

**UNIVERZITET U BEOGRADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET**

Duška D. Paunović

**TARTUF (*Tuber* sp.): MIKROFLORA,
AROMATIČNA JEDINJENJA I PRIMENA U
PROIZVODNJI SIRA**

doktorska disertacija

Beograd, 2021.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF AGRICULTURE**

Duška D. Paunović

**TRUFFLE (*Tuber* sp.): MICROFLORA,
AROMATIC COMPOUNDS AND APPLICATION
IN CHEESE PRODUCTION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021

Mentor:

**Prof. dr Zorica Radulović, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet**

Članovi Komisije:

**Prof. dr Miomir Nikšić, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet**

**Prof. dr Vele Tešević, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Hemijski fakultet**

**Prof. dr Jelena Miočinović, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet**

**dr Milica Mirković, docent,
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet**

Datum odbrane:

IZJAVE ZAHVALNOSTI

Ova disertacija je rezultat višegodišnjeg timskog rada, a predstavlja krunu mog profesionalnog i ličnog razvoja. Zato želim da iskoristim priliku i da iskreno zahvalim izuzetnim ljudima koji su bili sa mnom na ovom putu, a svojim znanjem prosvjećuju umove drugih.

Najveću zahvalnost dugujem mojoj mentorki, Prof. dr Zorici Radulović, koja mi je bila posebna motivacija i bila uz mene u svim izazovnim situacijama tokom izrade ovog rada. Njena vizija i nesebična vera u mene, pomoć, saveti i trud, doprineli su da istrajem do samog kraja i da ova disertacija ugleda svetlost dana.

Posebno zahvaljujem profesoru Prof. dr Miomiru Nikšiću, koji me je uveo u svet gljiva. Takođe se zahvaljujem profesoru dr Veletu Teševiću, kao i njegovim saradnicama Jovani i Marini, koje su mi pružile podršku u tumačenju rezultata gasno-hromatografskih analiza. Od srca se zahvaljujem Prof.dr Jeleni Miočinović, na velikoj stručnoj i moralnoj podršci, kao i dr Zorani Miloradović, asistentu Ani Radulović i članovima Katedre za tehnologiju animalnih proizvoda.

Mojim dragim, docentkinji dr Milici Mirković i dr Nemanji Mirkoviću, sa Katedre za Tehnološku mikrobiologiju, malo je reći hvala jer su bili izvor energije za svaki moj rad u toku i van izrade ove disertacije.

Veliko hvala članovima Katedre za tehnološku mikrobiologiju, dragim damama koje su svojim znanjem i iskustvom pomogle u stručnom i profesionalnom smislu, svih ovih godina zajedničkog rada.

Takođe se zahvaljujem Prof. dr Veri Raičević, sa Katedre za ekološku mikrobiologiju, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na velikoj pomoći i podršci prilikom izrade ove disertacije, kao i članovima Katedre za ekološku mikrobiologiju.

Takođe veliku zahvalnost dugujem donatoru tartufa za sve moje eksperimente, od 2015. do 2020. godine, Veselinu Raduloviću.

Kolektivu fabrike komposta "Uča" Vranovo, veliko hvala na moralnoj i materijalnoj pomoći.

Hvala svim mojim rođacima i prijateljima koji su bili uz mene, sve ove godine.

Veliko hvala Slobi, Prof. dr Slobodanu Joviću, koji je moja velika podrška u svakoj situaciji.

Na kraju, zauvek i neizmerno hvala mojim dragim roditeljima, koji su me naučili radu. Mojim sestrama i njihovim porodicama hvala na безусловnoj ljubavi i podršci u životu, za sve što su učinili da danas budem ta koja jesam, a mojima: Dušanu, Stojanu, Marku, Rastku, Dejani i Niki veliko hvala što su uvek izvor moje velike radosti u životu.

Volim vas sve beskrajno!

TARTUF (*Tuber sp.*): MIKROFLORA, AROMATIČNA JEDINJENJA I PRIMENA U PROIZVODNJI SIRA

SAŽETAK

Tartufi su podzemne mikorizne gljive, veoma cenjene zbog specifične arome, koja velikim delom nastaju kao proizvodi metabolizma mikroorganizama rizosfere, kao što su bakterije, kvasci i filamentozne gljive. S obzirom da se aroma tartufa gubi tokom čuvanja, neophodno je naći tehnike očuvanja arome u dužem periodu, kako bi se tartufi mogli koristiti i van sezone njihovog pronalaženja.

Kako je tartuf prirodan proizvod sa izuzetnim nutritivnim i funkcionalnim svojstvima, krajnji cilj ovog rada je bio dobijanje novog multifunkcionalnog prirodnog i nutritivno vrednog proizvoda, u ovom slučaju polutvrdog sira sa dodatkom tartufa i potencijalnog autohtonog probiotika *Lactobacillus plantarum* 564, bez dodavanja veštačkih aroma. Jedan od ciljeva ovog rada je bio izolacija mikrobiote tartufa i njena identifikacija, kao jednog od faktora produkcije arome tartufa, pri čemu je utvrđeno prisustvo bakterija, kvasaca, aktinomiceta i gljiva. Većinu prisutnih mikroorganizama su činile bakterije, gde su najzastupljenije vrste roda *Bacillus* sp. (62,5%). Zatim je ispitano očuvanje aromatičnih materija samih tartufa, nakon liofilizacije i režima zamrzavanja tartufa na -20°C i -80°C, sa i bez primene tečnog azota u toku skladištenja od 90 dana. U cilju očuvanja arome, utvrđen je najoptimalniji tretman dekontaminacije za primenu tartufa u hrani, a na osnovu dobijenih rezultata odabrani su režimi flambiranja i autoklaviranja tartufa svežih i smrznutih na -20°C za primenu u proizvodnji četiri varijante sireva. Osim navedenih varijanti proizvedene su i dve varijante, jedna kontrolna bez dodavanja tartufa i druga sa dodatkom veštačke arome, kako bi se mogao porediti senzorni kvalitet dobijenih sireva tokom 90 dana zrenja. Tokom zrenja sireva je utvrđeno da sirevi sa flambiranim smrznutim tartufima imaju ubrzano zrenje, veći koeficijent zrelosti, broj prisutnih startera i potencijalnih probiotika veći za 1 log jedinicu u odnosu na kontrolni sir. Sastav aromatičnih materija sireva je obuhvatao 35 jedinjenja, koja su svrstana u jedinjenja sa sumporom, aldehide, ketone i alkohole. Utvrđeno je da su ketoni najzastupljeniji kod varijanti sireva sa svežim i zamrznutim flambiranim tartufima, dok sumporna jedinjenja nisu detektovana. Sadržaj 2,3-butandiona, 2-pentanona, 2-heptanona i 3-oktanona u sirevima sa flambiranim tartufima je bio najveći, a sadržaj 2-butanona u siru sa smrznutim flambiranim tartufom, je bio deset puta veći u odnosu na kontrolni sir. U ukupnom sadržaju aldehida u sirevima od 90 dana, utvrđen je najveći relativni udeo 2-metil-butanala, 3-metil-butanala, acetaldehida i 2-metil-propanala u varijantama sireva sa smrznutim flambiranim tartufima. Alkoholi važni za aromu tartufa, 2-butanol, 2-metil-butanol i 1-okten-3-ol, koji su se pojavljivali u sirevima, su najviše zastupljeni kod sireva sa flambiranim tartufima, pri čemu je 2-butanol bio zastupljeniji kod sira sa smrznutim flambiranim tartufom.

Senzornom analizom je utvrđeno da su najbolje ocenjeni kontrolni sir i sirevi sa tartufima dodatim nakon flambiranja, pre zamrzavanja ili nakon 90 dana čuvanja u smrznutom stanju na -20°C. Ovi sirevi su ocenjeni kao sirevi visokog kvaliteta sa ocenama 95,41% i 98,08% od maksimalnog kvaliteta, što ih svrstava u grupu odličnih sireva. Najniže ocene u pogledu mirisa i ukusa, imao je sir proizveden uz dodatak veštačke arome.

Ovim radom je postignut cilj pronalaženja optimalnog načina zamrzavanja tartufa i inkorporacije u sir, obogaćenog autohtonim potencijalnim probiotikom u cilju dobijanja inovativnog prirodnog prehrambenog proizvoda bez dodavanja veštačke arome.

Ključne reči: tartufi, aromatične materije, sir, autohtoni potencijalni probiotici

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Tehnološka mikrobiologija

UDK broj: 631.465:547.52]:637.358 (043.3)

TRUFFLE (*Tuber* sp.): MICROFLORA, AROMATIC COMPOUNDS AND APPLICATION IN CHEESE PRODUCTION

ABSTRACT

Truffles are underground mycorrhizal fungi, highly valued for their specific aroma, which are largely formed as products of metabolism of microorganisms of the rhizosphere such as bacteria, yeasts and filamentous fungi. Since the aroma of truffles is lost during storage, it is necessary to find techniques for preserving the aroma for a longer period of time, so that truffles can be used outside the season of finding them.

As truffle is a natural product with exceptional nutritional and functional properties, the ultimate goal of this work was to obtain a new multifunctional natural and nutritionally valuable product, in this case semi-hard cheese, with added truffles and potential autochthonous probiotic *Lactobacillus plantarum* 564, without adding artificial flavors. One of the goals of this work was the isolation and identification of the truffle microbite, as one of the factors in the production of truffle aroma, during which the presence of bacteria, yeasts, actinomycetes and fungi was determined. Isolated microorganisms mainly were bacteria, where the most common species was genus *Bacillus* sp. (62.5%). Then, the preservation of aromatic substances of the truffles was examined after lyophilization and freezing regime at -20°C and -80°C with and without the application of liquid nitrogen during 90 days of storage. In order to preserve the truffle aroma, the most optimal way of truffles decontamination for application in food production was determined, and based on the obtained results, the regimes of flambing and autoclaving of fresh and frozen truffles at -20°C were selected for application in the 4 variants cheese production.

Beside the above mentioned four variants of cheese, two more variants were produced, one control without the addition of truffles and the other with the addition of artificial flavor, in order to compare the sensory quality of the obtained cheeses during 90 days of cheese ripening.

During cheese ripening, it was determined that cheeses with flambed frozen truffles had accelerated ripening, had higher ripening coefficient, number of starter culture bacteria and potential probiotics higher by 1 log unit, compared to control cheese. The composition of the aromatic substances of the cheeses included 35 compounds, which are classified as sulfur compounds, aldehydes, ketones and alcohols. Ketone compounds were most abundant in cheese variants with fresh and frozen flambed truffles, while sulfur compounds were not detected. The content of 2,3-butanedione, 2-pentanone, 2-heptanone and 3-octanone in cheeses with flambed truffles was the highest, and the content of 2-butanone in cheese with frozen flambed truffles was ten times higher than in the control cheese. For aldehydes content in 90-day in cheeses, the highest relative share of 2-methyl-butanal, 3-methyl-butanal, acetaldehyde and 2-methyl-propanal was determined in cheese variants with frozen flambed truffles. Alcohols which are important for the aroma of truffles, like 2-butanol, 2-methyl-butanol and 1-octen-3-ol were most present in cheeses with flambed truffles, while 2-butanol had the highest concentration in cheeses with frozen flambed truffles.

Sensory evaluation determined that the best evaluated cheeses were control cheese and cheeses with truffles added after flambing either before or after 90 days of storage in the frozen state at -20°C . These cheeses were evaluated as cheeses of high quality with the marks 95.41% and 98.08% of the highest possible quality, which classifies them as excellent cheeses. The cheese with the addition of artificial aroma had the lowest marks in terms of smell and taste. This work achieved the goal of finding the optimal way to freeze truffles and incorporate them into cheese, enriched with autochthonous potential probiotics in order to obtain an innovative natural food product without adding artificial flavor.

Key words: truffles, aromatic compounds, cheese, autochthonous potential probiotics

Scientific field: Technological Engineering
Scientific field: Industrial Microbiology
UDK No. 631.465:547.52]:637.358 (043).

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	3
2.1. ZEMLJIŠNI MIKROORGANIZMI.....	3
2.2. MIKORIZA.....	3
2.2.1. Ektomikoriza.....	4
2.3. ODNOS MIKROORGANIZAMA I EKTOMIKORIZNIH GLJIVA	5
2.4. TARTUFI (<i>Tuber</i> spp.).....	6
2.4.1. Podela tartufa	7
2.4.2. Pronalaženje tartufa	9
2.5. MIKROBIOTA TARTUFA	10
2.5.1. Bakterijske zajednice u mikrobioti tartufa	11
2.5.2. Kvasci, filamentozne gljive i virusi mikrobiote tartufa	11
2.6. AROMATIČNA JEDINJENJA TARTUFA	11
2.6.1. Sumporna jedinjenja tartufa	14
2.6.2. Alkoholi, estri, aldehidi i ketoni.....	15
2.6.3. Medicinska svojstva tartufa	17
2.7. TRETMANI ZA OČUVANJE AROMA TARTUFA.....	18
2.8. PRIMENA TARTUFA U HRANI	20
2.9. PROIZVODNJA I SVOJSTVA SIREVA HOLANDSKOG TIPA	21
2.10. PROBIOTICI I PRIMENA U FUNKCIONALNOJ HRANI.....	23
2.10.1. Zdravstveni efekti probiotskih bakterija	24
2.10.2. Funkcionalna hrana sa probioticima	25
2.10.3. Primena probiotskih bakterija u proizvodima od mleka	26
3. NAUČNI CILJ ISTRAŽIVANJA	27
4. MATERIJAL I METODE	28
4.1. MIKOLOŠKA IDENTIFIKACIJA TARTUFA	28
4.2. MEDIJUMI ZA IZOLACIJU MIKROORGANIZAMA	28
4.3. IZOLACIJA BAKTERIJA, FILAMENTOZNIH GLJIVA I KVASACA	29
4.4. PRELIMINARNA KARAKTERIZACIJA DOBIJENIH BAKTERIJSKIH IZOLATA	29
4.4.1. Katalaza test	29
4.4.2. Oksidaza test	29
4.4.3. Ispitivanje rasta bakterijskih izolata na medijumu sa malom količinom azota	29
4.4.4. Ispitivanje rasta izolata aktinomiceta	30
4.5. ODREĐIVANJE BIOHEMIJSKIH OSOBINA IZOLOVANIH BAKTERIJA I KVASACA - API TEST	30
4.6. IDENTIFIKACIJA BAKTERIJA I KVASACA MOLEKULARNIM METODAMA	30

4.6.1.	Izolacija totalne DNK iz bakterijskih izolata.....	30
4.6.2.	Umnožavanje DNK fragmenata – PCR (Polymerase Chain Reaction)	31
4.6.3.	Elektroforeza.....	31
4.6.4.	Sekvenciranje.....	31
4.6.5.	Izolacija totalne DNK iz kvasaca.....	31
4.6.6.	Umnožavanje DNK fragmenata – PCR.....	32
4.6.7.	Elektroforeza sekvenciranje.....	32
4.6.8.	Sekvenciranje.....	32
4.7.	ZAMRZAVANJE TARTUFA.....	32
4.8.	TRETMANI ZA DEKONTAMINACIJU TARTUFA.....	32
4.9.	ODREĐIVANJE AROMATIČNIH JEDINJENJA U TARTUFIMA.....	33
4.9.1.	Statička headspace GC/MS analiza.....	33
4.10.	ODREĐIVANJE MIKROBIOLOŠKOG STATUSA TRETIRANIH TARTUFA.....	34
4.11.	PROIZVODNJA I ANALIZA SIREVA.....	34
4.11.1.	Proizvodnja sireva.....	34
4.11.2.	Određivanje hemijskog sastava sireva.....	35
4.11.3.	Praćenje proteolize tokom zrenja sireva.....	36
4.11.4.	Mikrobiološki status sireva.....	36
4.11.5.	Aromatične materije sireva.....	37
4.11.6.	Senzorna analiza sireva.....	37
4.12.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	37
5.	REZULTATI I DISKUSIJA.....	38
5.1.	MIKOLOŠKA IDENTIFIKACIJA TARTUFA.....	38
5.2.	IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKIH IZOLATA TARTUFA.....	38
5.3.	MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKIH IZOLATA.....	41
5.3.1.	Identifikacija izolata aktinomiceta.....	44
5.3.2.	Identifikacija izolata filamentoznih gljiva.....	44
5.3.3.	Identifikacija izolata kvasaca.....	45
5.3.4.	Genetska identifikacija kvasaca.....	46
5.4.	ZAMRZAVANJE TARTUFA.....	46
5.5.	TRETMANI ZA DEKONTAMINACIJU TARTUFA.....	53
5.5.1.	Mikrobiološki status tretiranih tartufa.....	53
5.6.	AROMATIČNA JEDINJENJA TRETIRANIH TARTUFA I VEŠTAČKE AROME	55
5.7.	MIKROBIOLOŠKI STATUS SIREVA.....	57
5.8.	HEMIJSKI SASTAV SIREVA.....	61
5.9.	PROTEOLITIČKI PARAMETRI SIREVA TOKOM ZRENJA.....	61
5.10.	AROMATIČNA JEDINJENJA SIREVA.....	65

5.11. SENZORNA ANALIZA SIREVA.....	72
6. ZAKLJUČAK.....	75
7. LITERATURA.....	79
8. PRILOG.....	101
9. SPISAK SKRAĆENICA:.....	113
10. BIOGRAFIJA AUTORA	114
Изјава о ауторству	115
Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада	116
Изјава о коришћењу	117

1. UVOD

Prvi podaci o istraživanju tartufa u Srbiji datiraju od davne 1778. godine, kada je Fridrih Vilhelm fon Taube, zapisao da na području Slavonije i Srema postoje tartufi, koji “ni u čem ne zaostaju za pijemonteskim” (čuvena pokrajina u Italiji).

Kralj Milan Obrenović je 1896. godine, uvezo prve pse tartufare, kada je otkriveno prvo nalazište tartufa u Srbiji, u šumi “Koviljaci” (između Kragujevca i Gornjeg Milanovca). To je navelo kralja na ideju da uveze “seme tartufa” kako bi na svom imanju kraj Niša veštački gajio tartufe.

Nekoliko decenija kasnije, Jekić, J. 1933. godine, pronalazi vredne primerke tartufa u području Jastrepa (<https://agroinfonet.com/poljoprivreda/povrtarstvo/tartufi-u-srbiji/>) a 1947. godine, na području Morovića, Pančeva i Rogota, pronađeni su vredni primerci tartufa (<https://agroinfonet.com/poljoprivreda/povrtarstvo>).

U poslednjoj deceniji prošlog veka, u Srbiji se intenzivno proučavaju tartufi. Od 1991. godine, na prostoru Srbije, na više od 200 lokaliteta, otkriveno je samo iz roda pravih tartufa 13 vrsta, što je približno polovina svih do sada poznatih evropskih pravih tartufa. Srbuja se svrstava u red izrazito malobrojnih privilegovanih zemalja i regija (Italija, Francuska, Grčka, Istra, južna Mađarska), gde je ova dragocena vrsta do sada pronađena (<https://agroinfonet.com/poljoprivreda/povrtarstvo>).

Tartuf (*Tuber* spp.), kao ektomikorizna vrsta, razvija podzemne jestive plodove, askokarpe, u simbiozi sa korenom biljaka, najčešće hrasta, lipe, graba, topole, bora i dr., zavisno od vrste tartufa. Ove ektomikorizne gljive, pripadaju redu *Pezizales*, razdeo *Ascomycota*, a mikorizu uspostavljaju sa korenom *Gimnospermi* i *Angiospermi*, obrazujući plodonosna tela, askokarpe, obično nepravilno okruglog oblika i mesnate konzistencije. Životni ciklus tartufa počinje fazom vegetativnog rasta hifa, koje uspostavljaju kontakt sa korenom biljke domaćina gradeći simbiozu, koja dovodi do razvoja ektomikorize. Proces sazrevanja/melanizacije, formiranja gleba, stvaranje spora unutar gleba, traje nekoliko meseci. U završnoj fazi, micelijum je organizovan u plodonosno telo u kome se formiraju spore.

Istraživanja mikroflore ektomikorizne zajednice tartufa i plodonosnih tela tartufa, pokazuju da raznovrsnu mikrobnu zajednicu čine bakterije, kvasci, filamentozne gljive i virusi (Splivallo i Ebeler 2015; Culleré et al., 2010). Bakterijske zajednice izolovane iz askokarpa tartufa, njihovo potencijalno učešće u ishrani plodonosnih tela tokom njihovog celokupnog razvojnog perioda, zaštita plodonosnih tela od parazitskih mikroorganizama prisutnih u zemljištu, ili razlaganja samih askokarpa, predmet su velikog broja istraživanja (Antony-Babu et al., 2014; Vahdatzadeh et al., 2015). Bakterije u tlu koloniziraju primordije tartufa, pre diferencijacije askokarpnih tkiva, pri čemu se sastav bakterijske zajednice menja tokom sazrevanja askokarpa tartufa.

Mikorizalna kolonizacija korena biljaka gljivama indukuje takozvani “efekat mikorizosfere”, koji favorizuje pojavu bakterija uključenih u mikorizni proces, mikorizne pomoćne bakterije i bakterije povezane s ektomikorizom. Bakterije mobilizacijom hranljivih materija iz minerala ili proizvodnjom isparljivih organskih jedinjenja, koji su u vezi sa drugim mikroorganizmima (kvascima i drugim gljivama), povezani sa *Tuber* spp., doprinose aromi tartufa.

Plodonosna tela tartufa karakteriše jaka, kompleksna aroma, mešavina isparljivih jedinjenja, koja se verovatno koriste za komunikaciju sa biljkama, životinjama i mikroorganizmima (Barbieri et al., 2005) i imaju jedinstven mehanizam za apsorpciju hranljivih materija iz zemljišta zajedno sa biljkom domaćinom. Pored biološke funkcije, mešavina isparljivih jedinjenja emitovanih iz plodonosnih tela, određuje njihovu ekonomsku vrednost. Sadržaj aromatičnih materija u tartufima je promenljiv i zavisi od više faktora, kako od biljke domaćina, prisutne mikroflore, tako i od vegetativnog perioda, starosti tartufa, genetskog faktora i regiona sa koga potiče. S obzirom da su istraživanja o tartufima sa regiona Srbije veoma oskudna, otvara se široko polje za istraživanja, koja mogu doprineti saznanjima iz ove oblasti u svetu.

Mnogobrojna istraživanja su pokazala da aroma tartufa potiče od lako isparljivih organskih jedinjenja. Do sada je izolovano i identifikovano više od 200 isparljivih organskih jedinjenja iz

plodonosnih tela tartufa, koji imaju veliki značaj za aromu i određuju senzorna svojstva tartufa (Cullere et al., 2010).

Zbog specifične strukture, tartufi su veoma osetljivi, lako kvarljivi a glavni problem jeste održavanje aromatičnih materija koje daju kvalitet tartufa. Postoje brojna istraživanja u vezi pronalaza načina očuvanja aromatičnih materija tartufa kao što je pakovanje u modifikovanoj atmosferi, skladištenje na niskim temperaturama ili čak ozračivanja gama zracima. Način čuvanja tartufa treba da obezbedi očuvanje hemijskih i senzornih svojstava tartufa, kako bi se njegovom primenom u prehrambenoj industriji, dobio proizvod adekvatnih senzornih karakteristika.

Primena tartufa, kao dodatak hrani, piću i raznim drugim proizvodima je poslednjih godina sve veća. Međutim, prehrambeni proizvodi sa dodatkom tartufa, koji se danas nalaze na tržištu, često podrazumevaju primenu veštačkih aroma, koji postaju glavni nosioci arome u proizvodu. Pronalazanje tehnike koja bi omogućila očuvanje prirodne arome tartufa, a samim tim i mogućnost dobijanja prehrambenih proizvoda sa prirodnom aromom tartufa, još uvek nije istražena. Sa druge strane, pronalazanje načina da se očuva prirodna aroma tartufa i inkorporira u prehrambene proizvode, omogućilo bi da se proizvodnja prehrambenih proizvoda sa tartufima može odvijati tokom cele godine.

U tom smislu, proizvodnja sireva sa dodatkom tartufa, obogaćen autohtnim potencijalnim probioticima predstavlja veliki izazov, zbog karakteristika koje poseduje tartuf, kao i zbog metabolita bakterija mlečne kiseline, koje takođe utiču na senzorna svojstva proizvoda. Stoga je predmet ove disertacije ispitivanje mogućnosti primene tartufa (svežih i zamrznutih različitim režimima), u proizvodnji sireva dobijenih dodavanjem autohtonih bakterija mlečne kiseline, koje mogu da se koriste kao probiotske kulture i njihov interaktivni uticaj na procese zrenja i senzorni kvalitet sireva.

Imajući u vidu specifičnost nastanka arome tartufa i rešavanje problema njenog očuvanja tokom skladištenja, a kasnije i primenu tartufa u proizvodnji sireva sa autohtonim bakterijama mlečne kiseline, moguće je dobijanje atraktivnog prehrambenog proizvoda koji je kompletno poreklom iz Srbije. Inovativno tehnološko rešenje podrazumeva primenu autohtonih potencijalnih probiotskih bakterija, kao i autohtonih svežih i smrznutih tartufa u proizvodnji sireva visokog senzornog kvaliteta. Umesto upotrebe veštačkih aroma, dobijanje prehrambenog proizvoda sa potpuno prirodnim komponentama, zbog nutritivnih karakteristika koje poseduje tartuf kao i zbog zdravstvenih efekata probiotika, predstavlja značajan iskorak u prehrambenoj industriji.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. ZEMLJIŠNI MIKROORGANIZMI

Mikroorganizmi koji kolonizuju zemljište su najzastupljeniji i najraznovrsniji oblici života na Zemlji i neophodni su za normalno funkcionisanje kopnenih ekosistema i odvijanje geohemijskih procesa (Woodcroft et al., 2018). Takođe, oni su ogroman rezervoar za dobijanje prirodnih proizvoda koji imaju potencijalni značaj za farmaceutsku industriju i biotehnologiju (Crits-Christoph et al., 2018). Biološki diverzitet mikrobnih zajednica u zemljištu se prepoznaje kao glavni faktor koji direktno, ograničavajući širenje potencijalnih patogena, i indirektno, učestvujući u procesima koji osiguravaju čist vazduh, vodu i zdravu hranu, utiče na zdravlje ljudi (Wall et al., 2015). Treba imati u vidu da zemljište predstavlja primarni rezervoar bakterija koje kolonizuju biljke i igraju glavnu ulogu u određivanju biljne produktivnosti (Laforest-Lapointe et al., 2015) i utiču na plodnosti zemljišta i zdravlje biljaka (Gianinazzi i Schuepp, 1994).

Za mikroorganizme ove složene zajednice se ranije koristio izraz mikroflora a danas je u upotrebi izraz mikrobiota, koji će se koristiti u daljem tekstu ovog rada.

Dominantne komponente zemljišne mikrobiote su bakterije, arhea i gljive i čine više od 99% mikrobne biomase u zemljištu (Fierer, 2017). U svakom gramu zemljišta nalazi se od 10^8 - 10^{10} mikrobnih ćelija i hiljade, ako ne i milioni različitih vrsta (Roesch et al., 2007). Koren biljaka komunicira s izvornom zemljišnom zajednicom, uspostavljajući „biljnu mikrobiotu“ koja naseljava i zemljište i biljna tkiva (Lebeis et al., 2012). U mnogim ekosistemima mikorizne gljive čine važnu komponentu zemljišne mikrobiote koja utiče na rast biljaka i unošenje nutrijenata. Osim što povećavaju površinu korena biljaka domaćina, hife ovih simbiotskih gljiva predstavljaju površinu za interakcije s drugim mikroorganizmima i važan put za translokaciju energetski bogatih biljnih asimilativa u zemljište. Imajući u vidu značaj zemljišne mikrobiote u vitalnim funkcijama neophodnim za funkcionisanje naše planete, jasno je zašto gubitak mikrobnog biodiverziteta u zemljištu izaziva sve veću zabrinutost.

2.2. MIKORIZA

Značajna biotička komponenta zemljišnih ekosistema su mikorizne gljive, odnosno gljive koje uspostavljaju simbioznu asocijaciju sa korenom različitih biljaka. Ova simbioza označava se kao mikoriza ("mico"-gljiva i "rhiza" koren) i prvi put je opisana 1885. godine. U ovom simbiotskom odnosu, mikorizne gljive koriste, za biljku nepristupačne, nutrijente iz zemljišta i transportuju ih do korena. Hife gljiva snadbavaju biljke sa nutrijentima, fosforom, bakrom, cinkom koji su slabo pokretni u zemljištu, ali i vodom koja inače manje dostupna korenu. Na ovaj način, koren koji je kolonizovan mikoriznim gljivama, omogućava biljci da bude bolje zaštićena i da se odupre različitim stresnim uslovima kojima je izložena u zemljištu. Mikorizne gljive, takođe, imaju korist od ove simbioze, gde biljka svojim fotosintetskim proizvodima na bazi ugljenika (šećeri) hrani mikorizne gljive. Zbog toga se može reći da u ovoj simbiozi postoji pravedna razmena usluga između gljiva i biljaka. Mikorizne gljive olakšavaju biljkama rast pod stresnim uslovima kroz niz složenih mehanizama što dovodi do povećanja inteziteta fotosinteze i drugih svojstava vezanih za razmenu gasova (Birhane et al., 2012), kao i povećanja unosa vode. Na ovaj način, povećana fotosintetska aktivnosti rezultiraće i većim odpuštanjem produkata fotosinteze i boljim rastom mikoriznih gljiva. Mikorizne gljive igraju jedinstvenu ulogu u dinamici organske materije u zemljištu i doprinose stvaranju rezervoara mikrobne biomase, koja ima dominantnu ulogu u formiranju i stabilizaciji zemljišne organske materije. Treba istaći da mikorize u zemljištu utiču na kvalitet zemljišta, na njegovu strukturu i teksturu, a time i na zdravlje biljaka (Thirkell et al., 2017; Zhu et al., 2012), kao i na procese razgradnje organskih materija (Peterson et al., 2004). Nadalje, mikorizne gljive mogu uticati na fiksaciju CO₂ u atmosferi od strane biljaka domaćina, povećavajući „efekat rezervoara“ i kretanje fotoasimilata iz vazdušnih delova u koren biljke. Neke

obligatno mikorizne biljke su ekonomski značajne (orhideje, familija *Orchidaceae*), a primena mikorize u poljoprivredi daje bolje rezultate u prinosu poljoprivrednih kultura, u pošumljavanju rudničkih deponija i drugih zagađenih područja (Raičević et al., 2010)

Značaj mikorize ogleda se i u činjenici da formiranje mikorize predstavlja jedan od najvažnijih adaptacija biljaka na život u kopnenim uslovima i evolucija biljaka bila je moguća samo kroz ova međusobna partnerstva (Strullu-Derrien et al., 2018).

Mnoge mikorizne gljive formiraju jestiva plodonosna tela (pečurke), koja imaju veliki značaj za ljudsku ishranu. U novije vreme, neke od njih se proizvode na veštački mikorizovanim sadnicama. Na osnovu morfoloških karakteristika, vrsta gljiva (mikobiont) i biljaka (fitobiont), koji ostvaruju simbiozu, razlikuje se sedam tipova mikoriza (Smith i Read, 2008): ektomikoriza (ECM), arbuskularna (AM), erikoidna mikoriza (ERM), monotropoidna mikoriza, arbutoidna mikoriza, ekto-endo mikoriza i orhidoidna mikoriza.



Slika1. Mikoriza (<http://logottotartufi.com/wp-content/uploads/macrosporum>)

2.2.1. Ektomikoriza

Ektomikorizne gljive su ključni regulatori primarne proizvodnje i mineralizacije hranjivih sastojaka u kopnenim ekosistemima. One posreduju u prenošenju vode i nutrijenata iz zemljišta u biljke i služe za transport fotosintetički fiksiranog ugljenika u zemljišnu zajednicu. Ove gljive utiču na skladištenje ugljenika i brzinu kruženja hranjivih sastojaka u zemljištu. Ektomikorizne zajednice predstavljaju simbiozu biljaka i gljiva, pri čemu svaka od članica ima mogućnost da koristi izvore hranjivih sastojaka iz zemljišta (Jonsson et al., 2001; Lilleskov et al., 2002). Ektomikorizni koren karakteriše omotač i Hartigova mreža koja se sastoji od isprepletanih hifa između epiderma korena i kortikalnih ćelija. Formiranje ECM može se predstaviti kroz nekoliko koraka:

- kontakt sa hifama koje prepoznaju epidermalne ćelije korena na sitnim, mladim bočnim korenčićima
- proliferacija micelijuma na površini korena i diferencijacija u obliku omotača-plašta
- hife prodiru u ćelije epiderma ili u korteks da bi stvorile Hartigovu mrežu. Odgovor domaćina na ove promene može uključiti proizvodnju polifenola u ćelijama i taloženje sekundarnih metabolita u ćelijskim zidovima,
- područja mikorizne aktivnosti različita su od udaljenost (mm) od vrha korena, i Hartigova aktivnost zavisi od starosti i rasta korena
- omotač kod starijih korenova obično traje dugo nakon pojave asocijacije, ali vremenom postaje neaktivan.

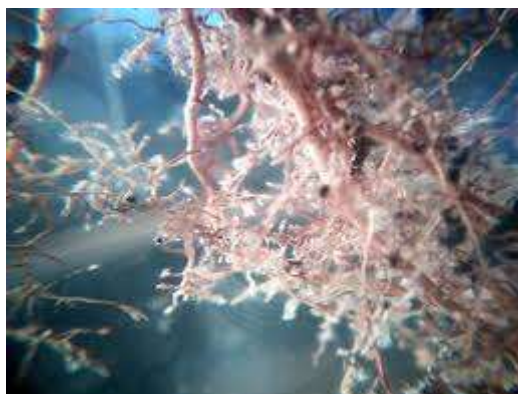
Pojedine hife se od omotača šire u okolno zemljište i mogu biti duge i do 20 m, što omogućuje transport fosfata, vode i drugih supstanci sa velike udaljenosti. Stariji ektomikorizni koren se morfološki menja (prestaje da raste apikalno, deblja, postaje stubast, bez korenskih dlaka) (Smit et al., 2011) i funkcioniše kao struktura za skladištenje.

Ektomikorizne (ECM) gljive grade simbiotske asocijacije sa korenom drvenastih biljaka i igraju presudnu ulogu u različitim šumskim ekosistemima koji pokrivaju 30% globalne kopnene površine (Pan et al., 2013). ECM formiraju drvenaste biljke umerenog pojasa, (*Fagales*, *Pinaceae*, *Eucalyptus*), neke paprati. ECM gljivične vrste pripadaju jednoj od tri fungalna filuma, uključujući *Ascomycota* (subfilum *Pezizomycotina*), *Basidiomycota* (subfilum *Agaricomycotina*) ili *Mucoromycota* (subfilum *Mucoromycotina*) (Spatafora et al., 2017)

ECM gljive su od izuzetne važnosti u ekosistemima, jer njihovo udruživanje s biljkama različitih vrsta pomaže apsorpciju nutrijenata i vode, doprinosi zaštiti biljaka od patogena, abiotskog stresa i kontaminirane sredine (Silva et al., 2013). Takođe, u šumskim ekosistemima, ECM je od posebne važnosti za odvijanje biogeohemijskih ciklusa i stabilnosti biljnih biocenoza.

Pored ekosistemskih uloga, ECM gljive predstavljaju izvor prihoda i hranu sa značajnom hranljivom vrednošću. Jestive ECM gljive daju visokokvalitetnu i važnu količinu sirovih proteina, minerala, ugljenih hidrata, masti, itd. (Correa et al., 2016). Zbog visokog udela nezasićenih masnih kiselina i visokog postotka linolne kiseline koje se nalaze u jestivim, ECM gljive se smatraju zdravom hranom (Chang et al., 2004). Uz to, proteini većine jestivih ECM taksona sadrže devet esencijalnih aminokiselina (leucin, izoleucin, valin, triptofan, lizin, treonin, fenilalanin, metionin i histidin) koji su značajni u ishrani ljudi (Chang et al., 2004).

Na rasprostranjenost ECM utiču brojni faktori, a poznato je i da ekološki i prostorno bliska staništa sadrže slične ECM zajednice gljiva (Peay i Bruns, 2014). Zapravo, na zajednice ECM gljiva istovremeno utiče takson domaćina (Ishida et al., 2007), karakteristike zemljišta (npr. pH) (Toljander et al., 2006) i ograničenje širenja (Peay et al., 2012). Istraživanja Matsuoka et al. (2020) ukazuju da je biljka domaćin primarna odrednica sastava ECM gljiva u šumskom ekosistemu. Ljudske aktivnosti, kao što je seča šuma, urbanizacija i poljoprivredne prakse promenile su zemljišne ekosisteme pretvarajući područja sa ECM u nemikorizna staništa. Od ektomikoriznih gljiva, posebnu pažnju istraživača privlače tartufi, autohtone gljive za određena područja.



Slika 2. Formiranje ektomikorize belog tartufa
(<http://logottotartufi.com/login/>)

U protekloj deceniji postignuti su značajni pomaci u proučavanju ECM zajednica. To je uglavnom zbog razvoja i primene molekularno-bioloških tehnika, koje su korišćene uz tradicionalne morfološke tehnike. Svakako je ova "molekularna revolucija" barem delom bila posledica korisnosti i primene ITS regija gljivične rRNA koje su u fokusu većine ekoloških studija o ECM gljivama. Molekularni pristupi poput ITS PCR i RFLP danas su uobičajene tehnike u ekološkim studijama ECM koje doprinose boljem razumevanju ogromne raznolikosti i ekologije ektomikoriznih zajednica.

2.3. ODNOS MIKROORGANIZAMA I EKTOMIKORIZNIH GLJIVA

Ekološka niša je definisana interakcijskim odnosima, biotičkih, abiotičkih faktora i predstavlja mikrostanište u kome vrsta postiže maksimalan rast (Raičević et al., 2010). Posebna ekološka niša-

mikorizosfera nastaje modifikacijom fizičkih i hemijskih karakteristika zemljišta u neposrednoj okolini ektomikorizne zajednice (Read i Perez-Moreno, 2003), aktivnošću micelijuma ECM gljiva (Simard et al., 1997). Mikorizosfera je dinamična regija od ogromne važnosti za funkcionisanje i rast mikorizne zajednice i ona je zapravo „omotač“ aktivnosti koji pruža vezu između složene strukture korena biljke, gljive i zemljišta. U mikorizosferi biljke i mikorizne gljive nisu same u partnerstvu, ostvaruju se i dodatne interakcije sa bakterijama ili drugim gljivama što doprinosi formiranju multi-partnerskih interakcija koje utiču na ishod simbiotske zajednice (Wagner et al., 2016) i dodatno usložnjava ovu ionako složenu zajednicu. Neke gljive u mikorizosferi mogu stvarati auksin indol-3-sirćetnu kiselinu (IAA), koja stimuliše mikorizaciju, a egzogeno prisustvo fitohormona pospešuje grananje, što dovodi do povećanog stvaranja Hartig-mreže tokom simbioze (Krause et al., 2015). Takođe, zemljišne bakterije su sposobne za biosintezu auksina, uglavnom nakon indukcije triptofanskog puta i sinteze IAA, koja povećava grananje ektomikoriznih gljiva, zbog čega se ove bakterije nazivaju mikoriza-pomoćne bakterije (Frey-Klett et al., 2016). Bakterije iz rodova *Burkholderia*, *Pseudomonas* i *Rhizobium*, svrstane su u grupu mikoriza-pomoćne bakterije i one pospešuju stvaranje mikorize (Churchland i Grayston, 2014). Stoga mikorizosfera pruža nišu za određene bakterije koje zauzvrat igraju važnu ulogu u simbiotskom sistemu. Eksperimentalni rezultati su pokazali da *Pseudomonas fluorescens*, kao mikoriza-pomoćna bakterija, ima potencijal za komercijalnu primenu pri tretmanu sadnica inokulisanih tartufom (*Tuber melanosporum*) za poboljšanje kvaliteta i mikorizacije u uslovima rasadničke proizvodnje (Piñuela et al., 2020).

Istraživanjem mikorizosfere mnogih gljiva koje žive u različitim prirodnim uslovima, detektovane su zajednice bakterija iz rodova: *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Aquamonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Chryseobacteriu*, *Janthinobacterium*, *Mesorhisobium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rahnella*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Sphingomonas* i *Variovorax* (de Boer et al., 2005; Izumi et al., 2006; Johanson et al., 2004; Pavić et al., 2013).

2.4. TARTUFI (*Tuber* spp.)

Tartufi su posebno cenjeni zbog dve važne karakteristike: koristi šumskim ekosistemima i biljci domaćinu, a jestive vrste imaju veću ekonomsku vrednost od mnogih prehrambenih useva. Tartufi su ektomikorizne gljive, pripadaju redu *Pezizales*, razdeo *Ascomycota*. Mikorizu uspostavljaju sa korenom *Gymnospermi* i *Angiospermi*, obrazujući plodonosna tela, askokarpe, obično nepravilnog okruglog oblika i mesnate konzistencije (Pegler et al., 1993). Na površini plodonosnog tela nalazi se omotač (peridija), koja može biti gladak ili sa bradavičastim izraštajima u zavisnosti od vrste tartufa. Vegetativni oblik tartufa je micelija, koja se sastoji od razgranatih niti-hifa.

Životni ciklus tartufa počinje klijanjem spora iz kojih nastaju hife koje mogu dalje da se razvijaju jedino ako stupe u kontakt sa finim završecima korenovog sistema nekih viših biljaka. Spoj završetaka korenovog sistema i micelijuma gljive zove se mikoklena od koje dalje u zemljište polazi veliki broj hifa. Na ovaj način biljka se na efikasniji način snabdeva vodom i mineralnim materijama, a zauzvrat gljiva dobija gotovu hranu (ugljene hidrate). Stvaranjem ektomikorizne zajednice, stvaraju se uslovi za razmenu hranljivih sastojaka između biljke i tartufa (Smith i Read, 2008). Pošto žive pod zemljom, prilikom sazrevanja tartufi ispuštaju mirise po kojima ih pronalaze brojne životinje i insekti koji se hrane ovom gljivom i na taj način rasejavaju spore i otpočinju novi životni ciklus tartufa. Da bi se stvorilo plodonosno telo tartufa ispod zemlje, potrebno je nekoliko meseci, čak i godina, po čemu se, između ostalog, tartufi razlikuju od drugih gljiva. Ektomikorizosfera, prostor oko mikorizne zajednice, površina plodonosnog tela tartufa (peridijum), kao i unutrašnja tkiva ploda (gleb), kolonizovani su složenom mikrobnom zajednicom od nekoliko stotina vrsta (Antony-Babu et al., 2014; Barbieri et al., 2007; Vahdatzadeh et al., 2015). Istraživanja uloge mikrobne zajednice na biologiju tartufa, ukazuju da neke bakterije svojim metaboličkim produktima, učestvuju u izgradnji aroma tartufa (Vahdatzadeh et al., 2015). Takođe je utvrđeno da neke bakterije razgrađuju isparljiva organska jedinjenja tartufa, a neke svojim produktima (antibiotik, hormoni), štite ektomikoriznu zajednicu (inhibicijom patogenih gljiva, stimulacijom

rasta gomolja) (Antony-Babu et al., 2014; Deveau et al., 2016; Dominguez et al., 2012; Grindler et al., 2013, 2015; Saidi et al., 2015). Neke bakterije iz porodice *Bradirhizobiaceae*, izolovane iz *Tuber magnatum*, imaju sposobnost da fiksiraju azot što utiče na ishranu i razvoj plodonosnog tela tartufa (Barbieri et al., 2010).

2.4.1. Podela tartufa

Osnovna podela tartufa prema boji je na: bele tartufe, čija se plodonosna tela odlikuju glatkim omotačem i crne tartufe, kod kojih se na površini plodonosnog tela nalaze bradavičasti izraštaji. Na našim prostorima pronađeno je nekoliko desetina različitih vrsta tartufa od kojih nekoliko spada u sam vrh po kvalitetu:

- Beli tartuf (*Tuber magnatum Pico*),
- Crni jesenji tartuf (*Tuber macrosporum*),
- Letnji tartuf (*Tuber aestivum*)
- Zimski tartuf (*Tuber brumale*, *Tuber aestivum* var. *uncinatum*)

Beli tartuf (*Tuber magnatum Pico*)

Beli tartuf stupa u simbiozu sa većim brojem drvenastih vrsta biljaka: sve vrste hrasta, a najčešće hrast lužnjak, sve vrste topola, najčešće bela topola, grab, i dr. Na vlažnim, aluvijalnim zemljištima, sa pH vrednostima 7,0 do 9,0 plodonosna tela se formiraju uglavnom na dubini od 10-30 cm, a retko na 40-100 cm. Sazrevanje plodonosnih tela obično traje od polovine septembra do kraja decembra. Beli tartuf spada u najkrupnije vrste tartufa sa telom veličine kokošjeg jajeta, a može biti veličine manje lubenice. Pokožica jestivog dela belog tartufa je glatka, prljavo bela, žućkasto bela ili žućkasto zelena, što zavisi od biljne vrste s kojom je u simbiozi. Unutrašnji deo gleba „meso“, protkano je izuvijanim „venama“, što mu daje mramorast izgled i varira od bele do svetlosmeđe, ružičasto smeđe i zagasito crvene boje. Ima jak, karakterističan miris koji podseća na mešavinu pikantnog sira gorgonzole s malim naglaskom belog luka. Koristi se kao delikatesni dodatak u mnogim jelima.



Slika 3. Beli tartuf (*Tuber magnatum Pico*)
(<http://logottotartufi.com/wp-content/uploads/macrosporum>)

Crni jesenji tartuf (*Tuber macrosporum*)

Crni jesenji tartuf, stupa u mikorizu sa hrastom i topolom. Plodonosna tela sazrevaju od septembra, pa do kraja januara. Izuzetno je cenjena gljiva, po mirisu slična belom tartufu. Plodonosno telo je okruglog ili nepravilno okruglog oblika sa blagim kvrgama. Na površini se nalazi peridija rdasto-crne boje sa sitnim bradavicama. Na poprečnom preseku je tamno smeđe boje sa nepravilno izuvijanim belim tankim žilama. Za razliku od belog tartufa, crni tartuf se može naći i na terenim sa nešto većom nadmorskom visinom.



Slika 4. Crni jesenji tartuf (*Tuber macrosporum*)
(<http://logottotartufi.com/wp-content/uploads/macrosporum>)

Letnji tartuf (*Tuber aestivium*)

Crni letnji tartuf (*Tuber aestivium*), sazreva u leto, od kraja maja, pa do decembra, po čemu je i dobio naziv. Raste na krečnim zemljištima širom Evrope i Severne Afrike, a kod nas najčešće raste u simbiozi sa hrastom, lipom, grabom, leskom, itd.



Slika 5. *Tuber aestivium*

Gljiva je nepravilno okruglastog oblika, veličine manje pomorandže. Spoljna površina je smeđe-crna, sa poligonalnim bradavicama širine 3-10 i visine do 3 milimikrona. Unutrašnjost „mesa“ je prljavo bele do smeđe boje, sa brojnim širokim, razbacanim i kratkim „venama“.

Crni zimski tartuf (*Tuber brumale*)

Zimski tartuf uspeva na lakšim, humusnim zemljištima, često ispod samog površinskog zemljišnog sloja odnosno lisnatog pokrova u simbiozi sa hrastom, bukvom, grabom, leskom, topolom i borom. Kod nas je poznat pod imenom zimski tartuf, zbog vremena sazrevanja plodonosnih tela koje traje od početka novembra, pa do sredine marta. Raste do veličine kokošijeg jajeta. Pokožica je crna sa stožastim bradavicama prečnika do 3 mm. Unutrašnjost plodonosnog tela je sivo-smeđe boje sa belim venama širim nego kod crnog tartufa. U askusima se nalazi 3-6 eliptičnih askospora, veličine 20-43 x 16-19 milimikrona sa dužim bodljama.

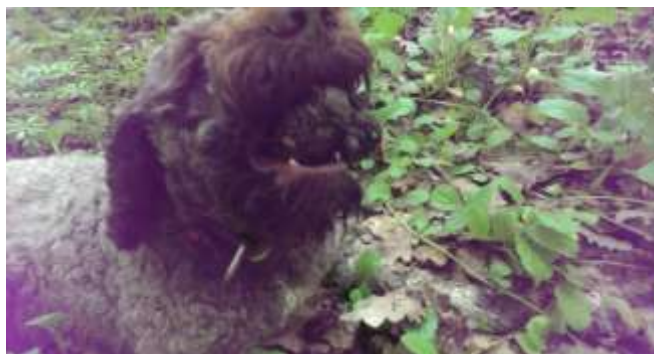


Slika 6. Crni zimski tartuf (*Tuber brumale*)
(https://www.lagoto.rs/vrste_tartufa.php)

2.4.2. Pronalaženje tartufa

Kada je u pitanju komercijalna vrednost tartufa, uzima se u obzir veličina, oblik ploda i aroma (što je plod veći i pravilnijeg oblika, veća je cena). Proces pronalaženja tartufa, pošto rastu pod zemljom, zasnovan je na lučenju karakterističnih mirisa koji privlače glodare, sisare i mušice. Sisari osećaju miris dimetil-sulfida (DMS) (Talou et al., 1990), ali neke životinje mogu da osete i jedinjenja specifičnih za vrstu tartufa (Hochberg et al., 2003), što je još uvek u fazi ispitivanja. Pitanje da li su isparljiva jedinjenja, koja ljudi opažaju, isti signali koje psi koriste za pronalaženje tartufa, nepoznanica je za mnoge istraživače. Psi uglavnom pronalaze plodove tartufa, ali je sastav isparljivih jedinjenja u tom periodu nedovoljno istražen, u smislu da nije tačno definisano koja su to jedinjenja koja privlače životinje (Buntgen et al., 2017).

Činjenica je da životinje pronalaze zrele i nezrele plodove, pa je nejasno šta privlači životinje pri pronalaženju tartufa. Veverice i miševi, na primer, koriste tartufe kao hranu zbog sadržaja glukoze u njima (Buntgen et al., 2017).



Slika 7. Pas Bak rase Lagotto Romagnolo u akciji pronalaženja tartufa

2.5. MIKROBIOTA TARTUFA

Za razliku od gljiva koje formiraju plod iznad zemlje i u kratkom roku, tartufi formiraju plod tek nakon nekoliko meseci, ispod zemlje (hipogejne gljive) (Splivallo et al., 2019). Zbog toga je jasno da na formiranje ploda verovatno utiču brojni zemljišni mikroorganizmi (Salerni et al., 2014). Tokom svog složenog životnog ciklusa, tartufi uspostavljaju simbiotske interakcije s bakterijama (*Archaea* i *Eubacteria*) (Antony-Babu et al., 2014; Gryndler et al., 2013), gljivama (kvasci i filamentozne gljive) (Pacioni et al. 2007) i virusima (Stielow end Menzel, 2010), u svim fazama razvoja. Prisustvo mikroorganizama u okviru simbiozne zajednice između mikoriznog korena i micelijuma tartufa, kao i u različitim delovima askokarpa, ukazuje na složenost i postojanje multi paratnerskih interakcija.

