

Univerzitet u Beogradu

Poljoprivredni fakultet

Marina P. Ivanović

POTENCIJAL PRIMENE AUTOHTONIH  
BAKTERIJA MLEČNE KISELINE KAO  
ANTILISTERIJSKIH KULTURA U PROIZVODNJI  
HRANE

Doktorska disertacija

Beograd, 2022.

University of Belgrade

Faculty of Agriculture

Marina P. Ivanović

APPLICATION POTENTIAL OF  
AUTOCHTHONOUS LACTIC ACID BACTERIA  
AS ANTILISTERIAL CULTURES IN FOOD  
PRODUCTION

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022.

**Mentor:**

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

**Članovi Komisije:**

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

**Prof. dr Dušan Živković, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet**

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

**Dr Tatjana Šolević Knudsen, naučni savetnik,  
Univerzitet u Beogradu, Institut za hemiju, tehnologiju i metalurgiju**

**Datum odbrane: \_\_\_\_\_**

## IZJAVE ZAHVALNOSTI

*Najveću zahvalnost dugujem mojoj mentorki, Prof. dr Zorici Radulović, na ukazanom poverenju, bezgraničnom strpljenju, nesebičnoj stručnoj pomoći i vođstvu tokom izrade ovog rada. Veliko hvala na snazi, volji i motivaciji koje ste mi davali.*

*Zahvaljujem se Prof. dr Jeleni Miočinović, na izuzetnoj susretljivosti, stručnim savetima, podršci. Hvala svim članovima Katedre za tehnologiju animalnih proizvoda na pruženoj pomoći tokom proizvodnje i senzorne ocene sireva.*

*Srdačno se zahvaljujem Prof. dr Dušanu Živković na korisnim savetima i stručnoj pomoći.*

*Dragoj dr Milici Mirković beskrajno hvala na ogromnoj stručnoj i drugarskoj pomoći. Hvala joj što je verovala u mene i bodrila me, inspirisala i davala mi snagu kada sam posustajala.*

*Dr Tatjani Šolević Knudsen, naučnom savetniku Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju, veliko hvala na svim korisnim savetima i sugestijama, i pružanju nesebične pomoći u izvođenju gasno-hromatografskih analiza i interpretacije rezultata.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem dr Nemanji Mirković, na svesrdnoj pomoći, ličnom i profesionalnom zalaganju, stručnoj i drugarskoj podršci u svim fazama koncipiranja i realizacije ovog rada.*

*Svim članovima Katedre za tehnološku mikrobiologiju, dragoj Duški, devojkama, veliko hvala na drugarskoj i stručnoj podršci.*

*Dragoj dr Snežani Zlatanović, beskrajno hvala za prijateljsku podršku, bodrenje i nesebičnu pomoć pri savladavanju prepreka tokom prethodnog perioda.*

*Kolektivu Mlekare "Granice" iz Mladenovca, veliko hvala na materijalnoj i stručnoj pomoći.*

*Zahvalnost dugujem preduzeću Dekor company iz Priboja, na moralnoj i materijalnoj podršci.*

*I na kraju, veliko hvala mojoj porodici. Ova teza je mali znak zahvalnosti za svu ljubav koju od njih primam i koja me iznova i iznova uči i motiviše da postanem bolja verzija sebe. Najveću zahvalnost za bezgraničnu podršku i безусловnu ljubav dugujem mojim roditeljima. Nikoli, mom životnom uspehu, mojoj snazi i radosti, beskrajno hvala što postoji. Mom bratu Aleksandru, mom Filipu, Andrei, Dušanu, Pavlu, hvala što ste deo mog sveta zauvek.*

# POTENCIJAL PRIMENE AUTOHTONIH BAKTERIJA MLEČNE KISELINE KAO ANTILISTERIJSKIH KULTURA U PROIZVODNJI HRANE

## SAŽETAK

Posebnu važnost među kontaminantima hrane ima *L. monocytogenes*, jer može uzrokovati pojavu ozbiljnih kliničkih bolesti, pa je njena kontrola veoma značajna sa aspekta bezbednosti hrane. Primena prirodnih antilisterijskih izolata u proizvodnji hrane, omogućuje dobijanje visokovrednih namirnica sa garancijom bezbednosti i očuvanja senzornih svojstava. Cilj ove disertacije je bio da se, kroz primenu u proizvodnji hrane, ispita antilisterijsko dejstvo autohtonih bakterija mlečne kiseline (BMK), poreklom iz tradicionalnih sireva sa područja Srbije. Izolat PFMI565 je odabran na osnovu najsnažnije antilisterijske aktivnosti od 200 izolata iz Sjeničkog sira. Sekvenciranjem dela gena za *16S rRNK*, identifikovan je kao *E. durans*. Praćena je aktivnost soja *E. durans* PFMI565, i sojeva *L. lactis* subsp. *lactis* 563 i *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* BGBU1-4, iz ranijih istraživanja. Testiranjem inhibitorne aktivnosti je isključena produkcija bakteriocina soja *E. durans* PFMI565, a ustanovljen značajan efekat organske kiseline i uticaj drugih inhibitornih jedinjenja. Produkcija vodonik-peroksida je potvrđena, a primenom HSS gasne hromatografije sa ECD detektorom kvantifikovana je produkcija diacetila. Ispitivani sojevi su pokazali dobra tehnološka svojstva za primenu u proizvodnji hrane, a najbolju antimikrobnu aktivnost prema *L. monocytogenes* ATCC19111, ispoljili su BGBU1-4 i PFMI565. *L. lactis* subsp. *lactis* 563, samostalno primenjen, nije pokazao antilisterijsko dejstvo, pa je isključen iz daljih istraživanja. Metodom difuzionog testa je utvrđena senzitivnost PFMI565-a i BGBU1-4 na antibiotike značajne u kliničkoj praksi. Sojevi obeleženi rezistencijom na antibiotike PFMI565<sub>str</sub> i BGBU1-4<sub>rif</sub> su primenjeni u hrani, pojedinačno ili u kombinacijama, zajedno sa *L. monocytogenes* koja je dodata u koncentracijama  $10^3$ ,  $10^4$  i  $10^5$  cfu/g. Ispitivanjem antilisterijskog delovanja u modelu sira, dobijena je statistički značajna razlika u broju patogena u odnosu na kontrolu, pri čemu je pokazano najbolje antilisterijsko dejstvo autohtonih sojeva u uzorcima sa inicijalnim  $10^3$  cfu/g *L. monocytogenes* u 14. danu, snižavanjem broja *L. monocytogenes* ispod 100 cfu/g. Dokazano je da su PFMI565<sub>str</sub> i BGBU1-4<sub>rif</sub>, u proizvodnji sira od UF mleka, inhibirali rast *L. monocytogenes*, a najbolji rezultati su postignuti u 21. danu u varijantama sa  $10^3$  cfu/g *L. monocytogenes*, snižavanjem broja patogena ispod 100 cfu/g, pri čemu je soj BGBU1-4<sub>rif</sub> pokazao bolju aktivnost do 35. dana. Primenom autohtonih sojeva, dobijeni su sirevi sa poboljšanim senzornim svojstvima, sa 84,40 - 94,60 %, od maksimalnog kvaliteta, značajno boljim od sireva sa komercijalnim starterom (56,40 - 85,90). U kajmaku je dokazano antilisterijsko delovanje u svim varijantama sa dodatim kulturama, a 14. dana, postignuti su najbolji rezultati, u uzorcima sa inicijalnim  $10^3$  cfu/g, sa brojem *L. monocytogenes* manjim od 100 cfu/g. Slabija inhibicija patogena zabeležena je u svim uzorcima lososa, pri čemu broj patogena nije bio snižen ispod 100 cfu/g tokom celog perioda. Potvrđena je dobra vijabilnost autohtonih sojeva tokom proizvodnje i skladištenja hrane i u svim uzorcima se kretala  $10^7$ - $10^8$  cfu/g. Rezultati istraživanja sugerišu da autohtoni sojevi PFMI565 i BGBU1-4, primenjeni kao protektivne kulture, mogu da obezbede zaštitu od *L. monocytogenes* u različitim proizvodima, a istovremeno kao dodatne kulture, mogu uticati na poboljšanje senzornih svojstava sira.

Ključne reči: bakterije mlečne kiseline, antilisterijska aktivnost, sir od UF mleka, kajmak, losos

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Tehnološka mikrobiologija

UDK broj: 579.864:[664:338.43(043.3)

# APPLICATION POTENTIAL OF AUTOCHTHONOUS LACTIC ACID BACTERIA AS ANTILISTERIAL CULTURES IN FOOD PRODUCTION

## ABSTRACT

*L. monocytogenes* plays an especially important role among food contaminants, as it can cause severe clinical disease. Its containment is, therefore, of paramount importance for food safety. Application of natural antilisterial isolates in production allows for the production of high value foodstuffs, with guaranteed safety and preserved sensory properties. The aim of this dissertation was to investigate the antilisterial activity of autochthonous lactic acid bacteria (LAB) strains, originating from traditional cheeses from Serbia, through their use in food production. The PFMI565 isolate was selected among 200 isolates from Sjenica cheese as it showed the strongest antilisterial activity. It was identified as *E. durans* by partial gene sequencing for *16S rRNA*. The study examined the activity of the *E. durans* PFMI565 strain, as well as strains *L. lactis* subsp. *lactis* 563 and *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 from previous studies. Bacteriocin production of *E. durans* PFMI565 was excluded by testing and a significant effect of an organic acid, together with other inhibitory compounds, was established. Hydrogen peroxide production was confirmed, and diacetyl production was detected and quantified by HSS gas chromatography with ECD detection. The strains showed good technological properties for use in food production, and the best antimicrobial activity to *L. monocytogenes* ATCC19111, was demonstrated by BGBU1-4 and PFMI565 strains. *L. lactis* subsp. *lactis* 563, used alone, showed no antilisterial effect, so it is excluded from further research. Diffuse test method was used to demonstrate the sensitivity of PFMI565 and BGBU1-4 to antibiotics significant for clinical practice. Antibiotic-labelled strains PFMI565<sub>str</sub> and BGBU1-4<sub>rif</sub> were used to produce food, individually or in combinations, together with *L. monocytogenes* added in concentrations of 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> and 10<sup>5</sup> cfu/g. Investigation of antilisterial activity using a cheese model system demonstrated a statistically significant difference in the number of pathogen cells, compared to the control, showing the best autochthonous strains antilisterial activity in samples with initially 10<sup>3</sup> cfu/g *L. monocytogenes* on day 14, decreasing number of *L. monocytogenes* below 100 cfu/g. It was proven that PFMI565<sub>str</sub> and BGBU1-4<sub>rif</sub>, in the production of UF milk cheese, inhibit the growth of *L. monocytogenes*, and the best results was achieved on day 21, in sample with 10<sup>3</sup> cfu/g *L. monocytogenes*, decreasing pathogens number below 100 cfu/g, whereby the strain BGBU1-4<sub>rif</sub> showed better activity by day 35. By applying autochthonous strains, cheese with improved sensory quality was obtained, with the maximum quality (%) of 84.10 - 94.60, which is significantly better than cheeses that use commercial starter cultures (56.40 - 85.90). In kajmak, antilisterial activity was proven in all samples with added cultures and. On day 14, the best results were achieved, with a reduction in the number of *L. monocytogenes* below 100 cfu/g in samples with initially 10<sup>3</sup> cfu/g. Poorer pathogen inhibition was observed for salmon, where the pathogens number was not reduced below 100 cfu/g, during the entire period. Satisfactory viability of the autochthonous strains during food production and storage was confirmed, and in all samples was 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> cfu/g. The findings suggest that strains PFMI565 and BGBU1-4, used as protective cultures, can provide protection from *L. monocytogenes* in different food products, while at the same time, as additional cultures, they may have an impact on the improvement of sensory properties of cheese.

Keywords: lactic acid bacteria, antilisterial activity, UF milk cheese, kajmak, salmon

Scientific field: Technological engineering

Scientific subfield: Industrial microbiology

UDC No. 579.864:[664:338.43(043.3)]

# Sadržaj

1.	UVOD.....	1
2.	PREGLED LITERATURE.....	3
2.1	PATOGENI U HRANI – EPIDEMIOLOŠKI ZNAČAJ .....	3
2.2	ZAKONODAVNI OSVRT NA KONTROLU <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> U HRANI. .....	4
2.3	<i>Listeria monocytogenes</i> – OPŠTE KARAKTERISTIKE .....	6
2.3.1	Epidemiološki rizik.....	7
2.3.2	<i>Listeria monocytogenes</i> u hrani .....	8
2.3.3	<i>Listeria monocytogenes</i> u siru .....	8
2.3.3.1	<i>Listeria monocytogenes</i> u kajmaku .....	10
2.3.3.2	<i>Listeria monocytogenes</i> u ribi .....	10
2.4	BAKTERIJE MLEČNE KISELINE .....	11
2.5	NAJVAŽNIJE VRSTE BMK .....	12
2.5.1	<i>Lactococcus</i> spp. ....	13
2.5.2	<i>Enterococcus</i> spp. ....	14
2.5.3	Zastupljenost BMK u hrani.....	15
2.6	ANTIMIKROBNI PRODUKTI METABOLIZMA BAKTERIJA MLEČNE KISELINE	16
2.6.1	Bakteriocini.....	16
2.6.2	Organske kiseline.....	18
2.6.3	Masne kiseline .....	19
2.6.4	Diacetil.....	19
2.6.5	Vodonik peroksid.....	19
2.6.6	Ugljen-dioksid.....	20
2.6.7	Ostali produkti metabolizma BMK.....	20
2.7	PRIMENA BAKTERIJA MLEČNE KISELINE KAO ANTILISTERIJSKIH KULTURA U HRANI .....	20
3.	CILJ RADA .....	22
4.	MATERIJAL I METODE .....	23
4.1	AUTOHTONI SOJEVI PRIMENJENI U ISTRAŽIVANJU .....	23
4.2	IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA BAKTERIJA MLEČNE KISELINE .....	23
4.2.1	Izolacija i utvrđivanje morfoloških karakteristika autohtonih BMK.....	23
4.2.2	Antilisterijska aktivnost izolata.....	23
4.2.3	Bakteriocinska aktivnost izolata .....	24
4.2.4	Biohemijske karakteristike izolata.....	24

4.2.4.1	Katalaza test .....	24
4.2.4.2	Test fermentacije šećera .....	24
4.3	IDENTIFIKACIJA SELEKTOVANIH BAKTERIJSKIH IZOLATA.....	24
4.3.1	Izolacija totalne DNK selektovanih sojeva BMK.....	24
4.3.2	Umnožavanje DNK fragmenata – PCR (“Polymerase Chain Reaction”) .....	25
4.3.3	Elektroforeza.....	25
4.3.4	Sekvenciranje .....	26
4.4	TESTIRANJE TEHNOLOŠKIH OSOBINA SOJEVA.....	26
4.4.1	Sposobnost rasta pri različitim temperaturama.....	26
4.4.2	Sposobnost rasta pri različitim koncentracijama soli.....	26
4.4.3	Produkcija egzopolisaharida .....	26
4.4.4	Ispitivanje acidogene aktivnosti.....	26
4.5	SPOSOBNOST PRODUKCIJE AROMOGENIH JEDINJENJA .....	26
4.5.1	Determinacija produkcije diacetila - Kreatinski test.....	26
4.5.2	Utvrđivanje prisustva acetil-metil-karbinola (acetoin) - Reakcija Voges-Proskauer .....	27
4.6	PRODUKCIJA DIACETILA (GASNA HROMATOGRAFIJA).....	27
4.7	PRODUKCIJA VODONIK-PEROKSIDA.....	30
4.8	INHIBITORNA SVOJSTVA SELEKTOVANIH SOJEVA .....	30
4.8.1	Antimikrobna aktivnost selektovanih sojeva prema <i>L. monocytogenes</i> ATCC19111 i <i>S. aureus</i> ATCC25923 .....	30
4.9	REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE SELEKTOVANIH SOJEVA.....	31
4.10	FERMENTACIJA MLEKA.....	31
4.11	ISPITIVANJE ANTIMIKROBNOG POTENCIJALA SELEKTOVNIH SOJEVA U HRANI .....	32
4.11.1	Određivanje broja ćelija u bujonu.....	32
4.11.2	Obeležavanje sojeva bakterija mlečne kiseline rezistencijom na antibiotike ....	32
4.11.3	Model sira .....	32
4.11.4	Proizvodnja sira od UF mleka.....	33
4.11.4.1	Praćenje pH vrednosti sira od UF mleka u toku skladištenja.....	35
4.11.4.2	Senzorna analiza sira od ultrafiltriranog mleka.....	35
4.11.5	Ispitivanje antilisterijske aktivnosti BMK u kajmaku .....	36
4.11.6	Ispitivanje antilisterijske aktivnosti <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> BGBU1-4 <sub>rif</sub> i <i>E. durans</i> PFMI565 <sub>str</sub> u lososu .....	36
4.11.7	Određivanje broja <i>L. monocytogenes</i> u uzorcima sira, kajmaka i lososa .....	37
4.11.8	Enumeracija broja BMK u uzorcima sira, kajmaka i lososa.....	38
4.12	STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA .....	38



5.	REZULTATI I DISKUSIJA.....	39
5.1	IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA SOJEVA .....	39
5.1.1	Izolacija.....	39
5.1.2	Antilisterijska aktivnost izolata.....	39
5.1.3	Biohemijske karakteristike izolata.....	40
5.1.3.1	Katalaza test .....	40
5.1.3.2	Fermentacija šećera .....	40
5.2	IDENTIFIKACIJA SELEKTOVANOG IZOLATA PFMI565 .....	40
5.3	TESTIRANJE TEHNOLOŠKIH SVOJSTAVA SOJEVA.....	41
5.3.1	Rast na različitim temperaturama .....	41
5.3.2	Rast pri različitim koncentracijama soli na 30 °C .....	41
5.3.3	Produkcija egzopolisaharida .....	42
5.3.4	Acidogena sposobnost .....	42
5.4	SPOSOBNOST PRODUKCIJE AROMOGENIH JEDINJENJA .....	43
5.4.1	Determinacija produkcije diacetila – Kreatinski test .....	43
5.4.2	Utvrđivanje prisustva acetil-metil-karbinola (acetoina) - Voges-Proskauer test .....	43
5.5	PRODUKCIJA DIACETILA - GASNA HROMATOGRAFIJA.....	44
5.6	PRODUKCIJA VODONIK-PEROKSIDA.....	45
5.7	INHIBITORNA SVOJSTAVA SELEKTOVANIH SOJEVA .....	46
5.7.1	Antimikrobna aktivnost ispitivanih sojeva .....	46
5.8	REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE .....	48
5.9	FERMENTACIJA MLEKA.....	49
5.10	ISPITIVANJE ANTILISTERIJSKOG EFEKTA ODABRANIH SOJEVA U HRANI.....	50
5.10.1	Model sira .....	50
5.10.2	Rezultati praćenja antilisterijskog dejstva BMK u uslovima proizvodnje sira od UF mleka .....	55
5.10.2.1	pH sira od UF mleka u toku skladištenja .....	60
5.10.2.2	Senzorna ocena sira.....	61
5.10.3	Ispitivanje antilisterijske aktivnosti BMK u kajmaku .....	62
5.10.4	Ispitivanje antilisterijske aktivnosti BMK u lososu .....	67
5.11	VIJABILNOST ISPITIVANIH SOJEVA U HRANI .....	71
5.11.1	Preživljavanje <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> BGBU1-4 <sub>rif</sub> i <i>E. durans</i> PFMI565 <sub>str</sub> u siru od UF mleka .....	71
5.11.2	Preživljavanje <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> BGBU1-4 <sub>rif</sub> i <i>E. durans</i> PFMI565 <sub>str</sub> u kajmaku .....	73
5.11.3	Preživljavanje <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> BGBU1-4 <sub>rif</sub> i <i>E. durans</i> PFMI565 <sub>str</sub> u lososu.....	76

6. ZAKLJUČAK.....	79
7. LITERATURA.....	83
8. SPISAK SKRAĆENICA.....	100
9. BIOGRAFIJA AUTORA.....	101

# 1. UVOD

Sprečavanje kontaminacije proizvoda, tokom njegove proizvodnje i skladištenja, od izuzetnog je značaja za industriju, naročito ako se radi o proizvodima proizvedenim bez primene termičkih tretmana. Imajući u vidu da *Listeria monocytogenes* predstavlja značajnog uzročnika bolesti, koji se uglavnom prenosi putem hrane, kao i činjenicu da kod starije populacije, hroničnih bolesnika, trudnica, imunokompromitovanih, može izazvati teže oblike bolesti, istraživanjima u ovoj oblasti poklanja se sve veća pažnja. Duži period preživljavanja u nepovoljnim uslovima spoljašnje sredine, posedovanje specifičnih mehanizama opstanka i adaptacije, sposobnost formiranja biofilmova, samo neke su od karakteristika ovog patogena. Formiranje biofilmova na različitim vrstama materijala koji dolaze u kontakt sa hranom u toku pripreme, kao i pričvršćivanje patogena za površinu opreme, često doprinose visokom stepenu preživljavanja *L. monocytogenes* u prehrambenoj industriji.

Usled loše higijenske prakse, ili unakrsne kontaminacije, dešava se da se proizvod kontaminira *L. monocytogenes*, bez obzira što je u procesu proizvodnje hrane primenjen neki od termičkih tretmana koji nepovoljno utiče na ovaj patogen (Melo et al., 2015; Heiman et al., 2016; Jackson et al., 2018).

Listerija može da se prenosi putem različite hrane, mekog sira, kobasica, delikatesnih proizvoda, dimljenih plodova mora, mesa, salate, voća, povrća (Adzitey, 2010; Jordan i McAuliffe, 2018). Ovaj patogeni mikroorganizam može da preživi i poveća broj svojih kolonija u siru i duže od 60 dana na temperaturi rashlađivanja (D'Amico et al., 2008). Najveću opasnost predstavljaju sirevi pripremljeni od nepasterizovanog mleka. Zabeleženi su rezultati preživljavanja određenih sojeva *L. monocytogenes* na temperaturi skladištenja +4 °C u retentatu nakon ultrafiltracije mleka u periodu 3 - 5 nedelja, a u obranom mleku 4 - 6 nedelja (El-Gazzar et al., 1992).

Osiguranje bezbednosti proizvoda i očuvanje u roku trajanja predstavlja osnovni cilj svakog proizvođača hrane. Mikrobiološka sigurnost proizvoda u značajnoj meri se obezbeđuje primenom sintetičkih sredstava i/ili agresivnih fizičkih tretmana. Međutim, njihovom upotrebom, gubi se na senzornom kvalitetu, a kod potrošača se stvara sumnja u zdravstvenu bezbednost proizvoda. Radi obezbeđenja mikrobiološke, ali i hemijske sigurnosti hrane, te zadovoljenja potrebe današnjeg potrošača, neophodno je iznaći alternativne načine čime bi bila ispoštovana većina kriterijuma. Razvojem novih biotehnologija, zasnovanih na bezbednosti proizvoda i zaštiti zdravlja konzumenta, uz primenu prirodnih bakterijskih izolata, proizvode se visokovredne namirnice sa očuvanim teritorijalnim osobenostima ukusa.

Prirodni izolati autohtonih bakterija mlečne kiseline (BMK), svojim metabolitima mogu uticati na pojavu patogena i osigurati mikrobiološku bezbednost proizvoda. Primena tehnike biokonzervisanja, uključuje upotrebu prirodnih mikroorganizama i njihovih metabolita sa antimikrobnim potencijalom, kao što su mlečna kiselina, bakteriocini, itd., što može dati doprinos u bezbednosti ili produženju roka trajanja proizvoda. Primarni metabolizam BMK karakteriše produkcija supstanci sa antimikrobnim svojstvima, među koje se ubrajaju i: organske kiseline, diacetil, vodonik-peroksid, dok kao produkti sekundarnog metabolizma nastaju proizvodi slični antibioticama, bakteriocini, koji mogu sprečiti rast bakterija, izazivača kvarenja hrane i patogena. Po definiciji, bakteriocini predstavljaju peptide koji su ribozomalno sintetisani i imaju malu molekulsku masu. Karakteriše ih svojstvo da uglavnom deluju na blisko srodne vrste. Jedna od bitnijih osobina je njihov uticaj na patogene i bakterije koje kvare hranu (Lozo et al., 2017). Značajnu antimikrobnu ulogu imaju i aromogena jedinjenja, kao što su acetoin, diacetil, acetaldehid. Takođe, bakteriostatsku i baktericidnu ulogu može imati i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Juven i Pierson, 1996).

Zahvaljujući divergentnosti vrsta i sojeva, specifičnostima metabolizma, aplikativna uloga BMK u prehrambenoj industriji je izuzetno značajna. Produkcijom aromogenih jedinjenja, egzopolisaharida, sprečavanjem rasta patogenih mikroorganizama i probiotskom aktivnošću, BMK obezbeđuju

zdravstvenu sigurnost i zadovoljavajući kvalitet finalnog proizvoda. Bogat izvor vrlo značajnih izolata autohtonih sojeva BMK čine tradicionalni proizvodi, koji nose osobenosti i suštinski kvalitet jednog podneblja. Na taj način, uz primenu autohtonih BMK, dobijaju se proizvodi koji lako osvajaju domaće i svetsko tržište. U zavisnosti od specifičnosti metabolizma inokulata BMK u proizvodnji hrane, razvijaju se različite tehnološke karakteristike proizvoda, dobijaju proizvodi sa poželjnim i tradicionalno prepoznatljivim senzornim svojstvima.

Osluškujući potrebe sve zahtevnijeg tržišta, zadatak proizvođača je prilagođavanje tehnoloških procesa proizvodnje novim trendovima. Kombinacija dobre proizvođačke prakse (GMP), sa dobrom higijenskom praksom (GHP), razvojem specifičnih HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*) procesnih i proizvodnih planova, kao i minimalno agresivnih tehnika proizvodnog procesa, rezultirala bi proizvodnjom artikla koji zadovoljava zahteve sigurnosti i željenog kvaliteta. Primena autohtonih izolata BMK, sa dokazanim poželjnim tehnološkim osobinama, osim osiguranja ispravnosti proizvoda tokom roka trajanja, doprinela bi i očuvanju tradicionalno priznatih i prepoznatljivih organoleptičkih osobina proizvoda.

## 2. PREGLED LITERATURE

Razvoj savremenog društva odlikuju izmene ustaljenih obrazaca ponašanja u gotovo svim životnim sferama. Globalna trgovina hranom, uz promene prehrambenih navika pojedinca, donosi povećan rizik po narušavanje bezbednosti životnih namirnica. Moderni čovek, na svesnom i nesvesnom nivou, usvaja nove načine obrade namirnica, pripremanja jela i ishrane. Sve više pažnje posvećuje se odabiru proizvoda, pri čemu primat dobijaju oni sa oznakom "prirodno", "zdravo", "domaće". Minimalno tretirani proizvodi različitim hemijskim sredstvima tokom proizvodnog procesa, očuvanih prepoznatljivih senzornih svojstava, a pritom zdravstveno bezbedni, zauzimaju vodeću poziciju na svetskom tržištu, što se podudara sa zahtevima današnjeg potrošača. Porast interesovanja konzumenata za ovom vrstom proizvoda predstavlja izazov za proizvođače da udovolje potrebama tržišta stvarajući minimalno tretiran, bezbedan proizvod sa odgovarajućim rokom trajanja i očuvanim organoleptičkim osobinama. Stoga je naglašena potreba za proizvodnjom zdravstveno bezbednih proizvoda i očuvanjem njihove zdravstvene ispravnosti u roku trajanja, s obzirom da se hrana, u velikom broju slučajeva, javlja kao put prenošenja patogenih mikroorganizama. Posledica toga su pojave velikog broja obolelih, visoka smrtnost i veliki ekonomski gubici uzrokovani bolestima koje se prenose dominantno hranom (EFSA i ECDC, 2019).

### 2.1 PATOGENI U HRANI – EPIDEMIOLOŠKI ZNAČAJ

Kao uzročnik trovanja hranom, duži niz godina prednjači *Campylobacter* sp. Za period 2012 – 2016. godine, karakterističan je njihov rastući trend. Kampilobakterioze su bile najčešće registrovane u 2016. godini, u gotovo 70 % svih slučajeva humanih zoonoza. Potom slede salmoneloze, jersinioze, infekcije *Shiga*-toksogenom *E. coli* (STEC infekcije) (EFSA i ECDC, 2017). Slična situacija zabeležena je i 2017. godine u Evropskoj Uniji, kada su, nakon kampilobakterioza, najučestalije bile salmoneloze, jersinioze, STEC infekcije (EFSA i ECDC, 2017). Najčešće intoksikacije posledica su stafilokoknog trovanja hranom (Fetsch i Jöhler, 2018).

Listerioze, bakterijske crevne infekcije nastale kao posledica konzumiranja hrane koja je kontaminirana bakterijama iz roda *Listeria*, čine zoonoze koje su najređe prijavljene, ali sa najviše hospitalizovanih lica i procentualno najviše smrtnih ishoda. U SAD se godišnje registruje oko 1600 listerioza (Scallan et al., 2011). Period 2008 – 2016. godine, kao i 2012 – 2016. godine karakteriše trend porasta broja listerioza (EFSA i ECDC, 2017). U EU u 2016. godini registrovano je 2536 potvrđenih slučajeva listerioze, sa incidencijom od 0,47 % na 100000 stanovnika, što ukazuje na porast u odnosu na 2015. godinu, u kojoj je zabeleženo 2206 slučajeva listerioza na 100000 stanovnika i incidencija 0,43 % (EFSA i ECDC, 2017).

Prema Izveštaju o kretanju zaraznih bolesti u Republici Srbiji u 2016. godini (Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut, 2017), hrana je u 2016. godini bila put prenosa 35 epidemija, sa 194 obolele osobe i 8 hospitalizovanih slučajeva. Za period 2008 – 2016. godine, beleži se trend pada specifične stope incidencije obolevanja od salmoneloza (posmatrano na 100000 stanovnika), dok u slučaju kampilobakterioza i jersinioza se beleži trend rasta. Kada su u pitanju zoonoze, za isti period, registruje se trend pada stope incidencije. Listerioza se pojavljivala najčešće u starosnoj dobi iznad 60 godina, u 8 slučajeva, sa stopom incidencije 0,11 % (na 100000 populacije), bez registrovanih smrtnih ishoda (Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut, 2017). U Zdravstveno-statističkim godišnjacima Republike Srbije (bez registrovanih podataka za Kosovo i Metohiju) za 2018. i 2019. godinu istog Instituta (Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut, 2019; 2020) navodi se da je najčešći uzročnik epidemija u 2018. i 2019. godini bio *Salmonella enteritidis* sa 42 odn. 32 epidemije. Od kampilobakterijskog enteritisa

u 2018. godini obolelo je 567 lica, a u 2019. godini 784. Jersinioze su bile zastupljene u 20 slučajeva (2018.) i 14 (2019.). U 2018. godini od listerioze je obolelo 6 osoba (*L. septica* – 2; *L. non specificata* – 4), a smrtni slučajevi nisu registrovani. Tokom 2019. godine, od listerioza je umrlo 5 osoba. Letalitet 50 % vezuje se za *L. septica* (od 2 obolele osobe, 1 sa smrtnim ishodom), a 30,77 % za *L. non specificata* (od 13 obolelih, 4 umrla lica)(Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut, 2019; 2020).

Iako najređe prijavljena, *Listeria monocytogenes* predstavlja uzročnika alimentarnih trovanja sa najvećim brojem hospitalizovanih slučajeva i smrtnih ishoda. Tome, u velikoj meri, doprinose njena rasprostranjenost u prirodi i sposobnost rasta na temperaturi hlađenja (Jackson et al., 2018). *Listeria* sp. preživljava dugo u nepovoljnim uslovima, što predstavlja razlog za dodatnu zabrinutost proizvođača hrane i potrošača (EFSA i ECDC, 2018). Uzimajući u obzir da je procenat smrtnosti izazvanih ovim patogenom 20-30 %, kao i činjenicu da je izuzetno raširena u okruženju i da lako može kontaminirati postrojenja i uređaje za pripremu namirnica (Jordan i McAuliffe, 2018), *L. monocytogenes* predstavlja realnu opasnost u lancu ishrane.

## **2.2 ZAKONODAVNI OSVRT NA KONTROLU *LISTERIA MONOCYTOGENES* U HRANI**

Radi potrebe obezbeđenja i osiguranja bezbednosti krajnjeg proizvoda, u zakonodavstvo Evropske Unije, 2005. godine uvrštena je Regulativa Evropske zajednice (EC) No 2073 o mikrobiološkim kriterijumima za hranu (Commition regulation, 2005), koja kroz dve vrste kriterijuma: kriterijum bezbednosti i kriterijum higijene procesa, reguliše ovu oblast. Kriterijumi bezbednosti služe da bi se procenila bezbednost hrane, dok kriterijum higijene procesa ocenjuje da li se sam proizvodni proces sprovodi uz adekvatnu primenu higijenskih mera. U slučaju da kriterijumi nisu zadovoljeni, regulisana je obaveza subjekta u poslovanju hranom o preduzimanju odgovarajućih aktivnosti koje su definisane u okviru Regulative Evropske zajednice No 2073/2005 (Commition regulation, 2005). Prema Regulativi, prisustvo *L. monocytogenes* u gotovoj hrani (ready-to-eat food) u 25 g nije dozvoljeno, ukoliko se kriterijum primenjuje na hranu za odojčad ili medicinske potrebe. U onoj vrsti hrane koja podržava rast ovog patogena određena je granica od 100 cfu/g tokom roka upotrebe, a neposredno pre puštanja u promet, *L. monocytogenes* ne sme biti prisutna u 25 g.

*Codex Alimentarius* komisija 2007. godine objavljuje Vodič o primeni opštih načela higijene hrane za kontrolu prisustva *L. monocytogenes* u gotovoj hrani. U Aneksu I – III naznačene su preporuke o načinu vršenja monitoringa okruženja mesta proizvodnje (površine koje dolaze ili ne dolaze u kontakt sa *L. monocytogenes*). Ove preporuke date su za nadležne kontrolne institucije i tela, u slučaju da u svoje redovne aktivnosti, uključe i nadzor nad okruženjem, kontrolom procesa i sl. Preporučeni su načini vršenja mikrobioloških ispitivanja, kako bi se proverila uspešnost sprovođenja opštih higijenskih mera u objektu koji posluje sa hranom, kao i uspešnost kontrolnih mera u objektima u kojima je uspostavljen HACCP ili neki drugi sistem za kontrolu bezbednosti hrane (CAC, 2007), budući da je u Opštim principima higijene hrane data preporuka za uspostavljanje istih (CAC, 2003). Implementacija ovakvih načina kontrole okruženja, za samog proizvođača hrane, predstavlja potvrdu dobrog dizajna opreme i prostora, i primene sanitacionih procedura, a istovremeno ovakav vid kontrole obezbeđuje potvrdu odgovarajuće identifikacije i kontrole mrtvih uglova i skrivenih mesta na kojima bi se *L. monocytogenes*, eventualno mogla naći. Na osnovu uspostavljenih mikrobioloških kriterijuma, u slučaju pojave nepoželjnih trendova, subjekat u poslovanju hranom u obavezi je da preispita sistem kontrole radi utvrđivanja uzroka i preduzimanja korektivnih mera, a nadležne kontrolne (inspeksijske) službe proveravaju da li su preduzete odgovarajuće radnje i postupci u slučaju prekoračenja kriterijuma (CAC, 2007).

Zakonodavno telo Republike Srbije uvrstilo je Zakon o bezbednosti hrane ("Službeni glasnik Republike Srbije", br.41/2009) u zvanična akta 2009. godine, kojim je izvršena svojevrsna verifikacija međunarodnih standarda u oblasti bezbednosti hrane, a uspostavljanje i organizacija

sistema u oblasti bezbednosti i kvaliteta hrane u skladu sa *Codex alimentarius*-om, postali su obavezujući. Zasnovano na preporukama FAO (*Food and Agriculture Organization*), WHO (*World Health Organization*) i WTO (*World Trade Organization*), prihvaćena je analiza opasnosti i kritičnih kontrolnih tačaka HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*) i u Republici Srbiji. Uspostavljen je sistem procene opasnosti rizika, čime je omogućeno svim učesnicima u procesu proizvodnje i prometa hrane planiranje aktivnosti prema potencijalnom nivou rizika.

Da bi se obezbedila usaglašenost hrane sa mikrobiološkim kriterijumima, potrebno je da se u svakoj fazi proizvodnje, prerade i distribucije hrane, preduzimaju mere koje su zasnovane na načelima HACCP-a, uz obavezno sprovođenje postupaka dobre higijenske prakse (*Good Hygienic Practice - GHP*) i dobre proizvođačke prakse (*Good Manufacturing Practice - GMP*). Kao osnovni cilj postavlja se bezbednost hrane. Subjekti u poslovanju hranom sprovode ispitivanja prema mikrobiološkim kriterijumima, prilagođavajući dinamiku prirodi i obimu proizvodnje. Prilikom inspeksijskog nadzora i planskog monitoringa, u svrsi samokontrole proizvođača hrane, kao i radi usklađivanja sa uslovima koje nalaže zakonodavstvo, očuvanja i obezbeđenja kvaliteta i zdravstvene ispravnosti, vrše se ispitivanja ispravnosti sirovina, gotovih proizvoda, briseva sa površina i ruku zaposlenih na poslovima pripreme i usluživanja hrane. S obzirom da prisustvo *L. monocytogenes* može predstavljati opasnost po javno zdravlje, legislativom je regulisano da se, u objektima u kojima se vrši priprema hrane koja pogoduje njenom rastu i razvoju, sa proizvodne opreme i površina koje dolaze u kontakt sa hranom u postupku pripreme, uzimaju uzorci radi provere prisutnosti ovog patogena. Prikupljeni podaci u ovoj oblasti ukazuju na eventualne propuste i nepravilnosti pri radu, nakon čega se pribegava korektivnim merama radi otklanjanja istih (Ivanović, 2015).

U procesu utvrđivanja roka trajanja hrane spremne za konzumiranje, proizvođač je dužan da analizira uslove koji odgovaraju razmnožavanju *L. monocytogenes* u hrani. Neophodno je da razmotri i o kojoj vrsti hrane se radi, pri čemu u obzir treba uzeti njene osobine, sastav i fizičko-hemijske karakteristike. Takođe, treba razmotriti način i uslove proizvodnje, čuvanja, pakovanja, skladištenja, kao i spoljne faktore: temperaturu, relativnu vlažnost, koncentraciju gasova. Među najbitnijim svojstvima koja utiču na preživljavanje i razmnožavanje *L. monocytogenes* u hrani spremnoj za konzumiranje izdvajaju se pH, aktivnost vode ( $a_w$ ), temperatura i dužina skladištenja proizvoda. Na preživljavanje *L. monocytogenes* u hrani, osim toga, mogu uticati starter kulture, konzervansi (Ministarstvo poljoprivrede, trgovine, turizma i vodoprivrede, 2011). Subjekt u poslovanju hranom, na osnovu svih ovih osobina, izvodi zaključak da li, eventualno, listerija može preživeti i razmnožavati se u toj vrsti hrane. Pored toga, subjekat u poslovanju hranom, različitim dostupnim tehnikama, preduzima mere kako bi uklonio realne pretnje po bezbednost proizvoda, a proizvod učinio nepogodnim za rast i razmnožavanje ovog mikroorganizma.

U Vodiču za primenu mikrobioloških kriterijuma za hranu, Ministarstva poljoprivrede, trgovine, šumarstva i vodoprivrede (2011), naznačeno je da se hrana može svrstati u dve kategorije (tabela 1), posmatrano prema mogućnosti rasta *L. monocytogenes* u hrani:

1. Hrana spremna za konzumiranje koja podržava razmnožavanje *L. monocytogenes*
2. Hrana spremna za konzumiranje koja ne podržava rast *L. monocytogenes*.

Rast i razvoj *L. monocytogenes* ne podržava tip prehrambenog proizvoda koji ima sledeća svojstva:

- pH < 4,4 i  $a_w \leq 0,92$
- pH < 5,0 i  $a_w \leq 0,94$
- rok upotrebe kraći od 5 dana.

Ovoj grupi se može pridružiti i ona vrsta hrane za koju postoje dokazi da nije pogodna za rast *L. monocytogenes* (Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa, Sl. glasnik Republike Srbije br. 72/2010, 62/2018).

Tabela 1. Izvod iz Pravilnika o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa ("Sl.gl.RS", br. 72/2010 i 62/2018)

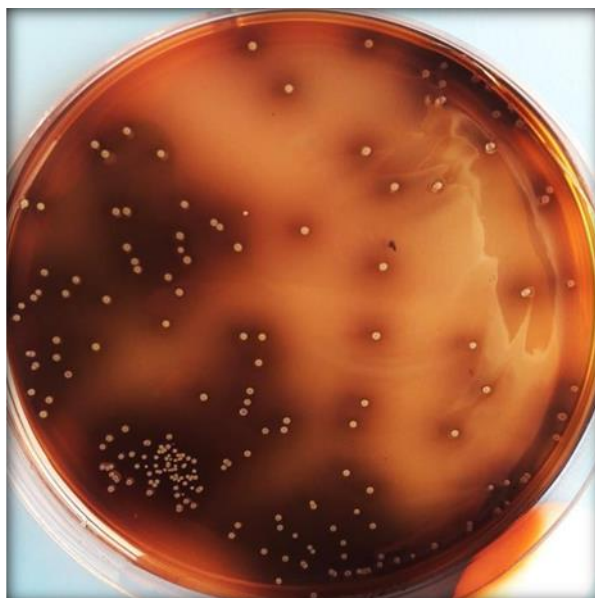
Kategorija hrane	Mikroorganizmi/ njihovi toksini, metaboliti	Plan uzorkovanja		Granične vrednosti m/M	Referentna metoda ispitivanja	Faza u kojoj se kriterijum primenjuje
		N	c			
1.1 Hrana spremna za konzumiranje koja podržava rast <i>L.monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 cfu/g	EN ISO 11290-2	Proizvod u prometu tokom njegovog roka upotrebe
		5	0	Ne sme biti u 25g	EN ISO 11290-1	Pre nego što hrana prestane da bude pod neposrednom kontrolom subjekta koji je proizveo
1.2 Hrana spremna za konzumiranje koja ne podržava rast <i>L.monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 cfu/g	EN ISO 11290-2	Proizvod u prometu tokom njegovog roka upotrebe

Ovi kriterijumi se ne primenjuju na gotovu hranu koja je termički obrađena ili se iz nje na neki drugi način uklanja *L. monocytogenes* i ne može se ponovo kontaminirati. Takođe, isti se ne mogu primeniti na hleb, keks, slične proizvode, na sveže sečeno i neobrađeno voće i povrće (izuzimajući klice), na flaširanu ili upakovanu vodu, bezalkoholna pića, pivo, vino, jaka alkoholna pića i sl. Proizvodi od kakaoa, čokolade, šećer, med i konditorski proizvodi, živi školjkaši i kuhinjska so, ne podležu ovim kriterijumima (Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa, Sl. glasnik Republike Srbije br. 72/2010, 62/2018).

