-Vidojević, A., Vukašinović, M., Veljović, K., Ostojić, M., Topisirović, Lj. (2007) Characterisation of microflora in homemade white Zlatar cheese, *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 114, 1, 36-42.
- Teuber, M., Geis, A. and Neve, H. (1991) The genus *Lactococcus*. In: A Balows. H.G. Trüper, M. Dworkin. W. Harder and K.H. Schleifer (editors). *The Prokaryotes*, Vol. II. 2nd edition. Springer-Verlag. New York, pp. 1482-1501.

- Todorov, S. D., Prévost, H., Lebois, M., Dousset, X., Le Blanc, J. G., Franco, B. D. G. M. (2011) Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya*) from isolation to application: characterization of a bacteriocin, *Food Research International*, 44, 1351-1363.
- Topisirović, Lj., Kojić, M., Fira, D., Golić, N., Strahinić, I., Lozo, J. (2006) Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation, *International Journal of Food Microbiology*, 112, 230-235.
- Tsakalidou, E., Zoidou, E., Pot, B., Wassil, L., Ludwig, W., Devriese, L.A., Kalantzopoulos, G., Schleifer, K.-H., Kersters, K. (1998) Identification of streptococci from Greek Kasseri cheese and description of *Streptococcus macedonicus* sp. nov., *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 519-527.
- Tulumoğlu, Ş., Kaya, H. İ. Şimşek, Ö. (2014) Probiotic characteristics of *Lactobacillus fermentum* strains isolated from tulum cheese, *Anaerobe*, Vol. 30, 120-125.
- Turner, K. W., Morris, H. A. and Martley, F. G. (1983) Swiss-type cheese. II. The role of thermophilic lactobacilli in sugar fermentation, *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology* 18, 117-124.
- Turner, K.W. and Thomas, T.D. (1980) Lactose fermentation in Cheddar sheese and the effect of salt, *NZ Journal of Dairy Science and Technology*, 15, 265-276.
- Tzanetakis, N. and Litopoulou-Tzanetaki, E. (1992) Changes in numbers and kinds of lactic acid bacteria in Feta and Teleme, two Greek cheeses from ewes' milk, *Journal Dairy Science*, 75, 1389-1393.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J. (1996) Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics, *Microbiology Review*, 60, 407-438.
- Veljović, K., Terzić-Vidojević, A., Vukasinović, M., Strahinić, I., Begović, J., Lozo, J., Ostojić, M., and Topisirović, Lj. (2007) Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from Zlatar cheese, *Journal of Applied Microbiology*, 103, 2142-2152.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F.J. and Lupski, J.R. (1994) Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction, *Methods Molecular Cell Biology*, 5: 25-40.
- Весковић-Морачанин, С. (2010) Бактериоцини БМК као природни протектори хране могућности примене у индустрији меса, *Технологија меса* 51, 1, 83-94.

- Весковић-Морачанин, С., Боровић, Б., Велебит, Б. (2013) Морфолошке и биохемијске карактеристике природних изолата бактерија млечне киселине изолованих из Златарског сира, *Технологија меса*, 54 , 1, 79-84.
- Viallon, C., Verdier-Metz, I., Denoyer, C., Pradel, P., Coulon, J. B., & Berdague, J. L. (1999) Desorbed terpenes and sesquiterpenes from forages and cheeses, *Journal of Dairy Research*, 66, 319-326.
- Weinrichter, B., Luginbühl, W., Rohm, H., Jimeno, J. (2001) Differentiation of facultatively heterofermentative lactobacilli from plants, milk, and hard type cheeses by SDS-PAGE, RAPD, FTIR, energy source utilization and autolysis type, *LWT - Food Science and Technology*, 34, 8, 556-566.
- Wong, N.P., Jenness, R., Keeney, M., Marth, E.H. (1988) Fundamentals of Dairy Chemistry, (3rd ed.). Van Nostrand Reinhold, New York, p. 21.
- Wouters, J.T.M., Ayad, E.H.E., Hugenholtz, J., and Smit, G. (2002) Microbes from raw
- Zago, M., Fornasari, M.E., Carminati, D., Burns, P., Suárez, V., Vinderola, G, Reinheimer, J., Giraffa, G (2011) Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses, *Food Microbiology*, Vol. 28, 5, 1033-1040.
- Zamfir, M., Vancanneyt, M., Makras, L., Vaningelgem, F., Lefebvre, K., Pot, B., Swings, J. and De Vuyst, L. (2006) Biodiversity of lactic acid bacteria in Romanian dairy products, *Systematic and Applied Microbiology*, 29, 487-495.
- Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature*, 415:389-395.
- Zeppa, G., Fortina, M. G. Dolci, P., Acquati, A., Gandini, A., Manachini, P. L. (2004) Characterization of autochthonous lactic acid bacteria from an artisanal Italian cheese, *Acta agriculturae slovenica*, 84, 1, 3-9.
- Ziino, M., Condurso, C., Romeo, V., Giuffrida, D., Verzera, A. (2005) Characterization of “Provola dei Nebrodi”, a typical Sicilian cheese, by volatiles analysis using SPME-GC/MS, *International Dairy Journal*, 15, 585- 593.
- Zoumpopoulou, G., Foligne, B., Christodoulou, K., Grangette, C., Pot, B., Tsakalidou, E. (2008) *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and *Salmonella* infection in murine models, *International Journal of Food Microbiology* 121, 18-26.