U sastavu mikrobioma tartufa postoje razlike (Benucci i Bonito, 2016) koje su verovatno nastale pod uticajem evolucije (Barbieri et al., 2016). Bakterijske zajednice, selektuju se iz zemljišnih biocenoza, tokom rane faze formiranja tartufa, iz spoljnog omotača tartufa (peridijum) i unutrašnjeg (gleb), različitih vrsta tartufa (Antony-Babu et al., 2013; Grindler et al., 2013). Istraživanja mikrobiote tartufa pokazala su da površina plodonosnog tela tartufa, kao i unutrašnjost ploda tartufa, sadrže nekoliko stotina bakterijskih zajednica (Antony-Babu et al., 2014; Barbieri et al., 2007; Vahdatzadeh et al., 2015). Mikrobiota plodonosnih tela je slična kod svih do sada proučavanih vrsta tartufa (Antony-Babu et al., 2013) i uglavnom se sastoji od α -*Proteobacteria* iz porodice *Bradirhizobiaceae* dok razlike postoje u mikrobiomu različitih vrsta tartufa. Neke bakterije učestvuju u razgradnji i sintezi složenih aroma tartufa (Splivallo et al., 2015; Vahdatzadeh et al., 2015). Takođe, postoje pretpostavke i dokazi da neke bakterijske vrste izazivaju inhibiciju rasta konkurentnih gljiva, stimulišu rast gomolja, kao i razgradnju askokarpa (Antony-Babu et al., 2014; Dominguez et al., 2012; Deveau et al., 2016; Grindler et al., 2013, 2015; Saidi et al., 2015). Istraživanja ektomikorizne zajednice i uloge biljke u ektomikoriznoj zajednici, još uvek nisu dala odgovore na mnoga pitanja (Ishida et al., 2007; Morris et al., 2008; Tedersoo et al., 2008). Klimatski uslovi, biljka domaćin, tehnološka zrelost tartufa, faktori su koji utiču na razlike u mikrobiomima tartufa (Barbieri et al., 2010; Deveau et al., 2016; Li et al., 2018), ali je mehanizam funkcionisanja ektomikorizne zajednice još uvek nedovoljno istražen.

Mikrobiota tartufa se razlikuje po vrstama tartufa, ali dominiraju bakterije iz reda *Rhizobiales*, *Actinomycetales*, *Enterobakteriales*, *Flavobakteriales* i *Pseudomonadales* (Barbieri et al., 2016). Metode za utvrđivanje mikrobnog diverziteta kod tartufa ukazale su na velike razlike. Tako, primenom molekularnih metoda potvrđeno je prisustvo α -*Proteobacteria* pri čemu oko 82% je povezano sa *Sinorhizobium*, *Rhizobium* i *Bradyrhizobium* spp. Metodama kultivacije potvrđeno je prisustvo i to γ -*Proteobacteria* uglavnom fluorescentne pseudomonade. Fluorescentna *in situ* hibridizacija je pokazala da su α -*Proteobacteria* preovlađujuće u mikrobioti tartufa (85,8%), dok su ostale grupe slabije zastupljene i to: β -*Proteobacteria* (1,5%), γ -*Proteobacteria* (1,9%), *Bacteroidetes* (2,1%), *Firmicutes* (2,4%) i *Actinobacteria* (3%) (Barbieri et al., 2007). Primenom pirosekvenciranja gena 16s rRNA, TTGE, *in situ* hibridizacije i GeoChip 3,0 otkriveno je da askokarpi crnog tartufa pružaju stanište složenim bakterijskim zajednicama koje se jasno razlikuju od onih u okolnom zemljištu i ektomikorizosferi. Sastav ovih zajednica je dinamičan i razvija se tokom sazrevanja askokarpa, što je ukazalo na interakciju između tartufa i bakterija i potencijalne uloge bakterija u sazrevanju tartufa (Antony-Babu et al., 2014).

U plodonosnim telima tartufa, dokazano je prisustvo velikog broja bakterija, kvasaca, virusa i filamentoznih gljiva (Vahdatzadeh et al., 2015), koje tokom svojih metaboličkih procesa, mogu stvarati neka od isparljivih jedinjenja, ali je isto tako i sam tartuf u mogućnosti da ih stvara.

Rezultati Mestre et al. (2011) su ukazali da ektomikorizosfera može biti uobičajeno stanište za kvasce. Kvasci *Cryptococcus humicola*, *Rhodotorula mucilaginnosa*, *Debaryomyces hansenii* i *Saccharomyces* spp. izolovani su iz mikrobite *Tuber melanosporum*, *Tuber aestivum* i *Tuber magnatum* (Buzzini et al., 2005; Rivera et al., 2010). Nekoliko studija pokazalo je da kvasci verovatno pomažu u kolonizaciji ektomikoriznih gljiva (Garbaye i Bowen, 1989).

Filamentozne gljive koje su izolovane iz gljivičnog mikrobioma tartufa (*Tuber rufum*, *T. brumale*, *T. magnatum*, *T. melanosporum*, *T. aestivum*, *T. borchii*), uglavnom su askomicete (Pacioni et al., 2007), koje zajedno sa plesnima (*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp.), kolonizuju peridijume tartufa, retko glebu (Rivera et al., 2010). Znanja o gljivičnom mikrobiomu ploda *Tuber* spp. su relativno ograničena, ali je dostupno više informacija o gljivama koje naseljavaju zemljište i korenov sistem biljaka (Li et al., 2018). O prisustvu virusa u mikrobiomu tartufa, još uvek nema dovoljno podataka, mada su neki istraživači (Stielow i Menzel 2010; Stielow et al., 2011, 2012) iz *Tuber aestivum*, izolovali *Totivirus*, *Mitovirus* i *Endoravirus* i *Mitovirus* iz *Tuber escavatum*.

2.5.1. Bakterijske zajednice u mikrobioti tartufa

Bakterije iz mikrobiote tartufa imaju važnu ulogu u rastu, razvoju i ishrani plodova tartufa (Antony-Babu et al., 2013; Barbieri et al., 2007; 2010; Pavić et al., 2013). Bakterije kolonizuju spoljašnji omotač i unutrašnjost plodonosnog tela tartufa (Barbieri et al., 2005, 2007; Gryndler et al., 2013; Saltarelli et al., 2008). Bakterijske zajednice tartufa čine *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* i *Actinobacteria* (Antony-Babu et al., 2014; Gryndler et al., 2013; Splivallo et al., 2015). Kod svih vrsta tartufa dominirale su α -*Proteobacteria*, nešto manje *Firmicutes* i *Actinobacteria*, a razlikuju se po sastavu β -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria* i *Bacteroidetes* (Barbieri et al., 2000). Sa fazom zrenja, broj određenih mikroorganizama se smanjuje, a nekih ostaje isti ili se čak povećava (α , β i γ -*Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*) (Barbieri et al., 2007). Promene u sastavu bakterijskih zajednica tokom sazrevanja askokarpa, posledica su činjenice da bakterije u zemljištu kolonizuju primordije tartufa pre diferencijacije askokarpnih tkiva. Formiranjem glebe bakterije ostaju u unutrašnjosti gleba, dok peridijum sprečava razmenu bakterija zemljište-gleb (Antony-Babut et al., 2014). Sazrevanjem tartufa, povećava se broj α -*Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, a broj β -*Proteobacteria* se smanjuje. Kod svih vrsta tartufa, zabeleženo je prisutvo α -*Proteobacteria* (porodica *Bradyrizobiaceae* i *Rhizobiaceae*) (Barbieri et al., 2010; Carvalho et al., 2010). Isto tako, bakterije iz roda *Pedobacter*, dominiraju u micelijumu tartufa, kao i u rizosferi biljke i mikoriznoj zajednici (Brabcova et al., 2016). Ova bakterije poseduju enzime koji razlažu jedinjenja, produkuje enzime hitinaze koji učestvuju u razgradnji hitina kod gljiva, što utiče na degradaciju plodonosnog tela tartufa. Bakterije iz roda *Polaromonas*, imaju sposobnost fiksacije azota, vodonika i ugljen dioksida (Sizova, M., and Panikov, N. (2007; Hanson et al., 2012), koje verovatno imaju i u tartufima.

2.5.2. Kvasci, filamentozne gljive i virusi mikrobiote tartufa

Mikrobiota tartufa je veoma složena a istraživanja su pokazala da se kvasci nalaze u peridijumu tartufa (Buzzini et al., 2005; Rivera et al., 2010; Zacchi et al., 2003) a izolovani su uglavnom, *Cryptococcus humicola*, *Rhodotorula muciloginosa*, *Debaryomyces hansenii* i *Saccharomyces* spp. Filamentozne gljive koje su izolovane iz mikrobioma tartufa (*T. rufum*, *T. Brumale*, *T. magnatum*, *T. melanosporum*, *T. aestivum*, *T. borchii*), uglavnom su askomicete (Pacioni et al., 2007), koje zajedno sa plesnima (*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Trichoderma* spp.), kolonizuju peridijume tartufa, retko gleb (Rivera et al., 2010).

Koliko je prisustvo virusa u mikrobiomu tartufa, još uvek nije dovoljno istraženo, ali su neki istraživači iz tartufa izolovali *Totivirus*, *Mitovirus* i *Endoravirus* (Stielow i Menzel 2010).

2.6. AROMATIČNA JEDINJENJA TARTUFA

Tartufi su prepoznatljiviji po svom izraženom mirisu i cenjeni u gurmanskom kulinarskom svetu, kao „podzemno zlato“ i „dijamanti kuhinje“. Aromatičnost tartufa može varirati od blage do intenzivne, poput zemljanih, mošusnih i oštih, belog luka, mesnate note, voćno zelene jabuke, sira, ruže, putera, a potiču od isparljivih organskih jedinjenja, kojih je do sada identifikovano više od 200 uglavnom alkoholi, aldehidi, estri, isparljiva sumporna jedinjenja i dr. (Culleré et al., 2010; Liu et

al., 2012; Splivallo i Ebeler 2015;). Isparljiva aromatična jedinjenja tartufa merilo su kvaliteta tartufa kao gastronomskog specijaliteta (Splivallo i Cullteré, 2016). U tabeli 1, prikazani su pragovi osetljivostii i arome za karakteristična jedinjenja tartufa.

Poreklo isparljivih jedinjenja najpre je bilo vezivano samo za mikrobiotu tartufa (Buzzini et al., 2005; Splivallo et al., 2007, 2011), naročito za metabolizam kvasaca i bakterija. Smatra se da *Bradyrhizobium* bakterije mogu stvarati neka sumporna jedinjenja odgovorna za aromu tartufa, a takođe danas se zna da bakterije učestvuju u stvaranju derivata tiofena, ali ovaj biosintetski put nije dovoljno proučen (Splivallo et al., 2015).

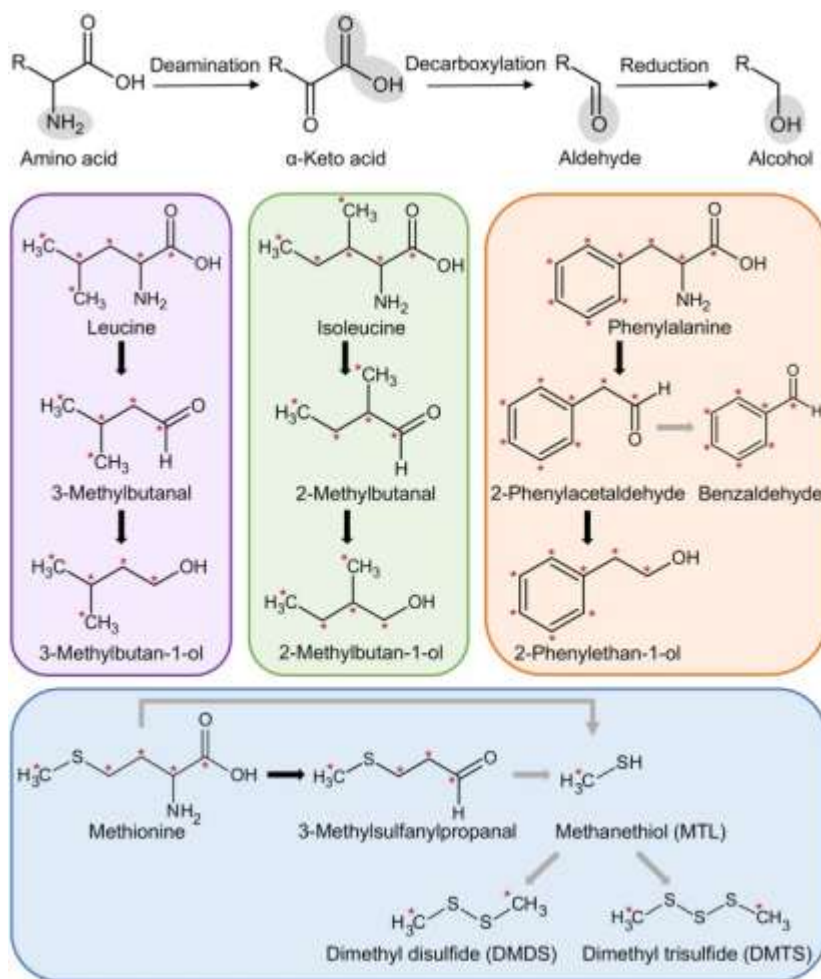
Tabela 1. Isparljiva organska jedinjenja, prag osetljivosti i aroma tartufa

	Jedinjenje	Prag osetljivosti	Miris- aroma
1.	2-butanol	1700 ppb	-
2.	2-metil-1-propanol	360 ppb do 3,3 ppm	prodoran, vinu sličan, neprijatan miris (a)*
3.	3-metil-1-pentanol	830 ppb to 1,2 ppm	Voćni, zeleni, blago opori miris (a)
4.	1-hexanol	200 ppb to 2,5 ppm	zeljasti, drvenasti, blagi, slatki, zeleni, voćni miris (v)
5.	2-fenil-etan-1-ol		sličan mirisu ruže (e)
6.	3-metil-butan-1-ol		miris na sir i viski (e)
7.	3-metill-fenol	650 ppb	Suv, kožni miris (v)
10.	3-metil-sulfanil-propanal	-	beli luk, kuvani krompir, trulu hranu (a)
11.	(E)-2-Pental	-	voćna, jagoda (d)
12.	3-metil-2-butenal	-	miris badema (v)
13.	Benzaldehid	-	gorki badem (a)
16.	2-heptanon	1ppbdo 1,33ppm	voćni, začinski, cimet, banana, blago začinskog mirisa (a)
17.	Acetoin	-	blag, drvenast, miris jogurta i puter i kremaste arome (f)
18.	Acetofenon	170ppb	karakterističan slatkast, opor miris (a)
19.	2 (5H) furanon	-	Puter
20.	2-pentilfuran	-	voćni, zeleni i zemljani mahunarski miris (g)
21.	Dihidro-5-pentil-2 (3H) furanon	-	kokosov, kremasti, voštani, slatki, puter i mast, (g)
22.	Benzofenon	-	delikatan, miris ruže (a)
23.	Propionska kiselina	5 to 10 ppm	užegao miris (v)
24.	Buterna kiselina	240 ppb to 4,8 ppm	prodoran miris putera (a)
25.	3-metil-2-buterna kiselina	-	Zelena, fenolna, mlečna aroma (a)
26.	4-metil-pentanonska kiselina	810ppb	neprijatan, kiseo, prodoran miris (a)
27.	Heptanska kiselina	640 ppb to 10,4 ppm	neprijatan užegli, kiseli, masni miris (a)
28.	DMS; DMDS; DMTS	0.16 to 1,2 ppb	Difuzan, intenzivan miris belog luka, na kuvani krompir i trulu hranu (v)
29.	Metiltio –cikloheksan	-	snažnu, slatku, miris i ukus supe ili mesa(e)
30.	Motional	0,02 ppb	jak miris mesa, luka
31.	3-methiltio-1-propanol	0,2 ppb c	mirisa i ukusa nalik supi ili mesu (a)
32.	Benzotiazol	80 do 450 ppb	delikatan, miris sličan ruži, sličan mirisu hinolina (a)

* (a) Shimoda et al. 1996; (b) Burdock, 2010; (v) Ong et al. 1998; (d) Varlet et al., 2006; (e) Jović, 1991; (f) Splivallo et al., 2007; (g) Diaz et al., 2003.

Pored biljke domaćina, mikroorganizmi iz ektomikorizosfere i askokarpa tartufa, takođe učestvuju u stvaranju isparljivih jedinjenja (Splivallo et al., 2015; Vahatzadeh et al., 2015). Svaka vrsta tartufa ima svoje specifične mirise, ali postoje isparljive materije koje sadrže sve vrste tartufa, a to su: metil-tio-metan, 3-metil-1-butanol i 1-okten-3-ol. Kod *T. melanosporum* aromu čini više od 15 jedinjenja (Culleré et al., 2010), dok kod *T. aestivum*, *T. himalaiense*, *T. sinense*, *T. indicum* i *T. borchii*, 10-20 jedinjenja učestvuju u formiranju njihove arome (Culleré et al., 2010; Liu et al., 2012). Kod tartufa *T. magnatum*, jedinjenje 2,4-ditiopentan se smatra glavnim sastojkom koji određuje njegovu aromu (Fiecchi et al., 1967). Osamdesetih godina prošlog veka identifikovani su nosioci arome tartufa *T. melanosporum*, 2-metilbutanal i dimetil-sulfid (DMS) (Talou et al., 1989). Kako se razvojem sofisticiranih tehnika napredovalo, povećavao se broj identifikovanih isparljivih jedinjenja tartufa. Intenzivni mirisi plodonosnih tela tartufa, potiču od sumpornih jedinjenja (Splivallo i Maier, 2015; Splivallo et al., 2011). Ova sumporna jedinjenja osnova su senzornih karakteristika tartufa, koje čulom mirisa registruju sisari (Cullere et al., 2010; Splivallo i Maier, 2015; Talou et al., 1990). Isti autori poreklo isparljivih aromatičnih materija u tartufima vezuju za mikrobiom tartufa, dok je analizom genoma crnog tartufa *T. melanosporum*, ustanovljeno da crni tartuf može proizvoditi isparljive materije bez učešća bakterija (Martin et al., 2010). Takođe, ispitivanjem uticaja bakterijske zajednice belog tartufa *T. borchii* na formiranje arome, došlo se do zaključka da nisu samo bakterije odgovorne za aromu ovog tartufa, već izvor može biti i metabolizam mikroorganizama, bakterija i kvasaca, ali može biti i produkt enzimskih reakcija u tartufima (Splivallo et al., 2015; Vahdatzadeh et al., 2015). U svakoj fazi, počev od formiranja ektomikorizne zajednice do plodonošenja tartufa i sporulacije, kolonizuju se mikroorganizmi kojih ima više od 15 rodova.

Neka novija istraživanja o varijacijama u sastavu aromatičnih isparljivih jedinjenja, smatraju da katabolizam aminokiselina (metionina, Erlichov put, slika 9.) i genetika, značajno utiču na stvaranje arome koja karakteriše aromatičnost tartufa (Vahdatzadeh i Splivallo, 2018).



Slika 8. Sinteza aromatičnih jedinjenja tartufa- Erlihov put (Vahdatzadeh and Splivallo, 2018.)

2.6.1. Sumporna jedinjenja tartufa

Isparljiva jedinjenja sumpora su glavna komponenta u ukupnom sadržaju isparljivih jedinjenja tartufa. Ova jedinjenja imaju karakterističan miris belog luka, koji je karakteristika svih vrsta tartufa. Jedinjenja dimetil-sulfid (DMS), dimetil-trisulfid (DMTS) i 3-tio-sulfanil-propanal su najzastupljenija kod većine tartufa (Hazelwood et al., 2008; Liu et al., 2013.; Splivallo et al., 2015). Za većinu sumpornih isparljivih jedinjenja je utvrđeno da se ne sintetišu iz askenskih kultura micelijuma tartufa (Li et al., 2012; Splivallo et al., 2015; Tirillini et al., 2000), što potvrđuje da bakterije (α i β -*Proteobacteria*, dominantne u plodonosnim telima tartufa), kao i kvasci, mogu sintetisati sumporna jedinjenja. Neka sumporna jedinjenja specifična su samo za neke vrste tartufa (2,4-ditiopentan, 2-metil-furan-3-tiol, 4,5-di-hidro-tiofen, 3-metil-4,5-di-hidro-tiofen i (Van der Heijden et al., 2015).

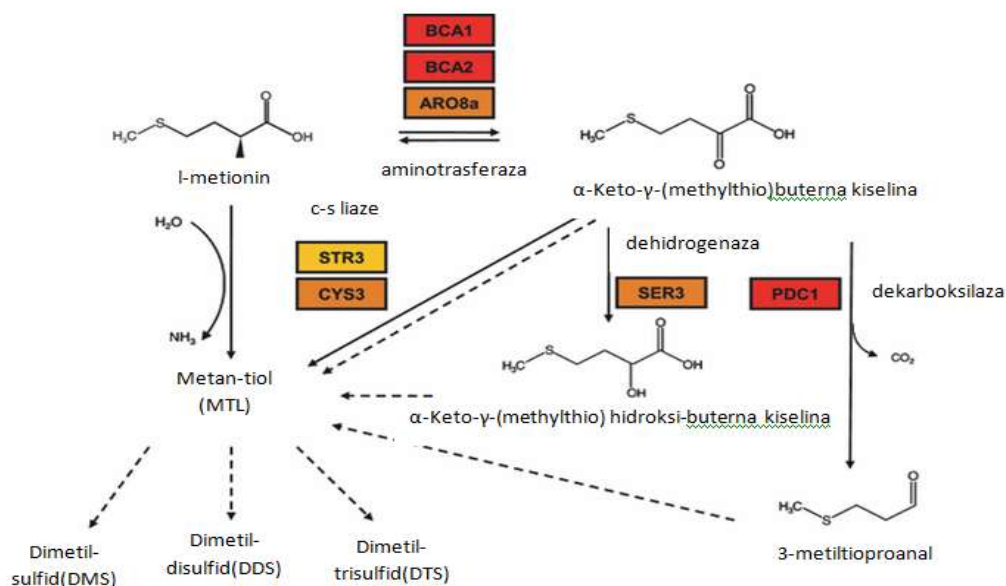
Na osnovu podataka dobijenih istraživanjem porekla isparljivih jedinjenja, prozilazi da karakteristična isparljiva jedinjenja sumpora za sve vrste tartufa, mogu nastati kao proizvod metabolizma bakterija mikrobioma plodonosnog tela tartufa i unutar plodonosnog tela (Erlihov put), a da isparljiva jedinjenja sumpora specifična za pojedine vrste tartufa, nastaju samo od tartufa ili samo od mikroba (Buzzini et al., 2005; Vahdatzadeh et al., 2018). Neki autori su gajili micelijum tartufa i dodavali aminokiseline (leucin, izoleucin, fenilalanin i metionin) i dokazali da je došlo do sinteze isparljivih sastojaka tartufa Erlihovim putem (Liu et al., 2013; Splivallo i Maier 2015; Xiao et al., 2015). U tabeli 2 prikazane su aminokiseline od kojih Erlihovim putem nastaju odgovarajući aldehidi odnosno alkoholi.

Tabela 2. Produkti metabolizma aminokiselina Erlihovim putem

Aminokiseline	Produkti metabolizma
Leucin	3-metil-butanal i 3-metil-butan-1-ol
Izoleucin	2- metil-butanal i 2 metil-butan-1-ol
Fenilalanin	2-fenil-acet-aldehid, 2-fenil-etan-1-ol i benzaldehid
Metionin	3-metil-sulfanil-propanal, di-metil-disulfid(DMDS),di-metil-trisulfid (DMTS)

Razgradnjom metionina, nastaje metantiol, prekursor za jedinjenja sumpora, karakteristična za tartufe. Razgradnja metionina prikazana je na slici 9.

Neki autori su dokazali da kvasci, izolovani iz plodonosnih tela tartufa, proizvode isparljiva sumporna jedinjenja (DMS, DMDS, DMTS) (Buzzini et al., 2005). Isto tako, postoje dokazi da DMS i neka ciklična sumporna jedinjenja, u plodonosnim telima tartufa mogu da stvaraju i neke bakterije (Splivallo et al., 2015).



Slika 9. Metabolizam l-metionina (Martin et al., 2010.)

U ponovljenim ciklusima zamrzavanja i odmarzavanja *Tuber melanosporum*, Xiao i sar. (2015) su dokazali da dolazi do promena u sastavu sumpornih jedinjenja tartufa.

Isparljiva sumporna jedinjenja glavne su mirisne note tartufa, a imaju mali prag osetljivosti. Čulo mirisa kod čoveka, osetljivije je od aparata za ispitivanje mirisa-elektronski nos (Tabela 1).

2.6.2. Alkoholi, estri, aldehidi i ketoni

Jedna od pretpostavki je da alkoholi, aldehidi, ketoni i estri u okviru isparljivih jedinjenja tartufa, nastaju u procesu katabolizma aminokiselina i masnih kiselina (Hazelwood et al., 2008).

Iz ove grupe jedinjenja, 3-metil-butanal, oktan-3-on, 1-okten-3-ol, 3-metil-1-butanol, heksanal i acetaldehid su zastupljeni u kod većine vrsta tartufa. Jedinjenja oktan-3-on, 1-okten-3-ol sintetišu se u plodonosnom telu tartufa, a 3-metil-butanal, 3-metil-1-butanol, acetaldehid i heksanal mogu biti produkti metabolizama nekih bakterija (Combet et al., 2006).

Manje zastupljeni alkoholi, aldehidi, ketoni i estri, ne tako važni za aromu tartufa, mogu nastati u procesu metabolizma filamentoznih gljiva, kvasaca ili bakterija ili su specifične za polnu fazu plodonosnih tela tartufa (Vahdatzadeh et al., 2018). Cvetne arome pripisuju se 2-acetaldehidu i 2-

fenil-etanolu. Aromatična jedinjenja karakterističnog mirisa, koja su sastavni deo isparljivih jedinjenja tartufa, npr. 2-fenil-etanol, koji podseća na miris ruže i benzaldehid koji ima miris gorkog badema, mogu biti proizvod katabolizma aminokiselina (fenilalanina) (Hazelwood et al., 2008), dok druga jedinjenja mogu biti mešovitog porekla, 2-metoksi-4-metilfenol kao proizvod metabolizma γ -*Proteobacteria* i *Bacillus* spp.

Brojni mikroorganizmi mogu da sintetišu buternu kiselinu (mikrobiota plodonosnog tela tartufa može proizvoditi ovu kiselinu), a 4-hidroksi-2,5-dimetil-furan-3-on može da se sintetiše samo tokom seksualne faze tartufa (Culleré et al., 2010), što je još uvek nedovoljno ispitano.

U svežim uzorcima tartufa, 1-okten-3-ol je važno isparljivo jedinjenje, zajedno sa manjim količinama alkohola, aldehida i 2- i 3-metil-tiofena, kao i jedinjenja sumpora. Oslobođanje (*E*)-2-pentenala je primer razgradnje na niskim temperaturama, pri smrzavanju, dok se *bis*-3-metil-butildisulfid, 2-metil-4,5-dihidro-tiofen i 3-metil-4,5-dihidro-tiofen razvijaju na sobnoj temperaturi. Relevantna promena aroma tartufa je primećena posle 5 dana od berbe, kada dolazi do fermentacije unutar tartufa (Falasconi, 2004), pri čemu dolazi do povećanja sadržaja jedinjenja: sirćetne kiseline, etanola, 2-metil-1-butanola, 2-metil-1-propanola. Jedinjenja nastala fermentacijom unutar tartufa smatraju se markerima degradacije proizvoda (Falasconi, 2004).

Biološko sazrevanje tartufa i formiranje plodonosnog tela tartufa, počinje pigmentacijom spora i povećanjem sadržaja melanina što utiče na tamnu boju gleba (Harki et al., 2006). Neki autori smatraju da se u zavisnosti od međusobnih interakcija bakterija i kvasaca, stvaraju i sazrevaju askokarpi (Antony-Babu et al., 2014), sa aromatičnim isparljivim jedinjenjima, koja su takođe delom poreklom od međusobnih interakcija u mikrobioti tartufa (Splivallo et al., 2015; Splivallo i Ebeler 2015; Vahdatzadeh et al., 2015). Promene u hemijskom sastavu tartufa tokom sazrevanja su merljive, ali još uvek nije razjašnjeno koliko na to utiču biotički, a koliko abiotički mehanizmi i procesi unutar i izvan mikrobioma tartufa (Buntgen et al., 2017). Istraživanjem sazrevanja tartufa *T. aestivum*, u Mađarskoj i Švajcarskoj, utvrđeno je da ne postoji jasno definisan optimalan period-sezona za rast, razvoj i sazrevanje primordija, već se svi procesi paralelno i neprestano odvijaju (Buntgen et al., 2017). Isto tako, tvrdnje da klimatski uslovi, zemljište i njegova struktura kao i mikorizna zajednica, bitno utiču na period sazrevanja tartufa, ali još uvek nisu razjašnjene činjenice kako abiotički faktori utiču na veličinu, oblik, teksturu peridijuma i zrelost tartufa. Pretpostavke da je zrelost povezana sa veličinom plodonosnog tela (Stobbe et al., 2012, 2013), na primeru *T. aestivum* ne važi, jer su pronađeni i zreli tartufi raličitih veličina (Buntgen et al., 2017). Životni ciklus i plodonošenje *T. aestivum*, razlikuje se od drugih vrsta tartufa po tome što duže traje (Callot, 1999; Stobbe et al., 2012).

Veza između formiranja arome i biološkog procesa sazrevanja tartufa, pitanje je kojim se bave mnogi istraživači. Kod nekih tartufa je sazrevanje važan faktor u formiranju aroma, jer se smatra da zreli tartuf *T. borchii*, u fazi raspršivanja spora, oslobađa arome koje životinje tragači osećaju (Zeppa et al., 2004), dok kod *T. aestivum* to nije presudno (Mello et al., 2002; Splivallo et al., 2012), već se za formiranje arome ovog tartufa, vezuje uloga mikrobiote askokarpa (Splivallo et al., 2015; Splivallo i Ebeler 2015; Vahdatzadeh et al., 2015), sa još nekim faktorima koji paralelno utiču na razvoj kvaliteta.

Struktura aromatičnih jedinjenja vezana je za fazu razvoja tartufa, u fazi micelijarnog rasta manji je broj isparljivih jedinjenja, a najviše ih ima u fazi zrenja (Splivallo et al., 2007; Tirillini et al., 2000), što može biti posledica mikrobioma tartufa, jer se stvaranje nekih jedinjenja vezuje za metaboličke puteve pojedinih mikroorganizama (bakterija i kvasaca) (Vahdatzadeh et al., 2015). Tako na primer, jedinjenje koje je detektovano u zreлом plodonosnom telu *T. borchii*, 3-metil-4,5-(2 H)-tiofen, nije pronađeno u drugim životnim ciklusima tartufa (Splivallo et al., 2015).

Osim što postoje razlike u sastavu aromatičnih jedinjenja između vrsta, postoje i razlike unutar vrste (primer kod *T. aestivum*, sakupljan na razmaku od nekoliko centimetara udaljenosti) (Splivallo et al., 2012; Molinier et al., 2015), što se pripisuje i genetskim razlikama. Učešće genetike u poboljšanju arome i ukusa prehrambenih proizvoda sa tartufima, odabirom vrsta koje tome doprinose, pokazalo se kao veoma značajno (Smit et al., 2005; Tanous et al., 2002; Vilela-Moura et al., 2008). Genetska razlika među sojevima bitno utiče na sadržaj i variranja u sadržaju isparljivih

jedinjenja tartufa (Molinier et al., 2015; Splivallo et al. 2012). U eksperimentu čiji je jedan od ciljeva bilo dokazivanje postojanja Erlichov-og puta i njegove uloge u sintezi isparljivih jedinjenja tartufa *T. borchii* (Vahdatzadeh i Splivallo 2018), dokazan je uticaj genetike na 29 isparljivih sastojaka askenskih kultura micelijuma tartufa, naročito na produkte Erlichov-og puta. Kod plodonosnih tela tartufa, sa izraženim prisustvom bakterija i kvasaca, postoji mogućnost da oni sintetišu isparljiva jedinjenja van Erlich-ovog puta (Vahdatzadeh et al., 2015).

Erlihov put je proučavan kod kvasca *Sacharomyces cerevisiae*, gde se proces razgradnje aminokiselina deaminacijom u α -keto kiselinu koja dekarboksilacijom prelazi u aldehid, a zatim oksidacijom u alkohol ili redukcijom u kiselinu (Hazelwood et al., 2008). Takođe je utvrđeno da kvasci, izolovani iz plodonosnih tela tartufa proizvode neka jedinjenja kao što su 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol (Buzzini et. al., 2005).

Genetska istraživanja plodova različitih vrsta tartufa (*T. magnatum* i *T. melanosporum*), pokazala su da svi oni sadrže gene koji kodiraju enzime važne za razgradnju lignoceluloze, metabolizam isparljivih organskih materija, koji predstavljaju procese od izuzetnog značaja za funkcionisanje ektomikorizne zajednice. Poređenjem razvojnih puteva ektomikorizne zajednice i plodova *T. magnatum* i *T. melanosporum* vrsta tartufa, utvrđeno je da razlika u ekspresiji genetskog materijala ispitivane vrste tartufa utiče na stvaranje isparljivih jedinjenja sa karakterističnim, izraženim mirisom tipičnim za svaku vrstu tartufa. Veliko interesovanje za veštačko uspostavljanje mikorizne zajednice tartufa, predstavlja izazov u oblasti istraživanja uloge genomskih resursa, evoluciji i ekologiji vekovima visoko cenjenih gljiva (Murat et al., 2018).

U budućnosti, sa aspekta prehrambene industrije, selekcionisanjem sojeva mikroorganizama radi poboljšanja senzornih i nutritivnih osobina (vina, mlečnih proizvoda), moglo bi se uticati na sastav aromatičnih materija gajenih tartufa (Smit et al., 2005; Vilela-Moura et al., 2008).

2.6.3. Medicinska svojstva tartufa

Osim zavidnog statusa u kulinarstvu, tartufi imaju i medicinska svojstva, a samim tim i zdravstvenu ulogu. Antioksidativna, antiinflamatorna, antimikrobna i afrodizijačka svojstva tartufa potvrđena su ispitivanjima *in vitro* i *in vivo* (Lee et al., 2020).

U nedavnim istraživanjima, navedeno je da se bioaktivna jedinjenja, koja postoje u tartufima, mogu koristiti kao potencijalna terapijska sredstva u nutraceutskim preparatima i dodacima bogatim antioksidantima (Ustin et al., 2018).

Međutim, istraživanja u pogledu hemijskih svojstava, vrlo su ograničena kod nekih vrsta tartufa što dalje upućuje na istraživanje bioaktivnosti tartufa. Proučavanjem hemijskog sastava tartufa dokazano je prisustvo velikog broja jedinjenja koja imaju pozitivan efekat na zdravlje ljudi (Dahham et al., 2016; Gajos, 2014). Poznato je da jedinjenja, kao što su polifenoli, askorbinska kiselina, flavonoidi, tanini, glikozidi, ergosterol, antocijani, imaju zdravstvene efekte (imunomodulirajuća, hepato-protektivna, antibakterijska, antifungalna, antioksidativna i antivirusna). Tartufi se osim kao hrana, koriste i u tradicionalnoj medicini (Dogan et al., 2007).

Ispitivanjem hemijskog sastava iračkih tartufa, dokazano je prisustvo 18 esencijalnih aminokiselina (glicin, alanin, fenilalanin, arginin, cistin, metionin, treonin, serin, lizin, leucin, tirozin, triptofan). Pored amino kiselina, utvrđeno je prisustvo zasićenih i nezasićenih masnih kiselina (stearinska, linoleinska, palmitoleinska) (Bokhary et al., 1989), kao i prisustvo mikro-elemenata N, P, K, Ca, Mg, Na, Fe, Mn, Cu i Zn (Al-Mahamdi 2011; Dundar et al., 2012). Neke vrste tartufa (*T. boudneri*) sadrže flavonoide i resveratrol (Akyuz et al., 2013), zbog čega im se pripisuju antioksidativna i antikancerogena svojstva (Dahham et al., 2016; Gajos, 2014). Antimikrobna i antimikotična svojstva acetonskih ekstrakta tartufa, dokazana su na vrstama *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes* i *Candida albicans* (Dogan et al., 2013; Paul i Roth, 2008). Tanini i glikozidi iz tartufa deluju inhibitorno na rast patogenih bakterija (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter* sp., *E. coli*), kao i na gljive (*Fusarium* sp., *Aspergillus* sp.) (Al-Mahamdi 2011; Villares et al., 2012). Osim nutritivne vrednosti, tartufi se mogu primenjivati i u lečenju nekih očnih infekcija (Al-Rahmah, 2014).

Neki pustinjski tartufi, *Terfezia arenaria* (iz Alžira i Sahare), proizvode bioaktivne supstance, polifenole i flavonoide, sa antimikrobnom aktivnošću (Harir et al., 2019). Ekstrakti *T. arenaria* u metanolu pokazali su antifungalne aktivnosti protiv *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. i *C. albicans*, dok ekstrakti ove gljive u di-hlormetanu, pored antifungalnih, pokazali su i antibakterijske aktivnosti (*Enterobacter faecalis*, *E. coli*, *S. aureus* i *P. aeruginosa*). Neggaz i sar. (2020) su pokazali da se ekstrakti pustinjskih tartufa mogu koristiti kao potencijalni insekticidni agens, sa ciljem poboljšanja kvaliteta i bezbednosti uskladištene hrane protiv štetnih insekata.

Istraživanja Janakat i Nassa (2010) su pokazala da vodeni ekstrakt tartufa *T. claverii*, poseduje antibakterijska svojstva, deluje pozitivno u slučajevima uree u krvi, holesterola (LDL, HDL, GOT, ALP) i triglicerida. Pokazalo se da je naročito efikasan u slučaju oboljenja nastala infekcijom *Streptococcus pneumonie*, kao i u lečenju nekih očnih bolesti (Owaid et al., 2018).

Medicinska svojstva jestivih gljiva (oko 700 vrsta), poznata su godinama unazad (Wasser, 2010). Lekovita svojstva gljiva, primena u mikoterapiji, počela je 1970-ih i do danas su mnoga istraživanja dokazala pozitivne efekte mikoterapije kod mnogih bolesti (lečenje degenerativnih bolesti, karcinoma) (Attia et al., 2018). Antioksidativna svojstava ekstrakata tartufa su ispitivana u prevenciji hroničnih bolesti, poput kardiovaskularnih poremećaja, karcinoma, dijabetesa, visokog krvnog pritiska i Alchajmerove i Parkinsonove bolesti (Cole et al., 2005; Riboli i Norat 2003). Više istraživanja treba usmeriti na prirodne proizvode ekstrahovane iz tartufa i njihov biološki uticaj protiv različitih bolesti i patogena.

2.7. TRETMANI ZA OČUVANJE AROMA TARTUFA

Glavni problem prilikom čuvanja tartufa je održavanje aromatičnih materija na duže vreme, kako bi se sačuvalo njihov kvalitet. Primena tartufa kao dodatak hrani, piću i drugim prehrambenim proizvodima poslednjih godina sve je veća, pa je pronalaženje tehnike koja bi omogućila očuvanje prirodne arome tartufa, a samim tim i mogućnost dobijanja prehrambenih proizvoda bez veštačkih aroma, još uvek je u fazi istraživanja. Veliki problem prilikom čuvanja tartufa je očuvanje sadržaja njihovih isparljivih jedinjenja koji tokom vremena i neadekvatnog čuvanja (oksidacijom i pod uticajem enzimskih reakcija), prelaze u druga, manje vredna ili čak štetna jedinjenja za kvalitet i kvantitet arome tartufa. Zato su tokom vremena istraživani postupci i tehnologije koji bi obezbedili očuvanje kvaliteta tartufa.

Tokom skladištenja tartufa, sadržaj karakterističnih aromatičnih materija svežeg tartufa (DMS, 2-butan-on, 2- i 3-metil-1-butanol, 2-feniletan-ol i dr.) se menja, a u prisustvu bakterija koje izazivaju kvarenje, dolazi do stvaranja jedinjenja koja negativno utiču na miris svežeg tartufa. Sa stanovišta zdravstveno bezbedne hrane, kao i očuvanja senzornih svojstava, važno je pronalaženje uspešnih metoda dezinfekcije i skladištenja tartufa, a u cilju produženja roka trajanja askokarpa, očuvanja željene arome i primene tartufa u hrani. Idealan tretman za dezinfekciju ne treba da stvara fizička oštećenja, kao ni da utiče na senzorna svojstva tartufa, ali treba da bude efikasan i jednostavan za upotrebu. Produženje roka trajanja svežih tartufa uz očuvanje senzornih karakteristika, obuhvata razne metode u kojima se koriste razne tehnologije skladištenja proizvoda.

Fizički tretmani

Tretman sterilizacije u autoklavu, kao tehnika očuvanja senzornih svojstava tartufa i kao način za dobijanje zdravstveno bezbednog proizvoda, nije dao rezultate u očuvanju isparljivih jedinjenja tartufa (Saltareli et al., 2008). Takođe, kao način skladištenja koji je podesan i za održavanje senzornih karakteristika tartufa, neki autori (Al-Ruquie, 2006; Mancareli et al., 1997; Nazaro et al., 2007; Reale et al., 2009), su upotrebili blanširanje i skladištenje na niskim temperaturama.

Hemijski tretmani

Seymour i sar. (2002) su uporedili efikasnost hlorne vode sa i bez primene ultrazvuka za pranje lišća salate kontaminirane *S. typhimurium* i konstatovali da ultrazvuk poboljšava efikasnost hlora za 1 logaritamsku jedinicu, a za *Enterobacteriaceae* 2 logaritamske jedinice. Antimikrobna aktivnost hlora znatno se smanjuje kada hlor dolazi u kontakt sa organskom materijom (Beuchat et al., 1998), a s obzirom da je u tartufima ovaj sadržaj vrlo visok, ova metoda nema primenu u dezinfekciji tartufa.

Slični rezultati su dobijeni kada su tartufi isprani vodonikperoksidom, sam ili u kombinaciji sa ultrazvukom. Kada je vodonikperoksid primenjen sa ultrazvukom, njegova efikasnost kod *Enterobacteriaceae* je od 0,7 do 1,7 log cfu/g. Pranje tartufa samo sa vodonikperoksidom (5% H₂O₂), nije postiglo značajno smanjenje bakterija, a takođe je bilo neefikasno u uklanjanju plesni (Sapers, 2005; Sapers i Simmons, 1998). H₂O₂ ima GRAS (Generally Recognized Safety) status u SAD-u, ali još nije odobren za upotrebu kao sredstvo za pranje svežih proizvoda. Delotvoran je protiv širokog spektra bakterija, kvasca i gljiva.

Chang i Schneider (2012) su istraživali upotrebu 70% etanola kao sredstva za dekontaminaciju tartufa, gde je postignuta redukcija broja *Pseudomonas* sp. za 3,1 logaritamske jedinice, *Enterobacteriaceae* za 5 logaritamskih jedinica i bakterija mlečne kiseline za 2 logaritamske jedinice, dok je populacija plesni i kvasca eliminisana. Kombinacija etanola sa ultrazvukom je poboljšala početne efekte dekontaminacije. Iako je upotreba etanola kao dezinficijensa češća u objektima, medicinskim ustanovama, istraživačkim ustanovama, njegova efikasnost je dokazana kod nekih svežih proizvoda (Feliciano et al., 1987; Margosan et al., 1997).

Tretmani niskim temperaturama

Hlađenje i zamrzavanje su uobičajene metode koje se koriste za čuvanje tartufa (Patel et al., 2012). Saltarelli et al. (2008) su utvrdili da hlađenje na 4°C najbolje čuva biohemijske i mikrobiološke karakteristike tartufa na kraći period. Cullere et al. (2013) su utvrdili 15 jedinjenja sa visokim aromatičnim potencijalom u tartufima. U istoj studiji, aroma smrznutih tartufa značajno se razlikovala od arome svežih tartufa. Metionin i neki fenoli su predloženi kao markeri vremena zamrzavanja, a 1-okten-3-on se pojavio kao opšti marker procesa zamrzavanja.

Neki autori su utvrdili da se liofilizacijom aromatični profil tartufa vrsta *T. melanosporum* i *T. indicum* uglavnom održava nakon tretmana, dok je aromatični profil *T. aestivum* značajno izmenjen (Palacios et al., 2014). Liofilizacijom *T. aestivum*, dolazi do gubitka DMS i 2-butanona, a u slučaju liofilizacije sa rehidratacijom tartufa, došlo je do promena u sastavu karakterističnih jedinjenja (2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol i DMS) (Mart et al., 2006; Palacios et al., 2012).

Kod *T. melanosporum* i *T. indicum*, ove promene nisu značajnije uticale na njihov aromatski profil (Villares et al., 2012). Takođe, ovi autori su utvrdili da se posle liofilizacije i rehidratacije, smanjuje učešće 2-butanola i 2-butanona na račun povećanja sadržaja 2-metilpropanala, 2-metilbutanala i smanjenja sadržaja 3-metilbutanala. Enzimske i oksidativne reakcije dovode do konverzije nezasićenih masnih kiselina u aromatična jedinjenja (Misharina et al., 2010) i smanjenja 1-okten-3-ona do 3-oktanona (Darriet et al., 2002).

Pakovanje u modifikovanoj atmosferi

Jedan od načina da se sačuvaju senzorne karakteristike tartufa je i tehnika pakovanja u modifikovanoj atmosferi (Palacios et al., 2011; Rivera et al., 2010). Ova tehnika doprinosi i ograničavanju gubitka težine, održavanju teksturalnih karakteristika tartufa i sprečava razvoj površinskog rasta micelija.

Neke studije su se bavile pakovanjem sa izmenjenom atmosferom (MAP) sa mikroperforiranim filmovima sa različitim sadržajem CO₂ i O₂ (Rivera et al., 2011). U MAP atmosferi sa visokim CO₂ i niskim sadržajem O₂ smanjuje se metabolizam polifenola, anaerobni putevi i biosinteza poliamina,

produžavajući rok trajanja tartufa (Hajjar et al., 2010). Vrste *T. aestivum* i *T. melanosporum* su dekontaminirane, upakovane odabranim tretmanom u MAP-a, mikroperforiranim filmom i čuvane na 4°C tokom 28 dana. Prilikom ovog tretmana broj mikroorganizama i senzorni kvalitet održavali su se tokom skladištenja, a rok trajanja obe vrste tartufa produžen je na 28 dana (Rivera et al., 2011). Ispitivanja kvaliteta i mikrobiološkog statusa svežih tartufa, upakovanih u 15% CO₂ / 7% O₂ na 4°C, su pokazala da se broj mikroorganizama *Pseudomonas* spp. i *Enterobacteriaceae* smanjuje, kao i gubitak težine, uz održavanje tipične tvrda teksture. Takođe, ustanovljeno je da se odlaže razvoj rasta micelija što omogućava produženje roka trajanja tartufa *T. melanosporum* i *T. aestivum* na 28 i 21 dan uz očuvanje adekvatne arome (Rivera et al., 2010).

Gama zračenje

Primena sofisticiranih tehnika, kao što je gama zračenje, je još jedna od mogućnosti održavanja senzornih svojstava tartufa (Nazzaro et al., 2007; Reale et al., 2009). Korišćenje gama zraka za povećanje roka trajanja i očuvanja senzornih svojstava tartufa zahteva da sveži tartufi budu dobro složeni, kao i da se primeni odgovarajuća doza zračenja, (1000 i 2500 Gi), kako bi se izbegle promene njihovih biohemijskih, strukturnih i tehnoloških osobina. Međutim, ako se primenjuje u neodgovarajućem režimu, zračenje može izazvati neželjene promene senzornih svojstava i hemijskog sastava, što rezultira slobodnim radikalima, čija reakcija sa proteinima, lipidima i polifenolima može povećati štetne efekte (Al Rawi i Aldin, 1979).

Tartufi nisu u stanju da dugo zadrže svoja senzorna i biohemijska svojstva u svežem stanju, pa je pronalazanje optimalnog načina njihovog skladištenja od velikog značaja. Shodno tome, koriste se različite metode kako bi se tartufima omogućilo da „dišu“, a da ne postanu previše mokri ili suvi. Primeri uključuju stavljanje u voštane papirne kese ili uranjanje u nekuvanom pirinču u teglama. Mikroporozne plastične kese, dizajnirane za dugoročno skladištenje povrća, takođe mogu biti funkcionalne u očuvanju tartufa.

2.8. PRIMENA TARTUFA U HRANI

Sa napretkom u prehrambenoj tehnologiji, očekuje se pronalazak inovativnijih načina za primenu tartufa u hrani, zadržavajući njihova biohemijska svojstva. Potencijalni terapijski efekti koji se odnose na tartufe mogu dodati vrednost hrani u kojima se dodaju, iako medicinska zajednica još uvek nije utvrdila i definisala potrebne količine za terapijske svrhe. Sasvim je jasno da dalja naučna ispitivanja moraju posvetiti veću pažnju tome kako bi se što bolje iskoristila utvrđena biohemijska i biološka svojstva tartufa a sa ciljem dobijanja prehrambenih proizvoda sa dodatom vrednošću (Üstun et al., 2020).

Ranije je utvrđeno da su tartufi bogati proteinima, vitaminima, esencijalnim aminokiselinama, masnim kiselinama, ugljenim hidratima, prehrambenim vlaknima i mineralima (Al-Mahamdi, 2011; Bokhary et al., 1989; Dundar et al., 2012). Danas je popularna hrana sa tartufima, kao što su testenine, pice, rižoto, omlet, ulje za salate, džemovi i keksi. Sveži crni i beli tartufi se isporučuju u sezoni ili se od tartufa prave proizvodi, kao začini jelima (crveno meso, testenine, pirinač, predjela) ili kao sosovi (sos od tartufa, senf, sos sa roštilja, itd.), paste i sokovi od tartufa. U mlečnoj industriji se koriste kao dodatak mlečnim proizvodima (puter, namaz od sira, sirevi Burrata, Boschetto al Tartufo, Sottocenere, Caciotta i Pecorino, itd.).