### 2.3 *Listeria monocytogenes* – OPŠTE KARAKTERISTIKE

*Listeria monocytogenes* je asporogeni Gram-pozitivan bacil koji nema kapsulu i ima flagele. Na sobnoj temperaturi je pokretan, dok na temperaturi 37 °C nije. S obzirom da je rasprostranjen u prirodi, može da se nađe na tlu, vodama, truleži i sl. U okruženju u prirodi *L. monocytogenes* može opstati više godina, u proizvodima na temperaturi zamrzavanja -18 °C, više meseci (Kuzmanović et al., 2011). Na većini hranljivih podloga u aerobnim i mikroaerofilnim uslovima dobro raste (slika 1). Na krvnom agaru listerija stvara glatke, beličaste, konveksne i sjajne kolonije okružene zonom β-hemolize. Bujon difuzno muti. *L. monocytogenes* je psihrotolerantna, pa se može kultivisati i na +4 °C. Otporna je na veću koncentraciju soli, a podnosi i nizak nivo pH. Posедуje somatske O i flagelarne H antigene.





Slika 1. *Listeria monocytogenes* na Palcam agaru

### 2.3.1 Epidemiološki rizik

*L. monocytogenes* predstavlja vrlo značajnog uzročnika bolesti koje se prenose putem hrane. Osim direktnog kontakta sa obolelom životinjom, čovek se najčešće inficira zaraženom, kontaminiranom hranom. Klinička slika bolesti čiji je uzročnik ovaj patogen poreklom iz hrane, u najvećem broju slučajeva je blaga, dok se, kod pripadnika osetljive populacije, trudnica, starijih ili imunokompromitovanih osoba, često manifestuje kao neurolisterioza (meningitis, meningoencefalitis), sepsa ili mononukleozni sindrom (Ramaswamy et al., 2007). Kao što je prethodno navedeno, listerija može izazvati teži oblik bolesti, sa velikim brojem hospitalizovanih slučajeva i visokom stopom smrtnosti (Buchanan et al., 2017). Perinatalna listerioza je vrlo često povezana sa negativnim ishodima trudnoće, pobačajima i smrću novorođenčadi. Prolaskom kroz placentu, *L. monocytogenes* može dovesti do infekcije ploda, prevremenog porođaja ili rađanja mrtvog novorođenčeta (Li et al., 2020). Kod zdravih osoba listerija izaziva blagi gastroenteritis i simptome slične gripu. Iako se pojavljuje znatno ređe od ostalih akutnih infektivnih bolesti čiji je put prenošenja hrana, svrstava se u najznačajnije patogene, sa najvećom stopom letaliteta (Ramaswamy et al., 2007). Bez obzira što se *Listeria* sp. retko pojavljuje kao patogen kod ljudi, gotovo svi prijavljeni slučajevi listerioze su hospitalizovani. Iako je broj smrtnih slučajeva u 2018. godini u Evropskoj Uniji smanjen, *Listeria* sp. i dalje ostaje među vodećim uzročnicima zoonoza koje su prenose putem hrane. U periodu 2009 – 2018., kao i periodu 2014 – 2018. godine, u Evropskoj Uniji zabeležen je statistički značajan porast broja potvrđenih listerioza (EFSA i ECDC, 2019).

Razlog više za dodatnu zabrinutost konzumenata i proizvođača hrane, predstavlja duži period preživljavanja listerije u neprijateljskom okruženju i posedovanje specifičnih mehanizama koji joj obezbeđuju opstanak. Visok stepen preživljavanja *L. monocytogenes* u prehrambenoj industriji omogućuje i sposobnost pričvršćivanja ovog patogena na površinu opreme izrađene od različitih materijala, kao i formiranje biofilmova na različitim vrstama materijala koji dolaze u kontakt sa hranom u toku pripreme, bez obzira na prethodnu primenu postupaka čišćenja i dezinfekcije (Harvey et al., 2007). Biofilmovi predstavljaju formacije bakterijskih ćelija pričvršćene za površinu polimerom, koji same proizvode (Tremblay et al., 2014) radi adaptacije na nepovoljne uslove

života. U biofilmovima bakterije, udružujući se u zajednice, postaju otpornije na dezinficijense, antibiotike, pa iz tog razloga mogu predstavljati dugotrajan izvor kontaminacije hrane (Čabarkapa, 2015). Opasnost od biofilmova je veća, s obzirom da postoji mogućnost da se bakterije, odvajajući se sa abiotske površine, prošire po pogonima za proizvodnju hrane. Istraživanjem koje su sproveli Dygico et al. (2020), u biofilmovima na površinama od nerđajućeg čelika, betona, gume, aluminijuma, polikarbonata, polipropilena, pronađeno je čak sedam različitih sojeva *L. monocytogenes*. Postoji nekoliko načina rešavanja problematike biofilmova. Prvenstveno, može se uticati na početnu adheziju mikroorganizama, sprečavanjem rasta mikroorganizama, inhibiranjem sinteze polimernog matriksa ili degradacijom samog matriksa (Tremblay et al., 2014). Svakako, delovanjem na sam rast patogena, znatno se slabi mogućnost nastanka i održavanja nakupina mikroorganizama, što smanjuje mogućnost proizvodnje mikrobiološki nebezbednog finalnog proizvoda.

### 2.3.2 *Listeria monocytogenes* u hrani

*L. monocytogenes* je široko rasprostranjena u prirodi. Možemo je naći u zemljištu, vodi, truleži. U hranu može dospeti na različite načine. Preživljava i raste u brojnim matriksima. Navodi se njeno prisustvo u mlečnim proizvodima, dimljenim plodovima mora, sečenom voću i povrću, delikatesnim proizvodima, kobasicama (Adzitey, 2010; Melo et al., 2015; Buchanan et al., 2017).

### 2.3.3 *Listeria monocytogenes* u siru

Mlečni proizvodi, sa svojim nutrijentima, predstavljaju pogodan matriks za razvoj listerije i drugih patogenih bakterija. U literaturnim podacima opisani su slučajevi preživljavanja i rasta *L. monocytogenes* u buteru, različitim sirevima od svežeg mleka, sirevima od pasterizovanog mleka, sirevima u salamuri (Adzitey, 2010; Barancelli et al., 2011; Barancelli et al., 2014; Melo et al., 2015). Sirevi koji potiču od nepasterizovanog mleka imaju najveći rizik od kontaminacije, pogotovo iz razloga što novije doba prati sve veća potražnja stanovništva za proizvodima proizvedenim na organski način, bez upotrebe aditiva ili hemijskih konzervanasa. Ogromna većina sprovedenih studija i literaturnih podataka zasnovana je na izučavanju prisustva listerije u mesnim delikatesnim proizvodima, kobasicama, mekim sirevima, dimljenim plodovima mora (Adzitey, 2010). Budući da se *L. monocytogenes* može naći u različitim vrstama proizvoda (Tabela 2 i 3), u poslednje vreme fokus istraživanja regulatornih tela i industrije, predstavlja i hrana, kao što je sečeno voće i povrće, dinja, sladoled, klice mungo pasulja, koštunjavo voće, koja se pojavljuje kao put prenošenja ovog patogena (Buchanan et al., 2017).

Prema literaturnim podacima, slučajevi trovanja različitim vrstama mlečnih proizvoda su dosta česti. U 13 država SAD-a i Kolumbija distriktu, u periodu od marta do oktobra 2012. godine, zabeležena su 22 slučaja trovanja hranom koja su rezultirala sa 4 smrtna ishoda, jednim pobačajem i jednim mrtvorodenčetom, gde je *L. monocytogenes* bila uzročnik (Heiman et al., 2016). Oboleli su konzumirali različite vrste mekih sireva i/ili rikota salatu, među kojima je bilo sireva od pasterizovanog i od nepasterizovanog mleka. Sirevi su razmeravani i prepakivani, što je, usled loše higijenske prakse, dovelo do kontaminacije pribora, a na kraju i proizvoda. Jackson et al. (2018) navode da je u SAD, broj listerioza od 2006. godine, povezanih sa sirom proizvedenim u ne higijenskim uslovima, u porastu. Pritom, čak 2/3 listerioza su bile vezane za konzumaciju mekog sira ("Latin") od pasterizovanog mleka, gde je kontaminacija nastupila u postpasterizacionom periodu, kao rezultat lošeg sprovođenja higijenskih mera. Iz navedenog se može zaključiti da je prisustvo patogena u proizvodima moglo biti uzrokovano na više načina: ne sprovođenjem ili neadekvatnim sprovođenjem postupka pasterizacije, lošim higijenskim procedurama, unakrsnom kontaminacijom, shodno činjenici da sprovođenje pasterizacije nije uvek garancija za bezbednost

proizvoda. Od 415 uzoraka mlečnih proizvoda prikupljenih u objektima slobodne prodaje, marketima, tržnicama, uličnoj prodaji, seoskim domaćinstvima u Indiji, *L. monocytogenes* je izolovana iz čak 52,7 % uzoraka. Listerija je bila prisutna u mleku, siru, sladoledu, mleku u prahu, slatkišima od mleka, jogurtu, indijskim tradicionalnim proizvodima gi (ghee) i panir (paneer) (Sheela i Shrinithiviahshini, 2017).

Tabela 2. Registrovani slučajevi trovanja čiji je uzročnik *L. monocytogenes* u EU i SAD u 2014. godini (Jordan i McAuliffe, 2018)

Hrana kao put prenosa	Država	Br. slučajeva	Smrtni ishod
Govede meso i prerađevine od govedeg mesa	Belgija	2	0
Riba i riblji proizvodi	Danska	6	0
Ostala hrana	Danska	41	0
Mešana hrana	Danska	6	0
Nepoznato	Danska	8	0
Nepoznato	Nemačka	4	0
Nepoznato	Malta	2	0
Mešana hrana	Nemačka	2	0
Povrće, sokovi i njihovi proizvodi	Španija	3	0
Nepoznato	Španija	2	0
Drugo ili mešano crveno meso i njegovi proizvodi	Švedska	4	0
Riba i riblji proizvodi	Švedska	17	0
Nepoznato	Švedska	5	0
Bife obroci	Velika Britanija	4	0
Sveži sir	SAD – Kalifornija, Merilend	8	0
Nije dostupno	SAD – Maine	2	0
Breskve	SAD – više država	2	1
Pasulj mung	SAD – više država	5	2
Karamelisana jabuka	SAD – više država	35	7
Sirovo mleko	SAD – više država	2	1
Dimljena riba	SAD – više država	4	0
Nije dostupno	SAD – Njujork	2	2
Nije dostupno	SAD – Njujork	2	0
Klice	SAD – Virdžinija	2	0
Meksička vrsta pasterizovanog sira	SAD – Vašington	3	1
Milkšejk	SAD – Vašington	2	0

Tabela 3. Registrovani slučajevi trovanja čiji je uzročnik *L. monocytogenes* u EU i SAD u 2015. godini (Jordan i McAuliffe, 2018)

Hrana kao put prenosa	Država	Br.slučajeva	Smrtni ishod
Nije dostupno	Danska	2	0
Bife obroci	Finska	24	0
Mešana hrana	Nemačka	159	0
Nepoznato	Nemačka	6	0
Nepoznato	Grčka	2	2
Svinjsko meso i proizvodi	Italija	12	2
Nepoznato	Litvanija	4	0
Riba i riblji proizvodi	Holandija	3	0
Mešana hrana	Portugalija	3	0
Povrće i sokovi i njihovi proizvodi	Španija	3	0
Mešana hrana	Švedska	13	0
Nepoznato	Švedska	2	0
Zelena salata upakovana	SAD – više država	19	1
Američki sir, pasterizovan	SAD – Njujork	2	1
Pavlaka	SAD – Oregon	2	0

### 2.3.3.1 *Listeria monocytogenes* u kajmaku

Kajmak predstavlja mlečni proizvod sa dugom tradicijom proizvodnje u Srbiji. Osim na teritoriji Srbije, proizvodi se i u ostalim krajevima Balkanskog poluostrva, u Turskoj, Avganistanu, Iranu (Jokovic et al., 2008). Spada u grupu delikatesnih mlečnih proizvoda, a najčešće se proizvodi u seoskim domaćinstvima i manjim objektima, u kojima se proizvodnja vrši na zanatski način (Puđa et al., 2006). Takav vid proizvodnje često ne podrazumeva sprovođenje svih higijenskih i kontrolnih mera na adekvatan način, pa postoji realna mogućnost kontaminacije. U prilog tome, govore i rezultati istraživanja do kojih su došli Kara i Aslan (2020) uzimajući briseve u pogonima za proizvodnju kajmaka. Od ukupno 87 uzetih briseva, 8,33 % brisa uzetih u proizvodnom procesu i 16,66 % sa opreme je bilo pozitivno na *L. monocytogenes*. Prisustvo ovog patogena u proizvodnim pogonima za mlečne proizvode potvrđeno je i drugim istraživanjima (Tomar i Akarca, 2019), gde je *L. monocytogenes* bila prisutna u brisevima uzetim sa podova, zidova, noževa, sečiva za sireve.

### 2.3.3.2 *Listeria monocytogenes* u ribi

Riba i morski plodovi predstavljaju visokovredne životne namirnice, zastupljene u ishrani stanovništva širom sveta. Zbog svoje kvarljivosti i kraćeg roka trajanja, da bi se izbegla kontaminacije nepoželjnim mikroorganizmima, zahtevaju odgovarajuće uslove proizvodnje i prometa. *L. monocytogenes* je mikroorganizam koji se, između ostalih, može naći u proizvodima ove vrste. U istraživanju koje su sprovedli Di Ciccio et al. (2012) od 170 uzoraka lososa, 29 je bilo pozitivno na prisustvo *L. monocytogenes*. Veći deo uzoraka bili su uzorci svežeg lososa, a ostalo uzorci poluproizvoda i gotovih proizvoda. Istovremeno, uzeti su i brisevi iz radnog okruženja iz objekta za preradu ribe, gde je 16 od 95 uzetih briseva, mahom sa radnih stolova i mašina za sečenje ribe, bilo pozitivno na prisustvo ovog patogena. Prisustvo listerije u pogonima za

proizvodnju i preradu morskih plodova, može dovesti do proizvodnje nebezbednog finalnog proizvoda. Iz tog razloga, neophodno je adekvatno sprovođenje higijenskih procedura i uspostavljanje odgovarajućih kontrolnih mera u procesu proizvodnje (Vongkamjan et al., 2015). U prilog činjenici da postoji veća verovatnoća od pojavljivanja listerije u svežoj, nego u termički obrađenoj ribi, govore i podaci drugih autora. Farber (1991) je prateći rast dva soja *L. monocytogenes* na dimljenom lososu, škampima, jastogu, mesu krabe, ustanovio da ovaj patogen raste na svim proizvodima na temperaturi +4 °C tokom dve nedelje, a da najmanju pretnju predstavljaju kuvani morski produkti, gde se uz dobru primenu higijenski mera, rast listerije može držati pod kontrolom. Budući da preživljava više meseci na temperaturi zamrzavanja (-18 °C), te da podnosi visoke koncentracije soli i nizak pH, *Listeria* spp. opstaje i u smrznutim i konzervisanim ribljim i morskim produktima (Kuzmanović et al., 2011).

Obezbeđenje zdravstvene ispravnosti proizvoda i njeno očuvanje u roku trajanja predstavlja osnovni cilj svakog proizvođača hrane. Primena sintetičkih sredstava i/ili agresivnih fizičkih tretmana, u velikoj meri obezbeđuje mikrobiološku sigurnost proizvoda. Međutim, njihovom upotrebom, gubi se na senzornom kvalitetu, a kod potrošača stvara sumnja u zdravstvenu bezbednost proizvoda. Radi obezbeđenja mikrobiološke, ali i hemijske sigurnosti hrane, te zadovoljenja potrebe današnjeg potrošača, neophodno je iznaći alternativne načine koji bi zadovoljili većinu kriterijuma. Kao adekvatno rešenje javlja se primena prirodnih izolata autohtonih bakterija mlečne kiseline (BMK), koje osim uticaja na neprijateljsku mikrobiotu i osiguranja mikrobiološke bezbednosti, doprinose i očuvanju tradicionalno priznatih i prepoznatljivih organoleptičkih osobina proizvoda.

## 2.4 BAKTERIJE MLEČNE KISELINE

Bakterije mlečne kiseline (BMK) obuhvataju heterogenu grupu Gram (+) nesporelišućih bakterija. Definišu ih zajedničke morfološke, fiziološke, metaboličke i genetičke osobine. Spadaju u grupu anaerobnih i fakultativno anaerobnih, katalaza negativnih bakterija. Nepokretne su i acidotolerantne. Po osnovnoj podeli u grupu bakterija mlečne kiseline spadaju rodovi: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, kojim su u novije vreme priključeni i rodovi: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* i *Weissella* (Khalid, 2011). Na osnovu karakteristika svog metabolizma, dele se na homofermentativne i heterofermentativne. Homofermentativne, kao glavni proizvod fermentativnog karbohidratnog metabolizma, produkuju mlečnu kiselinu, dok su kod heterofermentativnih u većoj meri zastupljena druga jedinjenja, kao što su ugljen-dioksid, etanol, acetoin, diacetil, vodonik-peroksid, aldehidi, reuterin, sirćetna kiselina i sl. Kod nekih homofermentativnih oblika, ukoliko postoje odgovarajući uslovi, može se ispoljiti heterofermentativni metabolizam. S obzirom da BMK ne mogu same da sintetišu sve neophodne nutrijente, imaju potrebu za staništima koja obiluju neophodnim faktorima rasta, aminokiselinama, nukleotidima, peptidima, vitaminima B grupe, masnim kiselinama (Stiles i Holzappel, 1997; Axelsson, 2004). Mogu se naći na biljkama, životinjama, a neke vrste nastanjuju respiratorni, intestinalni i genitalni trakt ljudi i životinja (Giraffa, 2014).

BMK su našle svoju primenu u proizvodnji fermentisanih proizvoda od mleka, mesa, povrća, voća, ribe, žitarica (Caplice i Fitzgerald, 1999; Jokovic et al., 2008; Radulović et al., 2011; Bintsis, 2018). Snižavanjem pH sredine, stvaraju nepovoljne uslove za razmnožavanje mikroorganizama i sprečavaju rast patogenih mikroorganizama i mikroorganizama kvarenja hrane, te se može reći da predstavljaju značajne prirodne konzervanse (Hladíková et al., 2012). Jedan od razloga njihove nadmoći nad drugim mikroorganizmima u okruženju, predstavlja upravo njihova sposobnost preživljavanja u uslovima sa niskom pH vrednošću (Giraffa, 2014). Široka primena fermentacionih procesa, osim konzervišećeg dejstva, bazirana je i na razvijanju specifičnih senzornih karakteristika proizvoda pod uticajem produkata bakterija mlečne kiseline (Hayaloglu et al., 2013). Konverzijom laktoze i citrata tokom procesa glikolize, lipolizom masti i proteolizom kazeina, formiraju se

jedinjenja, koja fermentisanom proizvodu daju poseban ukus. BMK konvertuju laktozu u laktate, a kao međuprodukti iz piruvata mogu nastati različiti aromatični produkti, kao što su diacetil, acetoin, acetaldehid, sirćetna kiselina. Slobodne masne kiseline nastaju kao rezultat lipolize, dok proteoliza kazeina predstavlja najznačajniji biohemijski proces odgovoran za ukus i teksturu fermentisanih proizvoda (Molimard i Spinnler, 1996). Degradacijom kazeina pod uticajem peptidaza i proteinaza BMK nastaju peptidi i slobodne amino kiseline. Dalja konverzija amino kiselina do različitih alkohola, aldehida, kiselina, estara i sumpornih komponenti igra značajnu ulogu za razvoj specifičnih ukusa proizvoda (Sousa et al., 2001; Ammor i Mayo, 2007; Hayaloglu et al., 2013).

Imajući u vidu specifičnosti metabolizma BMK i raznovrsnost njihovih metabolita, kao i uticaj na razvoj senzornih svojstava proizvoda, proizvođači hrane se odlučuju na njihovu primenu, u svojstvu starter kultura. U prošlosti se fermentacija proizvoda dešavala spontano, pod uticajem mikrobiote sirovina i okruženja. U određenim oblastima, najčešće ruralnim sredinama, proizvodnja fermentisanih mlečnih proizvoda i dalje se vrši na, sličan izvornom, tradicionalni način, pri čemu, dobijeni proizvodi nose karakteristike i nasleđe određenog područja. Prirodna kombinacija mikroorganizama zastupljenih u njima, zaslužna je za prepoznatljivost senzornih svojstava proizvoda. Iz tradicionalnih mlečnih proizvoda izolovane su BMK koje pripadaju rodovima *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* i dr. (Jokovic et al., 2008). Danas se, za potrebe proizvodnje fermentisanih proizvoda sira, jogurta, proizvoda od mesa, povrća, ribe i sl., koriste BMK kao starteri. Pre primene, starter kulture prolaze tehnološke provere, utvrđuju se njihove karakteristike, bez obzira što BMK imaju GRAS (Generally Recognized As Safe) status. Vrsta starter kulture ima direktan uticaj na reološka i nutritivna svojstva fermentisanog proizvoda. Odgovarajući izbor aplikovanih kultura i podešavanje koncentracije i odnosa, doprinose postizanju optimalnih karakteristika finalnog produkta. Najčešće korišćene BMK u proizvodnji hrane su vrste rodova *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* (Bintsis, 2018). Upotrebom BMK u svojstvu starter kultura u proizvodnji mlečnih proizvoda postižu se dobri rezultati (Radulović, 2007; Radulović et al., 2011). Takođe, BMK se primenjuju kao dodatne (adjunct) kulture (Guidone et al., 2015; Mirkovic et al., 2020). Adjunct kulture ili “adjuncts” utiču na zrenje sireva, na hemijska i mikrobiološka svojstva, prisustvo isparljivih jedinjenja, ali i na osobenost samog proizvoda (Guidone et al., 2015; Bintsis, 2018).

Određeni sojevi BMK izolovani iz tradicionalnih proizvoda su pokazali da poseduju probiotska svojstva (Radulović et al., 2010; Radulović et al., 2017). Da bi mikroorganizam bio kandidat za probiotsku kulturu, treba da zadovolji određene kriterijume. Pod tim kriterijumima podrazumeva se odsustvo patogenih osobina i kolonizacija gastrointestinalnog trakta u visokim koncentracijama, od  $10^7$ – $10^9$  cfu/mL<sup>-1</sup> (Mattila-Sandholm et al., 2002). Pored osnovnih kriterijuma, postoje i specifični kriterijumi, koji se odnose na uslove za selekciju probiotika, a to su bezbednosni, tehnološki, funkcionalni kriterijumi, kao i poželjna fiziološka svojstva (Shah, 2007). BMK koje se najčešće primenjuju u hrani, a imaju probiotska svojstva su *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* i *L. plantarum* (Champagne et al., 2005).

Kao produkti primarnog metabolizma BMK javljaju se supstance sa antimikrobnim delovanjem: organske kiseline, diacetil, vodonik-peroksid, dok kao produkti sekundarnog metabolizma nastaju proizvodi slični antibioticima, bakteriocini (Giraffa, 2014). Potencijal za primenu BMK u industriji hrane kao biokonzervansa, kao i primenu u svrsi postizanja zdravstvenih efekata, još uvek nije dovoljno ispitan. Autori navode značajne rezultate koji su do sada postignuti na ovim poljima. Ipak, bogatstvo resursa novih, neispitanih sojeva iz tradicionalnih proizvoda, otvara vrata za nova istraživanja.

## 2.5 NAJVAŽNIJE VRSTE BMK

Među najznačajnijim bakterijama mlečne kiseline izdvajaju se *Lactococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Enterococcus* spp.

### 2.5.1 *Lactococcus* spp.

Bakterije predstavnici roda *Lactococcus* su mezofilne, homofermentativne koke, koje proizvode L (+) oblik mlečne kiseline. Pod mikroskopom su vidljive u parovima ili kratkim lancima. Optimalna temperatura rasta je 30 °C. Mogu rasti i na 10 °C, ali ne i na 45 °C.

Rod *Lactococcus* je relativno nov, većina njegovih predstavnika pripadala je rodovima *Streptococcus* i *Lactobacillus*. Danas ovaj rod obuhvata pet vrsta: *L. garviae*, *L. piscium*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis* i *L. lactis*. Vrsti *L. lactis* pripadaju tri subvrste *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *hordniae* i *L. lactis* subsp. *cremoris* i biovar *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (Batt, 2014).

Razlikujemo ih prema njihovoj sposobnosti rasta na temperaturi većoj od 40 °C i u prisustvu NaCl u koncentraciji većoj od 4 %. Međusobno se razlikuju prema sposobnosti produkcije kiseline iz šećera uključujući laktozu, manitol i rafinozu (tabela 4). Važna karakteristika je sposobnost fermentacije laktoze, naročito za vrste koje se koriste u mlečnoj industriji. U proizvodnji mlečnih proizvoda, upotrebljavaju se kao pojedinačne kulture ili u mešavinama. Podvrste vrste *L. lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis* i *L. lactis* subsp. *cremoris* se najčešće koriste kao starter kulture i njihova najvažnija uloga je proizvodnja mlečne kiseline (Batt, 2014). Poznata je viševjekovna primena *L. lactis* sp. u proizvodnji fermentisanih proizvoda, naročito sira, jogurta, kiselog kupusa (Song et al., 2017). Prirodna sredina laktokoka su zelene biljke, sirovo mleko i površina kože domaćih životinja, tradicionalni fermentisani mlečni proizvodi, sirevi (Golić et al., 2013; Radulović et al., 2009), kajmak (Jokovic et al., 2008).

Tabela 4. Faktori razdvajanja BMK prema vrstama - prilagođeno (Batt, 2014)

Parametar diferencijacije među vrstama	<i>L. garviae</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>hordniae</i>	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>L. piscium</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. raffinolactis</i>
Rast na 40°C	+	-	-	(+)	-	-	-
Rast u prisustvu 4 % NaCl	+	-	-	+	ND*	+	-
Hidroliza arginina	+	-	+	+	-	-	(-)
Stvaranje kiseline iz laktoze	+	+	-	+	+	-	+
Stvaranje kiseline iz manitola	(+)	-	-	(-)	+	+	ND
Stvaranje kiseline iz rafinoze	-	-	-	-	+	-	+

\*nije detektovano

## 2.5.2 *Enterococcus* spp.

Enterokoke predstavljaju normalne stanovnike digestivnog trakta ljudi i životinja. Kao glavni produkt homofermentativnog metabolizma, proizvode L - mlečnu kiselinu. Enterokoke su Gram pozitivne, katalaza negativne bakterije, koje se pojavljuju u vidu pojedinačnih koka, u parovima ili kratkim lancima. Ne produkuju spore, oksidaza su negativne i fakultativno anaerobne. Preživljavaju u uslovima stresnog i neprijateljskog okruženja, podnose ekstremne temperaturne uslove u opsegu 5–65 °C, visoku koncentraciju soli, kao i pH od 4,5 do 10. Ove osobine omogućuju enterokokama kolonizaciju različitih mikrobioloških niša (Fisher i Phillips, 2009). Izolovane su iz vode, biljaka, životinja, hrane (Byappanahalli et al., 2012; Collins et al., 1986; Baccouri et al., 2019).

Po Sherman-ovoj klasifikaciji iz 1937. godine, *Streptococcus* spp. obuhvata četiri podvrste: fekalne streptokoke (enterokoke), streptokoke mlečnih proizvoda, streptokoke viridans i piogene streptokoke (Klein, 2003). Do novijih taksonomskih istraživanja, enterokoke su bile klasifikovane kao fekalne streptokoke i streptokoke grupe D. Danas rod *Enterococcus* broji 28 vrsta: *E. asini*, *E. avium*, *E. canis*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. flavescens*, *E. gallinarum*, *E. gilvus*, *E. haemoperoxidus*, *E. hirae*, *E. malodoratus*, *E. moraviensis*, *E. mundtii*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. ratti*, *E. saccharolyticus*, *E. saccharominimus*, *E. solitarius*, *E. sulfureus* i *E. villorum* (Foulquié Moreno et al., 2006).

Duži niz godina smatralo se da *Enterococcus* spp. deluju nepovoljno na organizam čoveka i da nemaju poseban medicinski značaj. Međutim, danas se enterokoke u velikoj meri upotrebljavaju u svojstvu probiotika, a mogu se koristiti u svojstvu starter kultura u proizvodnji hrane (Mullan, 2014). Kao probiotske kulture koriste se *E. faecalis*, *E. lactis*, a od nedavno i *E. hirae* (Adnan et al., 2017) i *E. durans* (Li et al., 2018). Opravdanost primene enterokoka kao probiotskih i starter kultura, bazirana je na njihovim poželjnim osobinama, kao što su otpornost na žučne soli i želudačnu kiselinu (Baccouri et al., 2019), produkcija bakteriocina (enterocina) (Foulquié Moreno et al., 2006).

Kao starter ili "adjunct" kulture, koriste se u proizvodnji različitih vrsta fermentisanih proizvoda, sira iz domaće proizvodnje, kobasica, maslina i dr. (Foulquié Moreno et al., 2006). Zahvaljujući različitim produktima metabolizma, kao što su aromatična jedinjenja (Hancock et al., 2014), bakteriocini (enterocini) (Foulquié Moreno et al., 2006), enzimi, enterokoke imaju uticaj na senzorna svojstva proizvoda, njihov ukus, aromu, teksturu, ali i zdravstvenu ispravnost (Foulquié Moreno et al., 2006).

Iz tradicionalnih sireva i specijalnih vrsta sireva izolovane su, *Enterococcus* spp. kao što su: *E. faecalis* i *E. faecium*, a mogu se koristiti i u proizvodnji sira, gde je svoju primenu našao i *E. durans*, koji pripada *E. faecium* grupi (Mullan, 2014). Bez obzira na pozitivna tehnološka svojstva, kao i primenu enterokoka kao probiotskih kultura, mišljenja o njihovom korišćenju kao starter kultura su podeljena. Vrste roda *Enterococcus* nemaju GRAS status (Araújo i Ferreira, 2013). Poznato je da neki sojevi enterokoka imaju sposobnost da proizvode bioamine (histamin, kadaverin, putrescin), koji mogu da izazovu glavobolju ili druge fiziološke tegobe. Iz tog razloga, predlaže se skrining na bioamine pre upotrebe novih sojeva u prehrambenoj industriji. Takođe, postoji opasnost od pojave bolničkih infekcija i prenosa rezistencije na antibiotike, pa bi, za svaki novi potencijalno probiotski soj koji je namenjen za prehrambenu ili farmaceutsku industriju, bilo neophodno ispitati mogućnost prenosa rezistencije na antibiotike (Baccouri et al., 2019).

Većina bakteriocina (enterocina) pripadaju klasi II bakteriocina, uključujući pediocin-slične enterocine sa snažnim antilisterijskim dejstvom (Ness et al., 2014). Određeni sojevi enterokoka produkuju nekoliko bakteriocina, što im daje izvesnu prednost u odnosu na kompetitivnu mikrofloru niše koju kolonizuju (Hanchi et al., 2018). Prema dosadašnjim istraživanjima, bakteriocini enterokoka su pokazali antimikrobnu aktivnost prema različitim vrstama bakterija, kao što su G (+) patogeni iz hrane (Lauková et al., 2003), *L. monocytogenes* i G (-) bakterije. Za neke



bakteriocine karakteristična je antifungalna i/ili antivirusna aktivnost. Takođe, ovi bakteriocini mogu inhibirati i stvaranje spora bakterija *Clostridium botulinum* i *Bacillus cereus* (Burgos et al., 2014).

### 2.5.3 Zastupljenost BMK u hrani

Zbog svojih izuzetnih osobina, BMK su široko zastupljene u proizvodnji hrane. Najčešći biokonzervansi danas su BMK, a tipičan primer biokonzervacije proizvoda predstavlja fermentacija (Ganguly, 2013) omogućena specifičnim produktima njihovog metabolizma. Zbog raznolikosti vrsta i sojeva, proizvodnje aromogenih jedinjenja, produkcije egzopolisaharida (EPS), inhibicije rasta patogenih bakterija, probiotskog, bakteriocinskog delovanja, BMK predstavljaju važan faktor u smanjenju rizika po narušavanje bezbednosti i garant očuvanja tradicionalnih senzornih svojstava proizvoda. Tradicionalni ukusi i karakteristike proizvoda, predstavljaju težnju današnjeg proizvođača, uz konstantnu potrebu za očuvanjem bezbednosti proizvoda tokom njegovog roka trajanja. Tradicionalni proizvodi predstavljaju bogat izvor vrlo važnih izolata, koji se mogu uspešno koristiti u proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda, sira, kao protektivne i starter kulture (Radulović et al., 2011). Njihova primena doprinosi očuvanju autentičnosti određenog klimatskog područja i specifičnih senzornih osobina, ali i osiguranju bezbednosti hrane. Korišćenje ovih resursa za potrebe prehrambene industrije je od izuzetnog značaja, jer takvi izolati imaju ogroman potencijal za stvaranje novih, kvalitetnih proizvoda prehrambene industrije. Danas se u standardizovanoj industrijskoj proizvodnji pretežno koriste sojevi prirodni izolati, sa pokazanim dobrim tehnološkim karakteristikama. Njihovo delovanje je znatno brže i bolje od prirodne mikrobiote, sojevi imaju predvidivo dejstvo, bez štetnih efekata po kvalitet proizvoda i zdravlje konzumenta (Martinović et al., 2006).

BMK učestvuju u fermentativnim procesima proizvodnje proizvoda od mleka, mesa, povrća, voća, žitarica, ribe (Caplice i Fitzgerald, 1999; Bintsis, 2018). U sirovom mleku prisutne su kao deo prirodne mikroflore (Van Hoorde et al., 2010). Golić et al. (2013) navode da su, analizirajući mikrobiom autohtonih sireva sa teritorije Republike Srbije i Republike Hrvatske, izolovali 717 izolata, te da su iz svih uzoraka analiziranih sireva izolovane laktokoke, iz gotovo svih enterokoke, a da su, pritom, *Lactococcus lactis* vrste bile najzastupljenije. Mezofilna mikroflora pokazala se kao dominantna, nakon karakterizacije autohtonih BMK iz belih sireva u salamuri (Radulović et al., 2009), pri čemu su najbrojnije vrste bile: *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* i *Leuconostoc*. Među laktokokama dominirale su *L. lactis* subsp. *lactis*, kao i citrat pozitivna *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*. U sirovom i fermentisanom mleku i sirevima zabeleženo je prisustvo *E. faecalis* i *E. durans* (Van Hoorde et al., 2010; Hanchi et al., 2014). Veći broj različitih sojeva izolovan je iz sireva od sirovog mleka, nego iz sireva koji se podvrgavaju pasterizaciji u toku proizvodnje (De Angelis et al., 2001). Prema autorima, analizirajući uzorke iz sireva sa zrenjem u tipu Gauda sira, najveći procenat izolovanih sojeva pripadao je vrsti *L. lactis*, potom *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. curvatus*, *P. pentosaceus*, a takođe i *Enterococcus* spp., naročito među sirevima od sirovog mleka (Van Hoorde et al., 2010). Analizom 12 uzoraka ovčijih sireva u tipu tvrdog i polu-tvrdog iz različitih oblasti Italije, među nestarterskim BMK izolovane su: *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. curvatus*, *L. fermentum*, *L. casei* subsp. *casei*, *L. pentosus*, *L. casei* subsp. *pseudoplantarum* i *L. rhamnosus* (De Angelis et al., 2001).

Iz tradicionalnog kurdskog sira izolovani su sojevi *L. plantarum* LP3, AF1 i LU5, koji su, učestvujući u fermentaciji kajmaka (saršir), pokazali inhibitorno dejstvo prema patogenim bakterijama *Escherichia coli* O157:H7, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *S. aureus* (Hashemi et al., 2017), što opravdava tvrdnju o mogućnosti primene autohtonih sojeva i sa aspekta mikrobiološke bezbednosti proizvoda. BMK predstavljaju deo prirodne mikrobiote i u kajmaku. Među 374 izolata izolovanih iz 6 uzoraka kajmaka, izolovane su vrste *L. mesenteroides*, *E. faecalis*, *E. fecium*, dok su *Lactococcus* spp. izolovane iz 4 uzorka kajmaka (Jokovic et al., 2008).

Enterokoke se mogu naći i u termički obrađenoj i termički neobrađenoj hrani, budući da imaju sposobnost rasta u različitim uslovima i okruženju (prisustvo soli, širok temperaturni i pH opseg). Upravo ove osobine čine ih pogodnim za upotrebu u industriji hrane. U poslednje vreme je u porastu njihova primena kao starter i dodatnih starter (adjuncts) kultura. Aplikativni značaj u prehrambenoj industriji enterokoke imaju i zahvaljujući sposobnosti da proizvode bakteriocine i njihovoj povezanosti sa ispoljavanjem specifičnih senzornih svojstava fermentisanih proizvoda (Foulquié Moreno et al., 2006). Enterokokni bakteriocini CCM 4231, AS-48 (Lauková et al., 1999; Molinos et al., 2005) dodaju se u hranu izolovani i prečišćeni (Foulquié Moreno et al., 2006), u vidu bakteriocin-produkujućih startera, "adjuncts" ili protektivnih kultura (Arqués et al., 2015).

BMK imaju primenu u proizvodnji fermentisanih proizvoda od ribe. Tokom fermentacije ribe, pod uticajem prisutnih mikroorganizama i enzima, nastaju različite kiseline, alkoholi, fenoli i ostala jedinjenja koja joj daju dobar ukus i miris (Ngasotter et al., 2020). Kao starter kulture u proizvodnji tajlandske fermentisane ribe "Plaa-som" korišćeni su sojevi *L. plantarum* i *L. reuteri* (Saithong et al., 2010), gde su, u kombinaciji, ispoljile pozitivan uticaj na acidifikaciju, naročito u početnoj fazi fermentacije, i uticale na sprečavanje pojave nepoželjne mikrobiote. Iz iste vrste fermentisane ribe su Hwanhlem et al. (2011) izolovali ukupno 138 izolata, od čega je 133 pripadalo BMK. Jedan soj *Streptococcus salivarius* i tri soja *Enterococcus faecalis*, pokazali su dobra antimikrobna svojstva prema patogenim bakterijama *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

Pažljiv odabir izolata BMK iz tradicionalnih proizvoda radi dalje primene u hrani, naročito enterokoka, je od izuzetnog značaja. Neophodna je provera njihovih karakteristika i krajnji oprez da bi se izbegle eventualne greške, koje su u suprotnosti sa sigurnosnim postavkama. Prilikom odabira, neophodno je koristiti dostupne naučne tehnike, bazirajući se na praćenju smernica i ne odstupajući od zakonodavnih normi i ograničenja (Ben Braïek i Smaoui, 2019).

## 2.6 ANTIMIKROBNI PRODUKTI METABOLIZMA BAKTERIJA MLEČNE KISELINE

Bakterije mlečne kiseline predstavljaju raznoliku grupu. Svojim specifičnim metabolizmom, pružaju mogućnost široke primene u prehrambenoj industriji, budući da utiču inhibitorno na rast bakterija koje mogu da izazovu kvarenje hrane. Raznolikost i prilagodljivost različitim uslovima, kao i različiti produkti metabolizma, predstavljaju bitan razlog uspešnosti fermentativnih procesa. Raznovrsnost metabolita nastalih u tim procesima, rezultira stvaranjem karakterističnih senzornih svojstva krajnjih produkata (Giraffa, 2014).

### 2.6.1 Bakteriocini

Bakteriocini se definišu kao ribozomalno sintetisani peptidi sa malom molekulskom masom, koji uglavnom deluju na blisko srodne vrste. Kroz vreme, njihova klasifikacija se menjala. Za najsveobuhvatniju klasifikaciju, koja uključuje sve do sada okarakterisane antimikrobne metabolite, u obzir bi se mogla uzeti ona koju su postavili Rea et al. (2011). Po toj definiciji, bakteriocini se dele na sledeći način (Tabela 5):

Tabela 5. Klasifikacija bakteriocina (Rea et al., 2011)

Klasa I (posttranslaciono modifikovani bakteriocini)	Klasa Ia	Lantibiotici
		Lantipetidi
	Klasa Ib	Labirintopeptini
	Klasa Ic	Saktibiotici
		Jednopeptidni bakteriocini
		Dvopeptidni bakteriocini
Klasa II (nemodifikovani bakteriocini)	Klasa IIa – pediocin slični bakteriocini	
	Klasa IIb – dvokomponentni nemodifikovani bakteriocini	
	Klasa IIc – cirkularni bakteriocini	
	Klasa IId – nemodifikovani linearni bakteriocini, različiti od pediocina	
Bakteriolizini (ranije Klasa III)		

Određeni predstavnici ove grupe imaju širi dijapazon inhibitornog delovanja i pokazuju antimikrobno dejstvo prema patogenima i bakterijama koje su uzročnici kvarenja hrane (Lozo et al., 2017). Poluprečišćeni ili prečišćeni bakteriocini, mogu da se koriste kao konzervansi čime bi se produžio rok upotrebljivosti proizvoda (Dillon, 2014). Zbog svoje termostabilnosti, antimikrobno dejstvo zadržavaju i ispoljavaju i nakon termičkih procesa prerade hrane. Delujući samostalno ili u kombinaciji sa drugim antimikrobnim jedinjenjima, metaboličkim proizvodima BMK, ispoljavaju bakteriostatičko ili baktericidno dejstvo.