## БИОГРАФИЈА

Мр Небојша П. Милосављевић је рођен 26. 07. 1963. године у Доброљупцима, С.О. Александровац. Основну школу завршио је у Велесу (Р. Македонија), а средњу школу у Велесу и Нишу. Дипломирао на Технолошком факултету у Лесковцу 1990. године. Магистарску тезу под називом „Добијање, хемијска и микробиолошка истраживања етарских уља и екстраката чубра (*Satureja kitaibelii* Wierzb. ex Neuff.) “ одбранио је 2002. године на Технолошком факултету у Лесковцу.

У периоду од 1991. до 2003. године радио је у Средњој пољопривредној школи "Радош Јовановић - Сеља" у Прокупљу, на радном месту професора прехранбене групе предмета, а од 2000. до 2003. године у истој школи обављао функцију помоћника директора. Од 2003. до 2006. године био је запослен у "Прехрамбено – хемијској школи" у Нишу, на радном месту професора прехранбене групе предмета. Јануара 2006. ангажован је на Високој пољопривредно – прехранбеној школи у Прокупљу, као предавач за предмете Контрола квалитета и Технологија кондиторских производа. Од октобра 2006. године запослен је у истој установи са пуним радним временом у звању предавач струковних студија. Априла 2007. године изабран је за предавача за ужу научну област Микробиологија у оквиру које обавља наставу на основним струковним (предмети Микробиологија хране и Микробиологија) и специјалистичким (Виши курс микробиологије хране и Микробиолошке методе анализе хране) струковним студијама.

Резултате досадашњих истраживања објавио је у међународним (1 рад у водећем и 2 рада у међународним часописима) и домаћим часописима. Поред тога, учествовао је са саопштењима на више међународних и националних скупова.



---

**Прилог 1.**

**ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ**

Изјављујем да је докторска дисертација, под насловом

**БАКТЕРИЈЕ МЛЕЧНЕ КИСЕЛИНЕ ПИРОТСКОГ КАЧКАВАЉА**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација, ни у целини, ни у деловима, није била предложена за добијање било које дипломе, према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио ауторска права, нити злоупотребио интелектуалну својину других лица.

У Лесковцу, 09.04.2015. године

Аутор дисертације: мр Небојша Милосављевић

Потпис докторанда:

*Небојша Милосављевић*

---





**Прилог 2.**

**ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Име и презиме аутора: мр Небојша Милосављевић

Студијски програм: \_\_\_\_\_

Наслов рада: Бактерије млечне киселине Пиротског качкаваља

Ментор: проф. др Драгиша Савић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији, коју сам предао за уношење у **Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу.**

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци, који су у вези са добијањем академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада, и то у каталогу Библиотеке, Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Нишу, као и у публикацијама Универзитета у Нишу.

У Лесковцу, 09.04.2015. године

Аутор дисертације: мр Небојша Милосављевић

Потпис докторанда:

Небојша Милосављевић



**Прилог 3.**

**ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ**

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Никола Тесла“ да, у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, унесе моју докторску дисертацију, под насловом:

**БАКТЕРИЈЕ МЛЕЧНЕ КИСЕЛИНЕ ПИРОТСКОГ КАЧКАВАЉА**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао сам у електронском формату, погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију, унету у Дигитални репозиторијум Универзитета у Нишу, могу користити сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons), за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство - некомерцијално - без прераде
4. Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
5. Ауторство - без прераде
6. Ауторство - делити под истим условима

(Молимо да подвучете само једну од шест понуђених лиценци; крагак опис лиценци је у наставку текста).

У Лесковцу, 09.04.2015. године

Аутор дисертације: мр Небојша Милосављевић

Потпис докторанда:

Небојша Милосављевић



---

## ТИПОВИ ЛИЦЕНЦИ

1. Ауторство. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне еврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци (CC BY 3.0).

2. Ауторство - некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела (CC BY-NC 3.0).

3. Ауторство - некомерцијално - без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе вашег дела у делима других аутора, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела (CC BY-NC-ND 3.0).

4. Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прераде (CC BY-NC-SA 3.0).

5. Ауторство - без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе вашег дела у делима других аутора, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела (CC BY-ND 3.0).

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора, на начин одређен од аутора или даваоца лиценце, и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода (CC BY-SA 3.0).