Pored toga, na tržištu su dostupne bombone sa tartufima, med i testenine, a u komercijalnoj preradi se može naći balzamiko sirće od tartufa, maslinovo ulje sa tartufima, votka, rakija sa tartufima, kao i konzervisani u salamuri i u konzervi (Anonymous, 2018d, 2018e).



Slika 10. Sir i bombone sa tartufima-Caciotta al Tartufo - Forever Cheese (files\link.svg)

Raznovrsna „ulja od tartufa“ koja se mogu naći u specijalizovanim prodavnicama, aromatizovana su sa jednom ili nekoliko veštačkih aroma, koje sadrže ključne komponente aromatičnih jedinjenja tartufa, ali ne i sa celim nizom aromatičnih jedinjenja koji se nalaze u svežim tartufima. Maslinovo ulje se često koristi sa svežim tartufima za trenutnu upotrebu, a u kulinarstvu se tartufi koriste zbog arome, koja se razlikuje po vrstama tartufa. Pridevi poput „pečurkast“, beli luk“, „sirast“, voćni“, se koriste pri opisivanju aromatičnih svojstava koja su karakteristična za tartufe (Díaz et al., 2003; Jović, 1991; Ong et al. 1998; Shimoda et al. 1996; Splivallo et al., 2007; Varlet et al., 2006). Praktično, tartufi jelu dodaju više mirisa nego ukusa, a zbog činjenice da se miris lako uništava kuvanjem, tartufi se često dodaju neposredno pre konzumiranja.

Neka aromatična jedinjenja tartufa „vezuju“ se za molekule masti, pa se zbog toga maslinovo ulje, puter, jaja, meso, sir i kajmak koriste za kombinovanje sa tartufima kako bi poboljšali ukus jelima od testenina i namazima. Sladoled sa ukusom tartufa iznenađujuće je ukusan za određene kategorije potrošača (Anonimous 2018c).

Osim u hrani, tartufi se mogu primeniti u proizvodnji parfema, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji (Hall et al., 2008; Anonimous, 2018c).

2.9. PROIZVODNJA I SVOJSTVA SIREVA HOLANDSKOG TIPRA

Sirevi holandskog tipa su veoma rasprostranjena grupa sirišnokoagulišućih sireva koji se proizvode širom sveta, a noviji podaci govore i o povećanju njihove proizvodnje i potrošnje.

Najpoznatiji predstavnici sireva holandskog tipa su gauda i edamski sir, koji se razlikuju u zahtevima za sadržaj masti u mleku pri čemu se za proizvodnju edamskog sira koristi delimično obrano mleko, a za gaudu punomasno mleko (Walstra et al., 1993; Codex Alimentarius, 2013). Prema regulativi u SAD, sir gauda mora da ima maksimalno 45% sadržaj vode i minimalno 46% masti u suvoj materiji.

Postupak proizvodnje sireva holandskog tipa karakteriše dodavanje mezofilnih bakterija mlečne kiseline kao starter kulture koje u sebi sadrže citrat pozitivne bakterije. Upravo metabolizmom citrata delovanjem ovih bakterija dolazi do formiranja CO₂ što dovodi do nastajanja nekoliko pravilnih šupljika veličine zrna pirinča do zrna graška koje su karakteristične za ovu grupu sireva. Druga karakteristična operacija tokom postupka proizvodnje je ispiranje koje se sprovodi tokom operacija obrade gruš, odlivanjem dela izdvojene surutke (30 – 40% od početne količine mleka) i dodavanjem iste ili manje količine vode. Na ovaj način, vrši se odstranjivanje laktoze koja predstavlja supstrat za delovanje bakterija mlečne kiseline i time se sprečava značajno opadanje pH vrednosti sira.

Zrenje sireva holandskog tipa može da traje od 1 do 20 meseci što značajno utiče na sastav i svojstva finalnog proizvoda (van den Berg et al., 2004; Mellgren, 2005; Jung et al., 2013). Primera radi zreli sirevi se odlikuju manjim sadržajem vode i većim sadržajem masti i soli, kao i većim

sadržajem organskih kiselina. Takođe, senzorna svojstva holandskih sireva velikim delom zavise od stepena zrelosti.

Zrenje holandskih sireva se odvija na temperaturi 10–18°C pri čemu se odvija čitav set biohemijskih promena, u prvom redu proteolitičke promene, a potom glikolitičke i lipolitičke promene. U promenama tokom zrenja nastaju brojna jedinjenja koja utiču na formiranje ukusa i mirisa ovih sireva.

Ispitivanjem komercijalnih sireva sa tržišta različitih zemalja Jo i sar. (2018) su identifikovali 93 aromatična jedinjenja koja mogu da imaju značaj za formiranje ukusa i mirisa gauda sira. Međutim, kao ključna aromatična isparljiva jedinjenja autori navode diacetil, 2- i 3-metilbutanal, 2-metilpropanal, metionin, etil butirac, sirćetna kiselina, buterna kiselina, homofuraneol, δ -deklalaktone i 2-izobutil-3-metoksipirazin. Aroma zrelih sireva nastaje kao posledica formiranja 2-metilpropanala, maslačne kiseline, homofuraneola, δ -deklalaktone i 2-izopropil-3-metoksipirazina.

Za aromu gauda sira značajne su organske kiseline. U gauda sirevima je kvantifikovano šest organskih kiselina od kojih je mlečna kiselina bila prisutna u najvećoj koncentraciji, a sve kiseline su se povećavale sa odmicanjem perioda zrenja (Califano i Bevilacqua 2000; Skeie et al., 2001). Sadržaj mlečne kiseline je posebno važan tokom ranih faza zrenja, a kasnije se ona transformiše u druga jedinjenja (McSweeney i Sousa, 2000). Primera radi oksidacijom mlečne kiseline aktivnošću nestarterskih bakterija može nastati ugljen dioksid i sirćetna kiselina koja takođe doprinosi aroma sireva (McSweeney i Sousa 2000; Singh et al., 2003).

Aromatična jedinjenja koja su detektovana u gauda sirevima različitog stepena zrelosti su obuhvatala 6 slobodnih masnih kiselina (FFA), 7 sumpornih jedinjenja, 20 aldehida, 10 estara, 9 azotnih jedinjenja, 3 laktona, 3 alkana, 11 alkohola, 13 ketona, 3 furanona i 5 nepoznatih jedinjenja (Jo et al., 2018). Ovi autori su prvi put identifikovali u ovoj vrsti sireva sledeća jedinjenja: diacetil, sirćetnu kiselinu, 2 metilbutanal i metional.

Metodom GC-MS identifikovano je 25 jedinjenja koja obuhvataju 4 slobodne masne kiseline, 4 sumporna jedinjenja, 6 aldehida, 3 estra, 1 pirazin, 1 lakton, 3 furana, diacetil, acetoin i 2-acetil-1-pirolin. Isparljiva jedinjenja sireva uključuju sirćetnu kiselinu, buternu kiselinu, heksansku kiselinu, dimetil sulfid, dimetil trisulfid, metionin, heksanal, heptanal, diacetil, etil butirac i 2- i 3-metilbutanal. Zreliji sirevi imaju veću koncentraciju 2- i 3-metilbutanala, 2-izobutil-3-metoksipirazina i homofuraneola a sirevi sa većim sadržajem masti imaju veće koncentracije δ -deklalaktone, furaneola, sotolona i homofuraneola. Ova jedinjenja se dobijaju razgradnjom peptida ili aminokiselina ili mlečne masti enzimima bakterija mlečne kiseline koje se razvijaju u siru (El Soda, 1993).

Koncentracija isparljivih jedinjenja značajna za aromu velikim delom nastaje i razgradnjom mlečne masti tokom zrenja sireva. Mlečna mast je veoma važna za karakterističan ukus sira jer iz nje raznim reakcijama kao što su hidroliza, oksidacija, i esterifikacija, nastaju slobodne masne kiseline, laktoni, estri i ketoni, koji doprinose ukusu sira (Alewijn et al., 2005; McSweeney i Sousa, 2000). Masne kiseline kraćeg lanca (C4 – C8), imaju važnu ulogu u formiranju ukusa sira, a i značajne su za nastajanje drugih aromatičnih jedinjenja kao što su laktoni, aldehidi i alkoholi (McSweeney i Sousa, 2000). Smatra se da buterna kiselina ima najveći uticaj na aromu zrelog gauda sira, a njeno povećanje tokom zrenja je posledica selektivne aktivnosti lipaza i preferencije za formiranje FFA kratkog lanca. Takođe, buternu kiselinu mogu da sintetišu i mikroorganizmi prisutni u siru (Alewijn et al., 2005; McSweeney i Sousa, 2000).

Za aromu holandskih sireva značajni su i aldehidi koji daju miris na travu i seno. Sadržaj heptanala, heksanala i oktanala je povećan kod zrelih sireva i onih sa većim sadržajem masti.

Laktoni nastaju neenzimatskom transesterifikacijom hidroksi masnih kiselina (Alewijn et al., 2007) i doprinose aromu sira. Alewijn i sar. (2005) su došli do zaključka da se tokom zrenja gauda značajno povećava sadržaj δ -dekalaktone i u manjem obimu sadržaj γ -laktona. Sadržaj δ -dekalaktone tokom zrenja zavisi od temperature zrenja i nestarterske mikrobiote (Alewijn et al., 2005).

Estri se uobičajeno nalaze u siru i formiraju se esterifikacijom FFA sa alkoholom (Alewijn et al., 2005; McSweeney i Sousa, 2000). Ova jedinjenja doprinose voćkastom ukusu i u gauda sirevima su

prisutni u najvećoj meri etil-butirat s obzirom na veliki sadržaj buterne kiseline koja je predominantna SMK. Takođe, ovi estri su u većoj meri zastupljeni kod sireva koji se proizvode od sirovog mleka verovatno kao posledica izraženije esterazne aktivnosti. Ipak, esteraze iz bakterija mlečne kiseline mogu doprineti formiranju estara koji daju doprinos aromi sira.

Uloga diacetila značajna je za formiranje ukusa holandskih sireva. Formira se u procesu metabolizma citrata, zajedno sa laktatom i acetoinom (McSweeny i Sousa, 2000). Doprinosi maslačnom ukusu mladih sireva, a prisutan je u niskim koncentracijama prvih 6 meseci zrenja (Drake et al., 2010; Urbach, 1997).

Aroma holandskih sireva u velikoj meri zavisi od stepena proteolize, posebno tokom katabolizma peptida i slobodnih aminokiselina, nakon čega nastaju brojna jedinjenja, prekursori za stvaranje isparljivih jedinjenja kao što su aldehidi, kiseline, alkoholi i sumporna jedinjenja.

Razgradnja aminokiselina u siru je povezana sa aktivnošću mikrobioloških enzima koje su uključene u reakcije deaminacije, transaminacije, dekarboksilacije (McSweeny i Sousa, 2000).

Isparljiva sumporna jedinjenja imaju značajan uticaj na ukus brojnih sireva, kao što su čedar, sirevi švajcarskog tipa i drugi (Marilley i Casei, 2004; McSweeny i Sousa, 2000). Jedinjenja sumpora, dimetil disulfid (DMDS), dimetil trisulfid (DMTS) i metional potiču od metionina koji je u visokim koncentracijama prisutan u kazeinu (McSweeny i Sousa, 2000). Metional nastaje razgradnjom metionina, dok dimetil sulfid nastaje kao proizvod metabolizma metionina, aktivnošću bakterija propionske kiseline, ali može nastati i direktno iz metantiola (McSweeny i Sousa, 2000).

Furanoni (furaneol, homofuraneol i sotolon) su značajni za aromu sira i njihov sadržaj se povećava tokom zrenja. Smatra se da povećanje furanona nastaje delovanjem određenih sojeva laktobacila i drugih nestarterskih bakterija (Milo i Reineccius, 1997). Ova jedinjenja doprinose formiranju slatke arome sira na karamel.

2.10. PROBIOTICI I PRIMENA U FUNKCIONALNOJ HRANI

Prema Organizaciji za hranu i poljoprivredu Ujedinjenih nacija (FAO) i Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO), (FAO/WHO, 2001; FAO/WHO, 2002) probiotici su definisani kao živi mikroorganizmi, uneti u organizam u odgovarajućim količinama, ostvaruju zdravstvenu korist. Ovu definiciju probiotika usvojilo je i Međunarodno naučno udruženje za probiotike i prebiotike (ISAPP) i koristi se u većini naučnih publikacija. Kao probiotske bakterije, najveću primenu ostvarile su vrste rodova *Lactobacillus* sp. i *Bifidobacterium* sp.

Poznato je da u ljudskom gastrointestinalnom traktu živi najmanje 10 puta više bakterija od broja ljudskih ćelija (NIH HMP Working group, 2009). Sastav crevne mikrobiote varira tokom detinjstva do punoletstva (Vieira et al., 2012.) i pored genetike, bitno utiče na naše zdravlje (Specter, 2012).

Iako otkriće antibiotika, poput penicilina i streptomocina koji su spasili milione života, je predstavljalo važno otkriće u 20-om veku, upotreba antibiotika ima za posledicu uništavanje komensalne mikrobiote ljudi (Blaser, 2011). Crevna mikrobiota može biti modulirana dodavanjem probiotika tokom akutnog poremećaja osetljive ravnoteže crevne mikrobiote.

Selekciju probiotskih vrsta uslovljava čitav niz bioloških i tehnoloških faktora. Da bi se mogli deklarirati kao probiotici, Salminen i sar. (1998) su predložili sledeće kriterijume:

- soj treba da se deponuje u međunarodno priznatoj kolekciji
- probiotik mora biti identifikovan do nivoa rod, vrsta i soj
- GRAS status -Generally recognized as safe
- stabilnost sojeva (aktivnost i vijabilnost u proizvodu)
- rezistencija na nizak pH, žučne soli, preživljavanje in vivo
- da zadovolji funkcionalne i fiziološke aspekte (sposobnost adhezije i virulencije, da ispoljava antimikrobnu aktivnost prema patogenim mikroorganizmima, imunomodulacija, selektivna stimulacija poželjnih bakterija i supresija nepoželjnih i ispitivanje negativnih efekata).

Zbog složenosti ovih zahteva, koriste se mešovite kulture probiotskih, ali i neprobiotskih bakterija, koje svojim zajedničkim radom ispunjavaju kriterijume. Kao primer može se uzeti ABT-2 kultura, u čijem se sastavu nalaze probiotski sojevi *Lactobacillus acidophilus* i *Bifidobacterium* sp. koje

zadovoljavaju funkcionalne zahteve, kao i vrsta *Streptococcus thermophilus* koja, u najvećoj meri zadovoljava tehnološke zahteve.

Jedna od prvih bakterija koja kolonizuje creva novorođenčadi nakon rođenja su vrste roda *Bifidobacterium* (Walker, 2013). Kao probiotici, koriste se vrste *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *animalis*, *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*. Kada ih koriste u proizvodima, kompanije često za neke od ovih bifidobakterija, koriste naučno zvučna, komercijalna imena.

Neki laktobacili se koriste u proizvodnji jogurta, sira, kiselog kupusa, vina i drugih fermentisanih proizvoda (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus fermentum*) (Bauer et al., 2010; De Vuyst et al., 2014; Siragusa et al., 2013). Osim zdravstvenih efekata, njihova uloga je i fermentacija šećera i stvaranje kisele sredine, što sprečava kvarenje hrane mikroorganizmima.

S obzirom na rasprostranjenost bakterija mlečne kiseline (gastrointestinalni trakt, fermentisani biljni proizvodi, tradicionalni mlečni proizvodi, itd.), istraživanjima je ustanovljeno da brojni izolati iz različitih sredina mogu da poseduju probiotske karakteristike. Autohtone bakterije mlečne kiseline izolovane iz tradicionalnih sireva predstavljaju veliki potencijal za selekciju novih potencijalnih probiotskih sojeva, pa se poslednjih godina, osim selekcije bakterija mlečne kiseline u cilju primene kao starter kultura, kao jedan od osnovnih kriterijuma za selekciju, primenjuje ispitivanje potencijalnih probiotskih karakteristika (Hermanns et al., 2014; Milesi et al., 2009; Radulović et al., 2010; Zago et al., 2011).

Dobijanje željenih svojstava proizvoda, postiže se uključivanjem odabranih autohtonih probiotskih izolata u fermentacione procese, gde se brzo i lako razmnožavaju. U cilju njihovog koncentrovanja i primene u nefermentacionim postupcima proizvodnje hrane, koriste se različite tehnike mikroinkapsulacije probiotskih kultura (Radulović et al., 2011; Petrović et al., 2012).

2.10.1. Zdravstveni efekti probiotskih bakterija

Iako su koristi od konzumiranja fermentisane hrane čovečanstvu poznate vekovima, mnogo pre otkrivanja mikroorganizama, primenu mikroorganizama u cilju postizanja pozitivnih zdravstvenih koristi započeo je pre više od jednog veka Metchnikoff kada je tvrdio da se zdravlje može poboljšati bakterijama koje se nalaze u jogurtu, (Mackowiak, 2013). Tokom poslednje dve decenije, objavljeno je preko 6000 publikacija o probioticima, pri čemu je preko 60% radova objavljeno u poslednjih 5 godina, od kojih su neki u vrhunskim naučnim časopisima. Najčešće se kao probiotici primenjuju BMK i bifidobakterije, mada se koriste i druge bakterije i određeni kvasci (Didari et al., 2014).

Zdravstveni efekti probiotika su merljivi i mogu se dokazati sličnim vrstama studija koje se sprovode kod ispitivanja lekova (dvostruko slepa, randomizirana, placebo kontrolisana ispitivanja na ljudima) (Fijan, 2014). Uglavnom se sprovode *in vivo* studije (FAO/WHO 2002). *In vitro* studije pružaju prvi korak u proceni probiotika za upotrebu u hrani i prate kontrolisana ispitivanja na ljudima (Conway et al., 1987).

Dokazano je da *Lb.acidophilus*, *Lb.casei*, *Lb.rhamnosus* i sojevi iz roda *Bifidobacterium*, koji preživljavaju nepovoljne uslove u intestinalnom traktu (Fijan, 2014), doprinose regulaciji mikrobiote navedene sredine. Kompeticija sa hranljivim sastojcima i verovatno, produkcija antimikrobnih supstanci, dovodi do porasta poželjnih mikroorganizama. Probiotske bakterije unete u organizam imaju niz terapijskih efekata i koriste se:

1. U prevenciji i terapiji dijareja: akutna dijareja, rota virusi, putnička diareja, profilaksa i terapija dijareje izazvane antibiotskom terapijom, Kronova bolest i iritabilni kolon (Hempel et al., 2012; McFarland 2007). Probiotske bakterije unete u obliku kiselo-mlečnih proizvoda kolonizuju intestinalni trakt i deluju kao prirodna barijera za infektivne bakterije. Uzročnici dijareje su uglavnom patogeni kao što su *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* i *Shigella* vrste. Probiotski

mikroorganizmi koji se najčešće koriste protiv ovih patogena su: *Lb. acidophilus*, *Lb. rhamnosus GG*, *Saccharomyces boulardi* i *B. bifidum* (McFarland, 2007). Takođe, dokazano je da soj *B. lactis* BB 12, *Lb. rhamnosus*, *Lb. casei* i *Lb. reuteri*, mogu pozitivno delovati u prevenciji i tretmanu dijareja izazvanih terapijom antibioticima (Servin, 2004). Infektivne dijareje su jedan od najznačajnijih svetskih problema u zdravstvu, a objašnjenje antimikrobne aktivnosti probiotika može biti produkcija mlečne i sirćetne kiseline, što dovodi do sniženja pH vrednosti i inhibicije patogena (Servin, 2004).

2. U prevenciji i lečenju kandidijaze-peroralno uneti antibiotici uništavaju korisnu crevnu floru i zbog toga se u prevenciji nastanka oralne ili intestinalne kandidijaze konzumiraju probiotici istovremeno ili posle antibiotika. Određeni sojevi laktobacila efikasni su u sprečavanju dijareje povezane sa antibioticima (Johnston et al., 2011; Hempel et al., 2012).

3. Hipoholesterolemijski efekat bakterije koje ulaze u sastav starter kultura u toku fermentacije u mleku stvaraju specifične metabolite koji su sposobni da inhibiraju sintezu holesterola u organizmu (Ruiz, 2013). Neki sojevi *Lb. acidophilus* i neke vrste roda *Bifidobacterium* mogu sniziti nivo holesterola.

4. Antikancerogenu aktivnost- probiotski soj *Escherichia coli Nissle 1917 (EcN)*, zajedno sa drugim probioticima, dokazano leči opstipaciju (Chmielewska i Szajewska 2010) i upalnu bolest creva (Behnsen, et al., 2013). Ovaj soj takođe može da ublaži gastrointestinalni poremećaj, ulcerozni kolitis, Crohnovu bolest (Xia et al., 2013), čak i rak debelog creva (Behnsen et al., 2013). Takođe, kod bolesti creva i umerenih simptoma ulceroznog kolitisa, koristi se probiotik *Saccharomyces boulardii* (Guslandi et al., 2000, 2003), kao i kod infekcija pseudomembranoznog kolitisa izazvana *Clostridium difficile* zajedno sa standardnim antibioticima (Fitzpatrick, 2013).

5. Poboljšanje digestije laktoze probiotske bakterije liziraju u crevima, produkuju enzime za razgradnju laktoze. Najbolji rezultati su dobijeni kod mlečnih proizvoda sa *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* i *Streptococcus thermophilus*, dok *Lb. rhamnosus* ne fermentiše laktozu (Ouweland et al., 2002).

6. Inhibicija *Helicobacter pylori* izazivača gastritisa, čira i kancera. Ova inhibicija se zasniva na smanjenju aktivnosti enzima ureaze neophodnog za održavanje u kiseloj sredini, kao što je želudac (Obradović et al., 2004). *Bacillus subtilis* kao probiotik predložen je u lečenju dijareje i iskorenjivanja *Helicobacter pylori* kod ljudi (Tompkins et al., 2010).

Buduća istraživanja probiotskih bakterija trebalo bi da ustanove mehanizme delovanja na definisane zdravstvene efekte kroz kliničke studije. Takođe, trebalo bi ispitati uticaj određenih prehrambenih proizvoda sa dodatkom probiotskih bakterija na zdravstvene efekte domaćina.

2.10.2. Funkcionalna hrana sa probioticima

Poslednjih godina, proizvodnja funkcionalne hrane predstavlja veliki izazov za prehrambenu industriju. Problemi nepravilne ishrane imaju negativne posledice na ljudsko zdravlje (epidemija dijabetesa, gojaznosti, problema sa krvnim pritiskom, bolesti srca i krvnih sudova, raznih tumora, itd). Upravo to su razlozi da se problemom ishrane bavi veliki broj istraživača, a prehrambena industrija, iz istih razloga, usmerava na proizvodnju različite funkcionalne hrane. Pojam funkcionalne hrane, koja po definiciji predstavlja hranu koja pored svog osnovnog, nutritivnog sadržaja, može biti obogaćena dodatnim komponentama, kao što su probiotici. Proizvodnja različite funkcionalne hrane sa probiotskim bakterijama, koja ostvaruje mnogobrojne pozitivne efekte na ljudsko zdravlje, u poslednje vreme naročito dobija na značaju.

Dodatakom probiotika u mlečne proizvode, poput sira, sladoleda, mlečnih poslastica i jogurta, kao i u proizvode, poput sokova, žitarica i čokolade, dobijaju se proizvodi poznati kao „funkcionalna hrana“, hrana sa brojnim zdravstvenim prednostima. Poslednjih godina, beleži se porast prodaje različitih probiotskih proizvoda od 7 do 32% (Granato et al., 2020).

2.10.3. Primena probiotskih bakterija u proizvodima od mleka

Prema najnovijim istraživanjima, tržište probiotskih proizvoda predstavlja najinteresantnije tržište. Postoje pretpostavke da će broj probiotskih proizvoda rasti 6,8% godišnje, tokom narednih 5 godina (<http://www.nutraingredients.com>).

Jogurt, jedan od najstarijih fermentisanih proizvoda od mleka, u poslednjih 20-tak godina, predstavlja najčešće korišćenu namirnicu za primenu probiotika kao što su *Lb. acidophilus* i *B. bifidum*, koje utiču na poboljšanje nutritivnih i fizioloških osobina jogurta (Lourens-Hattingh i Viljoen, 2001).

Pored jogurta, sirevi kao mlečni proizvodi, takođe zauzimaju bitno mesto u proizvodnji hrane sa dodatkom probiotskih bakterija. Kada su sirevi u pitanju, probiotici pokazuju aktivan metabolizam, čija stabilnost zavisi od fizičkih svojstava osnovnog proizvoda i osobina probiotskog soja. Čini se da mikroinkapsulacija nudi dobru tehnološku alternativu za upotrebu u sirarskoj industriji (Borgogna et al., 2010). Pored matrice, na održivost probiotika i rok trajanja, procesni faktori značajno utiču na održivost probiotika u siru kao i vrsta i koncentracija inokulisanog probiotika. Takođe, dodatak arome, moguće prisustvo bakteriocina ili drugih antimikrobnih sredstava, pH, redoks potencijal, temperatura inkubacije i skladištenja, so i aktivnost vode utiču na sposobnost preživljavanja određenog probiotskog soja (Castro, et al., 2015).

Sir Mocarela je istaknuti član sireva parenog testa, poreklom iz Italije, napravljen hemijskim ili biološkim zakišeljavanjem upotrebom komercijalnih starter kultura, kao što je *Streptococcus thermophilus* (Minervini et al., 2012). Mocarela se odlikuje izuzetnom rastegljivošću i topivošću, koja nastaje kao rezultat tehnološkog postupka proizvodnje ove vrste sira. Mukhtar i sar. su 2020-e otkrili da je najefikasniji soj za proizvodnju probiotskog sira Mocarela, *Lb. acidophilus*, koji pozitivno utiče na senzorne osobine. Sir sa probiotikom u poređenju sa sirom bez dodavanja probiotika, ima bolje senzorne karakteristike i duži rok trajanja, što ga čini dobrim sistemom za iskorišćavanje probiotika.

Neki sojevi BMK i bifidobakterija proizvode CLA (konjugovanu linolnu kiselinu) u mlečnim proizvodima (Sosa-Castaneda et al., 2015; Yang et al., 2015), kao što je slučaj sa *L. lactis* LMG, *Lb. rhamnosus* C14, *Lb. plantarum*-2, *B. animalis* BB12, *B. bifidum* CRL1399, *Lb. casei* CRL431 i *Lb. acidophilus* Lac1 (Florence et al., 2009; Van Nieuvenhove et al., 2007a).

Mohan i sar. (2013) su kao probiotsku kulturu u Čedar siru, koristili *L. lactis* CI4b, koja utiče na poboljšanje nivoa ukupne CLA u siru.

Mnoge vrste sireva proizvedene su sa probiotskim bakterijama, kao što su sir Kotidž (Suarez-Solis et al., 2002), Čedar (Gardiner et al., 1998), Minas sir (Buriti et al., 2005), Gauda sir (Gomes et al., 1995), sveži sirevi od UF obranog mleka (Roy et al., 1997).

U našoj zemlji ima literaturnih podataka o sirevima sa probioticima, ali je proizvodnja ovakvih sireva zanemarljiva. Tucović i sar. su 2004. godine proizveli edamski sir prema standardnoj tehnologiji, direktnom inokulacijom probiotskih kultura *B. lactis* BB-12 i *L. acidophilus*, La-5 u količini $\sim 10^{10}$ cfu/ml. Isti autori su ustanovili da je u toku prvih 120 dana zrenja, pri čemu su pratili promene u toku 180 dana, stepen preživljavanja ≥ 6 log cfu/g, čime su u velikoj meri ispunjeni kriterijumi o minimalnoj koncentraciji probiotika. Radulović i sar. (2017) su ispitali kvalitet kozjeg mekog sira sa dodatkom komercijalnih i autohtonih potencijalnih probiotika u slobodnom i sprej sušenom obliku i pokazali da je vijabilnost sojeva bila $\sim 10^{10}$ cfu/ml, a senzorna ocena bila veća od ocene kontrolnih varijanti sireva. Komercijalni i autohtoni probiotici primenjeni u proizvodnji sireva od UF mleka, takođe su pokazali veoma visoku vijabilnost ($\sim 10^9$ cfu/ml) tokom 56 dana skladištenja, a sirevi su ocenjeni odličnim kvalitetom (Miočinović et al., 2014).

3. NAUČNI CILJ ISTRAŽIVANJA

Izučavanje mikroflore tartufa, sadržaja aromatičnih materija, pronalaženje načina očuvanja arome i primena tartufa u prehrambenoj industriji predstavlja veliki izazov poslednjih godina. Kako se tartufi sakupljaju sezonski, problem skladištenja i adekvatnog čuvanja, odnosno zadržavanje senzornih osobina tartufa, veoma je zahtevan zadatak. Promene sastava aromatičnih materija tokom skladištenja tartufa određuju njegov kvalitet i trajnost. U tu svrhu, potrebno je očuvati aromatična jedinjenja koja utiču na kvalitet tartufa, a samim tim i proizvoda dobijenih sa dodatkom tartufa. Međutim, kako problem očuvanja prirodne arome tartufa još uvek nije rešen, komercijalna proizvodnja hrane sa tartufima se bazira na dodavanju veštačkih aroma. Kada je u pitanju dobijanje sireva sa tartufima, važan uticaj na aromu sira ima i starter kultura, tako da sastav i interakcije aromatičnih materija nastalih pod dejstvom startera i dodatih tartufa mogu doprineti formiranju specifičnih senzornih karakteristika sira.

Stoga, cilj ovog rada je pronalaženje načina za očuvanje prirodne arome tartufa, njegove inkorporacije u proizvodnju sira, što omogućava proizvodnju sira sa tartufima tokom cele godine, bez dodatka veštačkih aroma.

Zbog svega toga, postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

- Izolacija, biohemijska i molekularna identifikacija izolata mikroorganizama iz tartufa
- Ispitivanje uticaja različitih režima zamrzavanja (-20°C i -80°C sa i bez prethodnog zamrzavanja u tečnom azotu) i liofilizacije tartufa, na sastav aromatičnih materija
- Ispitivanje uticaja različitih načina dekontaminacije svežih i zamrznutih tartufa, za bezbednu primenu u proizvodnji sira, i na sastav aromatičnih materija
- Primena svežih i zamrznutih tartufa u proizvodnji sira, sa dodatkom autohtonog potencijalnog probiotika *Lactobacillus plantarum* 564 i utvrđivanje hemijskih, mikrobioloških i senzornih svojstava dobijenog proizvoda

4. MATERIJAL I METODE

U istraživanju su korišćena sporošćena tela letnjeg crnog tartufa (*Tuber aestivum*), koji potiču iz Bojćinske šume (Srem) i sakupljana su u letnjem periodu 2016-2019. godine. Tartufe je pronalazio obučeni pas Bak, rase Lagotto Romagnolo, vlasnika Radulović Veselina, sa brojem dozvole za sakupljanje tartufa 353-01-1807/2/2019-04.



Slika 11. *Tuber aestivum*

4.1. MIKOLOŠKA IDENTIFIKACIJA TARTUFA

Mikološka identifikacija tartufa koji su korišćeni u eksperimentalnom delu izvršena je po ključu Fascinated by Fungi, Pat O'Reilly (2016) i British Mycological Society's GB Checklist of Fungi and (for basidiomycetes) on Kew's Checklist of the British & Irish Basidiomycota CB Checklist of Fungi i Checklist of the British i Irish Basidiomycota (2005).

4.2. MEDIJUMI ZA IZOLACIJU MIKROORGANIZAMA

Primenom selektivnih podloga izvršena je izolacija različitih mikroorganizama sa površine i iz unutrašnjosti askokarpa tartufa. Zatim je izvršena selekcija na osnovu makroskopskih i mikroskopskih sličnosti i razlika. Za izolaciju i kultivisanje mikroorganizama, korišćene su podloge:

1. TSA (Torlak), za bakterije,
2. Cetrimide (CN) agar (Biolab, United Kingdom), za izolaciju *Pseudomonas*
3. Fjodorov agar (Anderson, 1958), za izolaciju azotobakterija
4. M17 arap (Biolab, United Kingdom), za izolaciju laktokoka
5. MRS arap (Merck, Germany), za izolaciju laktobacila
6. Skrobno-amonijačni agar/1000ml: Skrob-10g, amonijum sulfat-1g, $MgSO_4 \times 7H_2O$, 1g NaCl 1g, KNO_3 1g, $CaCO_3$ 3g, agar 20g, za izolaciju aktinomiceta
7. Roze Bengal, DRBC agar, (LAB217, United Kingdom), za izolaciju filamentoznih gljiva
8. Sladni agar, (Torlak),
9. Fiziološki rastvor (8,6 g NaCl u 1000ml destilovane vode)
10. Krompir-dekstrozni agar (Merck, Nemačka)

4.3. IZOLACIJA BAKTERIJA, FILAMENTOZNIH GLJIVA I KVASACA

Uzorci plodonosnih tela tartufa su dostavljeni u laboratoriju gde su korišćeni za izolaciju mikroorganizama. Izolacija bakterija vršena je sa površine i iz unutrašnjosti askokarpa, a gljiva i aktinomiceta samo sa površine. Prilikom izolacije mikroorganizama sa površine i iz unutrašnjosti askokarpa, tartufi su oprani, a potom je iz unutrašnjosti askokarpa odstranjen površinski sloj askokarpa u sterilnim uslovima. Zatim su svi uzorci potopljeni u sterilan fiziološki rastvor, mešani na Vortex aparatu (Scientific Industries, SAD) u trajanju od 1 minut i metodom razređenja izolovani mikroorganizmi zasejavanjem na gore navedene selektivne podloge. Inkubacija je izvršena na optimalnim temperaturama za rast navedenih grupa mikroorganizama (za bakterije i kvasce 24 h, na 30°C, a za gljive i aktinomicete na 25°C, 120 h), dok je za gajenje laktobacila, primenjen Gas Pak sistem, za gajenje u anaerobnim uslovima.

Pojedinačne kolonije bakterija izrasle na selektivnim podlogama, presejane su na iste selektivne medijume, kako bi se dobile čiste kulture, koje su se potom čuvale u odgovarajućem bujonu sa 20% glicerola na -80°C.

Kod izolata gljiva praćena je brzina rasta, boja kolonije, promena boje podloge, konzistencija površine (rastrešena ili kompaktna), miris, karakteristike eksudata, osobine utonulih hifa (imaju li pregradice ili ne), stadijum u kome se formiraju plodonosni organi, osobine i raspored zrelih plodonosnih organa, boja veličina i oblik plodonosnih organa, struktura plodonosnih organa (raspored spora u njima) i potpuni opis spora.

Pojedinačne kolonije izraslih gljiva i kvasaca na selektivnim podlogama, presejane su na iste, selektivne medijume kako bi se dobile čiste kulture koje su čuvane na kosom agaru na 4°C.

4.4. PRELIMINARNA KARAKTERIZACIJA DOBIJENIH BAKTERIJSKIH IZOLATA

Preliminarna karakterizacija bakterijskih izolata izabranih iz svih uzoraka tartufa, vršena je najpre makroskopskim (boja kolonija, oblik), a onda mikroskopskim pregledom, bojenjem po Gramu, ispitivanjem preživljavanja na 80°C (prisustvo endospora), testom za oksidazu i katalaza testom (Knežević et al., 1999).

4.4.1. Katalaza test

Prisustvo enzima katalaze kod bakterijskih izolata vršeno je nanošenjem 3%-nog rasvora H₂O₂ na pločicu sa izraslom bakterijskom kolonijom. Kod katalaza pozitivnih izolata dolazi do izdvajanja CO₂ (pojave mehurića).

4.4.2. Oksidaza test

Prisustvo citohrom oksidaze kod izabranih bakterijskih izolata, ispitivano je nanošenjem bakterijske kulture sa čvrstog medijuma na oksidaza trake. Prisustvo citohrom oksidaze potvrđuje se pojavom plavo bojene reakcije nakon 10 sekundi.

4.4.3. Ispitivanje rasta bakterijskih izolata na medijumu sa malom količinom azota

Za vrste roda *Azotobacter*, ispitivana je sposobnost rasta u uslovima sa malom količinom dostupnog azota, gajenjem bakterijskih izolata na Fjodorovom medijumu koji sadrži malu količinu (NH₄)₂MoO₄ kao jedini izvor azota.

Petrijeve šolje sa Fjodorovim medijumom inokulisane su bakterijskom kulturom, (nanošenjem 0,1ml razređenja ukapavanjem, 50 kapi, na razlivenu podlogu) i inkubirane su pet dana na temperaturi od 30°C.

4.4.4. Ispitivanje rasta izolata aktinomiceta

Rast izolata aktinomiceta, praćen je na Petrijevim kutijama sa čvrstom podlogom skrobno amonijačnog agara. Petri kutije inokulisane bakterijskim kulturama aktinomiceta, inkubirane su desetak dana (od 5-10) na temperature od 30°C.

4.5. ODREĐIVANJE BIOHEMIJSKIH OSOBINA IZOLOVANIH BAKTERIJA I KVASACA - API TEST

U zavisnosti od grupe bakterija koja se ispituje, korišćeni su različiti API sistemi (API CH50 za bacile, API 20C AUX za kvasce, API 20 NE za *Pseudomonas*) vrste.

Na Petri kutiji sa odgovarajućom selektivnom podlogom, inkubirane su u toku 24 časa ispitivane kulture mikroorganizama. Posle inkubacije na optimalnim temperaturama, izrasle kolonije su sterilnom ezom prenete u 10 ml odgovarajućeg API medijuma odakle su mikropipetom zasejane u kupole API sistema. Zasejani stripovi, spakovani u plastičnim kutijama, inkubirani su na odgovarajućim temperaturama i očitani su nakon određenog vremena (24 časa za laktokoke, 24-48 časa za laktobacile i bacile, 72 časa za kvasce). Za očitavanje rezultata koristi se program API Lab plus softver.

4.6. IDENTIFIKACIJA BAKTERIJA I KVASACA MOLEKULARNIM METODAMA

4.6.1. Izolacija totalne DNK iz bakterijskih izolata

Sa površine i iz plodonosnog tela askokarpa tartufa izolovano je 35 bakterijska izolata (26 sa površine i 9 iz unutrašnjosti askokarpa). Izolati su prečišćeni i čuvani na -80°C u odgovarajućem bujonu sa 20% glicerolu. Bakterijski izolati su zasejani na hranljivi agar (Torlak, Srbija) i inkubirani na 30°C tokom 48h. Kulture su gajene u hranljivom bujonu (10 mL) na temeperaturi 30°C do postizanja logaritamske faze rasta koja je utvrđena spektrofotometrijski (Shimadzu, Japan), kada je na talasnoj dužini od 600 nm postignuta apsorbancija od 0,6-0,8. Taloženje ćelija je rađeno na 5000×g (Eppendorf, Nemačka) tokom 10 minuta čime je dobijen talog ćelija, koji je opran u 500 µL TEN pufera (50 mM Tris-HCl pH 8; 10mM EDTA pH 8; 50mM NaCl). Ispiranje je ponovljeno dva puta. Talog ćelija je resuspendovan u 500 µL PP pufera (0,5 M saharoze; 40 mM amonijum-acetata; 10 mM magnezijum-acetata; pH 7) sa dodatkom lizozoma (Merck, Nemačka) u koncentraciji 4 mg/mL. Inkubacija ćelija vršena je na 37°C tokom 30 minuta. Nakon inkubacije dodato je 250 µL 2% natrijum dodecil-sulfata (SDS) i suspenzija je intenzivno homogenizovana na vorteksu u trajanju od jednog minuta. Za odstranjivanje proteina dodato je 250 µL neutralnog fenol-hloroforma. Rastvor je intenzivno homogenizovan na vorteksu u trajanju od 30 sekundi, a zatim centrifugiran na 13000×g tokom 2 minuta (Eppendorf, Nemačka). Proces fenolne ekstrakcije je za neke izolate ponavljan sve dok nije dobijen potpuno čist, bistar supernatant, bez nečistoća. Supernatantu je dodata 1/10 volumena 3M Na-acetata i 1 volumen izopropanola. Nakon laganog mešanja, smeša je inkubirana na sobnoj temperature tokom 5 minuta. Centrifugiranjem na 13000×g (Eppendorf, Nemačka) tokom dva minuta istaložena je ukupna DNK. Ispiranje taloga izvršeno je hladnim etanolom (75%), a nakon centrifugiranja na 13000 ×g (Eppendorf, Nemačka) u trajanju od 2 minuta, talog je osušen na sobnoj temperaturi i resuspendovan u 50 µL RNKaze (10mg/mL). Kako bi bila odstranjena RNK, rastvor je inkubiran na 37°C tokom 30 minuta (Mirković et al., 2016).

4.6.2. Umnožavanje DNK fragmenata – PCR (Polymerase Chain Reaction)

U cilju molekularne identifikacije bakterijskih izolata, sledeći korak nakon izolacije DNK bio je umnožavanje specifičnih delova 16S rDNK korišćenjem specifičnih prajmera. Umnožavanje varijabilnog regiona gena za *16S rRNK* izvršeno je primenom specifičnih 16S prajmera: P116S (5'-GAGAGTTTGATCCTGGC-3') i P2 16S (5'-AGGAGGTGATCCAGCCG-3') (Jovčić et al., 2009). Smeša za PCR reakciju pripremljena od reakcionog pufera (1x) sa 1,5 mL MgCl₂ (Kapa Biosystems Inc., Boston, USA), smeše dNTP (svaki po 200 μM), prajmera (svaki po 2,5 μM), enzima DNK polimeraza, 1U (Kapa Biosystems Inc., Boston, USA) i DNK prethodno izolovanog iz bakterije u količini 0,1-1 μg. Dopunjavanje do radne zapremine od 50 μL vršeno je vodom bez RNKaze (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf).

PCR reakcija izvršena je prema sledećem programu: inicijalna denaturacija na 94°C u trajanju od pet minuta, zatim je izvedeno 30 ciklusa umnožavanja DNK fragmenata: denaturacija 30 sekundi na 94°C; vezivanje prajmera 30 sekundi na 55°C; polimerizacija lanaca, 60 sekundi na svakih 1000 baznih parova umnožene DNK na 72°C; finalna elongacija, sedam minuta na 72°C (Marshall et al., 2003).

4.6.3. Elektroforeza

Primenom kita za prečišćavanje PCR produkata (QIAquick PCR Purification KIT/250, QIAGEN GmbH, Nemačka) svi PCR produkti su prečišćeni, a zatim provereni na agaroznom gelu. Za proveru rezultata PCR reakcije korišćena je horizontalna gel elektroforeza. Za pripremu gela korišćena je agarozna (1%), a bojenje gelova izvršeno je etidijum-bromidom. Agarozni gelovi su napravljeni otapanjem agaroze i 1xTAE pufera (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA), uz dodatak etidijum-bromida (0,5 μg/mL). Kao pufer za elektroforezu korišćen je TAE (1x). Proces elektroforeze je vršen pri konstantnom naponu od 1-10 V/cm. Veličine PCR produkata utvrđene su poređenjem sa dužinama pređenog puta DNK fragmenata poznate veličine (standard, Gene Ruler DNA Ladder Mix, ThermoScientific). Za posmatranje i fotografisanje gela korišćen je UV transiluminator (Nippon Genetics Europe GmbH).

4.6.4. Sekvenciranje

Sekvenciranje uzoraka izvršeno je u centru za sekvenciranje Microgen sequencing service u Holandiji. Analiza sekvenci urađena je u BLAST programu, korišćenjem NCBI baze podataka (Altschul et al., 1997) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

4.6.5. Izolacija totalne DNK iz kvasaca

Sa površine i iz plodonosnog tela askokarpa tartufa izolovano je 4 izolata kvasaca (2 sa površine i 2 iz unutrašnjosti askokarpa). Izolati su prečišćeni i čuvani na -80°C u odgovarajućem bujonu sa 20% glicerola. Izolati kvasaca su zasejani na sladni agar (Torlak, Srbija) i inkubirani na 25°C tokom 48 h. Kulture su gajene u sladnom bujonu (10 mL) na temperaturi 25°C do postizanja logaritamske faze rasta koja je utvrđena spektrofotometrijski (Shimadzu, Japan), kada je na talasnoj dužini od 600 nm postignuta apsorbanca od 0,6-0,8.

Dalja priprema kvasaca za izolaciju totalne DNK je bila ista kao kod bakterijskih kultura, opisane u odeljku 4.6.1.

Za izolaciju totalne DNK iz kvasaca, korišćen je komercijalni kit (DNA Isolation Kit for Cells and Tissues, Merck, Nemačka), po uputstvu proizvođača.

4.6.6. Umnožavanje DNK fragmenata – PCR

Priprema reakcione smeše za PCR reakciju, kao i polimerazna lančana reakcija su izvedeni primenom istog postupka i programa kao kod bakterija (Odeljak 4.6.2.).

Za identifikaciju izolata kvasaca korišćeni su prajmeri za umnožavanje specifičnih delova gena za 18s rRNK korišćenjem specifičnih prajmera NS1 (5'- GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') i NS2 (5'- GGCTGCTGGCACCACTTGC-3') (White et al., 1990).

4.6.7. Elektroforeza sekvenciranja

PCR produkti su prečišćeni primenom komercijalnog kita za prečišćavanje (QIAquick PCR Purification KIT/250, QIAGEN GmbH, Nemačka), nakon čega su provereni na agaroznom gelu, korišćenjem horizontalne gel elektroforeza, postupkom kao kod bakterijskih izolata (Odeljak br 4.6.3.).

4.6.8. Sekvenciranje

Nakon provere PCR fragmenata na agaroznom gelu, uzorci sa pozitivnim signalom su poslani na sekvenciranje u centar za sekvenciranje Microgen sequencing service, Holandija. Analiza sekvenci urađena je u BLAST program, korišćenjem NCBI baze podataka (Altschul et al., 1997) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

4.7. ZAMRZAVANJE TARTUFA

U cilju praćenja promena isparljivih jedinjenja, svežeg tartufa i tartufa koji su podvrgnuti različitim režimima zamrzavanja, promene su ispitivane posle zamrzavanja i nakon 30, 60 i 90 dana čuvanja.

Režimi zamrzavanja su bili sledeći:

- Zamrzavanje na -20°C (Deep Freezer Samsung, Germany)
- Zamrzavanje na -80°C (Thermoscientific, HERA freeze, Germany)
- Tretman sa tečnim azotom (-196°C), a zatim na -20°C (Deep Freezer Samsung, Germany)
- Tretman sa tečnim azotom (-196°C), a zatim na -80°C (Thermoscientific, HERA freeze, Germany)
- Liofilizacija: smrzavanje 24 h na -80°C (Thermoscientific, HERA freeze, Germany), a zatim liofilizacija 24 h na T -55°C i pritisak 0,05 mbar (MartinChrist Alpha 1-4 LSCplus, Germany).

4.8. TRETMANI ZA DEKONTAMINACIJU TARTUFA

U cilju dobijanja sireva sa dodatkom tartufa, kao zdravstveno bezbednog proizvoda, tartufi su pre proizvodnje sira podvrgnuti različitim tretmanima:

- Sterilizacija u autoklavu na 120°C i pritisku od 1,1 atmosfere 10 min. (ASTELL, Astell Scientific19, United Kingdom), u daljem tekstu će se koristiti termin autoklavirani.
- Potapanje u 70% alkoholu, pa flambiranje na plameniku do sagorevanja alkohola, u daljem tekstu će se koristiti termin flambirani.



Slika 12. Flambiranje tartufa

4.9. ODREĐIVANJE AROMATIČNIH JEDINJENJA U TARTUFIMA

U cilju pronalaženja najboljeg načina očuvanja arome tartufa, u uzorcima koji su podvrgnuti različitim režimima zamrzavanja, ispitivan je sastav aromatičnih materija tokom tri meseca čuvanja. U istom cilju, ispitivana je promena sastava aromatičnih isparljivih materija posle različitih tretmana tartufa pre primene u proizvodnji sireva.

4.9.1. Statička headspace GC/MS analiza

Statička HS GC/MS analiza urađena je na Agilent 7890A gasno-hromatografskom sistemu sa autosemplerom GC80, gasnim hromatografom 7890 A i masenim detektorom 5975C MSD (Agilent Scientific, Santa Clara). Parametri za HS analizu na autosempleru su bili sledeći: vreme inkubacije bilo je 1200 s, temperatura uzorka 100°C, a temperatura šprica je bila 110°C. Za kvalitativnu i semikvantitativnu analizu isparljivih komponenti korišćen je pomenuti gasni hromatograf direktno povezan na dva detektora: plameno-jonizacioni (FID) (Agilent Scientific, Santa Clara) i maseno-spektrometrijski detektor (MSD) (Agilent Scientific, Santa Clara.) Kapilarna polarna kolona HP-Innowax (Agilent Scientific, Santa Clara) (dimenzije 30 m × 0,320 mm i debljine filma 0,25 μm) korišćena je pri svim analizama. Protok nosećeg gasa (helijum) je bio konstantan (protok helijuma na 3 ml/min). Temperatura injektora je bila 220°C, a plameno-jonizacionog detektora 300°C. Temperatura kolone je programirana 35°C u trajanju od 5 min., zatim raste brzinom od 3°C/min do 65 °C i 10°C/min do 225°C, na kojoj ostaje 4 min. Injektovanje je vršeno u split režimu 3:1, a injektovana zapremina je bila 2000 μL uzorka. Maseni spektri su snimljeni tehnikom elektronske jonizacije (EI) energijom od 70 eV. Temperatura jonskog izvora je bila 230°C, dok je maseni analizator (kvadrupol) konstantno grejan na 150°C (Nikolić et al., 2018; Nikolić et al., 2019).

Hemijski sastav lako isparljivih komponenti izražen je kao relativni maseni procenat površina njihovih pikova dobijenih iz FID hromatograma. Identifikacija svih jedinjenja je određena poređenjem masenih spektara jedinjenja sa spektrima iz NIST (verzija 11) i poređenjem retencionih indeksa jedinjenja sa retencionim indeksima iz NIST webbook biblioteka. Retencioni indeksi (RI) analiziranih jedinjenja dobijeni na osnovu retencionih indeksa *n*-alkana (C₆-C₂₆ pod istim hromatografskim uslovima).

4.10. ODREĐIVANJE MIKROBIOLOŠKOG STATUSA TRETIRANIH TARTUFA

Za određivanje mikrobiološkog statusa tretiranih tartufa za proizvodnju sireva (autoklavirani, flambirani), kao i sireva, primenjene su ISO metode i to:

- za određivanje ukupnog broja aerobnih mikroorganizama na 30°C, primenjena je horizontalna metoda SRPS EN ISO 4833-1:2014;
- za određivanje broja enterobakterija primenjena je horizontalna metoda za otkrivanje i određivanje broja *Enterobacteriaceae* SRPS ISO 21528-2:2009;
- za određivanje broja sulfitoredujućih bakterija koje rastu u anaerobnim uslovima, korišćena je horizontalna metoda SRPS ISO 15213:2011.