Antimikrobna aktivnost bakteriocina je najčešće usmerena prema srodnim vrstama bakterija, kako prema BMK, tako i prema G (+) bakterijama koje uzrokuju kvarenje hrane i patogenim bakterijama prisutnim u hrani, kao što su *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp., *Clostridium* sp., *Listeria* sp., i druge (Olasupo et al., 1995; Gaamouche et al., 2014; Lozo et al., 2017; Zhao et al., 2017; Mirkovic et al., 2020).

Aplikacija bakteriocina u hranu vrši se na više načina. Prvi način je dodavanjem prečišćenog bakteriocina direktno u hranu, kao zaštita od kvarenja i razvoja patogenih bakterija. Bakteriocini se u hranu mogu dodati i kao bakteriocin-produkujuće kulture (Buyong et al., 1998; Ennahar et al., 1998; Guinane et al., 2005), gde se koriste sojevi u vidu startera koji produkuju bakteriocin *in situ*. Treći način primene bakteriocina predstavlja primena uz komercijalne startere, kao dodatna kultura u fermentisanim proizvodima (Montville i Chikindas, 2012). Takođe, primena u hrani je moguća i dodavanjem prethodno fermentisanih proizvoda koji sadrže bakteriocin-produkujuće kulture, a i inkorporacijom bakteriocina ili bakteriocin-produkujuće kulture u bioaktivni film pakovanja (Silva et al., 2018). Primer za to je primena imobilisanog bakteriocina 32Y poreklom iz *Lb. curvatus*, koji inkorporiran u polietilenski film utiče na smanjenje broja *L. monocytogenes* u toku skladištenja u proizvodima od mesa. Bakteriocini se mogu vezati za nosač. Primer za to je inhibicija *L. monocytogenes* u siru pod uticajem nizina inkapsulisanog u lipozom (Dillon, 2014). Nizin se na tržištu može naći pod oznakom E-234 ili pod komercijalnim imenom Nisaplin i Novasin. Produkuje ga *L. lactis* subsp. *lactis*. Zbog svoje aktivnosti u širokom rasponu pH i stabilnosti prilikom zagrevanja, nalazi primenu u različitim vrstama prehrambenih proizvoda (mlečni proizvodi, mesne preradevine, saladni prelive i dr.) (Johnson et al., 2018). Deluje inhibitorno na vegetativne forme G (+) bakterija i sporogene forme *Bacillus* i *Clostridium* vrste (Dillon, 2014). Kao protektivne kulture, koriste se da bi osigurali mikrobiološku bezbednost hrane, a inhibicijom mikroorganizama kvarenja, kao što je *Pseudomonas* sp., i patogenih mikroorganizama (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*), doprinose konzervisanju fermentisanih proizvoda (Olasupo et al., 1995). S obzirom da u postpasterizacionom periodu postoji mogućnost kontaminacije proizvoda listerijom,

neophodno je preduzeti sve mere kontrole (D'Amico et al., 2008). U tom slučaju, primenom u svrsi protektivnih kultura, sprečio bi se rast patogenih mikroorganizama.

Sinergističko dejstvo bakteriocina sa drugim produktima metabolizma BMK, takođe, daje dobre rezultate (De Martinez et al., 2002). Nizin u kombinaciji sa limunskom kiselinom pokazao je jače inhibitorno dejstvo prema *S. aureus* i *L. monocytogenes*, nego samostalno primenjen (Zhao et al., 2017). Kombinacija nizina i mlečne kiseline se takođe pokazala kao uspešnija, nego primena bakteriocina u tretiranju proizvoda samostalno. De Martinez et al. (2002) su u svom istraživanju, prskanjem po površini goveđeg trupa, nanosili nizin u kombinaciji sa mlečnom kiselinom (1,5 %, 25°C) i nizin bez mlečne kiseline, gde se kao delotvornija u smanjenju broja aerobnih bakterija, ukupnih koliforma i *E. coli*, pokazala kombinacija nizina i mlečne kiseline. Kombinovanom primenom nizina sa nitritima u fermentisanim mesnim prerađevinama tipa frankfurtera (Dillon, 2014), dokazano je inhibitorno delovanje i na rast *C. perfingens*.

Poznato je da neki bakteriocini podnose čak i temperaturu sterilizacije (Todorov i Dicks, 2006; Anastasiadou et al., 2008), što je od izuzetnog značaja radi primene u prehrambenoj industriji (Caplice i Fitzgerald, 1999; Juodeikiene et al., 2012). Takođe, zabeležena je efikasnost pediocina PA-1 kao aktivne komponente konzervansa pod nazivom Alta 2341 (Da Costa et al., 2019). Ananou et al. (2010) opisuje potpuno baktericidno dejstvo enterocina AS-48 koga proizvodi *E. faecalis* protiv *L. monocytogenes* i delimično dejstvo protiv *S. aureus*.

Bakteriocini su prepoznati kao moguća alternativa antibioticima u slučaju pojave infekcija izazvanih bakterijama koje su na njih rezistentne. Prikazani su brojni pozitivni rezultati istraživanja sa delovanjem bakteriocina na veliki broj bakterija izazivača bolesti u različitim matriksima. Oblast primene bakteriocina je široka i još uvek nedovoljno ispitana (Cotter et al., 2013; Hammami et al., 2013).

## 2.6.2 Organske kiseline

Organske kiseline predstavljaju prirodni konzervans i proizvodu daju specifična senzorna svojstva. Prema broju karboksilnih grupa dele se na mono-, di- i polikarboksilne, dok prema prirodi ugljovodoničnog ostatka za koji je vezana karboksilna grupa, mogu biti alifatične i aromatične. Mnoge organske kiseline imaju aplikativnu primenu u industriji hrane, koristeći se kao aditivi i konzervansi, kao prevencija kvarenja hrane i radi produženja njenog roka trajanja (Ricke, 2003; Ben Braïek i Smaoui, 2021). Često se javljaju kao sporedni produkt metaboličkih puteva bakterija, te je njihova koncentracija mala, a pored toga mogu biti i dodate u hranu. Mogu da pospeše rast BMK i inhibiraju rast ostalih grupa mikroorganizama (Park, 2018). U zavisnosti od fizičko-hemijskih osobina mikroorganizama, kao i uslova okruženja, organske kiseline ispoljavaju svoja bakteriostatska i baktericidna svojstva (Ricke, 2003). Zastupljene su u mlečnim proizvodima, jogurtu (Fernandez-Garcia i McGregor, 1994; Vénica et al., 2014), a često nastaju i kao produkt metabolizma različitih starter kultura u procesu fermentacije mlečnih proizvoda, povrća, mesnih prerađevina (Caplice i Fitzgerald, 1999; Laranjo et al., 2019). Snižavanje pH i nagomilavanje organskih kiselina, kao što je mlečna, sirćetna, propionska, kao posledica metabolizma BMK, ima ključnu ulogu u konzervisanju proizvoda, budući da kiselina sredina predstavlja nepovoljno okruženje za rast patogenih mikroorganizama i mikroorganizama koji izazivaju kvarenje hrane (Caplice i Fitzgerald, 1999). Inhibitorna aktivnost u najvećoj meri potiče upravo od snižene pH vrednosti, usled sinteze organskih kiselina i aktivnosti nedisosovanih formi organske kiseline (Hladíková et al., 2012; Wemmenhove et al., 2018).

Osnovni proizvod metabolizma BMK predstavlja mlečna kiselina. Mlečna kiselina ( $\text{CH}_3\text{-CH(OH)-COOH}$ ) je izuzetno zastupljena u prehrambenoj, farmaceutskoj, hemijskoj, tekstilnoj industriji. Po svom sastavu je 2 - hidroksipropionska kiselina, koja se javlja u dva izomerna oblika, kao L (+) desnogira i D (-) levogira. Za primenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji, uglavnom se proizvodi L (+) mlečna kiselina, budući da je u humanom organizmu dominantan enzim L-laktat

dehidrogenaza. Mlečna kiselina ima GRAS status (Đukić Vuković et al., 2011). Mlečna i sirćetna kiselina nastaju kao produkti degradacije laktoze. Zhang i Farber (1996) su ispitali primenu mlečne i sirćetne kiseline u kombinaciji sa hlorom ili bez njega i dokazali inhibitorno dejstvo na *L. monocytogenes*. Benzoeva i sorbinska kiselina su u mleku zastupljene u malim količinama, ali njihova protektivna uloga nije zanemarljiva. Poznato je da benzoeva kiselina ima antibakterijske i antifugicidne osobine. Tokom fermentacije mleka, u prisustvu i delovanjem BMK, njihova koncentracija raste, da bi se smanjenje uočilo u periodu skladištenja proizvoda (Urbienė i Leskauskaitė, 2006). Limunska kiselina je slaba organska kiselina koja je prirodno zastupljena u citrusnom voću. U svežem mleku je zastupljena u značajnoj meri, da bi se, bakterijskom aktivnošću, njen sadržaj znatno smanjio (Urbienė i Leskauskaitė, 2006). U toku fermentacije, sadržaj organskih kiselina je promenljiv. Koncentracija određenih kiselina raste, dok se zastupljenost drugih smanjuje (Damir et al., 1992), pri čemu mlečna kiselina održava najviši nivo od početka, do kraja fermentacionog procesa. Značaj organskih kiselina ogleđa se, osim kao prirodnog konzervansa, u povećanju kvaliteta fermentisanih mlečnih proizvoda i produžetka njihovog roka upotrebljivosti (Urbienė i Leskauskaitė, 2006),

### 2.6.3 Masne kiseline

Yuyama et al. (2020) navode da su masne kiseline, posebno nezasićene masne kiseline dugog lanca, pokazale snažno antimikrobno dejstvo protiv G (+) bakterija u biofilmovima, naročito protiv *S. aureus*. Budući da biofilmovi predstavljaju značajnu pretnju po bezbednost proizvoda u prehrambenoj industriji, veća zastupljenost BMK, kao protektivnih kultura, i njihovih antimikrobnih produkata, mogla bi podići bezbednost proizvoda na viši nivo. Struktura masnih kiselina i dužina lanca, utiču na njihovu antimikrobnu aktivnost. Tako, masne kiseline kratkog lanca, ispoljavaju toksičnost u visokim koncentracijama na G (-) bakterije, dok masne kiseline dugog lanca imaju antimikrobni efekat na G (+) bakterije u malim koncentracijama, nezavisno od pH sredine (McGaw et al., 2002).

### 2.6.4 Diacetil

Značajnu antimikrobnu ulogu imaju aromogene supstance diacetil, acetoin, acetaldehid. Diacetil proizvode neke vrste rodova *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* i *Pediococcus*. Ima značajnu ulogu u inhibiciji rasta G (-) bakterija, kvasaca i plesni, a manje G (+) bakterija. Antimikrobna svojstva ispoljava samo kada je zastupljen u velikim koncentracijama, koje dostiže ako postoje drugi izvori piruvata, kao što su citrati ili acetati (Dillon, 2014). U kombinaciji sa drugim antimikrobnim agensima, može delovati sinergistički, što je najčešće slučaj, s obzirom da je u fermentaciji hrane retko kada prisutan u koncentraciji koja je dovoljna da bi imao glavnu ulogu u antimikrobnom delovanju na nepoželjnu mikrofloru (Lanciotti et al., 2003; Macciola et al., 2008; Guler i Gursoy-Balci, 2011).

Na produkciju i delovanje diacetila utiču uslovi okruženja. Porastom temperature od 21 do 30°C redukuje se produkcija diacetila. Optimalan pH za njegovu produkciju je 4,5 - 5,5, a porastom pH smanjuju se njegova antimikrobna svojstva (Dillon, 2014).

### 2.6.5 Vodonik peroksid

Određene vrste BMK imaju sposobnost da proizvode vodonik-peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). U zavisnosti od koncentracije i niza drugih faktora, vodonik-peroksid može ispoljiti bakteriostatičke ili baktericidne efekte (Juven i Pierson, 1996). Baktericidno dejstvo potiče od jakog oksidacionog efekta. Na taj način oštećuju se ćelijske komponente, kao što su lipidi membrane, DNK (Dillon, 2014). Ito et al.

(2003) navode bolju produkciju H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> od strane *L. lactis* subsp. *lactis* u odnosu na *Lactobacilli* spp. Korišćenjem supernatanta soja *L. lactis* subsp. *lactis* AI 62, autori su dokazali snažno baktericidno dejstvo protiv psihrotrofnih patogena koji se prenose hranom, kao što su: *Listeria*, *Yersinia*, *Aeromonas* species, i mezofilnih bakterija, kao što je *E. coli* (Ito et al., 2003). Laktoperoksidazni sistem (LPS) svežeg mleka može biti aktiviran od strane H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, kada nastaju hipotiocianat i druga antimikrobna jedinjenja (Caplice i Fitzgerald, 1999; Dillon, 2014). Da bi došlo do aktiviranja LPS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mora imati koncentraciju od 0,3 - 0,4 mM/L mleka. Jačina inhibitornog dejstva LPS-a protiv mikroorganizama, proporcionalna je njihovoj koncentraciji (Mijačević i Otenhaj, 1989). LPS, uz pomoć H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, može da pojača antibakterijsku aktivnost, stvaranjem jačeg inhibitora bakterijskog metabolizma i rasta. Takođe, konvertovanjem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u slabije oksidaciono sredstvo, LPS može štiti bakterije od njegove toksičnosti (Thomas et al., 1994), čime je, katalaza negativnim, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pozitivnim, bakterijama omogućeno preživljavanje i rast u okruženju. Autori Arefin et al. (2017) utvrdili su da je rok trajanja svežeg kravljeg mleka, u koje je dodato 0,14 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, duži za 10 sati u odnosu na kontrolni uzorak. Dodavanjem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u odgovarajućim koncentracijama omogućila bi se zdravstvena bezbednost mleka u situacijama i sredinama kada je ista ugrožena usled delovanja različitih faktora okruženja (Arefin et al., 2017).

#### 2.6.6 Ugljen-dioksid

Kao produkt heterofermentativnog metabolizma BMK, može nastati CO<sub>2</sub>. Stvara anaerobnu sredinu, pa tako može uticati negativno po opstanak aerobnih formi mikroorganizama hrane delovanjem na ćelijsku membranu. Metabolizam limunske kiseline predstavlja karakteristiku produkcije mnogih mlečnih proizvoda. Njenim razlaganjem nastaje CO<sub>2</sub>, koji daje teksturu nekim proizvodima (Hugenholtz i Starrenburg, 1992; Foulquié Moreno et al., 2006).

Pri fermentaciji određenih proizvoda kao što je Kimchi, dodavanjem CO<sub>2</sub> može se uticati na smanjenje nepoželjne mikroflore, a takođe i usporiti rast BMK, što bi bilo poželjno radi dobijanja dobrog kvaliteta i zadržavanja svežine proizvoda (Park, 2018). Pojava okaca karakterističnih za neke vrste švajcarskih sireva, potiče od CO<sub>2</sub> koji nastaje korišćenjem laktoze od strane propionibakterija (Caplice i Fitzgerald, 1999).

#### 2.6.7 Ostali produkti metabolizma BMK

Među ostalim produktima metabolizma BMK, nalazi se i etanol. Međutim, uloga etanola u antibiozi nije posebno značajna, budući da je nivo njegove produkcije minimalan (Caplice i Fitzgerald, 1999). Reuterin ima širok spektar antimikrobnog dejstva. Utiče inhibitorno na kvasce, plesni, G (+) i G (-) bakterije. Nastaje produkcijom od strane heterofermentativnih laktobacila tokom anaerobnog metabolizma glicerola ili gliceraldehida. Inhibira rast vrsta bakterija *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Candida* (Dillon, 2014).

### 2.7 PRIMENA BAKTERIJA MLEČNE KISELINE KAO ANTILISTERIJSKIH KULTURA U HRANI

O antilisterijskom delovanju BMK u hrani postoje brojni literaturni podaci. S obzirom na visok procenat smrtnosti obolelih od listerioze, kod brojnih autora akcenat istraživanja bio je na ovom patogenu. Bakteriocinogeni sojevi BMK izolovani iz tradicionalnih portugalskih sireva su primenjeni kao protektivne kulture u siru od pasterizovanog mleka, gde su pokazali snažno antilisterijsko dejstvo tokom skladištenja sira na temperaturi frižidera (Coelho et al., 2014). Inhibitorno dejstvo BMK u odnosu na *L. monocytogenes* dokazali su u svojim istraživanjima i El-Gazzar et al. (1992) prateći uticaj BMK na listeriju u obranom mleku, kao i odvojenim proizvodima

ultrafiltracije mleka, retentatu i permeatu. Lakticin 3147, koji je komercijalno dostupan, i Pediocin PA-1/ACH (komercijalno dostupan pod imenom ALTA 2341), bitno redukuju broj *L. monocytogenes* u mlečnim proizvodima. Sakacin P, Pediocin AcH i karnobakteriocin inhibiraju rast *L. monocytogenes* u vakuum-pakovanom mesu (Dillon, 2014). Neke *Bacillus* spp. i *Carnobacterium* spp. su od velikog značaja za prehrambenu industriju, s obzirom da su pokazale antimikrobni uticaj svojih metabolita proteinske prirode na različite patogene (Dillon, 2014). Bakteriocini Bacillocin 490 i Cerein 8A inhibiraju rast *L. monocytogenes* u siru, a Piscicolin 126 poreklom iz sojeva *Carnobacterium maltaromaticum* JG126 i UAL26 se mogu primeniti kao antilisterijske kulture u mesu (Dillon, 2014). Antilisterijsko dejstvo na proizvode koji se čuvaju na temperaturi rashlađivanja, kao što je hladno dimljeni losos, pokazali su bakteriocin-produkujući sojevi *C. piscicola* V1 i *C. divergens* V41, dok Carnocin CP5 i Piscikolin 126 inhibiraju *L. monocytogenes* u mleku (Dillon, 2014).

Na osnovu literaturnih podataka, dolazi se do saznanja i o primeni enterokoka i njihovih metabolita u cilju očuvanja bezbednosti hrane. Mnogi bakteriocini enterokoka iz klase II pediocin-sličnih bakteriocina, pokazuju antilisterijsko dejstvo. Međutim, pre primene u hrani, neophodno je, svaki pojedinačan slučaj razmotriti da bi se izbegla pojava eventualnih štetnih efekata (Baccouri et al., 2019), *E. faecalis* u mleku i siru produkuje enterocin AS-48, ne inhibirajući rast startera i BMK, a primena enterocin AS-48 produkujućeg soja *E. faecalis* A-48-32 inhibira rast *B. cereus* u tvrdom kravljem siru sa smanjenim sadržajem masti (Muñoz et al., 2004; Muñoz et al., 2007). Huang et al. (2013) navode da je RM6 enterocin, koga produkuje *E. faecalis* OSY RM6 izolovan iz mleka, pokazao antimikrobnu aktivnost prema *L. monocytogenes*, *B. cereus*, meticilin-rezistentnom *S. aureus*, a takođe i snažno antilisterijsko dejstvo protiv *L. monocytogenes* u Cottage siru, Antilisterijsko dejstvo u mlečnim proizvodima pokazali su Enterocin CCM4231 i Enterocin CRL35 (Dillon, 2014). Khay et al. (2014) navode da *E. durans* E204, poreklom iz kamiljeg mleka, produkuje enterocin-slične supstance koje inhibiraju rast *L. monocytogenes* u tradicionalnom marokanskom jben siru (Arqués et al., 2015). Enterocin AS-48, nanošen prskanjem po filetima morske deverike, u kombinaciji sa visokim hidrostatskim pritiskom pokazao je inhibitornu aktivnost protiv *L. monocytogenes* (Blázquez et al., 2018).

### 3. CILJ RADA

Sposobnost patogena da se prilagode i prežive uslove prerade hrane, u mnogome doprinosi porastu broja alimentarnih trovanja. Proizvodni procesi, u najvećoj meri, oslanjaju se na primenu agresivnih tehnika prerade i hemijskih sredstava, radi produžetka roka trajanja proizvoda i njihove mikrobiološke bezbednosti. Međutim, savremeni potrošač ispoljava zabrinutost zbog upotrebe hemijskih konzervanasa i okreće se proizvodima koji koriste prirodne konzervanse, bezbedne po ljudsko zdravlje. Bakterije mlečne kiseline sa svojim antimikrobnim metabolitima, predstavljaju adekvatno tehnološko rešenje.

Dosadašnja istraživanja u sferi prehrambene industrije bazirala su se, uglavnom, na primeni manjeg broja sojeva sa već potvrđenim antimikrobnim svojstvima. Fermentisani proizvodi proizvedeni na tradicionalan način, obiluju ogromnim brojem sojeva sa izuzetnim karakteristikama i još uvek nedovoljno istraženim mehanizmima antimikrobnog delovanja.

Imajući to u vidu, njihova aplikacija u proizvodnji u svojstvu starter kultura ili dodatnih kultura mogla bi dati izuzetan doprinos u industrijskoj proizvodnji bezbednih proizvoda, sa očuvanim tradicionalnim senzornim osobinama.

Protektivne kulture u proizvodnji prehrambenih proizvoda, usled antimikrobnog delovanja produkata metabolizma, pokazale su se kao adekvatna alternativa hemijskom tretiranju i invazivnim tehnikama prerade. U tom smislu, za očekivati je, da među autohtonim sojevima BMK, koji se mogu koristiti kao starter kulture, postoje i oni koji će pokazati antimikrobno dejstvo na patogene. Ovaj aspekt primene autohtonih bakterija mlečne kiseline još uvek nije dovoljno istražen, naročito kada je u pitanju primena u različitim vrstama namirnica. Primenom prirodnih izolata BMK u proizvodnji sira od UF mleka, kajmaka, hladno dimljenog lososa, mogli bi se očekivati zadovoljavajući antilisterijski efekti. Sa druge strane, aplikacijom autohtonih sojeva u proizvodnji hrane, mogao bi se utvrditi njihov uticaj na eventualnu promenu senzornih svojstava proizvoda.

Na osnovu navedenih činjenica, osnovni ciljevi istraživanja ove doktorske disertacije, predstavljaju:

- Izolacija i karakterizacija odabranih sojeva bakterija mlečne kiseline
- Identifikacija izolovanih sojeva BMK
- Preliminarno ispitivanje inhibitornog dejstva autohtonih sojeva BMK na rast *L. monocytogenes* u model sistemu sira
- Praćenje vijabilnosti autohtonih sojeva BMK u model sistemu sira
- Ispitivanje uticaja autohtonih sojeva BMK na rast *L. monocytogenes* u različitim koncentracijama u siru od UF mleka, kajmaku, lososu
- Praćenje vijabilnosti autohtonih sojeva BMK u siru od UF mleka, kajmaku, lososu u roku trajanja.



## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1 AUTOHTONI SOJEVI PRIMENJENI U ISTRAŽIVANJU

Autohtone bakterije mlečne kiseline korišćene u istraživanju poreklom su iz tradicionalnih sireva sa teritorije Republike Srbije. Prvi soj, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 563, deo je kolekcije Katedre za tehnološku mikrobiologiju Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, izolovan iz Sjeničkog sira sa područja Sjeničko-peštarske visoravni. Izolacija i identifikacija *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 563 izvršena je u ranijim istraživanjima (Radulović, 2007). Izolacija i identifikacija soja *Enterococcus durans* PFMI565 izvršena je u toku ovog istraživanja. Sirevi za potrebe izolacije, kupljeni su na gradskoj pijaci direktno od proizvođača. Od momenta kupovine do laboratorijske analize, poštovan je hladni lanac čuvanja proizvoda. Treći soj, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 pripada kolekciji Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Ovaj soj izolovan je iz tradicionalnog sira s područja planinskog dela Istočne Srbije (Golić et al., 2013). Za testiranje antimikrobne aktivnosti bakterija mlečne kiseline korišćeni su sojevi *Listeria monocytogenes* ATCC19111 i *Staphylococcus aureus* ATCC25923.

### 4.2 IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA BAKTERIJA MLEČNE KISELINE

#### 4.2.1 Izolacija i utvrđivanje morfoloških karakteristika autohtonih BMK

U aseptičnim uslovima, iz središnjeg dela tri pojedinačna uzorka Sjeničkog sira, proizvedenih na tradicionalni način bez dodavanja starter kultura, odmereno je 20 g sira i preneto u sterilnu Stomacher kesu sa 180 mL natrijum-citrata (2 % w/v), a potom homogenizovano na blenderu Stomacher 400 (Lab Blender 400, Seward Medical, London, UK) do potpune homogenizacije. Korišćenjem metode razređenja, uz upotrebu fiziološkog rastvora (0,85 % w/v), uzorci su zasejavani na površinu odgovarajuće podloge i inkubirani na odgovarajućoj temperaturi rasta. Za izolaciju laktokoka i enterokoka korišćen je M17 agar (Merck, Darmstadt, Nemačka) sa glukozom (0,5 % w/v), a za laktobacile MRS agar (Merck, Darmstadt, Nemačka). Podloge su inkubirane na 30 °C za laktokoke i 37 °C za enterokoke u aerobnim uslovima, a za laktobacile anaerobno u Gas Pak – sistemu (BBL, Nemačka) tokom 48 h. Provera čistoće kulture vršena je mikroskopiranjem, a bojenjem po Gram-u utvrđeno je da li izolovane kulture pripadaju Gram pozitivnim ili Gram negativnim bakterijama.

#### 4.2.2 Antilisterijska aktivnost izolata

Petri šolje sa izraslim kolonijama, prelivene su M17 top agarom obogaćenim glukozom (0,5 % w/v) u koji je dodata *Listeria monocytogenes* ATCC19111 ( $10^5$  -  $10^6$  ćelija po 1 mL medijuma) i inkubirane na 37 °C u trajanju od 24 h. Na mestu rasta kolonija koje proizvode antimikrobna jedinjenja, pojavljuje se zona inhibicije indikator soja. Na tim mestima sterilnom ezom pikirane su pojedinačne kolonije i metodom iscrpljenja, uz trostruko prečišćavanje, dobijene su čiste kulture. Potvrda antilisterijske aktivnosti sojeva kod kojih je uočeno pojavljivanje zona inhibicije indikator soja, izvršena je korišćenjem difuzione metode sa bunarićima (Kojic et al., 1991). Prekonočne kulture *L. monocytogenes* ATCC19111 ( $10^5$  -  $10^6$  ćelija po 1 mL medijuma) inokulisane su u top

M17 agar sa dodatih 0,5 % glukoze. Po očvršćavanju agara, u agar su utisnuti bunarići prečnika 5 mm. Svaki bunarić naliven je sa 50 µL kulture (nakon 16 h rasta u bujonu) sa prethodno detektovanom antilisterijskom aktivnošću. Isti postupak ponovljen je sa supernatantom kulture, koji je dobijen centrifugiranjem kulture (16 h) na 5000 rpm u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je filtriran korišćenjem 0,2 µm filtera (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (Kojic et al., 1991).

#### 4.2.3 Bakteriocinska aktivnost izolata

Izabrani izolati su u sledećem koraku testirani difuzionom metodom sa bunarićima (Kojic et al., 1991) na listeriju, korišćenjem supernatanta i neutralisanog supernatanta (pH vrednost podešena na 7). Prethodno pripremljene Petri šolje sa čvrstom podlogom, prelivene sa top agarom u koji je dodat indikator soj ( $10^5$  -  $10^6$  ćelija po 1 mL medijuma). Kao indikator sojevi korišćeni su *L. monocytogenes* ATCC19111 i *S. aureus* ATCC25923. Bunarići promera 5 mm utisnuti su u top agar, pa je u njih je dodato 50 µL natanta ili supernatanta (16 h) ispitivanog soja. Da bi se utvrdilo da li je antimikrobno jedinjenje proteinskog porekla, u neposrednoj blizini ivice bunarića, sterilnim štapićem dodavan je kristal pronaze E (Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, SAD). Smanjenje zone u regiji nanošenja pronaze E, predstavljalo bi potvrdu proteinske prirode antimikrobnog jedinjenja.

#### 4.2.4 Biohemijske karakteristike izolata

Prečišćene kolonije sa pokazanim antilisterijskim delovanjem, zasejane su u odgovarajuće bujone, a potom testirane na test Katalaza i test fermentacije šećera.

##### 4.2.4.1 Katalaza test

Budući da BMK pripadaju katalaza negativnoj skupini mikroorganizama, urađen je katalaza test. Za potrebe prisustva enzima katalaze, korišćen je 3 % vodonik-peroksid. U jednu kap rastvora H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> položenu na staklenu pločicu, sterilnom ezom dodata je mala količina biomase ispitivane kulture. Pozitivna reakcija detektovana je pojavom mehurića, a katalaza pozitivne kulture su bile isključene iz daljeg istraživanja, s obzirom na činjenicu da BMK ne poseduju enzim katalazu.

##### 4.2.4.2 Test fermentacije šećera

U M17 bujon sa dodatih 0,5 % laktoze, u koncentraciji 1 %, inokulisane su sveže prekonocne kulture prečišćenih sojeva sa antilisterijskom aktivnošću. Po isteku 24 - 48 h inkubacije na 30 °C, utvrđeno je da li je došlo do zamućenja kulture i pojave gasa u Durham cevčicama, što bi predstavljalo pokazatelj da se sojevi svrstavaju u heterofermentativni tip. Odsustvo mehurića u Durham cevčici uz zamućenje bujona ukazalo bi na pripadnost sojeva homofermentativnom tipu.

### 4.3 IDENTIFIKACIJA SELEKTOVANIH BAKTERIJSKIH IZOLATA

#### 4.3.1 Izolacija totalne DNK selektovanih sojeva BMK

Kulture su gajene u adekvatnim uslovima u 10 mL odgovarajućeg bujona do postizanja logaritamske faze rasta koja je utvrđena spektrofotometrijski (Shimadzu, 1800UV), kada je na talasnoj dužini od 600 nm postignuta apsorbancija od 0,6 - 0,8. Ćelije su obarane na 5000 rpm (5804R, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) tokom 5 minuta čime je dobijen talog ćelija, koji je ispiran dva puta u zapremini od 500 µL TEN pufera (50 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM EDTA pH 8;

50 mM NaCl). Nakon ispiranja, ćelije su resuspendovane u zapremini od 500  $\mu$ L PP pufera (0,5 M saharoze; 40 mM  $\text{NH}_4$ -acetata; 10 mM Mg-acetata; pH 7) sa dodatkom lizozima (Merck) u finalnoj koncentraciji 4 mg/mL. Ćelije sa lizozimom su inkubirane na 37 °C tokom 30 minuta. Nakon završene inkubacije, u rastvor ćelija sa lizozimom dodato je 250  $\mu$ L 2 % natrijum dodecil-sulfata (SDS), a zatim je suspenzija intenzivno homogenizovana na vorteksu jedan minut. Za denaturaciju proteina dodato je 250  $\mu$ L neutralnog fenol-hloroforma. Suspenzija je intenzivno homogenizovana na vorteksu 30 sekundi, a zatim centrifugirana na 13000 rpm tokom 2 minuta (5415D, Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Proces fenolne ekstrakcije je ponavljan sve dok nije dobijen potpuno čist, bistar supernatant, bez nečistoća. Supernatantu je dodata 1/10 ukupne zapremine 3M Na-acetata i 1 zapremine izopropanola. Nakon mešanja, suspenzija je inkubirana na sobnoj temperaturi tokom 5 minuta. Centrifugiranjem na 13000 xg (5415D, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) tokom dva minuta istaložena je ukupna DNK. Ispiranje taloga DNK izvršeno je hladnim etanolom (70 %), a nakon centrifugiranja na 13000 xg (5415D, Eppendorf, Hamburg, Nemačka) u trajanju od 2 minuta, talog je osušen na sobnoj temperaturi i resuspendovan u 50  $\mu$ L RNKaze (10 mg/mL). Kako bi bila odstranjena RNK, rastvor je inkubiran na 37 °C tokom 30 minuta (Mirković, 2016).

#### 4.3.2 Umnožavanje DNK fragmenata – PCR (“Polymerase Chain Reaction”)

Nakon izolacije DNK, sledeći korak u procesu molekularne identifikacije bakterijskih izolata, bio je umnožavanje dela gena *16S rDNK* korišćenjem specifičnih prajmera.

Umnožavanje varijabilnog regiona gena za *16S rRNK* izvršeno je primenom specifičnih 16S prajmera: P<sub>16S</sub> (5'-GAGAGTTTGATCCTGGC-3') i P<sub>216S</sub> (5'-AGGAGGTGATCCAGCCG-3') (Jovicic et al., 2009). PCR smeša je pripremljena na sledeći način: reakcioni pufer (1x) sa 1,5 mL  $\text{MgCl}_2$  (Kapa Biosystems Inc., Boston, USA), smeša dNTP (svaki po 200  $\mu$ M), prajmera (svaki po 2,5  $\mu$ M), enzim DNK polimeraza, 1U (Kapa Biosystems Inc., Boston, USA) i prethodno izolovana DNK iz bakterije u količini 0,1-1  $\mu$ g. Radna zapremina od 50  $\mu$ L postignuta je dopunjavanjem vodom bez RNKaze (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf).

PCR reakcija puštena je prema sledećem programu: inicijalna denaturacija na 94 °C / pet minuta, zatim 25 ciklusa umnožavanja DNK fragmenata: denaturacija 30 / 94 °C; vezivanje prajmera 30 / 55 °C; polimerizacija lanaca, 60 sekundi na 1000 baznih parova umnožene DNK na 72 °C; finalna elongacija, sedam minuta na 72 °C (Marshall et al., 2003).

#### 4.3.3 Elektroforeza

PCR produkti su prečišćeni primenom kita za prečišćavanje PCR produkata (QIAquick PCR Purification KIT/250 (QIAGEN GmbH, Hilden, Nemačka), a zatim provereni na horizontalnoj elektroforezi korišćenjem agaroznog gela. Za pripremu gela korišćena je agarozna (1 %), a bojenje gelova izvršeno je etidijum-bromidom. Agarozni gelovi su pripremani otapanjem suspenzije agaroze i 1x TAE pufera (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA), a nakon hlađenja otopljene suspenzije dodat je etidijum-bromid (0,5  $\mu$ g/mL). Kao pufer za elektroforezu korišćen je TAE (1x). Proces elektroforeze je vršen pri konstantnom naponu od 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 transluminator (Nippon Genetics Europe GmbH).

#### 4.3.4 Sekvenciranje

Sekvenciranje PCR produkata urađeno 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>.

### 4.4 TESTIRANJE TEHNOLOŠKIH OSOBINA SOJEVA

#### 4.4.1 Sposobnost rasta pri različitim temperaturama

Da bi se utvrdila sposobnost rasta izolovanih kultura na temperaturama 15 °C i 45 °C, sveže kulture su zasejavane u adekvatnim uslovima i inkubirane u trajanju od 48 h.

#### 4.4.2 Sposobnost rasta pri različitim koncentracijama soli

Ispitivanje sposobnosti rasta autohtonih izolata pri različitim koncentracijama soli, vršeno je zasejavanjem u odgovarajući bujon sa dodatkom 2 %, 4 % i 6,5 % NaCl. Bujoni sa zasejanim izolatima inkubirani su na temperaturi od 30 °C u trajanju od 48 h.

#### 4.4.3 Produkcija egzopolisaharida

Sposobnost produkcije egzopolisaharida (EPS) utvrđena je zasejavanjem autohtonih kultura na odgovarajućoj podlozi. Nakon dvadesetčetvoročasovne inkubacije na adekvatnoj temperaturi, dodirivanjem izraslih kolonija ezom, proveravano je prisustvo EPS. Prisustvo sluzi ukazivalo bi na produkciju egzopolisaharida.

#### 4.4.4 Ispitivanje acidogene aktivnosti

U 100 mL 10 % sterilnog rekonstituisanog obranog mleka (Mlekara, Pančevo), inokulisano je 1000 µL prekončne kulture odabranih sojeva prirodnih izolata. Nakon toga, mleko je inkubirano na odgovarajućoj temperaturi rasta u toku 24 h. Merenje pH vrednosti vršeno je korišćenjem WTW Inolab pH-metra (Nemačka) tokom 24 h fermentacije odmah po inokulaciji (0-ti čas), te nakon 4 h, 6 h, 8 h i 24 h.

### 4.5 SPOSOBNOST PRODUKCIJE AROMOGENIH JEDINJENJA

#### 4.5.1 Determinacija produkcije diacetila - Kreatinski test

Da bi se došlo do saznanja da li odabrane sojeve autohtonih BMK odlikuje sposobnost produkcije diacetila, izveden je kreatinski test. U epruvetama je pomešano po 2,5 mL mleka, zgrušanog delovanjem predmetnih kultura, sa 2,5 mL 30 % NaOH uz dodatak manje količine kreatina. Nakon toga, praćeno je da li dolazi do pojavljivanja crvenog prstena na površini smeše i za koje vreme.

#### 4.5.2 Utvrđivanje prisustva acetil-metil-karbinola (acetoin) - Reakcija Voges-Proskauer

Za determinaciju prisustva acetoina, u pripremljeni glukozo-peptonski bujon inokulisane su sveže bujonske kulture ispitivanih izolata. Nakon inkubacije na 30 °C odn. 37 °C, u svaku pojedinačnu epruvetu dodato je po 0,2 mL  $\alpha$ -naftola i 0,6 mL 40 % KOH. Potom je praćeno da li će doći do pojave crvenog prstena, što bi označavalo pozitivnu reakciju.

#### 4.6 PRODUKCIJA DIACETILA (GASNA HROMATOGRAFIJA)

Priprema uzoraka za liofilizaciju rađena je po modifikovanoj metodi Richelieu et al. (1997). Prekonoćne kulture autohtonih sojeva BMK *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 563, *Enterococcus durans* PFMI565 i *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 zasejane su u 100 mL M17 bujona obogaćenog glukozom (0,5 % w/v) i inkubirane na 30 °C. Po ulasku u stacionarnu fazu, bujonske kulture su centrifugirane (Eppendorf AG, Hamburg, Nemačka) i isprane 3 puta sterilnim fiziološkim rastvorom. Dvostruki pelet dodat je u 10 mL sterilisanog rekonstituisanog 10 % obranog mleka (Mlekara, Pančevo). U sterilne penicilinke dodato je 1 mL mleka sa duplim peletom. Liofilizacija je vršena na liofilizatoru ALPHA 1-4 LSC plus (Christ, Nemačka), sa parametrima liofilizacije:

- -80 °C, 24 h
- -15 °C, 3,5 h na 0,1 mbar
- -10 °C, 3,5 h na 0,1 mbar
- -5 °C, 3,5 h na 0,1 mbar
- 0 °C, 3,5 h na 0,1 mbar
- 5 °C, 3,5 h na 0,1 mbar
- 10 °C, 3,5 h na 0,1 mbar
- 15 °C, 3 h 15 min., na 0,001 mbar

Po završetku liofilizacije, kulture su, u koncentraciji 0,125 g/L dodate u UHT obrano mleko (u 10 mL mleka dodato je 0,00125 g liofilizovane kulture) i čuvane na 22 °C u trajanju od 14 h, nakon čega su analizirane putem gasne hromatografije.

Diacetil kao produkt metabolizma BMK analiziran je korišćenjem gasnog hromatografa (GC) Agilent 7890A povezanog sa Agilent 7697A uređajem za statičko headspace uzorkovanje (Headspace Static Sampling, HSS) i detektorom sa zahvatom elektrona (Electron Capture Detector, ECD) (Slika 2).

GC uređaj je opremljen sa kapilarnom kolonom dužine 60 m, sa unutrašnjim prečnikom od 0,25 mm i debljinom filma od 0,25  $\mu$ m (Thermo Scientific™ TraceGOLD™ TG-5MT; Slika 3). Temperaturni program korišćen za detekciju butandiona (diacetila) u uzorcima bio je: 45 °C tokom 2 minuta, potom je temperatura povećana za 10 °C po minuti do postizanja 150 °C, a nakon toga usledilo je zadržavanje na 150 °C tokom 27 minuta.

Režim rada za ECD bio je: 250 °C sa protokom gasa od 30 mL/min.



Slika 2. Gasni hromatograf Agilent 7890A sa Agilent 7697A uređajem za statičko headspace uzorkovanje

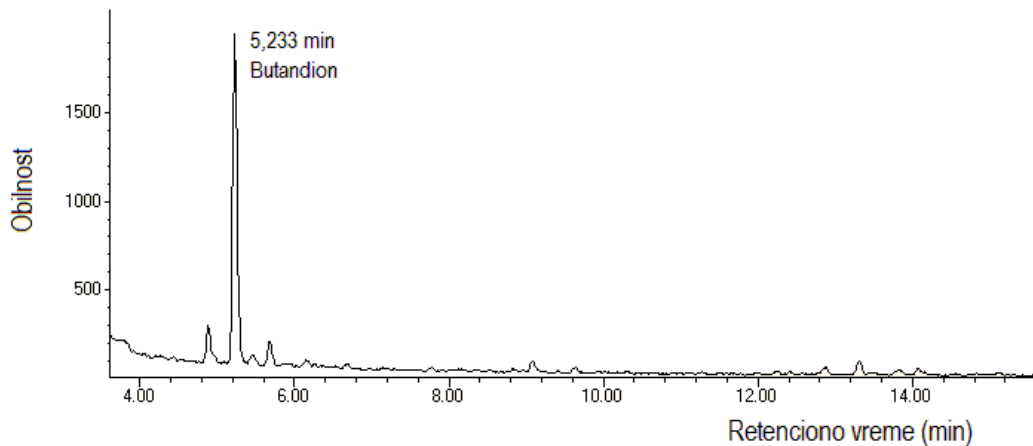


Slika 3. Kapilarna kolona Thermo Scientific™ TraceGOLD™ TG-5MT

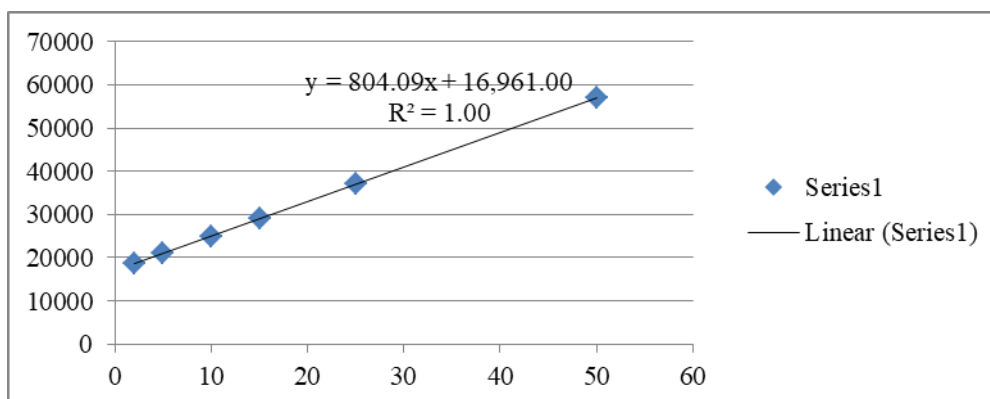
Kvantifikacija butandiona u uzorcima vršena je korišćenjem eksterne kalibracione krive. Za tu svrhu, standard butandiona za GC analizu (97 % čistoće; Sigma-Aldrich) rastvoren je u vodi (milli Q ultrapure water system) sa 4 % etanola (HPLC grade; čistoća  $\geq 99,9$  %; Sigma-Aldrich). Standardna serija butandiona koja je korišćena za izradu kalibracione krive obuhvatila je rastvore sledećih koncentracija: 0, 2, 5, 10, 15, 25 i 50  $\mu\text{g/L}$ .