4.11. PROIZVODNJA I ANALIZA SIREVA

4.11.1. Proizvodnja sireva

Proizvodnja sireva je obavljena u tehnološkoj laboratoriji odnosno pogonu za preradu mleka na Odeljenju za tehnologiju mleka, Katedra za tehnologiju animalnih proizvoda, Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Mleko korišćeno za proizvodnju sireva je dopremano sa farme "13. maj" Zemun, a proizvodnja je vršena u dva ponavljanja.

Proizvedene su sledeće varijante sireva:

1. Kontrolni sir proizveden bez tartufa (K)
2. Sir sa svežim autoklaviranim tartufima (SV)
3. Sir sa smrznutim autoklaviranim tartufima (SM)
4. Sir proizveden sa svežim flambiranim tartufima (SVF)
5. Sir proizveden sa smrznutim flambiranim tartufima (SMF)
6. Sir sa smrznutim, autoklaviranim tartufima i veštačkom aromom tartufa (SVA)



Slika 13. Pripremljen izrendan tartuf



Slika 14. Dodavanje tartufa u sir



Slika 15. Izgled sireva posle presovanja



Slika 16. Izgled preseka sira

Sirovo mleko (50 litara) je filtrirano, a potom termički tretirano u duplikatoru režimom srednje pasterizacije (65°C/30 min). Posle termičkog tretmana vršeno je hlađenje mleka do 35°C, a zatim je izvršeno dodavanje kalcijum hlorida (0,2 g/L mleka; 50 ml 20% CaCl₂), mezofilne starter kulture (Flora Danica, Chr Hansen, Danska) i autohtone potencijalno probiotske kulture *Lactobacillus plantarum* 564 iz kolekcije mikroorganizama Katedre za tehnološku mikrobiologiju, Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu. Nakon 15 minuta izvršeno je dodavanje sirila u prahu koji sadrži 90% himozina i 10% pepsin (1g/50 l mleka; Caglificio Clarici, Italija). Koagulacija je trajala 45 minuta, a potom je gel sečen na zrna dimenzija 1 cm nakon čega je vršeno blago mešanje u toku 30 minuta. Posle izdvajanja određene količine surutke (30%) vršeno je njeno odlivanje, a potom dodavana određena količina vode temperature oko 50°C prilikom čega je istovremeno vršena operacija dogrevanja gruša. Nakon završene obrade gruša i postizanja adekvatne čvrstine sirnih zrna, sirna masa je prebacivana u plastične cilindrične kalupe. Prilikom kalupljenja vršeno je dodavanje prethodno pripremljenih (u zavisnosti od varijante sira) i usitnjenih tartufa u količini od 2% u odnosu na masu sira. U varijanti sira sa dodatom veštačkom aromom, osim dodatih tartufa, dodato je 0,02% veštačke arome (Meilleur du Chef, ZAC du Golf, Italia). Presovanje je vršeno 1 h, nakon čega su sirevi okretani i presovanje nastavljeno još 1,5 h. Nakon toga, sirevi su ostavljani u kalupu u toku 8 h, a nakon toga su sečeni na komade (svaki kotur je sečen na četiri dela). Soljenje se vršilo potapanjem komada sireva u salamuru koncentracije 20% NaCl pri temperature od 12°C i trajalo je 12 h. Nakon završenog soljenja sirevi su ostavljani na sušenje u cilju formiranja kore na površini pri temperature 13-14°C. Nakon formiranja adekvatne kore (4-5 dana) sirevi su potapani u vosak, a potom stavljeni na zrenje pri temperature 6-8°C. Uzorkovanje i mikrobiološko analiziranje sireva je vršeno u sledećim vremenskim intervalima:

- neposredno nakon proizvodnje (1 dan);
- nakon 10 dana zrenja;
- nakon 30 dana skladištenja;
- nakon 60 dana skladištenja;
- nakon 90 dana skladištenja.

Hemijski sastav sireva, parametri proteolitičkih promena, kao i elektroforetsko razdvajanje su određivani nakon 10 i 90 dana zrenja, dok su sadržaj isparljivih jedinjenja i senzorna svojstva sireva analizirani nakon 30, 60 i 90 dana.

4.11.2. Određivanje hemijskog sastava sireva

Za analiziranje sireva tokom zrenja korišćene su sledeće metode:

- Određivanje sadržaja suve materije metodom sušenja na 102 +/- 2°C (IDF standard 4A:1982);
- Određivanje sadržaja mlečne masti sira butirometrijskom metodom po Van Guliku (Carić et al., 2000; IDF standard 5B, 1986);
- Određivanje sadržaja ukupnog azota po metodi Kjeldahl-a pomoću Kjeltex aparata (Tecator 1002, Švedska). Sadržaj proteina se izračunavao množenjem sadržaja ukupnog azota sa faktorom 6,38 (IDF standard 20-1, 2002);
- Određivanje pH vrednosti upotrebom pH-metra (Consort, Belgija);
- Određivanje sadržaja vode u bezmasnoj materiji sira računskim putem;
- Određivanje sadržaja mlečne masti u suvoj materiji sira računskim putem.

4.11.3. Praćenje proteolize tokom zrenja sireva

Protelitičke promene su praćene određivanjem u vodi rastvorljivih azotnih materija (RN) metodom po Kuchroo i Fox-u (1982) i preračunavanjem koeficijenta zrelosti nakon 90 dana zrenja sireva, a karakter proteolize je ispitan poliakrilamidnom elektroforezom u prisustvu uree (Urea PAGE) po metodi Andrews-a (1983).

UREA poliakrilamidna elektroforeza

Razdvajanje azotnih materija primenom UREA poliakrilamidne gel elektroforeze u prisustvu uree je vršeno nakon 10 i 90 dana zrenja sireva.

Priprema uzoraka sireva je obuhvatila sledeću proceduru: 0,4g homogenizovanog uzorka sira je rastvoreno u 5 ml pufera pH 7,6 (1,875 g Tris i 120 g Uree se rastvara u 250 ml destilovane vode i pH vrednost podešava sa HCl), a potom temperirano u vodenom kupatilu na 40°C u toku 1 h. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, sadržaj je filtriran kroz papirnu vatu u ependorfove kivete. Nakon toga vršeno je centrifugiranje na 4°C na 5000 o/min u toku 10 min. sa ciljem izdvajanja sloja masti na površini. 100 µl dobijenog supernatanta je pomešano sa 300 µl pufera (pH 7,6) u koji su dodati β-merkaptotanol (Merck, Nemačka) i par zrna boje bromfenolplavo. Na ovaj način pripremljeni ekstrakti sireva čuvani su zamrznuti, a neposredno pred elektroforezu je izvršeno odmrzavanje i temperiranje uzoraka na sobnu temperaturu. Na gelove je nanošeno po 5 µl pripremljenog ekstrakta uzoraka sira.

Elektroforetska analiza obavljena je na poliakrilamidnim gel pločama dimenzija 100 x 200 x 1 mm. Kao gel za koncentrisanje korišćen je 4% gel (4 g akrilamida i 0,2 g bis akrilamida se rastvara u 100 ml Tris-HCl pufera pH 7,6) i 12% gel za razdvajanje (24 g akrilamida i 1 g bis akrilamida se rastvara u 200 ml Tris-HCl pufera pH 8,9). Pufer Tris-HCl pH 7,6 je pripremljen odmeravanjem 0,75 g Tris-a, 26 g Uree i dopunjavanjem destilovane vode do 100 ml, dok je pufer Tris-HCl pH 8,9 pripremljen odmeravanjem 4 g Tris-a, 26 g Uree i dopunjavanjem do 100 ml destilovane vode. pH vrednost je podešavana sa HCl. Kao elektrodni pufer korišćen je Tris-glicinski pufer (18 g Tris-a, 87,5 g glicina u 6 l vode). Neposredno pred ulivanje dodati su TEMED (dve kapi) i veoma mala količina amonijum persulfata.

Za razdvajanje je korišćena vertikalna elektroforetska jedinica tipa EV 220 (Consort, Belgija), termostatirana sa rashladnim uređajem Multitemp II i povezana sa izvorom napona MacroDrive, istog proizvođača.

Poliakrilamidna gel elektroforeza u prisustvu uree izvedena je pod sledećim uslovima:

$I_{const.} = 60 \text{ mA} / U_{max.} 300V / t = 12^{\circ}C, t = \sim 3 \text{ h}$

Bojenje gelova je vršeno sa 0,23% rastvorom Coomassie Blue R-250, koji je istovremeno sadržao 3,9% TCA, 6% sirćetne kiseline i 17% metanola, u toku 90 min.

Odbojavanje gelova je vršeno u rastvoru 18% etanola i 8% sirćetne kiseline, a za čuvanje je korišćen rastvor 5% sirćetne kiseline i 5% glicerina.

4.11.4. Mikrobiološki status sireva

Za određivanje mikrobiološkog statusa sireva, primenjene su ISO metode i to:

- za određivanje broja enterobakterija primenjena je horizontalna metoda za otkrivanje i određivanje broja *Enterobacteriaceae* SRPS ISO 21528-2:2009
- za određivanje broja sulfitoredukujućih bakterija koje rastu u anaerobnim uslovima, korišćena je horizontalna metoda SRPS ISO 15213:2011
- M17 arap (Lab092, United Kingdom), za izolaciju laktokoka-startera
- MRS arap (Merck, VM459860 241, Germany), za izolaciju laktobacila-encijalnog probiotika.

4.11.5. Aromatične materije sireva

Praćenje promena sastava aromatičnih materija tartufa u sirevima vršeno je tokom perioda zrenja, posle 30, 60 i 90 dana. Primenjena je metoda statički headspace GC/MS analiza, kao i u slučaju isparljivih jedinjenja tartufa (opisano u odeljku 4.9.1).

4.11.6. Senzorna analiza sireva

Senzorno ocenjivanje oglednih sireva, vršeno je primenom korigovanog petobalnog bod sistema (Radovanović i Popov Rajlić, 2001) i opisnom metodom.

Prilikom ocenjivanja korišćen je bodovni raspon od 1 do 5 sa mogućnošću davanja polubodova (0,5; 1,5; 2,5; 3,5; 4,5) (Slika 12). Obzirom da reprezentativna svojstva nemaju jednak uticaj na ukupni kvalitet za svako odabrano svojstvo kvaliteta određen je koeficijent važnosti (KV) pomoću kojeg je vršena korekcija (množenjem) date ocene. Ispitivani parametri kvaliteta sa određenim koeficijentima važnosti su obuhvatili sledeće: spoljni izgled i izgled preseka – 3, miris – 3 ukus - 8 i tekstura – 6. Koeficijenti važnosti su izabrani prema uticaju pojedinih svojstava na ukupan kvalitet, a izbalansirani tako da njihov zbir iznosi 20. Sabiranjem pojedinačnih korigovanih ocena dobijen je jedinstven kompleksni pokazatelj koji odražava ukupan senzorni kvalitet i koji se izražava kao (% od maksimalno mogućeg kvaliteta). Deljenjem ove vrednosti sa zbirom koeficijenata važnosti (20) dobijena je ponderisana srednja ocena koja, takođe, izražava sveukupni kvalitet sira.

Grupa svojstava	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5	5
Spoljni Izgled (presek,boja)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Miris	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tekstura	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ukus	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
NAPOMENA:											

Slika 17. Ocenjivački list za senzornu ocenu kvaliteta sira

4.12. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Jednofaktorijalna analiza varijanse (ANOVA) primenjena je za obradu rezultata merenja u programu Statistica 10.0 (Stat Soft. Inc., Tulsa, SAD), kako bi se ocenili efekti dodavanja tartufa na senzorna svojstva sireva proizvedenih bez i sa tartufima. Razlike sredina određivanih parametara utvrđene su pomoću Fišerovog LSD-testa, na nivou značajnosti 0,05.

5. REZULTATI I DISKUSIJA

5.1. MIKOLOŠKA IDENTIFIKACIJA TARTUFA

Primenom ključa za identifikaciju, pomenutog u poglavlju 4. 1., izvršena je identifikacija plodonosnih tela tartufa koji su korišćeni u radu. Na osnovu mikroskopskih pregleda i morfoloških osobina, utvrđeno je da tartuf koji je korišćen u eksperimentu pripada vrsti *Tuber aestivum*.

Plodonosno telo *Tuber aestivum* je sfernog oblika, najčešće veličine 3 do 6 cm ali može biti i veći. Spoljašna površina - peridijum, prekrivena je nepravilnim piramidalnim bradavicama a unutrašnjost tartufa - gleb, gde se stvaraju spore, u početku je bele boje a sazrevanjem prelazi u bež ili sivo smeđu boju, sa belim membranama, koje daju specifičan, mramorni izgled (Dennis, 1981). Spore *Tuber aestivum* su jajastog oblika, (18-35 μ m), kremasto bele ili žućkaste boje.

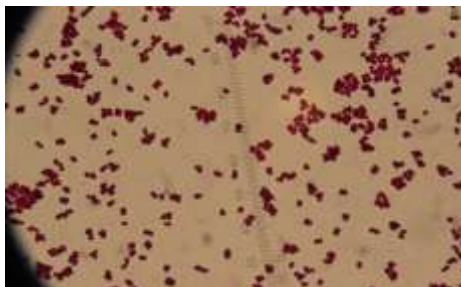
Generičko ime *Tuber* potiče od latinske reči *tuber*, što znači kvržica ili otok a *aestivum* potiče od latinskog *aestivus* što znači leto. *Tuber aestivum*, ponekad se naziva bordo tartuf, letnji tartuf.

Tuber aestivum pripada redu *Pezizales*, razdelu *Ascomycota*, klasi: *Pezizomycetes* - red: *Pezizales* - porodica: *Tuberaceae*.

5.2. IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKIH IZOLATA TARTUFA

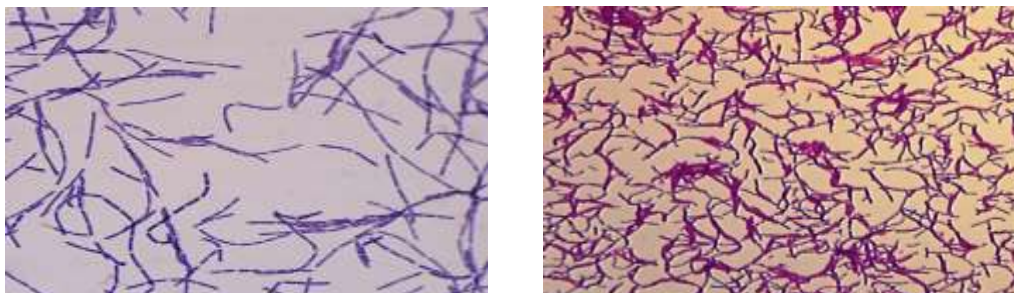
Primenom selektivnih medijuma za izolaciju mikroorganizama sa površine i unutrašnjosti askokarpa tartufa, dobijeno je ukupno 35 bakterijska izolata (26 sa površine i 9 iz unutrašnjosti askokarpa), morfološki različitih kolonija, crnog tartufa (*Tuber aestivum*).

Sa površine askokarpa, dobijena su tri bakterijska izolata na Fjodorovom medijumu, koji je selektivan za *Azotobacter*. Posle makroskopskog i mikroskopskog pregleda, bojenja po Gramu, utvrđeno je da pripadaju rodu *Azotobacter*. Dalja identifikacija nije rađena.



Slika 18. *Azotobacter* sp.

Za ostale izdvojene izolate, dobijene čiste kulture su bojene po Gramu, a zatim je odabir izvršen prema rezultatima mikroskopskog ispitivanja, katalaza i oksidaza testa.



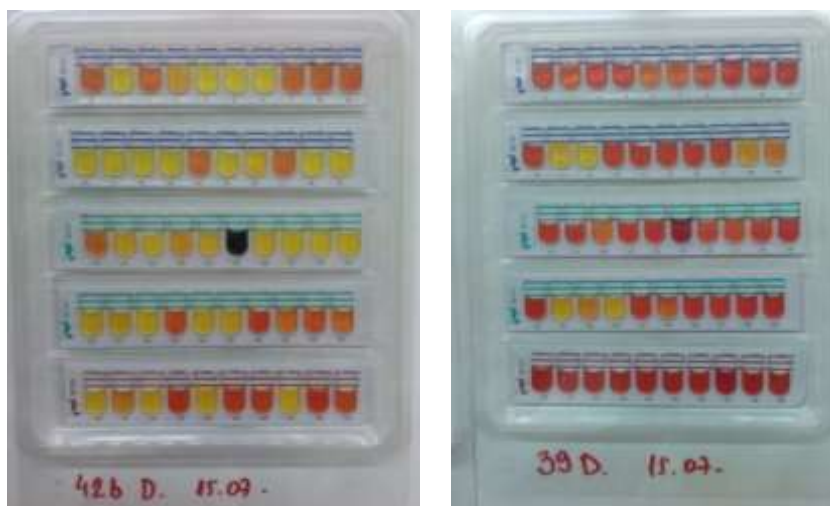
Slika 19. *Bacillus licheniformis* i *Bacillus megaterium*

Pomoću API sistema, urađena je identifikacija odabranih izolata bakterija, koji su prikazani u Tabeli 4.

Rezultati očitavanja API testa za bacile (API CH50) su pokazali da su u najvećem broju prisutne vrste iz roda *Bacillus* 20, zatim po 3 izolata iz rodova *Pseudomonas* i *Aeromonas*, po 2 izolata *Staphylococcus* sp. i *Brevibacillus brevis*, po 1 iz rodova *Arthrobacter* i *Microbacterium*. Poredeći broj izolata izdvojenih sa površine i unutrašnjosti askokarpa, utvrđeno je da su izolati iz roda *Bacillus* izdvojeni najvećim delom sa površine (17), dok kod broja ostalih izolata nije bilo značajnih razlika. Svi izolati roda *Bacillus* pripadali su sledećim vrstama: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericu*, *Bacillus firmus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumillus* i *Bacillus circulans*.

Tabela 4. Identifikovani izolati bakterija API- testom

	Vrsta	Izolati sa askokarpa	Izolati iz askokarpa	Bojenje po Gramu	Katalaza test	Oksidaza test
1.	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	-	+	+	-
2.	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	-	+	+	-
3.	<i>Bacillus licheniformis</i>	+	-	+	+	-
4.	<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	+	+	-
5.	<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	+	+	-
6.	<i>Bacillus subtilis</i>	-	+	+	+	-
7.	<i>Bacillus sphaericus</i>	+	-	+	+	-
8.	<i>Bacillus sphaericus</i>	+	-	+	+	-
9.	<i>Bacillus firmus</i>	+	-	+	+	-
10.	<i>Bacillus firmus</i>	+	-	+	+	-
11.	<i>Bacillus mycoides</i>	+	-	+	+	-
12.	<i>Bacillus mycoides</i>	+	-	+	+	-
13.	<i>Bacillus pumillus</i>	+	-	+	+	-
14.	<i>Bacillus pumillus</i>	+	-	+	+	-
15.	<i>Bacillus cereus</i>	+	-	+	+	-
16.	<i>Bacillus megaterium</i>	+	-	+	+	-
17.	<i>Bacillus circulans</i>	+	-	+	+	-
18.	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	+	+	-
19.	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	+	+	-
20.	<i>Bacillus</i> sp.	+	-	+	+	-
21.	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	+	-	+	+
22.	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	-	-	+	+
23.	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	+	-	+	+
24.	<i>Aeromonas hidrophila</i>	+	-	-	+	+
25.	<i>Aeromonas hidrophila</i>	-	+	-	+	+
26.	<i>Aeromonas salmonicida</i>	-	+	-	+	+
27.	<i>Staphylococcus</i> sp.	+	-	+	+	-
28.	<i>Staphylococcus</i> sp.	+	-	+	+	-
29.	<i>Brevibacillus brevis</i>	+	-	+	+	-
30.	<i>Brevibacillus brevis</i>	-	+	+	+	-
31.	<i>Arthrobacter</i> sp.	-	+	+	+	+
32.	<i>Microbacterium</i>	-	+	+	+	-

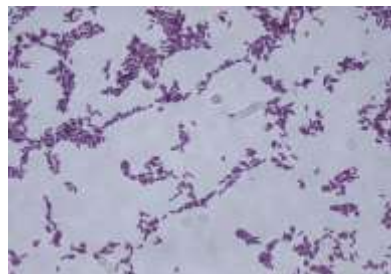


Slika 20. *Bacillus circulans* i *Bacillus firmus* (Strip API 50 CH)

Bakterije iz roda *Bacillus* koje su izolovane sa površine askokarpa, imaju specifične osobine koje verovatno u ektomikoriznoj zajednici tartufa imaju svoju funkciju. Tako na primer, *Bacillus circulans* koristi silicijum iz minerala i oslobađa se kalijum, auksini, citokinini, giberelini (Heba et al., 2018). Određeni *Bacillus licheniformis* izolati vrše denitrifikaciju (Pavari, 1916), podukuje ekstracelularne enzime i već decenijama se koristi u industrijskoj proizvodnji enzima (proteaze, α -amilaze, penicilinaze, pentozanaze) (Diaz i Cock, 2005). Amilaze *Bacillus licheniformis* vrše hidrolizu skroba (Jones et al., 2005). *Bacillus megaterium* obavlja proces mineralizacije i obezbeđuje biljku sa fosforom, utiče na oslobađanje amonijaka iz belančevina, stvara vitamin B12 i neke materije rasta. Imajući u vidu svojstva ovih izolata, može se reći da ovi mikroorganizmi imaju višestruku ulogu u mikoriznoj zajednici tartufa.

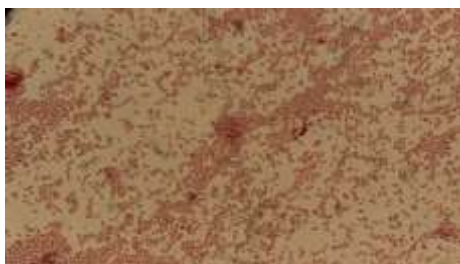


Slika 21. *Brevibacillus brevis*

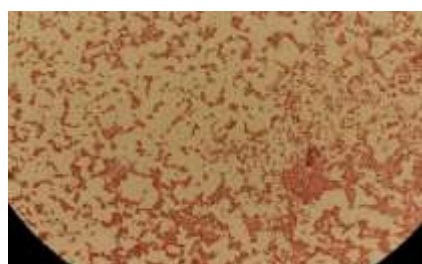


Slika 22. *Bacillus pumillus*

Odabrani izolati sa selektivne podloge citrimidin, za *Pseudomonas* sp., koji su na osnovu preliminarnih, mikroskopskih ispitivanja i oksidaza testa, pokazali karakteristike ovog roda, zasejani su na Petri kutiju sa hranljivim agarom. Posle inkubacije tokom 24 h, zasejani su na API 20 NE. Očitavanje testa posle 24 h, pokazalo je da među izolatima mikosfere tartufa nalaze *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* i *Pseudomonas* sp.



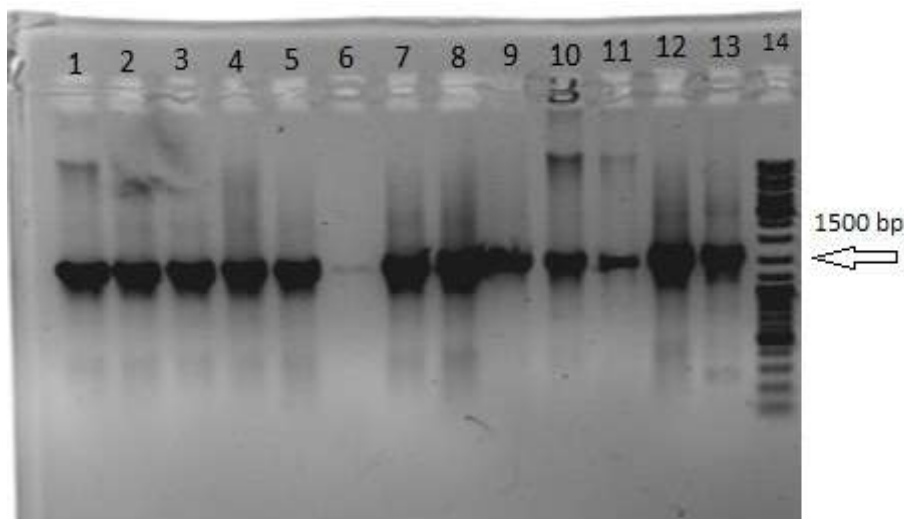
Slika 23. *Aeromonas hydrophila*



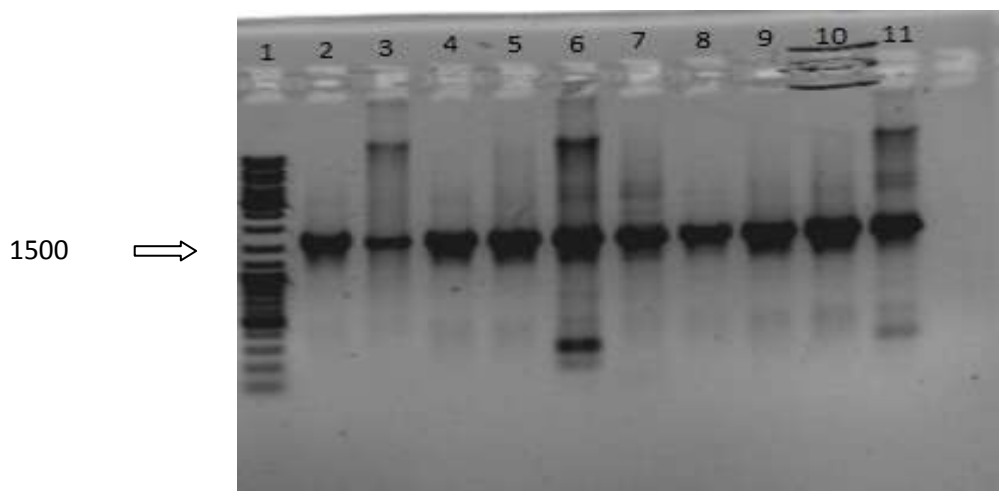
Slika 24. *Aeromonas salmonicida*

5.3. MOLEKULARNA IDENTIFIKACIJA BAKTERIJSKIH IZOLATA

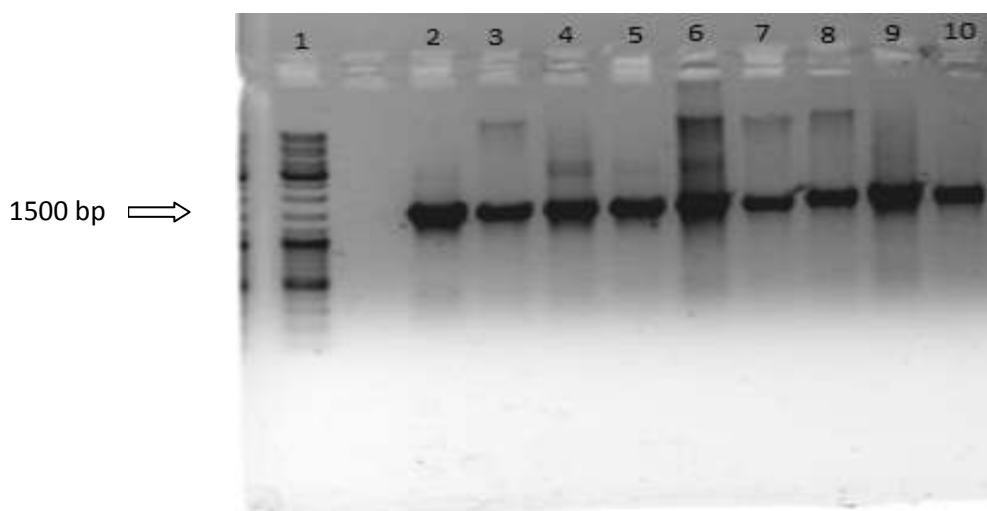
Nakon izolacije bakterija sa površina plodonosnog tela kleistotecija, izvršena je izolacija DNK, a zatim i amplifikacija varijabilnog regiona gena za *16S rRNK* primenom specifičnih prajmera P1 16S i P2 16S. Veličine PCR produkata određene su na osnovu migracije u 1% agaroznom gelu u poređenju sa standardom. Na ovaj način je potvrđena očekivana veličina PCR reakcije od 1500 bp kod svih bakterijskih izolata (slike 25, 26, 27).



Slika 25. Elektroforeza PCR produkata bakterijskih izolata korišćenjem specifičnih prajmera P1 16S i P2 16S na 1% agaroznom gelu: 1- izolat DP1, 2- izolat DP2, 3- izolat DP3, 4- izolat DP5, 5- izolat DP6, 6- izolat DP9, 7- izolat DP10, 8- izolat DP11, 9- izolat DP12, 10- izolat DP13, 11- izolat DP14, 12- izolat DP15, 13- izolat DP16, 14- DNK Ladder Mix (ThermoScientific).



Slika 26. Elektroforeza PCR produkata bakterijskih izolata korišćenjem specifičnih prajmera P1 16S i P2 16S na 1% agaroznom gelu: 1- DNK Ladder Mix (ThermoScientific), 2- izolat DP17, 3- izolat DP18, 4- izolat DP19, 5- izolat DP20, 6- izolat DP21, 7- izolat DP22, 8- izolat DP23, 9- izolat DP24, 10- izolat DP26, 11- izolat DP27.



Slika 27. Elektroforeza PCR produkata bakterijskih izolata korišćenjem specifičnih prajmera P1 16S i P2 16S na 1% agaroznom gelu: 1- DNK Ladder Mix (ThermoScientific), 2- izolat DP28, 3- izolat DP29, 4- izolat DP30, 5- izolat DP31, 6- izolat DP32, 7- izolat DP33, 8- izolat DP35, 9- izolat DP36, 10- izolat DP37.

Produkti PCR reakcije prečišćeni su i sekvencirani u Microgen's sequencing service u Holandiji. Korišćenjem NCBI baze podataka iz BLAST platforme utvrđeni su rodovi i/ili vrste kojima pripadaju bakterije izolovane sa površina plodonosnog tela kleistocija. Rezultati su prikazani u Prilogu rada u tabelama 3 – 34.

Od dobijenog broja izolata, analizom sekvence je utvrđeno da najveći broj izolata (19 izolata) pripada vrstama roda *Bacillus*, od kojih je 18 izolovano sa površine i 1 iz unutrašnjosti askokarpa. Ostali sojevi se mogu svrstati u 6 rodova: *Pseudomonas* sp. (4), *Staphylococcus* sp. (3), *Brevibacterium* sp. (2), *Microbacterium* sp. (1), *Enterococcus* sp. (1) i *Arthrobacter* sp. (1). Rezultati molekularne analize prikazani su u tabeli 5.

Na osnovu prethodnog istraživanja (Barbieri et al., 2005) pokazano je da najveći broj izolata pripadalo klasi α -*Proteobacteria*, porodicama *Bradirhizobiaceae* i *Rhizobiaceae* što nije u skladu sa našim rezultatima. Ova razlika se može objasniti istraživanjem koje su sproveli Splivallo i sar. (2015), gde su opisali promenu biodiverziteta tartufa sa njegovim sazrevanjem, ali i tokom skladištenja. Mikrobiota izolovana sa tartufa prvog dana i nakon nekoliko dana skladištenja značajno se razlikuju. Autori su pokazali da dominantnu mikrobiotu prvog dana čine α -*Proteobacteria* i β -*Proteobacteria*, dok su ostale bakterije prisutne u manjem broju. Nakon nekoliko dana skladištenja uočen je porast broja bakterija iz filuma *Firmicutes*, dok je broj ostalih bakterija smanjen. Filumu *Firmicutes* pripada i rod *Bacillus* sp. koji čini dominantnu mikrobiotu u našim rezultatima. Tartufi sa kojih su izolovani naši izolati čuvani su nekoliko dana na 4°C pre izolacije bakterija, što može biti dodatni razlog da *Bacillus* sp. predstavlja dominantnu mikrobiotu.

U istraživanju Barbieri i sar. (2005), pored roda *Bacillus* sp. iz filuma *Firmicutes* izolovane su i bakterije iz rodova *Staphylococcus* sp. i *Listeria* sp. dok su u ovom radu izolovane bakterije rodova *Staphylococcus* sp. i *Enterococcus* sp.

Iz rezultata se može uočiti prisustvo manjeg broja izolata iz klase γ -*Proteobacteria*, vrste *Pseudomonas* sp. kao i manjeg broja izolata koji pripadaju razdelu *Actinobacteria*, vrstama *Brevibacterium* sp., *Microbacterium* sp. i *Arthrobacter* sp.

Prisutna bakterijska populacija se može dovesti u vezu sa produkcijom isparljivih jedinjenja, koja se oslobodaju kao rezultat interakcije tartufa i bakterija. Bakterije koje stupaju u interakciju sa tartufima mogu aktivirati njihove biosintetske puteve koji su inače potisnuti u čistim micelijskim kulturama (Scherlach i Hertweck, 2009; Schroeckh et al., 2009).

Tabela 5. Genetska identifikacija izolata izdvojenih sa površine i iz unutrašnjosti askokarpa

IZOLATI SA POVRŠINE ASKOKARPA				
R br.	Oznaka	Najsličniji izolat dostupan u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Stepen poklapanja (%)	Tabela u Prilogu
1.	DP2	<i>Bacillus subtilis</i>	95	4.
2.	DP3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	97	5.
3.	DP5	<i>Bacillus paramycooides</i>	96	6.
4.	DP6	<i>Bacillus licheniformis</i>	96	7.
5.	DP9	<i>Bacillus albus</i>	95	8.
6.	DP10	<i>Bacillus wiedmannii</i>	96	9.
7.	DP11	<i>Bacillus velezensis</i>	96	10.
8.	DP12	<i>Bacillus cereus</i>	95	11.
9.	DP13	<i>Bacillus wiedmannii</i>	96	12.
10.	DP 15	<i>Bacillus albus</i>	95	14.
11.	DP16	<i>Bacillus sp.</i>	95	15.
12.	DP17	<i>Bacillus licheniformis</i>	~96	16.
13.	DP 18	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	96	17.
14.	DP 20	<i>Pseudomonas brenneri</i>	92	19.
15.	DP22	<i>Staphylococcus equorum</i>	97	21.
16.	DP 23	<i>Bacillus sp.</i>	96	22.
17.	DP 24	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	84	23.
18.	DP 26	<i>Bacillus sp.</i>	96	24.
19.	DP 27	<i>Microbacterium sp.</i>	97	25.
20.	DP28	<i>Bacillus licheniformis</i>	~97	26.
21.	DP 29	<i>Bacillus licheniformis</i>	98	27.
22.	DP35	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	97	32.
23.	DP36	<i>Bacillus cereus</i>	96	33.
IZOLATI IZ UNUTRAŠNOSTI ASKOKARPA				
1.	DP1	<i>Arthrobacter sp.</i>	97	3.
2.	DP14	<i>Pseudomonas fragi</i>	97	13.
3.	DP 19	<i>Pseudomonas sp.</i>	92	18.
4.	DP 21	<i>Bacillus sp</i>	97	20.
5.	DP 30	<i>Enterococcus durans</i>	97	28.
6.	DP 31	<i>Brevibacterium sp.</i>	96	29.
7.	DP32	<i>Brevibacterium sp.</i>	98	30.
8.	DP 33	<i>Bacillus subtilis</i>	96	31.
9.	DP37	<i>Pseudomonas sp.</i>	88	34.

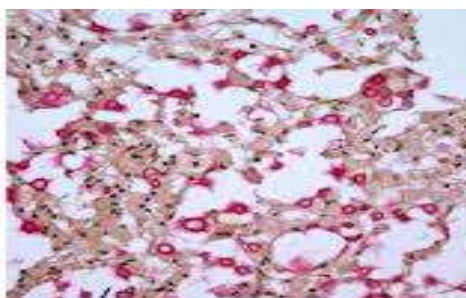
Derivati tiofena su jedinjenja koja doprinose aromi tartufa međutim, formiranje ovih derivata u plodonosnom telu tartufa zavisi od bakterija koje generišu heterociklična jedinjenja koja sadrže sumpor iz linearnog prekursora kao što je L-metionin. Najefikasniji "proizvođači" tiofenskih derivata su bakterijski sojevi α -*Proteobacteria*, β -*Proteobacteria* i γ -*Proteobacteria*. Odsustvo ili

retka pojava mikroorganizama koji formiraju specifičnu aromu ukazuje na to da bi aromatična jedinjenja mogla biti sintetizovana od samog tartufa ili tokom njihove seksualne faze (Splivallo et al., 2015).

5.3.1. Identifikacija izolata aktinomiceta

Pojedinačne kolonije izrasle na selektivnoj podlozi (skrobno-amonijačnom agaru) nakon inkubacije su presejane na selektivni medijum, kako bi se dobile čiste kulture koje su čuvane na kosom agaru na 4°C.

Kod identifikacije aktinomiceta, posle makroskopskih ispitivanja (boja i oblik kolonija), bojenja po Gramu i mikroskopskog pregleda dobijenih izolata, katalaza testa, selektovano je 5 različitih izolata, od kojih su 2 pripadala rodu *Actinomyces*, a tri *Streptomyces*. Na sintetskoj podlozi daju hrapave kolonije, zbog sadržaja pigmenata, različite obojene (crvena, ljubičasta, braon, crna i sivkasto-bela).



Slika 28. *Azotobacter* sp.

5.3.2. Identifikacija izolata filamentoznih gljiva

Sa selektivnih podloga za izolaciju gljiva izdvojeno je 4 različita izolata i to svi sa površine askokarpa, dok u unutrašnjosti askokarpa nije utvrđeno prisustvo filamentoznih gljiva. Odabrani izolati filamentoznih gljiva iz mikosfere askokarpa tartufa *T. aestivum* identifikovana su makro i mikroskopski. Identifikovane su filamentozne gljive: *Penicillium notatum*, *Fusarium* sp., *Rhizophus* sp. i *Trichoderma* sp., prikazani u tabeli 6.

Tabela 6. Identifikovani izolati filamentoznih gljiva

Izolati		<i>Tuber aestivum</i>	
		Sa askokarpa	iz askokarpa
1.	<i>Penicillium notatum</i>	+	-
2.	<i>Fusarium</i> sp.	+	-
3.	<i>Rhizophus</i> sp.	+	-
4.	<i>Trichoderma</i> sp.	+	-

Penicillium notatum, izolovan iz mikosfere crnih tartufa ima septirane hife, konidiofore razgranate, grane cilindrične, metule glatkih zidova, fjalide tanke sa izraženim vratom, ne stvara sklerocije, a luči pigment u podlogu. Posle 24 časa, kolonije su bele, a posle 7 dana tamno maslinasto zelene boje. Prema priručniku za klasifikaciju gljiva po Robert A. Samson-u i Elen S. Van Rernen-Hoekstra (1988) utvrđeno je da ova gljiva pripada klasi *Ascomycetas*, redu *Moniliales*, porodica *Moniliceae*, rod-*Penicillium* vrsta-*Penicillium notatum*.

Prilikom izolacije, na podlozi je bio izražen antagonizam *Bacillus subtilis* i *Penicillium notatum*. Naime, *Bacillus subtilis* je sprečavao rast micelijuma *Penicillium notatum*, a dozvoljavao rast micelijuma *Tuber aestivum*, slika 29.



Slika 29. Antagonizam *Bacillus subtilis* i *Penicillium notatum*

Fusarium sp. je na čvrstoj hranljivoj podlozi, pokazivao vegetativne hife bele boje, septirane, konidiofore razgranate i septirane, konidije srpastog oblika, zelenkaste sa 4-5 septi. Kolonije su bele, vataste, a sa donje strane tamno žute boje. Izolat pripada klasi- *Hiphomycetes*, porodica- *Moniliceae*, rod-*Fusarium*.

Kod *Rhizophus* sp. na čvrstoj hranljivoj podlozi, posle dva dana, su se javile neseptirane hife, sporangiofore izrasle iz stolona samostalno, ne granaju se, sporanije loptaste, braon boje, a sporiospore braon boje, sferne i nepravilnog oblika.

Za izolaciju *Trichoderma* sp. primenjene su selektivne hranljive podloge Rose Bengal agar (RBA) (Peper et al., 1995), koja je nakon zasejavanja inkubiran sedam dana na 25°C. Sa RBA su presejane na dekstrozni krompirov agar (PDA) (Merck, Nemačka), gde raste i formira rastresite konidije u nijansama zelene boje. Izlučuje žuti pigment u PDA agaru. Na osnovu morfologije, identifikovano je da izrasle kolonije pripadaju rodu *Trichoderma* (Samson i Van Rernen-Hoekstra, 1988).

Sekrecijom različitih litičkih enzima, *Trichoderma* sp. ograničava rast i aktivnost fitopatogenih gljiva. *Trichoderma* sp. direktno kontroliše gljive – prouzrokovače bolesti. Specifični sojevi gljiva iz roda *Trichoderma* koloniziraju i prodiri u tkiva korena biljaka i izazivaju bolji porast biljaka (Harman et al., 2004).

5.3.3. Identifikacija izolata kvasaca

Primenom selektivnih medijuma za izolaciju kvasaca sa površine i unutrašnjosti askokarpa tartufa, dobijeno je ukupno 7 izolata, pri čemu su svi izolati bili izdvojeni sa površine askokarpa. Posle makroskopskih ispitivanja (boja i oblik kolonija), mikroskopskog pregleda i ispitivanjem stvaranja lažnih micelija, odabrano je 4 izolata kvasaca, koji su presejani na Petri kutiju sa sladnim agarom i posle 24 h inkubacije na 30°C, zasejani na API 20C AUX test za kvasce. Rezultati očitavanja API testa, pokazali su prisustvo sledećih kvasaca: *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida guilliermondii*, *Cryptococcus humicalus* i *Kloeckera apiculata* (tabela 7).

Tabela 7. Identifikovani izolati kvasaca API 20C AUX-testom

Izolati	<i>Tuber aestivum</i>	
	Sa askokarpa	iz askokarpa
1. <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	+	-
2. <i>Candida guilliermondii</i>	+	-
3. <i>Cryptococcus humicalus</i>	+	-
4. <i>Kloeckera apiculata</i>	+	-

Istraživanja su pokazala da nekoliko mikrobnih agenasa mogu efikasno inhibirati razvoj truleži na raznim plodovima voća, primer, primena kvasaca *Kloeckera apiculata* (Grahovac et al., 2009).



Slika 30. *Candida guilliermondii*

Kvasci *Kloeckera apiculata* i *Candida guilliermondii* se primenjuju u suzbijanju skladišnih bolesti jabuke, breskve i grožđa, kao antagonistički kvasci, sprečavaju truljenje uskladištenog voća pojačavanjem enzimskih aktivnosti koje su vezane za otpornost, te se ove osobine sigurno koriste i u mikoriznoj zajednici tartufa (McLaughlin, 1992).

5.3.4. Genetska identifikacija kvasaca

Kvasci izolovani sa površine askokarpa, od 7 izolata, 4 su selektovana nakon maskroskopskog pregleda. Izolati kvasca, zasnovani na 18s rRNK, identifikovani su kao *Cryptococcus humicola*, *Debaromyces hanseinii*, *Candida fermenti* i *Rhodotorula mucylaginoso*. Prethodne studije otkrile su da se mikrobiota kvasca sastoji od pet vrsta, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus humicola*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Debariomyces hansenii* i *Saccharomyces paradoxus* (Zacchi et al., 2003). Kvasac *Candida saitoana*, *Debaromyces hansenii*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* i *Trichosporon* takođe su izolovani iz *T. melanosporum* i *T. magnatum* (Buzzini et al., 2005). Zanimljivo je da su *Cryptococcus* spp., *R. mucylaginoso*, *D. hansenii* i *Saccharomyces* spp. takođe izolovani spp. takođe izolovani iz *T. melanosporum*, *T. magnatum* ili *T. aestivum* i zbog toga mogu biti uobičajeni za različite vrste tartufa (Buzzini et al., 2005; Rivera et al., 2010). Buzzini i sar. (2005) dokazali su da kvasci izolovani iz plodonosnih tela tartufa, proizvode neka jedinjenja, kao što su 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol i neka isparljiva sumporna jedinjenja (DMS, DMDS, DMTS), dok su Splivallo i sar. (2015), dokazali da DMS neka ciklična sumporna jedinjenja u plodonosnim telima tartufa, stvaraju bakterije (Splivallo et al., 2015). Dobijeni rezultati pokazuju da se mikrobiota kvasca razlikuje među vrstama tartufa. Daljim istraživanjima, neophodno je pronaći tehnike koje bi objasnile uticaj kvasaca na sadržaj aromatičnih jedinjenja tartufa (Vahdatzadeh et al., 2015).

5.4. ZAMRZAVANJE TARTUFA

U cilju praćenja promena isparljivih jedinjenja, svežeg tartufa i tartufa koji su podvrgnuti različitim režimima zamrzavanja, promene su ispitivane posle zamrzavanja, 30, 60 i 90 dana. Ukupno je detektovano 57 isparljivih jedinjenja, od kojih je 26 izdvojeno kao značajnija aromatična jedinjenja. Izdvojena jedinjenja su jedinjenja koja sadrže sumpor (5), aldehidi (7), ketoni (4), alkoholi (6) i furani (4), a rezultati su prikazani u tabelama 8, 9, 10, 11, 12. Rezultati prikazanih aromatičnih jedinjenja su predstavljeni kao procentualni udeo svakog jedinjenja u odnosu na ukupan sadržaj detektovanih isparljivih jedinjenja. Među njima su 2-butanon i 2-butanol bili kvantitativno dominantni i činili su više od 50% ukupne arome u svim ispitivanim uzorcima.

Sadržaj jedinjenja zamrznutih tartufa, koja sadrže sumpor tokom 90 dana zamrzavanja, prikazani su u tabeli 8.

Tabela 8. Sadržaj sumpornih jedinjenja u tartufima tokom 90 dana skladištenja pri različitim režimima zamrzavanja

Jedinjenja	Formula	RI	R.T. min	Dan	Svež tartuf	Režim zamrzavanja				
						-20°C*	TečniN -20°C**	-80°C*	TečniN -80°C**	Liofiliz.
						% od ukupnih isparljivih jedinjenja				
Metantioi	CH ₄ S	666	1,266	0	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1
				30		0,8	1,4	1,1	1,1	0,1
				60		0,5	0,8	1,0	0,9	0,1
				90		1,2	0,8	0,9	0,7	0,1
Dimetil-sulfid DMS	C ₂ H ₆ S	737	1,418	0	3,97	0,3	0,3	0,3	0,3	0,22
				30		0,2	0,2	0,1	0,3	0,2
				60		0,2	0,2	0,1	0,3	0,2
				90		0,2	0,1	0,1	0,3	0,2
Dimetil-disulfid DMDS	C ₂ H ₆ S ₂	1057		0	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04
				30		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
				60		0,00	tr	0,00	0,00	0,00
				90		0,1	tr	0,1	0,1	0,00
Dimetil-trisulfid DMTS	C ₂ H ₆ S ₃	1373	16,712	0	tr	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
				30		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
				60		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
				90		tr	tr	tr	tr	0,00
3-Metiltio-1-propanol	C ₄ H ₁₀ OS	1724		0	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
				30		0,05	0,03	0,02	0,01	tr
				60		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
				90		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

*zamrzavanje na -20°C, odnosno na -80°C; **zamrzavanje u tečnom azotu i čuvanje na -20°C odnosno -80°C; tr-tragovi; RI-retencioni indeks; RT-retenciono vreme

U svežem tartufu i nakon zamrzavanja, tokom 90 dana čuvanja, praćen je sadržaj sumpornih jedinjenja koja imaju najveći značaj u formiranju arome tartufa: metantioi, dimetil-sulfid (DMS), dimetil-disulfid (DMDS), dimetil-trisulfid (DMTS). Ova jedinjenja se smatraju esencijalnim komponentama koje doprinose aromatičnosti crnog tartufa Evrope i Azije (Culleré et al. 2010; Liu et al. 2012; Talou et al. 1989).

Pri svim režimima zamrzavanja je utvrđeno prisustvo sumpornih jedinjenja, pri čemu je u nultom danu sadržaj DMS bio najveći. Tokom skladištenja, sadržaj se neznatno smanjivao i održao u toku svih 90 dana dana pri svim režimima čuvanja. Što se tiče promena sadržaja metantiola, nakon procesa zamrzavanja se smanjio pri svim režimima, a povećao nakon 90 dana i najviše ga bilo na tretmanu -20°C. Učešće ovog jedinjenja u 90. danu bilo je 2-3 puta veće nego u nultom danu, što se može objasniti smanjenjem sadržaja drugih jedinjenja u ukupnom sastavu aromatičnih materija. Kada je u pitanju sadržaj DMDS i DMTS, zapaženo je da se sadržaj ovih jedinjenja najmanje promenio tokom 90 dana čuvanja.

Pri svim režimima zamrzavanja, promene u sadržaju sumpornih jedinjenja su bile veoma slične, pri čemu je sadržaj metantiola kod režima -20°C, 90- tog dana bio veći u odnosu na ostala sumporna jedinjenja.

Prema podacima Berger i sar. (1999) i Spinnler i sar. (2001), pokazano je da sumporna jedinjenja nastaju iz katabolizma L-metionina, njihovog glavnog preteče. Činili su najveću grupu isparljivih sastojaka (tioli, tioestri, sulfidi, tioalkoholi i tiofenoni), ali su uglavnom prisutni u tragovima u svežim plodovima. Bez obzira na to, ova jedinjenja imaju vrlo niske granice detekcije mirisa i zbog toga daju doprinos konačnoj aromi tartufa, iako su prisutni u niskim koncentracijama. Poznato je da struktura i diverzitet sumpornih jedinjenja zavise od vrste tartufa. Sa jedne strane, isparljiva jedinjenja kao što su DMS, DMDS, DMTS su prisutna u većini vrsta tartufa i nastaju verovatno kao rezultat Ehrlich-ovog puta, a verovatno su uslovljena aktivnošću mikroorganizama (Martin et al. 2010; Splivallo et al. 2011), pri čemu jedinjenje DMS može nastati kao rezultat metabolizma kvasaca, iz aminokiselina kao što su cistin, glutation i miriše na kuvanu šparglu, kokice, melasu (Milo i Reineccius, 1997). Sa druge strane, ova jedinjenja mogu biti i ograničena na nekoliko vrsta tartufa, ili čak i specifična za određenu vrstu. Na primer, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal, 2-metilbutanol, 3-metilbutanol i okt-1-en-3-ol zajednički su za većinu vrsta tartufa, dok je 2,4-ditiopentan isključiv za plodove tela *T. magnatum* (Vahdatzadeh i Splivallo, 2018).