Rastvori standardne serije preneti su u 20 - mililitarske staklene headspace vaje (proizvođač Agilent) dodavanjem po 5 mL rastvora po vaji i hermetički zatvorene sa aluminijumskim zatvaračima. Korišćen je azot ( $\text{N}_2$ ) visoke čistoće ( $> 99,999$  %) za postizanje pritiska u vaji HSS jedinice. Vaje su ekvilibrirane tokom 30 minuta na 70 °C. Nakon toga, rastvori su ekstrahovani u režimu rada sa jednostrukom ekstrakcijom i preneti u GC jedinicu pomoću spojene kapilarne transfer linije od  $\text{SiO}_2$  (unutrašnji prečnik 0,25 mm) pri temperaturi nozle od 100 °C i pri temperaturi transfer linije od 110 °C.

Na osnovu površina pikova butandiona u hromatogramima dobijenim snimanjem rastvora standardne serije (grafikon 1) konstruisana je kalibraciona kriva (grafikon 2).



Grafikon 1. Hromatogram standardnog rastvora butandiona



Grafikon 2. Kalibraciona kriva

Uzorci mleka preneti su u 20 - mililitarske staklene *headspace* vaje dodavanjem po 5 mL uzorka po vaji. Nakon toga, vaje su hermetički zatvorene aluminijumskim zatvaračima i uzorci su analizirani na isti način kao i rastvori standardne serije. Sve analize rađene su u triplicatu.

## 4.7 PRODUKCIJA VODONIK-PEROKSIDA

Utvrđivanje prisustva vodonik-peroksida ( $H_2O_2$ ) kao produkta metabolizma bakterija mlečne kiseline vršeno je po modifikovanoj metodi Tomás et al. (2004) zasejavanjem kolonija bujonskih kultura autohtonih sojeva na površini TMB agara. Za pripremu TMB agara, napravljeni su rastvori A i B. Za rastvor A 12,5 mg 17,34 mM TMB (3,3',5,5'-tetrametyl-benzidine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) pomešano je sa 3 mL metanola (Merck, Darmstadt, Nemačka). Rastvor je promućkan do potpunog rastvaranja. Rastvor B dobijen je dodavanjem 0,5 mg peroksidaze (EC 1.11.1.7), tip II: iz rena, 200 U/mg (Sigma Aldrich) u 1 mL sterilne destilovane vode (0,5 mg/mL ili 100U/mL peroksidaze). U M17 agar sa glukozom (0,5 % w/v) 0,6 mL alikvota rastvora A i 0,2 mL alikvota rastvora B je pomešano i dodato u ohlađen agar. Agar je potom izliven u Petrijeve šolje. Nakon što se agar stegao, na površinu su zasejane bujonske kulture i supernatanti. Petrijeve šolje su stavljene na inkubaciju na 30 °C odn. 37 °C u trajanju od 48 h. Nakon toga, Petri šolje su izložene vazduhu, pri čemu kolonije koje proizvode  $H_2O_2$  dobijaju plavo ili braon obojenje.

## 4.8 INHIBITORNA SVOJSTVA SELEKTOVANIH SOJEVA

### 4.8.1 Antimikrobna aktivnost selektovanih sojeva prema *L. monocytogenes* ATCC19111 i *S. aureus* ATCC25923

Za određivanje antimikrobnih osobina korišćene su prekonoćne kulture selektovanih autohtonih BMK pojedinačno ili u kombinacijama, kao i komercijalna starter kultura CHN 11 (CHR Hansen, Danska (*L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc*) (Tabela 6).

*Staphylococcus aureus* ATCC25923 i *Listeria monocytogenes* ATCC19111, subkulturirani su u TSY bujonu na 37 °C. Prirodni izolati BMK inokulisani su u odgovarajući bujon i inkubirani su na adekvatnoj temperaturi. Komercijalna starter kultura CHN 11 za potrebe eksperimenta pripremljena je na tako što je u GM17 bujon dodato 0,1 g liofilizovane kulture, homogenizovano na Vorteks mešalici i inkubirano na 30 °C u trajanju od 24 h, sa dvostrukim presejavanjem kulture.

U Petri šolje je izliveno 20 mL agara za rast ispitivane kulture (GM17 ili MRS), a nakon što se agar stegao, u njega su utisnuti bunarčići prečnika 5 mm. Korišćen je TSY top agar (TSY bujon sa dodatkom 0,7 % agara) inokulisan odgovarajućim indikator sojem (*Staphylococcus aureus* ATCC25923 ili *Listeria monocytogenes* ATCC19111) u zapremini od 1 %. U bunarčiće je dodato po 50  $\mu$ L test kulture. Podloge su inkubirane na odgovarajućoj temperaturi tokom 24 h, nakon čega je izmerena zona inhibicije (Harris et al., 1989; Kojic et al., 1991). Zona je merena od ivice bunarčića i izražena u mm.



Tabela 6. Kombinacije autohtonih BMK i komercijalnih starter kultura za utvrđivanje inhibitornog dejstva prema *L. monocytogenes* i *S. aureus*

Oznaka kombinacije	Autohtone BMK i komercijalne starter kulture
1	CHN 11 <sup>1</sup>
2	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> BGBU1-4
3	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 563 + <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> BGBU1-4
4	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 563
5	<i>E. durans</i> PFMI565 + <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> BGBU1-4
6	<i>E. durans</i> PFMI565
7	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 563 + <i>E. durans</i> PFMI565 + <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> BGBU1-4
8	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 563 + <i>E. durans</i> PFMI565

<sup>1</sup>=komercijalna starter kultura sadrži *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc*

#### 4.9 REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE SELEKTOVANIH SOJEVA

Ispitivanje rezistencije odabranih sojeva autohtonih BMK vršeno je metodom difuznog testa prema uputstvu proizvođača antibiotik diskova Becton Dickinson (BD, SAD). Za potrebe ispitivanja korišćeni su sledeći antibiotici:

Streptomycin (300 µg), Ampicilin (10µg), Gentamicin (120µg), Vancomycin (30µg), Tetracycline (30µg), Neomicin (30µg), Penicillin (10U), Eritromycin (15µg), Chloramphenicol (30µg).

100 µL prekonoćne kulture ispitivanih izolata dodato je u epruvetu sa 9 mL sterilnog fiziološkog rastvora (0,85 % w/v). Nanošenje kultura vršeno je sterilnim brisom po površini osušenog odgovarajućeg agara za rast kulture, naizmeničnim pokretima u 3 pravca. Petri šolja je rotirana za 60° posle svakog ravnomernog nanošenja suspenzije. Šolje su ostavljene da se prosuše 15-20 minuta, nakon čega su po površini agara postavljeni diskovi sa antibiotikom. Merenje zona vršeno je nakon 24 i 48 h inkubacije na odgovarajućoj temperaturi. Meren je prečnik zone zajedno sa prečnikom antibiotika (6 mm), na osnovu čega su izolati determinisani kao senzitivni (S) ili rezistentni (R).

#### 4.10 FERMENTACIJA MLEKA

U cilju ispitivanja sojeva radi primene kao dodatnih starter i protektivnih kultura u proizvodnji sireva, rađena je fermentacija mleka različitim kombinacijama (koncentracionim udelima). Za fermentaciju mleka korišćeno je 10 % sterilno rekonstituisano obrano mleko (Mlekara, Pančevo). Za potrebe metode korišćene su prekonoćne bujonske kulture BMK (*L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 i *E. durans* PFMI565). Liofilizovana komercijalna starter kultura CHN11 (CHR Hansen, Denmark), aktivirana je dodavanjem manje količine liofilizata u GM17 bujon, koji je inkubiran na 30 °C 24 h, a potom presejana 2 puta. Različite varijante kultura dodavane su u mleko u ukupnoj koncentraciji 2 %, odnosno, 2 mL odgovarajuće kombinacije kultura, dodato je na 100 mL mleka (Tabela 7). Primenjene po inokulaciji i mešanju, mleko je inkubirano na 30 °C u

trajanju od 24 h. Nakon inkubacionog perioda, izmeren je pH uzoraka. Svaki uzorak je senzorno ocenjen, ocenjen je izgled gruša i određen broj BMK u mleku.

Tabela 7. Primenjene kombinacije startera za fermentaciju mleka

Kombinacije starter kultura	Zapreminski udeo startera
PFMI565 i CHN11	1:1
	1:3
BGBU14 i CHN11	1:1
	1:3
BGBU14, PFMI565, CHN11	1:1:2

#### 4.11 ISPITIVANJE ANTIMIKROBNOG POTENCIJALA SELEKTOVNIH SOJEVA U HRANI

##### 4.11.1 Određivanje broja ćelija u bujonu

Broj ćelija *L. monocytogenes* ATCC19111, nakon 16 h inkubacije na 37 °C, određivan je korišćenjem metode decimalnog razređena na Palcam agaru (Merck, Darmstadt, Nemačka). Izrasle kolonije *L. monocytogenes* ATCC19111 brojane su nakon 48 h inkubacije na 37 °C (ISO 11290-2:1998).

Broj ćelija svakog od autohtonih izolata bakterija mlečne kiseline u bujonu, određivan je nakon 16 h inkubacije u odgovarajućim uslovima. Za određivanje broja ćelija korišćena je metoda decimalnog razređena, kao i odgovarajući agar i temperature inkubacije.

##### 4.11.2 Obeležavanje sojeva bakterija mlečne kiseline rezistencijom na antibiotike

Autohtoni sojevi *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 i *E. durans* PFMI565 koji su korišćeni dalje u testiranju, obeleženi su rezistencijom na antibiotike rifampicin i streptomycin (Frece et al., 2005). Ispitivani sojevi su gajeni u odgovarajućem bujonu pod odgovarajućim uslovima 16 h, a zatim presejani na odgovarajući agar sa streptomycinom (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Germany) u koncentraciji 1 mg/mL (soj *E. durans* PFMI565) ili sa rifampicinom (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Germany) 500 µg/mL (soj *L. Lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4). Nakon inkubacije od 5 dana u odgovarajućim uslovima, izrasle kolonije su presejavane još tri puta na Petri šolje sa odgovarajućim antibiotikom, a zatim pripremljene za dalji rad.

##### 4.11.3 Model sira

Model sira napravljen je korišćenjem sira od UF mleka (Mlekara Sombor). Nakon dodavanja sira u Na-fosfatni pufer (0,1M, pH 7), u odnosu 1:1, smeša je homogenizovana i sterilisana na 100 °C tokom 20 min. *L. monocytogenes* ATCC19111 je zasejana i inkubirana u TSY bujonu 16 h na 37 °C. U sledećem koraku ćelije su oborene (5000xg, 10 min) i dva puta isprane u Na-fosfatnom puferu (0,1M, pH 7). Na kraju, ćelije su diluirane u Na-fosfatnom puferu i dodate u model sira u broju  $10^3$ ,  $10^4$  i  $10^5$  cfu/g. Dodavanjem ispitivanih sojeva pravljene su različite varijante modela sireva (tabela 8). Sveže bujonske autohtone kulture inkubirane su 16 h na adekvatnoj temperaturi rasta. U model sistem sira dodate su u broju  $\geq 10^7$  cfu/g.

Tabela 8. Varijante modela sira

Oznaka sira	Korišćene kulture
LM3	<i>L. monocytogenes</i> 10 <sup>3</sup>
LM4	<i>L. monocytogenes</i> 10 <sup>4</sup>
LM5	<i>L. monocytogenes</i> 10 <sup>5</sup>
BGBU14_LM3	BGBU1-4 <sub>rif</sub> , <i>L. monocytogenes</i> 10 <sup>3</sup>
BGBU14_LM4	BGBU1-4 <sub>rif</sub> , <i>L. monocytogenes</i> 10 <sup>4</sup>
BGBU14_LM5	BGBU1-4 <sub>rif</sub> , <i>L. monocytogenes</i> 10 <sup>5</sup>
CHN_LM3	CHN11*, <i>L. monocytogenes</i> 10 <sup>3</sup>
CHN_LM4	CHN11, <i>L. monocytogenes</i> 10 <sup>4</sup>
CHN_LM5	CHN11, <i>L. monocytogenes</i> 10 <sup>5</sup>
PFMI565_LM3	<i>E. durans</i> PFMI565 <sub>str</sub> , <i>L. monocytogenes</i> 10 <sup>3</sup>
PFMI565_LM4	<i>E. durans</i> PFMI565 <sub>str</sub> , <i>L. monocytogenes</i> 10 <sup>4</sup>
PFMI565_LM5	<i>E. durans</i> PFMI565 <sub>str</sub> , <i>L. monocytogenes</i> 10 <sup>5</sup>

\*komercijalna starter kultura (*L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* biovar *diacetylactis* i *Leuconostoc*)

Nakon dodavanja *L. monocytogenes*, autohtonih sojeva BMK i homogenizacije, sve kombinacije model sireva podvrgnute su simulaciji procesa fermentacije i zrenja, koji su svojstveni za proces proizvodnje sira (Miočinović et al., 2011):

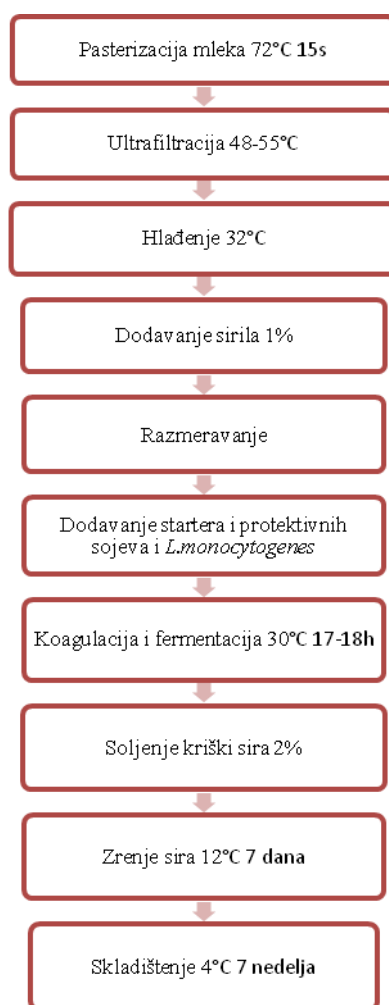
1. 17 - 18 h na 30 °C – simuliranje procesa fermentacije
2. 7 dana na 12 °C – simuliranje procesa zrenja
3. Skladištenje na 4-5 °C 35 dana.

Broj ćelija *L. monocytogenes* ATCC19111 praćen je tokom celog perioda ispitivanja: 0. dana, potom nakon 7. dana zrenja i 14., 21. i 35. dana skladištenja.

#### 4.11.4 Proizvodnja sira od UF mleka

Sir od UF (ultrafiltriranog) mleka sa 3,2 % mlečne masti, proizveden je u modifikovanim uslovima Mlekare “Granice” u Mladenovcu. Veći deo istraživanja obavljen je u laboratorijskim uslovima Katedre za tehnološku mikrobiologiju Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Po modifikovanoj metodi Karimi et al. (2011), nakon pasterizacije mleka na temperaturi od 72 °C u trajanju od 15 sekundi, mleko je ultrafiltrirano na temperaturi 48 - 55 °C, sve do momenta dok nije postignut adekvatan stepen koncentrovanja. Po okončanju ultrafiltracije, retentat je ohlađen do temperature od 32 °C, nakon čega je dodato sirilo (Fromase 2200 TL Granulate, Francuska) u koncentraciji 1 % (w/v). Izvršeno je mešanje, a zatim je odmereno 0,5 kg podsirenog retentata u sterilnu ambalažu od polistirena. Po odmeravanju, u svako pojedinačno pakovanje, dodato je  $\geq 10^7$  ćelija starter odnosno autohtone kulture opredeljene za odgovarajuću varijantu sira, pojedinačno ili u kombinaciji. Korišćene su sveže bujonske starter i autohtone kulture inkubirane u trajanju od 16 h na adekvatnoj temperaturi rasta. *L. monocytogenes* ATCC19111 za potrebe eksperimenta, pripremljena je na isti način kao kod model sistem sira. Po zasejavanju i inkubiranju u TSY bujonu 16 h na 37 °C, usledilo je obaranje ćelija (5000xg, 10 min), a potom i dvostruko ispiranje u Na-

fosfatnom puferu (0,1M, pH 7). U poslednjoj fazi pripreme, ćelije su diluirane u Na-fosfatnom puferu, a zatim dodavane u koncentraciji  $10^3$ ,  $10^4$  i  $10^5$  cfu/g u svaku jedinicu pakovanja. Svaka varijanta sira napravljena je u 6 pojedinačnih pakovanja, za svaku tačku praćenja. Procesi koagulacije i fermentacije sira odvijali su se na temperaturi 30 °C u trajanju od 17 - 18 h. Po isteku vremena fermentacije, nanošena je kuhinjska so (Tuzla, BiH) u koncentraciji 2 % (w/w) posipanjem po površini sira. U sledećoj fazi pripreme, sirevi su izloženi procesu zrenja pri temperaturi od 12 °C tokom 7 dana, a zatim su skladišteni na temperaturi od 4 °C tokom 35 dana (Slika 4).



Slika 4. Šematski prikaz procesa proizvodnje sira od UF mleka sa dodatim autohtonim sojevima BMK i/ili komercijalnom starter kulturom

Napravljeno je 16 varijanti sireva, koje su podeljene u 4 grupe. Prve tri grupe predstavljali su sirevi sa različitim inicijalnim koncentracijama *L. monocytogenes* (Grupa 1 –  $10^3$  cfu/g, Grupa 2 –  $10^4$ , Grupa 3 –  $10^5$ ), a u Grupi 4 su svrstane varijante sa autohtonim sojevima bez *L. monocytogenes*, koje su planirane za ocenu senzornih svojstava sireva (tabela 9). Starter kultura CHN11 (Christian Hansen, Danska) koja sadrži *L. lactis* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis*, *L. lactis* biovar *diacetylactis* i *Leuconostoc*, dodata je pojedinačno ili u kombinaciji sa autohtonim sojevima BMK (*Enterococcus durans* PFMI565<sub>str</sub> i *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* BGBU1-4<sub>tif</sub>) na prethodno opisani način (1:1). Eksperiment je vršen u tri ponavljanja.

Uzorkovanje je vršeno nultog dana (nakon fermentacije) i nakon 7, 14, 21, 35 dana zrenja. Određivan je ukupan broj dodatih protektivnih i starter kultura i *L. monocytogenes* ATCC19111.

Tabela 9. Varijante sireva

Oznaka sira	Korišćene kulture
<b>Grupa 1</b>	
CHN_LM3 <sup>+</sup>	CHN11, <i>L. monocytogenes</i> 10 <sup>3</sup>
CHN_BGBU14_LM3	CHN11, BGBU1-4 <sub>rif</sub> , <i>L.monocyt.</i> 10 <sup>3</sup>
CHN_PFMI565_LM3	CHN11, PFMI565 <sub>str</sub> , <i>L.monocyt.</i> 10 <sup>3</sup>
CHN_BGBU14_PFMI565_LM3	CHN11, BGBU1-4 <sub>rif</sub> , PFMI565 <sub>str</sub> , <i>L. monocytogenes</i> 10 <sup>3</sup>
<b>Grupa 2</b>	
CHN_LM4 <sup>+</sup>	CHN11, <i>L. monocytogenes</i> 10 <sup>4</sup>
CHN_BGBU14_LM4	CHN11, BGBU1-4 <sub>rif</sub> , <i>L.monocyt.</i> 10 <sup>4</sup>
CHN_PFMI565_LM4	CHN11, PFMI565 <sub>str</sub> , <i>L.monocyt.</i> 10 <sup>4</sup>
CHN_BGBU14_PFMI565_LM4	CHN11, BGBU1-4 <sub>rif</sub> , PFMI565 <sub>str</sub> , <i>L. monocytogenes</i> 10 <sup>4</sup>
<b>Grupa 3</b>	
CHN_LM5 <sup>+</sup>	CHN11, <i>L. monocytogenes</i> 10 <sup>5</sup>
CHN_BGBU14_LM5	CHN11, BGBU1-4 <sub>rif</sub> , <i>L.monocyt.</i> 10 <sup>5</sup>
CHN_PFMI565_LM5	CHN11, PFMI565 <sub>str</sub> , <i>L.monocyt.</i> 10 <sup>5</sup>
CHN_BGBU14_PFMI565_LM5	CHN11, BGBU1-4 <sub>rif</sub> , PFMI565 <sub>str</sub> , <i>L. monocytogenes</i> 10 <sup>5</sup>
<b>Grupa 4</b>	
CHN	CHN 11
CHN_BGBU14	CHN11, BGBU1-4 <sub>rif</sub>
CHN_PFMI565	CHN11, PFMI565 <sub>str</sub>
CHN_BGBU14_PFMI565	CHN11, BGBU1-4 <sub>rif</sub> , PFMI565 <sub>str</sub>

<sup>+</sup>= pozitivna kontrola

#### 4.11.4.1 Praćenje pH vrednosti sira od UF mleka u toku skladištenja

pH sira od UF mleka meren je 7., 14., 21. i 35. dana. Iz svakog pojedinačnog pakovanja uzet je 1 g uzorka i dodato 20 mL sterilne destilovane vode. Nakon homogenizacije, merenje pH vršeno je pH-metrom WTW Inolab (Nemačka).

#### 4.11.4.2 Senzorna analiza sira od ultrafiltriranog mleka

Senzorna ocena sireva od UF mleka vršena je primenom korigovanog petobalnog bod sistema (Radovanović i Popović-Raljić, 2001). Svaka varijanta sira senzorno je ocenjivana od strane 5 ocenjivača sa obavljenom obukom za senzorno ocenjivanje (ISO 8586-1:1993 i ISO 8586-2:1994). Raspon ocena kretao se od 1 do 5 uz mogućnost davanja poluboda.

Za parametre ocenjivanja izabrani su izgled, boja, konzistencija, miris i ukus, pri čemu je za svaki parametar određen koeficijent važnosti (KV), prema njegovom uticaju na ukupni kvalitet sira. Ustanovljeni koeficijenti važnosti imali su vrednost: izgled – 1, boja – 2, konzistencija – 4, miris – 10 i ukus – 3. Uz pomoć KV vršila se korekcija, primenom operacije množenja sa senzornom ocenom. Procenat maksimalnog kvaliteta, kao pokazatelj ukupnog kvaliteta sira, predstavlja zbir dobijenih ocena pomnoženih sa odgovarajućim koeficijentom važnosti. Svi uzorci sireva, sa označenim varijantama, ocenjivani su 7., 14., 21., 35. dana.

#### 4.11.5 Ispitivanje antilisterijske aktivnosti BMK u kajmaku

Radi utvrđivanja inhibitorne aktivnosti BMK prema *L. monocytogenes* korišćen je mladi kajmak, proizvođača Jastrebački eko biseri, Kruševac, Srbija. U svako sterilno pakovanje sa 50 g kajmaka dodato je  $10^7$  ćelija prekončne bujonske kulture BMK (*Enterococcus durans* PFMI565<sub>str</sub> i *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* BGBU1-4<sub>rif</sub>) i  $10^7$  ćelija prekončne bujonske kulture *L. monocytogenes* ATCC19111, u različitim kombinacijama. Radi određivanja vijabilnosti autohtonih sojeva BMK i poređenja sa varijantama sa dodatom *L. monocytogenes*, po istom principu, napravljene su varijante kajmaka bez *L. monocytogenes* (tabela 10). Uzorci su potom homogenizovani. Eksperiment je rađen u tri ponavljanja. Uzorkovanje je vršeno nakon dodavanja kultura - 0. dan, 7., 14., 21. i 28. dana.

Tabela 10. Varijante kajmaka

Oznaka kajmaka	Korišćene kulture
K <sup>-</sup>	Kajmak bez dodatih kultura
LM3 <sup>+</sup>	<i>L. monocytogenes</i> $10^3$
LM4 <sup>+</sup>	<i>L. monocytogenes</i> $10^4$
LM5 <sup>+</sup>	<i>L. monocytogenes</i> $10^5$
BGBU14 <sup>-</sup>	BGBU1-4 <sub>rif</sub>
BGBU14_LM3	BGBU1-4 <sub>rif</sub> , <i>L. monocytogenes</i> $10^3$
BGBU14_LM4	BGBU1-4 <sub>rif</sub> , <i>L. monocytogenes</i> $10^4$
BGBU14_LM5	BGBU1-4 <sub>rif</sub> , <i>L. monocytogenes</i> $10^5$
PFMI565 <sup>-</sup>	<i>E. durans</i> PFMI565 <sub>str</sub>
PFMI565_LM3	<i>E. durans</i> PFMI565 <sub>str</sub> , <i>L. monocytogenes</i> $10^3$
PFMI565_LM4	<i>E. durans</i> PFMI565 <sub>str</sub> , <i>L. monocytogenes</i> $10^4$
PFMI565_LM5	<i>E. durans</i> PFMI565 <sub>str</sub> , <i>L. monocytogenes</i> $10^5$
BGBU14_PFMI565_LM3	<i>E. durans</i> PFMI565 <sub>str</sub> , BGBU1-4 <sub>rif</sub> , <i>L. monocytogenes</i> $10^3$
BGBU14_PFMI565_LM4	<i>E. durans</i> PFMI565 <sub>str</sub> , BGBU1-4 <sub>rif</sub> , <i>L. monocytogenes</i> $10^4$
BGBU14_PFMI565_LM5	<i>E. durans</i> PFMI565 <sub>str</sub> , BGBU1-4 <sub>rif</sub> , <i>L. monocytogenes</i> $10^5$

<sup>-</sup> = Negativna kontrola; <sup>+</sup> = Pozitivna kontrola

#### 4.11.6 Ispitivanje antilisterijske aktivnosti *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* BGBU1-4<sub>rif</sub> i *E. durans* PFMI565<sub>str</sub> u lososu

Za potrebe eksperimenta, sveži fileti lososa su kupljeni u maloprodajnom objektu gradske ribarnice. Uzorci ribe su najpre ispitani na prisustvo *L. monocytogenes*, primenom metode ISO 11290-1:1996. Po dobijanju rezultata, u sterilne Stomacher kese odmeravano je u aseptičnim uslovima po 25 g filea lososa, nakon čega je svakom uzorku dodato po 40 μL/g prekončne kulture *L. monocytogenes* ATCC19111 u koncentraciji  $10^3$ ,  $10^4$  i  $10^5$  cfu/g, i po 40 μL/g prekončne kulture *Enterococcus durans* PFMI565<sub>str</sub> ili *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* BGBU1-4<sub>rif</sub>, ili kombinacije *Enterococcus durans* PFMI565<sub>str</sub> i *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* BGBU1-4<sub>rif</sub> (1:1) u

broju  $\geq 10^7$  cfu/g. Pozitivnu kontrolu predstavljali su uzorci lososa u koje je dodato po 1 mL prekonocne kulture *L. monocytogenes* ATCC19111 koncentracije  $10^3$ ,  $10^4$  i  $10^5$  cfu/g. Kulture su dodavane ravnomernim prskanjem po površini odmerenog uzorka ribe. Za potrebe eksperimenta, ispitivano je 12 varijanti lososa u tri ponavljanja (Tabela 11).

Tabela 11. Varijante uzoraka lososa

Oznaka uzorka lososa	Korišćene kulture
LM3 <sup>+</sup>	<i>L. monocytogenes</i> $10^3$
LM4 <sup>+</sup>	<i>L. monocytogenes</i> $10^4$
LM5 <sup>+</sup>	<i>L. monocytogenes</i> $10^5$
BGBU14_LM3	BGBU1-4 <sub>rif</sub> , <i>L. monocytogenes</i> $10^3$
BGBU14_LM4	BGBU1-4 <sub>rif</sub> , <i>L. monocytogenes</i> $10^4$
BGBU14_LM5	BGBU1-4 <sub>rif</sub> , <i>L. monocytogenes</i> $10^5$
PFMI565_LM3	<i>E. durans</i> PFMI565 <sub>str</sub> , <i>L. monocytogenes</i> $10^3$
PFMI565_LM4	<i>E. durans</i> PFMI565 <sub>str</sub> , <i>L. monocytogenes</i> $10^4$
PFMI565_LM5	<i>E. durans</i> PFMI565 <sub>str</sub> , <i>L. monocytogenes</i> $10^5$
BGBU14_PFMI565_LM3	<i>E. durans</i> PFMI565 <sub>str</sub> , BGBU1-4 <sub>rif</sub> , <i>L. monocytogenes</i> $10^3$
BGBU14_PFMI565_LM4	<i>E. durans</i> PFMI565 <sub>str</sub> , BGBU1-4 <sub>rif</sub> , <i>L. monocytogenes</i> $10^4$
BGBU14_PFMI565_LM5	<i>E. durans</i> PFMI565 <sub>str</sub> , BGBU1-4 <sub>rif</sub> , <i>L. monocytogenes</i> $10^5$

+ = Pozitivna kontrola

Nakon dodavanja kultura, zatvoreni uzorci lososa podvrgnuti su simuliranim temperaturnim uslovima hladnog dimljenja (bez dima). Uzorci su čuvani na temperaturi 25 °C tokom 5-6 h, potom na temperaturi rashlađivanja +4°C u frižideru tokom 48 h. Narednih 5 h uzorci su zamrzavani na -20 °C, nakon čega su skladišteni u rashladnom uređaju na +4 °C do kraja eksperimentalnog perioda. Antilisterijska aktivnost BMK u lososu, praćena je tokom perioda od 15 dana. Određivanje broja BMK i *L. monocytogenes* ATCC19111 vršeno je u 5 tačaka i to:

- 0. dan - po dodavanju svežih bujonskih kultura BMK i *L. monocytogenes* u uzorke lososa
- 3. dan - nakon inkubacije na +4 °C tokom 48h
- 7. dan - nakon skladištenja na +4 °C tokom 6 dana
- 11. dan - nakon skladištenja na +4 °C tokom 10 dana
- 15. dan - nakon skladištenja na +4 °C tokom 14 dana.

#### 4.11.7 Određivanje broja *L. monocytogenes* u uzorcima sira, kajmaka i lososa

Iz svakog pakovanja sira i kajmaka odmeravano je po 10 g uzorka i preneto u 90 mL primarnog Fraser bujona (Merck, Darmstadt, Nemačka), a iz svakog pakovanja lososa po 25 g uzorka i preneto u 225 mL primarnog Fraser bujona. Uzorci sira i kajmaka homogenizovani su na Stomacher mešalici (Lab Blender 400, Seward Medical, London, UK) u trajanju od 2 minuta na ambijentalnoj temperaturi, dok su uzorci lososa homogenizovani 10 minuta do potpune homogenizacije. Pre zasejavanja, uzorci su odstajali u primarnom Fraser bujonu na temperaturi 20 °C sat vremena. Zasejavanje je vršeno metodom razređenja. Odgovarajuće decimalno razređenje zasejavano je na

površinu Palcam agara sa suplementima (Merck, Darmstadt, Nemačka), po 100  $\mu\text{L}$  iz prethodnog razređenja. Petrijeve šolje su inkubirane na 37 °C 48 h (ISO 11290-2:1998). Podaci su prikazani kao logaritam broja cfu ( $\text{cfu g}^{-1}$ ). Sve mikrobiološke analize su rađene u triplikatu.

#### 4.11.8 Enumeracija broja BMK u uzorcima sira, kajmaka i lososa

Iz svakog pakovanja odmeravano je po 10 g uzorka i preneto u 90 mL sterilnog fiziološkog rastvora (0,85 %), za određivanje broja BMK. Uzorci sira i kajmaka homogenizovani su na Stomacher mešalici (Lab Blender 400, Seward Medical, London, UK) u trajanju od 2 minuta na ambijentalnoj temperaturi, dok su uzorci lososa homogenizovani 10 minuta do potpune homogenizacije. Iz odgovarajućeg decimalnog razređenja, po 100 $\mu\text{L}$  iz prethodnog razređenja, zasejavano je utrljavanjem na površinu GM17 agara (Merck, Darmstadt, Nemačka) sa streptomycinom ili rifampicinom u zavisnosti od toga koja kultura je obeležena kojom antibiotskom rezistencijom. Radi enumeracije *E. durans* PFMI565<sub>str</sub> zasejavanje je vršeno na površinu GM17 agara sa streptomycinom, ili na površinu GM17 agara sa rifampicinom, radi određivanja broja *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* BGBU1-4<sub>rif</sub>. Petrijeve šolje su inkubirane pod odgovarajućim uslovima 48 h. Podaci su prikazani kao logaritam broja cfu ( $\text{cfu/g}$ ). Sve mikrobiološke analize su rađena u triplikatu.

#### 4.12 STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA

Korišćenjem programa Microsoft Excel 2010, proračunat je broj *L. monocytogenes* u proizvodima, rezultati vijabilnosti autohtonih BMK i starter kultura, kao i ocene senzornih svojstava, i prikazani u obliku srednja vrednost  $\pm$  standardna devijacija. Statistička analiza podataka je urađena pomoću programa SPSS, dok je, u svrsi određivanja razlika među eksperimentalnim grupama proizvoda, korišćena dvofaktorska ANOVA. Koristeći Studentov t-test izvršeno je poređenje razlike između srednjih vrednosti, za statističku razliku uziman je u obzir  $p \leq 0,05$ .



## 5. REZULTATI I DISKUSIJA

### 5.1 IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA SOJEVA

#### 5.1.1 Izolacija

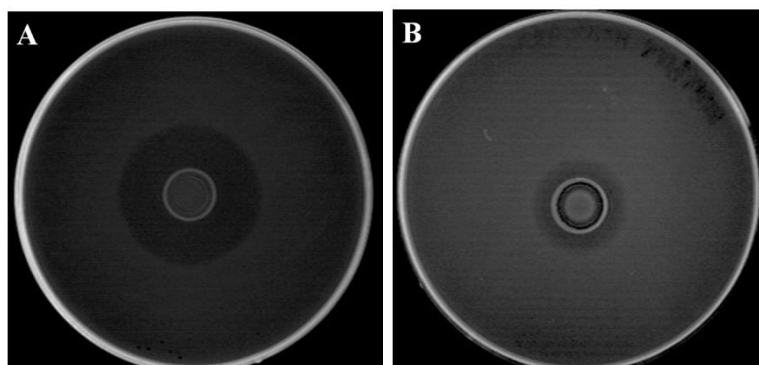
Iz Sjeničkog sira, proizvedenog na tradicionalni način, izolovano je ukupno 200 izolata. Posmatranjem morfoloških karakteristika selektovano je 176 izolata za dalji rad, od kojih je 47 izolata odbačeno iz dalje studije nakon bojenja po Gram-u, s obzirom da su pripadali Gram (-) bakterijama.

#### 5.1.2 Antilisterijska aktivnost izolata

Antilisterijsku aktivnost pokazalo je 20 izolata, što predstavlja deseti deo od ukupno 200 izolata. Ovaj procenat sojeva sa dokazanom antilisterijskom aktivnošću, u saglasnosti je sa rezultatima do kojih su došli drugi autori. Od ukupno 300 izolovanih sojeva iz različitih vrsta kobasice, Cintas et al. (1997) dokazali su antilisterijsku aktivnost 25 izolata. Istraživanjem koje su sproveli Campagnollo et al. (2018), od ukupno izolovanih 891 sojeva iz tradicionalnog brazilskog Minas sira, 48,1 % pokazao je antilisterijsku aktivnost prema dva soja *L. monocytogenes*. Isto istraživanje prikazuje signifikantnu razliku između broja BMK sa antilisterijskom aktivnošću koje su uzgajane na različitim medijumima. Naime, 73 i 70,8 % sojeva uzgajanih na MRS-u, pokazalo je antimikrobno dejstvo prema *L. monocytogenes*, naspram 21,2 i 23,1 % uzgajanih na M17 medijumu. Različiti rezultati istraživanja mogu se objasniti razlikama u vrsti i načinu proizvodnje, korišćene metodologije, metode uzgoja kultura, kultivacionog medija, produkciji različitih antimikrobnih jedinjenja i sl. (Ivanović et al., 2021).

Nakon dokazivanja antilisterijske aktivnosti sojeva, potvrda inhibitornog dejstva prema *L. monocytogenes* ATCC19111, urađena je testom sa bunarićima. Od 20 izolata sa ispoljenom antilisterijskom aktivnošću, izmerena zone inhibicije kod 10 izolata kretala se između 5 i 6 mm, dok je najsnažnije dejstvo, sa zonom inhibicije 10 mm od zida bunarića, pokazao je izolat PFMI565. S obzirom da je korišćena pronaza E i da nije bilo smanjenja zone inhibicije, može se utvrditi da je u pitanju antimikrobno jedinjenje koje nije proteinske prirode.

Poznato je da se među antilisterijskim metabolitima BMK, osim bakteriocina, mogu naći diacetil, vodonik-peroksid, organske kiseline, ugljen-dioksid (Juven i Pierson, 1996; Zhang i Farber, 1996; Caplice i Fitzgerald, 1999; Ito et al., 2003; Dillon, 2014). Korišćenjem neutralisanog supernatanta i dalje postoji zona inhibicije, mada smanjena, što implicira da je uticaj neke organske kiseline veliki. Budući da antimikrobna aktivnost postoji i na pH 7, pretpostavlja se da je prisutan uticaj još nekog antimikrobnog metabolita. S obzirom da izolat PFMI565 nije pokazao bakteriocinsku aktivnost, a da je delovanje nekog antimikrobnog metabolita prisutno i u neutralisanom supernatantu, u nastavku istraživanja, ispitivani su ostali produkti metabolizma koji imaju antimikrobnost.



Slika 5. Antilisterijsko dejstvo PFMI565 protiv *L. monocytogenes* ATCC19111

A) Supernatant PFMI565 B) Supernatant PFMI565 pH = 7

### 5.1.3 Biohemijske karakteristike izolata

#### 5.1.3.1 Katalaza test

Prilikom dodavanja biomase autohtonih kultura BMK u kap vodonik-peroksida, u svrsi utvrđivanja proizvodnje enzima katalaze, od 10 izolata sa jačom antilisterijskom aktivnošću, uočeno je penušanje kod 3 izolata, nakon čega su iste izbačene iz daljeg istraživanja, budući da BMK ne poseduju enzim katalazu. Izolat PFMI565 se pokazao kao katalaza negativan, što implicira da bi mogao pripadati i rodu laktokoka ili enterokoka (Kubota et al., 2010).

#### 5.1.3.2 Fermentacija šećera

Do pojave mehurića u Durham cevčicama došlo je kod 4 izolata, što svedoči o fermentaciji laktoze heterofermentativnim putem, 2 izolata ne fermentišu laktozu, dok je samo za izolat PFMI565 ustanovljeno da ima homofermentativni tip metabolizma. Određivanje tipa metabolizma šećera kod izolata u svojim istraživanjima, na isti način, prikazano je i u radovima drugih autora (Bojanić Rasović et al., 2017). Homofermentativni tip metabolizma smatra se poželjnom karakteristikom za proizvodnju sireva bez šupljika (Smit et al., 2002).

## 5.2 IDENTIFIKACIJA SELEKTOVANOG IZOLATA PFMI565

Iz razloga jake antilisterijske aktivnosti i pokazanih zadovoljavajućih biohemijskih osobina, za dalje istraživanje selektovan je izolat PFMI565. Identifikacija izolata PFMI565 urađena je korišćenjem molekularnih metoda, umnožavanjem gena za *16s rRNK*. Kao matrica korišćena je totalna DNK izolovana iz izolata PFMI565, a za umnožavanje konzerviranog regiona gena *16s rDNK* korišćeni su prajmeri P1<sub>16s</sub> i P2<sub>16s</sub> (Jovčić et al., 2009). Kao produkt umnožavanja dela gena *16s rDNK* dobijen fragment od 1000bp, koji odgovara broju baza koje zaklapaju odabrani prajmeri. PCR produkt je prečišćen, a zatim sekvenciran (MacroGen sequencing service, Holandija). Na osnovu rezultata sekvenciranja i uporednom analizom sekvence korišćenjem NCBI baze podataka, utvrđeno je da izolat PFMI565 pokazuje 99 % identičnosti gena za *16s rRNK* sa vrstom *Enterococcus durans*.

### 5.3 TESTIRANJE TEHNOLOŠKIH SVOJSTAVA SOJEVA

#### 5.3.1 Rast na različitim temperaturama

U nastavku istraživanja, soju *E. durans* PFMI565, pridruženi su sojevi *L. lactis* subsp. *lactis* 563 i *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* BGBU1-4 sa poželjnim tehnološkim osobinama, potvrđenim tokom ranijih istraživanja (Radulović, 2006; Mirković, 2016).