Raznolikost isparljivih supstanci koje sadrže sumpor imaju važnu ulogu u formiranju aromatičnih profila zbog njihovog niskog olfaktornog praga, kao i razlikovanja uzoraka (Culleré et al., 2013; Pelusio et al., 1995). Isparljive supstance koje sadrže sumpor u crnom tartufu (0,040 µg/g) uključuju dimetil disulfid i 3-metiltio-propansku kiselinu, dok jedinjenja u belom tartufu (2,894 µg/g) uključuju metion, metiltio -cikloheksan, 3-metiltio-1-propanol, 3-metiltio-propansku kiselinu i benzotiazol. Do sada je u mnogim tartufima identifikovan dimetil disulfid (Culleré et al., 2013; Splivallo et al., 2011). 3-metiltio-1-propanol je detektovan u *T. borchii* i *T. melanosporum*, kao što je objavljeno u radu Splivallo i sar. (2007), koji ima snažan, slatkast miris, miris na supu ili miris sličan mesu, u velikom razblaženju. Metantiol, koji je detektovan u našim tartufima kako u svežem, tako i u zamrznutim, poznat je kao proizvod razgradnje metionina. Ima neprijatan miris i nisku graničnu vrednost od približno 1ppb (Devos et al., 1990). Ovo jedinjenje se naziva još i metilmerkaptan, miriše na paljenu gumu, pokvarena jaja, pokvareni kupus. Osim metionina, može da nastane iz drugih organskih i neorganskih prekursora, u toku metabolizma kvasaca, a sam put nije razjašnjen (Jović, 1991).

Sadržaj aldehida u zamrznutim tartufima tokom 90 dana skladištenja, predstavljen je u tabeli 9.

Sadržaj ukupnih aldehida je varirao u pogledu pojedinačnih jedinjenja. Kao glavni isparljivi aldehidi detektovani su: acetaldehid, 2-metil-propanal, 2-metil-butanal i 3-metil-butanal.

Sam proces zamrzavanja je uticao na smanjenje koncentracije acetaldehida, tako da je u nultom danu ona bila duplo manja u odnosu na svež tartuf. Koncentracija acetaldehida se smanjivala tokom vremena čuvanja, u svim režimima zamrzavanja ravnomerno, osim kod režima na -80°C i -80°C sa tečnim azotom, nakon 60 dana, koncentracija acetaldehida je bila približna kao u nultom danu a 90 dana je ponovo opala. Acetaldehid ima miris ustajale jabuke, može da nastane dekarboksilacijom pirogroždane kiseline, nakuplja se i najviše ga ima na početku čuvanja.

Što se tiče sadržaja 2-metil-propanala nema značajnih razlika u zavisnosti od tretmana zamrzavanja. Nakon zamrzavanja svim tretmanima, sadržaj se povećao dva puta u odnosu na svež tartuf, kod režima sa tečnim azotom je 30. i 60. dana bio veći (19,1 i 12,8%). Tokom vremena čuvanja, sadržaj 2-metil-propanala se smanjivao, tako da je nakon 90 dana relativna koncentracija u svim uzorcima opala približno dvadeset puta.

U slučaju 2-metil-butanala, koncentracija pokazuje trend rasta, pri čemu se pokazalo da odmah nakon zamrzavanja pri svim režimima, koncentracija je veća nego kod svežeg tartufa u nultom danu. Tokom čuvanja, kod svih uzoraka sadržaj 2-metil-butanala se povećava, osim kod uzorka tretiranog u tečnom azotu i čuvanog na -20°C u 90-om danu.

Tabela 9. Sadržaj aldehida u tartufima tokom 90 dana skladištenja pri različitim režimima zamrzavanja

Jedinjenja	Formula	RI	R.T. min	Dan	Svež tartuf	Režim zamrzavanja				
						-20°C*	TečniN -20°C**	-80°C*	TečniN -80°C**	Liofiliz.
						% od ukupnih isparljivih jedinjenja				
Acet-aldehid	C ₂ H ₄ O	686	1,294	0	6,32	3,0	3,0	3,0	3,0	1,39
				30		0,8	2,1	1,2	1,2	1,1
				60		1,7	1,8	2,8	2,7	1,5
				90		1,1	1,2	1,3	1,1	1,1
2-metilpropanal	C ₄ H ₈ O	816	1,655	0	5,26	11,1	11,1	11,1	11,1	12,7
				30		7,9	19,1	8,7	10,6	11,5
				60		7,6	7,2	13,4	12,8	11,0
				90		0,5	0,4	0,4	0,3	0,5
2-metilbutanal	C ₅ H ₁₀ O	889	2,344	0	9,55	10,6	10,6	10,6	10,6	21,4
				30		13,8	15,0	17,4	13,8	16,0
				60		14,7	13,2	15,8	14,7	15,2
				90		13,1	7,6	11,7	13,1	14,5
3-metilbutanal	C ₅ H ₁₀ O	911	2,511	0	7,43	7,6	7,6	7,6	7,6	8,5
				30		0,4	0,2	0,3	0,4	3,5
				60		0,4	0,8	0,3	0,4	2,0
				90		9,8	6,6	9,3	9,8	3,5
Heksanal	C ₆ H ₁₂ O	1068	5,772	0	0,30	0,1	0,1	0,1	0,1	tr
				30		tr	0,2	tr	0,1	tr
				60		0,1	0,1	0,1	0,1	tr
				90		tr	tr	tr	tr	tr
2-metil-2-butenal	C ₅ H ₈ O	1076	6,132	0	tr	tr	tr	tr	tr	0,00
				30		tr	0,1	0,1	0,1	0,00
				60		tr	tr	tr	0,1	0,00
				90		tr	tr	tr	tr	0,00
Heptanal	C ₇ H ₁₂ O	1177	9,771	0	0,47	0,00	0,00	0,00	0,00	0,78
				30		0,1	0,1	0,1	0,1	0,4
				60		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
				90		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

*zamrzavanje na -20°C odnosno na -80°C; **zamrzavanje u tečnom azotu i čuvanje na -20°C odnosno -80°C; tr – tragovi

Ranija istraživanja su pokazala da su jedinjenja 2-metilbutanal i 3-metilbutanal uobičajeni sastojci aromatičnih materija tartufa (Costa et al., 2015). Takođe, utvrđeno je da su ova dva jedinjenja, kao dominantna jedinjenja u isparljivoj frakciji tartufa, sa kvalitativnim fluktuacijama u zavisna od promenljivih kao što je vrsta tartufa i geografsko poreklo (Fiecchi et al., 1967; Gioacchini et al., 2008).

Aldehidi velike molekulske mase, poput heksanala i heptanala, otkriveni su u vrlo niskoj koncentraciji, koja se tokom čuvanja od 90 dana smanjivala, osim u slučaju heptanala. Većina isparljivih alkohola, aldehida i ketona u tartufima potiče iz masnih kiselina iz katabolizma aminokiselina i masnih kiselina. Tako npr. heksanal- aldehid kapronske kiseline, nastaje razgradnjom nezasićenih masnih kiselina dugih lanaca, (linolne i linolenske), a manjim delom potiče i od metabolizma kvasaca. Ima vegetativan miris na zeleno lišće, biljni miris. Sadržaj ketona tokom 90 dana zamrzavanja prikazan je u tabeli 10.

Tabela 10. Sadržaj ketona u tartufima tokom 90 dana skladištenja pri različitim režimima zamrzavanja

Jedinjenja	Formul a	RI	R.T. min	Dani	Svež tartuf	Režimi zamrzavanja				
						-20°C*	TečniN -20°C**	-80°C*	Tečni N -80°C**	Liof iliz.
2-Butanon	C ₄ H ₈ O	880	2,230	% od ukupnih isparljivih jedinjenja						
				0	1,67	48,7	48,7	48,7	48,7	1,61
				30		35,4	29,3	32,4	39,4	1,5
				60		39,8	43,3	24,0	39,8	1,6
				90		39,2	41,9	37,5	35,2	1,5
2,3- Butandion	C ₄ H ₆ O ₂	994	3,289	0	0,56	0,2	0,2	0,2	0,2	0,37
				30		0,1	0,2	0,1	0,1	0,17
				60		0,1	0,1	0,2	0,1	0,15
				90		0,1	0,1	0,1	0,1	0,15
2,3- Pentandion	C ₅ H ₈ O ₂	105 6	5,316	0	0,67	0,4	0,4	0,4	0,4	0,28
				30		0,1	0,2	0,2	0,1	0,1
				60		0,2	0,1	0,3	0,2	0,1
				90		0,2	0,1	0,1	0,2	0,1
3-Oktanon	C ₈ H ₁₆ O	125 7	12,69 3	0	2,49	0,1	0,1	0,1	0,1	2,35
				30		0,2	0,2	0,3	0,3	2,0
				60		0,2	0,9	0,3	0,2	1,5
				90		0,6	0,8	0,7	0,7	1,0

*zamrzavanje na -20°C odnosno na -80°C; **zamrzavanje u tečnom azotu i čuvanje na -20°C odnosno -80°C

Ketoni su veoma važne komponente aromatičnih jedinjenja tartufa. Takođe, ketoni se javljaju kao aromatične isparljive supstance i drugih pečuraka, sintetizovane putem *beta*-oksidacije masnih kiselina. U ovom radu 2-butanon je dominantna isparljiva ketonska komponenta. Osim njega, rezultati su pokazali da u okviru ketona se pojavljuju: 2,3-butandion, 2,3-pentandion, 3-oktanon. Prisustvo ovih ketona izvesno je dokazano u nekim crnim tartufima (Vahdatzadeh et al., 2015). Koncentracija 2-butanona se višestruko povećala (24 puta) u svim režimima zamrzavanja, osim kod liofilizacije u nultom danu u odnosu na svež tartuf i održavala na visokom nivou sve do 90. dana čuvanja. Kod liofilizacije, sadržaj ovog jedinjenja u nultom danu je bio približan kao kod svežeg tartufa i na tom nivou se održavao do kraja procesa čuvanja. Sadržaj jedinjenja 2,3-butandiona se duplo smanjio režimom zamrzavanja u nultom danu i do kraja čuvanja se nije značajno menjao. Jedinjenje 2,3-pentandion je registrovan kod svežeg tartufa, a nakon smrzavanja udeo ovog ketona se pojavljuje u ukupnom sadržaju ketona i nije se značajno menjao do kraja perioda čuvanja. Što se tiče jedinjenja 3-oktanona, njegova koncentracija se u nultom danu smanjila u svim režimima zamrzavanja, osim kod liofilizacije. Tokom čuvanja, koncentracija se povećavala u 90. danu pri svim režimima zamrzavanja, pri čemu se opet pokazao izuzetak kod procesa liofilizacije.

Uzorci *T. aestivum* sa aromatskim profilima u kojima dominira 3-oktanon (ponekad i u kombinaciji sa 1-okten-3-olom) imaju karakterističan truli miris. Molinier i sar. (2015) su pokazali da prisustvo dimetil sulfida (>60%) i 1-metiltio- 1-propena-, E- (> 25%) takođe doprinose njegovom neprijatnom bukeu. 2-butanon se javlja u različitim vrstama gomolja i zabeležen je u plodonosnim telima *T. magnatum* (Schmidberger i Schieberle, 2017), a takođe je prisutan u niskim nivoima u nezrelim tartufima. Strojnik i sar. (2020) su naveli da se čini da je 2-butanon pokazatelj kvaliteta za *T. aestivum* jer su svi uzorci sa malim količinama (<15%) imali neprijatan truli miris, osim uzoraka sa visokim količinama 1-okten-3-ola (≤80%) prijatnog mirisa.

Cullere i sar. (2013) su pokazali da kod smrznutih uzoraka ima više jedinjenja kao što su 1-okten-3-ol i 1-okten-3-on. Prilikom zamrzavanja, utvrdili su pojavu mekane teksture, atipičan miris (slatko

pečeni kolačići) i prisustvo velikih količina 3-oktanona (20-50%). Sadržaj alkohola u tartufima tokom 90 dana zamrzavanja prikazan je u tabeli 11.

Tabela 11. Sadržaj alkohola u tartufima tokom 90 dana skladištenja pri različitim tretmannima zamrzavanja

Jedinjenja	Formula	RI	R.T. min	Dan	Svež tartuf	Režimi zamrzavanja				
						-20°C*	Tečni N -20°C **	-80°C*	Tečni N -80°C **	Liofil iz.
						% od ukupnih isparljivih jedinjenja				
Etanol	C ₂ H ₆ O	922	2,614	0	18,36	0,7	0,7	0,7	0,7	0,00
				30		1,2	1,3	1,5	1,2	0,00
				60		1,1	2,1	0,9	1,1	0,00
				90		0,8	2,6	1,4	0,8	0,00
2-butanol	C ₄ H ₁₀ O	1023	4,253	0	17,90	14,0	14,0	14,7	14,0	0,02
				30		29,2	21,0	28,6	29,0	0,01
				60		29,1	24,0	34,0	29,0	tr
				90		24,1	22,0	19,4	22,1	tr
1-propanol	C ₃ H ₈ O	1034	4,503	0	0,64	0,5	0,5	0,5	0,5	0,02
				30		1,1	1,6	0,7	1,1	tr
				60		1,1	0,4	1,2	1,1	tr
				90		0,4	0,5	0,4	0,4	tr
2-metil-1-propanol	C ₄ H ₁₀ O	1089	6,390	0	1,02	0,5	0,5	0,5	0,5	tr
				30		0,3	0,3	0,6	0,3	tr
				60		0,4	0,6	0,5	0,4	tr
				90		0,5	0,6	0,7	0,4	tr
2-metil-1-butanol	C ₅ H ₁₂ O	1215	10,961	0	12,13	0,6	0,6	0,6	0,6	1,2
				30		1,1	0,2	2,2	0,3	1,1
				60		1,0	0,8	2,1	0,3	1,2
				90		1,3	0,8	2,0	0,8	1,2
1-octen-3-ol	C ₈ H ₁₆ O	1467	18,930	0	2,49	2,1	2,1	2,1	2,1	2,42
				30		2,3	4,9	2,8	5,3	2,3
				60		2,4	2,4	2,7	4,6	2,2
				90		2,6	2,5	2,4	3,6	2,4

*zamrzavanje na -20°C odnosno na -80°C; **zamrzavanje u tečnom azotu i čuvanje na -20°C odnosno -80°C; Tr-tragovi

U pogledu sadržaja alkohola, praćeno je 6 jedinjenja tokom 90 dana čuvanja: etanol, 2-butanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol i 1-octen-3-ol. Tokom istraživanja, utvrđeno je najveće prisustvo 2-butanola, pri čemu režimi zamrzavanja nisu imali uticaja na sadržaj 2-butanola u nultom danu, a tokom vremena relativni udeo ovog jedinjenja se značajno povećavao do 90. dana, tako da je u 90. danu smrznutih tartufa, sadžaj bio veći nego u svežem tartufu. Najveće koncentracije ovog jedinjenja su dobijene smrzavanjem na -20°C u 90. danu. Takođe se pokazalo da u slučaju primene liofilizacije, sadržaj ovog jedinjenja se drastično smanjio. U pogledu sadržaja 1-octen-3-ola, efekat samog zamrzavanja je bio sličan kao kod 2-butanola u nultom danu, a takođe i tokom čuvanja 90 dana, sadržaj 1-octen-3-ol se povećavao. Ova dva jedinjenja su veoma važna u doprinosu formiranja arome tartufa, pa se može zaključiti da se primenjenim režimima zamrzavanja nakon 90 dana, sadržaj navedenih alkohola povećava u odnosu na sadržaj u svežem tartufu. Ovi rezultati su od velikog značaja za očuvanje arome na dug period u zamrznutim uslovima. Autori Janssen i sar. (2007), Menottai sar., (2004), Splivallo i sar. (2007), su izjavili da su jedinjenja sa

osam ugljenika veoma važna za aromu gljiva jer daju karakterističan miris. Splivallo i sar. (2015) takođe ih je pronašao u nekoliko vrsta tartufa (*T. borchii* i *T. indicum*). Veruje se da 1-okten-3-ol deluje kao signal biljkama (Barbieri et al., 2005). 1-okten-3-ol (oktenol, alkohol pečurki) privlači insekte (komarce). Ovaj alkohol je prisutan u ljudskom dahu i znoju (Barbieri et al., 2007). Oktenol se ponekad koristi u kombinaciji sa CO₂ za privlačenje insekata elektronskim uređajima koji uništavaju insekte (Buzzini et al., 2005; Pacioni et al., 2007; Stielow i Menzel, 2010).

U našoj studiji, ovo jedinjenje je otkriveno u svim testiranim uzorcima. Njegova koncentracija se povećava tokom procesa zamrzavanja i tokom skladištenja.

Jedinjenje 2-metil-1-butanol je takođe važna komponenta arome tartufa. Ovo jedinjenje se dobija katabolizmom masnih kiselina, dobro je zastupljeno među vrstama tartufa, naročito kod *T. melanosporum* (Vahdatzadeh i Splivallo, 2018). Koncentracija 2-metil-1-butanola je pokazala trend rasta u uzorcima čuvanim na -20°C i -80°C tokom 90 dana. Alkoholi oksidacijom prelaze u odgovarajuće aldehide, ketone i kiseline. Tako bi 2-butanol mogao da se transformiše u 2-butanon i dalje transformacije mogu dovesti do 2-metilpropanala, 3-metilpropanala ili 2-butanala (March et al., 2006).

Prema podacima Palacios i sar. (2012), ključne komponente odgovorne za aromu tartufa posle liofilizacije u slučaju *T. melanosporum* su bile 2-metil-1-propanol i keton 2-butanon, čija se koncentracija povećala, dok se sadržaj 3-metil-butanala i 2-metil-propanona smanjivao. Kod *T. aestivum* su utvrdili da se veliki procentualni udeo 2-butanola smanjio procesom liofilizacije sa 40% na 1%, što je u saglasnosti sa našim dobijenim rezultatima.

Sadržaj furana u tartufima tokom 90 dana zamrzavanja prikazan je u tabeli 12.

Tabela12. Sadržaj furana u tartufima tokom 90 dana skladištenja pri različitim režimima zamrzavanja

Jedinjenja	Formula	RI	R.T. min	Dan	Svež tartuf	Režimi zamrzavanja				
						-20°C*	Tečni N -20°C**	-80°C*	Tečni N -80°C**	Liofil iz.
						% od ukupnih isparljivih jedinjenja				
Furan	C ₄ H ₄ O	804	1,573	0	0,97	0,4	0,4	0,4	0,4	0,74
				30		0,4	0,8	0,5	0,5	0,6
				60		0,4	0,4	0,7	0,6	0,5
				90		0,1	0,1	0,1	0,1	0,3
3-metil-furan	C ₅ H ₆ O	856	1,995	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
				30		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
				60		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
				90		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Penil furan,2-	C ₅ H ₁₂ O	1229	11,827	0	tr	tr	tr	tr	r	0,00
				30		tr	tr	tr	tr	0,00
				60		0,1	0,1	tr	tr	tr
				90		0,1	0,2	tr	tr	tr
2-Furanmetianol	C ₅ H ₆ O ₂	1673	22,003	0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,66
				30		0,2	0,3	0,5	0,2	0,3
				60		0,2	0,6	0,2	0,1	0,2
				90		0,4	0,8	1,0	0,4	0,3

*zamrzavanje na -20°C odnosno na -80°C; **zamrzavanje u tečnom azotu i čuvanje na -20°C odnosno -80°C

Rezultati su pokazali da klasu derivata furana predstavljaju furan, 3-metil-furan, 2-pentil-furan i 2-furan-metanol. Među njima, jedinjenje furan pokazuje najšire razlike u koncentraciji u zavisnosti od uslova rada. U pogledu sadržaja ovog jedinjenja, liofilizacija se pokazala kao nešto bolji režim zamrzavanja u odnosu na ostale. Razmatrajući furane i furanone Díaz i sar. (2003) su detektovali 2-

pentilfuran u *T. escavatum*, *T. aestivum* i *T. melanosporum* preko SPME. Ova jedinjenja imaju karakterističan miris voćne, zelene i zemljane biljke sa nijansom sličnom povrću. Mauriello i sar. (2004) su utvrdili da dihidro-5-pentil-2 (3H) furanon ima miris na kokos, krem, vosak, slatko, mastan i uljni i 2 (5 H) furanon tipičan miris na maslac.

Furaneol, koji se često opisuje kao atribut „karamele“ i „slatkog“ mirisa (Cullere et al., 2010) je povezan sa slatkastim ukusom, zajedno sa γ -dekalaktonom, koji su drugi autori opisali kao „voćne“ i „slatke“ note (Du et al., 2010).

5.5. TRETMANI ZA DEKONTAMINACIJU TARTUFA

Tartufi su veoma cenjeni pre svega kao aromatična komponenta koja se može dodati u hranu, pa se kao glavni problem postavlja kako sačuvati njihove aromatične karakteristike, koje se obično gube kao posledica uslova čuvanja (Bellesia et al. 1998, 2001).

Kada se radi o dodavanju tartufa u hranu, veoma je važno razmotriti i drugi aspekt njihove primene, a to je aspekt mikrobiološke bezbednosti. Imajući u vidu da se tartufi vade iz zemljišta, koje predstavlja bogat izvor veoma različitih mikroorganizama, postoji velika verovatnoća da se različiti mikroorganizmi mogu naći na plodonosnom telu tartufa. Ovo je naročito problem, ako se uzme u obzir hrapava površina tartufa, sa koje je teško odstraniti mikroorganizme pranjem i četkanjem.

Kada se uzme u obzir da se tartufi konzumiraju najčešće narendani preko tanjira gotovog obroka, bez prethodnog termičkog tretmana, rizik po bezbednost konzumacije se javlja kao potpuna realnost.

Imajući u vidu da se u ovom radu tartufi dodaju u proizvodnju sira, koji ima period zrenja od tri meseca, jasno je da mikroorganizmi sa površine tartufa predstavljaju rizik za bezbednost sira, a takođe mogu dovesti i do nepravilnog procesa zrenja sira, a samim time i do kvarenja i promene kvaliteta sira.

S obzirom da je u ovom radu sa površine i unutrašnjosti askokarpa tartufa identifikovano nekoliko različitih vrsta zemljišnih mikroorganizama (tabele 4, 5, 6) njihovo prisustvo u siru bi bilo nepoželjno.

Jasno je da dodavanju tartufa u proizvodnji sira mora prethoditi neki od tretmana njegove dekontaminacije, a sa druge strane, cilj je sačuvati aromatične materije tartufa.

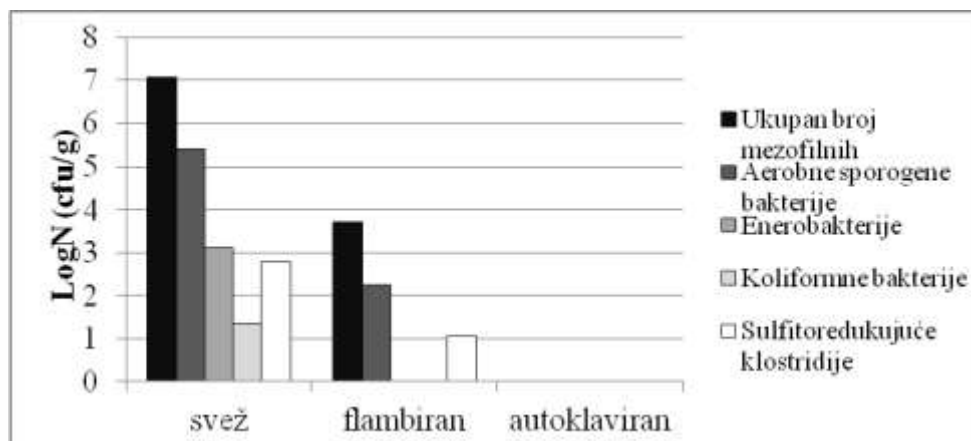
5.5.1. Mikrobiološki status tretiranih tartufa

U ovom radu razmotren je aspekt dekontaminacije tartufa u cilju mikrobiološke bezbednosti, a sa druge strane praćen je i sastav aromatičnih materija, kako bi se odabrao optimalni način za bezbednu primenu tartufa u proizvodnji sireva, a da se sačuvaju aromatične materije. Kao najbezbedniji način pripreme tartufa, odabran je postupak autoklaviranja tartufa i postupak flambiranja (potapanje u alkoholu i spaljivanje na plameniku).

Rezultati mikrobiološkog statusa tartufa nakon tretmana dekontaminacije su prikazani u tabeli 13 i grafikonu 1.

Tabela 13. Mikrobiološki status tartufa pre i nakon tretmana dekontaminacije

	Svež (cfu/g)	Flambiran (cfu/g)	Autoklaviran (cfu/g)
Ukupan broj mezofilnih	$1,2 \times 10^7$	$5,2 \times 10^3$	-
Aerobne sporogene bakterije	$2,5 \times 10^5$	$1,7 \times 10^2$	-
Enerobakterije	$1,3 \times 10^3$	-	-
Koliformne bakterije	$2,2 \times 10$	-	-
Sulfitoredukujuće klostridije	$6,2 \times 10$	$1,1 \times 10$	-



Grafikon 1. Logaritam broja mikroorganizama u tartufima nakon tretmana dekontaminacije

Kao što je bilo i očekivano, postupak dekontaminacije autoklaviranjem je pokazao bolji efekat, gde je postignuta potpuna sterilnost, dok je postupak flambiranja pokazao takođe veoma dobar učinak. Kod svežeg tartufa, koji je bio opran četkom pod mlazom vode, prisustvo od 10^7 cfu/g mezofilnih bakterija pre tretmana, koji se postupkom flambiranja smanjio na nivo od 10^3 cfu/g. U okviru ukupnog broja mezofilnih bakterija dominantne su bile vrste roda *Bacillus*, koje su u svežem tartufu bile na nivou 10^5 cfu/g, a nakon flambiranja broj je bio 10^2 cfu/g. Enterobakterije i koliformne bakterije nisu detektovane u flambiranom tartufu, a broj sulfitoredukujućih klostridija je pao na 11 cfu/g. Ovi rezultati su bili očekivani, s obzirom da je u izolaciji i identifikaciji mikroflora sa površine i unutrašnjosti askokarpa pokazano da je najveći broj izolata bio iz roda *Bacillus* (tabela 5). Do sličnih rezultata su došli i drugi autori, koji su pokazali da prisustvo α , β , γ -proteobakterija, spirogenih bakterija su veoma rasprostranjeni kod *T. aestivum*-a (Barbieri et al., 2005). Nazzaro i sar. (2007) su pokazali da se mikrobiološki profil *T. aestivum* sastojao od uglavnom od laktobacila, laktokoka, mikrokoka, klostridija i enterobakterija. Ukupan broj mezofilnih aerobnih bakterija kod sveže izvađenih tartufa raličitih vrsta je bio u granicama od 10^7 - 10^8 cfu/g (Barbieri et al., 2005, 2007; Nazzaro et al., 2007). Takođe, Nazzaro i sar. (2007) su pokazali da kod *T. aestivum* broj mikroorganizama u periodu od nultog do 30. dana čuvanja na 4°C je bio konstantan, osim sadržaja enterokoka čiji se sadržaj povećao četiri puta. Bakterijske vrste koje su nađene kod tartufa su opisane najčešće kao bakterije rizosfere korena, ukazujući na interakciju sa biljkom (Berg et al., 2005). Koliko askokarp tartufa predstavlja rezervoar oportunističkih patogena za ljude, još uvek nije potpuno razjašnjeno. Nekoliko autora su pokazali da podaci o broju prisutne mezofilne mikroflora i njenom ponašanju na niskim temperaturama mogu biti veoma korisni u predviđanju roka trajanja tartufa (Liu et al., 2006).

Ovakve analize su veoma korisne, imajući u vidu da tartufi predstavljaju specifičan ekosistem, a prisutna mikroflora, koja je vezana za tartuf, uslovljava njegovu degradaciju utičući na njegov rok trajanja. Kao što su pokazali Saltarelli i sar. (2008) kod različitih vrsta tartufa, među kojima je bio i *T. aestivum*, tokom čuvanja 4-8 dana na 4°C dolazi do brzog porasta broja prisutne mikrobne populacije, a nakon 15 dana broj dostiže nivo od 10^{10} cfu/g. Mikrobiološka analiza uzoraka tartufa smrnutih na -20°C , a potom čuvanih na 4°C pokazala je smanjenje broja prisutnih bakterija tartufa, dok je čuvanje samo na 4°C dovelo do povećanja broja bakterija u roku od 48 h, gde je dominantna mikroflora pripadala psihrofilnim vrstama.

Različiti autori su ispitivali primenu različitih tehnika za produženje roka trajanja tartufa, koristeći postupak blanširanja i autoklaviranja (Saltarelli et al. 2008), pa i neke od sofisticiranih metoda kao što je zračenje gama zracima (Nazzaro et al. 2007; Reale et al., 2009). S obzirom da se tartufi konzumiraju bez termičkog tretmana, neophodno je detaljnije ispitati i pratiti mikrobiotu svežeg tartufa, a prioritet, dati garanciji bezbednosti za konzumente, nad senzornim svojstvima.

5.6. AROMATIČNA JEDINJENJA TRETIRANIH TARTUFA I VEŠTAČKE AROME

Razvojem novih instrumentalnih metoda za identifikaciju isparljivih aromatičnih jedinjenja, broj aromatičnih jedinjenja se povećava, pa je i u ovom radu detektovano 87 jedinjenja u tartufima nakon tretmana dekontaminacije, od kojih su izdvojena 26 jedinjenja koja su prikazani u tabeli 14.

Tabela 14. Aromatična jedinjenja u tartufima nakon tretmana

Jedinjenja	Formula	RI	R.T. min	Svež tartuf	Flambirani	Autoklavirani	Opis mirisa (Feng et al., 2019)
				Relativni udeo (%)			
SUMPORNA JEDINJENJA							
Metantiol	CH ₄ S	666	1,266	0,40	0,76	0,01	Kupus, povrće, kuvani krompir
Dimetil-sulfid DMS	C ₂ H ₆ S	737	1,418	3,97	0,15	0,62	Tartuf, kupus, sumpor
Dimetil-disulfid DMDS	C ₂ H ₆ S ₂	1057		0,19	0,14	0,08	Tartuf, Kupus, beli luk
Dimetil-trisulfid DMTS	C ₂ H ₆ S ₃	1373	16,712	0,01	0,01	tr	Tartuf, beli luk, crni luk
3-Metiltio-1-propanol	C ₄ H ₁₀ OS	1724		0,17	0,05	0,01	Vino, beli luk, sir
ALDEHIDI							
Acetaldehid	C ₂ H ₄ O	686	1,294	6,32	8,68	10,34	
2-metil-propanal	C ₄ H ₈ O	816	1,655	5,26	15,44	2,8	Sladovina
2-metil-butanal	C ₅ H ₁₀ O	889	2,344	9,55	9,6	7,08	Kako, badem
3-metil-butanal	C ₅ H ₁₀ O	911	2,511	7,43	7,38	5,32	Lešnik, kakao
Heksanal	C ₆ H ₁₂ O	1068	5,772	0,30	0,28	0,42	Lišće, voće, slatkasto
2-metil-2-butenal	C ₅ H ₈ O	1076	6,132	0,00	0,00	0,00	Voćno, badem lešnik
Heptanal	C ₇ H ₁₂ O	1177	9,771	0,47	0,49	0,32	Svež, masno, zeleno
KETONI							
2-butanon	C ₄ H ₈ O	880	2,230	1,67	1,36	0,35	Slatko-oštar miris
2,3-butanodion	C ₄ H ₆ O ₂	994	3,289	0,56	0,17	0,96	Maslac, kremasto
2,3-pentandion	C ₅ H ₈ O ₂	1056	5,316	0,15	0,11	0,03	
3-oktanon	C ₈ H ₁₆ O	1257	12,693	2,49	0,99	0,01	Lavanda, pečurke
ALKOHOLI							
Etanol	C ₂ H ₆ O	922	2,614	18,36	58,88	26,36	
2-butanol	C ₄ H ₁₀ O	1023	4,253	0,01	0,01	0,01	Plastika

1-propanol	C ₃ H ₈ O	1034	4,503	0,64	0,69	0,43	Slatkasto
2-metil-1-propanol	C ₄ H ₁₀ O	1089	6,390	1,02	0,13	0,34	Vino
2-metil-1-butanol	C ₅ H ₁₂ O	1215	10,961	0,07	0,06	0,02	Sir
1-okten-3-ol	C ₈ H ₁₆ O	1467	18,930	1,64	3,05	0,22	Beli luk, pečurke, zemljište
FURANI							
Furan	C ₄ H ₄ O	804	1,573	0,97	0,37	0,17	
3-metil-furan	C ₅ H ₆ O	856	1,995	0,01	0,04	0,00	
2-furan-metanol	C ₅ H ₆ O ₂	1673	22,003	0,2	0,23	0,06	
2-pentil-furan	C ₅ H ₁₂ O	1229	11,827	0,00	0,00	0,00	Voćkasto, zeleno, zemljišno

Rezultati sadržaja aromatičnih jedinjenja u tartufima, nakon flambiranja i autoklaviranja, su pokazali da je u pogledu sadržaja izdvojenih jedinjenja, flambiranje postupak kojim se bolje čuvaju aromatične materije u tartufu. Izutetak se pokazao kod sadržaja DMS, acetaldehida, heksanala, 2-metil-1-propanola i 2,3-butanediona.

U odnosu na aromatična jedinjenja svežeg tartufa, kod flambiranih tartufa se pokazalo da je kod sumpornih jedinjenja sadržaj metantiola bio veći, dok je sadržaj DMS bio manji, a sadržaj ostalih sumpornih jedinjenja je bio približan.

Što se tiče sadržaja aldehida, pokazalo se da se kod flambiranih tartufa povećao sadržaj acetaldehida, a sadržaj 2-metil-propanala, se povećao čak tri puta u odnosu na svež tartuf. Sadržaj ostalih aldehida kod svežeg i flambiranih tartufa je bio približan.

Sadržaj ketona kod flambiranih tartufa se nije značajno razlikovao u odnosu na svež tartuf, osim kod sadržaja 3-oktanona, koji se smanjio jedan i po put.

Kada je u pitanju sadržaj alkohola, relativni udeo etanola je bio najveći kod svih uzoraka, u odnosu na ostale alkohole. Kod autoklaviranog i flambiranog tartufa, sadržaj etanola je bio znatno veći u odnosu na svež tartuf, naročito kod flambiranog, pri čemu je sadržaj etanola bio tri puta veći u odnosu na svež tartuf. To se delom može objasniti samim postupkom flambiranja, koji podrazumeva potapanje plodonosnog tela tartufa u 70% etanol. Takođe treba istaći da u flambiranim tartufima se za oko dva puta povećao sadržaj i 1-okten-3-ola, koji ima važnu ulogu u formiranju arome tartufa.

U pogledu sadržaja furana nije bilo značajnih razlika između tretiranih i svežih tartufa. Isparljiva jedinjenja tartufa su bila predmet istraživanja većeg broja autora, gde su primenom različitih tehnika za identifikaciju dobijeni podaci da je moguće izdvojiti 40 jedinjenja kod *T. aestivuma*, 70 kod *T. melanosporum*-a (Díaz et al., 2003), 29 kod *T. borchii* i 36 kod *T. magnatum* (Giocchini et al., 2008).

Veštačka aroma koja je primenjena u proizvodnji jedne varijante sireva je imala samo 6 aromatičnih komponenti, što je prikazano u tabeli 15.

Tabela 15. Aromatična jedinjenja veštačke arome

Jedinjenje	R.T.(min)	Peak area	Peak%	Relativni udeo (%)
Monometil karbonotritioat	4,07	1767012	0,48	0,46
Dimetil-disulfid DMDS	5,214	620567	0,17	0,16
2,4-ditiopentan	13,791	3,65E+08	100	94,91
Sirćetna kiselina	18,873	1339861	0,37	0,35
N1	21,934	210628	0,06	0,06
N1	26,501	15620433	4,28	4,06

Aromatični sastav veštačke arome je pokazao da najveći deo aromatičnosti pripada sumpornim jedinjenjima. Najveći udeo pripadao je jedinjenju 2,4-ditiopentan, sa relativnim udelom od 94,91%, dok je DMDS bio zastupljen samo sa 0,16%. Prema literaturnim podacima, poznato je da se prisustvo 2,4-di-tio-pentana vezuje samo za aromatične materije belog tartufa *T. magnatum* (Spinnler et al., 2001; Splivallo et al., 2012; Stojnik et al., 2020).

Veštačka aroma, koja je korišćena u ovom radu je bila francuske proizvodnje i deklarirana kao aroma crnog tartufa. Ovakva pojava govori o tome koliko su proizvođači veštačkih aroma neinformisani o pripadnosti određenih aromatičnih jedinjenja u određenim vrstama tartufa. S obzirom da je miris belog tartufa mnogo cenjeniji od crnog, baziranje sastava veštačke arome na ovom jedinjenju je imalo za pretpostavku da proizvod sa dodatkom ove arome treba da ima primamljiv miris za potrošače. Međutim, rezultati senzorne ocene ovog rada su pokazali da su ocenjivači prepoznavali ovaj miris kao neprirodan i suviše jak, te se odavao kao veštački dodatak u siru.

5.7. MIKROBIOLOŠKI STATUS SIREVA

Kada se radi o mikrobiološkom statusu sireva, postoje dva aspekta. Jedan se odnosi na mikrobiološku bezbednost i higijenu, a drugi na aktivnost bakterija mlečne kiseline, koje su velikim delom odgovorne za pravilnu fermentaciju i proces zrenja sireva. U tom smislu, kao važan faktor, prati se broj starter kultura, a ukoliko su dodate i probiotske bakterije, utvrđuje se da li je njihovo prisustvo u dovoljno visokom broju, koji je potreban da bi se zadovoljio probiotsko-zdravstveni efekat (Salminen et al., 1998).

Što se tiče bezbednosti sireva sa dodatkom tartufa, neophodno je bilo obratiti posebnu pažnju na opasnost unošenja nepoželjnih mikroorganizama u samu proizvodnju sireva, pa su stoga primenjeni tretmani dekontaminacije, koja su opisana u odeljku 5.5.

S obzirom da proces autoklaviranja podrazumeva potpunu sterilizaciju i da je mogućnost kontaminacije tartufima nakon ovog načina termičkog tretmana skoro odbačena, potrebno je bilo da se posebna pažnja obrati na tretman flambiranja. Imajući u vidu da se tartufi vade iz zemljišta i da je površina tartufa veoma neravna, postoji opasnost od opstanka sporogenih bakterijskih vrsta. Sa druge strane, sam postupak proizvodnje sireva može biti izložen kontaminaciji nepoželjnim mikroorganizmima, pa se kao uobičajeni parametar higijene proizvodnje utvrđuje prisustvo enterobakterija.

Zbog svega navedenog, kao parametar higijene, određivano je prisustvo enterobakterija, a sa aspekta bezbednosti, ispitivano je prisustvo sporogenih sulfitoredujućih klostridija (Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa, 2010).

Tabela 16. Mikrobiološki status sireva nakon 10 dana zrenja

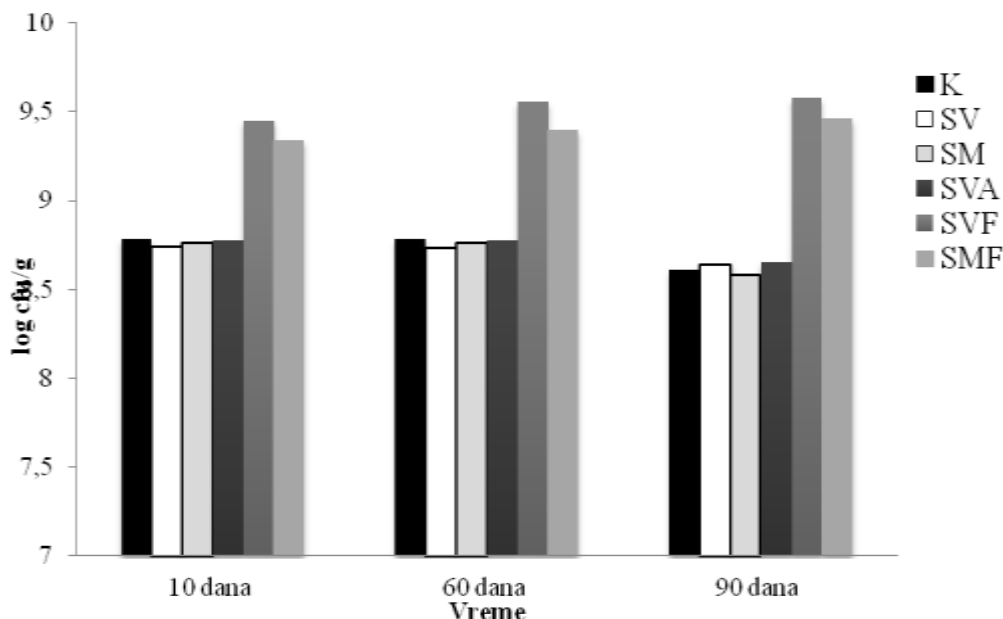
Varijanata sira	Broj mikroorganizama (cfu/g)			
	<i>Lb. plantarum</i> 564	Starteri	Enterobakterije	Sulfitoredukujuće klostridije
K	3,9 x10 ⁸	6,1 x10 ⁸	-	-
SV	3,5 x10 ⁸	5,5 x10 ⁸	-	-
SM	4,2 x10 ⁸	5,8 x10 ⁸	-	-
SVA	1,9 x10 ⁸	6,0 x10 ⁸	-	-
SVF	2,7 x10 ⁹	2,8 x10 ⁹	-	-
SMF	2,1 x10 ⁹	2,2 x10 ⁹	-	-

Tabela 17. Mikrobiološki status sireva nakon 60 dana zrenja

Varijanata sira	Broj mikroorganizama (cfu/g)			
	<i>Lb. plantarum</i> 564	Starteri	Enterobakterije	Sulfitoredukujuće klostridije
K	3,6 x10 ⁸	6,1 x10 ⁸	-	-
SV	3,1 x10 ⁸	5,4 x10 ⁸	-	-
SM	4,0 x10 ⁸	5,8 x10 ⁸	-	-
SVA	1,8 x10 ⁸	6,0 x10 ⁸	-	-
SVF	3,5 x10 ⁹	3,6 x 10 ⁹	-	-
SMF	2,2 x10 ⁹	2,5 x 10 ⁹	-	-

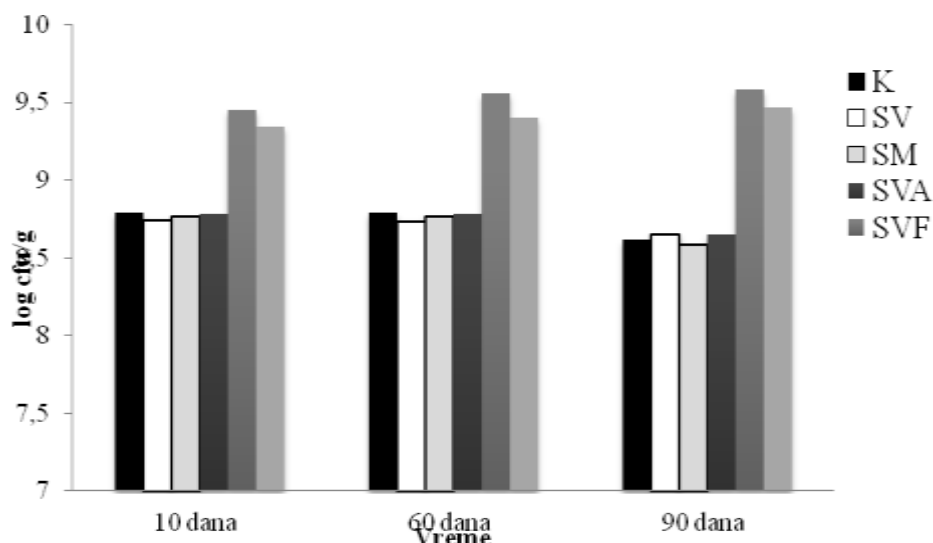
Tabela 18. Mikrobiološki status sireva nakon 90 dana zrenja

Varijanata sira	Broj mikroorganizama (cfu/g)			
	<i>Lb. plantarum</i> 564	Starteri	Enterobakterije	Sulfitoredukujuće klostridije
K	1,1 x10 ⁸	4,1 x10 ⁸	-	-
SV	2,9 x10 ⁸	4,4 x10 ⁸	-	-
SM	3,0 x10 ⁸	3,8 x10 ⁸	-	-
SVA	1,3 x10 ⁸	4,5 x10 ⁸	-	-
SVF	3,7 x10 ⁹	3,8 x 10 ⁹	-	-
SMF	2,8 x10 ⁹	2,9 x 10 ⁹	-	-



Grafik 2. Promene broja starter kultura tokom 90 dana zrenja sireva

Rezultati su pokazali da u svim uzorcima sireva tokom 90 dana zrenja, nije detektovano prisustvo enterobakterija, što je potvrdilo da je postupak proizvodnje sireva zadovoljio higijenske kriterijume. Takođe, odsustvo sporogenih sulfitoredukujućih je pokazalo da je postupak flambiranja pravilno sproveden.



Grafik 3. Promene broja potencijalnog probiotika *Lb. plantarum* 564 tokom 90 dana zrenja sireva

Starter kulture u proizvodnji sireva imaju primarnu ulogu u započinjanju fermentacije, a kasnije i veoma važnu ulogu u procesu zrenja sireva, gde imaju veliki značaj u formiranju senzornih svojstava sireva, što se sveukupno odražava na njihov kvalitet.

Na samom početku i kasnije tokom zrenja sireva se pokazalo da su starter kulture u svim varijantama sireva bile prisutne u visokom broju 8-9 logaritamskih jedinica. Kada se detaljnije analiziraju rezultati, primećuje se da su varijante sa flambiranim svežim i flambiranim smrznutim tartufima imale od početka do kraja zrenja broj od 9 logaritamskih jedinica, dok je kod ostalih varijanti (kontrolni sir bez tartufa, i varijante sa autoklaviranim tartufima i veštačkom aromom), broj starter kultura bio na nivou od 8 logaritamskih jedinica.

Kako starter kulture svojim metabolizmom, glikolitičkom, proteolitičkom i lipolitičkom aktivnošću učestvuju u svim biohemijskim procesima zrenja sireva, veoma je važan njihov broj, koji učestvuje

u formiranju senzornih osobina sireva. S obzirom da je taj broj u svim uzorcima sireva bio na visokom nivou, bilo je za očekivati da senzorni kvalitet sireva bude prihvatljiv, što su rezultati senzorne ocene sireva kasnije i pokazali (tabele 23 i 24).

Kada se radi o varijantama sireva sa dodatim flambiranim tartufima (SVF i SMF) i većem broju ćelija detektovanih starter kultura, koji se za ceo 1 log razlikovao od ostalih varijanti, postavlja se pitanje šta je stimulisalo rast startera u ovim varijantama. Pošto ovakav rezultat nije očekivan i naša dalja istraživanja nisu išla u tom pravcu, može se pretpostaviti da je dodavanje tartufa stimulisalo rast bakterija mlečne kiseline, pre svega aktivnošću enzima tartufa, koji nisu bili uništeni termičkim tretmanom pripreme tartufa (flambiranjem).

S obzirom da sirevi predstavljaju sredinu bogatu laktozom, proteinima i mastima, uz prisustvo mikro i makroelemenata, koji su neophodni kao kofaktori aktivnosti enzima, za očekivati je da su enzimi tartufa imali obezbeđen i substrat i kofaktore za aktivnost i biohemijsku razgradnju složenih jedinjenja sira u niža jedinjenja, koji su bili pogodniji za usvajanje bakterijama mlečne kiseline, što je doprinelo povećanju njihovog broja. Sa druge strane, imajući u vidu da je i sam tartuf bogat aminokiselinama, vitaminima masnim kiselinama, mikroelementima (Al-Mahamdi 2011; Dundar et al., 2012), moglo bi se pretpostaviti da je sam tartuf imao ulogu važnog faktora rasta bakterija mlečnih kiselina.

Ove pretpostavke imaju realnu osnovu, ako se sagledaju rezultati koji govore o koeficijentu zrelosti sireva (tabela 20), gde je pokazano da su ovi koeficijenti zrelosti veći u varijantama sireva sa dodatim flambiranim tartufima, odnosno varijantama sa većim brojem bakterija mlečne kiseline. Kao dodatni razlog povećanja koeficijenta zrelosti sireva, svakako treba razmatrati dodatni efekat povećane aktivnosti i broja bakterija mlečne kiseline, koji je nastao kao posledica dodavanja flambiranih tartufa. Ove konstatacije nas mogu navesti do nove hipoteze da bi dodavanje tartufa u sirevima moglo dovesti do ubrzanja procesa zrenja sireva, a samim tim i do bržeg oslobađanja bioaktivnih komponenata sireva.

Slično promenama broja ćelija starter kultura, dešavale su se i promene autohtone probiotske kulture *Lb. plantarum* 564. S obzirom da je za probiotike, veoma važno prisustvo u velikom broju, dostignuti broj u svim varijantama od 8-9 logaritamskih jedinica je bio veoma zadovoljavajući.

Uzimajući u obzir da dnevni unos probiotskih bakterija u hrani treba da bude 10^8 - 10^9 ćelija, kada se radi o siru, dobijeni broj probiotika u svim varijantama sireva je potpuno zadovoljio ovaj zahtev. Dobijenim rezultatima se pokazalo da bi dnevni unos ovih sireva bio dovoljan da bude samo 1 gram, kako bi se uneo zahtevani broj probiotika. S obzirom da se ova vrsta sireva obično konzumira u desetinama do stotinu grama, dnevni unos bi bio za 1-2 logaritamske jedinice veći od propisanog. Primenom probiotika i ispitivanjem njihove vijabilnosti tokom zrenja holandskih sireva su se bavili mnogi autori (Suarez-Solis et al., 2002), pri čemu je pokazano da su ovi sirevi veoma dobar matriks za rast probiotskih bakterija. Takođe, ispitivana je održivost probiotika i u drugim vrstama sireva, koji imaju kraći period zrenja ili ga uopšte i nemaju, gde je održivost i preživljavanje probiotika znatno bolje, zbog samih uslova rasta probiotika, što podrazumeva veći sadržaj vode, manji procenat soli, kraći period zrenja i dr. (Ong et al., 2007).

Kako je primena probiotika u hrani sve popularnija, pronalaženje novih sojeva ima sve veći značaj, naročito za region sa koga su izolovani (Hermanns et al., 2014; Radulovic et al., 2010; Zago et al., 2011). U tom smislu, primena autohtonih probiotika može doprineti razvoju tehnologija autentičnih proizvoda (Radulović et al., 2017).

U ovom radu je primenjen autohtoni soj *Lb. plantarum* 564, koji je već istraživan u primeni različitih proizvoda od mleka. Pokazano je da je vijabilnost ovog soja u proizvodnji jogurta obogaćenog omega-3-masnim kiselinama bila veoma dobra tokom 21 dana čuvanja i održavala se na nivou od 8-9 logaritamskih jedinica, a takođe i senzorna ocena je bila veoma zadovoljavajuća tj. veća od 90% od maksimalnog kvaliteta (Radulović et al., 2014).

Veoma dobru vijabilnost ovaj soj je pokazao i u proizvodnji kozjeg mekog sira, gde je tokom 56 dana čuvanja, pokazano da se soj *Lb. plantarum* 564 održavao na nivou većem od 7 logaritamskih jedinica, a senzorna ocena ovog sira je bila ocenjena visoka sa 99% od maksimalnog kvaliteta (Radulović et al., 2017).

Visok nivo preživljavanja ovog soja je dobijen i u sirevima od UF mleka, pri čemu je utvrđeno da tokom 56 dana čuvanja, njegov nivo ostaje na nivou od > 6 log jedinica, a senzorni kvalitet je ocenjen sa 95,41 i 98,08% od maksimalno mogućeg kvaliteta što ih svrstava u grupu odličnih sireva (Miočinović et al., 2014).

Bez obzira što su dosadašnja istraživanja koja se odnose na primenu *Lb. plantarum* 564 u proizvodima od mleka bila orijentisana na proizvode od mleka sa većom aw vrednošću, za očekivati je bilo da će ovaj soj pokazati dobru aktivnost i u polutvrdom siru, koji je bio predmet rada ove disertacije.

5.8. HEMIJSKI SASTAV SIREVA

Hemijski sastav i pH vrednost sireva proizvedenih bez i sa tartufima različito pripremljeni pre dodavanja, prikazani su u tabeli 19.

Tabela 19. Sastav i pH vrednost sireva nakon 90 dana zrenja

Varijanta sira	MM	UP	SM	MSM	VBMS	pH
K	33,75±0,35	24,06±0,09	62,04±0,81	54,40±0,14	57,29±0,92	5,46±0,08
SV	30,25±0,35	24,50±0,54	61,85±2,01	48,94±2,16	54,70±3,16	5,43±0,01
SM	30,00±0,71	22,78±1,08	59,51±0,26	50,42±1,41	57,85±0,95	5,44±0,10
SVA	30,25±0,35	23,35±0,27	61,56±0,33	49,15±0,84	55,12±0,76	5,49±0,07
SVF	30,50±0,71	24,72±0,68	63,32±0,17	48,17±1,24	52,78±0,78	5,59±0,15
SMF	32,50±1,41	24,94±0,99	62,22±1,97	52,22±0,62	55,94±1,74	5,43±0,06

MM-sadržaj mlečne masti; UP-sadržaj ukupnih proteina; SM- sadržajsuve materije; MSM-sadržaj masti u suvoj materiji; VBMS- sadržaj vode u bezmasnoj materiji sira

Na osnovu sastava prikazanog u tabeli uočava se da sirevi pripadaju grupi punomasnih sireva. Takođe, prema sadržaju vode u bezmasnoj materiji sira sirevi se mogu svrstati u kategoriju tvrdih sireva, mada su blizu graničnih vrednosti za polutvrde sireve (54%) (Pravilnik, 2014.). Navedeni sastav odgovara grupi sireva holandskog tipa, ali je važno napomenuti da u zavisnosti od brojnih faktora uključujući i stepen zrelosti sastav može značajno varirati.

Jo i sar. (2018), navode da se pH vrednosti komercijalnih Gauda sireva kreće u interval 4,9 do 5,6, a da je prosečna vrednost 5,49 što je u potpunosti u saglasnosti sa našim rezultatima.

Dodavanje tartufa nije značajno uticalo na sastav sireva, kao što je i očekivano s obzirom na količinu njihovog dodavanja. Podaci o uticaju dodatka na sastav i svojstva sireva su veoma oskudni i odnose se pretežno na upotrebu različitih vrsta začina. Prema našim saznanjima do sada uticaj tartufa na sastav i svojstva sireva nije izučavan.

5.9. PROTEOLITIČKI PARAMETRI SIREVA TOKOM ZRENJA

Zrenje sireva je poslednja faza u postupku proizvodnje brojnih sireva, posebno sirišnokoagulišućih. U ovoj fazi odvijaju se brojne biohemijske promene koje obuhvataju promene na proteinima, mastima i ugljenim hidratima, a doprinose formiranju velikog broja različitih jedinjenja koje doprinose definisanju senzornih svojstava sireva. Proteolitičke promene predstavljaju najvažniji segment zrenja sireva i obuhvataju široki skup biohemijskih reakcija koje, zahvaljujući svom obimu i kompleksnosti, predstavljaju preovlađujući deo zrenja sireva. Stoga se promene na proteinima često označavaju kao zrenje sireva u užem smislu (Puđa, 2009). U toku proteolitičkih promena nastaje veliki broj različitih produkata razgradnje kazeina. Početak proteolitičkih promena obeležava nastanak polipeptida, zatim peptida manje molekularne mase, a kao krajnji produkti hidrolize protein, javljaju se aminokiseline koje se u kasnijim fazama mogu razlagati do brojnih jedinjenja. Kod različitih vrsta sireva, proteoliza se odvija u različitom obimu i na nju utiče veliki broj faktora kao što su sastav i pH vrednost sira, posebno sadržaj vode i soli, količina dodatog

enzima, temperature koje se koriste tokom tehnološkog postupka proizvodnje i naravno stepena zrelosti odnosno dužine trajanja zrenja (Miočinović, 2020; Puđa, 2009).

Peptidi koji nastaju razgradnjom kazeina tokom zrenja sireva su rastvorljivi u različitim vrstama rastvarača i na osnovu odabira rastvarača i primenjene metode ekstrakcije može se vršiti određivanje sadržaja peptida različite veličine. Najzastupljeniji rastvarač koji se koristi u ekstrakciji peptida koji nastaju tokom zrenja sireva je voda. Naime, jedan od najznačajnijih indikatora zrenja je sadržaj u vodi rastvorljivih azotnih materija. Ekstrakcija sa vodom efektivno separiše srednje i male peptide, kao i aminokiseline, koji nastaju razgradnjom proteina i velikih peptida, pretežno aktivnošću himozina i plazmina, a u manjoj meri enzimima startera. Smatra se da najveći deo u void rastvorljivog azota, RN, čine peptidi koji nastaju razgradnjom α_{s1} -kazeina delovanjem himozina ili β -kazeina pod uticajem plazmina (Miočinović, 2015).

Sadržaj u vodi rastvorljivih azotnih materija predstavlja značajan indikator zrenja sireva, posebno primarnih proteolitičkih promena, i razlikuje se u zavisnosti od vrste sira. Odmicanjem perioda zrenja sireva i favorizovanjem proteolize povećava se sadržaj u vodi rastvorljivih azotnih materija. Sirevi sa dugim i izraženim periodom zrenja imaju viši sadržaj RN u odnosu na sireve sa kraćim periodom zrenja. Sadržaj u vodi rastvorljivih azotnih materija se najčešće izražava kao udeo u ukupnim azotnim materijama. Ovaj parametar se naziva koeficijent zrelosti sira (KZ). Kod pojedinih vrsta sireva koeficijent zrelosti se značajno razlikuje, a takođe se povećava sa odmicanjem perioda zrenja.

Proteoliza sireva bez i sa tartufima je ispitivana određivanjem u vodi rastvorljivih azotnih materija odnosno koeficijenta zrelosti nakon 90 dana zrenja što je prikazano u tabeli 20.

Tabela 20. Koeficijent zrelosti (KZ) sireva nakon 90 dana

Varijanta sira	RN	UN	KZ
K	0,5444	3,77±0,01	14,44±0,06
SV	0,5694	3,84±0,08	14,83±0,33
SM	0,5946	3,57±0,17	16,67±0,79
SVA	0,5235	3,66±0,04	14,31±0,16
SVF	0,9538	3,87±0,11	24,63±0,68
SMF	0,9970	3,91±0,16	25,53±1,01

RN-rastvorljivi azot u siru; UN-ukupni azot u siru; KZ-koeficijent zrenja sira

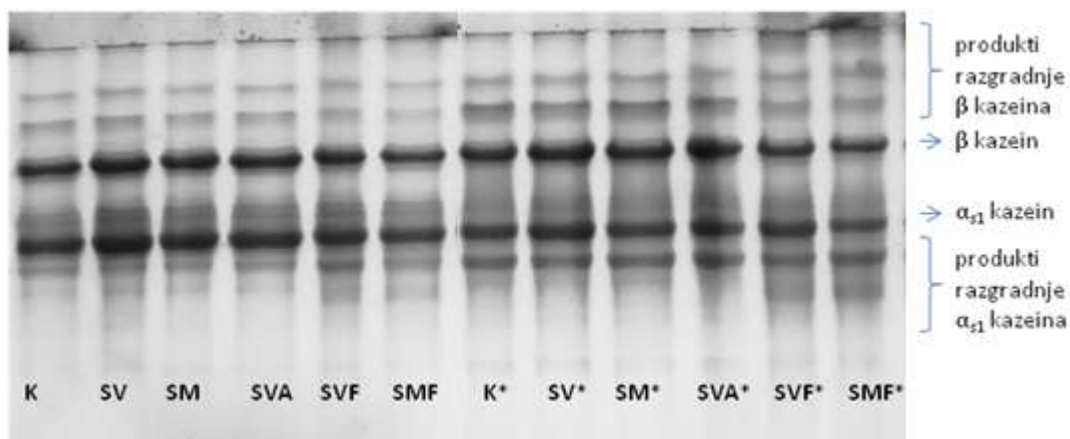
Kao što se uočava iz tabele ustanovljena je značajna razlika u koeficijentu zrelosti između ispitivanih sireva. Naime, kontrolni sir kao i sirevi proizvedeni sa autoklaviranim tartufima bilo pre ili nakon smrzavanja su imali koeficijent zrelosti u interval od 14,31 do 16,67%. S druge strane sirevi proizvedeni sa flambiranim tartufima bez obzira da li su korišćeni sveži ili smrzavani dodaci su pokazali značajno veći koeficijent zrelosti koji se kretao u interval 24,63 do 25,53%. Kao što smo napomenuli stepen zrelosti izražen preko koeficijenta zrelosti kao indikatora zrenja veoma varira i razlikuje se u zavisnosti od različitih vrsta sireva. Primera radi, KZ gaude koji pripada grupi sireva holandskog tipa se kreće u intervalu 13% do 25% nakon 6, odnosno 24 nedelje zrenja (Miočinović, 2015).

Prema našim saznanjima literaturni podaci o uticaju dodavanja tartufa na tok zrenja sireva ne postoje, što ovom radu daje posebnu značajnost, ali takođe i otvara mogućnosti za dalja ispitivanja. Ipak, poslednjih godina su aktuelna istraživanja koja se bave mogućnostima dodavanja različitih vrsta začina kao i njihovom uticaju na svojstva i tok proteolize različitih sireva. Dodavanje različitih vrsta biljnih dodataka se vrši u cilju poboljšanja ili kreiranja novih proizvoda sa specifičnim senzornim svojstvima, kao i radi ostvarivanja uticaja dodataka na poboljšanje njihovih funkcionalnih svojstava (El Sayed et al., 2019). Pored pozitivnog uticaja na senzorna svojstva sireva, upotreba začina može imati i značaja za poboljšanje mikrobiološkog statusa sireva. Kada razmatramo uticaj dodataka na tok i obim proteolize tokom zrenja istraživanja su vršena na nekolicini sireva kao što su sir u salamuri, Ras, Kerkez (Circasian) i drugi (El-Sayed et al., 2020; Gezmiş i Tarakçı, 2020; Tarakçı i Deveci, 2019). Tarakçı i Deveci, (2019) su ustanovili da stepen proteolize zavisi od vrste začina koji se koristi. S tim u vezi, intenzivniji tok proteolize je

ustanovljen sa dodacima kao što su crni kim i biber. Kao razlog povećanja obima proteolize autori navode povećanje aktivnosti prisutnih bakterija kao i enzimskih sistema. Povećanje toka proteolize turskih sireva kerkez proizvedenih sa različitim začinima kao što su kim, biber, bosiljak, korijander, su pratili Gezmiş i Tarakçı, 2020. Ustanovili su povećanje obima proteolize tokom zrenja sireva proizvedenih sa biberom i kimom što ukazuje da uticaj dodataka zavisi od vrste. Veći koeficijent zrelosti je ustanovljen i tokom zrenja Ras sira proizvedenog sa crvenom jalapeno paprikom u poređenju sa sirom bez dodataka (El-Sayed et al., 2020). Autori smatraju da je razlog povećanog obima proteolize usled dodavanja paprike povećanje rasta i aktivnosti prisutnih starter bakterija. Promene proteolitičkih parametara sireva bez i sa tartufima su razmatrane UREA elektroforetskom metodom i rezultati su prikazani na slici 31.

Elektroforeza je fizičko-hemijska metoda za razdvajanje naelektrisanih čestica na osnovu njihove različite pokretljivosti u električnom polju. Elektroforetske tehnike su veoma zastupljene metode u izučavanju odnosno jedan od najboljih načina za razdvajanje, izolaciju i analizu bioloških makromolekula, prvenstveno proteina i nukleinskih kiselina. U zavisnosti šta se ispituje postoji više različitih elektroforetskih tehnika kao što su slobodna koja se vrši u rastvoru i zonska gde se razdvajanje vrši na čvrstoj podlozi, često poliakrilamidnim gelovima.

Urea PAGE je veoma podesan alat za proučavanje proteolize tokom ranih stadijuma zrenja sireva. Razdvajanje frakcija koje nastaju razgradnjom proteina primenom ove tehnike se vrši na osnovu odnosa naelektrisanja i mase molekula. Obzirom da su elektroforetske frakcije kazeina veoma sličnih molekulskih masa, smatra se da je ova metoda elektroforeze podesnija za proučavanje zrenja sireva u odnosu na SDS PAGE. Urea je atraktivna zbog niske cene, što je velika prednost pri prečišćavanju većih količina proteina (Miočinović, 2015).



Slika 31. UREA PAG elektroforetoqram sireva nakon 10 i 90 (uzorci sa *) dana zrenja

Razgradnja α_{s1} kazeina se odvija postepeno pri čemu se kod skoro svih sireva prvo razgrađuje veza između Phe23-Phe24 pri čemu nastaje peptidi α_{s1} I -kazein (f24-199). U daljem toku razgranje peptid α_{s1} I kazein (f24-199) se hidrolizuje u srenje i male peptide najčešće aktivnošću enzima sirila, nativnih enzima i enzima mikroorganizama. Kod većine sireva izraženija je razgradnja α_{s1} frakcije u odnosu na druge delove kazeina.

Kao što se sa slike elektroforetograma uočava, tokom zrenja svih ispitivanih sireva dolazi do razgradnje α_{s1} i β kazeina u određenom obimu. Uočava se, što je u skladu sa rezultatima o koeficijentu zrelosti, da je izraženija proteoliza sireva koji su proizvedeni sa flambiranim tartufima. U literaturi nema podataka o toku proteolize sireva koji su proizvedeni sa ovim dodacima. Naša pretpostavka je da flambirani tartufi sa sobom nose određeni enzimatski sistem koji doprinosi povećanom obimu proteolize. Enzimski sistemi mogu poticati i od većeg broja mikroorganizama koji se mogu naći u flambiranim tartufima, a stvaraju enzime. Ovakvi rezultati su donekle i očekivani s obzirom da je ovakav način pripreme najmanje agresivan odnosno značajno drugačiji u poređenju sa autoklaviranjem koji verovatno u velikoj meri uništava prisutnu mikrobiotu, odnosno mikroorganizme koji potiču od tartufa. Tarakçı i Deveci (2019) navode da je najveći stepen

razgradnje α_{s1} kazeina ustanovljen tokom zrenja sireva proizvedenih sa timijanom (majčina dušica) i biberom (isot pepper), dok je smanjen obim hidrolize ovog dela kazeina ustanovljen kod sireva sa crvenim biberom, kimom i paprikom. Autori smatraju da je tok i obim proteolize usko povezan sa prisutnom mikrobiotom odnosno da antimikrobna aktivnost pojedinih začina može da inhibira proteaznu aktivnost mikroorganizama prisutnih u siru. Ipak, za ove tvrdnje potrebna su dodatna istraživanja kako bi se detaljnije sagledao uticaj dodataka na tok i obim proteolitičkih promena tokom zrenja sireva.

Tokom zrenja sireva razgradnja β kazeina je često povezana sa aktivnošću nativnih enzima plazmina koji preferira hidrolizu ovog dela kazeina. U zavisnosti od uslova tokom tehnološkog postupka proizvodnje kao i sastava sireva zavisi i stepen razgradnje ovog dela kazeina. Kod pojedinih sireva kao što su švajcarski sirevi ili tvrdi italijanski sirevi kod kojih se koriste visoke temperature dogrevanja, aktivnost plazmina je veoma značajna što rezultira intenzivnoj razgradnji β kazeina. Ipak, kod velikog broja sireva uključujući i sireve holandskog tipa kojima pripadaju naši eksperimentalni sirevi, razgradnja ovog dela kazeina je značajno manje izražena u poređenju sa α_{s1} kazeinom (Miočinović, 2020; Puđa, 2009). Sa elektroforetograma možemo uočiti da se i tokom zrenja naših sireva uočava izraženija razgradnja α_{s1} kazeina u poređenju sa β kazeinom. Pojedini autori navode da razgradnja β kazeina zavisi od vrste dodataka koji se koriste u proizvodnji sireva. S tim u vezi, Tarakçı i Deveci (2019) su ustanovili da je intenzitet razgradnje β kazeina najveći tokom zrenja sirevi sa tamjanom, potom sledi sirevi sa kimom i na kraju sa biberom. Ovi autori navode da je kod svih sireva sa začinima izraženija razgradnja β kazeina u poređenju sa kontrolnim sirom, proizvedenim bez začina. Slične rezultate su predstavili i Gezmiş i Tarakçı, (2020) koji su ustanovili da turski sirevi sa začinima imaju povećan obim razgradnje i α_{s1} i β kazeina u poređenju sa kontrolnim sirevima bez dodataka. Stepem razgradnje u velikoj meri zavisi od vrste začina, pa je tako najizraženija razgradnja α_{s1} kazeina ustanovljena tokom zrenja sireva proizvedenih sa kimom, a najintenzivnija hidroliza β kazeina sireva sa crnim biberom. Evidentno je da tok i obim proteolize zavise od enzimskih sistema u siru na koji u određenoj meri utiče vrsta i količina dodataka koji se koriste tokom proizvodnje.

Dalja istraživanja su neophodna kako bi se detaljnije utvrdio uticaj odnosno značaj pojedinih agenasa koji učestvuju u zrenju sireva, a koji potiču od različitih dodataka.

5.10. AROMATIČNA JEDINJENJA SIREVA

Analizom aromatičnih materija u sirevima tokom zrenja je utvrđeno prisustvo 57 jedinjenja, od kojih su izdvojena ona koja su već detektovana u tartufima nakon zamrzavanja i tretmana dekontaminacije i predstavljena su u tabelama 21 i 22.

Tabela 21. Relativni udeo aromatičnih jedinjenja u sirevima nakon 60 dana zrenja

Jedinjenja	Formul a	RI	R.T. min	K	SV	SM	SVF	SMF	SV A	Opis mirisa (Feng et al.,2019.)
				Relativni udeo od ukupnih isparljivih jedinjenja (%)						
SUMPORNA JEDINJENJA										
Metantioi	CH ₄ S	666	1,266	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Kupus, povrće, kuvani krompir
Dimetil- sulfid DMS	C ₂ H ₆ S	737	1,418	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Tartuf, kupus, sumpor
Dimetil- disulfid DMDS	C ₂ H ₆ S ₂	1057		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Tartuf, Kupus, beli luk
Dimetil- trisulfid DMTS	C ₂ H ₆ S ₃	1373	16,71	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Tartuf, beli luk, crni luk
3-metiltio-1- propanol	C ₄ H ₁₀ O S	1724		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Vino, beli luk, sir
2,4- ditiopentan		1281		0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,13	
ALDEHIDI										
Acetaldehid	C ₂ H ₄ O	686	1,294	0,54	0,51	0,45	1,35	1,65	0,77	
2-metil- propanal	C ₄ H ₈ O	816	1,655	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Slad
2-metil- butanal	C ₅ H ₁₀ O	889	2,344	0,03	1,1	0,8	3,1	4,8	0,02	
3-metil- butanal	C ₅ H ₁₀ O	911	2,511	0,19	1,30	0,89	3,40	4,58	0,13	Lešnik, kakao
Hexanal	C ₆ H ₁₂ O	1068	5,772	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Lišće, voće, slatkasto
2-metil-2- butenal	C ₅ H ₈ O	1076	6,132	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Voćno, badem lešnik
Heptanal	C ₇ H ₁₂ O	1177	9,771	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Svež, zeleno
Benzen-acet- aldehid	C ₈ H ₈ O			0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
KETONI										
2-butanon	C ₄ H ₈ O	880	2,230	0,40	0,37	0,35	0,44	0,64	0,36	Slatko- oštar miris

REZULTATI I DISKUSIJA

2,3-butandion	C ₄ H ₆ O ₂	994	3,289	4,74	9,5	5,2	14,5	10,1	4,4	Maslac, kremasto
2,3-pentandion	C ₅ H ₈ O ₂	1056	5,316	0,01	0,02	0,00	0,03	0,01	0,00	Kremast
3-oktanon	C ₈ H ₁₆ O	1257	12,69	0,01	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	Lavanda, pečurke
Aceton	C ₃ H ₆ O	820		2,5	3,25	2,18	4,62	4,26	3,01	
2-pentadion	C ₅ H ₁₀ O			0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Ustajao
2-heptanon	C ₇ H ₁₄ O	1173		0,01	0,01	0,23	0,01	0,08	0,00	Plastičan
3-hidroksi-2-butanon	C ₄ H ₈ O ₂	1294		17,4	18,2	16,3	14,5	9,4	8,5	
ALKOHOLI										
Etanol	C ₂ H ₆ O	922	2,614	74	58,5	18	24,3	22,4	54,2	Alcohol
1-butanol	C ₄ H ₁₀ O	1145		0,00	0,00	0,00	0,00	2,46	0,01	Slatkasto
2-butanol	C ₄ H ₁₀ O	1023	4,253	0,00	0,00	0,02	0,00	0,05	0,00	Plastika
1-propanol	C ₃ H ₈ O	1034	4,503	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
2-metil-1-propanol	C ₄ H ₁₀ O	1089	6,390	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Vinasto
2-metil-1-butanol	C ₅ H ₁₂ O	1215	10,96	0,01	0,02	0,02	0,05	0,10	0,01	Sir, metal
1-okten-3-ol	C ₈ H ₁₆ O	1467	18,93	0,00	0,00	0,00	0,12	0,03	0,00	Beli luk, pečurke, zemljištu
Heksanol	C ₆ H ₁₄ O	1371		0,00	0,03	0,02	0,02	0,03	0,01	
1-pentanol	C ₅ H ₁₂ O	1220		0,01	0,05	0,64	1,5	1,6	0,02	
FURANI										
Furan	C ₄ H ₄ O	804	1,573	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
3-metil-furan	C ₅ H ₆ O	856	1,995	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
2-furan-metanol	C ₅ H ₆ O ₂	1673	22,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
2-pentil-furan	C ₅ H ₁₂ O	1229	11,827	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Voćkast, zeleno

Tabela 22. Relativni udeo aromatičnih jedinjenja u sirevima nakon 90 dana zrenja

Jedinjenja	Formula	RI	R.T. min	K	SV	SM	SVF	SMF	SV A	Opis mirisa Feng et al., 2019
				Relativni udeo od ukupnih isparljivih jedinjenja (%)						
SUMPORNA JEDINJENJA										
Metantioi	CH ₄ S	666	1,266	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Kupus, povrće, kuvani krompir
Dimetil-sulfid DMS	C ₂ H ₆ S	737	1,418	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Tartuf, kupus, sumpor
Dimetil- disulfid DMDS	C ₂ H ₆ S ₂	1057		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Tartuf, Kupus, beli luk
Dimetil- trisulfid DMTS	C ₂ H ₆ S ₃	1373	16,712	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Tartuf, beli luk, crni luk
3-metiltio-1- propanol	C ₄ H ₁₀ O S	1724		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Vino, beli luk, sir
2,4-ditiopentan		1281		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,23	
ALDEHIDI										
Acetaldehid	C ₂ H ₄ O	686	1,294	1,38	1,42	2,15	4,7	3,01	2,8	Miris jabuke
2-metil- propanal	C ₄ H ₈ O	816	1,655	0,5	0,5	0,1	0,9	0,2	0,00	Slad
2-metil- butanal	C ₅ H ₁₀ O	889	2,344	0,3	1,1	1,8	7,1	7,8	0,3	Kako, badem
3-metil- butanal	C ₅ H ₁₀ O	911	2,511	0,67	4,4	1,4	8,9	9,6	0,89	Lešnik, kakao
Hexanal	C ₆ H ₁₂ O	1068	5,772	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,00	Lišće, voće, slatkasto
2-metil-2- butenal	C ₅ H ₈ O	1076	6,132	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Voćno, badem lešnik
Heptanal	C ₇ H ₁₂ O	1177	9,771	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Svež, masno, zeleno
Benzen-acet- aldehid	C ₈ H ₈ O			0,14	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	Gorki badem
KETONI										
2-butanon	C ₄ H ₈ O	880	2,230	0,35	0,50	0,60	0,543	3,5	0,46	Slatko- oštar miris
2,3-butandion	C ₄ H ₆ O ₂	994	3,289	5,25	10,6	18,5	24,3	19,6	9,3	Maslac, kremast
2,3-pentandion	C ₅ H ₈ O ₂	1056	5,316	0,01	0,02	0,00	0,05	0,01	0,0	Kremast
3-oktanon	C ₈ H ₁₆ O	1257	12,693	0,01	0,01	0,01	0,04	0,02	0,0	Lavanda pečurke
Aceton	C ₃ H ₆ O	820		2,25	2,75	,5	3,3	2,5	5,5	

2-pentanon	C ₅ H ₁₀ O	510	1100	0,09	0,20	0,28	1,5	1,18	0,2	Ustajao
2-heptanon	C ₇ H ₁₄ O	1173		0,22	0,15	0,45	2,5	1,35	0,4	Plastičan
3-hidroksi-2-butanon	C ₄ H ₈ O ₂	1294		28,7	24,4	27,5	24,5	27,6	24,2	
ALKOHOLI										
Etanol	C ₂ H ₆ O	922	2,614	58,3	45,4	38,1	39,1	22,1	55,5	Alcohol
1-butanol	C ₄ H ₁₀ O	1145		0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Slatkast
2-butanol	C ₄ H ₁₀ O	1023	4,253	0,00	0,02	0,01	0,41	0,32	0,00	Plastika
1-propanol	C ₃ H ₈ O	1034	4,503	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
2-metil-1-propanol	C ₄ H ₁₀ O	1089	6,390	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Vinasto
2-metil-1-butanol	C ₅ H ₁₂ O	1215	10,961	0,02	0,05	0,05	0,2	0,1	0,01	Sir, metal
1-okten-3-ol	C ₈ H ₁₆ O	1467		0,00	0,00	0,00	0,32	0,22	0,00	Beli luk, pečurke, zemljišt.
heksanol	C ₆ H ₁₄ O	1371		0,00	0,03	0,01	0,00	0,00	0,17	
1-pentanol	C ₅ H ₁₂ O	1220		0,01	0,01	0,03	1,52	1,9	0,01	
FURANI										
Furan	C ₄ H ₄ O	804	1,573	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
3-metil-furan	C ₅ H ₆ O	856	1,995	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
2-furan-metanol	C ₅ H ₆ O ₂	1673	22,003	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
2-pentil-furan	C ₅ H ₁₂ O	1229	11,827	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	Voćkast, zeleno

Analizom prisustva aromatičnih jedinjenja je utvrđeno da se tokom perioda zrenja sadržaj menjao u intervalu od 60. do 90. dana zrenja. U pogledu sastava komponenti aromatičnosti nije bilo značajnih razlika u prisustvu različitih jedinjenja, tako da je u obe tačke ispitivanja detektovano prisustvo sumpornih jedinjenja, aldehida, ketona, alkohola, dok furani nisu detektovani. S obzirom da se aromatična jedinjenja dobijaju brojnim primarnim i sekundarnim biohemijskim reakcijama koje se odvijaju tokom zrenja sireva i da se sadržaj isparljivih komponenti povećava tokom zrenja, razumljivo je da je relativni udeo ovih jedinjenja veći u završnim fazama zrenja. Do sličnih rezultata su došli i Stojnik i sar. (2020) pokazavši da se u starijem gauda siru dobijaju veće količine aromatičnih materija u odnosu na srednje stari i mladi sir. S obzirom da je u ovom radu praćeno zrenje do 90 dana kada se postiže komercijalna zrelost, glavna analiza sadržaja aromatičnih materija će biti upravo na ovoj tački ispitivanja, odnosno kod sireva koji su postigli komercijalnu zrelost. Nakon 90 dana zrenja detektovano je prisustvo sumpornih jedinjenja (1), aldehida (8), ketona (8) i alkohola (9).

Analizom sumpornih jedinjenja je utvrđeno da u svim varijantama sireva bez dodatka veštačke arome nije detektovano prisustvo sumpornih jedinjenja. U varijanti sira sa veštačkom aromom je utvrđeno prisustvo 2,4-ditiopentana i to u 60. danu 0,13% i u 90. danu se povećao na 0,23%. Ovo jedinjenje je u 60. danu u vrlo maloj koncentraciji detektovano i kod varijante sira sa smrznutim

flambiranim tartufom, a kasnije u 90. danu ovo jedinjenje nije detektovano. Imajući u vidu da je jedinjenje 2,4-ditiapentan osnovna komponenta u sastavu veštačke arome, bilo je za očekivati da će se ovo jedinjenje detektovati u varijanti sira gde je dodata veštačka aroma. S obzirom da je 2,4-ditiapentan detektovan u *T. magnatum* kao glavni nosilac arome (Splivalo et al., 2012; Stojnik et al., 2020), ovo jedinjenje nije ni bilo očekivano u ostalim varijantama sireva. Njegova pojava u siru sa flambiranim smrznutim tartufom nije bila očekivana i može se tumačiti kao međuprodukt u biohemijskim transformacijama isparljivih jedinjenja u ovom siru, pogotovo ako se uzme u obzir da ovo jedinjenje više nije detektovano do kraja procesa zrenja.

Nedostatak sumpornih jedinjenja nije bio očekivan kod svih ostalih varijanti sireva, pogotovo što se na senzornoj oceni sireva pokazalo da sirevi imaju prijatan miris na tartufe. Međutim, imajući u vidu da se tokom smrzavanja i termičke dekontaminacije znatno smanjuje sadržaj sumpornih jedinjenja, dodati tartufi u sir su u startu imali nizak sadržaj ovih jedinjenja. Jasno je da je u složenim biohemijskim promenama u siru tokom zrenja došlo do biohemijskih promena u kojima su se ova jedinjenja transformisala.

Interesantno je zapaziti da i u varijanti sira u kojoj je dodat svež tartuf, nisu detektovana sumporna jedinjenja, pogotovo DMS, koji je u svežem tartufu detektovan u visokoj koncentraciji od 3,97% (tabela 8) što potvrđuje pretpostavku da se ovo jedinjenje tokom 60 dana zrenja sira transformisalo, pa samim tim nije ni detektovano. S obzirom da u literaturi nema podataka o promenama isparljivih jedinjenja u sirevima sa tartufima, ne možemo se pozvati na rezultate drugih autora, tako da možemo samo pratiti šta su drugi autori otkrivali o promenama isparljivih jedinjenja sireva holandskog tipa bez dodavanja tartufa. Prema podacima Van Leuven i sar. (2008), utvrđeno je da se sadržaj sumpornih jedinjenja povećava tokom zrenja gauda sira. Prema ovim autorima sadržaj metantiole u siru starom 6 nedelja nije detektovan, a sa zrenjem u siru od 4 meseca do 10 meseci starosti sadržaj ovog jedinjenja se povećavao. DMS nije bio detektovan ni u jednom siru starosti od 6 nedelja do 10 meseci, dok su jedinjenja DMDS i DMTS detektovana u ranijim fazama zrenja i kasnije se njihov sadržaj povećavao.

Detekcija aromatičnih isparljivih materija umnogome zavisi od načina ekstrakcije i načina same detekcije, pa su mnogi autori dobijali veoma različite rezultate o sastavu aromatičnih materija zavisno od tehnike koju su primenjivali za njihovu ekstrakciju. Bertuzzi i sar. (2018) su utvrdili da se DHS (dynamic headspace extraction), TD (thermal desorption), HS-SPME (headspace solid-phase microextraction), P&T (purge and trap), and SDE (simultaneous distillation-extraction) mogu detektovati sumporna jedinjenja kao što su DMDS i DMTS u različitim vrstama sireva i da se dobijene vrednosti mogu značajno razlikovati, zavisno od primenjene tehnike.

Analizom relativnog udela ketona, utvrđeno je da su ona bila najzasupljenija kod varijanti sireva sa svežim i zamrznutim flambiranim tartufima (SVF i SMF), što je u skladu sa podacima o prisustvu ovih jedinjenja kod tartufa pripremljenih za primenu u proizvodnji sireva, tabela 14. Takođe, varijante sireva sa dodatim flambiranim tartufima, su i na senzornoj oceni dobile znatno više ocene u odnosu na varijante sa autoklaviranim tartufima.

Poredeći podatke sadržaja aromatičnih ketona dobijenih iz sireva, sa onima koji su dobijeni u svežim i smrznutim tartufima, utvrđeno je prisustvo 8 ketona u sirevima, dok je u tartufima bilo identifikovano 4 ketonska jedinjenja. Povećan broj detektovanih ketona je svakako posledica niza biohemijskih reakcija, koje se odigravaju u samom siru tokom procesa zrenja. Ovu pretpostavku potvrđuje i činjenica da je većina ovih jedinjenja identifikovana i u kontrolnom siru bez tartufa, pri čemu procesima hidrolize, oksidacije i esterifikacije pored nastanka ketona, nastaju slobodne masne kiseline i estri koji doprinose kompletnom mirisu i ukusu sireva (Alewijn et al., 2005; McSweeney i Sousa, 2000).

Jedinjenje 2,3-butandion je aromatično jedinjenje koje može da nastane aktivnošću starter kultura metabolizmom pirogroždane kiseline i citrata (Jo et al., 2018). Ovu činjenicu potvrđuje i podatak da je ovo jedinjenje identifikovano i u kontrolnom siru bez tartufa (5,25%). Poznato je da se ovo jedinjenje nalazi u sirevima holandskog tipa i nastaje iz diacetila i acetoina koji su povezani reverzibilnim reakcijama, pri čemu daje prijatnu aromu na maslac i krem (Feng et al., 2019).

Međutim, kada se pogledaju vrednosti relativnog udela ovog jedinjenja, evidentno je da je sadržaj ovog jedinjenja u sirevima sa flambiranim tartufima najveći (SVF=24,3% i SMF=19,6%), potom su sirevi sa autoklaviranim tartufima i sirevi sa veštačkom aromom, a kontrolni sir ima najmanji udeo ovog jedinjenja (5,25%). Kod sira sa svežim flambiranim tartufom je utvrđeno znatno veće prisustvo ovog jedinjenja u odnosu na sir sa smrznutim flambiranim tartufom. Veći sadržaj ovog jedinjenja u sirevima sa tartufima je jasna posledica dodavanja tartufa, pogotovo kada se uzme u obzir visok sadržaj ovog jedinjenja u flambiranim tartufima (tabela 14). Treba istaći da su Paloma i sar. (2003), takođe dokazali prisustvo ovog jedinjenja u crnim tartufima Italije.

Što se tiče jedinjenja 2-butanon, može se konstatovati njegova značajna uloga u sastavu ketonskih jedinjenja u svim varijantama sireva. U kontrolnom siru starom 90 dana sadržaj ovog jedinjenja je bio najniži (0,35%), dok je u siru sa smrznutim flambiranim tartufom, sadržaj ovog jedinjenja bio deset puta veći (3,5%). Evidentno je da je smrznuti flambirani tartuf bio odličan nosač ove aromatične komponente u siru. Kod ostalih varijanti, zastupljenost ovog jedinjenja je bila približna (0,46-0,60%). Ovo jedinjenje je inače prisutno u polutvrdim sirevima holandskog tipa (Jo et al., 2018) i ima slatko-oštar miris.

Na račun smanjenja sadržaja alkohola, stvaraju se aldehidi, oksidacijom 2-butanola nastaju 2-butanon (Vahdatzadeh et al., 2019). Takođe, aldehidi mogu nastati od ugljovodonika male molekulske mase (na primer, od butenala nastaje butanon (ozonolizom), od alkina, adicijom vode, mogu da nastanu aldehidi i ketoni).

Za ovo jedinjenje je utvrđeno da se može smatrati jednim od markera arome *T. aestivum* (Palacios et al., 2012). 2-butanon zajedno sa 2-butanolom je detektovan uglavnom u svim uzorcima *T. aestivum*, pri čemu autori ističu da se 2-butanon smatra i markerom kvaliteta, jer svi uzorci koji su sadržali nizak nivo 2-butanona su imali neprijatan miris zemljišta, korenja, osim uzoraka gde je utvrđeno veće prisustvo 1-octen-3-ola, koji su pokazali prihvatljivu aromu (Strojnijk et al., 2020).

Kada su u pitanju ostali ketoni u sirevima od 90 dana, za 2-pentanon i 2-heptanon je utvrđeno najveće prisustvo opet u uzorcima sireva sa flambiranim tartufima, pri čemu je sadržaj u sirevima sa svežim tartufima bio veći. Takođe, ova dva jedinjenja su detektovana i u kontrolnom siru, ali u manjoj zastupljenosti. U uzorcima sireva od 60 dana nije detektovano prisustvo 2-pentanona, dok je sadržaj 2-heptanona bio znatno niži u odnosu na 90. dan (Boltar et al., 2016).

Jedinjenje 3-hidroksi-2-butanon je jedinjenje koje nije bilo detektovano u tartufima za primenu u proizvodnju sireva, dok je u sirevima detektovano sa velikim udelom. U kontrolnom siru je prisutan sa 28,74%, a na sličnom nivou je bio i u svim ostalim varijantama sireva sa dodatim tartufima i aromom (24,20-27,5%). S obzirom na ovako visok udeo ovog jedinjenja u kontrolnim sirevima, ne bi se moglo zaključiti da je dodavanje tartufa imalo uticaj na prisustvo ovog jedinjenja u varijantama sireva sa tartufima.

Jedinjenje 3-oktanon je detektovano sa malim udelom kod sireva sa flambiranim tartufom, a kod kontrolnog sira i sira sa veštačkom aromom nije detektovano. Ovo jedinjenje ima karakterističan miris na pečurke i takođe se smatra jednim od markera mirisa *T. aestivum* (Palacios et al., 2012).

Što se tiče sadržaja aldehida u sirevima od 90 dana, najzastupljenija su bili 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, acetaldehid i 2-metil-propanal. Poredeći sadržaj ovih jedinjenja u varijantama proizvedenih sireva, detektovano je da je najveći relativni udeo ovih jedinjenja bio u varijantama sireva sa flambiranim tartufima, pri čemu je kod sira sa smrznutim flambiranim tartufom udeo ovih jedinjenja veći u odnosu na sir sa svežim flambiranim tartufom (2-metil-butanal, 3-metil-butanal), što se može objasniti "efektom zamrzavanja" (Palacios et al., 2012), jer 2 i 3-metil-butanol prelaze u 2 i 3-metil-butanal na niskim temperaturama. Na osnovu sadržaja ovih jedinjenja, može se reći da se smrznuti tartuf može uspešno primeniti, pri čemu je sadržaj aromatičnih aldehida na znatno višem nivou u odnosu na sve ostale varijante sireva. Sadržaj ovih aldehida je detektovan i u kontrolnom siru, ali na najnižem nivou u odnosu na ostale varijante sireva (tabela 21, 22).

Poznato je da je proteoliza primarna reakcija tokom zrenja sireva, pri čemu se aroma razvija procesima katabolizma peptida i slobodnih masnih kiselina (McSweeney i Sousa, 2000). Smatra se da mali peptidi i slobodne amino kiseline predstavljaju agense formiranja arome kod većine sireva (McSweeney i Sousa, 2000). Nadalje, ova jedinjenja doprinose aromi sireva, kao prekursori

nastanka isparljivih jedinjenja kao što su aldehidi, alkoholi, sumporna jedinjenja i dr. (Yvon i Rijnen, 2001). Putevi degradacija amino kiselina u sirevima su glavni procesi aktivnosti enzima obuhvaćenih procesima deaminacije, transaminacije, dekarboksilacije i dr. (McSweeney i Sousa, 2000). Takođe i hemijska degradacija Strecker-ovom degradacijom je veoma važan put koji se javlja tokom zrenja sireva (Yvon i Rijnen, 2001).

Najzastupljenija jedinjenja u eksperimentalnim sirevima su bila 2-metil-butanal i 3-metil-butanal, čiji se sadržaj u sirevima sa svežim flambiranim tartufima kretao od 7,1-7,8% i smrznutim flambiranim tartufima od 8,9-9,6%. Kod varijanti sireva sa autoklaviranim sirevima i sirevima sa veštačkom aromom, sadržaj ovih jedinjenja je bio znatno niži i kretao se od 0,3-1,8% za 2-metil-butanal i 1,4-2,4% za 3-metil-butanal. Ova jedinjenja su nosioci mirisa na kakao badem i lešnik (Feng et al., 2019) i daju prijatan miris proizvodu. Smatra se da ova jedinjenja potiču iz samih tartufa i da nastaju tako što ih sama gljiva sintetiše i to uglavnom od amino kiselina kao što su leucin i izoleucin (Erlichov put), a kasnije se mogu transformisati do 2-metil-butanola i 3-metil-butanola (Splivallo et al., 2007; Talou et al., 1990). Takođe je potvrđeno da 3-metil-butanal, 3-metil-1-butanol, acetaldehid i heksanal mogu biti produkti metabolizama nekih bakterija (Combet et al., 2006). S obzirom da je u sirevima prisutna brojna mikrobiota starterskih i nestarterskih bakterija, jasno je da veliki uticaj na formiranje ovih jedinjenja imaju i biohemijski procesi i produkti metabolizma prisutnih mikroorganizama (Vahdatzadeh et al., 2018). Ova konstatacija je potvrđena i rezultatima Jo i sar. (2018), koji su pokazali da se sadržaj 2- i 3-metilbutanala povećava tokom zrenja Gauda sireva. Međutim, prvi korak u razgradnji amino kiselina u sirevima je enzimski katalizovana reakcija transaminacije, koja se dalje nastavlja dekarboksilacijom ili Streckerovom reakcijom, produkujući odgovarajuće aldehide (Yvon i Rijnen, 2001; McSweeney i Sousa, 2000). Razgranate amino kiseline kao što su izoleucin, leucin i valin se razgrađuju aminotransferazama ili Strecker ovom razgradnjom, produkujući razgranate aldehide, kao što su 2- i 3-metilbutanal i 2-metil-propanal (Marilley i Casey, 2004; McSweeney i Sousa, 2000; Yvon i Rijnen, 2001).

Ovi aldehidi doprinose stvaranju mirisa na lešnik, badem i kakao u siru (Yvon i Rijnen, 2001). Imajući u vidu da je sadržaj 2- i 3-metilbutanala bio znatno veći u sirevima sa svežim i smrznutim flambiranim tartufima, može se konstatovati da su flambirani tartufi bili nosioci enzima, koji su doprineli ovim rezultatima nastanka 2- i 3-metilbutanala.

Takođe i druga aromatična jedinjenja karakterističnog mirisa, koja su sastavni deo isparljivih jedinjenja tartufa, npr. benzaldehid koji ima miris gorkog badema, takođe mogu biti proizvod katabolizma aminokiselina (fenilalanina) (Hazelwood et al., 2008).

Što se tiče prisustva alkohola, rezultati su pokazali da su varijante sireva sa flambiranim tartufima pokazale veći sadržaj alkohola u odnosu na sve ostale varijante sireva, osim u sadržaju etanola. Etanol je bio najzastupljeniji kod svih varijanti sireva, koji nosi alkoholni miris i lako se transformiše u druga jedinjenja. Jedinjenja koja su važna za aromu tartufa, a koja se pojavljuju u sirevima su 2-butanol, 2-metil-butanol i 1-okten-3-ol. Sva tri jedinjenja su najviše zastupljena kod sireva sa flambiranim tartufima, pri čemu je 2-butanol bio zastupljeniji kod sira sa smrznutim flambiranim tartufom i iznosio 0,41%, a kod sira sa svežim 0,32%. Za obe vrste sira je utvrđeno da je sadržaj 2-metil-butanola bio približan i iznosio 0,2% u siru sa svežim tartufom i 0,1% za sir sa smrznutim tartufom. Važno aromatično jedinjenje za aromu tartufa je i 1-okten-3-ol, koji nije detektovan ni u jednoj varijanti sira, osim kod sira sa svežim flambiranim (0,32%) i sira sa smrznutim tartufom 0,22%. Kod sireva sa veštačkom aromom nije detektovano ni jedno od navedenih jedinjenja. Jedinjenja 2-metil-butanol i 1-okten-3-ol imaju prijatan miris, pri čemu prvo ima miris na sir, a drugo na beli luk i pečurke (Feng et al., 2019). Prema literaturi, 3-metil-butanol, 1-okten-3-ol i druga jedinjenja kao što su 3-metil-butanal, 3-octanone, heksanal i acetaldehid se javljaju u više od 50% svih vrsta tartufa (Stojnik et al., 2020), pri čemu su koncentracije C4-isparljivih jedinjenja (2-butanon i 2-butanol) ili C8- jedinjenja (1-okten-3-ol, 1-okten-3-one i 3-oktanol) u korelaciji sa klon/gena, a ne od genetskog klastera (Molinier et al., 2015). U ranijim istraživanjima je potvrđeno da kod *T. aestivum* postoji jaka povezanost između koncentracija C8 isparljivih jedinjenja i genotipa (Splivallo et al., 2012).

Generalno se može zaključiti da su sirevi sa svežim i smrznutim flambiranim tartufima imali veći udeo svih jedinjenja koja su važni nosioci arome tartufa, pri čemu je sir sa svežim tartufom imao neznatno veći sadržaj ovih jedinjenja, čime je potvrđena hipoteza, da je moguće naći tretman čuvanja i pripreme tartufa za proizvodnju sireva, a da se dobije visok kvalitet sira. Poredeći ove rezultate sa rezultatima dobijenim za sir sa veštačkom aromom, uključujući i rezultate senzorne ocene, utvrđeno je da su sirevi sa flambiranim tartufima, kao nosioci arome mnogo prihvatljiviji od sireva sa veštačkom aromom.

5.11. SENZORNA ANALIZA SIREVA

Senzorne ocene nakon 1 i 3 meseca zrenja svih varijanti proizvedenih sireva su prikazani u tabelama 23 i 24.

Kao što je i očekivano izgled sireva, kao i tekstura, se nije razlikovala između varijanti sireva. Generalno, svi sirevi su se odlikovali adekvantnim spoljašnjim izgledom uključujući i boju. Na preseku sireva je bilo nekoliko pravilnih šupljika što je tipično za sireve holandskog tipa (Miočinović, 2020). Pored toga, na preseku sira su se jasno uočavala zrna tartufa.



Slika 32. Sir sa tartufima

Uticaj dodavanja različito pripremljenih tartufa je uočen na mirisu, a posebno ukusu sireva, nakon 1 i 3 meseca zrenja. Najniže ocene u pogledu mirisa i ukusa su imali sirevi proizvedeni uz dodatak veštačke arome što se uočava i sa najnižom ocenom % od maksimalno mogućeg kvaliteta (MKV). Generalno, možemo iz prikazanih rezultata zaključiti da svi sirevi pripadaju grupi odličnih sireva osim sireva proizvedenih sa aromom. Takođe, najbolje ocenjeni sirevi nakon 1 i 3 meseca zrenja su sirevi proizvedeni sa tartufima koji su pripremljeni postupkom flambiranja. Ovakvi rezultati su i očekivani s obzirom da takav način pripreme u najvećoj meri zadržava prirodna svojstva tartufa. Ovo je u skladu i sa rezultatima ispitivanja proteolitičkih promena u kojima je ustanovljen veći koeficijent zrelosti.

Tabela 23. Senzorna ocena sireva nakon 30 dana zrenja

		Izgled	Miris	Tekstura	Ukus	%MKV
K	Xsr	4,81a	4,50	4,69a	4,56a	92,56
	Sd	0,37	0,27	0,26	0,32	3,89
	Cv	7,73	5,94	5,52	7,02	4,20
SV	Xsr	4,56a	3,94ab	4,25a	4,00ab	83,00
	Sd	0,22	0,35	0,27	0,30	3,58
	Cv	4,86	8,82	6,29	7,47	4,32
SMF	Xsr	4,28a	4,19ab	4,33a	4,28a	85,63
	Sd	0,43	0,18	0,11	0,16	1,79
	Cv	10,08	4,22	2,65	3,74	2,09
SVF	Xsr	4,38a	4,45	4,38a	4,31a	87,23
	Sd	0,50	0,21	0,30	0,40	5,59
	Cv	11,43	4,73	6,83	9,17	6,41
SM	Xsr	4,53a	4,00ab	4,28a	4,13ab	84,28
	Sd	0,34	0,38	0,16	0,23	3,23
	Cv	7,48	9,45	3,74	5,61	3,83
SVA	Xsr	4,53a	3,83b	4,31a	3,59b	79,70
	Sd	0,28	0,66	0,91	0,71	11,84
	Cv	6,21	17,18	21,19	19,65	14,86

Tabela 24. Senzorna ocena sireva nakon 90 dana zrenja

		Izgled	Miris	Tekstura	Ukus	%MKV
K	Xsr	4,94a	4,94a	4,94a	4,91a	98,50
	Sd	0,18	0,18	0,18	0,19	3,08
	Cv	3,58	3,58	3,58	3,79	3,13
SV	Xsr	4,94a	4,42a	4,39a	4,25ab	88,42
	Sd	0,13	0,31	0,36	0,37	5,10
	Cv	2,71	7,08	8,26	8,75	5,77
SMF	Xsr	4,92a	4,86a	4,78a	4,67a	95,41
	Sd	0,18	0,17	0,22	0,46	5,08
	Cv	3,58	3,49	4,58	9,80	5,32
SVF	Xsr	4,92a	4,91a	4,83a	4,95a	98,08
	Sd	0,18	0,17	0,20	0,06	2,19
	Cv	3,58	3,54	4,14	1,31	2,23
SM	Xsr	4,89a	4,31b	4,73a	4,19b	89,52
	Sd	0,22	0,25	0,26	0,49	4,56
	Cv	4,41	5,80	5,55	11,73	5,09
SVA	Xsr	4,70a	3,73b	4,53a	3,75b	82,50
	Sd	0,43	0,75	0,62	0,75	9,65
	Cv	9,20	19,96	13,73	20,08	11,70

Pored navedenog važno je istaći da su svi sirevi imali bolja senzorna svojstva posebno ukus nakon 3 meseca zrenja. Najbolje ocenjeni su kontrolni sir (K) i sirevi sa tartufima dodati nakon flambiranja (SVF) ili nakon čuvanja u smrznutom stanju a potom flambirani (SMF). Ovi sirevi su se odlikovali sa 98,5% 98,08% i 95,41% od maksimalno mogućeg kvaliteta što ih svrstava u grupu odličnih sireva.