Tabela 12. Sposobnost rasta autohtonih BMK na različitim temperaturama tokom 48 h (za sojeve *L. lactis* subsp. *lactis* 563 i *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 korišćeni rezultati Radulović (2007) i Mirković (2016))

Ispitivana kultura	Temperatura	
	15 °C	45 °C
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 563	+	–
<i>E. durans</i> PFMI565	+	–
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> BGBU1-4	+	–

Konstatovano je sa sva tri soja rastu na temperaturi 15 °C, dok nijedan soj nije rastao na temperaturi 45 °C. Negativan rezultat pri testiranju rasta *E. durans* PFMI565 na temperaturi 45 °C, predstavlja neočekivano svojstvo. Činjenica je da neke enterokoke preživljavaju ekstremne uslove i mogu rasti na višim temperaturama (Fisher i Phillips, 2009; Alshammari et al., 2019), pa čak i preživeti temperaturni režim pasterizacije (McAuley et al., 2009).

#### 5.3.2 Rast pri različitim koncentracijama soli na 30 °C

Radi utvrđivanja tehnoloških karakteristika i ispitivanja mogućnosti primene sojeva u proizvodnji hrane, ispitivan je, između ostalog, i njihov rast pri različitim koncentracijama soli (tabela 13).

Tabela 13. Sposobnost rasta autohtonih sojeva BMK pri različitim koncentracijama soli (za sojeve *L. lactis* subsp. *lactis* 563 i *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 korišćeni rezultati Radulović (2007) i Mirković (2016))

Ispitivana kultura	Koncentracija soli		
	2 %	4 %	6,5 %
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 563	+	+	+
<i>E. durans</i> PFMI565	+	+	+
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> BGBU1-4	+	+	+

Ustanovljeno je da selektovani sojevi rastu pri koncentracijama 2, 4 i 6,5 % soli, što ih čini pogodnim za korišćenje u proizvodnji prehrambenih artikala. Kao zaštita od kvarenja i razvoja nepovoljne mikrobiote, u kombinaciji sa ostalim ekološkim faktorima, koristi se so u većim koncentracijama. Koncentracije 5 do 8 % soli smatraju se uobičajenim u proizvodnji fermentisanog

povrća, krastavaca (Johanningsmeier et al., 2012). U prezervaciji različitih vrsta industrijskih prehrambenih proizvoda, koriste se visoke koncentracije soli, što ukazuje na obećavajući potencijal primene naših sojeva, pored mlečne industrije, i u drugim granama industrijske proizvodnje hrane.

### 5.3.3 Produkcija egzopolisaharida

Test za determinaciju produkcije egzopolisaharida kod sva tri odabrana soja bio je negativan. U poslednje vreme, u skladu sa potrebama sve zahtevnijeg tržišta, radi popravljavanja teksture sireva sa smanjenim sadržajem masti, umesto dosta korišćenih karagenana i ksantan gume (Xiao et al, 2012), sve više se primenjuju EPS+ kulture kao starteri. Zhang et al. (2015) navodi povoljan uticaj EPS+ kultura *L. paracasei* 20408, u proizvodnji polumasnog sira tipa Čedar, na viskozitet i prinos, što je u saglasnosti i sa istraživanjima drugih autora (Rynne et al., 2007; Costa et al., 2012). Takođe, EPS smanjuju gorčinu sira (Zhang et al., 2015). Međutim, iako u proizvodnji fermentisanih mlečnih proizvoda imaju značajnu ulogu, usled negativnog uticaja na konzistenciju, nisu poželjni u proizvodnji sireva u salamuri (Radulović, 2006), pa se izbor sojeva radi primene u siru u našem istraživanju, može smatrati ispravnim u smislu produkcije egzopolisaharida, kao parametra.

### 5.3.4 Acidogena sposobnost

Izuzetno veliki značaj u industrijskoj proizvodnji mlečnih proizvoda ima acidogena sposobnost kultura. Dobra acidogena sposobnost jedan je od odlučujućih faktora za primenu kultura u proizvodnji sireva. Niže pH vrednosti sprečavaju rast patogenih mikroorganizama, utiču na bolje izdvajanje surutke, a osim toga, značajan je i njihov uticaj na ostvarivanje karakterističnih reoloških svojstava sireva u salamuri (Radulović, 2007).

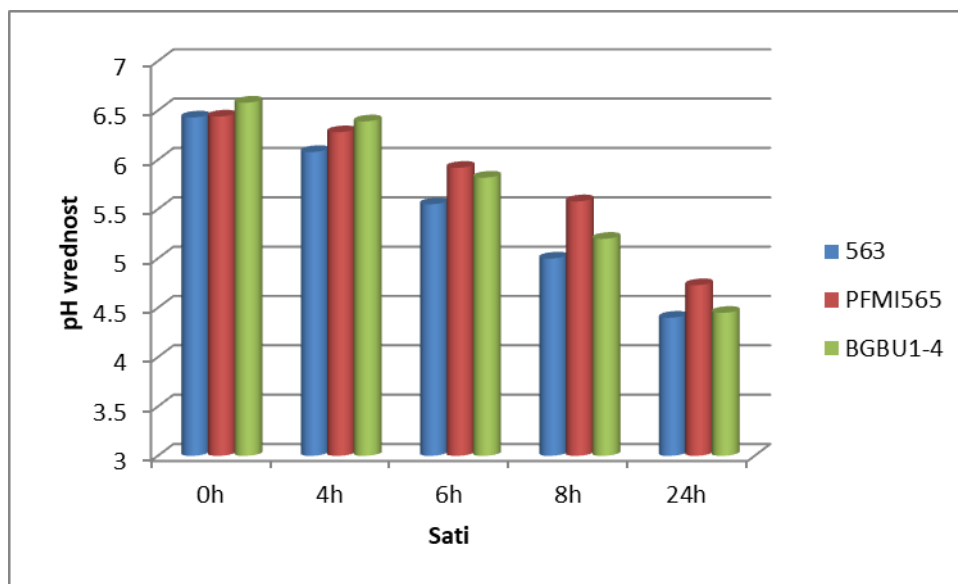
U tabeli 14 dat je prikaz kretanja pH vrednosti mleka tokom dvadesetčetvoročasovne fermentacije pod uticajem selektovanih sojeva BMK.

Tabela 14. Promena pH vrednosti mleka tokom fermentacionog perioda - za soj *L. lactis* subsp. *lactis* 563 korišćeni rezultati Radulović (2007)

Test kulture	0 h	4 h	6 h	8 h	24 h
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 563	6,43	6,08	5,55	5,00	4,40
<i>E. durans</i> PFMI565	6,44	6,28	5,92	5,58	4,73
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar <i>diacetylactis</i> BGBU1-4	6,58	6,39	5,82	5,20	4,45

Poredeći acidogenu sposobnost sojeva iz ranijih istraživanja *L. lactis* subsp. *lactis* 563 i BGBU1-4 (Radulović, 2007; Mirković, 2016), uočava se sličnost u postignutim vrednostima nakon 4 sata fermentacije sa razlikom od 0,31 pH jedinica. Najnižu vrednost pokazao je soj *L. lactis* subsp. *lactis* 563 u svim tačkama merenja. Svi sojevi tokom prvih 6 h fermentacije pokazale su malu acidogenu

aktivnost, te iz tog razloga, ne predstavljaju pravi izbor za primenu u svrsi starter kulture za proizvodnju sireva. Za starter kulture se obično biraju sojevi koji produkcijom kiselina uspevaju da obore pH ispod 5,3 pH-jedinica, u vremenskom periodu od 6 h, na temperaturi rasta u opsegu 30 – 37 °C (Beresford et al., 2001). Nešto sporiji pad pH vrednosti, može se pripisati primarnom poreklu kultura, budući da sva tri soja potiču iz tradicionalnih mlečnih proizvoda, gde spontanom fermentacijom, kao i delovanjem produkata metabolizma dolazi do stvaranja karakterističnih svojstava. Pretpostavlja se da su sojevi prirodno adaptirani na mešanu mikrobiotu i da je njihov učinak potpun tek u sadejstvu sa ostalim stanovnicima mikrobiološke niše koju nastanjuju. Pozitivno svojstvo njihove primene u proizvodnji ove vrste proizvoda, moglo bi se ogledati u primeni kao “adjunct” kulture ili protektivne kulture, budući da, za 24 h, postižu pH između 4,40 (*L. lactis* subsp. *lactis* 563) i 4,73 (*E. durans* PFMI565).



Grafikon 3. Prikaz acidogene sposobnosti autohtonih sojeva

## 5.4 SPOSOBNOST PRODUKCIJE AROMOGENIH JEDINJENJA

### 5.4.1 Determinacija produkcije diacetila – Kreatinski test

Očitavanjem rezultata Kreatinskog testa, konstatovano je da u slučaju *E. durans* PFMI565 i *L. lactis* subsp. *lactis* 563 nije došlo do promena, dok je izvođenjem testa sa *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 nakon 5 minuta uočena pojava blede crvene boje, što bi se moglo smatrati pozitivnom reakcijom.

### 5.4.2 Utvrđivanje prisustva acetil-metil-karbinola (acetoina) - Voges-Proskauer test

Prisustvo acetoina detektovano je u epruveti sa dodatom bakteriocinskom sojem *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 pojavom blede crvenog prstena. U ostala dva slučaja, do pojave prstena nije došlo, što se može smatrati negativnom reakcijom.

Produkcija aromogenih jedinjenja predstavlja jednu od karakteristika metabolizma BMK, pa tako i enterokoka i laktokoka. Ukoliko su prisutni drugi izvori piruvata, kao što su citrati i acetati, mogu se očekivati veće koncentracije ovih jedinjenja (Dillon, 2014). Neočekivano negativan rezultat u slučaju soja *E. durans* PFMI565, mogao bi biti i posledica slabije selektivnosti metode, jer je

poznato da su enterokoke često producenti aromatičnih jedinjenja, kao što su acetoin, diacetil, acetaldehid (Foulquié Moreno et al., 2006).

## 5.5 PRODUKCIJA DIACETILA - GASNA HROMATOGRAFIJA

Fermentacijom citrata dolazi do pojave produkata kao što su: laktat, acetat, format, acetoin, diacetil, 2,3-butandiol (Wang et al., 2021). Diacetil (2,3-butandion) se ireverzibilno redukuje do acetoina enzimom acetoin-reduktaza, da bi se potom acetoin redukovao do butandiola uz pomoć istog enzima (Hugenholtz i Starrenburg, 1992).

Testiranjem ispitivanih sojeva gasnom hromatografijom, detektovane su male koncentracije diacetila, što je bilo i očekivano (tabela 15), budući da se kod sve tri kulture radi o homofermentativnom tipu metabolizma ugljenih hidrata. Može se pretpostaviti i da je diacetil dalje metabolisan do 2,3-butandiola, a citrati do piruvata, pa do ostalih produkata.

Tabela 15. Rezultati analize diacetila gasnom hromatografijom

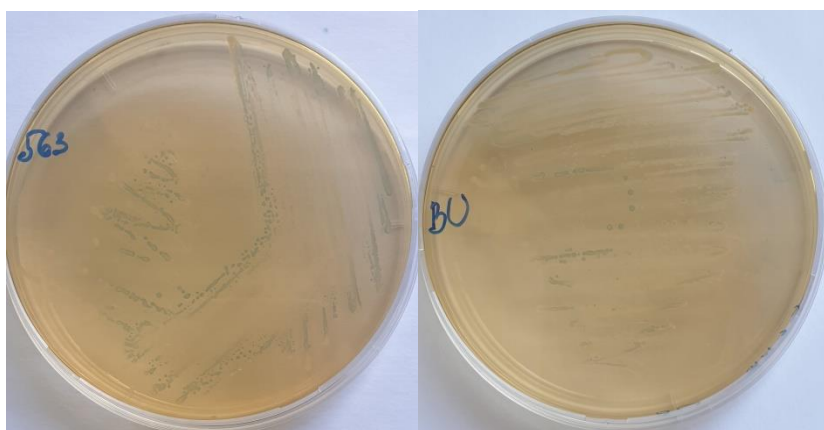
Uzorak	C (µg/L)	Srednja vrednost ± SD	ppm
<i>L. lactis subsp. lactis</i> 563	10,35	10,42 ± 0,07	0,01042
	10,41		
	10,49		
<i>E. durans</i> PFMI565	11,46	11,46 ± 0,16	0,01146
	11,62		
	11,29		
<i>L. lactis subsp. lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> BGBU1-4	12,29	15,07 ± 2,42	0,01507
	16,72		
	16,21		

Prikazani rezultati merenja u slučaju uzorka BGBU1-4 (merenje br.1) ukazuju na mogućnost postojanja greške, na čiju pojavu bi moglo uticati više faktora. Odbacivanjem rezultata 1. merenja, dobila bi se realnija slika. U ostalim ponavljanjima zabeležene su približne vrednosti, koje su bliske vrednostima koje su se dobijale u toku podešavanja metode.

Bakteriocinski soj, BGBU1-4, pokazao je najbolju produkciju diacetila, koja je u odnosu na sojeve *L. lactis subsp. lactis* 563 i *E. durans* PFMI565, bila gotovo za 50 % veća, što ne iznenađuje s obzirom da se radi o soju koji je *L. lactis subsp. lactis* biovar. *diacetylactis*. Autori navode koncentraciju od 300 ppm, kao minimalnu za postizanje antilisterijskog efekta (Lanciotti et al., 2003), a u slučaju pakovanja proizvoda u modifikovanoj atmosferi, uz 20 % zastupljenosti CO<sub>2</sub>, ta vrednost bi odgovarala koncentraciji od 50 ppm (Williams-Campbell i Jay, 2002). Svakako, koncentracija diacetila iz našeg istraživanja je dosta niža od rezultata ranijih istraživanja sa prikazanim antilisterijskim delovanjem, pa se ne može očekivati da antilisterijska aktivnost sojeva potiče isključivo od nje, već bi mogla biti rezultat sinergije više različitih produkata metabolizma (Ivanović et al., 2021).

## 5.6 PRODUKCIJA VODONIK-PEROKSIDA

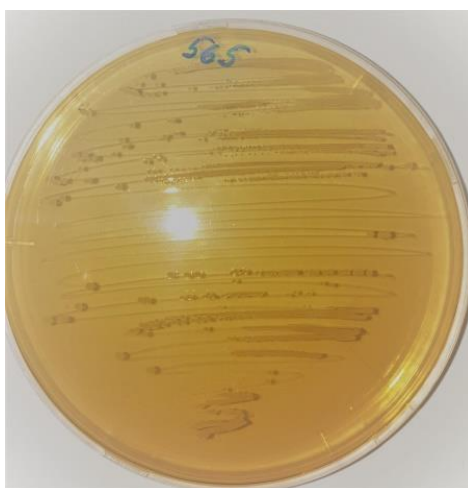
Kod sva tri soja detektovana je pozitivna reakcija na produkciju vodonik-peroksida (Slika 6, 7), na šta ukazuje plavo obojenje  $H_2O_2^+$  kolonija nakon izlaganja vazduhu. Potvrda stvaranja  $H_2O_2$  kao produkta metabolizma ispitivanih sojeva nije iznenađujuća, s obzirom da se u literaturnim podacima drugih autora, navode BMK kao producenati  $H_2O_2$  (Juven i Pierson, 1996; Kawasaki et al., 2009). Ovo jako oksidaciono sredstvo, koje oštećuje ćelijske komponente, lipide membrane, DNK (Dillon, 2014), često je metabolit potencijalnih probiotskih kultura (Kawasaki et al., 2009) ili kultura koje su deo vaginalne mikrobiote (Tomás et al., 2004; Martín i Suárez, 2010; Hertzberger et al., 2014).



Slika 6. Produkcija vodonik-peroksida od strane autohtonih laktokoka

Poznati su njegovi bakteriostatički i baktericidni efekti (Juven i Pierson, 1996). Aktiviranjem LPS u mleku i stvaranjem različitih antimikrobnih jedinjenja (Caplice i Fitzgerald, 1999; Dillon, 2014),  $H_2O_2$  posredno inhibitorno deluje na psihrotrofne *L. monocytogenes*, *Yersinia*, *Aeromonas* species, i mezofilne bakterije, kao što je *E. coli* (El-Gazzar et al., 1992; Ito et al., 2003). Ranije prikazano antilisterijsko dejstvo autohtonih sojeva ovog istraživanja, moglo bi poticati i od vodonik-peroksida (Ivanovic et al., 2021). Udruženim delovanjem laktoperoksidaznog sistema mleka i  $H_2O_2$ , stvara se jači inhibitor bakterijskog metabolizma i rasta (Thomas et al., 1994), što bi moglo pojačati antibakterijsku aktivnost prema nepoželjnoj mikroflori iz okruženja.

LPS predstavlja značajan faktor preživljavanja i rasta katalaza negativnih,  $H_2O_2$  - pozitivnih bakterija, budući da konvertovanjem  $H_2O_2$  u slabije oksidaciono sredstvo, štiti i samu bakterijsku ćeliju od njegove toksičnosti (Thomas et al., 1994), čime bi se moglo objasniti održavanje broja vijabilnih ćelija izolata u roku trajanja proizvoda.



Slika 7. Produkcija H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> od strane *E. durans* PFMI565

Primena izolata producenata H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u proizvodnji hrane, naročito mlečnih proizvoda, radi obezbeđenja mikrobiološke bezbednosti, takođe, mogla bi biti opravdana. Individualno, ili u sadejstvu sa drugim antimikrobnim jedinjenjima, mogao bi se pretpostaviti njihov uticaj na produžetak roka trajanja proizvoda. Ovakva pretpostavka ima realnu osnovu, budući da je zasnovana na rezultatima ranijih istraživanja (Arefin et al., 2017).

## 5.7 INHIBITorna SVOJSTAVA SELEKTOVaniH SOJEVA

### 5.7.1 Antimikrobna aktivnost ispitivanih sojeva

Antimikrobna aktivnost selektovanih sojeva testirana je na patogene bakterije *L. monocytogenes* ATCC19111 i *S. aureus* ATCC25923 (tabela 16), jer je polazna ideja ovog rada bila da se ispita i antilisterijsko i antistafilokokno dejstvo ispitivanih sojeva. S obzirom da su rezultati pokazali veoma slabo inhibitorno dejstvo selektovanih sojeva na stafilokoke, dalja istraživanja su usmerena samo na antilisterijsko dejstvo. Radi planirane primene u svojstvu startera u kombinaciji sa selektovanim sojevima u proizvodnji sira, ispitivano je inhibitorno delovanje prema patogenima komercijalne starter kulture CHN 11 (CHR Hansen, Danska) (*Lc.lactis* subsp. *cremoris*, *Lc.lactis* subsp. *lactis*, *Lc.lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *Leuconostoc*). Zona inhibicije nije uočena, što ukazuje na to da ne postoji inhibitorno delovanje CHN11 prema *L. monocytogenes* ATCC19111 i *S. aureus* ATCC25923.

Tabela 16. Antimikrobna aktivnost BMK prema *L. monocytogenes* i *S. aureus*

BMK i starter kulture	Zona inhibicije	
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
CHN11 <sup>1</sup>	-	-
	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> BGBU1-4	2 mm	1 mm
	2 mm	1 mm



BMK i starter kulture	Zona inhibicije	
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. aureus</i>
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 563 + <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> BGBU1-4	1 mm	-
	1,5 mm	-
	-	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 563	-	-
<i>Enterococcus durans</i> PFMI565 + <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> BGBU1-4	1,5 mm	-
	1 mm	-
	2 mm	-
<i>Enterococcus durans</i> PFMI565	2 mm	-
	2 mm	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 563 + <i>Enterococcus durans</i> PFMI565 + <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i> BGBU1-4	1,5 mm	-
	1 mm	-
	1,5 mm	-
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> 563 + <i>Enterococcus durans</i> PFMI565	1,5 mm	-
	1,5 mm	-

<sup>1</sup> komercijalna starter kultura CHN 11 CHR Hansen, Danska (*Lc.lactis* subsp. *cremoris*, *Lc.lactis* subsp. *lactis*, *Lc.lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, *Leuconostoc*)

Soj *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 pokazao je nešto slabiju antimikrobnu aktivnost prema *S. aureus*, dok u slučaju ostalih sojeva, nije dokazana inhibitorna aktivnost prema *S. aureus*.

Samostalno, soj *L. lactis* subsp. *lactis* 563 nije pokazao antilisterijsku aktivnost, dok u kombinaciji sa *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 jeste. Kombinacijom ova dva soja, postiže se dobra antimikrobna aktivnost, mada slabija nego u slučaju samostalne primene soja *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4. *L. lactis* subsp. *lactis* 563 smanjio je inhibitornu aktivnost cele kombinacije, budući da je, samostalno primenjen, neaktivan. U kombinaciji sa *E. durans* PFMI565, *L. lactis* subsp. *lactis* 563 je pokazao bolju aktivnost nego primenjen samostalno, usled uticaja antimikrobnih metabolita *E. durans* PFMI565, a takođe, uočena je bolja aktivnost soja *L. lactis* subsp. *lactis* 563 kada je primenjen u kombinaciji sa *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 i *E. durans* PFMI565.

Razlog za to bi mogla biti interaktivnost između sojeva, kao i njihovo međusobno inhibitorno delovanje. Kao rezultat kompleksnih interaktivnih odnosa među različitim sojevima BMK, može se javiti međusobno antimikrobno delovanje (Lozo et al., 2017) ili stimulatívno dejstvo jednog soja, na ispoljavanje bolje aktivnosti drugog, kao što je slučaj sa sojem *L. lactis* subsp. *lactis* 563.

*E. durans* PFMI565 pokazuje bolju antimikrobnu aktivnost primenjen samostalno, nego u kombinaciji sa *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4. Dobijeni rezultati testa nisu iznenađujući, s obzirom da bakteriocini pokazuju inhibitorno delovanje na blisko srodne vrste, a bakteriocinska aktivnost *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4, je dokazana ranijim istraživanjima (Mirković, 2016). Takođe je prikazano delovanje *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 na širok spektar Gram (+) bakterija (Lozo et al., 2017), što bi moglo biti jedno od objašnjenja smanjenja zone antilisterijskog delovanja kombinacije sojeva.

Samostalno, soj *L. lactis* subsp. *lactis* 563 nije ispoljio dejstvo prema patogenim bakterijama, niti je u kombinaciji sa druge dve autohtone kulture pokazao pozitivan uticaj na jačinu inhibicije i veličinu zone. Primenom soja *L. lactis* subsp. *lactis* 563, u kombinaciji sa ostalim sojevima, primećuje se smanjenje zone inhibitornog delovanja prema *L. monocytogenes*, kao rezultat njegove neaktivnosti. Iz tog razloga, ovaj soj isključen je iz daljeg istraživanja. Za nastavak istraživanja i primenu u proizvodnji sira, odabran je komercijalni starter CHN11, s obzirom da nije pokazao inhibitorno dejstvo prema patogenima, a najbolje inhibitorno delovanje prema listeriji pokazali su, samostalno primenjeni, sojevi *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 i *Enterococcus durans* PFMI565.

## 5.8 REZISTENCIJA NA ANTIBIOTIKE

Zone su merene nakon 24 i 72 h inkubacije (tabela 17). U oba merenja dobijeni su isti rezultati.

Tabela 17. Rezistencija/senzitivnost autohtonih sojeva BMK na antibiotike

Korišćeni antibiotici	<i>Enterococcus durans</i> PFMI565	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> BGBU1-4
Streptomycin	- <sup>r</sup>	16 <sup>s</sup>
Ampicillin	38 <sup>s</sup>	38 <sup>s</sup>
Gentamicin	8 <sup>r</sup>	25 <sup>s</sup>
Vancomycin	22 <sup>s</sup>	23 <sup>s</sup>
Tetracycline	34 <sup>s</sup>	40 <sup>s</sup>
Neomycin	12 <sup>r</sup>	22 <sup>s</sup>
Penicillin	30 <sup>s</sup>	40 <sup>s</sup>
Erythromycin	32 <sup>s</sup>	36 <sup>s</sup>
Chloramphenicol	28 <sup>s</sup>	36 <sup>s</sup>

<sup>s</sup> – senzitivnan soj na dejstvo antibiotika

<sup>r</sup> – rezistentan soj na dejstvo antibiotika

Izmeren ceo prečnik zone zajedno sa prečnikom antibiotika (6 mm). Vrednosti izražene u milimetrima.

Usled znatnog broja antibiotika koji se nalaze u upotrebi, dešava se da, i prirodno prisutni mikroorganizmi u okruženju, među koje spadaju i BMK, bivaju izloženi njihovom negativnom uticaju (Radulović i Mirković, 2016). Uglavnom se prenos gena rezistencije dešava *in vivo*, između bakterija koje nastanjuju gastrointestinalni trakt i drugih patogenih bakterija (Scott, 2002). Kontaktom sirovina animalnog porekla sa fekalnim onečišćenjima, omogućen je prenos gena rezistencije, sa eventualno prisutnih antibiotik-rezistentnih sojeva BMK u fekalnom materijalu, na finalne proizvode (Radulović i Mirković, 2016). Geni koji nose rezistenciju na vankomicin, tetraciklin, eritromicin detektovani su kod *Lactococcus lactis*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* sp. koji su izolovani iz fermentisanih mesnih proizvoda i mlečnih proizvoda (Mathur i Singh, 2005).

Testiranjem autohtonih sojeva BMK, utvrđeno je da je soj *E. durans* PFMI565 rezistentan na streptomycin i u manjoj meri na gentamicin i neomicin, dok je zona inhibicije, koja ukazuje na senzitivnost soja, uočena kod antibiotika, izuzetno značajnih u kliničkoj praksi: ampicilina, vankomicina, tetraciklina, penicilina, eritromicina i hloramfenikola (slika 8). Soj *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 nije pokazao rezistenciju ni na jedan antibiotik.



Slika 8. Zone senzitivnosti *E. durans* PFMI565 na vankomicin i tetraciklin

Slične rezultate istraživanja navode i drugi autori. Utvrđivanjem rezistencije na antibiotike u istraživanju koje su sproveli Amaral et al. (2017), sojevi *E. durans* SJRP14, SJRP17 i SJRP26 pokazali su senzitivnost na vankomicin, tetraciklin, eritromicin, penicilin i kanamicin.

Najčešći razlog rezistencije na ove antibiotike, generalno, posledica je posedovanja promenljivih genetičkih elemenata odgovornih za transmisiju determinanti rezistencije (Werner et al., 2013; Amaral et al., 2017). Činjenica je da enterokoke obično poseduju hromozomalno enkodirane enzime, koji su odgovorni za rezistenciju na aminoglikozide, među koje se ubrajaju neomicin, streptomycin i gentamicin, tako da bi prenos gena rezistencije bio gotovo nemoguć (Miller et al., 2014).

Na osnovu rezultata istraživanja, moglo bi se smatrati da prisustvo autohtonih sojeva *E. durans* PFMI565 i *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 u proizvodnji sira, kao starter ili dodatne kulture ne predstavlja rizik u smislu postojanja mogućnosti prenosa antibiotske rezistencije.

## 5.9 FERMENTACIJA MLEKA

Kako bi se ispitala aktivnost selekcionisanih sojeva za primenu u proizvodnji sireva, prethodno je utvrđena njihova aktivnost u mleku. Nakon fermentacije mleka pod delovanjem ispitivanih sojeva u različitim kombinacijama sa starter kulturom CHN11, utvrđena je sposobnost acidifikacije i vijabilnost ćelija nakon 24 h fermentacije (tabela 18). Fermentisana mleka su vizuelno opisana sa fokusom na izgled, konzistenciju gruša i miris.

Tabela 18. Rezultati primene autohtonih startera u fermentaciji mleka

Starteri	Udeo startera u ukupnoj zapremini	pH mleka nakon 24 h na 30 °C	Broj cfu/ml u mleku nakon 24 h na 30 °C
PFMI565:CHN11	1:1	4,80	$1,6 \times 10^{11}$
	1:3	4,70	$5 \times 10^{11}$
BGBU1-4:CHN11	1:1	4,33	$3 \times 10^{11}$
	1:3	4,20	$1 \times 10^{11}$
BGBU1-4:PFMI565:CHN11	1:1:2	4,30	$1,7 \times 10^{11}$

Ocenjivali su se efekti primene ispitivanih sojeva u kombinaciji sa komercijalnom starter kulturom CHN11, radi izbora varijante gde bi se ispitivane autohtone kulture koristile kao dodatne protektivne kulture. Za sve ispitivane varijante je utvrđeno da je postignuta dobra acidifikacija mleka, gde su sve vrednosti bile u intervalu 4,20 - 4,80. Kombinacija startera CHN11 i *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4, je pokazala bolju acidifikaciju u odnosu na kombinaciju sa *E. durans* PFMI565, što je i očekivano, s obzirom da je u tabeli 14 pokazano da soj BGBU1-4 ima bolju acidogenu sposobnost u odnosu na soj PFMI565. Utvrđeno je da je u kombinacijama sa većim udelom startera postignuta nešto niža pH vrednost, što govori o dobroj aktivnosti i acidogenoj sposobnosti startera, što je takođe bilo očekivano. Rezultati vijabilnosti ćelija svih kultura tokom fermentacije mleka, govore o veoma izraženoj aktivnosti. Broj od  $10^{11}$  cfu/ml potvrđuje da se moglo očekivati značajno sniženje pH vrednosti, koje su i zabeležene, tako da se generalno može reći da su u svim varijantama postignuti veoma visoki brojevi prisutnih ćelija, zahvaljujući čemu su ostvarene i veoma dobre acidifikacije mleka.

Prilikom primene *E. durans* PFMI565 sa CHN11 izgled gruš, kod varijante sa jednakom zapreminskom zastupljenošću kultura, bio je kompaktna, a surutka svetlo žućkasta. Broj ćelija nakon 24 h bio je približan u obe kombinacije kultura, dok je pH vrednost varijante mleka sa primenjenom jednakom koncentracijom kultura, bila nešto viša. U kombinaciji sa većom zastupljenošću CHN11 (PFMI565:CHN11 = 1:3), ukus je bio neprijatan i bljutav, pa je za dalja ispitivanja izabrana varijanta sa jednakim udelima *E. durans* PFMI565 i CHN11.

Sličan ukus je primećen i kod varijante u kojoj primenjena veća zastupljenost komercijalnog startera u kombinaciji sa *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4, pa je i ta varijanta mešavine kultura odbačena. Najbolja senzorna ocena gruš primećena je u slučaju primene varijante obe autohtone kulture u kombinaciji sa komercijalnim starterom.

Na osnovu senzornih karakteristika, izgleda gruš i finalnog broja koka, za dalji tok istraživanja i primenu u siru izabrane su kombinacije:

- PFMI565:CHN11 – 1:1
- BGBU14:CHN11 – 1:1
- BGBU14:PFMI565:CHN11 – 1:1:2

## 5.10 ISPITIVANJE ANTILISTERIJSKOG EFEKTA ODABRANIH SOJEVA U HRANI

Na osnovu rezultata preliminarnih ispitivanja antimikrobne aktivnosti i odsustva uticaja soja *L. lactis* subsp. *lactis* 563 na krajnji rezultat, u sledeće faze istraživanja i primenu na proizvodima, uključeni su autohtoni sojevi *E. durans* PFMI565 i *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4, a za primenu u proizvodnji sira, izabrana je komercijalna starter kultura CHN11 (Chr. Hansen, Danska). Kombinacija autohtonih sojeva *E. durans* PFMI565 i *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4, kao startera, nije primenjena iz razloga prikazane slabe acidogene aktivnosti sojeva u prvih 6 h (tabela 14).

### 5.10.1 Model sira

S obzirom da su sojevi *E. durans* PFMI565 i *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 izolovani iz tradicionalnih sireva sa teritorije Republike Srbije, karakterišu ih specifični uslovi preživljavanja određeni karakteristikama podneblja. Radi eventualne primene selektovanih sojeva u industrijskoj proizvodnji hrane, neophodno je ispitati sposobnost njihovog preživljavanja u siru, uz uticaj na potencijalno prisutne patogene mikroorganizme.

Kao polazna osnova za utvrđivanje inhibitornog dejstva selektovanih sojeva BMK na rast *L. monocytogenes*, primenjen je model sira. Praćenje broja *L. monocytogenes* sprovedeno je 0. dana - po inokulaciji, 7., 14., 21. i 35. dana u fazi skladištenja na temperaturi od 4 – 5 °C.

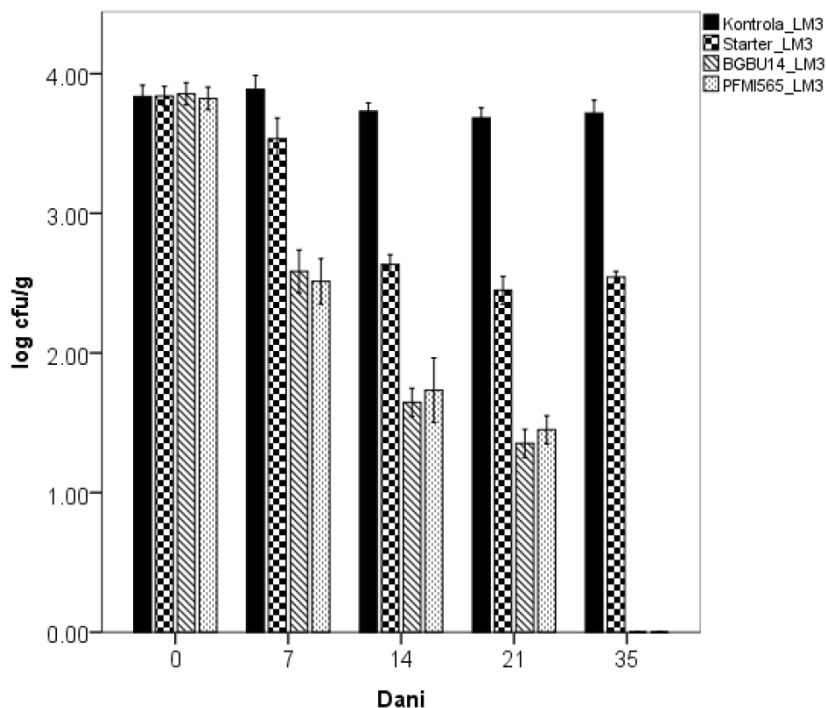
Prikaz rezultata praćenja broja *L. monocytogenes* ATCC19111 (dodate u broju  $10^3$  cfu/g), kao i uticaj sojeva *E. durans* PFMI565, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 i CHN11, dodatih u broju  $10^7$  cfu/g, u različitim varijantama modela sira kroz vreme, dat je tabelarno (tabela 19):

Tabela 19. Promena broja *L. monocytogenes* početnog broja ćelija  $10^3$  (cfu/g) u modelu sira tokom 35 dana skladištenja

Uzorak	0. dan	7. dan	14. dan	21. dan	35. dan
LM3	$6,89 \times 10^3 \pm 0,65$	$7,76 \times 10^3 \pm 0,91$	$5,39 \times 10^3 \pm 0,37$	$4,85 \times 10^3 \pm 0,39$	$5,24 \times 10^3 \pm 0,57$
CHN11_LM3	$6,93 \times 10^3 \pm 0,54$	$3,46 \times 10^3 \pm 0,57$	$4,32 \times 10^2 \pm 0,35$	$2,82 \times 10^2 \pm 0,33$	$3,50 \times 10^2 \pm 0,17$
BGBU14_LM3	$7,20 \times 10^3 \pm 0,64$	$3,88 \times 10^2 \pm 0,66$	$4,45 \times 10^1 \pm 0,52$	$2,26 \times 10^1 \pm 0,26$	$0,00 \pm 0,00$
PFMI565_LM3	$6,68 \times 10^3 \pm 0,64$	$3,30 \times 10^2 \pm 0,63$	$5,53 \times 10^1 \pm 0,13$	$2,83 \times 10^1 \pm 0,32$	$0,00 \pm 0,00$

srednja vrednost broja ćelija (cfu/g)  $\pm$  standardna devijacija

Značajan pad broja *L. monocytogenes* u model sistemu sira uočen je 7. dana kod varijanti sa BGBU1-4<sub>rif</sub> i PFMI565<sub>str</sub>, dok je u kontrolnoj varijanti zabeležen porast broja ćelija. Najveći pad broja ćelija *L. monocytogenes* do kraja eksperimentalnog perioda je bio u varijantama sa primenjenim autohtonim BMK, tako da prisustvo *L. monocytogenes* nije bilo moguće detektovati, dok se, u varijanti sa komercijalnom starter kulturom, beleži pad od jedne logaritamske jedinice do kraja eksperimentalnog perioda (grafikon 4).



Grafikon 4. Logaritam broja ćelija *L. monocytogenes* početne koncentracije  $10^3$  (cfu/g) tokom perioda skladištenja

Obradom podataka konstatovana je statistički značajna razlika ( $p \leq 05$ ) između varijanti modela sa primenjenim autohtonim sojevima u odnosu na kontrolnu varijantu, kao i varijantu sa aplikovanim komercijalnim starterom. Postoji statistički značajna razlika unutar svake varijante tokom perioda skladištenja, međutim, trend smanjenja broja ćelija *L. monocytogenes* je najizraženiji u varijantama sa dodatkom PFMI565<sub>str</sub> i BGBU14<sub>rif</sub> (grafikon 4).

Treba naglasiti da su do 14. dana autohtone BMK postigle sniženje prisustva *L. monocytogenes* ispod nivoa od 100 cfu/g, koliko je propisano Kriterijumima bezbednosti hrane Pravilnika o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa ("Sl. gl. RS", br. 72/2010, 62/2018), da bi se do kraja eksperimenta potpuno izgubilo prisustvo *L. monocytogenes*, što govori o veoma dobroj antilisterijskoj aktivnosti ispitivanih autohtonih sojeva BMK. Ovi rezultati su bili veoma ohrabrujući, ukazujući da se u sredinama kontaminiranim sa  $10^3$  cfu/g *L. monocytogenes*, u kojima su primenjeni autohtoni sojevi, posle 14 dana čuvanja, može očekivati proizvod koji bi zadovoljio Kriterijume bezbednosti hrane.

Varijante modela sira sa inokulisanom *L. monocytogenes* u broju  $10^4$  ćelija/g karakterišu slični rezultati preživljavanja ovog patogena (tabela 20). *L. monocytogenes* se u kontrolnoj varijanti modela sira održavala na nivou 4 logaritamske jedinice kroz period praćenja preživljavanja, dok u varijanti sa primenjenom komercijalnom starter kulturom, broj ćelija *L. monocytogenes* se smanjuje za 1 logaritamsku jedinicu u 14. danu, i na tom nivou ostaje do kraja perioda praćenja.

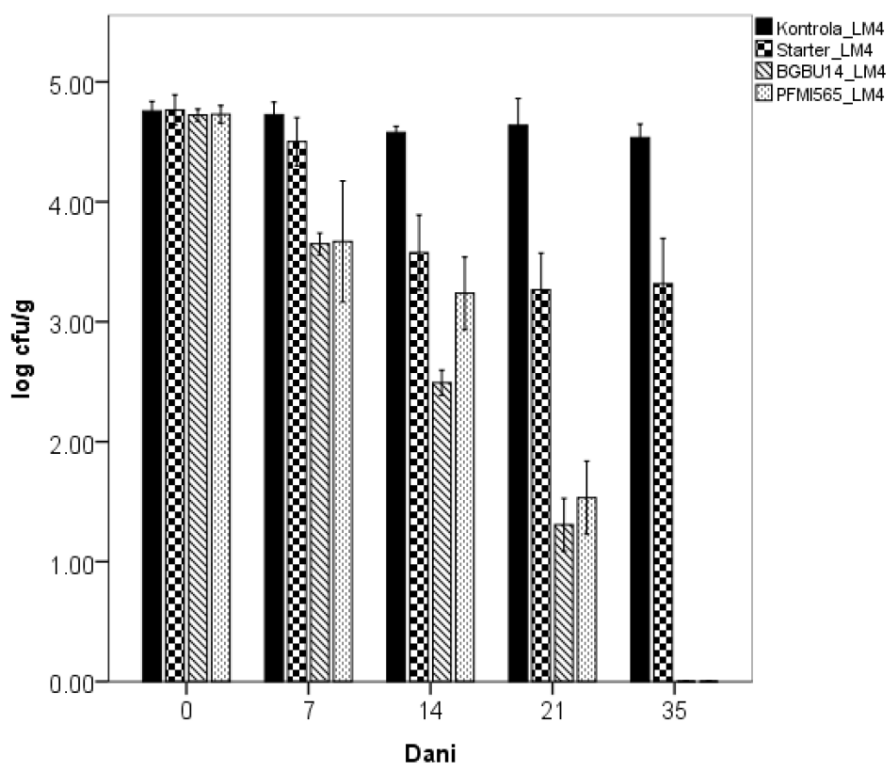
Tabela 20. Promena broja *L. monocytogenes* početnog broja ćelija  $10^4$  (cfu/g) u modelu sira tokom 35 dana skladištenja

Uzorak	0. dan	7. dan	14. dan	21. dan	35. dan
LM4	$5,73 \times 10^4 \pm 0,54$	$5,34 \times 10^4 \pm 0,66$	$3,79 \times 10^4 \pm 0,22$	$4,44 \times 10^4 \pm 0,12$	$3,45 \times 10^4 \pm 0,46$
CHN11_LM4	$5,87 \times 10^4 \pm 0,84$	$3,23 \times 10^4 \pm 0,73$	$3,92 \times 10^3 \pm 0,13$	$1,92 \times 10^3 \pm 0,63$	$2,20 \times 10^3 \pm 0,83$
BGBU14_LM4	$5,29 \times 10^4 \pm 0,31$	$4,48 \times 10^3 \pm 0,46$	$3,12 \times 10^2 \pm 0,38$	$2,07 \times 10^1 \pm 0,53$	$0,00 \pm 0,00$
PFMI565_LM4	$5,38 \times 10^4 \pm 0,46$	$5,19 \times 10^3 \pm 0,27$	$1,80 \times 10^3 \pm 0,64$	$3,56 \times 10^1 \pm 0,13$	$0,00 \pm 0,00$

srednja vrednost broja ćelija (cfu/g)  $\pm$  standardna devijacija

Što se tiče varijanti sa autohtonim sojevima BMK, najbolje antilisterijsko dejstvo pokazala je *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4<sub>rif</sub>, čijom se primenom u uzorcima beleži pad od jedne logaritamske jedinice na nedeljnom nivou. U poslednjoj tački praćenja, broj *L. monocytogenes* nije bio na nivou detektabilnosti u uzorcima sa primenjenim autohtonim sojevima *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4<sub>rif</sub> i *E. durans* PFMI565<sub>str</sub> (grafikon 5). Interesantno je zapaziti da, iako u 14. danu postoji različito dejstvo između autohtonih sojeva, pa se broj prisutne *L. monocytogenes* razlikuje za 1 log, u 21. danu dejstvo autohtonih sojeva se izjednačilo na red veličine  $10^1$  cfu/g, što je niže od nivoa koji propisuju Kriterijumi bezbednosti hrane ("Sl. gl. RS", br. 72/2010, 62/2018). Statističkom analizom podataka, konstatovana je statistički značajna razlika između uzoraka sa primenjenim autohtonim sojevima i kontrolnog

uzorka, kao i uzorka u kom je kao starter kultura korišćena komercijalna starter kultura CHN11 ( $p \leq 0,05$ ).