Kao što smo ranije napomenuli, podaci o svojstvima sireva sa tartufima prema našim saznanjima ne postoje u literaturi. Sagledavajući svojstva sireva proizvedenih sa različitim dodacima posebno začinima može se zaključiti da dodavanje dodataka poboljšava senzorna svojstva i pozitivno utiče na divergenciju vrsta sireva na tržištu. S tim u vezi, kvalitet sireva proizvedenih u okviru ove doktorske disertacije, jasno pokazuje da bi sigurno našli svoje mesto na tržištu. Generalno, možemo izneti mišljenje da različit način pripreme tartufa nije uticao značajno na urušavanje senzornog kvaliteta, ali svakako je važno istaći da je najbolje za senzorni kvalitet upotreba flambiranih tartufa.

6. ZAKLJUČAK

Analizom rezultata ovog rada došlo se do sledećih zaključaka:

1. Izolacijom mikroorganizama sa površine i unutrašnjosti askokarpa tartufa, dobijeno je ukupno 35 bakterijskih izolata (26 sa površine i 9 iz unutrašnjosti askokarpa) crnog tartufa *Tuber aestivum*.

2. Rezultati API testa su pokazali da su u najvećem broju prisutne vrste iz roda *Bacillus* 20, zatim po 3 izolata iz rodova *Pseudomonas* i *Aeromonas*, po 2 izolata *Staphylococcus* sp. i *Brevibacillus brevis*, po 1 iz rodova *Arthrobacter* i *Microbacterium*.

3. Utvrđeno je da su izolati iz roda *Bacillus* izdvojeni najvećim delom sa površine (18), dok kod broja ostalih izolata nije bilo značajnih razlika. Izolati roda *Bacillus* pripadali su sledećim vrstama: *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sphaericu*, *Bacillus firmus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumillus* i *Bacillus circulans*.

4. Analizom sekvenciranja je utvrđeno da najveći broj izolata (19) pripada vrstama roda *Bacillus*, od kojih je 18 izolovano sa površine i 1 iz unutrašnjosti askokarpa. Ostali sojevi se mogu svrstati u 6 rodova: *Pseudomonas* sp. (4), *Staphylococcus* sp. (3), *Brevibacterium* sp. (2), *Microbacterium* sp. (1), *Enterococcus* sp. (1) i *Arthrobacter* sp. (1).

5. Identifikacijom aktinomiceta, dobijeno je 5 različitih izolata, od kojih su 2 pripadala rodu *Actinomyces*, a tri *Streptomyces* rodu.

6. Izolacijom gljiva izdvojeno je 4 različita izolata i to svi sa površine askokarpa, dok u unutrašnjosti askokarpa nije utvrđeno prisustvo filamentoznih gljiva. Identifikovane su filamentozne gljive: *Penicillium notatum*, *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp. i *Trichoderma* sp.

7. Izolacijom kvasaca sa površine i unutrašnjosti askokarpa tartufa, dobijeno je ukupno 7 izolata, pri čemu su svi bili izdvojeni sa površine askokarpa. Makroskopskim i mikroskopskim ispitivanjem, odabrano je 4 izolata kvasaca, koji su na API 20C AUX testu identifikovani kao: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida guilliermondii*, *Cryptococcus humicalus* i *Kloeckera apiculata*. Izolati kvasaca na osnovu 18s rRNK, identifikovani su kao *Cryptococcus albidus*, *Debaroyces hanseinii*, *Candida fermentati* i *Rhodotorula mucilaginosa*.

8. U svežem tartufu i tartufima koji su podvrgnuti različitim režimima zamrzavanja, ukupno je detektovano 57 isparljivih jedinjenja, od kojih je 26 izdvojeno kao značajnija: jedinjenja koja sadrže sumpor (5), aldehidi (7), ketoni (4), alkoholi (6) i furani (4).

9. Pri svim režimima zamrzavanja je utvrđeno prisustvo sumpornih jedinjenja metantiol, dimetil-sulfid (DMS), dimetil-disulfid (DMDS), dimetil-trisulfid (DMTS), pri čemu je u nultom danu sadržaj DMS bio najveći (3,97%). Tokom čuvanja smrznutih tartufa, utvrđen je trend povećanja sadržaja matantiola, tako da je učešće ovog jedinjenja u 90. danu bilo 2-3 puta veće nego u nultom danu. Sadržaj DMDS i DMTS se najmanje promenio tokom 90 dana čuvanja. Pri svim režimima zamrzavanja, promene u sadržaju sumpornih jedinjenja su bile veoma slične, pri čemu je sadržaj metantiola kod režima -20°C , 90. dana bio veći u odnosu na ostala sumporna jedinjenja.

10. Kao glavni isparljivi aldehidi detektovani su: acetaldehid, 2-metil-propanal, 2-metil-butanal i 3-metil-butanal. Proces zamrzavanja je uticao na smanjenje koncentracije acetaldehida, tako da je u nultom danu ona bila duplo manja u odnosu na svež tartuf. Među različitim režimima zamrzavanja nije bilo značajnih razlika u sadržaju acetaldehida tokom celog perioda čuvanja. Sadržaj 2-metil-

propanala se nije značajno razlikovao u zavisnosti od tretmana zamrzavanja. Nakon zamrzavanja svim tretmanima, sadržaj se povećao dva puta u odnosu na svež tartuf, a tokom čuvanja, sadržaj 2-metil-propanala se smanjivao tako da je nakon 90 dana koncentracija u svim uzorcima opala približno dvadeset puta. Pri svim režimima zamrzavanja koncentracija 2-metil-butanala je veća nego kod svežeg tartufa u nultom danu. Tokom čuvanja, kod svih uzoraka sadržaj 2-metil-butanala pokazuje trend rasta, osim kod uzorka tretiranog u tečnom azotu i čuvanog na -20°C u 90-om danu.

11. Od ketona praćen je sadržaj: 2-butanona, 2,3-butanediona, 2,3-pentanediona, 3-oktanona. Pokazalo se da je sadržaj 2-butanona višestruko veći nakon zamrzavanja i čuvanja na -20°C , a sadržaj 3-oktanona nešto veći kod liofilizovanog tartufa, dok kod ostalih ketona nije bilo značajnih razlika.

12. Od alkohola praćeno je 6 jedinjenja: etanol, 2-butanol, 1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol, 1-okten-3-ol. Utvrđeno je najveće prisustvo 2-butanola, pri čemu režimi zamrzavanja nisu imali uticaja na njegov sadržaj u nultom danu, a tokom vremena relativni udeo ovog jedinjenja se značajno povećavao, tako da je u 90. danu kod smrznutih tartufa, sadržaj bio veći nego u svežem tartufu. Najveće koncentracije ovog jedinjenja su dobijene smrzzavanjem na -20°C u 90. danu, dok se u slučaju liofilizacije, sadržaj ovog jedinjenja drastično smanjio.

13. Klasu derivata furana predstavljali su: furan, 3-metil-furan, 2-pentil-furan i 2-furan-metanol. Među njima, jedinjenje furan je pokazao najšire razlike u koncentraciji. U pogledu sadržaja ovog jedinjenja, liofilizacija se pokazala kao nešto bolji režim zamrzavanja u odnosu na ostale.

14. Mikrobiološki status tretiranih tartufa za primenu u proizvodnji sireva je pokazao da je postupak dekontaminacije sterilizacijom u autoklavu dao bolji efekat, gde je postignuta potpuna sterilnost, dok je postupak flambiranja pokazao takođe veoma dobar učinak. Kod svežeg tartufa je pokazano prisustvo od 10^7 cfu/g mezofilnih bakterija, koji se postupkom flambiranja smanjio na nivo od 10^3 cfu/g. U okviru ukupnog broja mezofilnih bakterija dominantne su bile vrste roda *Bacillus*, koje su u svežem tartufu bile na nivou 10^5 cfu/g, a nakon flambiranja broj je bio 10^2 cfu/g. Enterobakterije i koliformne bakterije nisu detektovane u flambiranom tartufu, a broj sulfitoredukujućih klostridija je pao na 11 cfu/g.

15. Na osnovu sadržaja aromatičnih jedinjenja u tartufima, nakon flambiranja i autoklaviranja, utvrđeno je da je flambiranje postupak kojim se bolje čuvaju aromatične materije u tartufu, osim kod sadržaja DMS, acet-aldehida, heksanala, 2-metil-1-propanola i 2,3-butanediona. Kod flambiranih tartufa sadržaj metantiola je bio veći, dok je sadržaj DMS bio manji, a sadržaj ostalih sumpornih jedinjenja je bio približan.

Sadržaj aldehida kod flambiranih tartufa je pokazao povećanje acetaldehida, a sadržaj 2-metil-propanala, se povećao čak tri puta u odnosu na svež tartuf. Sadržaj ostalih aldehida kod svežeg i flambiranih tartufa je bio približan.

Sadržaj ketona kod flambiranih tartufa se nije značajno razlikovao u odnosu na svež tartuf, osim kod sadržaja 3-oktanona, koji se smanjio jedan i po put.

16. Mikrobiološkom analizom sireva u svim uzorcima sireva nije detektovano prisustvo enterobakterija i sulfitoredukujućih klostridija tokom 90 dana zrenja. Starter kulture i autohtona probiotska kultura *Lb. plantarum* 564 su u svim varijantama sireva bile prisutne u visokom broju 8-9 log jedinica tokom svih 90 dana. Varijante sa flambiranim svežim i flambiranim smrznutim tartufima imale su od početka do kraja zrenja broj od 9 log jedinica, dok je kod ostalih varijanti (kontrolni sir bez tartufa i varijante sa autoklaviranim tartufima i veštačkom aromom), broj starter kultura i kulture *Lb. plantarum* 564 bio na nivou od 8 log jedinica, što pokazuje razliku od 1 log jedinice.

17. Hemijski sastav sireva je pokazao da sirevi pripadaju grupi punomasnih tvrdih sireva. Dodavanje tartufa nije značajno uticalo na hemijski sastav sireva.
18. Ustanovljena je značajna razlika u koeficijentu zrelosti između ispitivanih sireva. Kontrolni sir i sirevi proizvedeni sa autoklaviranim tartufima, bilo svežim ili zamrznutim, su imali koeficijent zrelosti u interval od 14,31-16,67%. Sirevi proizvedeni sa flambiranim tartufima, sveži ili smrzanani, su pokazali značajno veći koeficijent zrelosti koji se kretao u interval 24,63-25,53%.
19. Elektroforetskim ispitivanjem proteolize tokom zrenja sireva, utvrđena je izraženija proteoliza kod varijanti sireva koji su proizvedeni sa flambiranim tartufima, što je u skladu sa rezultatima o koeficijentu zrelosti.
20. Analizom prisustva aromatičnih jedinjenja je utvrđeno da se tokom zrenja sadržaj aromatičnih materija menjao u intervalu od 60. do 90. dana zrenja. U pogledu sastava komponenti aromatičnosti nije bilo značajnih razlika u prisustvu različitih jedinjenja, tako da je u obe tačke ispitivanja detektovano prisustvo sumpornih jedinjenja, aldehida, ketona i alkohola.
21. Analizom sumpornih jedinjenja je utvrđeno da u svim varijantama sireva bez dodatka veštačke arome nije detektovano prisustvo sumpornih jedinjenja, osim 2,4-ditiapentana, koje je detektovano u koncentraciji 0,01% u 60. danu kod varijante sira sa smrznutim flambiranim tartufom, a kasnije u 90. danu ovo jedinjenje nije detektovano. Kod sira sa veštačkom aromom je utvrđeno prisustvo 2,4-ditiapentana i to u 60. danu 0,13% i u 90. danu 0,23%.
22. Analizom relativnog udela ketona, utvrđeno je da su ketoni bili najzasupljeniji kod varijanti sireva sa svežim (SVF) i zamrznutim flambiranim tartufima (SMF), što je u skladu sa podacima o prisustvu ovih jedinjenja kod tartufa pripremljenim za primenu u proizvodnji sireva. Sadržaj jedinjenja 2,3-butandion u sirevima sa flambiranim tartufima je bio najveći (SVF=24,3% i SMF=19,6%), a kontrolni sir je imao najmanji udeo ovog jedinjenja (5,25%). Sadržaj ketona 2-butanon u kontrolnom siru starom 90 dana je bio najniži (0,35%), dok je u siru sa smrznutim flambiranim tartufom, sadržaj ovog jedinjenja bio deset puta veći (3,5%). Za ostale ketone u sirevima od 90 dana, za 2-pentanon, 2-heptanon i 3-oktanon je utvrđeno najveće prisustvo u sirevima sa flambiranim tartufima.
23. Od aldehida u sirevima od 90 dana, najzastupljenija su bili 2-metil-butanal, 3-metil-butanal, acetaldehid i 2-metil-propanal. Utvrđen je najveći udeo ovih jedinjenja u sirevima sa smrznutim flambiranim tartufima u odnosu na sve ostale varijante sireva. Najzastupljenija jedinjenja u sirevima su bila 2-metil-butanal i 3-metil-butanal, čiji se sadržaj u sirevima sa smrznutim flambiranim tartufima bio od 8,9-9,6% i svežim od 7,1-7,8%.
24. Alkoholi koji su važni za aromu tartufa, a koja se pojavljuju u sirevima su 2-butanol, 2-metil-butanol i 1-okten-3-ol su najviše zastupljena kod sireva sa flambiranim tartufima, pri čemu je 2-butanol bio najzastupljeniji kod sira sa smrznutim flambiranim tartufom i iznosio 0,41%, a kod sira sa svežim 0,32%. Za obe varijante sira je utvrđeno da je sadržaj 2-metil-butanola bio približan i iznosio 0,2% u siru sa svežim tartufom i 0,1% za sir sa smrznutim flambiranim tartufom. Jedinjenje 1-okten-3-ol nije detektovan ni u jednoj varijanti sira, osim kod sira sa svežim flambiranim (0,32%) i sira sa smrznutim tartufom 0,22%.
25. Senzornom ocenom sireva je utvrđeno da se izgled sireva, boja, kao i tekstura nisu razlikovali. Na preseku sireva je bilo nekoliko pravilnih šupljika što je tipično za sireve holandskog tipa, a na preseku sira su se jasno uočavala zrna tartufa. Uticaj dodavanja tartufa je zapažen na mirisu, a posebno ukusu sireva, nakon 30 i 90 dana zrenja. Najbolje ocenjeni su kontrolni sir (K) i sirevi sa dodatim svežim flambiranim (SVF) i smrznutim flambiranim tartufima (SMF). Ovi sirevi su se

ocenjeni sa 98,5% 98,08% i 95,41% od maksimalno mogućeg kvaliteta što ih svrstava u grupu odličnih sireva. Najniže ocene u pogledu mirisa i ukusa su imali sirevi proizvedeni uz dodatak arome, što je rezultiralo najnižim % od maksimalno mogućeg kvaliteta.

26. Generalno se može zaključiti da su sirevi sa svežim i smrznutim flambiranim tartufima imali veći udeo svih jedinjenja koja su važni nosioci arome tartufa, takođe ovi sirevi su podržavali bolji rast autohtonih potencijalnih probiotka *Lb. plantarum* 564 i starter kultura, što je rezultiralo bržim zrenjem i većim koeficijentom zrelosti, čime je potvrđena hipoteza, da je moguće naći način čuvanja (zamrzavanjem na -20°C u toku 90 dana) i pripreme tartufa (flambiranjem) za proizvodnju sireva, a da se njihovom primenom dobije visok senzorni kvalitet sira, bez dodavanja veštačke arome.

7. LITERATURA

Akyuz, N., Altman, R.B., Blanchard, S.C., Boudker, O. (2013): Transport dynamics in a glutamate transporter homologue. *Nature* 502: 114-118.

Alewijn, M., Sliwinski, E.L., Wouters, J.T.M. (2005): Production of fat-derived (flavour) compounds during the ripening of Gouda cheese. *International Dairy Journal* 15: 733-740.

Alewijn, M., Smit, B.A., Sliwinski, E.L., Wouters, J.T.M. (2007): The formation mechanism of lactones in Gouda cheese. *International Dairy Journal* 17: 59-66.

Al-Mahamdi, W.A.A. (2011): Study the Biological Activity of Some Iraq Truffle Extracts Tuber (Rutba Region) Against Microorganisms and Tomato Mosaic Virus. M.Sc. Thesis, College of Science, University of Anbar, Iraq.

Almeida, J.P., Pomerantzeff, P.M., Dallan, L.O., Jatene, F.B., Stolf, N.A., Auler, J.O. Jr. (2010): Transfusion requirements after cardiac surgery: the TRACS randomized controlled trial. *JAMA*. 2010 Oct 13;304(14):1559-67.

Al-Rahmah, AB.N.M. (2014): Desert and Forest Truffles, (Fuga) Food and Drug. Saud Kingdom University, Saudi Arabia.

Al-Rawi, A.M., Aldin, M.M. (1979):. New mycorrhizal identification, truffles cultivation and truffles irradiation preservation. *Radiation Physics and Chemistry*, 4: 759-767.

Al-Ruqaie, I. (2006): Effect of different treatment processes and preservation methods on the quality of truffles: I. Conventional methods (drying/freezing). *Journal of Food Processing and Preservation* 30: 335-351.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-402.

Andrews, A.T. (1983): Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *Journal of Dairy Research* 50: 45-55.

Anonymous (2014). T.C. Trüf Ormanı Eylem Planı Kitapçığı 2014-2018. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü. 48 p. (in Turkish).

Anonymous (2018c). NATS, The North American Truffler, Truffle Recipes. Retrieved in July, 26, 2018 from <http://www.natruffling.org/news/news.htm>.

Anonymous (2018d). Urbani Truffles. Retrieved in July, 26, 2018 from <https://www.urbani.com/>. the aroma profile of black truffles (*Tuber melanosporum*). *Food Chemistry* 136:

Anonymous (2018e). Lowes Mount *Truffles*. Retrieved in July, 26, 2018 from <https://lowesmounttruffles.wordpress.com/>.

Antony-Babu, S., Murat, C., Deveau, A., Le Tacon, F., Frey-Klett, P., Uroz, S. (2013): An improved method compatible with metagenomic analyses to extract genomic DNA from soils in *Tuber melanosporum* orchards. *Journal of Applied Microbiology* 115: 163-170.

- Antony-Babu, S., Deveau, A., Van Nostrand, J. D., Zhou, J., Le Tacon, F., Robin, C. (2014): Black truffle-associated bacterial communities during the development and maturation of *Tuber melanosporum* ascocarps and putative functional roles. *Environmental Microbiology* 16: 2831–2847.
- Aury, L.G., Wincker, J.M., Grigoriev, P., Bonfante, I.V., Martin, F.M. (2018): Pezizomycetes genomes reveal the molecular basis of ectomycorrhizal truffle lifestyle. *Nat Ecol Evol.* 2018 Dec;2(12):1956-1965.
- Attia, H., Nounou, H., Shalaby, M. (2018): Zinc Oxide Nanoparticles Induced Oxidative DNA Damage, Inflammation and Apoptosis in Rat's Brain after Oral Exposure. *Toxics* 6: 29.
- Avsar, A. M.D., Dogan, A.M.D., Tavli, T.M.D. (2004): A Rare Cause of Reversible Dilated Cardiomyopathy: Hypocalcemia. *Echocardiography* 21: 609-612.
- Ayad, E.H.E., Omran, N., El-Soda M. (2006): Characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Egyptian Ras cheese. *Le Lait*, 86: 317-331.
- Barbieri, E., Potenza, L., Rossi, I., Sisti, D., Giomaro, G., Rossetti, S., Beimfohr, C., Stocchi, V. (2000): Phylogenetic characterization and in situ detection of a *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* phylogroup bacterium in *Tuber borchii* Vittad. ectomycorrhizal mycelium. *Applied Environmental Microbiology* 66: 5035–5042.
- Barbieri, E., Bertini, L., Rossi, I., Ceccaroli, P., Saltarelli, R., Guidi, C., Zambonelli, A., Stocchi, V. (2005): New evidence for bacterial diversity in the ascoma of the ectomycorrhizal fungus *Tuber borchii* Vittad. *FEMS Microbiological Letter* 247: 23–35.
- Barbieri, E., Guidi, C., Bertaux, J., Frey-Klett, P., Garbaye, J., Ceccaroli, P., Saltarelli, R., Zambonelli, A., Stocchi, V. (2007): Occurrence and diversity of bacterial communities in *Tuber magnatum* during truffle maturation. *Environmental Microbiology* 9: 2234–2246.
- Barbieri, E., Ceccaroli, P., Saltarelli, R., Guidi, C., Potenza, L., Basaglia, M., Fontana, F., Baldan, E., Casella, S., Ryahi, O., Zambonelli, A., Stocchi, V. (2010): New evidence for nitrogen fixation within the Italian white truffle *Tuber magnatum*. *Fungal Biol* 114: 936–942.
- Barbieri, E., Ceccaroli, P., Agostini, D., Zeppa, S. D., Gioacchini, A. M., Stocchi, V. (2016): Truffle-associated bacteria: extrapolation from diversity to function. In *True Truffle (Tuber spp.) in the World Soil Biology*, eds Zambonelli, A., Iotti, M., Murat, C. Springer Nature, Switzerland.
- Bauer, R., du Toit, M., Kossmann, J. (2010): Influence of environmental parameters on production of the acrolein precursor 3-hydroxy-propion-aldehyde by *Lactobacillus reuteri* DSMZ 20016 and its accumulation by wine *Lactobacilli*. *Int. J. Food Microbiol.* 137: 28–31.
- Behnsen, J., Deriu, E., Sassone-Corsi, M., Raffatellu, M. (2013): Probiotics: Properties, examples, and specific applications. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3.
- Behnsen, J., Jellbauer, S., Wong, C.P., Edwards, R.A., George, M.D., Ouyang, W., Raffatellu, M. (2014): Immunity, 40 (2014), pp. 262-273 this issue.
- Bellesia, F., Pinetti, A., Bianchi, A., Tirillini, B. (1998): The volatile organic compounds of black truffle (*Tuber melanosporum* Vitt.) from middle Italy. *Flavour Frag. J.* 13: 56–58.

- Bellesia, F., Pinetti, A., Tirillini, B., Bianchi, A. (2001): Temperature-dependent evolution of volatile organic compounds in *Tuber borchii* from Italy. *Flavour Frag. J.* 16: 1–6.
- Benucci, G.M.N., Bonito, G.M. (2016): The truffle microbiome: species and geography effects on bacteria associated with fruiting bodies of hypogeous *Pezizales*. *Microb. Ecol.* 72: 4–8.
- Berg, G., Eberl, L., Hartmann, A. (2005): The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environmental Microbiology* 7: 1673–85.
- Berger, L., Speare, R., Hyatt, A.D. (1999): Chytrid fungi and amphibian declines: overview, implications and future directions. In: Campbell A. (ed) *Declines and disappearances of Australian frogs*. Environment Australia: Canberra. 1999: 23–33.
- Bertuzzi, A.S., Kilcawley, K.N., Sheehan, J.J., O’Sullivan, M.G., Kennedy, D., McSweeney, P. L. H., Rea, M. C. (2017): Use of smear bacteria and yeasts to modify flavour and appearance of Cheddar cheese. *Intl Dairy J* 72: 44–54.
- Beuchat, L.R., Nail, B.V., Adler, B.B., Clavero, M.R. (1998): Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes, and lettuce. *Journal of Food Protection* 61: 1305–11.
- Birhane, E., Sterck, F., Fetene, M., Bongers, F., Kuyper, T. (2012): Arbuscular mycorrhizal fungi enhance photosynthesis, water use efficiency, and growth of frankincense seedlings under pulsed water availability conditions. *Oecologia* 169: 895–904.
- Blaser, M.J., Falkow, S. (2009): What are the consequences of the disappearing human microbiota? *Nat. Rev. Microbiol.* 12: 887–894.
- Bokhary, H.A., Suleiman, A.A.A., Basalah, M.O. (1989): The Fatty Acid Components of the Desert Truffle "Al Kamah" of Saudi Arabia. *Journal of Food Protection* 52: 668–669.
- Boltar, K.O., Burlakov, I.D., Ponomarenko, V.P. *et al.* (2016): Solid-state photoelectronics of the ultraviolet range (Review). *J. Commun. Technol. Electron.* 61, 1175–1185 (2016).
- Borgogna, M., Bellich, B., Zorzini, L., Lapasin, R., Cesàro, A. (2010): Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterization of non-conventional gelling system. *Food Chemistry* 122: 416–423.
- Brabcová, V., Nováková, M., Davidová, A., Baldrian, P. (2016): Dead fungal mycelium in forest soil represents a decomposition hotspot and a habitat for a specific microbial community. *New Phytology* 210: 1369–1381.
- British Mycological Society's GB Checklist of Fungi and (for basidiomycetes) on Kew's Checklist of the British & Irish Basidiomycota CB Checklist of Fungi i Checklist of the British i Irish Basidiomycota (2005).
- Büntgen, U., Bagi, I., Fekete, O., Molinier, V., Peter, M., Splivallo, R., et al. (2017): New insights into the complex relationship between weight and maturity of Burgundy truffles (*Tuber aestivum*). *PLoS One* 12: 0170375.
- Burdock, G.A. (2010): *Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredient*. 6th ed. CRC press, New York, NY, USA.

- Buriti, F. C. A., Rocha, J. S., Assis, E. G., Saad, S. M. I. (2005): Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. LWT-Food Science and Technology, 38: 173-180.
- Buzzini, P., Gasparetti, C., Turchetti, B., Cramarossa, M.R., Vaughan-Martini, A., Martini, A., Pagnoni, U.M., Forti, L. (2005): Production of volatile organic compounds (VOCs) by yeasts isolated from the ascocarps of black (*Tuber melanosporum* Vitt.) and white (*Tuber magnatum* Pico) truffles. Arch Microbiol 184: 187–193.
- Buzzini, P., Martinia, A., Gaetani, M., Turchetti, B., Ugo Maria Pagnoni, U.M., Davoli, P. (2005): Optimization of carotenoid production by *Rhodotorula graminis* DBVPG 7021 as a function of trace element concentration by means of response surface analysis. Enzyme and Microbial Technology 36: 687-692.
- Buzzini, P., Turchetti, B., Diolaiuti, G., D'Agata, C., Martini, A. (2005): Culturable yeasts in meltwaters draining from two glaciers in the Italian Alps. Annals of Glaciology 40: 119-122.
- Califano, A.N., Bevilacqua, A.E. (2000): Multivariate analysis of the organic acids content of Gouda type cheese during ripening. J. Food Compos. Anal. 13: 949–960.
- Callot, G. (1999): La truffe, la terre, la vie. INRA Editions, France.
- Carić, M. Milanović, S., Vucelja, D. (2000): Standardne metode analize mleka i mlečnih proizvoda. Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Prometej.
- Carvalho, M., Schwudke, D., Sampaio, J.L., Palm, W., Riezman, I., Dey, G., Gupta, G.D., Mayor, S., Riezman, H., Shevchenko, A., Kurzchalia, T.V., Eaton, S. (2010): Survival strategies of a sterol auxotroph. Development 137: 3675--3685.
- Castro, J.M., Tornadijo, M.E., Fresno, J.M., Sandoval, H. (2015): Biocheese: a food probiotic carrier. BioMed research international 723056.
- Chang, S.T, Mills, P.G. (2004): Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect and environmental impact. CRC Press, Taylor & Francis Gropu, UK.
- Chmielewska, A., Szajewska, H. (2010): Systematic review of randomised controlled trials: Probiotics for functional constipation. World J. Gastroenterol. 16: 69–75.
- Churchland, C., Grayston S.J. (2014): Specificity of plant-microbe interactions in the tree mycorrhizosphere biome and consequences for soil C cycling. Frontiers of Microbiology 5: 1–20.
- Codex Alimentarius Commission. FAO/WHO Food Standard Programme, 21st edition, Rome, 2013.
- Cole, S.H., Carney, G.E., McClung, C.A., Willard, S.S., Taylor, B.J., Hirsh, J. (2005): Two functional but noncomplementing *Drosophila tyrosine* decarboxylase genes. J. Biol. Chem. 280: 14948--14955.
- Combet, E., Henderson, J., Eastwood, D. et al. (2006): Eight-carbon volatiles in mushrooms and fungi: properties, analysis, and biosynthesis. Mycoscience 47: 317–326.
- Conway, P.L., Gorbach, S.L., Goldin, B.R. (1987): Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. J. Dairy Sci. 70: 1–12.

- Corrêa, R.C.G., Brugnari, T., Bracht, A., Peralta, R.M., Ferreira, I.C.F.R. (2016): Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp. (oyster mushroom) related with its chemical composition: a review on the past decade findings. *Trends in Food Science and Technology* 50: 103–117.
- Costa, R., Fanali, C., Pennazza, G., Tedone, L., Dugo, L., Santonico, M., Sciarrone, D., Cacciola, F., Cucchiaroni, L., Dachà, M. (2015): Screening of volatile compounds composition of white truffle during storage by GCxGC-(FID/MS) and gas sensor array analyses. *LWT-Food Science Technology* 60: 905–913.
- Crits-Christoph, A., Diamond, S., Butterfield, C.N., Thomas, B.C., Banfield, J.F. (2018): Novel soil bacteria possess diverse genes for secondary metabolite biosynthesis. *Nature* 558: 440–444.
- Culleré, L., Ferreira, V., Chevret, B., Venturini, M.E., Sánchez-Gimeno, A.C., Blanco, D. (2010): Characterisation of aroma active compounds in black truffles (*Tuber melanosporum*) and summer truffles (*Tuber aestivum*) by gas chromatography–olfactometry. *Food Chemistry* 122: 300–306.
- Culleré, L., Ferreira, V., Venturini, M.E., Marco, P., Blanco, D. (2013): Chemical and sensory effects of the freezing process on the aroma profile of black truffles (*Tuber melanosporum*). *Food Chemistry* 136: 518–525.
- Dahham, S.S., Tabana, Y.M., Sandai, D., Ahmed, M.A., Majid, A.M.S.A. (2016): In Vitro Anti-Cancer and Anti-Angiogenic Activity of Essential Oils Extracts from Agarwood (*Aquilaria crassna*). *Medical Aromatic Plants* 5: 256.
- Darriet, P., Pons, M., Henry, R., Dumont, O., Findeling, V., Cartolaro, P., Calonnet, A., Dubourdieu, D. (2002): Impact odorants contributing to the fungus type aroma from grape berries contaminated by powdery mildew (*Uncinula necator*); incidence of enzymatic activities of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem.* 50: 3277–82.
- de Boer, H.J., Kool, A., Broberg, A., Mziray, W.R., Hedberg, I., Levenfors, J.J. (2005): Anti-fungal and anti-bacterial activity of some herbal remedies from Tanzania. *Journal of Ethnopharmacology* 96: 461–469.
- De Vuyst, L., Van Kerrebroeck, S., Harth, H., Huys, G., Daniel, H.M., Weckx, S. (2014). Microbial ecology of sourdough fermentations: Diverse or uniform? *Food Microbiol.* 37:11–29.
- Deveau, A., Antony-Babu, S., Le Tacon, F., Robin, C., Frey-Klett, P., Uroz, S. (2016): Temporal changes of bacterial communities in the *Tuber melanosporum* ectomycorrhizosphere during ascocarp development. *Mycorrhiza* 26: 389–399.
- Devos, M., Patte, F., Rouault, J., Laffort, P., Van Gemert, L.J. (1990): Standardized human olfactory thresholds. Oxford: IRL Press at Oxford University Press.
- Diaz, M.F., Padilla, C., Torres, V., Gonzalez, A., Noda, A. (2003): Bromatological characterization of seasonal legume species and varieties with possibilities of use in animal feeding. *Cuban J. Agric. Sci.* 37: 443–447.
- Didari, T., Solki, S., Mozaffari, S., Nikfar, S., Abdollahi, M. (2014): A systematic review of the safety of probiotics. *Expert Opin Drug Saf.* 13: 227–239.

- Doğan, S., Turan, P., Doğan, M., Alkan, M., Arslan O. (2007): Inhibition kinetics of polyphenol oxidase by glutamic acid. *European Food Research & Technology* 225: 67-73.
- Dogan, L., Gulcelik, M.A., Yuksel, M., Uyar, O., Erdogan, O., Reis, E. (2013): The effect of plasmakinetic cautery on wound healing and complications in mastectomy. *Journal of Breast Cancer* 16: 198-201.
- Dominguez, J.A., Martin, A., Anriquez, A., Albanesi, A. (2012): The combined effects of *Pseudomonas fluorescens* and *Tuber melanosporum* on the quality of *Pinus halepensis* seedlings. *Mycorrhiza* 22: 429–436.
- Drake, M.A., Miracle, R.E., McMahon, D.J. (2010): Impact of fat reduction on flavor and flavor chemistry of Cheddar cheeses. *Journal of Dairy Science* 93: 5069–5081.
- Du, X., Finn, C.E., Qian, M.C. (2010) Volatile composition and flavors. *Journal of Dairy Science* 87: 777–784.
- Dundar, M., Kiraz, A., Emirogullari, E.F., Saatci, C.E., Taheri, S., Baskol, M., Polat, S., Ozkul, Y. (2012): A molecular analysis of familial Mediterranean fever disease in a cohort of Turkish patients. *Ann Saudi Med.* 32: 343-348.
- El Soda, M.A. (1993): The role of lactic acid bacteria in accelerated cheese ripening. *FEMS Microbiological Review* 12: 239–252.
- El-Sayed, S.M., Youssef, A.M. (2019): Potential application of herbs and spices and their effects in functional dairy products. *Heliyon* 5: 01989.
- El-Sayed, S.M., Ibrahim, S.A., Kholif, A.M.M. (2020): Characterization of novel Ras cheese supplemented with Jalapeno red pepper. *Journal of food processing and preservation* 44: 14535.
- Falasconi, M. (2004): Development and validation of an Electronic Olfactory System for the food industry. Ph.D. thesis, University of Brescia, Italy.
- Feliciano, A., Feliciano, A.J., Ogawa, J.M. (1987): *Monilinia fructicola* resistance in the Peach Cultivar Bolinha. *Phytopathology* 77: 776-780.
- Feng, J., Zhang, C., Lischinsky, J.E., Jing, M., Zhou, J., Wang, H., Zhang, Y., Dong, A., Wu, Z., Wu, H., Chen, W., Zhang, P., Zou, J., Hires, S.A., Zhu, J.J., Cui, G., Lin, D., Du, J., Li, Y.A. (2019): Genetically Encoded Fluorescent Sensor for Rapid and Specific In Vivo Detection of Norepinephrine. *Neuron*. 102: 745-761.
- Fiechi, A., Kienle, M.G., Scala, A., Cabella, P. (1967): Bis-methylthiomethane, an odorous substance from white truffle, *pico*. *Tetrahedron Letters* 8: 1681– 1682.
- Fierer N. (2017): Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nat Rev Microbiol.* 15:579
- Fijan, S. (2014). Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *International journal of environmental research and public health* 11: 4745–4767.
- Fitzpatrick, L.R. (2013). Probiotics for the treatment of *Clostridium difficile* associated disease. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* 4: 47–52.

Florence, A., Silva, R., Santo, A., Gioielli, L., Tamime, A., and Oliveira, M. (2009). Increased CLA content in organic milk fermented by *Bifidobacteria* or yoghurt cultures. *Dairy Sci. Technol.* 89: 541–553.

Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization FAO/WHO Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. 2001. [(accessed on 20 January 2014). Available online: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf.

Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization FAO/WHO (2002): Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food; London, Ontario, Canada: 2002.

Frey-Klett, P., Garbaye, J., Tarkka, M. (2016): The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytology* 176: 22–36.

Gajos, A., (2014): The intestinal microbiota in the mechanism of obesity and atherosclerosis. *Postępy Nauk Medycznych* 7: 502-505.

Garbaye, J., Bowen, G.D. (1989): Stimulation of ectomycorrhizal infection of *Pinus radiata* by some microorganisms associated with the mantle of ectomycorrhizas. *New Phytology* 112: 383–388.

Gardiner, G., Ross, R.P., Collins, J.K., Fitzgerald, G., Stanton, C., (1998): Development of a probiotic Cheddar cheese containing human-derived *Lactobacillus paracasei* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2192-2199.

Gezmiş, Y.E., Tarakçı, Z. (2020): Determination of the effects of spices on the ripening of traditional Circassian cheese. *Journal of food processing and preservation* 44: 14868.

Gianinazzi, S., Schuepp, H. (1994): Impact of arbuscular & mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems. *Birkhauser Verlag* 226.

Gioacchini, A.M., Menotta, M., Guescini, M., Saltarelli, R., Ceccaroli, P., Amicucci, A., Barbieri, E., Giomaro, G., Stocchi, V. (2008): Geographical traceability of Italian white truffle (*Tuber magnatum* Pico) by the analysis of volatile organic compounds. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22: 3147-3153.

Grahovac, M., Inđić, D., Lazić, S., Vuković, S. (2009): Biofungicidi i mogućnosti primene u savremenoj poljoprivredi, *Pestic. fitomed.* 24: 245-258.

Granato, D., Francisco, J. B., Bursac Kovacevic, D., Lorenzo, J. M., Cruz, A. G., and Putnik, P. (2020): Technological Trends, Efficacy Testing, and Safety, *Annual Review of Food Science and Technology*, Vol. 11:93-118.

Gryndler, M., Soukupova, L., Hrselova, H., Gryndlerova, H., Borovicka, J., Streiblova, E., Jansa, J. (2013): A quest for indigenous truffle helper prokaryotes: *Tuber aestivum*-associative prokaryotes. *Environmental Microbiology Report* 5: 346–352.

Gryndler, M., Beskid, O., Hršelová, H., Bukovská, P., Hujšlová, M., Gryndlerová, H. (2015): Mutabilis in mutabili: spatiotemporal dynamics of a truffle colony in soil. *Soil Biological Biochemistry* 90: 62–70.

Guidance on the Implementation of Regulation N81924/2006 on Nutrition and Health Claims Made on Foods. Conclusions of the Standing Committee on the Food Chain and Animal Health. (accessed on 20 January 2014).

Guslandi, M., Mezzi, G., Sorghi, M., Testoni, P.A. (2000): *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig. Dis. Sci.* 45: 1462–1464.

Guslandi, M., Giollo, P., Testoni, P.A. (2003): A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 15: 697–698.

Hanson, B.T., Yagi, J.M., Jeon, C.O., Madsen, E.M. (2012): Role of nitrogen fixation in the autecology of *Polaromonas naphthalenivorans* in contaminated sediments. *Environmental Microbiology* 14: 1544–1557.

Hajjar, L.A., Vincent, J.L., Galas, F.R., Nakamura, R.E., Silva, C.M., Santos, M.H., Fukushima, J., Kalil Filho, R., Sierra, D.B., Lopes, N.H., Mauad T, Roquim, AC, Sundin M.R., Leão, W.C., Almeida, J.P., Pomerantzeff, P.M., Dallan, L.O., Jatene, F.B., Stolf, N.A., Auler, J.O. Jr. (2010): Transfusion requirements after cardiac surgery: the TRACS randomized controlled trial. *JAMA*. 2010 Oct 13;304(14):1559-67.

Harir, M., Bendif, H., Yahiaoui, M., Bellahcene, M., Zohra, F., Rodríguez-Couto, S. (2019): Evaluation of antimicrobial activity of *Terfezia arenaria* extracts collected from Saharan desert against bacteria and filamentous fungi. *3 Biotech.* 9: 281.

Harki, E., Bouya, D., Dargent, R. (2006): Maturation-associated alterations of the biochemical characteristics of the black truffle *Tuber melanosporum* Vitt. *Food Chemistry* 99: 394–400.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., Lorito, M. (2004): *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews* 2: 43–56.

(<http://logottotartufi.com/wp-content/uploads/macrosporum>)

Hazelwood, L.A., Daran, J.M., van Maris, A.J., Pronk, J.T., Dickinson, J.R. (2008): The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied Environmental Microbiology* 74: 2259–2266.

Heba, Y., Dawodeyah, A., Obeidat, N., Luay F., Abu-Qatouseh, A., Shehabi, A. (2018): Antimicrobial resistance and putative virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with respiratory tract infection. *GERMS* 8: 31-40.

Hempel, S., Newberry, S.J., Maher, A.R., Wang, Z., Miles, J.N., Shanman, R., Johnsen, B., Shekelle, P.G. (2012): Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: A systematic review and meta-analysis. *JAMA* 307: 1959–1969.

Hochberg, M.E., Bertault, G., Poitrineau, K., Janssen, A. (2003): Olfactory orientation of the truffle beetle, *Leiodes cinnamomea*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 2003;109:147–153.

- International Dairy Federation (1982): Determination of the total solid content (cheese and processed cheese), IDF Standard 4A, Brussels, Belgium, International Dairy Federation.
- International Dairy Federation (1986): Cheese, Determination of fat content - Van Gulik butyrometers method, IDF Standard 5B, Brussels, International Dairy Federation.
- International Dairy Federation (2002): Milk, Determination of nitrogen content (Kjeldahl method) and calculation of crude protein content, IDF Standard 20 - I, Brussels, International Dairy Federation.
- Ishida, T.A., Nara, K., Hogetsu, T. (2007): Host effects on ectomycorrhizal fungal communities: insight from eight host species in mixed conifer-broadleaf forests. *New Phytol* 174:430–440.
- Izumi, Y., Auberson, Y.P., Zorumski, C.F. (2006): Zinc modulates bidirectional hippocampal plasticity by effects on NMDA receptors. *Journal of Neuroscience* 26: 7181-7188.
- Janakat, S. Nassar, M. (2010): Hepatoprotective Activity of Desert Truffle (*Terfezia Claveryi*) in Comparison with the Effect of *Nigella Sativa* in the Rat. *Pakistan J. Nut*, 9: 52-56.
- Jansen, O., Raynaud, C., Talou, T., Gaset, A. (2003): Flavour profiling of protected black truffle flavourings issued from black truffle industry by-products. In: *Flavour research at the dawn of the twenty-first century*, (eds) Le Quéré, J.L., Etiévant, P.X. Proceedings of the 10th Weurman flavour research symposium, Editions Tec & Doc, Beaune, June 2002, pp. 638–641.
- Jiang, T., Mustapham, A., Savaiano, D. A. (1996): Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. *Journal of Dairy Science*, 79: 750–757.
- Jo, Y., Benoist, D.M.A. Ameerally, A., Drake, M A. (2018): Sensory and chemical properties of Gouda cheese. *Journal of Dairy Science* 101: 1967–1989.
- Johansson, E., et al. (2004): The Pol32 subunit of DNA polymerase delta contains separable domains for processive replication and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) binding. *Journal of Biology Chemistry* 279: 1907-1915.
- Johnston, B.C., Goldenberg, J.Z., Vandvik, P.O., Sun, X., Guyatt, G.H. (2011): Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst. Rev.* 11: CD004827.
- Jones, G.V., White, M.A., Cooper, O.R. (2005): Climate Change and Global Wine Quality. *Climatic Change* 73: 319–343.
- Jonsson, L.M., Nilsson, M.C., Wardle, D.A., Zackrisson O. (2001): Context dependent effects of ectomycorrhizal species richness on tree seedling productivity. *Oikos* 93: 353–364.
- Jovčić, B., Begovic J., Lozo, J., Topisirović, L., Kojić, M. (2009): Dynamics of sodium dodecyl sulfate utilization and antibiotic susceptibility of strain *Pseudomonas* sp. ATCC19151. *Archives of Biological Sciences* 61: 159-164.
- Jović, S. (1991): Uticaj načina prerade grožđa i vinifikacije na sadržaj metanola i važnijih alkohola u vinu, doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad.

- Jung, H.J., Ganesan, P., Lee, S.J., Kwak, H.S. (2013): Comparative study of flavor in cholesterol-removed Gouda cheese and Gouda cheese during ripening. *J. Dairy Sci.* 96: 1972-1983
- Knežević, J., Radovanović, N., Simić, A., Micev, M., Radojković, S., Gerzić, Z. (1999): A paraesophageal bronchogenic cyst with esophageal communication. *Diseases of the Esophagus* 12: 321–323.
- Krause, K., Henke, C., Asimwe, T., Ulbricht, A., Klemmer, S., Schachtschabel, D. (2015): Biosynthesis and secretion of indole-3-acetic acid and its morphological effects on *Tricholoma vaccinum*-spruce ectomycorrhiza. *Applied Environmental Microbiology* 81: 7003–7011.
- Kuchroo, C.N., Fox, P.F. (1982): Fractionation of the water-soluble nitrogen from Cheddar cheese: chemical methods. *Milchwissenschaft* 37: 651–653.
- Laforest-Lapointe I, Paquette A, Messier C, Kembel SW. Leaf bacterial diversity mediates plant diversity and ecosystem function relationships. *Nature* 546:145
- Lebeis S, Rott M.,Dangl J., and Schulze-Lefert P.(2012): Culturing a plant microbiome community at the cross-Rhodes, *New Phytologist* 196: 341–344.
- Lee, H., Nam, K., Zahra, Z. *et al.* (2020): Potentials of truffles in nutritional and medicinal applications: a review. *Fungal Biol Biotechnol* 7, 9 (2020).
- Li, Q., Yan, L., Ye, L., Zhou, J., Zhang, B., Peng, W., et al. (2018): Chinese Black Truffle (*Tuber indicum*) alters the ectomycorrhizosphere and endoectomycosphere microbiome and metabolic profiles of the host tree *Quercus aliena*. *Frontiers in Microbiology* 9: 2202.
- Lilleskov, E.A., Hobbie, E.A., Fahey, T.J. (2002): Ectomycorrhizal fungal taxa differing in response to nitrogen deposition also differ in pure culture organic nitrogen use and natural abundance of nitrogen isotopes. *New Phytol* 154: 219–231.
- Liu, F., Yang, R.Q., Li, Y.F. (2006): Correlations between growth parameters of spoilage microorganisms and shelf-life of pork stored under air and modified atmosphere at 2, 4 and 10°C. *Food Microbiology* 23: 578-583.
- Liu, R.S., Li, D.C., Li, H.M., Tang, Y.J. (2012): Evaluation of aroma active compounds in *Tuber* fruiting bodies by gas chromatography-olfactometry in combination with aroma reconstitution and omission test. *Applied Microbiological Biotechnology* 94: 353–363.
- Liu, R.S., Zhou, H., Li, H.M., Yuan, Z.P., Chen, T., Tang, Y.J. (2013): Metabolism of l-methionine linked to the biosynthesis of volatile organic sulfur-containing compounds during the submerged fermentation of *Tuber melanosporum*. *Applied Microbiological Biotechnology* 97: 9981–9992.
- Lourens-Hattingh, A., Viljoen B.C. (2001): Yogurt as Probiotic Carrier Food. *International Dairy Journal* 11: 1-17.
- Mackowiak, P.A. (2013). Recycling metchnikoff: Probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. *Front. Public Health.* 1: 52.
- March, R.E., Richards, D.S., Ryan, R.W. (2006): Volatile compounds from six species of truffle—head-space analysis and vapor analysis at high mass resolution. *International Journal of Mass Spectrometry* 249: 60–67.

- Margosan, D.A., Smilanick, J.L., Simmons, G.F., Henson, D.J. (1997): Combination of hot water and ethanol to control postharvest decay of peaches and nectarines. *Plant Dis.* 81: 1405–1409.
- 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.
- Marshall, A. H., Abberton, M. T., Williams, T. A., Michaelson-Yeates, T.P.T., Powell, H. G. (2003): Forage quality of *Trifolium repens* L. x *T. nigrescens* Viv. Hybrids. *Grass and Forage Sci.*, 58: 295-301.
- Martin, A.C., Gelbart, M., Fernandez-Gonzalez, R., Kaschube, M., Wieschus, E.F. (2010): Integration of contractile forces during tissue invagination. *J. Cell Biol.* 188: 735--749.
- Martin, F., Kohler, A., Murat, C., Balestrini, R., Coutinho, P.M., Jaillon, O., Montanini, B., Morin, E., Noel, B., Percudani, R., Porcel, B., Rubini, A., Amicucci, A., Amselem, J., Anthouard, V., Arcioni, S., Artiguenave, F., Aury, J.M., Ballario, P., Bolchi, A., Brenna, A., Brun, A., Buée, M., Cantarel, B., Chevalier, G., Couloux, A., Da Silva, C., Denoeud, F., Duplessis, S., Ghignone, S., Hilselberger, B., Iotti, M., Marçais, B., Mello, A., Miranda, M., Pacioni, G., Quesneville, H., Riccioni, C., Ruotolo, R., Splivallo, R., Stocchi, V., Tisserant, E., Viscomi, A.R., Zambonelli, A., Zampieri, E., Henrissat, B., Lebrun, M.H., Paolocci, F., Bonfante, P., Ottonello, S., et al. (2010): Périgord black truffle genome uncovers evolutionary origins and mechanisms of symbiosis. *Nature* 464: 1033–1038.
- Matsuoka, S., Sugiyama, Y., Tateno, R., Imamura, S., Kawaguchi, E., Osono, T. (2020): Evaluation of host effects on ectomycorrhizal fungal community compositions in a forested landscape in northern Japan. *Royal Society Open Science* 7: 191952.
- Mauriello, E.M., Duc le, H., Istatico, R., Cangiano, G., Hong, H.A., De Felice, M., Ricca, E., Cutting, S.M. (2004): Display of heterologous antigens on the *Bacillus subtilis* spore coat using CotC as a fusion partner. *Vaccine.* 22: 1177-87.
- McFarland, L.V. (2005). Meta-analysis of probiotics for the prevention of traveler's diarrhea. *Travel Med. Infect. Dis.* 5: 97–105.
- McLaughlin, R.J., Wilson, C.L., Droby, S., Benarie, R., Chalutz, E. (1992): Biological control of postharvest diseases of grape, peach, and apple with the yeasts *Kloeckera apiculata* and *Candida guilliermondii*. *Plant Dis.* 76: 470–473.
- McSweeney, P.L.H., Sousa, M. J. (2000): Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait* 80: 293–324.
- Mellgren, J. (2005): All cheese considered: Gouda Bus. Source. *Complete* 26: 11-19.
- Mello, J.A., Sillje, H.H., Roche, D.M., Kirschner, D.B., Nigg, E.A., Almouzni, G. (200): Human Asf1 and CAF-1 interact and synergize in a repair-coupled nucleosome assembly pathway. *EMBO Rep.* 3: 329–334.
- Mencarelli, F., Massantini, R., Botondi R. (1997): Physiological and textural response of truffles during low-temperature storage. *J Horti Sci.* 72: 407–414.

- Menotta, M., Gioacchini, A.M., Amicucci, A., Buffalini, M., Sisti, D., Stocchi, V. (2004): Headspace solid-phase microextraction with gas chromatography and mass spectrometry in the investigation of volatile organic compounds in an ectomycorrhizae synthesis system. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 18: 206–210.
- Mestre, D.R., Ewald, M., Maiano, C. (2011): Virtual reality and exercise: behavioral and psychological effects of visual feedback. *Stud Health Technol Inform* 167: 122-127.
- Milesi, M.A., Lacan, D., Brosse, H., Desor, D., Notin, C. (2009): Effect of an oral supplementation with a proprietary melon juice concentrate (Extramel) on stress and fatigue in healthy people: a pilot, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Nutr J.* 2009.
- Milo, C., Reineccius, G. A. (1997): Identification and quantification of potent odorants in regular-fat and low-fat mild Cheddar cheese. *J. Agric. Food Chem.* 45: 3590–3594.
- Minervini, F., Siragusa, S., Faccia, M., Dal Bello, F., Gobbetti, M., De Angelis, M. (2012): Manufacture of Fior di Latte cheese by incorporation of probiotic lactobacilli. *J Dairy Sci* 95(2):508-20.
- Miočinović, J. (2015): *Praktikum Tehnologija mleka 1.* Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Miočinović, J. (2020): *Tehnologija mleka II. Posebno sirarstvo.* Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Miočinović, J., Radulović, Z., Paunović, D., Miloradović, Z., Trpković, G., Radovanović, M., Pudja, P. (2014): Properties of low-fat ultra-filtered cheeses produced with probiotic bacteria. *Archive of Biological Science* 66: 65-73.
- Mirkovic, N., Polovic, N., Vukotic, G., Jovic, B., Miljkovic, M., Radulovic, Z., Diep, D.B., Kojic, M. (2016): *Lactococcus lactis* LMG2081 produces two bacteriocins, a nonlantibiotic and a novel lantibiotic. *Applied and Environmental Microbiology* 82: 2555-2562.
- Misharina, T.A., Terenina, M.B., Krikunova, N.I. (2010): Autooxidation of a mixture of lemon essential oils, methyl linoleoate, and methyl oleinate. *Appl Biochem Microbiol* 46: 551–556.
- Misharina, T.A., Burlakova, E.B., Fatkullina, L.D., Alinkina, E.S., Vorobeva, A.K., Medvedeva, I.B., Erokhin, V.N., Semenov, V.A., Nagler, L.G., Kozachenko, A.I. (2013): Effect of oregano essential oil on the engraftment and development of lewis carcinoma in F1 DBA C57 black hybrid mice. *Applied Biochemistry and Microbiology* 49: 432–436.
- Mohan, M. S., Anand, S., Kalscheur, K. F., Hassan, A. N., Hippen, A. R. (2013): Starter cultures and cattle feed manipulation enhances conjugated linoleic acid concentrations in Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 96: 2081–2094.
- Molinier, V., Murat, C., Frochot, H., Wipf, D., Splivallo, R. (2015): Fine-scale spatial genetic structure analysis of the black truffle *Tuber aestivum* and its link to aroma variability. *Environmental Microbiology* 18: 3039-3050.
- Molinier, V., Murat, C., Peter, M., Gollotte, A., De la Varga, A.H., Meier, B., Egli, S., Belfiori, S.B., Paolocci, F., Wipf, D. (2016): SSR-based identification of genetic groups within European populations of *Tuber aestivum* Vittad. *Mycorrhiza* 26: 99–110.

Morris, M.H., Smith, M.E., Rizzo, D.M., Rejmanek, M., Bledsoe, C.S. (2008): Contrasting ectomycorrhizal fungal communities on the roots of co-occurring oaks (*Quercus* spp.) in a California woodland. *New Phytology* 178: 167–176.

Mukhtar, H., Yaqub, S. & Haq, (2020): Production of probiotic Mozzarella cheese by incorporating locally isolated *Lactobacillus acidophilus*. *Ann. Microbiol* 70: 56.

Murat, C., Payen, T., Noel, B., Kuo, A., Morin, E., Chen, J., Kohler, A., Krizsán, K., Balestrini, R., Da Silva, C., Montanini, B., Hainaut, M., Levati, E., Barry, K.W., Belfiori, B., Cichocki, N., Clum, A., Dockter, R.B., Fauchery, L., Guy, J., Iotti, M., Le Tacon, F., Lindquist, E.A., Lipzen, A., Malagnac, F., Mello, A., Molinier, V., Miyauchi, S., Poulain, J., Riccioni, C., Rubini, A., Sitrit, Y., Splivallo, R., Traeger, S., Wang, M., Žifčáková, L., Wipf, D., Zambonelli, A., Paolocci, F., Nowrousian, M., Ottonello, S., Baldrian, P., Spatafora, J.W., Henrissat, B., Nagy, Aury, L.G., Wincker, J.M., Grigoriev, P., Bonfante, I.V., Martin, F.M. (2018): Pezizomycetes genomes reveal the molecular basis of ectomycorrhizal truffle lifestyle. *Nat Ecol Evol.* 2018 Dec;2(12):1956-1965.

Nazzaro, F., Fratianni, F., Picariello, G., Coppola, R., Reale, A., Di Luccia, A. (2007): Evaluation of gamma rays influence on some biochemical and microbiological aspects in black truffles. *Food Chemistry* 103: 344–354.

Neggaz, S., Chenni, M., El-Houaria M., Zitouni-Haouar, Fernandez, X. (2020): Mycochemical composition and insecticidal bioactivity of Algerian desert truffles extract against two stored-product insects: *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrychidae). *3 Biotech* 10: 481.

NIH HMP Working group. Peterson, J., Garges, S., Giovanni, M., McInnes, P., Wang, L., Schloss, J.A., Bonazzi, V., McEwen, J.E., Wetterstrand, K.A., (2009): The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res.* 19: 2317–2323.

Nikolić B, Matović M, Todosijević M, Stanković J, Cvetković M, Marin PD, Tešević V. Volatiles of *Tanacetum macrophyllum* obtained by different extraction methods. *Nat Prod Commun.* 2018;13(7):891-3.

Nikolić B, Matović M, Mladenović K, Todosijević M, Stanković J, Đorđević I, Marin PD, Tešević V. Volatiles of *Thymus serpyllum* obtained by three different methods. *Nat Prod Commun.* 2019;14(6):1-3.

Obradović, D., Tucović, N., Radulović, Z., Karić, A., Čuk, M., Ipač, N. (2004): Primena probiotika u proizvodnji edamskog sira. *Preh. Ind.* 1-2, 12-14.

Ong, P.K.C., Acree, T.E. (1998): Gas Chromatography/Olfactory Analysis of Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 46: 2282–2286.

Ouwehand, A.C., Salminen, S., Isolauri, E. (2002): Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 279-289.

Pat O'Reilly, P. (2016): *Fascinated by Fungi*, Second Edition, UK.

Owaid, M.N. (2018): Bioecology and uses of desert truffles (*Pezizales*) in the middle east. *Walailak J Sci Technol.* 15: 179–88.

Ouwehand, A.C., Salminen, S., Isolauri, E. (2002): Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 279-289.

- Pacioni, G., Leonardi, M., Aimola, P., Ragnelli, A.M., Rubini, A., Paolocci, F. (2007): Isolation and characterization of some mycelia inhabiting *Tuber ascomata*. *Mycological Research* 111: 1450–1460.
- Palacios, I. et al. (2011): Antioxidant Properties of Phenolic Compounds Occurring in Edible Mushrooms. *Food Chem.* 128: 674-678.
- Palacios, I., Moro, C., Lozano, M., D'Arrigo, M., Gullamon, E., Garcia-Lafuente, A. (2011): Use of modified atmosphere packaging to preserve mushroom quality during storage. *Recent Pat. Food Nutr. Agric.* 3: 196–203.
- Palacios, L., Dickinson, R.J., Sacristán-Reviriego, A., Didmon, M.P., Marín, M.J., Martín, H., Keyse, S.M., Molina, M. (2011): Distinct docking mechanisms mediate interactions between the Msg5 phosphatase and mating or cell integrity mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 286: 42037-42050.
- Palacios, N., Gao, X., McCullough, M.L., Schwarzschild, M.A., Shah, R., Gapstur, S., Ascherio, A. (2012): Caffeine and risk of Parkinson's disease in a large cohort of men and women. *Mov Disord.* 27: 1276-1282.
- Palacios, C., Gonzalez, L. (2014): Is vitamin D deficiency a major global public health problem? *J Steroid Biochem Mol Biol.* 144: 138-145.
- Paloma, D., Elena, I., Francisco, J.S., Guillermo, R. (2003): Truffle aroma characterization by headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A* 1017: 207–214.
- Pan, Y., Birdsey, R.A., Phillips, O.L., Jackson, R.B. (2013): The structure, distribution, and biomass of the world's forests. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 44: 593–622.
- Panikov, S.N., Sizova, V.M. (2007): Growth kinetics of microorganisms isolated from Alaskan soil and permafrost in solid media frozen down to -35°C , *FEMS Microbiology Ecology*, Volume 59, Issue 2, February 2007, Pages 500–512.
- Patel, S., Showers, D., Vedantam, P., Tzeng, T.R., Qian, S., Xuan, X. (2012): Microfluidic separation of live and dead yeast cells using reservoir-based dielectrophoresis. *Biomicrofluidics* 6: 34102.
- Paul, R., Roth, F.P (2008): Characterizing and Predicting Outcomes of Communication Delays in Infants and Toddlers: Implications for Clinical Practice. *Lang Speech Hear Serv Sch* 42: 331-340.
- Pavari, A. (1916): Valutazione preliminare della coltivazione di specie forestali esotiche in Italia. General Section, *Annales of the Regio Istituto Superiore Forestale Nazionale*, Florence, 1-221.
- Pavić, A., Stanković, S., Saljnikov, E., Krüger, D., Buscot, F., Tarkka, M. (2013): Actinobacteria may influence white truffle (*Tuber magnatum* Pico) nutrition, ascocarp degradation and interactions with other soil fungi. *Fungal Ecol* 6:527–538.
- Peay, K., Bruns, T.D. (2014): Spore dispersal of basidiomycete fungi at the landscape scale is driven by stochastic and deterministic processes and generates variability in plant–fungal interactions. *New Phytologist* 180-191.

- Peay, K., Schubert, M.G., Nduyen, N.H., Bruns, T.D. (2012): Measuring ectomycorrhizal fungal dispersal: macroecological patterns driven by microscopic propagules. *Molecular Ecology* 21: 4122-4136.
- Pegler, D.N., Spooner, B.M., Yong, T.W.K. (1993): *British Truffles: A Revision of British Hypogeous Fungi*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Pelusio, F., Nilsson, T., Montanarella, L., Tilio, R., Larsen, B., Facchetti, S., Madsen, J. (1995): Headspace solid-phase microextraction analysis of volatile organic sulfur compounds in black and white truffle aroma. *J Agric Food Chem* 43: 2138–2143.
- Peper, I. L., Gerba, C. P., Brendencke, J.W. (1995): *Environmental Microbiology*. 11-33, Acad. Press, San Diego, USA.
- Peterson, R. L., Massicotte, H.B., Melville, L.H. (2004): *Mycorrhizas: anatomy and cell biology*. National Research Council Research Press, CABI Publishing, UK.
- Petrović, T., Dimitrijević, S., Radulović, Z., Mirković, N., Rajić, J., Obradović, D., V. Nedović (2012): Comparative analysis of the potential probiotic abilities of lactobacilli of human origin and from fermented vegetables, *Arch. Biol. Sci.* 64: 1473–1480.
- Piñuela, A., Oliach, D., Bolaño, F., Colinas, C., Bonet, J. (2020): Use of Inoculator Bacteria to Promote *Tuber melanosporum* Root Colonization and Growth on *Quercus faginea* Saplings. *Forests* 11: 792.
- Pravilnik o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura Službeni glasnik RS, 33/2010, 69/2010, 43/2013 - dr. pravilnik i 34/2014.
- Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa (2010): Službeni glasnik Republike Srbije 72/10.
- Puđa, P (2009): *Tehnologija mleka I. Opšte sirarstvo*. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Radovanović, R., Popov Raljić, J. (2001): *Senzorna analiza prehrambenih proizvoda*, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Radulović, Z., Mirković, M. (2016). *Probiotici i prebiotici*. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Radulovic, Z., Petrovic, T., Nedovic, V., Dimitrijevic, S., Mirkovic, N., Petrusic, M., Paunovic, D. (2010): Characterization of autochthonous *Lactobacillus paracasei* strains on potential probiotic ability. *Mljekarstvo* 60: 86–93.
- Radulović, Z., Miočinović, J., Petrušić, M., Mirković, N., Paunović, D., Petrović, T. (2011a): Application of autochthonous potential probiotic in the soft goat cheese production. In *Proceedings of 22nd International Scientific-Expert Conference of Agriculture and Food Industry*. Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, pp. 345-348.
- Radulović, Z., Miočinović, J., Puđa, P., Barać, M., Miloradović, Z., Paunović, D., Obradović, D. (2011b): The application of autochthonous lactic acid bacteria in white brined cheese production. *Mljekarstvo* 61: 15-25.

- Radulovic, Z., Miocinovic, J., Mirkovic, N., Mirkovic, M., Paunovic, D., Ivanovic, M., Seratlic, S. (2017): Survival of Spray-Dried and Free-Cells of Potential Probiotic *Lactobacillus plantarum* 564 in Soft Goat Cheese. *Animal Science Journal* 88: 1849–1854.
- Raičević, V., Lalević, B., Kljujev, I., Petrović, J. (2010): Ekološka mikrobiologija. projekat MSDP 004/2009, financed by Austrian Development Agency through WUS Austria.
- Read, D.J., Perez-Moreno, J. (2003): Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems—a journey towards relevance?. *New Phytologist* 157: 475–492.
- Reale, A., Sorrentino, E., Iacumin, L., Tremonte, P., Manzano, M., Maiuro, L., Comi, G., Coppola, G., Succi, M. (2009): Irradiation treatments to improve the shelf life of fresh black truffles (truffles preservation by gamma-rays). *Journal of Food Science*, 74: 196-200.
- Riboli E, Norat T. (2003): Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *American Journal of Clinical Nutrition* 78: 559-569.
- Rijkers, G.T., De Vos, W.M., Brummer, R.J., Morelli, L., Corthier, G., Marteau, P. (2011). Health benefits and health claims of probiotics: Bridging science and marketing. *Br. J. Nutr.* 106: 1291–1296.
- Rivera, C.S., Blanco, D., Salvador, M.L., Venturini, M.E. (2010): Shelf-life extension of fresh *Tuber aestivum* and *Tuber melanosporum* truffles by modified atmosphere packaging with microperforated films. *Journal of Food Science* 75: 225–233.
- Rivera, C.S, Blanco, D., Oria, R., Venturini, R.M. (2011): Effects of electron-beam irradiation on the shelf life, microbial populations and sensory characteristics of summer truffles (*Tuber aestivum*) packaged under modified atmospheres. *Food Microbiology*, 28: 141-148.
- Roesch, L.F., Fulthorpe, R.R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A.K., Kent, A.D., Daroub, S.H., Camargo, F.A., Farmerie, W.G., Triplett, E.W. (2007): Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbiological diversity. *The ISME Journal* 1: 283-290.
- Roy, S., Shashidhara, L.S., VijayRaghavan, K. (1997). Muscles in the *Drosophila* second thoracic segment are patterned independently of autonomous homeotic gene function. *Curr. Biol.* 7(4): 222-227.
- Ruiz, L., Margolles, A., Sánchez, B. (2013): Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Front Microbiol.* 4: 396.
- Saidi, K., Hammami, S. (2015): The impact of CO₂ emissions and economic growth on energy consumption in 58 countries. *Energy Report* 1: 62-70.
- Salerni, G., Terán, T., Alonso, C., Fernández-Bussy, R. (2014): The role of dermoscopy and digital dermoscopy follow-up in the clinical diagnosis of melanoma: clinical and dermoscopic features of 99 consecutive primary melanomas. *Dermatol Pract Concept* 4: 39-46.
- Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Brassart, D., de vos Fonden, M. W., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S. E., Mattila-Sandholm, T., (1998): Demonstration of safety of probiotics – a review. *Int. J. Food Microbiol*, 44: 93-106.

- Saltarelli, R., Ceccaroli, P., Cesari, P., Barbieri, E., Stocchi, V. (2008): Effect of storage on biochemical and microbiological parameters of edible truffle species. *Food Chemistry* 109: 8-16.
- Samson, R.A. and van Rernen-Hoekstra, E.S. (1988): Introduction to food-borne fungi Institute of the royal Netherlands, Academy of arts and sciences.
- Sapers, G.M. (2005): Washing and sanitizing treatments for fruits and vegetable. *Microbiology of fresh produce*. ASM Press, Washington, DC, pp. 375-400.
- Sapers, G.M. Simmons, G.F. (1998): Hydrogen peroxide disinfection of processed fruits and vegetables. *Food Technology* 52: 48-52.
- Scherlach, K., Hertweck, C. (2009): Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Org Biomol Chem*. 7: 1753-60.
- Schmidberger, P. C., Schieberle, P. (2017): Characterization of the Key Aroma Compounds in White Alba Truffle (*Tuber magnatum pico*) and Burgundy Truffle (*Tuber uncinatum*) by Means of the Sensomics Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65: 9287–9296.
- Schroeckh, V., Scherlach, K., Nützmann, HW., Shelest, E., Schmidt-Heck, W., Schuemann, J., Martin, K., Hertweck, C., Brakhage, A.A. (2009): Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *PNAS* 106: 14558–14563.
- Servin, A. L. (2004): Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogenes. *FEMS Microbiolo. Reviews*. 28: 405-440.
- Shimoda, M., Wu, Y., Osajima, Y. (1996): Aroma compounds from aqueous solution of haze (*Rhus succedanea*) honey determined by adsorptive column chromatography. *J. Agric. Food Chem*. 44: 3913–3918.
- Silva, R.F.; Lupatini, M.; Trindade, L.; Antonioli, Z.I.; Steffen, R.B.; Andreatza, R. (2013): Copper resistance of different ectomycorrhizal fungi such as *Pisolithus microcarpus*, *Pisolithus* sp., *Scleroderma* sp. and *Suillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology* 44: 619-627.
- Simard, S.W., Perry, D.A., Jones, M.D., Myrold, D.D., Durall, D.M., Molina, R. (1997): Net transfer of carbon between ectomycorrhizal tree species in the field. *Nature* 388: 579–582.
- Singh, B.P., Chauhan, R.S., Singhal, L.K. (2003): Toll-like receptors and their role in innate immunity. *Curr. Sci*. 85: 1156--1164.
- Siragusa, S., De Angelis, M., Calasso, M., Campanella, D., Minervini, F., Di Cagno, R., Gobbetti, M. (2013): Fermentation and proteome profiles of *Lactobacillus plantarum* strains during growth under food-like conditions. *J. Proteomics*. 96: 366–380.
- Skeie, S., Lindberg, C., Narvhus, J. (2001): Development of amino acids and organic acids in Norvegia, influence of milk treatment and adjunct *Lactobacillus*. *International Dairy Journal* 11: 399-411.
- Smit, I.P.J., Ferreira, S.M. (2010): Management intervention affects river-bound spatial dynamics of elephants. *Biological Conservation* 143: 2172– 2181.
- Smith, S. E., Read, D. J. (2008): *Mycorrhizal Symbiosis*, 3rd Edn. London: Academic Press.

- Smit, G., Smit, B.A., Engels, J.M.W. (2005): Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews* 29: 591–610.
- Smith, S.E., Jakobsen, I., Grønlund, M., Smith, F.A. (2011): Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus nutrition: Interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulation plant phosphorus acquisition. *Plant Physiology*. 2011; 156:1050–1057.
- Sosa-Castañeda, J., Hernández-Mendoza, A., Astiazarán-García, H., Garcia, H. S., Estrada-Montoya, M. C., González-Córdova, A. F., et al. (2015): Screening of *Lactobacillus* strains for their ability to produce conjugated linoleic acid in milk and to adhere to the intestinal tract. *J. Dairy Sci.* 98: 6651–6659.
- Spatafora, J.W., Aime, M.C., Grigoriev, I.V., Martin, F., Stajich, J.E., Blackwell, M. (2017). The fungal tree of life: From molecular systematics to genome-scale phylogenies. *Microbiol. Spectr.* 5: 3–34.
- Specter, M., Germs, are us. (2012). *Bacteria make us sick. Do they also keep us alive?* New Yorker. 22: 32–39.
- Spinnler, H.E., Berger, C., Lapadatescu, C., Bonnarne, P. (2001): Production of sulfur compounds by several yeasts of technological interest for cheese ripening, *International Dairy Journal* 245-252.
- Splivallo, R., Maier, C. (2011): Production of natural truffle flavours from truffle mycelium. U.S. Patent 9,277 760.
- Splivallo, R., Ebeler, S.E. (2015): Sulfur volatiles of microbial origin are key contributors to human-sensed truffle aroma. *Applied Microbiological Biotechnology* 99: 2583–2592.
- Splivallo, R., Cullteré, L. (2016): The Smell of Truffles: From Aroma Biosynthesis to Product. In book: *True Truffle (Tuber spp.) in the World*. Springer International Publishing, UK, pp.393-407.
- Splivallo, R., Bossi, S., Maffei, M., Bonfante, P. (2007): Discrimination of truffle fruiting body versus mycelial aromas by stir bar sorptive extraction. *Phytochemistry* 68: 2584-2598.
- Splivallo, R., Ottonello, S., Mello, A., Karlovsky, P. (2011): Truffle volatiles: from chemical ecology to aroma biosynthesis. *New Phytologist* 189: 688-99.
- Splivallo, R., Valdez, N., Kirchhoff, N., Ona, M.C., Schmidt, J.P., Feussner, I., Karlovsky, P. (2012): Intraspecific genotypic variability determines concentrations of key truffle volatiles. *New Phytologist*, 194: 823-835.
- Splivallo, R., Deveau, A., Valdez, N., Kirchhoff, N., Frey-Klett, P., Karlovsky, P. (2015): Bacteria associated with truffle-fruiting bodies contribute to truffle aroma. *Environmental Microbiology* 17: 2647-2660.
- Splivallo, R., Vahdatzadeh, M., Maciá-Vicente, J.G., Molinier, V., Peter, M., Egli, S. (2019): Orchard conditions and fruiting body characteristics drive the microbiome of the black truffle *Tuber aestivum*. *Frontiers of Microbiology* 10:1437.

- Stielow, B., Menzel, W. (2010): Complete nucleotide sequence of TaV1, a novel totivirus isolated from a black truffle ascocarp (*Tuber aestivum* Vittad.). Arch Virol 155: 2075–2078.
- Stielow, B., Klenk, H.P., Menzel, W. (2011): Complete genome sequence of the first endornavirus from the ascocarp of the ectomycorrhizal fungus *Tuber aestivum* Vittad. Arch Virol 156: 343–345.
- Stielow, B., Klenk, H.P., Winter, S., Menzel, W. (2011): A novel *Tuber aestivum* (Vittad.) mitovirus. Arch Virol 156: 1107–1110.
- Stielow, J.B., Bratek, Z., Klenk, H.P., Winter, S., Menzel, W. (2012): A novel mitovirus from the hypogeous ectomycorrhizal fungus *Tuber excavatum*. Arch Virol 157: 787–790.
- Stobbe, U., Büntgen, U., Sproll, L., Tegel, W., Egli, S., Fink, S. (2012): Spatial distribution and ecological variation of re-discovered German truffle habitats. Fungal Ecology 5: 591–599.
- Stobbe, U., Stobbe, A., Sproll, L. (2013): New evidence for the symbiosis between *Tuber aestivum* and *Picea abies*. Mycorrhiza 23: 669–673.
- Strojnik, L., Grebenc, T., Ogrinc, N. (2020): Species and geographic variability in truffle aromas. Food and Chemical Toxicology 142: 111434.
- Strullu-Derrien, C., Selosse, M-A., Kenrickl, P., Marti, F.M (2018): The origin and evolution of mycorrhizal symbioses: from palaeomycology to phylogenomics. New Phytologist 220: 1012–1030.
- Suarez-Solis, V., Cardoso, F., Nunez de Villavicencio, M., Fernandez, M, Fragoso, L. (2002): Probiotic fresh chesse. Alimentaria, 39: 83-86.
- Talou, T., Delmas, M., Gaset, A. (1989): Black Perigord truffle: from aroma analysis to aromatizer formulation. Flavors and Off-flavors, Proceedings of the 6th International Flavor Conference. Rethymnon, Crete, Greece, 715– 728.
- Talou, T., Gaset, A., Delmas, M., Kulifaj, M., Montant, C. (1990): Dimethyl sulphide: the secret for black truffle hunting by animals? Mycological Research 94: 277– 278.
- Tanous, C., Kieronczyk, A., Helinck, S., Chambellon, E., Yvon, M. (2002): Glutamate dehydrogenase activity: a major criterion for the selection of flavour-producing lactic acid bacteria strains. Antonie Van Leeuwenhoek 82: 271– 278.
- Tarakçı, Z., Deveci, F. (2019): The effects of different spices on chemical, biochemical, textural and sensory properties of White cheeses during ripening. Mljekarstvo 69: 64-77.
- Tedersoo, L., Jairus, T., Horton, B.M., Abarenkov, K., Suvi, T., Saar, I. Koljalg, U. (2008): Strong host preference of ectomycorrhizalfungi in a Tasmanian wet sclerophyll forest as revealed by DNABarcoding and taxon-specific primers. New Phytology 180: 479–490.
- Thirkell, T.J., Charters, M.D., Elliott, A.J., Sait, S.M., Field, K.J. (2017): Are mycorrhizal fungi our sustainable saviours considerations for achieving food security. J. Ecol. 105: 921–929.
- Tirillini, B., Verdelli, G., Paolocci, F., Cicciooli, P., Frattoni, M. (2000): The volatile organic compounds from the mycelium of *Tuber borchii* Vitt. Phytochemistry 55: 983–985.

- Toljander, J.F., Eberhardt, U., Toljander Y.K., Paul L.R., Taylor, A.F. (2006): Species composition of an ectomycorrhizal fungal community along a local nutrient gradient in a boreal forest. *New Phytol.* 170:873-83.
- Tompkins, T.A., Xu, X., Ahmarani, J.A. (2010). comprehensive review of post-market clinical studies performed in adults with an Asian probiotic formulation. *Benef. Microbes.* 1: 93–106.
- Tucovič N., Radulović Z., Karić A., Èuk, M., Ipač N., Obradović D., 2004. Primena probiotika u proizvodnji edamskog sira, *Preh. ind.* 1–2, 637.354.82:637.047.
- Urbach, G. (1997): The flavour of milk and dairy products: II. Cheese: Contribution of volatile compounds. *International Journal of Dairy Technology* 50: 79-89.
- Üstün, N., Bulam, S., Peksen, A. (2018): Biochemical properties, biological activities and usage of truffles. In *Proceedings of the Conference: International Congress on Engineering and Life Science, Kastamonu, Turkey*, pp. 26–29.
- Vahdatzadeh, M., Splivallo, R. (2018): Improving truffle mycelium flavour through strain selection targeting volatiles of the Ehrlich pathway. *Scientific Reports* 8: 9834.
- Vahdatzadeh, M., Deveau, A., Splivallo, R. (2015): The role of the microbiome of truffles in aroma formation: a meta-analysis approach. *Applied Environmental Microbiology* 81: 6946–6952.
- Van den Berg, B., Clemons, W.M. Jr, Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S.C. (2004): Rapoport TA. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427: 36-44.
- van den Berg, G., Meijer, W. C., Düsterhöft, E.M., Smit, G. (2004): Gouda and related cheeses. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (3rd ed.), eds. P.F. Fox, P.L.H. McSweeney, T.M. Cogan, T.P. Guinee. Elsevier, London, UK, pp. 103-140.
- Van der Heijden, M.G., Martin, F.M., Selosse, M.A., Sanders, I.R. (2015): Mycorrhizal ecology and evolution: the past, the present, and the future. *New Phytology* 205:1406-23.
- Van Leuven, I., Van Caelenberg, T., Dirinck, P. (2008): Aroma characterisation of Gouda-type cheeses. *International Dairy Journal* 18: 790–800.
- Van Nieuwenhove, C.P., Oliszewski, R., Gonzalez, S.N., Perez-Chaia, A.B. (2007a): Conjugated linoleic acid conversion by dairy bacteria cultured in MRS broth and buffalo milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 44: 467–474.
- Van Nieuwenhove, C.P., Oliszewski, R., Gonzalez, S.N., Perez-Chaia, A.B. (2007b): Influence of bacteria used as adjunct culture and sunflower oil addition on conjugated linoleic acid content in buffalo cheese. *Food Res. Int.* 40: 559–564.
- Varlet, V., Knockaert, C., Prost, C., Serot, T. (2006): Comparison of Odor-Active Volatile Compounds of Fresh and Smoked Salmon. *J. Agric. Food Chem.* 54: 3391–3401.
- Vilela-Moura, A., Schuller, D., Mendes-Faia, A., Côte-Real, M. (2008): Reduction of volatile acidity of wines by selected yeast strains. *Applied Microbiology Biotechnology* 80: 881-90.

- Villares, A., García-Lafuente, A., Guillamón, E., Ramos, A. (2012): Identification and quantification of ergosterol and phenolic compounds occurring in *Tuber* spp. truffles. *Journal of Food Composition and Analysis* 26: 177-182.
- Vieira, L.E.A., Norton, T., Dudok de Wit, M., Kretschmar, G.A., Schmidt, and M.C.M. Cheung, (2012): How the inclination of Earth's orbit affects incoming solar irradiance. *Geophys. Res. Lett.*, 39, L16104.
- Wagner, K., Krause, K., David, A., Kai, M., Jung, E. M., Sammer, D. (2016): Influence of zygomycete-derived D'orenone on IAA signalling in *Tricholoma-spruce* ectomycorrhiza. *Environmental Microbiology* 18: 2470–2480.
- Walker, W.A. (2013): Initial intestinal colonization in the human infant and immune homeostasis. *Ann. Nutr. Metab.* 63: 8–15.
- Wall DH, Nielsen UN, Six J.(2015): Soil biodiversity and human health. *Nature.* 528: 69–76.
- Walstra, P., Noomen, A., Geurts, T.J. (1993): Dutch-type varieties. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 2nd ed. Fox P.F., Chapman and Hall, London, UK. pp. 39–82.
- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S., Taylor, J. (1990): Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal rna genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J., eds. *Pcr protocols, a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp. 315–322.
- Woodcroft BJ, Singleton CM, Boyd JA, Evans PN, Emerson JB, Zayed AAF, et al. (2018): Genome-centric view of carbon processing in thawing permafrost. *Nature.* 560: 49–54.
- Xia, P., Zhu, J., Zhu, G. (2013): *Escherichia coli* Nissle 1917 as safe vehicles for intestinal immune targeted therapy—A review. *Acta Microbiol. Sin.* 53: 538–544.
- Xiao, D.R., Liu, R.S., He, L., Li, H.M., Tang, Y.L., Liang, X.H., Chen, T., Tang, Y.J. (2015): Aroma improvement by repeated freeze-thaw treatment during *Tuber melanosporum* fermentation. *Scientific Report* 5: 17120.
- Yang, B., Chen, H., Stanton, C., Ross, R. P., Zhang, H., Chen, Y. Q., et al. (2015): Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease. *J. Funct. Foods* 15: 314–325.
- Yvon, M., Rijnen, L. (2001): Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal* 11: 185-201.
- Zacchi, L., Vaughan-Martini, A., Angelini, P. (2003): Yeast distribution in a truffle-field ecosystem. *Ann Microbiol* 53: 275–282.
- 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 Microbiol.* 2011 Aug;28(5):1033-40.
- Zeppa, S., Gioacchini, A.M., Guidi, C., Guescini, M., Pierleoni, R., Zambonelli, A., Stocchi, V. (2004): Determination of specific volatile organic compounds synthesised during *Tuber borchii* fruit body development by solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18: 199–205.

Zhu, X.C., Song, F.B., Liu, S.Q., Liu, T. D., Zhou, X. (2012): Arbuscular mycorrhizae improves photosynthesis and water status of *Zea mays* L. under drought stress. *Plant Soil Environ.* 58: 186–191.

Zou, J., Secombes, C.J. (2016): The Function of Fish Cytokines. *Biology.* 5, (2), 23.

8. PRILOG

Tabela 1. Senzorna ocena sireva nakon 30 dana zrenja

		Izgled	Miris	Tekstura	Ukus	I*KV	M*KV	T*KV	U*KV	%MKV
K	Xsr	4,81a	4,50	4,69a	4,56a	14,44	13,50	28,13	36,50	92,56
	Sd	0,37	0,27	0,26	0,32	1,12	0,80	1,55	2,56	3,89
	Cv	7,73	5,94	5,52	7,02	7,73	5,94	5,52	7,02	4,20
SV	Xsr	4,56a	3,94ab	4,25a	4,00ab	13,69	11,81	25,50	32,00	83,00
	Sd	0,22	0,35	0,27	0,30	0,66	1,04	1,60	2,39	3,58
	Cv	4,86	8,82	6,29	7,47	4,86	8,82	6,29	7,47	4,32
SMF	Xsr	4,28a	4,19ab	4,33a	4,28a	12,84	12,56	25,97	34,25	85,63
	Sd	0,43	0,18	0,11	0,16	1,30	0,53	0,69	1,28	1,79
	Cv	10,08	4,22	2,65	3,74	10,08	4,22	2,65	3,74	2,09
SVF	Xsr	4,38a	4,45	4,38a	4,31a	13,13	13,36	26,25	34,50	87,23
	Sd	0,50	0,21	0,30	0,40	1,50	0,63	1,79	3,16	5,59
	Cv	11,43	4,73	6,83	9,17	11,43	4,73	6,83	9,17	6,41
SM	Xsr	4,53a	4,00ab	4,28a	4,13ab	13,59	12,00	25,69	33,00	84,28
	Sd	0,34	0,38	0,16	0,23	1,02	1,13	0,96	1,85	3,23
	Cv	7,48	9,45	3,74	5,61	7,48	9,45	3,74	5,61	3,83
SVA	Xsr	4,53a	3,83b	4,31a	3,59b	13,59	11,48	25,88	28,75	79,70
	Sd	0,28	0,66	0,91	0,71	0,84	1,97	5,48	5,65	11,84
	Cv	6,21	17,18	21,19	19,65	6,21	17,18	21,19	19,65	14,86

Tabela 2. Senzorna ocena sireva nakon 90 dana zrenja

		Izgled	Miris	Tekstura	Ukus	I*KV	M*KV	T*KV	U*KV	%MKV
K	Xsr	4,94a	4,94a	4,94a	4,91	14,81	14,81	29,63	39,25	98,50
	Sd	0,18	0,18	0,18	0,19	0,53	0,53	1,06	1,49	3,08
	Cv	3,58	3,58	3,58	3,79	3,58	3,58	3,58	3,79	3,13
SV	Xsr	4,94a	4,42a	4,39a	4,25	14,81	13,27	26,34	34,00	88,42
	Sd	0,13	0,31	0,36	0,37	0,40	0,94	2,18	2,98	5,10
	Cv	2,71	7,08	8,26	8,75	2,71	7,08	8,26	8,75	5,77
SMF	Xsr	4,92a	4,86a	4,78a	4,67	14,77	14,58	28,69	37,38	95,41
	Sd	0,18	0,17	0,22	0,46	0,53	0,51	1,31	3,66	5,08
	Cv	3,58	3,49	4,58	9,80	3,58	3,49	4,58	9,80	5,32
SVF	Xsr	4,92a	4,91a	4,83a	4,95	14,77	14,72	28,97	39,63	98,08
	Sd	0,18	0,17	0,20	0,06	0,53	0,52	1,20	0,52	2,19
	Cv	3,58	3,54	4,14	1,31	3,58	3,54	4,14	1,31	2,23
SM	Xsr	4,89a	4,31b	4,73a	4,19	14,67	12,94	28,41	33,50	89,52
	Sd	0,22	0,25	0,26	0,49	0,65	0,75	1,58	3,93	4,56
	Cv	4,41	5,80	5,55	11,73	4,41	5,80	5,55	11,73	5,09
SVA	Xsr	4,70a	3,73b	4,53a	3,75	14,11	11,20	27,19	30,00	82,50
	Sd	0,43	0,75	0,62	0,75	1,30	2,24	3,73	6,02	9,65
	Cv	9,20	19,96	13,73	20,08	9,20	19,96	13,73	20,08	11,70

Xsr – srednja vrednost; Sd – standardna devijacija; Cv- koeficijent varijacije; I *KV– ocena za izgled pomnožena sa koeficijentom važnosti (KV); M*KV – ocena za miris pomnožena sa koeficijentom važnosti; T*KV – ocena za teksturu pomnožena sa koeficijentom važnosti; U*KV – ocena za ukus pomnožena sa koeficijentom važnosti; %MKV – procenat od maksimalno mogućeg kvaliteta (max. 100%)

Tabela 3. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP1 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Arthrobacter sp.</i> JLX12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (KU891830.1)	81	97,19
<i>Arthrobacter sp.</i> TM4_3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (DQ279376.1)	81	97,19
<i>Arthrobacter sp.</i> QHL12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (JQ809717.1)	80	97,33

Tabela 4. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP2 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Bacillus subtilis</i> strain SA9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (KY285265.41)	87	95,08
<i>Bacillus sp.</i> (in: Bacteria) strain LMRE88 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MK571645.1)	85	95,63
<i>Bacillus sp.</i> (in: Bacteria) strain 75 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MT126331.1)	82	96,62

Tabela 5. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP3 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain S2QPS25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (HQ844505.1)	85	97,26
<i>Bacillus velezensis</i> strain Lac05D 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MH210888.1)	85	97,11
<i>Bacillus sp.</i> CZB13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (KF482856.1)	85	97,18

Tabela 6. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP5 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Bacillus paramycoides</i> strain BY9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MN093405.1)	87	96,70
<i>Bacillus albus</i> strain FA77 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MK993460.1)	89	95,88
<i>Bacillus cereus</i> strain 2.2PT3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MK648337.1)	89	95,79

Tabela 7. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP6 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Bacillus licheniformis</i> strain LB 102-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MT795769.1)	84	96,54
<i>Bacillus sp.</i> DU101(2010) 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence (HM566982.1)	82	97,21
<i>Bacillus sp.</i> (in: Bacteria) strain PC-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MG988279.1)	82	97,20

Tabela 8. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP9 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Bacillus albus</i> strain FA77 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MK993460.1)	87	95,34
<i>Bacillus cereus</i> strain 1.4PT6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MK648334.1)	87	94,79
<i>Bacillus albus</i> strain FA77 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MN093405.1)	84	95,72

Tabela 9. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP10 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Bacillus wiedmanni</i> strain D59-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MT256065.1)	82	96,69
<i>Bacillus cereus</i> strain SDF0221 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MH569380.1)	81	96,89
<i>Bacillus sp.</i> strain pc-1w 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MF993478.1)	80	97,04

Tabela 10. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP11 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Bacillus velezensis</i> strain 10075 chromosome, complete genome (CP025939.1)	84	96,14
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain XQ51 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (KU291367.1)	84	96,21
<i>Bacillus sp.</i> AM1(2019) chromosome, complete genome(CP047644.1)	84	96,06

Tabela 11. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP12 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Bacillus cereus</i> strain 1.4PT6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MK648334.1)	90	95,65
<i>Bacillus wiedmanni</i> strain D59-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MT256065.1)	89	95,89
<i>Bacillus albus</i> strain FA77 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MK993460.1)	89	95,95

Tabela 12. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP13 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Bacillus wiedmanni</i> strain D59-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MT256065.1)	91	95,06
<i>Bacillus paramycoides</i> strain BY9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MN093405.1)	88	95,76
<i>Bacillus cereus</i> strain 1.4PT6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MK648334.1)	91	94,63

Tabela 13. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP14 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Pseudomonas fragi</i> strain 8d-S10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MN062067.1)	91	97,39
<i>Pseudomonas fragi</i> strain 4G885 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MG972899.1)	91	97,53
<i>Pseudomonas sp.</i> strain N1SM1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MN928744.1)	91	97,38

Tabela 14. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP15 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Bacillus albus</i> strain FA77 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MK993460.1)	95	94,30
<i>Bacillus cereus</i> strain 2.2PT3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MK648337.1)	97	93,22
<i>Bacillus albus</i> strain SQ30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MT804651.1)	96	93,66

Tabela 15. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP16 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Bacillus sp.</i> DN7.5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MN567976.1)	96	95,37
<i>Bacillus wiedmanni</i> strain D59-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MT256065.1)	95	95,92
<i>Bacillus sp.</i> TN3D1-a1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (JN975235.1)	96	95,49

Tabela 16. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP17 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Bacillus licheniformis</i> strain LB 102-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MT795769.1)	92	95,98
<i>Bacillus licheniformis</i> strain CICC 10084 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (AY871103.1)	89	96,96
<i>Bacillus licheniformis</i> strain IND706 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MT642946.1)	89	96,89

Tabela 17. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP18 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> strain SCD2-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (KF476046.1)	86	96,33
<i>Staphylococcus sp.</i> jxk1-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (KJ504153.1)	85	96,54
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> strain 91A (BP3) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (KF254615.1)	85	96,46

Tabela 18. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP19 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Pseudomonas sp.</i> FDAARGOS_380 chromosome, complete genome (CO023969)	50	92,29
<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain KGGI20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (KY129835.1)	50	92,29
<i>Pseudomonas azotoformans</i> strain S4, complete genome (CP014546.1)	50	92,29

Tabela 19. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP20 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Pseudomonas brenneri</i> strain NA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (KT184488.1)	71	92,22
<i>Pseudomonas sp.</i> ADAK20 chromosome, complete genome (CO052858.1)	71	92,06
<i>Pseudomonas sp.</i> ADAK21 chromosome, complete genome (CO052857.1)	71	92,06

Tabela 20. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP21 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Bacillus sp.</i> DF49 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (AY462214.1)	89	97,53
<i>Bacillus sp.</i> (in: Bacteria) strain OR-B2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MN606168.1)	89	97,53
<i>Bacillus velezensis</i> strain 35SS1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MK713690.1)	89	97,46

Tabela 21. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP22 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Staphylococcus equorum</i> strain Y15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (JX134628.1)	98	97,40
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> strain yangyueP6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (KU977137.1)	99	97,33
<i>Staphylococcus equorum</i> strain T-53 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (HQ202869.1)	98	97,33

Tabela 22. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP23 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain LZ12-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MT845843.1)	92	96,05
<i>Bacillus subtilis</i> strain CIAD-Bs 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MT218329.1)	89	97,14
<i>Bacillus</i> sp. WJ-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (KP184708)	92	96,12

Tabela 23. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP24 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> strain Atecer13J 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MT386330.1)	69	84,71
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> strain UTI-045 chromosome, complete genome (CP054831.1)	69	84,62
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> strain UTI-058y chromosome, complete genome (CP054440.1)	69	84,62

Tabela 24. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP26 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Bacillus sp.</i> (in: Bacteria) strain LQ63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MG025798.1)	86	96,69
<i>Bacillus velezensis</i> strain YL15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (KY887775.1)	86	96,55
<i>Bacillus methylophilus</i> strain Mo-Bm-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (HQ662596.1)	86	96,55

Tabela 25. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP27 površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Microbacterium sp.</i> ZYZR2 gene for 16S rRNA, partial sequence (AB847928.1)	86	97,41
<i>Microbacterium sp.</i> BMA-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (DQ785816.1)	86	97,33
<i>Microbacterium sp.</i> LC255 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (JQ014477.1)	85	97,25

Tabela 26. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP28 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Bacillus licheniformis</i> strain MA-42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (KX426642.1)	87	96,97
<i>Bacillus sp.</i> strain SZ047 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (KU986668.1)	87	96,40
<i>Bacillus sp.</i> DU101(2010) 16S small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence (HM566982.1)	87	96,66

Tabela 27. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP29 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Bacillus licheniformis</i> strain MA-42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (KX426642.1)	88	98,50
<i>Bacillus licheniformis</i> strain DC3-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (EU257697.1)	89	98,20
<i>Bacillus licheniformis</i> strain J-15/1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MK418559.1)	88	98,20

Tabela 28. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP30 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Enterococcus durans</i> strain XT1-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MH891655.1)	85	97,34
<i>Enterococcus durans</i> strain KLDS 6.0930 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (KF768355.1)	85	97,27
<i>Enterococcus durans</i> strain KLDS 6.0933 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (KJ818114.1)	85	97,27

Tabela 29. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP31 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Brevibacterium sp.</i> J3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (EU099374.1)	94	96,24
<i>Brevibacterium sp.</i> strain LJ61 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MG049774.1)	94	96,04
<i>Brevibacterium epidermidis</i> strain X01-J1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MN515137.1)	94	96,16

Tabela 30. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP32 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Brevibacterium sp.</i> J3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (EU099374.1)	87	98,05
<i>Brevibacterium epidermidis</i> strain X01-J1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MN515137.1)	87	98,05
<i>Brevibacterium epidermidis</i> strain X01-J2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MN515134.1)	87	98,05

Tabela 31. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP33 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Bacillus subtilis</i> strain ISI-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MK367797.1)	62	96,30
<i>Bacillus sp.</i> 8-32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (KJ955375.1)	62	96,30
<i>Bacillus subtilis</i> strain EIV-22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (FJ613580.1)	62	96,30

Tabela 32. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP35 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Bacillus methylotrophicus</i> strain PY3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (KC790266.1)	88	97,88
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain QT-162 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MT081100.1)	89	97,80
<i>Bacillus velezensis</i> strain JM1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MK377156.1)	88	97,88

Tabela 33. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP36 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Bacillus cereus</i> strain 1.4PT6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MK648334.1)	98	96,25
<i>Bacillus toyonensis</i> strain FS-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (KY649418.1)	91	98,14
<i>Bacillus sp.</i> YXE3-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (JF701981.1)	91	98,14

Tabela 34. Rezultati molekularne identifikacije izolata DP37 sa površina plodonosnog tela kleistotecija

Najsličniji izolati dostupni u GenBank bazi podataka (NCBI pristupni broj sekvence iz BLASTA)	Pokrivenost ispitivanja (%)	Stepen poklapanja (%)
<i>Pseudomonas sp.</i> strain Fas25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MH235982.1)	53	87,84
<i>Pseudomonas putida</i> strain Ag04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (EU554430.1)	53	87,72
<i>Pseudomonas sp.</i> strain GT2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (MN527418.1)	52	87,70

9. SPISAK SKRAĆENICA:

ECM-ektomikoriza,
AM-arbuskularna mikoriza,
ERM- erikoidna mikoriza,
ITS –genetska metoda
RFLP- Metoda za genotipizaciju apolipoproteina
IAA-indol-3-sirćetna kiselina,
TTGE, *in situ* hibridizacija
DMS-dimetil-sulfid,
DMDS-dimetil-di-sulfid,
DMTS-di-metil-trisulfid
ppb-part-per-bilion
MAP-modifikovana atmosfera
DNK-dezoksi-ribonukleinska kiselina
RNK- ribonukleinska kiselina
rRNA t-transportna ribonukleinska kiselina
PCR- Polymerase Chain Reaction
BLAST- program
NCBI -baza podataka
HS GC/MS -gasno-hromatografska metoda sa masenim detektorom
ANOVA-jedno-faktorijska analiza varijanse
KZ- koeficijent zrelosti sira

10. BIOGRAFIJA AUTORA

Dušanka Paunović je rođena 28. jula 1957. godine u Beloj Crkvi. Osnovnu školu je završila u Vračev Gaju, a gimnaziju "Sava Munćan", u Beloj Crkvi. Osnovne studije na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, Odsek hemija, Grupa za industrijsku hemiju, završila je 1984/1985. U toku 1986-1987, radila je na Katedri za tehnološku mikrobiologiju Poljoprivrednog fakulteta Univeziteta u Beogradu, na usavršavanju za proizvodnju micelijuma jestivih gljiva i tehnologije proizvodnje gljiva. Od 2003. radila je kao stručni saradnik na Katedri za tehnološku mikrobiologiju Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Završila je Specijalističke akademske studije Modul tehnološka mikrobiologija 2013. Godine, a master studije Modul mikrobiologija hrane i životne sredine na Poljoprivrednom fakultetu Univerzitet u Beogradu, završila je 2015. godine. Doktorske studije na studijskom programu Prehrambena tehnologija, upisala je školske 2015/16. godine, na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu. U zajednici sa drugim autorima, objavila je i saopštila 35 naučnih radova, od kojih je 1 štampan u časopisu vrhunskog međunarodnog značaja, 4 u časopisima međunarodnog značaja i 3 tehnička rešenja. Bila je učesnik dva nacionalna projekta finansirana od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (046010 I 04600). Član je Udruženja mikrobiologa Srbije.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Душанка Пауновић

Број индекса 4-ТХ150009

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Тартуф (*Tuber sp.*): микрофлора, ароматична једињења и примена у производњи сира

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Душанка Пауновић

Број индекса 4-ТХ150009

Студијски програм Прехрамбена технологија

Наслов рада Тартуф (*Tuber* sp.): микрофлора, ароматична једињења и примена у производњи сира

Ментор проф. др Зорица Радуловић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањења у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Тартуф (*Tuber sp.*): микрофлора, ароматична једињења и примена у производњи сира
која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, _____

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране 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.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране 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.