Grafikon 5. Logaritam broja ćelija *L. monocytogenes* početne koncentracije  $10^4$  (cfu/g) tokom perioda skladištenja

Ovakvi rezultati su u saglasnosti sa istraživanjima drugih autora. El-Gazzar et al. (1992) navode antilisterijsko delovanje BMK u obranom mleku i produktima ultrafiltracije mleka. Takođe, antimikrobno delovanje prema *L. monocytogenes* pokazali su bakteriocinogeni sojevi u toku perioda skladištenja sira (Coelho et al., 2014), kao i produkti metabolizma enterokoka proteinske prirode (Khay et al., 2014; Dillon, 2014). Protektivna uloga određenih sojeva BMK u toku skladištenja je od izuzetnog značaja, imajući u vidu preživljavanje i rast *L. monocytogenes* na temperaturi rashlađivanja u toku skladištenja.

Iz prikazanih rezultata u Tabeli 21. koji se odnose na uzorke modela sira sa najvećom koncentracijom *L. monocytogenes*, uočljiv je pad broja ovog patogena u 7. danu delovanjem *E. durans* PFMI565<sub>str</sub> za jednu logaritamsku jedinicu. U 21. danu, zabeležen je najveći pad broja *L. monocytogenes* u varijantama sa autohtonim BMK, pri čemu su oba ispitivana soja postigla snižavanje broja listerije na nivo od  $10^1$  cfu/g. U ovom danu, autohtoni sojevi su postigli drastično snižavanje listerije od 4,21 logaritamskih jedinica u odnosu na početni broj, za *E. durans* PFMI565<sub>str</sub> i 3,89 log za BGBU1-4<sub>rif</sub>, da bi u poslednjoj tački praćenja smanjenje bilo još veće i iznosilo 4,74, odnosno 4,56 logaritamske jedinice, respektivno. Statistički značajan pad, konstatovan je kod obe varijante.

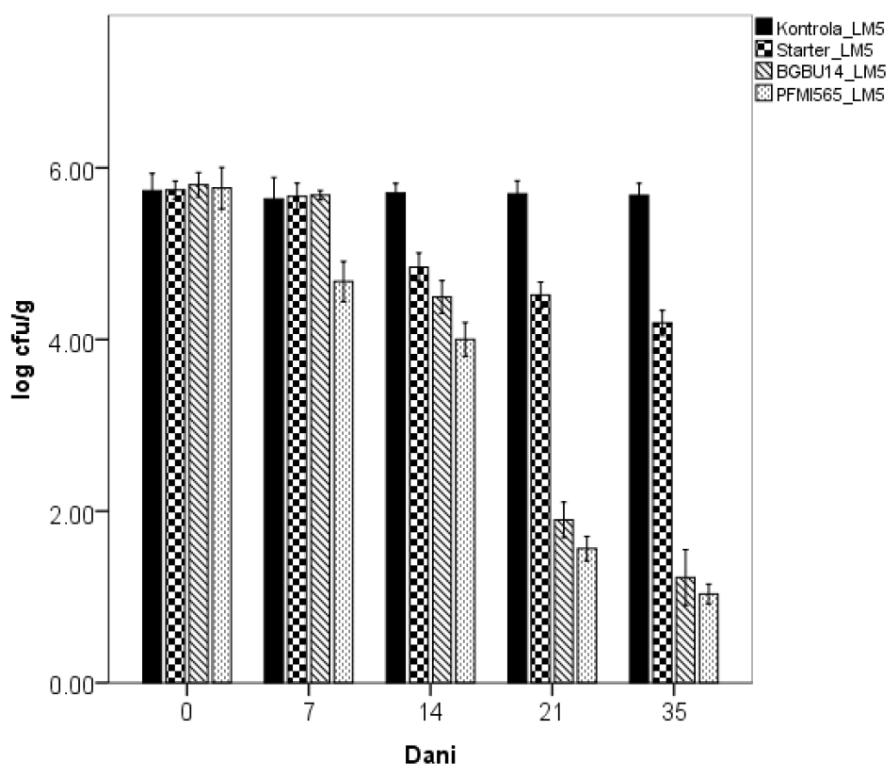
Poredeći ove rezultate sa prethodnim, kada je dodato  $10^4$  cfu/g *L. monocytogenes*, zapaža se da, iako je broj *L. monocytogenes* u inokulumu bio 10 puta veći, autohtoni sojevi su, takođe, u 21. danu pokazali značajno snižavanje broja listerije i u istom vremenskom intervalu je doveli na isti nivo od  $10^1$  tj. manji od 100 cfu/g. Takođe je zapaženo da u varijantama sa dodatim  $10^3$  i  $10^4$  cfu/g *L. monocytogenes*, u 35. danu nije bilo prisustva ovog patogena, a u varijanti sa najvećom

koncentracijom listerije ( $10^5$  cfu/g), broj ćelija patogena se na kraju praćenja održao na nivou od  $10^1$  cfu/g.

Tabela 21. Promena broja *L. monocytogenes* početnog broja ćelija  $10^5$  (cfu/g) u modelu sira tokom 35 dana skladištenja

Uzorak	0. dan	7. dan	14. dan	21. dan	35. dan
LM5	$5,49 \times 10^5 \pm 1,33$	$4,44 \times 10^5 \pm 1,22$	$5,10 \times 10^5 \pm 0,69$	$5,04 \times 10^5 \pm 0,86$	$4,83 \times 10^5 \pm 0,73$
CHN11_LM5	$5,54 \times 10^5 \pm 0,68$	$4,70 \times 10^5 \pm 0,86$	$7,04 \times 10^4 \pm 1,27$	$3,32 \times 10^4 \pm 0,06$	$1,58 \times 10^4 \pm 0,26$
BGBU14_LM5	$6,39 \times 10^5 \pm 0,99$	$4,81 \times 10^5 \pm 0,29$	$3,19 \times 10^4 \pm 0,07$	$8,06 \times 10^1 \pm 1,89$	$1,77 \times 10^1 \pm 0,67$
PFMI565_LM5	$5,94 \times 10^5 \pm 1,62$	$4,86 \times 10^4 \pm 1,33$	$1,02 \times 10^4 \pm 0,23$	$3,69 \times 10^1 \pm 0,61$	$1,09 \times 10^1 \pm 0,15$

srednja vrednost broja ćelija (cfu/g)  $\pm$  standardna devijacija



Grafikon 6. Logaritam broja ćelija *L. monocytogenes* početne koncentracije  $10^5$  (cfu/g) tokom perioda skladištenja

Generalno se može reći da su autohtoni sojevi BMK pokazali veoma izraženo antilisterijsko dejstvo u modelu sira. U nultom danu ne postoji statistički značajna razlika između uzoraka, što je rezultat koji je očekivan i pokazatelj je pravilno postavljenog ogleda. U sve tri varijante uočena je statistički značajna razlika ( $p \leq 0,05$ ) kod efekta interakcije faktora dana i tretmana, gde efekat dana zavisi od



broja dodatih ćelija *L. monocytogenes*, pri čemu je najbolje i najbrže dejstvo postignuto pri najnižoj koncentraciji inokulisane listerije, što je i očekivano.

#### 5.10.2 Rezultati praćenja antilisterijskog dejstva BMK u uslovima proizvodnje sira od UF mleka

Inhibitorna aktivnost selektovanih sojeva BMK PFMI565<sub>str</sub> i BGBU1-4<sub>rif</sub> prema *L. monocytogenes* ispitivana je u procesu proizvodnje sira od ultrafiltriranog mleka. Ultrafiltracija predstavlja proces u kom se vrši koncentrisanje mleka za proizvodnju različitih vrsta sireva (El-Gazzar et al., 1992). Primenom ovog postupka postižu se bolji rezultati grušanja mleka (Catarino et al., 2013). Praćenje antimikrobne aktivnosti selektovanih sojeva u uzorcima sira vršeno je tokom 35 dana skladištenja proizvoda. Iz rezultata prikazanih u Tabeli 22. uočava se smanjenje broja *L. monocytogenes* u 7. danu, dok je značajan pad broja ćelija patogena zabeležen je u 14. danu u uzorcima sa autohtonim sojevima PFMI565<sub>str</sub> i BGBU1-4<sub>rif</sub>. Najbolji rezultati, u odnosu na kontrolni sir, zabeleženi su 14. dana u uzorcima sa primenjenom kombinacijom autohtonih sojeva, što je u saglasnosti sa rezultatima ispitivanja antilisterijske aktivnosti u modelu sira. pH vrednost kontrolnih sireva sa primenjenom mešavinom autohtonih sojeva, u periodu 7 - 14. dana, karakteriše konstantnost (tabela 25), na osnovu čega bi se moglo očekivati da antilisterijska aktivnost nije isključivo posledica produkcije organskih kiselina, već i ostalih antimikrobnih produkata metabolizma.

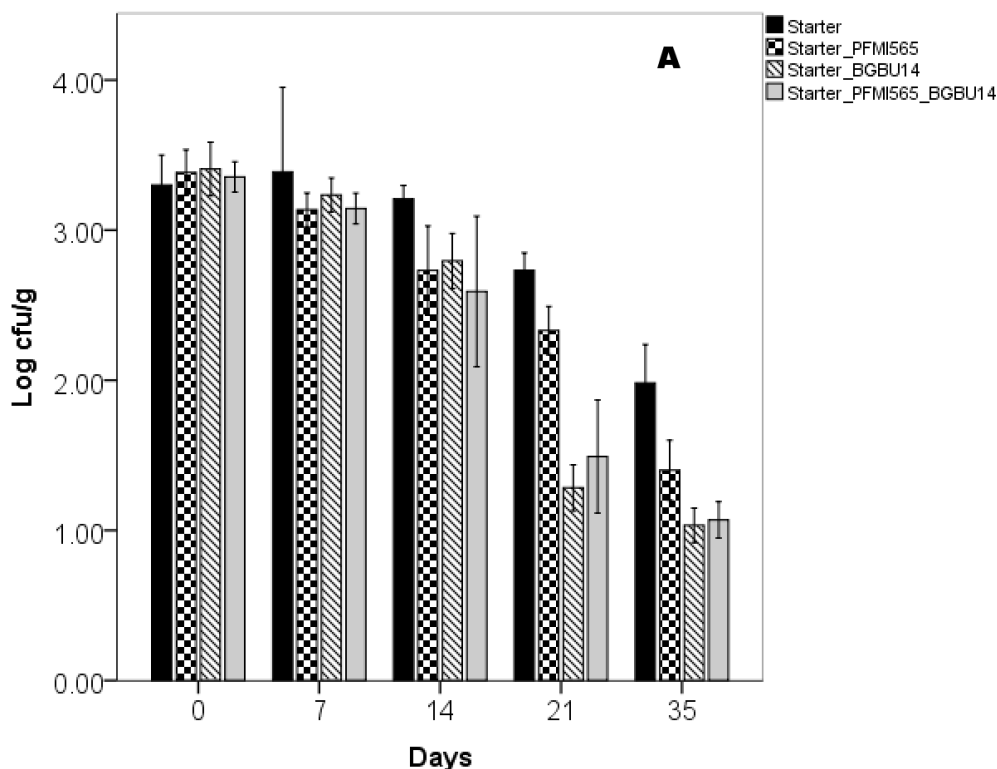
Tabela 22. Promena broja *L. monocytogenes* početnog broja ćelija  $10^3$  (cfu/g) u siru od UF mleka tokom 35 dana skladištenja

Uzorak	0. dan	7. dan	14. dan	21. dan	35. dan
CHN11	$2,03 \times 10^3 \pm 0,46$	$2,78 \times 10^3 \pm 1,67$	$1,62 \times 10^3 \pm 0,17$	$5,44 \times 10^2 \pm 0,75$	$9,89 \times 10^1 \pm 2,76$
CHN11_PFMI565	$2,44 \times 10^3 \pm 0,42$	$1,38 \times 10^3 \pm 1,80$	$5,59 \times 10^2 \pm 1,95$	$2,16 \times 10^2 \pm 0,39$	$2,56 \times 10^1 \pm 0,58$
CHN11_BGBU14	$2,59 \times 10^3 \pm 0,54$	$1,72 \times 10^3 \pm 0,24$	$6,30 \times 10^2 \pm 1,29$	$1,94 \times 10^1 \pm 3,30$	$1,09 \times 10^1 \pm 0,15$
CHN11_PFMI565 _BGBU14	$2,27 \times 10^3 \pm 0,26$	$1,40 \times 10^3 \pm 0,17$	$4,42 \times 10^2 \pm 2,76$	$3,31 \times 10^1 \pm 1,40$	$1,18 \times 10^1 \pm 0,16$

srednja vrednost broja ćelija (cfu/g)  $\pm$  standardna devijacija

Trend opadanja broja ćelija *L. monocytogenes* u svim uzorcima nastavljen je do kraja perioda praćenja. 21. dana, soj *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4<sub>rif</sub> pokazao je najbolje dejstvo sa padom broja ćelija listerije za 2,96 logaritamskih jedinica, čime je postignuta vrednost manja od  $10^1$  cfu/g, koju propisuje Kriterijum bezbednosti hrane. U varijanti sa primenjenom mešavinom autohtonih BMK, takođe dolazi do pada broja *L. monocytogenes* na zakonodavno prihvatljivu vrednost, što je za 1 log niže nego u varijanti sira sa PFMI565<sub>str</sub>. Ovakav rezultat se može pripisati delovanju bakteriocin-produkujućeg soja BGBU1-4<sub>rif</sub>, za koji je u ranijim istraživanjima potvrđena antimikrobna aktivnost bakteriocina (Mirković 2016, 2020), s obzirom da PFMI565<sub>str</sub> samostalno primenjen, nije pokazao tako izraženo dejstvo. 35. dan karakteriše pad broja ćelija listerije u svim uzorcima, što je i očekivano. Najveći pad i dalje je karakterističan za uzorak sa primenjenom *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4<sub>rif</sub> (grafikon 7). Poređenjem

rezultata sa rezultatima antilisterijske aktivnosti autohtonih sojeva BMK u modelu sira, uočava se nešto sporije delovanje PFMI565<sub>str</sub> i BGBU1-4<sub>rif</sub> u siru od UF mleka. U modelu sira, vrednost od 10<sup>1</sup> cfu/g je postignuta u 14. danu, dok je u siru od UF mleka ista vrednost zabeležena 21. dana. Iako bolji, rezultati antilisterijske aktivnosti u modelu sira su nerealniji, s obzirom da je praćeno delovanje autohtonih sojeva BMK u sterilnim uslovima, dok je u siru od UF mleka, uz delovanje PFMI565<sub>str</sub> i BGBU1-4<sub>rif</sub>, prisutno i delovanje ostalih mikroorganizama iz matriksa.



Grafikon 7. Logaritam broja ćelija *L. monocytogenes* početne koncentracije 10<sup>3</sup> (cfu/g) u siru od UF mleka tokom perioda skladištenja

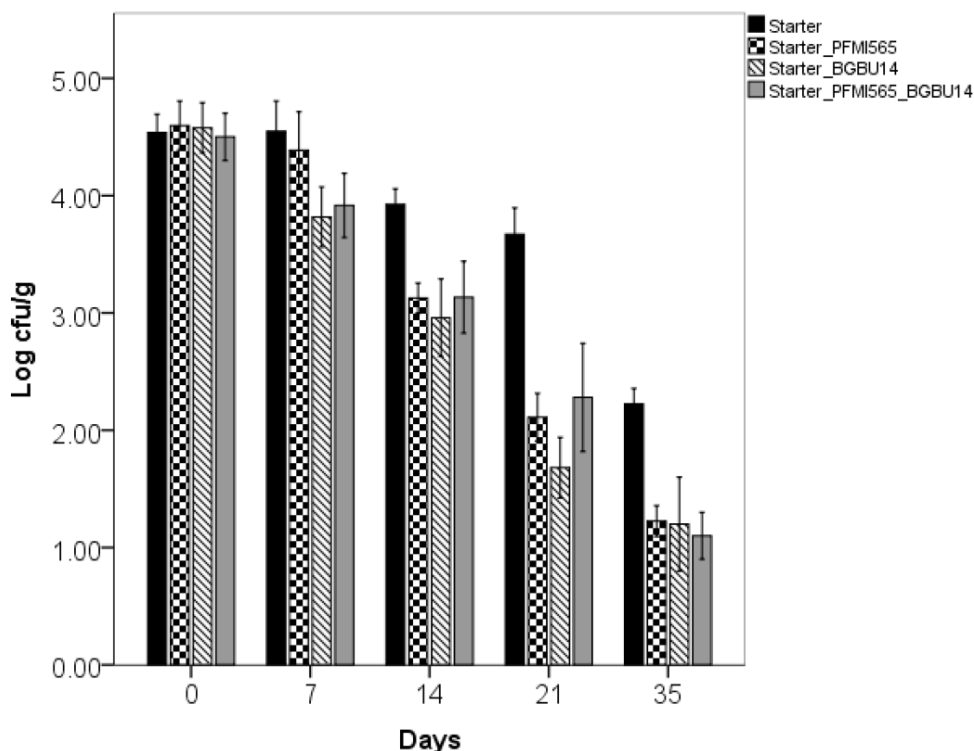
Varijante sireva sa *L. monocytogenes* inokulisanom u koncentraciji 10<sup>4</sup> karakteriše slična antimikrobna aktivnost kao u prethodno opisanim varijantama sireva od UF mleka. Delovanjem autohtonih sojeva BMK postignuto je sniženje u broju patogenih ćelija *L. monocytogenes*. Statistički značajnih razlika u 0. danu nije bilo, dok su statistički značajne razlike dokazane po danima i u odnosu na kontrolni sir ( $p \leq 0,05$ ). Najbolje inhibitorno dejstvo prema *L. monocytogenes* i dalje pokazuje BGBU1-4<sub>rif</sub>, gde se u 7. danu beleži pad od 0,77 logaritamskih jedinica (grafikon 8). Kombinacija autohtonih BMK pokazala je bolju antimikrobnu aktivnost u odnosu na varijantu sa komercijalnom starter kulturom i varijantu sa PFMI565<sub>str</sub>. Uzorak sa *E. durans* PFMI565<sub>str</sub> beleži značajniji pad 14. dana, snižavanjem broja ćelija listerije za 1 log. Najbolji rezultat, 14. dana praćenja, za 1 logaritamsku jedinicu niži od ostalih uzoraka, beleži BGBU1-4<sub>rif</sub>, koji u 21. danu snižava broj patogenih ćelija listerije na 10<sup>1</sup> cfu/g, što je za 1 log bolje u odnosu na ostale uzorke sa autohtonim sojevima BMK, što se podudara sa rezultatima njegove antilisterijske aktivnosti u modelu sira, i 2 logaritamske jedinice bolje u odnosu na sir sa komercijalnom starter kulturom. Do kraja eksperimentalnog perioda, u svim uzorcima sa autohtonim sojevima BMK, njihovim antilisterijski delovanjem, snižen je broj ćelija listerije do zakonski prihvatljive vrednosti (10<sup>2</sup> cfu/g), za razliku od modela sira, gde 35. dana, broj ćelija listerije nije bio na nivou detektabilnosti.

Tabela 23. Promena broja *L. monocytogenes* početnog broja ćelija  $10^4$  (cfu/g) u siru od UF mleka tokom 35 dana skladištenja

Uzorak	0. dan	7. dan	14. dan	21. dan	35. dan
CHN11	$3,48 \times 10^4 \pm 0,60$	$3,63 \times 10^4 \pm 1,11$	$8,51 \times 10^3 \pm 1,30$	$4,79 \times 10^3 \pm 1,32$	$1,70 \times 10^2 \pm 0,26$
CHN11_PFMI565	$4,03 \times 10^4 \pm 0,96$	$2,54 \times 10^4 \pm 0,84$	$1,35 \times 10^3 \pm 0,21$	$1,31 \times 10^2 \pm 0,29$	$1,70 \times 10^1 \pm 0,26$
CHN11_BGBU14	$3,85 \times 10^4 \pm 1,01$	$6,74 \times 10^3 \pm 1,99$	$9,54 \times 10^2 \pm 3,31$	$4,93 \times 10^1 \pm 1,42$	$1,70 \times 10^1 \pm 0,76$
CHN11_PFMI565_ BGBU14	$3,22 \times 10^4 \pm 0,74$	$8,55 \times 10^3 \pm 2,84$	$1,42 \times 10^3 \pm 0,52$	$2,10 \times 10^2 \pm 1,19$	$1,28 \times 10^1 \pm 0,29$

srednja vrednost broja ćelija (cfu/g)  $\pm$  standardna devijacija

Ovakvi rezultati istraživanja u saglasnosti su sa rezultatima drugih autora. Scatassa et al. (2017) opisuju antilisterijsko dejstvo mešavine BMK u tradicionalnim sicilijanskim sirevima *Pecorino* i *Vastedda della valle del Belice*, gde je nakon 15 dana od početne koncentracije  $10^4$  cfu/g *L. monocytogenes*, broj smanjen za 3 log u slučaju sira *Pecorino*, dok u siru *Vastedda della valle del Belice* broj patogena nije bio detektabilan.



Grafikon 8. Logaritam broja ćelija *L. monocytogenes* početne koncentracije  $10^4$  (cfu/g) u siru od UF mleka tokom perioda skladištenja

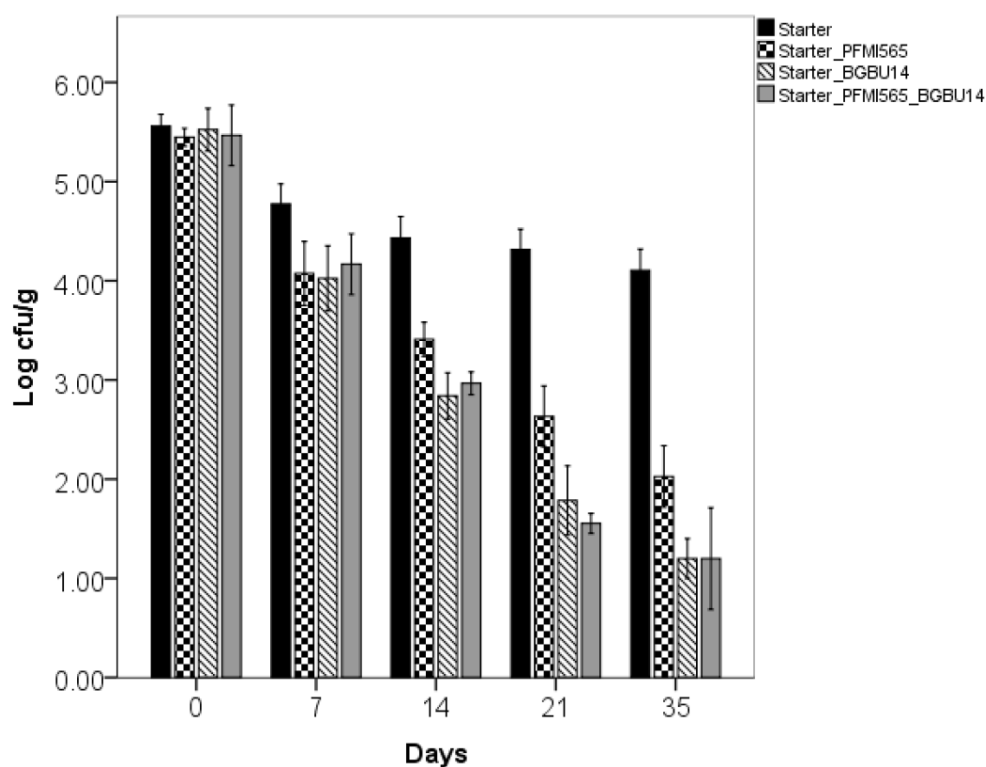
Analizirajući rezultate antilisterijske aktivnosti BMK u varijantama sireva sa *L. monocytogenes* u koncentraciji  $10^5$ , uočava se pad broja patogena za 1 log u 7. danu u svim uzorcima (tabela 24).

Trend smanjenja broja patogenih ćelija se nastavlja u varijantama sa autohtonim sojevima, dok se najznačajniji pad uočava u 14. danu za 2,68 logaritamskih jedinica, u varijanti sira koji je inokulisan sa bakteriocin-produkujućom kulturom BGBU1-4<sub>rif</sub>, a neznatno lošije antilisterijsko dejstvo pokazuje mešavina autohtonih izolata. Zabeležena je slabija antilisterijska aktivnost PFMI565<sub>str</sub> u odnosu na varijante BGBU1-4<sub>rif</sub> i BGBU1-4<sub>rif</sub>\_PFMI565<sub>str</sub>, što ukazuje na stimulatívno delovanje sojeva u kombinaciji. 21. dana praćenja, u uzorcima sa inokulisanim BGBU1-4<sub>rif</sub> i BGBU1-4<sub>rif</sub>\_PFMI565<sub>str</sub>, broj listerije snižen je do 10<sup>1</sup> cfu/g, dok je u varijanti sa PFMI565<sub>str</sub> zabeleženo 10<sup>2</sup> cfu/g. Broj ćelija *L. monocytogenes* se nakon 35. dana skladištenja, u varijantama sa autohtonim sojevima, kretao u vrednostima 1,20 - 2,03 log, dok je u kontrolnoj varijanti zabeležena vrednost 4,10 log. Analizirajući detaljnije, može se zaključiti da se delovanjem autohtonih sojeva BGBU1-4<sub>rif</sub> i PFMI565<sub>str</sub>, postiže dobra antilisterijska aktivnost u siru od UF mleka, a najbolje delovanje pokazao je soj BGBU1-4<sub>rif</sub> u uzorcima sa početnim brojem listerije 10<sup>3</sup> cfu/g.

Tabela 24. Promena broja *L. monocytogenes* početnog broja ćelija 10<sup>5</sup> (cfu/g) u siru od UF mleka tokom 35 dana skladištenja

Uzorak	0. dan	7. dan	14. dan	21. dan	35. dan
CHN11	3,65x10 <sup>5</sup> ±0,50	6,04x10 <sup>4</sup> ±1,36	2,75x10 <sup>4</sup> ±0,71	2,11x10 <sup>4</sup> ±0,48	1,29x10 <sup>4</sup> ±0,31
CHN11_PFMI 565	2,81x10 <sup>5</sup> ±0,29	1,24x10 <sup>4</sup> ±0,43	2,60x10 <sup>3</sup> ±0,52	4,48x10 <sup>2</sup> ±1,63	1,11x10 <sup>2</sup> ±0,42
CHN11_BGB U14	3,40x10 <sup>5</sup> ±0,78	1,11x10 <sup>4</sup> ±0,43	7,08x10 <sup>2</sup> ±1,83	6,40x10 <sup>1</sup> ±2,47	1,61x10 <sup>1</sup> ±0,37
CHN11_PFMI 565_BGBU14	3,05x10 <sup>5</sup> ±0,99	1,53x10 <sup>4</sup> ±0,50	9,31x10 <sup>2</sup> ±1,19	3,59x10 <sup>1</sup> ±0,41	1,79x10 <sup>1</sup> ±1,13

srednja vrednost broja ćelija (cfu/g) ± standardna devijacija



Grafikon 9. Logaritam broja ćelija *L. monocytogenes* početne koncentracije  $10^5$  (cfu/g) u siru od UF mleka tokom perioda skladištenja

El-Gazzar et al. (1992) su pratili rast *L. monocytogenes* u retentatu nakon ultrafiltracije mleka, permeatu i nefiltriranom obranom mleku u prisustvu mezofilnih BMK. BMK su pokazale bolji rast u retentatu, nego u permeatu i obranom mleku, uz evidentan uticaj na smanjenje broja kolonija *L. monocytogenes*. Bolji rast BMK u retentatu zabeležen je i kod drugih autora (Radulović et al., 2000). Pretpostavlja se da veći puferski kapacitet retentata, koji nastaje usled povećanog sadržaja proteina i nerastvorljivih soli kalcijuma i fosfora (Radulović et al., 2000), uslovljava veću inaktivaciju patogena u permeatu, nego u retentatu i obranom mleku. Upravo iz tog razloga, najbitniji je pravilan odabir sojeva BMK, gde je dobro acidogeno dejstvo jedan od uslova za njegovu bolju aktivnost.

Posebna pažnja u proizvodnji sira se mora posvetiti sprovođenju higijenskih mera i kontroli u toku procesa proizvodnje, da bi se izbegla kontaminacija proizvoda, naročito u slučaju proizvodnje sireva od UF mleka (El-Gazzar et al., 1992). U mnogim zemljama na snazi je nulta tolerancija na prisustvo *L. monocytogenes* u hrani (Gao et al., 2019). Iako znatno niži od inicijalnog, broj kolonija ovog patogena, u našem istraživanju, do kraja perioda praćenja, bio je u nivou detektabilnosti. Moguć razlog za to predstavlja smanjenje funkcionalnosti bakteriocina, pod uticajem proteolitičkih enzima iz hrane (Abdollahzadeh et al., 2014). Zakonodavstvo Republike Srbije u hrani spremnoj za konzumiranje koja podržava rast *L. monocytogenes* u roku trajanja, propisuje broj od 100 cfu/g (Ministarstvo poljoprivrede, trgovine, šumarstva i vodoprivrede, 2011), što ukazuje na to da su vrednosti našeg istraživanja zadovoljavajuće. Zahvaljujući pokazanim dobrim rezultatima kontrole i uticaja na smanjenje broja *L. monocytogenes*, primena autohtonih sojeva BMK iz našeg istraživanja u industrijskoj proizvodnji sira, kao protektivnih kultura, uz dopunska istraživanja i primenu kontrolnih mehanizama, mogla bi osigurati bezbednost hrane tokom njenog roka trajanja.

### 5.10.2.1 pH sira od UF mleka u toku skladištenja

Usled biohemijskih procesa koji se dešavaju tokom zrenja sira, dolazi do promene njegove pH vrednosti (tabela 25). Karakteristika bakterija mlečne kiseline je proizvodnja mlečne i drugih organskih kiselina, koje snižavaju pH proizvoda. Akumulacijom organskih kiselina, po procesu proizvodnje, pH surutke je 4,5 - 5,3, čime je onemogućen opstanak acido-netolerantnih vrsta (Beresford et al., 2001). U našem istraživanju, tokom posmatranog perioda zrenja sira, pH vrednost se uglavnom zadržavala u okviru pH vrednosti koje podržavaju rast *L. monocytogenes*. Najniža vrednost zapažena je u varijanti sira sa sojem BGBU1-4<sub>rif</sub> 21. dana skladištenja. Takođe, najmanja kolebanja vrednosti zapažena su u siru nastalom primenom kombinacije ova dva soja sa komercijalnim starterom.

Tabela 25. Promene pH vrednosti sira od UF mleka tokom skladištenja

Uzorak	7. dan	14. dan	21. dan	35. dan
CHN11	4,9	4,82	4,47	4,56
CHN11_ BGBU14 <sub>rif</sub>	4,73	4,68	4,35	4,48
CHN11_ PFMI565 <sub>str</sub>	4,85	4,71	4,38	4,51
CHN11_ BGBU14 <sub>rif</sub> _PFMI565 <sub>str</sub>	4,69	4,7	4,37	4,44

Broj *E. durans* PFMI565<sub>str</sub> na niskom pH se održava na visokom nivou (tabela 34). Haghshenas et al. (2016) navode da sojevi enterokoka pokazuju bolju tolerantnost na nisku pH vrednost od mnogih drugih sojeva BMK, a kao razlog navode posedovanje dvoslojne membrane. Analizom rezultata može se zaključiti da porastom broja BGBU1-4<sub>rif</sub>, kao i ukupnog broja BGBU1-4<sub>rif</sub> i PFMI565<sub>str</sub> u uzorku, dolazi do većeg pada pH vrednosti sira tokom 7. i 14. dana skladištenja. Najveće sniženje pH vrednosti bilo je 21. dana. U varijantama sira sa autohtonim sojevima, vrednosti su bile niže i kretale su se u opsegu 4,35 - 4,38, dok je u kontrolnom siru pH vrednost iznosila 4,47. S obzirom da bakteriocin Laktolisterin BGBU1-4 najbolju aktivnost pokazuje u opsegu pH između 4 i 10 (Mirković, 2016), a da je najniža pH vrednost (4,35) zabeležena u siru sa primenjenom kulturom BGBU1-4<sub>rif</sub> 21. dana, antimikrobno delovanje bakteriocina BGBU1-4<sub>rif</sub> nije bilo upitno ni u našim proizvodnim uslovima. Najniža pH vrednost može predstavljati jedan od razloga što se 21. dana pokazala najbolja antilisterijska aktivnost u siru od UF mleka. Slične pH vrednosti sira od UF mleka navode i drugi autori. U siru od UF mleka sa smanjenim sadržajem masti, Miočinović et al. (2011) prikazuju kretanje pH vrednosti u opsegu 4,85 - 4,52. Naši sirevi, sa primenjenim autohtonim izolatima, kroz period skladištenja, imali su nešto nižu pH vrednost, što se nije negativno reflektovalo na ukus sireva. Izbor odgovarajuće starter kulture za proizvodnju sira od UF mleka je ključan faktor za proizvodnju, jer utiču na tok fermentacije i proteolitičkih procesa tokom zrenja. Iz tog razloga poželjno je birati kulture sa izraženom acidogenom i umerenom proteolitičkom sposobnošću (Radulović et al., 2000), što ukazuje na to da je primena naših kultura u eksperimentalnim uslovima bila opravdana.

### 5.10.2.2 Senzorna ocena sira

Senzorna ocena hrane, osim mikrobioloških, hemijskih, fizičkih analiza, predstavlja jedan od najvažnijih alata pri oceni kvaliteta nekog proizvoda. Devijacije u kvalitetu vrlo često se uočavaju evaluacijom senzornih osobina. Ljudskim čulima se detektuju proizvodne greške teže uočljive na drugi način. Prikaz rezultata senzorne ocene sireva od UF mleka dat je u Tabeli 26. Za svaki parametar prikazana je srednja vrednost ocena i standardna devijacija.

Tabela 26. Prikaz pokazatelja senzorne ocene sireva od UF mleka sa komercijalnim i autohtonim BMK

Sir	Dani	Izgled	Boja	Konzistencija	Ukus	Miris	Max kvalitet (%)	Ponderisana ocena
CHN11	7	2,30±0,84	4,6±0,55	2,30±0,45	2,40±0,55	3,90±0,89	56,40	2,82
	14	5,00±0,00	5,00±0,00	3,80±0,45	4,10±0,65	4,90±0,22	85,90	4,30
	21	4,90±0,22	4,90±0,22	4,00±0,35	3,40±0,55	4,50±0,71	78,20	3,91
	35	3,60±0,65	4,70±0,27	3,50±0,61	3,80±0,27	4,80±0,45	79,40	3,97
CHN_BGBU14	7	4,90±0,22	4,80±0,45	3,80±0,27	3,70±0,45	4,70±0,45	80,80	4,04
	14	5,00±0,00	5,00±0,00	3,90±0,65	3,90±0,22	4,88±0,27	84,24	4,21
	21	5,00±0,00	4,80±0,45	4,50±0,50	3,80±0,27	4,40±0,65	81,80	4,09
	35	5,00±0,00	5,00±0,00	4,50±0,50	4,40±0,41	4,80±0,45	91,40	4,57
CHN_PFMI565	7	4,90±0,22	4,60±0,55	4,20±0,57	3,90±0,74	4,90±0,22	84,60	4,23
	14	5,00±0,00	5,00±0,00	4,50±0,41	4,40±0,42	4,90±0,22	91,70	4,58
	21	5,00±0,00	4,80±0,45	4,20±0,57	4,20±0,57	4,6±0,42	87,20	4,36
	35	5,00±0,00	5,00±0,00	4,80±0,27	4,60±0,55	4,80±0,45	94,60	4,73
CHN_BGBU14_PFMI565	7	4,90±0,22	4,60±0,55	3,90±0,55	4,00±0,71	4,90±0,22	84,40	4,22
	14	5,00±0,00	5,00±0,00	4,40±0,42	4,50±0,61	4,90±0,22	92,30	4,61
	21	5,00±0,00	5,00±0,00	4,20±0,45	4,20±0,45	4,50±0,50	87,30	4,36
	35	4,90±0,22	5,00±0,00	5,00±0,00	4,50±0,00	4,90±0,22	94,60	4,73

Na osnovu prikazanih rezultata, može se primetiti da su svi sirevi sa primenjenim autohtonim izolatima dobili visoke ocene od strane senzornih ocenjivača. Uočava se razlika u odnosu na kontrolni sir, koji je imao nešto lošije karakteristike, u gotovo svim ispitivanim tačkama tokom zrenja i skladištenja. Kada se radi o izgledu sireva sa autohtonim kulturama uz komercijalnu starter kulturu, dobijene su visoke ocene. Kretale su se u opsegu 4,90 - 5,00. Ovi sirevi su imali karakterističan izgled i boju. Što se tiče kontrolnog uzorka sira, 7. dana je izgled ocenjen nešto lošije, dok je boja bila karakteristična za tu vrstu sira. Kada je u pitanju konzistencija sireva, takođe su uočene razlike između kontrolnih uzoraka sira i ostalih varijanti. Varijanta sira sa komercijalnom starter kulturom, bila je mekše konzistencije i mazivija. Generalno, konzistencija je sa vremenom i zrenjem postajala bolja. Usled biohemijskih promena u siru, kao i rastom broja ćelija BGBU1-4<sub>rif</sub> i održavanjem PFMI565<sub>str</sub> u toku skladištenja, došlo je do razvoja poželjnih osobina i čvršće konzistencije sira. Sirevi sa primenjenim autohtonim izolatima, pokazali su bolje karakteristike u odnosu na kontrolni. Ocenjivači su ukus kontrolnog sira ocenjivali kao kiseliji i paleći, sa nešto slabijim ocenama u odnosu na ostale varijante, dok je miris svih sireva ocenjen visokim ocenama.

Sagledavajući maksimalni kvalitet sireva, najlošije je ocenjen kontrolni sir. Tokom čitavog perioda skladištenja, sir sa komercijalnom starter kulturom imao je lošije karakteristike u odnosu na ostale sireve, sa rasponom maksimalnog kvaliteta 56,40 - 85,90. Sirevi sa autohtonim sojevima u kombinaciji sa komercijalnim starterom, pokazali su dobra senzorna svojstva, sa procentom maksimalnog kvaliteta u opsegu 84,40 - 94,60. Uzimajući u obzir rezultate senzorne ocene, može se ustanoviti da primena autohtonih sojeva PFMI565<sub>str</sub> i BGBU1-4<sub>rif</sub>, kao dodatnih kultura, pozitivno utiče na svojstva sireva od UF mleka. Na osnovu visoko ocenjenih parametara senzornog ocenjivanja, može se zaključiti da su izabrani autohtoni sojevi BMK za primenu u proizvodnji sira, osim dobrih antilisterijskih rezultata, svojim metabolitima, uticali i na stvaranje dobrih senzornih svojstava proizvoda. Slične rezultate primene autohtonih sojeva u proizvodnji sireva, beleže i drugi autori. Radulović et al. (2011) navode bolja senzorna svojstva belog sira u salamuri proizvedenog primenom autohtonih sojeva, u odnosu na sir proizveden uz upotrebu komercijalnog startera. Selekcionisani sojevi BMK, pokazuju se kao bolji izbor za poboljšanje arome i eventualno ubrzanje zrenja sireva u smislu dodatnih kultura, u odnosu na primenu enzima, povišenu temperaturu zrenja, izmenu tehnološkog postupka (Obradović et al., 2007).

### 5.10.3 Ispitivanje antilisterijske aktivnosti BMK u kajmaku

Kao matriks za praćenje antilisterijskog dejstva autohtonih BMK korišćen je mladi kajmak. Mladi kajmak predstavlja proizvod, koji se može konzumirati odmah po završenom proizvodnom procesu, ima strukturu sličnu nekim vrstama sireva, nešto mekšu i maziviju.

Budući da je kajmak namirnica koja se u najvećem procentu proizvodi na nestandardizovan način, najčešće u seoskim domaćinstvima i manjim zanatskim proizvodnim objektima i u Srbiji, usled nezadovoljavajućih higijenskih praksi, kontaminacija proizvoda je moguća u procesu proizvodnje, skladištenja ili prodaje.

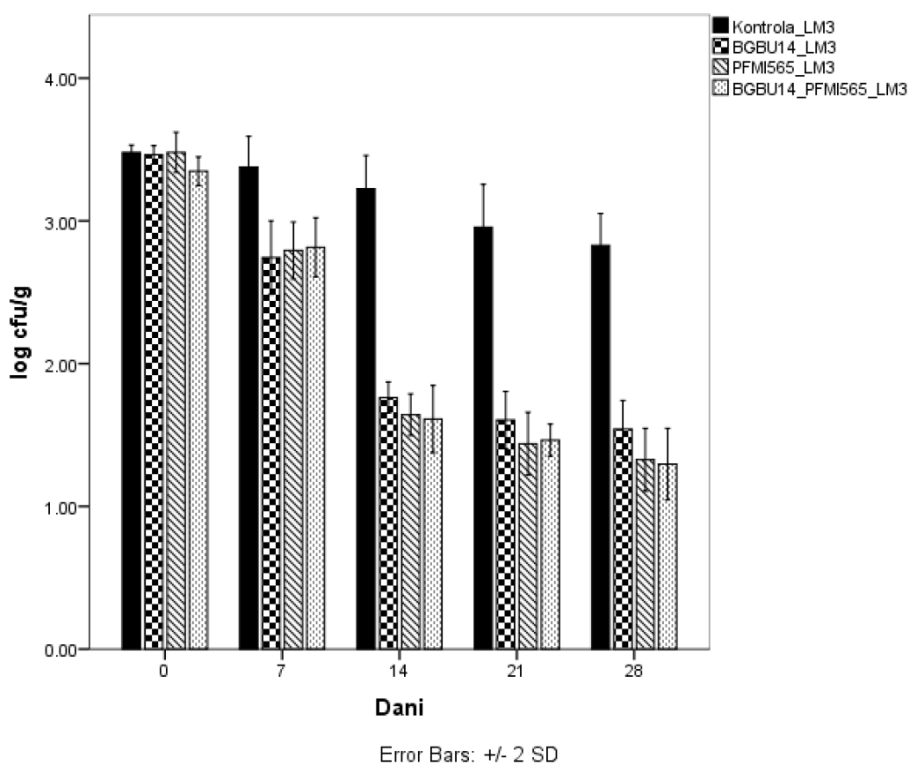
U tabeli 27 dat je prikaz praćenja broja *L. monocytogenes* 10<sup>3</sup> (cfu/g) u kajmaku tokom 28 dana skladištenja. Uočava se statistički značajan pad u broju patogena u svim uzorcima u odnosu na dane skladištenja. U okviru različitih uzoraka sa BMK postoji statistički značajna razlika u broju ćelija listerije u odnosu na kontrolni uzorak, što ukazuje na dobru antilisterijsku aktivnost autohtonih sojeva u kajmaku. Primećen je značajniji pad broja patogena u varijantama uzoraka sa protektivnim kulturama u odnosu na kontrolnu varijantu. Može se zaključiti da je najveći pad u broju patogenih bakterija od 1,21 log cfu/g postignut od 7. do 14. dana skladištenja u varijanti sa kombinacijom sojeva BGBU1-4<sub>rif</sub> i PFMI565<sub>str</sub> (grafikon 10). U 14. danu, i u uzorcima sa pojedinačno primenjenim autohtonim sojevima BMK, postignuta je vrednost 10<sup>1</sup> cfu/g, propisana Kriterijumima bezbednosti hrane. Trend opadanja broja nastavljen je do 28. dana. Sve tri varijante kajmaka sa autohtonim sojevima pokazale su inhibitorno dejstvo prema *L. monocytogenes* sa padom broja od ~ 2 logaritamske jedinice u odnosu na inicijalni broj, dok je u kontrolnoj varijanti pad broja iznosio 0,65 log cfu/g. Najbolju antilisterijsku aktivnost je dala kombinacija autohtonih BMK, sa padom od 2,05 log cfu/g u odnosu na početni broj. Povlačeći paralelu između rezultata antilisterijske aktivnosti u različitim matriksima, uočava se slično delovanje u modelu sira i kajmaku, u uzorcima sa sojevima BGBU1-4<sub>rif</sub> i PFMI565<sub>str</sub>, sa smanjenjem broja ćelija listerije (inicijalno 10<sup>3</sup>) do 10<sup>1</sup> cfu/g u 14. danu, dok je u siru od UF mleka ta vrednost postignuta 21. dana.



Tabela 27. Promena broja *L. monocytogenes* početnog broja ćelija  $10^3$  (cfu/g) u kajmaku tokom 28 dana skladištenja

Uzorak	0. dan	7. dan	14. dan	21. dan	28. dan
Kontrola_LM3	$3,02 \times 10^3 \pm 0,18$	$2,43 \times 10^3 \pm 0,64$	$1,73 \times 10^3 \pm 0,44$	$9,41 \times 10^2 \pm 3,14$	$6,91 \times 10^2 \pm 1,64$
BGBU14_LM3	$2,91 \times 10^3 \pm 0,22$	$5,70 \times 10^2 \pm 1,58$	$5,83 \times 10^1 \pm 0,71$	$4,08 \times 10^1 \pm 9,25$	$3,53 \times 10^1 \pm 0,81$
PFMI565_LM3	$3,05 \times 10^3 \pm 0,49$	$6,32 \times 10^2 \pm 1,43$	$4,44 \times 10^1 \pm 0,72$	$2,81 \times 10^1 \pm 0,71$	$2,17 \times 10^1 \pm 0,51$
BGBU14_PFM I565_LM3	$2,23 \times 10^3 \pm 0,26$	$6,68 \times 10^2 \pm 1,51$	$4,17 \times 10^1 \pm 1,12$	$2,92 \times 10^1 \pm 0,36$	$2,04 \times 10^1 \pm 0,63$

srednja vrednost broja ćelija (cfu/g)  $\pm$  standardna devijacija



Grafikon 10. Logaritam broja ćelija *L. monocytogenes* početne koncentracije  $10^3$  (cfu/g) u kajmaku tokom perioda skladištenja

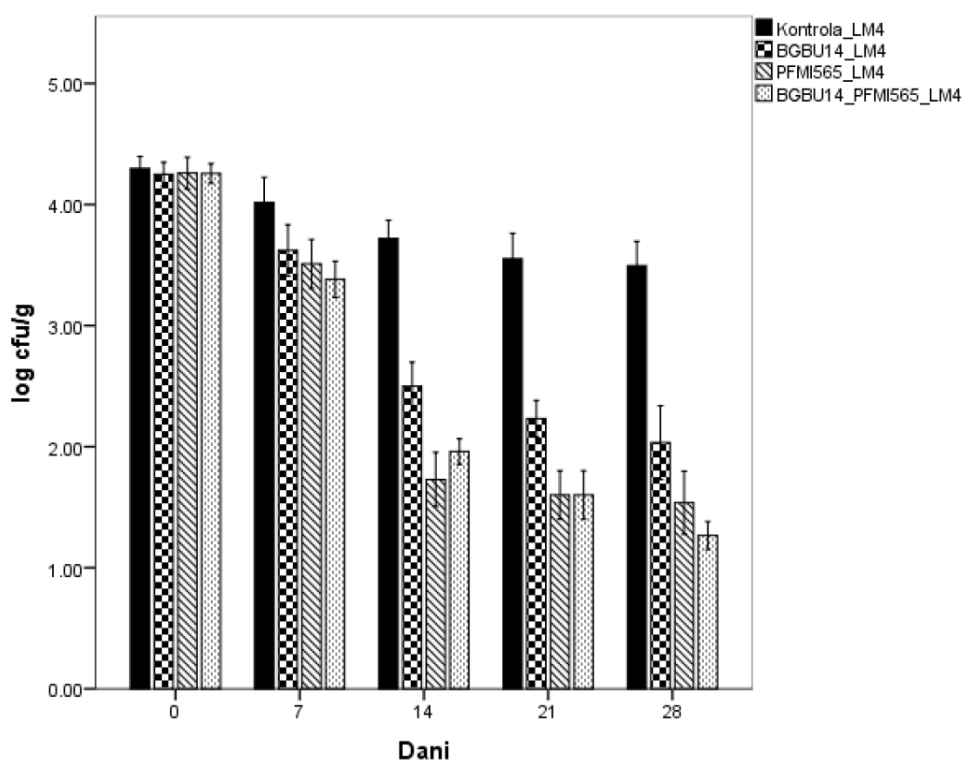
Kako se uočava iz rezultata prikazanih u tabeli 28, slična situacija zabeležena je i u varijantama kajmaka sa inicijalnom koncentracijom *L. monocytogenes*  $10^4$ . Postoji statistička značajnost u odnosu na dane i tretmane. U 0. danu nema statistički značajne razlike između različitih uzoraka kajmaka. Ovakav rezultat je dobar pokazatelj, s obzirom da ukazuje na optimalno postavljen ogled. Najveći pad u broju listerije uočava se u periodu između 7. i 14. dana, u kom je soj PFMI565<sub>str</sub> ispoljio najjaču antimikrobnu aktivnost sa smanjenjem broja ćelija *L. monocytogenes* od 1,78 logaritamskih jedinica, što je verovatno posledica bolje vijabilnosti soja PFMI565<sub>str</sub> u odnosu na

BGBU1-4<sub>rif</sub> između 7. i 14. dana. Ovakva vijabilnost može predstavljati i razlog za prikazanu slabiju inhibitornu aktivnost kombinacije autohtonih sojeva sa padom broja ćelija listerije od 1,42 log cfu/g (grafikon 11). Iako je kombinacija autohtonih sojeva pokazala nešto slabije antilisterijsko dejstvo u odnosu na delovanje soja PFMI565<sub>str</sub>, ipak je zabeležena bolja aktivnost kombinacije sojeva nego delovanjem *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4<sub>rif</sub> individualno, gde je konstatovan pad broja listerije za 0,3 log cfu/g. Za razliku od sira, u kajmaku je primećeno bolje delovanje soja *E. durans* PFMI565<sub>str</sub>, pojedinačno primenjenog, u odnosu na BGBU1-4<sub>rif</sub>. Imajući u vidu da enterokoke često čine nativnu mikrofloru kajmaka (Joković et al., 2008), jedan od razloga za bolju aktivnost enterokoka u ovom matriksu može biti i taj što kajmak predstavlja prirodnu sredinu pogodniju za rast enterokoka (Joković et al., 2008). Trend pada broja ćelija *L. monocytogenes* nastavljen je do poslednjeg dana eksperimentalnog perioda, sa statistički značajnom razlikom broja ćelija patogena u uzorcima sa autohtonim izolatima, u odnosu na kontrolni uzorak kajmaka. Do pada broja patogena u kontrolnom uzorku, moglo je doći i delovanjem primarno prisutnih mikroorganizama u kajmaku. Ipak, uočava se statistički značajan trend opadanja broja ćelija patogena u uzorcima sa aplikovanim sojevima BGBU1-4<sub>rif</sub> i PFMI565<sub>str</sub> u odnosu na kontrolu. Najbolja antilisterijska aktivnost zabeležena je 28. dana delovanjem kombinacije autohtonih BGBU1-4<sub>rif</sub> i PFMI565<sub>str</sub>, gde je postignuta vrednost za ~ 2,2 log cfu/g niža od vrednosti broja *L. monocytogenes* u kontrolnom uzorku kajmaka.

Tabela 28. Promena broja *L. monocytogenes* početnog broja ćelija 10<sup>4</sup> (cfu/g) u kajmaku tokom 28 dana skladištenja

Uzorak	0. dan	7. dan	14. dan	21. dan	28. dan
Kontrola_LM4	1,99x10 <sup>4</sup> ±0,23	1,06x10 <sup>4</sup> ±0,24	5,30x10 <sup>3</sup> ±0,93	3,65x10 <sup>3</sup> ±0,88	3,17x10 <sup>3</sup> ±0,75
BGBU14_LM4	1,79x10 <sup>4</sup> ±0,20	4,25x10 <sup>3</sup> ±0,97	3,22x10 <sup>2</sup> ±0,74	1,72x10 <sup>2</sup> ±0,29	1,13x10 <sup>2</sup> ±0,41
PFMI565_LM4	1,83x10 <sup>4</sup> ±0,28	3,29x10 <sup>3</sup> ±0,74	5,49x10 <sup>1</sup> ±1,3	4,05x10 <sup>1</sup> ±0,93	3,54x10 <sup>1</sup> ±1,03
BGBU14_PFMI565_LM4	1,81x10 <sup>4</sup> ±0,17	2,44x10 <sup>3</sup> ±0,42	9,16x10 <sup>1</sup> ±1,08	4,05x10 <sup>1</sup> ±0,93	1,86x10 <sup>1</sup> ±0,24

srednja vrednost broja ćelija (cfu/g) ± standardna devijacija



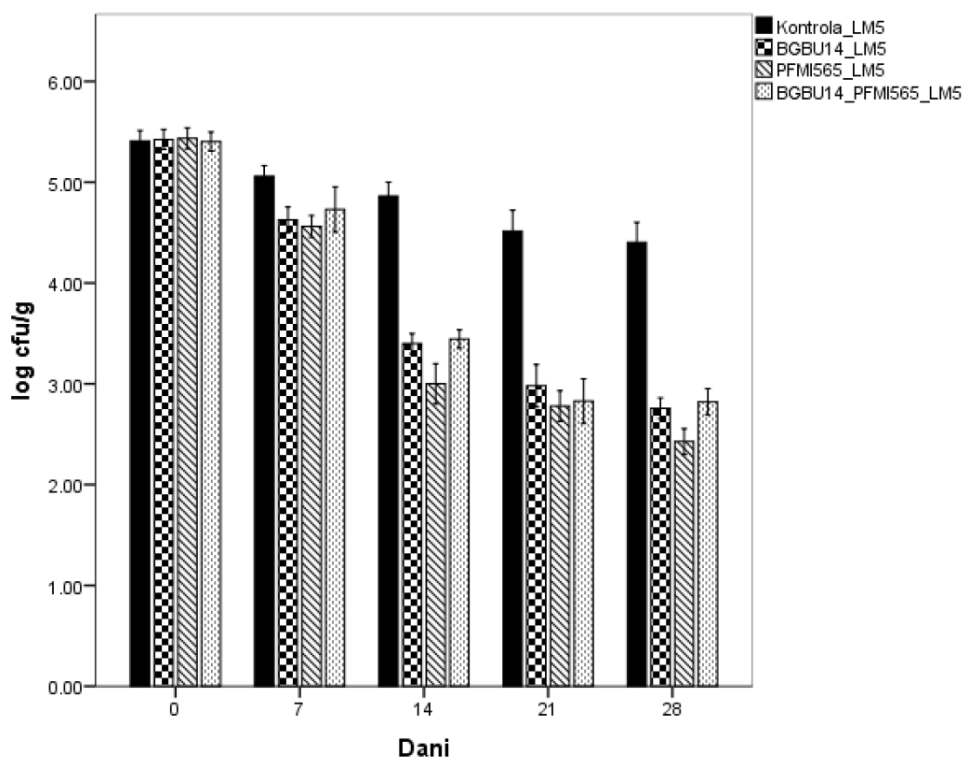
Grafikon 11. Logaritam broja ćelija *L. monocytogenes* početne koncentracije 10<sup>4</sup> (cfu/g) u kajmaku tokom perioda skladištenja

Trend pada broja patogenih ćelija u uzorcima sa autohtonim BMK, karakterističan je i za uzorke sa početnom koncentracijom *L. monocytogenes* 10<sup>5</sup>. Dokazana je antilisterijska aktivnost autohtonih BMK u kajmaku. Od 0. do 21. dana skladištenja, na nedeljnom nivou pad broja patogena iznosio je ~ 1 log cfu/g (tabela 29). 28. dana broj ćelija listerije u varijantama sa autohtonim BMK, kretao se u opsegu 2,42 - 2,82 log cfu/g. Vrednost propisana Kriterijumima bezbednosti hrane nije postignuta do kraja eksperimentalnog perioda, što nije iznenađujuće, s obzirom na veliki inicijalni broj listerije u uzorcima, a i činjenicu da je kajmak sredina sa šarolikom mikrobiotom, što bi moglo delovati na smanjenje antilisterijskog dejstva BMK. Analizirajući detaljnije rezultate antilisterijske aktivnosti autohtonih izolata u kajmaku, uočava se da je najbolje rezultate pokazao *E. durans* PFMI565. Antilisterijsko dejstvo enterokoka opisano je u prethodnim poglavljima. Rivas et al. (2012) navode da bi se objašnjenje za to moglo naći u filogenetskoj sličnosti listerija i enterokoka.

Tabela 29. Promena broja *L. monocytogenes* početnog broja ćelija 10<sup>5</sup> (cfu/g) u kajmaku tokom 28 dana skladištenja

Uzorak	0. dan	7. dan	14. dan	21. dan	28. dan
Kontrola_LM5	2,58x10 <sup>5</sup> ±0,30	1,15x10 <sup>5</sup> ±0,14	7,37x10 <sup>4</sup> ±1,23	3,32x10 <sup>4</sup> ±0,75	2,58x10 <sup>4</sup> ±0,58
BGBU14_LM5	2,66x10 <sup>5</sup> ±0,31	4,26x10 <sup>4</sup> ±0,65	2,52x10 <sup>3</sup> ±0,29	9,75x10 <sup>2</sup> ±2,49	5,74x10 <sup>2</sup> ±0,66
PFMI565_LM5	2,72x10 <sup>5</sup> ±0,32	3,68x10 <sup>4</sup> ±0,45	1,02x10 <sup>3</sup> ±0,23	6,09x10 <sup>2</sup> ±1,04	2,69x10 <sup>2</sup> ±0,41
BGBU14_PFMI565_LM5	2,54x10 <sup>5</sup> ±0,27	5,49x10 <sup>4</sup> ±1,30	2,79x10 <sup>3</sup> ±0,29	6,85x10 <sup>2</sup> ±1,60	6,66x10 <sup>2</sup> ±0,98

srednja vrednost broja ćelija (cfu/g) ± standardna devijacija



Grafikon 12. Logaritam broja ćelija *L. monocytogenes* početne koncentracije  $10^5$  (cfu/g) u kajmaku tokom perioda skladištenja

Kajmak predstavlja sredinu pogonu za rast različitih vrsta mikroorganizama. Karakteriše ga visok procenat mlečne masti, što pogoduje razvoju određenih vrsta bakterija, kvasaca i plesni. Zakonodavstvo Republike Srbije sadržaj mlečne masti u kajmaku, precizira Pravilnikom o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura ("Službeni glasnik RS", br. 33/2010, 69/2010, 43/2013 - dr. pravilnik i 34/2014), gde je naznačeno da mladi kajmak ne sme da sadrži manje od 65 % mlečne masti, a zreo kajmak ne manje od 75 %, pH vrednost mladog kajmaka ne sme biti niža od 4,8, a zrelog kajmaka, ne niža od 3,8 jedinica pH skale. Kajmak sa područja Turske je proizvod dobijen od bivoljeg ili kravljeg mleka, sa kraćim rokom trajanja i minimum 60 % mlečne masti (Akalin et al., 2006), što ga čini sličnim našem tradicionalnom proizvodu sa istim nazivom. U uzorcima kajmaka proizvedenog na području Turske izolovane su koliformne bakterije, *E. coli*, *S. aureus*, kvasci i plesni (Akalin et al., 2006). Do sličnih rezultata došli su i Yilsay i Bay (2002) koji su, analizirajući uzorke kajmaka iz turskog grada Burse, izolovali *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella-Shigella* vrste, kvasce, kao i Cakmakci i Hayaloglu (2011), koji su u uzorcima Ispirskog kajmaka, detektovali kvasce i plesni, koliformne bakterije i veći od propisanog ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija. U istraživanju koje su sproveli Kara i Aslan (2020) u tri objekta za proizvodnju kajmaka iz uzetih 87 briseva sa opreme, uređaja, radnog okruženja, ruku zaposlenih i dr., u 7 slučajeva potvrđeno je prisustvo *L. monocytogenes*. Iz smrznutog kajmaka Jeršek et al. (1999) izolovali su *L. monocytogenes*.

Rezultati naših istraživanja su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora. Antimikrobna aktivnost osam izolata *E. faecium* i jednog *E. faecalis* prikazana je prema *L. innocua* ATCC 33090 i *L. monocytogenes* (Rivas et al., 2012). U rezultatima istraživanja koje su sproveli Kučerová et al. (2009), 6 od ukupno 38 sojeva enterokoka pokazalo je inhibitorno dejstvo prema 15 sojeva *Listeria* spp.

#### 5.10.4 Ispitivanje antilisterijske aktivnosti BMK u lososu

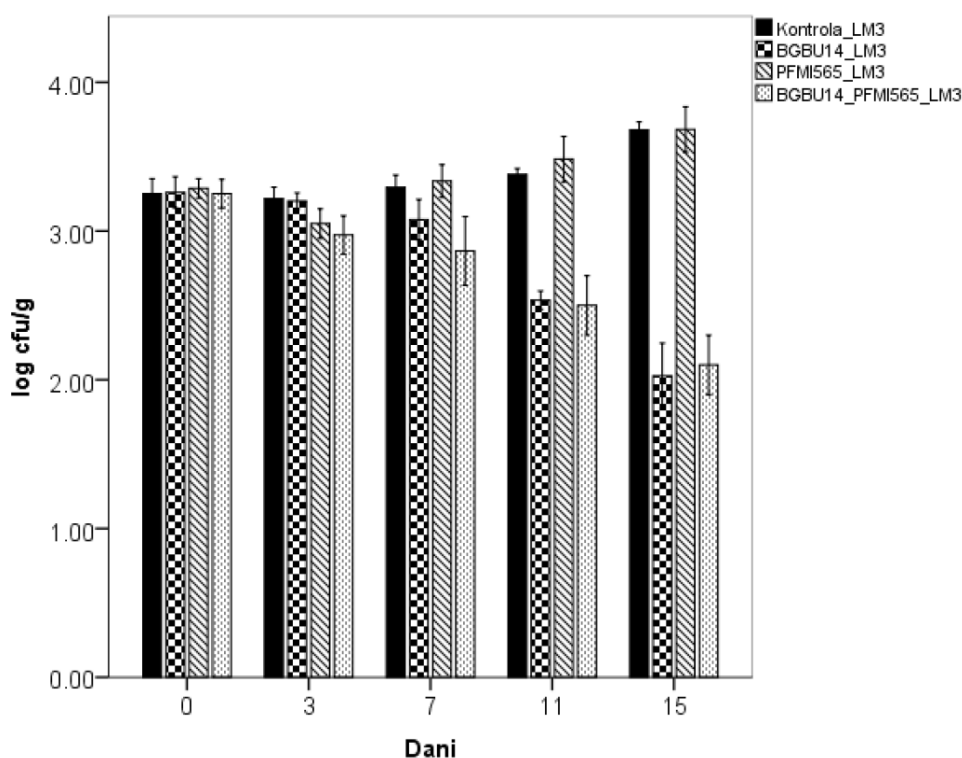
Riba predstavlja sredinu sa visokim rizikom od kvarenja, pogodnu za razvoj različitih vrsta mikroorganizama. Svojim hemijskim sastavom, strukturom, pogoduje razvoju nepoželjne mikroflore (Šalomskiene et al., 2020). Jedan od najnepoželjnih kontaminenata pogona za proizvodnju ribe je *L. monocytogenes*. Razlog za to su ekstremna otpornost ovog patogena, sposobnost preživljavanja na niskim temperaturama i formiranje biofilmova. Po autorima, u kontroli *L. monocytogenes*, važno mesto zauzima primena BMK. Stupar et al. (2021) navode inhibitornu aktivnost izolata BMK poreklom iz plodova mora prema *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *E. coli*. Slične rezultate beleže i drugi autori (Wiernasz et al., 2020).

Uticaj autohtonih sojeva BGBU1-4<sub>rif</sub>, PFMI565<sub>str</sub> i njihove kombinacije tokom 15 dana skladištenja, prikazan je u tabelama 30, 31 i 32. U uzorcima sa najmanjom primenjenom početnom koncentracijom *L. monocytogenes*, do 3. dana pod uticajem soja BGBU1-4<sub>rif</sub> nije došlo do značajnije promene u broju patogena. Uticajem kombinacije sojeva BGBU1-4<sub>rif</sub> i PFMI565<sub>str</sub>, u 3. danu, dobijeni su najbolji rezultati antilisterijske aktivnosti, sa smanjenjem broja ćelija listerije za 1 log. Kada je u pitanju varijanta lososa sa *E. durans* PFMI565<sub>str</sub>, u 3. danu beleži se pad od 0,23 log cfu/g, a potom, počev od 7. dana, neveliki porast broja, koji je do 15. dana praćenja iznosio 0,39 logaritamskih jedinica. U varijanti lososa sa sojem BGBU1-4<sub>rif</sub>, 15. dana došlo je do snižavanja broja listerije za 1,23 log cfu/g. Što se tiče dinamike kretanja broja listerije u uzorku sa inokulisana oba autohtona soja, primećuje se konstantno smanjenje broja do 15. dana, kada je broj listerija bio za 1,15 log cfu/g manji u odnosu na početni. Kontrolni uzorak prati porast broja listerije, koji je u 15. danu bio veći za 0,43 log cfu/g. Sagledavajući rezultate možemo zaključiti da je najslabije rezultate dala primena PFMI565<sub>str</sub>, pod čijim uticajem se beleži blagi porast broja ćelija patogena.

Tabela 30. Promena broja *L. monocytogenes* početnog broja ćelija 10<sup>3</sup> (cfu/g) u lososu tokom 15 dana skladištenja

Uzorak	0. dan	3. dan	7. dan	11. dan	15. dan
Kontrola_LM3	1,81x10 <sup>3</sup> ±0,21	1,66x10 <sup>3</sup> ±0,14	1,97x10 <sup>3</sup> ±0,18	2,40x10 <sup>3</sup> ±0,11	4,79x10 <sup>3</sup> ±0,29
BGBU14_LM3	1,83x10 <sup>3</sup> ±0,22	1,60x10 <sup>3</sup> ±0,93	1,20x10 <sup>3</sup> ±0,18	3,42x10 <sup>2</sup> ±2,38	1,09x10 <sup>2</sup> ±0,25
PFMI565_LM3	1,94x10 <sup>3</sup> ±0,14	1,13x10 <sup>3</sup> ±0,13	2,18x10 <sup>3</sup> ±0,29	3,07x10 <sup>3</sup> ±0,52	4,78x10 <sup>3</sup> ±0,83
BGBU14_PFMI 565_LM3	1,79x10 <sup>3</sup> ±0,20	9,47x10 <sup>2</sup> ±1,34	7,54x10 <sup>2</sup> ±2,13	3,22x10 <sup>2</sup> ±0,74	1,28x10 <sup>2</sup> ±0,29

srednja vrednost broja ćelija (cfu/g) ± standardna devijacija



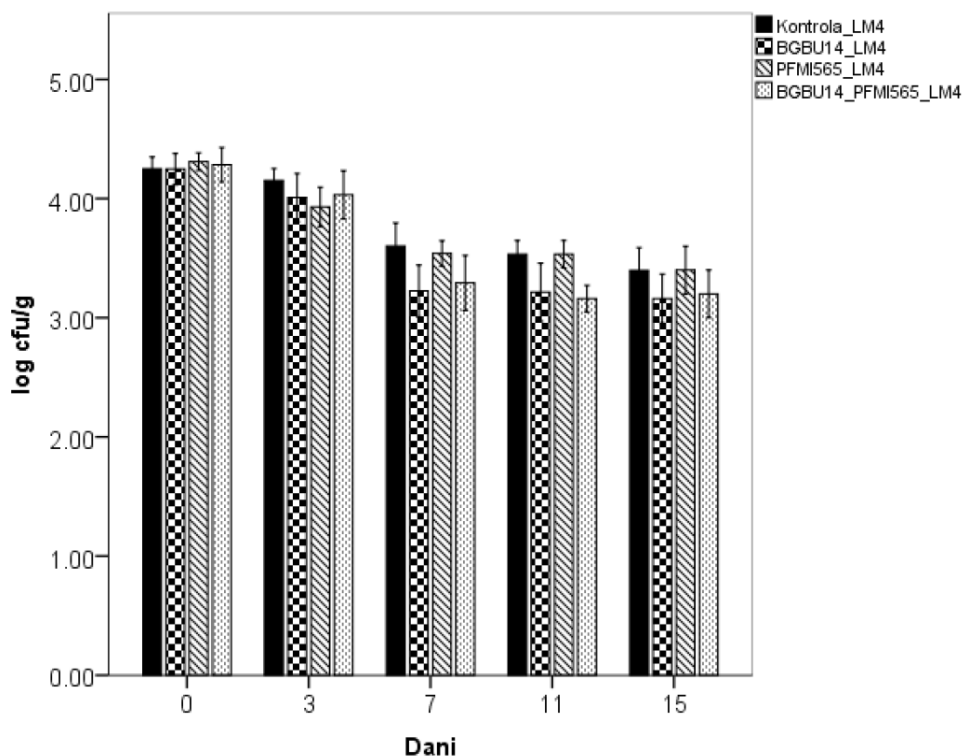
Grafikon 13. Logaritam broja ćelija *L. monocytogenes* početne koncentracije 10<sup>3</sup> (cfu/g) u lososu tokom perioda skladištenja

U varijantama lososa sa inicijalnom koncentracijom patogena 10<sup>4</sup>, 0. dana nije bilo statistički značajnih razlika između uzoraka (tabela 31). Početni broj *L. monocytogenes* se kretao između vrednosti 4,25 i 4,31 log cfu/g, a 3. dana, najveći pad prouzrokovao je PFMI565<sub>str</sub>, koji je iznosio 0,39 logaritamskih jedinica. 7. dan karakteriše smanjenje broja patogenih ćelija listerije do 10<sup>3</sup> cfu/g u svim uzorcima sa autohtonim sojevima BMK. Do kraja perioda skladištenja, BGBU1-4<sub>rif</sub> i BGBU14<sub>rif</sub>-PFMI565<sub>str</sub> pokazali su bolje delovanje u odnosu na PFMI565<sub>str</sub>. Zabeležen je pad od 1,08 log cfu/g, u slučaju BGBU1-4<sub>rif</sub> i BGBU14<sub>rif</sub>-PFMI565<sub>str</sub>, odn. 0,91 delovanjem soja PFMI565<sub>str</sub>, što implicira da je prisutna značajno slabija antilisterijska aktivnost autohtonih sojeva BMK u lososu.

Tabela 31. Promena broja *L. monocytogenes* početnog broja ćelija 10<sup>4</sup> (cfu/g) u lososu tokom 15 dana skladištenja

Uzorak	0. dan	3. dan	7. dan	11. dan	15. dan
Kontrola_LM <sub>4</sub>	1,75x10 <sup>4</sup> ±0,20	1,42x10 <sup>4</sup> ±0,16	4,08x10 <sup>3</sup> ±0,89	3,44x10 <sup>3</sup> ±4,73	2,53x10 <sup>3</sup> ±0,55
BGBU14_LM <sub>4</sub>	1,78x10 <sup>4</sup> ±0,27	1,04x10 <sup>4</sup> ±0,23	1,71x10 <sup>3</sup> ±0,39	1,68x10 <sup>3</sup> ±0,47	1,47x10 <sup>3</sup> ±0,37
PFMI565_LM <sub>4</sub>	2,05x10 <sup>4</sup> ±0,17	8,61x10 <sup>3</sup> ±1,56	3,48x10 <sup>3</sup> ±0,43	3,44x10 <sup>3</sup> ±0,47	2,56x10 <sup>3</sup> ±0,58
BGBU14_PFMI565_LM <sub>4</sub>	1,94x10 <sup>4</sup> ±0,31	1,09x10 <sup>4</sup> ±0,26	2,01x10 <sup>3</sup> ±0,51	1,45x10 <sup>3</sup> ±0,18	1,61x10 <sup>3</sup> ±0,37

srednja vrednost broja ćelija (cfu/g) ± standardna devijacija



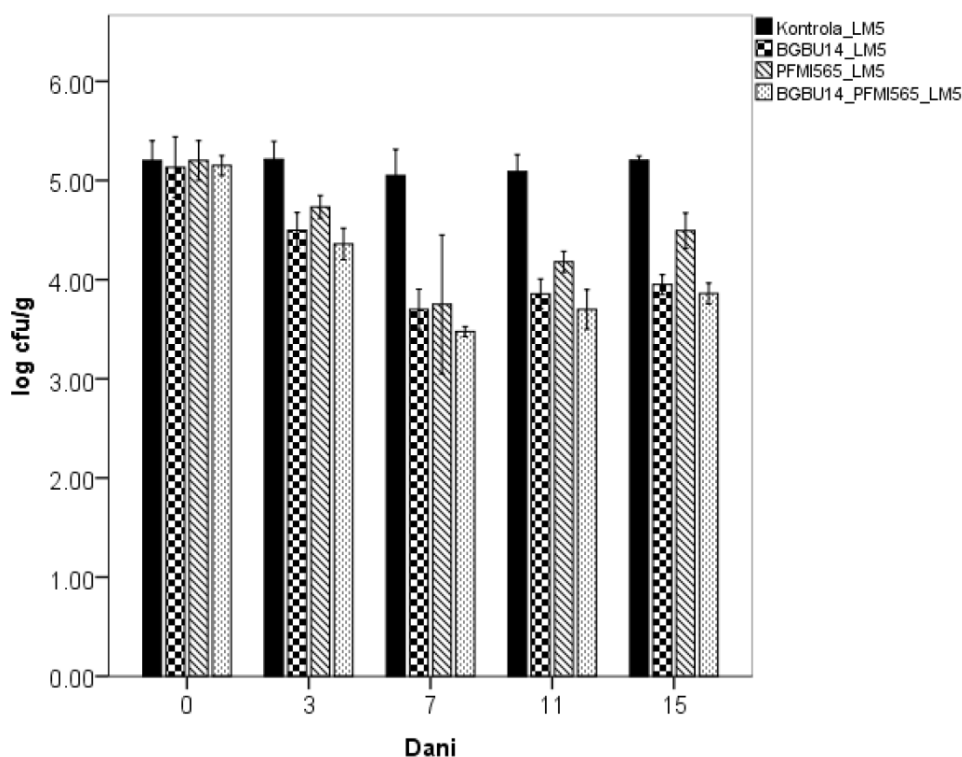
Grafikon 14. Logaritam broja ćelija *L. monocytogenes* početne koncentracije  $10^4$  (cfu/g) u lososu tokom perioda skladištenja

Analizirajući rezultate delovanja BMK u varijantama sa koncentracijom listerije  $10^5$  (tabela 32), uočava se pravilnost u postavljanju eksperimenta, s obzirom da nije bilo statistički značajne razlike u početnom broju *L. monocytogenes*. Vrednosti su se kretale u opsegu 5,13 - 5,20 log cfu/g u svim uzorcima. Od 0 - 3. dana, u svim uzorcima sa autohtonim sojevima BMK, beleži se pad od ~ 1 logaritamske jedinice, pri čemu je najveće smanjenje broja ćelija listerije zabeleženo delovanjem kombinacije startera. Za period skladištenja 3 - 7. dana, karakterističan je najveći pad u broju patogena pod uticajem soja PFMI565<sub>str</sub>, nakon čega, broj ćelija listerije raste, dostigavši vrednost od 4,49 log cfu/g do 15. dana. Na kraju eksperimentalnog perioda, najbolje inhibitorno dejstvo pokazala je kombinacija sojeva, sa smanjenjem broja ćelija patogena za ~ 2 logaritamske jedinice. Zabeležen je statistički značajan trend opadanja u varijanti sira sa sojem PFMI565<sub>str</sub> u odnosu na kontrolnu varijantu.

Tabela 32. Promena broja *L. monocytogenes* početnog broja ćelija  $10^5$  (cfu/g) u lososu tokom 15 dana skladištenja

Uzorak	0. dan	3. dan	7. dan	11. dan	15. dan
Kontrola_LM5	$1,61 \times 10^5 \pm 0,37$	$1,66 \times 10^5 \pm 0,34$	$1,16 \times 10^5 \pm 0,32$	$1,25 \times 10^5 \pm 0,24$	$1,60 \times 10^5 \pm 0,08$
BGBU14_LM5	$1,42 \times 10^5 \pm 0,52$	$3,18 \times 10^4 \pm 0,69$	$5,10 \times 10^3 \pm 1,17$	$7,26 \times 10^3 \pm 1,19$	$8,95 \times 10^3 \pm 1,03$
PFMI565_LM5	$1,61 \times 10^5 \pm 0,37$	$5,44 \times 10^4 \pm 0,75$	$6,73 \times 10^3 \pm 4,02$	$1,52 \times 10^4 \pm 0,18$	$3,16 \times 10^4 \pm 0,64$
BGBU14_PFM I565_LM5	$1,42 \times 10^5 \pm 0,016$	$2,32 \times 10^4 \pm 0,44$	$3,00 \times 10^3 \pm 0,17$	$5,10 \times 10^3 \pm 1,17$	$7,28 \times 10^3 \pm 0,86$

srednja vrednost broja ćelija (cfu/g)  $\pm$  standardna devijacija



Grafikon 15. Logaritam broja ćelija *L. monocytogenes* početne koncentracije  $10^5$  (cfu/g) u lososu tokom perioda skladištenja

Jače delovanje *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4<sub>rif</sub> i kombinacije *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4<sub>rif</sub> i *E. durans* PFMI565<sub>str</sub> na listeriju, u odnosu na delovanje individualno primenjenog soja *E. durans* PFMI565<sub>str</sub>, može se objasniti i njegovim nižim brojem u lososu tokom perioda skladištenja (detaljnije u nastavku (Tabela 38)). Inhibitorno dejstvo prema listeriji u ribi i proizvodima od ribe bakteriocin-produkujućih BMK prikazano je u rezultatima istraživanja drugih autora, Anacarso et al. (2014) navode smanjenje broja *L. monocytogenes* ATCC19117 u svežem lososu i simuliranim uslovima prekida hladnog lanca čuvanja lososa, pod uticajem soja *Lb. pentosus* 39, za 3,6 log cfu/g i 5,8 log cfu/g, respektivno.

Inhibitorno delovanje enterokoka protiv listerije, u svrsi njihove primene kao protektivnih ili "adjunc" kultura, predmet je istraživanja mnogih autora. Nakon 21. dana skladištenja



tradicionalnog skandinavskog jela od lososa Gravlax na +8 °C, protektivne kulture *Carnobacterium maltaromaticum* SF1944, *Lactococcus piscium* EU229 i *Leuconostoc gelidum* EU2249, pokazale su antimikrobno dejstvo prema *L. monocytogenes*, smanjivši broj kolonija patogena za ~ 4,1, 3,6 i 3,1 log cfu/g, respektivno (Wiernasz et al., 2020). Oko 40 % sojeva BMK izolovanih iz hladno dimljenog lososa (Stupar et al., 2021), pokazalo je potpuno inhibitorno dejstvo prema *L. monocytogenes* i srednje inhibitorno dejstvo prema *L. innocua*, što je značajno bolje od rezultata našeg istraživanja. Takođe, u istraživanju koje su sproveli Tomé et al. (2008), u simuliranim uslovima hladno dimljenog lososa, *E. faecium* ET05 je pokazao najbolju antimikrobnu aktivnost od ostalih BMK, prema *L. innocua* tokom dvadesetjednodnevnog skladištenja na +5 °C. Bigwood et al. (2012) navode smanjenje broja *L. monocytogenes* inicijalne koncentracije  $10^5$ , na 3,5 - 4,5 log cfu/g, delovanjem *E. mundii*.

Prilagodljivost soja na uslove u matriksu hrane jedan je od faktora za ispoljavanje antimikrobnog delovanja (Yap et al., 2021). Primena protektivnih kultura u različitim sredinama i uslovima okruženja, vrlo često daje i različite rezultate. Njihovo antimikrobno dejstvo tokom roka upotrebljivosti proizvoda zavisi od različitih faktora. Na njega, osim temperature skladištenja i promene pH vrednosti tokom čuvanja proizvoda, može uticati enzimaska aktivnost, interakcija među mikroorganizmima ili sa komponentama hrane i sl. (Dillon, 2014). Delimično objašnjenje slabijeg antilisterijskog dejstva sojeva BGBU1-4<sub>rif</sub> i PFMI565<sub>str</sub> u lososu, uz navedene faktore, moglo bi biti njihovo primarno poreklo i nedovoljna adaptacija na uslove sredine, s obzirom da oba soja potiču iz sira.

## 5.11 VIJABILNOST ISPITIVANIH SOJEVA U HRANI

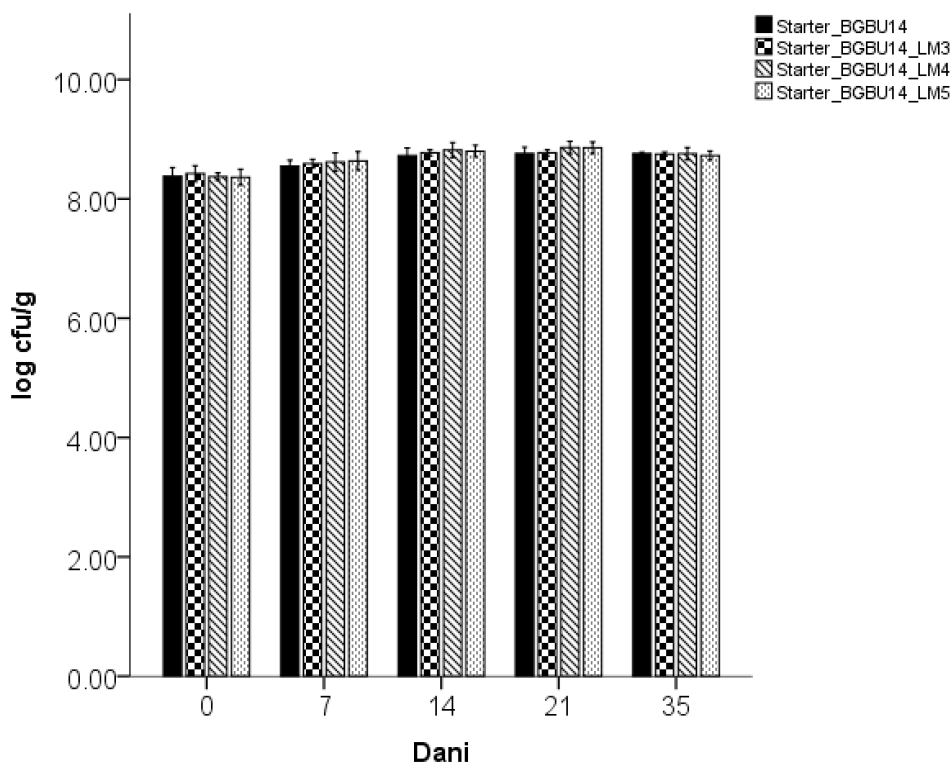
### 5.11.1 Preživljavanje *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4<sub>rif</sub> i *E. durans* PFMI565<sub>str</sub> u siru od UF mleka

Uticaj BMK na nepoželjnu mikrofloru zavisi, pre svega, od njihove vijabilnosti u različitim sistemima. Preživljavanje BMK u modifikovanim industrijskim uslovima proizvodnje i skladištenja sira od UF mleka praćeno je tokom 35 dana. Broj BGBU1-4<sub>rif</sub> (tabela 33) u uzorcima sa različitim koncentracijama *L. monocytogenes* bio je konstantan i kretao se u intervalu 8,36 log cfu/g, što predstavlja vrednost zabeleženu 0. dana, do vrednosti 8,86 log cfu/g, koja je zabeležena 21. dana u uzorku sa koncentracijom *L. monocytogenes*  $10^4$ . Nakon 35. dana skladištenja, zabeležena je vrednost od 8,76 logaritamskih jedinica.

Tabela 33. Promena broja BGBU1-4<sub>rif</sub> u siru od UF mleka tokom skladištenja (cfu/g)

Uzorak	0. dan	7. dan	14. dan	21. dan	35. dan
CHN11_BGB U14	2,42x10 <sup>8</sup> ±0,39	3,56x10 <sup>8</sup> ±0,41	5,37x10 <sup>8</sup> ±0,82	5,78x10 <sup>8</sup> ±0,68	5,76x10 <sup>8</sup> ±0,13
CHN11_BGB U14_LM3	2,67x10 <sup>8</sup> ±0,39	3,90x10 <sup>8</sup> ±0,32	5,94x10 <sup>8</sup> ±0,35	5,94x10 <sup>8</sup> ±0,35	5,63x10 <sup>8</sup> ±0,22
CHN11_BGB U14_LM4	2,37x10 <sup>8</sup> ±0,16	4,18x10 <sup>8</sup> ±0,75	6,65x10 <sup>8</sup> ±0,98	7,28x10 <sup>8</sup> ±0,86	5,74x10 <sup>8</sup> ±0,66
CHN11_BGB U14_LM5	2,33x10 <sup>8</sup> ±0,37	4,38x10 <sup>8</sup> ±0,75	6,34x10 <sup>8</sup> ±0,73	7,22x10 <sup>8</sup> ±0,79	5,34x10 <sup>8</sup> ±0,48

srednja vrednost broja ćelija (cfu/g) ± standardna devijacija



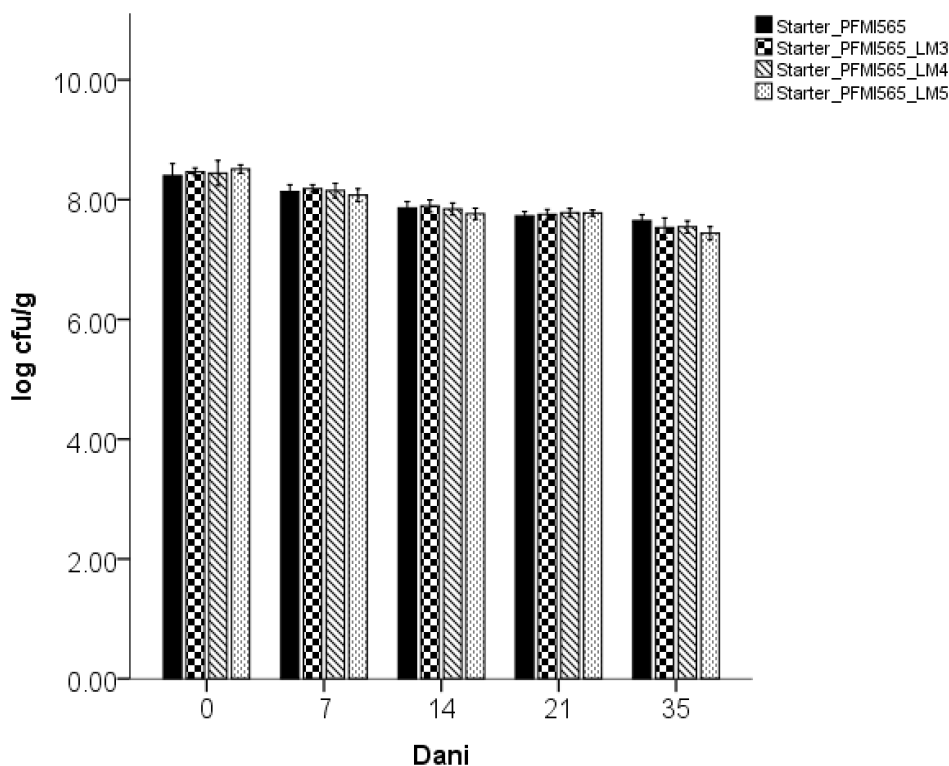
Grafikon 16. Logaritam broja ćelija BGBU1-4<sub>rif</sub> u siru od UF mleka tokom skladištenja

Analizirajući rezultate sireva sa primenjenim sojem PFMI565<sub>str</sub>, uočava se pad broja u toku perioda skladištenja. Nultog dana merenja, vrednost se kretala ~ 8,5 logaritamskih jedinica, da bi 14. dana skladištenja, sa blagim padom pH vrednosti sira, broj pao na ~ 7,8 log cfu/g. Značajnijih razlika u broju BMK u okviru uzoraka sa različitim polaznim koncentracijama listerije, nije bilo. Poslednjeg dana praćenja, broj se kretao ~ 7,5 log cfu/g (tabela 34).

Tabela 34. Promena broja PFMI565<sub>str</sub> u siru od UF mleka tokom skladištenja (cfu/g)

Uzorak	0. dan	7. dan	14. dan	21. dan	35. dan
CHN11_PFMI 565	$2,56 \times 10^8 \pm 0,58$	$1,37 \times 10^8 \pm 0,18$	$7,28 \times 10^7 \pm 0,86$	$5,38 \times 10^7 \pm 0,45$	$4,49 \times 10^7 \pm 0,52$
CHN11_PFMI 565_LM3	$2,91 \times 10^8 \pm 0,22$	$1,53 \times 10^8 \pm 0,11$	$7,86 \times 10^7 \pm 0,95$	$5,68 \times 10^7 \pm 0,55$	$3,43 \times 10^7 \pm 0,62$
CHN11_PFMI 565_LM4	$2,83 \times 10^8 \pm 0,68$	$1,42 \times 10^8 \pm 0,21$	$7,00 \times 10^7 \pm 0,80$	$6,04 \times 10^7 \pm 0,49$	$3,51 \times 10^7 \pm 0,40$
CHN11_PFMI 565_LM5	$3,24 \times 10^8 \pm 0,26$	$1,20 \times 10^8 \pm 0,14$	$5,82 \times 10^7 \pm 0,62$	$5,99 \times 10^7 \pm 0,35$	$2,75 \times 10^7 \pm 0,36$

srednja vrednost broja ćelija (cfu/g) ± standardna devijacija



Grafikon 17. Logaritam broja ćelija PFMI565<sub>str</sub> u siru od UF mleka tokom skladištenja

Iako nešto slabiji u odnosu na BGBU1-4<sub>rif</sub>, rezultati praćenja vijabilnosti *E. durans* PFMI565<sub>str</sub> ukazuju na dobro preživljavanje uslova proizvodnje i skladištenja sira proizvedenog od UF mleka. Ovakvi rezultati bi, mogli ukazati na bolju antilisterijsku aktivnost bakteriocinskog soja BGBU1-4<sub>rif</sub> u siru. Optimalan pH za rast većine bakterija je oko neutralne pH vrednosti, a pri pH < 5 je često slabiji (Beresford et al., 2001). Osobina BMK je svakako dobra adaptiranost na uslove sa niskom pH vrednošću, uz produkciju antimikrobnih metabolita, što im daje prednost u odnosu na ostale stanovnike sistema. Kombinacija ovih faktora dovela je, posledično, i do smanjenja broja *L. monocytogenes*, što nije uticalo na bitno smanjenje broja BMK. Do kraja skladištenja, broj BMK se zadržao na ~ 8 log cfu/g.

Sagledavajući rezultate našeg istraživanja, uočavaju se rezultati koji su u saglasnosti sa rezultatima drugih autora. Visok nivo vijabilnih ćelija starter kultura, u istraživanju koje su sprovedi Radulović et al. (2011), održavao se tokom čitavog perioda zrenja u proizvodnji belog sira u salamuri i kretao se ~ 8 log cfu/g. U tipu Quark-sira, tokom 21 dana skladištenja na +4 °C praćenja antilisterijske aktivnosti, bakteriocin-produgujući *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 se, u zavisnosti od polazne koncentracije, kretao u opsegu 6,7 - 9,6 log cfu/g (Mirkovic et al., 2020).

#### 5.11.2 Preživljavanje *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4<sub>rif</sub> i *E. durans* PFMI565<sub>str</sub> u kajmaku

Uloga i značaj BMK u fermentacionim procesima mlečnih proizvoda, kao i njihov uticaj na razvoj specifičnih senzornih osobina proizvoda, prikazani su u ranijim poglavljima. Dat je osvrt i na protektivnu ulogu BMK u proizvodima i obezbeđenje njihove sigurnosti do kraja roka trajanja. Jasno je da održavanje njihovog broja tokom roka trajanja proizvoda, doprinosi sigurnosti i očuvanju poželjnih senzornih karakteristika. Zbog svog sastava, kajmak predstavlja sredinu koja pogoduje rastu bakterija mlečne kiseline, Jokovic et al. (2008) su iz 6 uzoraka tradicionalnog

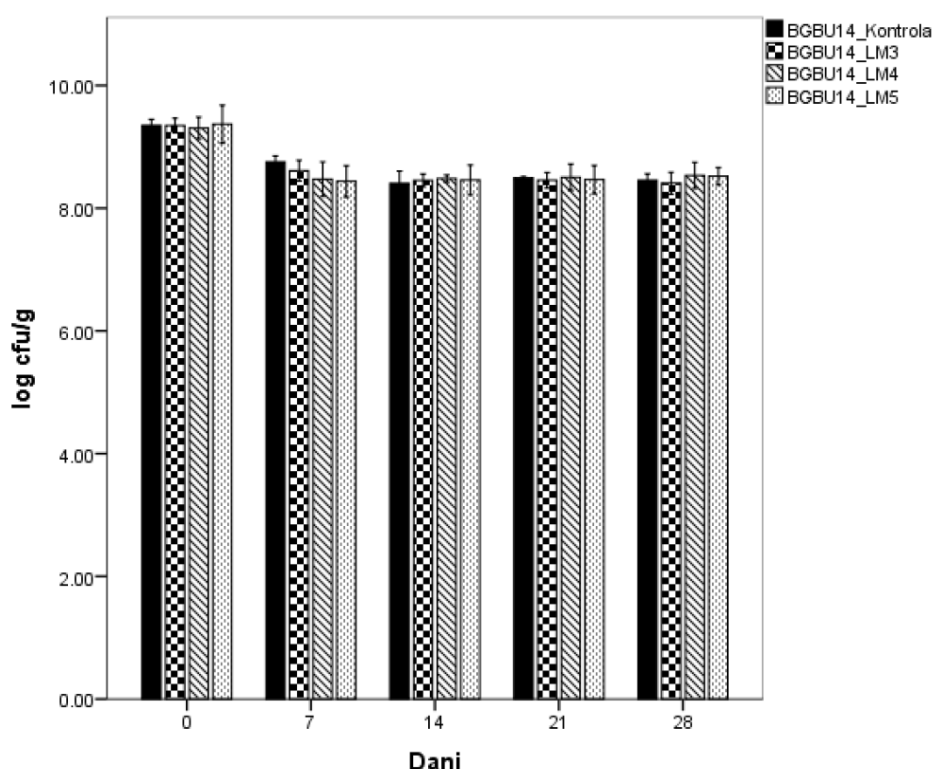
kajmaka sa područja Srbije izolovali 349 BMK, među kojima su preovladavali rodovi *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* i *Enterococcus*.

U varijantama kajmaka sa aplikovanom bakteriocinskom kulturom BGBU1-4<sub>rif</sub>, nakon 7. dana, konstatovano je održavanje visokog broja vijabilnih ćelija tokom čitavog eksperimentalog perioda (tabela 35). Broj laktokoka u 0. danu kretao se ~ 9,3 log cfu/g, da bi nakon 7 dana vrednost u svim uzorcima, osim u kontroli pala za ~ 1 log cfu/g. Tokom skladištenja, zabeležena je statistički značajna razlika (za p≤0,05) u odnosu na dane praćenja. U kontrolnom uzorku, u periodu između 7. i 14. dana došlo je do pada broja laktokoka za ~ 1 log cfu/g. Do kraja eksperimentalnog perioda, broj BGBU1-4<sub>rif</sub> se u svim uzorcima kretao ~ 8 log cfu/g. Nije zabeležena statistički značajna razlika u broju laktokoka u uzorcima sa *L. monocytogenes*, što znači da različite koncentracije patogena nisu uticale na broj laktokoka u kajmaku.

Tabela 35. Promena broja BGBU1-4<sub>rif</sub> u kajmaku tokom skladištenja (cfu/g)

Uzorak	0. dan	7. dan	14. dan	21. dan	28. dan
BGBU14_Kontrola	2,25x10 <sup>9</sup> ±0,29	5,69x10 <sup>9</sup> ±0,06	2,58x10 <sup>8</sup> ±0,58	3,11x10 <sup>8</sup> ±0,08	2,88x10 <sup>8</sup> ±0,33
BGBU14_LM3	2,24x10 <sup>9</sup> ±0,31	4,13x10 <sup>8</sup> ±0,82	2,86x10 <sup>8</sup> ±0,36	2,86x10 <sup>8</sup> ±0,41	2,59x10 <sup>8</sup> ±0,54
BGBU14_LM4	2,06x10 <sup>9</sup> ±0,43	3,08x10 <sup>8</sup> ±0,95	3,05x10 <sup>8</sup> ±0,19	3,25x10 <sup>8</sup> ±0,78	3,48x10 <sup>8</sup> ±0,87
BGBU14_LM5	2,44x10 <sup>9</sup> ±0,83	2,82x10 <sup>8</sup> ±0,87	2,96x10 <sup>8</sup> ±0,88	3,00x10 <sup>8</sup> ±0,85	3,34x10 <sup>8</sup> ±0,57

srednja vrednost broja ćelija (cfu/g) ± standardna devijacija



Grafikon 18. Logaritam broja ćelija *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4<sub>rif</sub> u kajmaku tokom skladištenja

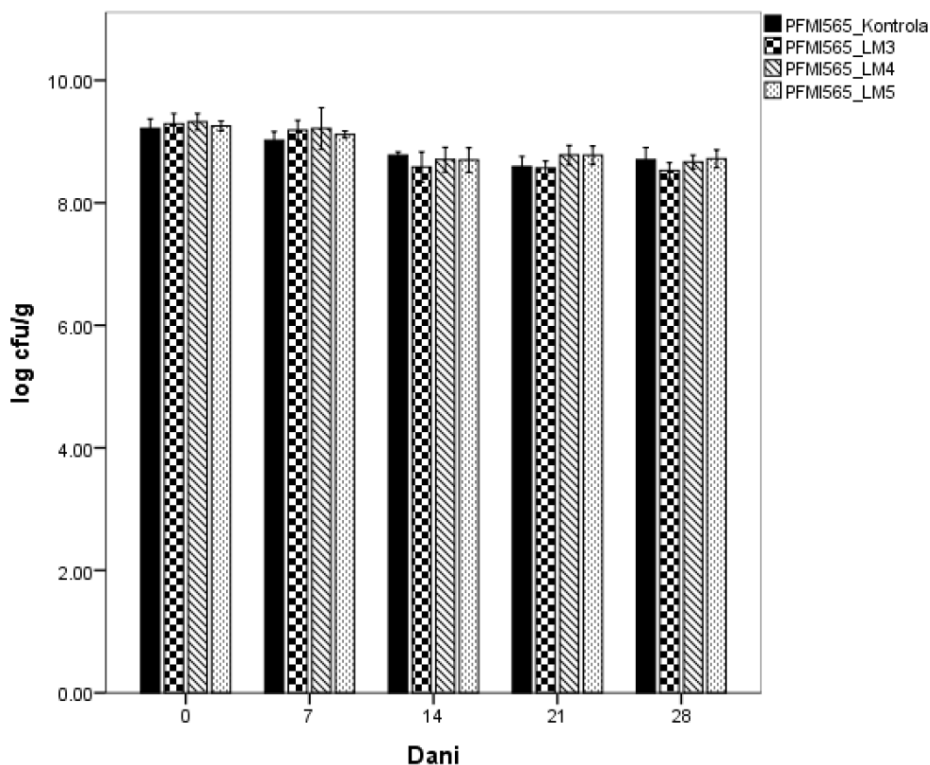
Posmatrajući interakciju dana i tretmana, može se konstatovati da postoji statistička značajna razlika ( $p \leq 0,05$ ). Broj laktokoka u uzorcima opada nakon 7 dana, a statistička značajnost se više može pripisati efektu perioda skladištenja.

Posmatrajući broj enterokoka u uzorcima kajmaka tokom 28 dana skladištenja (tabela 36), uočava se pad za  $\sim 1$  log cfu/g u periodu između 7. i 14. dana skladištenja, gde postoji statistički značajna razlika (za  $p \leq 0,05$ ). Takođe, između uzoraka sa različitim koncentracijama patogena, postoji značajna razlika. Broj enterokoka se, od 7. do 14. dana, u uzorcima sa početnom koncentracijom listerije  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ , smanjio za 0,60, 0,51, 0,42 log cfu/g, respektivno. Efekat interakcije dana sa tretmanima (različite koncentracije listerije) ima statističku značajnost, pa se može konstatovati da efekat dana zavisi od broja dodatih ćelija patogena, odn. postoji međusobna zavisnost.

Tabela 36. Promena broja *E. durans* PFMI565<sub>str</sub> u kajmaku tokom skladištenja (cfu/g)

Uzorak	0. dan	7. dan	14. dan	21. dan	28. dan
PFMI565_Kontrola	$1,66 \times 10^9 \pm 2,99$	$1,06 \times 10^9 \pm 0,18$	$6,03 \times 10^8 \pm 0,36$	$3,97 \times 10^8 \pm 0,73$	$5,14 \times 10^8 \pm 1,16$
PFMI565_LM3	$1,97 \times 10^9 \pm 0,38$	$1,55 \times 10^9 \pm 0,28$	$3,94 \times 10^8 \pm 1,10$	$3,71 \times 10^8 \pm 0,47$	$3,39 \times 10^8 \pm 0,52$
PFMI565_LM4	$2,12 \times 10^9 \pm 0,34$	$1,72 \times 10^9 \pm 0,68$	$5,18 \times 10^8 \pm 1,17$	$6,09 \times 10^8 \pm 1,12$	$4,63 \times 10^8 \pm 0,56$
PFMI565_LM5	$1,81 \times 10^9 \pm 0,17$	$1,31 \times 10^9 \pm 0,08$	$5,10 \times 10^8 \pm 1,17$	$6,04 \times 10^8 \pm 1,03$	$5,30 \times 10^8 \pm 0,90$

srednja vrednost broja ćelija (cfu/g)  $\pm$  standardna devijacija



Grafikon 19. Logaritam broja ćelija *E. durans* PFMI565<sub>str</sub> u kajmaku tokom skladištenja

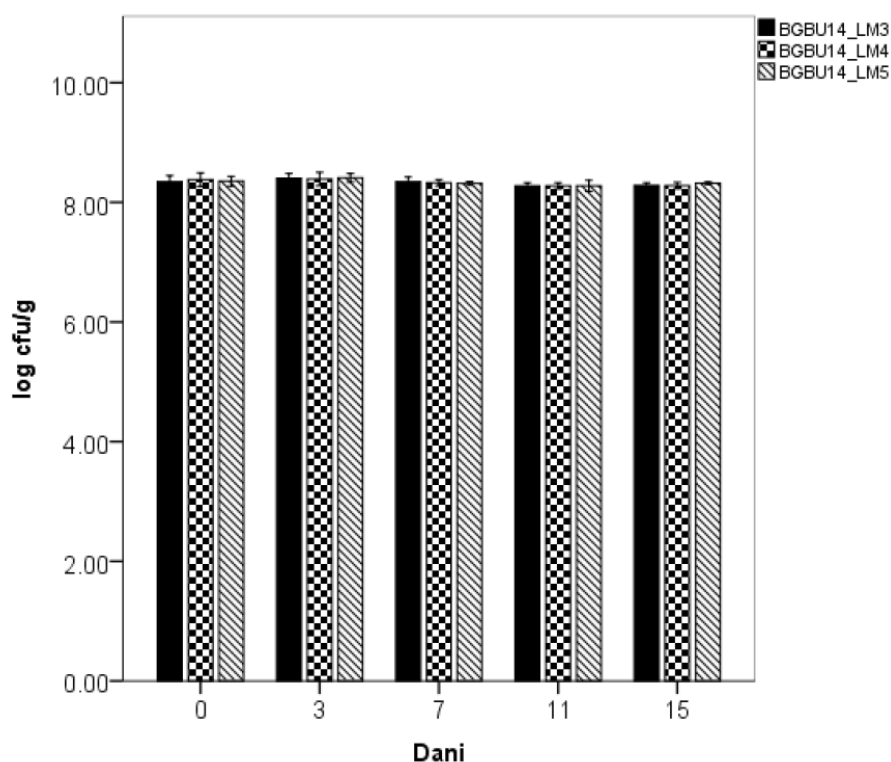
Bez obzira na konstantan pad broja enterokoka, kao i postojanje statistički značajne interakcije dana i različitih koncentracija patogena u uzorcima, broj enterokoka u uzorku do kraja perioda skladištenja kajmaka ostao je na nivou 8,5 - 8,72 logaritamske jedinice. Uzimajući u obzir dobro inhibitorno dejstvo prema listeriji, koje je pokazao PFMI565<sub>str</sub>, može se izvesti zaključak da bi primena ovog antilisterijski aktivnog soja u sredini kao što je kajmak, mogla biti opravdana. Mehanizam njegovog inhibitornog dejstva na *L. monocytogenes* mogao bi biti predmet daljih istraživanja.

### 5.11.3 Preživljavanje *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4<sub>rif</sub> i *E. durans* PFMI565<sub>str</sub> u lososu

Iz tabelarnog prikaza rezultata praćenja vijabilnosti bakteriocin-produkujućeg soja u lososu, tokom petnaestodnevno skladištenja na temperaturi rashlađivanja (tabela 37), uočava se konstantnost u broju cfu/g. Nije bilo statistički značajne razlike ( $p \leq 0,05$ ) u broju laktokoka. Različite početne koncentracije listerije u uzorcima, nisu uticale na broj BGBU1-4<sub>rif</sub>. Vrednosti su se kretale u intervalu 8,27 - 8,40 log cfu/g. Dobro preživljavanje laktokoka u uslovima proizvoda od ribe navode i drugi autori. Saithong et al. (2010) navode preživljavanje BMK u tajlandskoj fermentisanoj sušenoj ribi "plaa som", gde se njihov broj, od inicijalnih  $10^{10}$ , nakon 20 nedelja skladištenja na +4 °C, kretao između  $10^6$  i  $10^9$  cfu/g, u zavisnosti od načina sušenja.

Tabela 37. Promena broja BGBU14<sub>rif</sub> u lososu tokom skladištenja (cfu/g)

Uzorak	0. dan	3. dan	7. dan	11. dan	15. dan
BGBU14_L M3	2,22x10 <sup>8</sup> ±0,27	2,54x10 <sup>8</sup> ±0,23	2,21x10 <sup>8</sup> ±0,20	1,89x10 <sup>8</sup> ±0,11	1,92x10 <sup>8</sup> ±0,09
BGBU14_L M4	2,41x10 <sup>8</sup> ±0,31	2,47x10 <sup>8</sup> ±0,31	2,12x10 <sup>8</sup> ±0,12	1,89x10 <sup>8</sup> ±0,11	1,91x10 <sup>8</sup> ±0,11
BGBU14_L M5	2,26x10 <sup>8</sup> ±0,22	2,58x10 <sup>8</sup> ±0,22	2,07x10 <sup>8</sup> ±0,07	1,90x10 <sup>8</sup> ±0,21	2,09x10 <sup>8</sup> ±0,05



Grafikon 20. Logaritam broja ćelija BGBU1-4<sub>rif</sub> u lososu tokom skladištenja

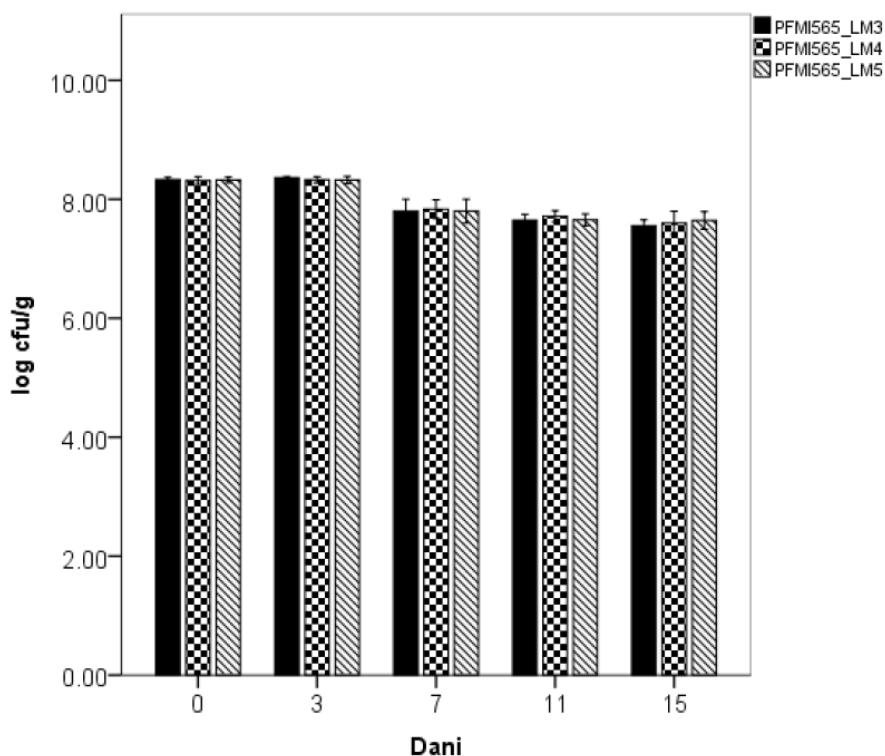
Takođe, protektivne kulture BMK su primenjene u jelu od sušenog lososa, gde su 14. dana, dostigle maksimalnu vrednost 8,9 - 9,5 log cfu/g, da bi se, do kraja eksperimentalnog perioda, 21. dana, zabeležio pad broja do 7,1 log cfu/g (Wiernasz et al., 2020).

Vijabilnost *E. durans* PFMI565<sub>str</sub> u lososu tokom perioda skladištenja, prikazana je u tabeli 38. Uočljiv je pad broja enterokoka od ~ 0,5 log cfu/g u periodu od 3. do 7. dana u svim uzorcima. Statistički značajne razlike među varijantama sa različitim koncentracijama patogena nije bilo. Nakon tog perioda, PFMI565<sub>str</sub> je pao 0,1 - 0,2 log cfu/g, sa ukupno postignutim padom broja ~ 0,7 log cfu/g.

Tabela 38. Promena broja *E. durans* PFMI565<sub>str</sub> u lososu tokom skladištenja (cfu/g)

Uzorak	0. dan	3. dan	7. dan	11. dan	15. dan
PFMI565_LM3	2,14x10 <sup>8</sup> ±0,09	2,29x10 <sup>8</sup> ±0,05	6,42x10 <sup>7</sup> ±1,47	4,45x10 <sup>7</sup> ±0,52	3,59x10 <sup>7</sup> ±0,41
PFMI565_LM4	2,06x10 <sup>8</sup> ±0,15	2,12x10 <sup>8</sup> ±0,12	6,89x10 <sup>7</sup> ±1,27	5,19x10 <sup>7</sup> ±0,55	4,05x10 <sup>7</sup> ±0,93
PFMI565_LM5	2,12x10 <sup>8</sup> ±0,10	2,11x10 <sup>8</sup> ±0,15	6,42x10 <sup>7</sup> ±1,47	4,52x10 <sup>7</sup> ±0,52	4,44x10 <sup>7</sup> ±0,72

srednja vrednost broja ćelija (cfu/g) ± standardna devijacija



Grafikon 21. Logaritam broja ćelija *E. durans* PFMI565<sub>str</sub> u lososu tokom skladištenja

Slične rezultate vijabilnosti enterokoka tokom skladištenja beleže i drugi autori. *E. faecium* ET05 primenjen u simuliranim uslovima hladno dimljenog lososa, od inicijalne koncentracije  $10^5 - 10^6$  cfu/g tokom perioda skladištenja na  $+5$  °C dostigao je  $10^9$  cfu/g (Tomé et al., 2008). Već je napomenuto da uslovi okruženja mogu bitno uticati na ispoljavanje antimikrobnih svojstava mikroorganizama, a što je, svakako, usko vezano za vijabilnost samog soja u određenoj sredini. Riba kao matriks se pokazala kao najnepovoljnija sredina za ispoljavanje inhibitornih svojstava sojeva PFMI565<sub>str</sub> i BGBU1-4<sub>rif</sub>, što je i razumljivo budući da sojevi potiču iz drugačije sredine. Prirodnu sredinu ovih sojeva karakteriše drugačiji hemijski sastav, nutritivna svojstva, koji predstavljaju jedan od faktora ispoljavanja njihovih uobičajenih svojstava.



## 6. ZAKLJUČAK

Sumiranjem i analizom dobijenih rezultata ovog istraživanja, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Iz tradicionalnih sireva proizvedenih na teritoriji Republike Srbije, izolovano je 200 sojeva, od kojih je 10 % pokazalo inhibitorno dejstvo prema *L. monocytogenes*. Na osnovu intenziteta antilisterijskog delovanja, izabran je izolat PFMI565, naknadno identifikovan kao *Enterococcus durans*. Istraživanju su pridružena i dva soja BMK, takođe iz tradicionalnih sireva, iz ranijih istraživanja: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 563 i *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4.

2. Sojevi su, u prvih 6 h, pokazali slabu acidogenu aktivnost u mleku, pa je zaključeno da nisu pogodni za primenu u svojstvu starter kulture, ali da postoji dobar potencijal za primenu u proizvodnji sira kao dodatne protektivne kulture.

3. Produkcija diacetila, potencijani razlog antimikrobnog delovanja BMK, potvrđena je kod sva tri soja i iznosila je: *L. lactis* subsp. *lactis* 563 –  $10,42 \pm 0,07$ ; *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 –  $15,07 \pm 2,42$ ; *E. durans* PFMI565 –  $11,46 \pm 0,16$ .

4. Kod sva tri soja detektovana je pozitivna reakcija na produkciju vodonik-peroksida, pa bi antilisterijski efekat mogao poticati i od ovog jedinjenja.

5. Testiranjem ispitivanih sojeva BMK na antibiotsku rezistenciju, utvrđeno je da je soj *E. durans* PFMI565 rezistentan na streptomycin, gentamicin i neomicin, dok je zona inhibicije, koja ukazuje na senzitivnost soja, uočena kod antibiotika, izuzetno značajnih u kliničkoj praksi: ampicilina, vankomicina, tetraciklina, penicilina, eritromicina i hloramfenikola. Soj *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4 nije pokazao rezistenciju ni na jedan testirani antibiotik.

6. Testiranjem antilisterijskog delovanja u modelu sira, autohtoni sojevi BGBU1-4 i PFMI565 ispoljili su aktivnost u svim varijantama, bez obzira na inicijalnu koncentraciju *L. monocytogenes*, pri čemu je njihovo najbrže i najbolje dejstvo zabeleženo u uzorcima sa najnižom inicijalnom koncentracijom *L. monocytogenes*  $10^3$  cfu/g. U tim varijantama, do 14. dana, delovanjem oba soja postignuto je sniženje prisustva *L. monocytogenes* ispod nivoa od 100 cfu/g. U varijanti sa komercijalnom starter kulturom, zabeležen je pad od jedne logaritamske jedinice do kraja eksperimentalnog perioda, a u kontrolnoj varijanti, vrednost patogena se zadržala na nivou 3 logaritamske jedinice.

U varijantama sa  $10^4$  cfu/g dodate *L. monocytogenes* delovanjem oba autohtona soja, 21. dana postignuto je sniženje prisustva *L. monocytogenes* ispod nivoa od 100 cfu/g. Konstatovana je statistički značajna razlika između uzoraka sa primenjenim autohtonim sojevima i kontrolnog uzorka, kao i uzorka u kom je kao starter kultura korišćena komercijalna starter kultura.

U varijantama sa početnom koncentracijom *L. monocytogenes*  $10^5$  cfu/g, 21. dana praćenja, zabeležen je najveći pad broja patogenih ćelija u varijantama sa autohtonim BMK, pri čemu su oba soja postigla snižavanje broja *L. monocytogenes* na nivo od  $10^1$  cfu/g. U ovom danu, autohtoni sojevi su postigli drastično snižavanje *L. monocytogenes* od 4,21 logaritamskih jedinica u odnosu na početni broj, za *E. durans* PFMI565<sub>str</sub> i 3,89 log za BGBU1-4<sub>rif</sub>, da bi u poslednjoj tački praćenja smanjenje bilo još veće i iznosilo 4,74, odnosno 4,56 log cfu/g, respektivno.

U varijantama sa dodatim  $10^3$  i  $10^4$  cfu/g *L. monocytogenes*, u 35. danu nije bilo prisustva ovog patogena, a u varijanti sa najvećom koncentracijom *L. monocytogenes* ( $10^5$  cfu/g), broj ćelija patogena se na kraju praćenja održao na nivou od  $10^1$  cfu/g.

7. Praćenjem rezultata antilisterijske aktivnosti, u siru od UF mleka, u varijantama sa sve tri početne koncentracije *L. monocytogenes*, zabeleženo je smanjenje broja patogenih ćelija tokom skladištenja. Najbolji rezultat u odnosu na kontrolni sir, u varijantama sa koncentracijom *L.*

*monocytogenes*  $10^3$  cfu/g, postignut je 21. dana u uzorcima sa primenjenim BGBU1-4<sub>rif</sub> i kombinacijom sojeva PFMI565<sub>str</sub> i BGBU1-4<sub>rif</sub>, pri čemu je broj *L. monocytogenes* bio na nivou  $10^1$  cfu/g. Trend opadanja broja ćelija *L. monocytogenes* u svim uzorcima nastavljen je do kraja perioda praćenja. Poslednji dan karakteriše pad broja ćelija *L. monocytogenes* u svim uzorcima, što je i očekivano, a najveći pad postignut je u uzoraku sa BGBU1-4<sub>rif</sub>. Poređenjem rezultata sa rezultatima antilisterijske aktivnosti autohtonih sojeva BMK u modelu sira, uočava se nešto sporije delovanje PFMI565<sub>str</sub> i BGBU1-4<sub>rif</sub> u siru od UF mleka.

Varijante sireva sa *L. monocytogenes* inokulisanom u koncentraciji  $10^4$  cfu/g karakteriše najbolje inhibitorno dejstvo soja BGBU1-4<sub>rif</sub>, gde se od početka do 21. dana beleži pad od 3,35 logaritamskih jedinica. U 21. danu ovaj soj snižava broj patogenih ćelija *L. monocytogenes* na  $10^1$  cfu/g, što je za 1 log bolje u odnosu na ostale uzorke sa autohtonim sojevima BMK, što se podudara sa rezultatima njegove antilisterijske aktivnosti u modelu sira, a za 2 logaritamske jedinice bolje u odnosu na sir sa komercijalnom starter kulturom. Do kraja eksperimentalnog perioda, u svim uzorcima sa autohtonim sojevima BMK, njihovim antilisterijski delovanjem, snižen je broj ćelija *L. monocytogenes* do zakonski prihvatljive vrednosti ( $10^2$  cfu/g).

Najznačajniji pad u broju ćelija *L. monocytogenes*, u varijantama sireva sa *L. monocytogenes* dodatog u koncentraciji  $10^5$  cfu/g, uočava u 14. danu za 2,68 logaritamskih jedinica, u varijanti sira sa BGBU1-4<sub>rif</sub>, a neznatno lošije antilisterijsko dejstvo pokazuje mešavina autohtonih izolata. Zabeležena je slabija antilisterijska aktivnost PFMI565<sub>str</sub> u odnosu na varijante BGBU1-4<sub>rif</sub> i BGBU1-4<sub>rif</sub>\_PFMI565<sub>str</sub> 21. dana praćenja, u uzorcima sa inokulisanim BGBU1-4<sub>rif</sub> i BGBU1-4<sub>rif</sub>\_PFMI565<sub>str</sub>, broj *L. monocytogenes* snižen je do  $10^1$  cfu/g, dok je u varijanti sa PFMI565<sub>str</sub> zabeleženo  $10^2$  cfu/g. Broj ćelija *L. monocytogenes* se nakon 35. dana skladištenja, u varijantama sa autohtonim sojevima, kretao u vrednostima 1,20 - 2,03 log, dok je u kontrolnoj varijanti zabeležena vrednost 4,10 log. Može se zaključiti da se delovanjem autohtonih sojeva BGBU1-4<sub>rif</sub> i PFMI565<sub>str</sub>, postiže dobra antilisterijska aktivnost u siru od UF mleka, a najbolje delovanje pokazao je soj BGBU1-4<sub>rif</sub> u uzorcima sa početnim brojem *L. monocytogenes*  $10^3$  cfu/g.

8. Svi sirevi sa ispitivanim autohtonim sojevima, primenjenim u svojstvu dodatne kulture, dobili su visoke ocene od strane senzornih ocenjivača. Sir dobijen samo sa komercijalnom starter kulturom je imao lošije karakteristike u gotovo svim ispitivanim tačkama tokom zrenja i skladištenja, tokom čitavog perioda praćenja, sa značajnom razlikom u odnosu na sir proizveden upotrebom ispitivanih sojeva. Varijante sireva sa PFMI565<sub>str</sub> i BGBU1-4<sub>rif</sub> u kombinaciji sa komercijalnim starterom, pokazale su dobra senzorna svojstva, sa procentom maksimalnog kvaliteta 84,40 - 94,60 %, znatno višim nego u slučaju sira sa komercijalnom starter kulturom, gde se kretao u opsegu 56,40 - 85,90 %. Uzimajući u obzir rezultate senzorne ocene, može se ustanoviti da primena sojeva PFMI565<sub>str</sub> i BGBU1-4<sub>rif</sub>, kao dodatnih kultura, pozitivno utiče na razvoj senzornih svojstava sira od UF mleka.

9. Testiranjem antimikrobne aktivnosti autohtonih sojeva u kajmaku, bez obzira na početnu koncentraciju *L. monocytogenes*, ove varijante pokazale su bolje antilisterijsko delovanje u odnosu na kontrolu. Kod svih varijanti kajmaka, najbolji rezultati postignuti su 7 - 14. dana, pri čemu je, u varijantama sa početnom koncentracijom *L. monocytogenes*  $10^3$  cfu/g, najbolju inhibiciju ispoljila kombinacija sojeva BGBU1-4<sub>rif</sub> i PFMI565<sub>str</sub> sa padom broja *L. monocytogenes* od 1,21 log cfu/g. U 14. danu, i u uzorcima sa pojedinačno primenjenim autohtonim sojevima BMK, postignuta je vrednost  $10^1$  cfu/g i na tom nivou je ostala do kraja perioda praćenja, što odgovara Kriterijumima bezbednosti hrane. Sve tri varijante kajmaka sa autohtonim sojevima pokazale su inhibitorno dejstvo prema *L. monocytogenes* sa padom broja od ~ 2 logaritamske jedinice u odnosu na inicijalni broj, dok je u kontrolnoj varijanti, 28. dana, pad broja iznosio 0,65 logaritamskih jedinica. Najbolju antilisterijsku aktivnost je dala kombinacija autohtonih sojeva, sa padom od 2,05 log cfu/g u odnosu na početni broj. U kajmaku, kao i u modelu sira, u uzorcima sa sojevima BGBU1-4<sub>rif</sub> i PFMI565<sub>str</sub>, smanjen je broj ćelija *L. monocytogenes* (inicijalno  $10^3$  cfu/g) na  $10^1$  cfu/g u 14. danu, dok je u siru od UF mleka ta vrednost postignuta 21. dana.

U varijantama kajmaka sa početnom koncentracijom *L. monocytogenes*  $10^4$  cfu/g, najveći pad u broju *L. monocytogenes* uočava se u periodu između 7. i 14. dana, u kom su varijante sa sojem PFMI565<sub>str</sub> i kombinacija PFMI565<sub>str</sub> i BGBU1-4<sub>rif</sub> ispoljili antimikrobnu aktivnost sa smanjenjem broja ćelija *L. monocytogenes* od 1,78 i 1,42 logaritamskih jedinica. Trend pada broja ćelija *L. monocytogenes* nastavljen je do poslednjeg dana eksperimentalnog perioda, sa statistički značajnom razlikom broja ćelija patogena u uzorcima sa autohtonim sojevima, u odnosu na kontrolni uzorak kajmaka. Uočava se statistički značajan trend opadanja broja ćelija patogena u uzorcima sa sojevima BGBU1-4<sub>rif</sub> i PFMI565<sub>str</sub> u odnosu na kontrolu. Najbolja antilisterijska aktivnost zabeležena je 28. dana delovanjem kombinacije autohtonih BGBU1-4<sub>rif</sub> i PFMI565<sub>str</sub>, gde je postignuta vrednost za  $\sim 2,2$  log cfu/g niža od vrednosti broja *L. monocytogenes* u kontrolnom uzorku kajmaka.

Uzorke sa početnim brojem ćelija *L. monocytogenes*  $10^5$ , od 0. do 21. dana skladištenja, na nedeljnom nivou, odlikuje pad broja  $\sim 1$  log cfu/g. 28. dana broj ćelija *L. monocytogenes* u varijantama sa autohtonim BMK, je bio na nivou  $10^2$  cfu/g, pri čemu je varijanta sa PFMI565<sub>str</sub> postigla nešto bolji efekat, smanjujući broj listerije na 2,42 log, a varijanta sa kombinacijom na 2,82 log jedinice, tako da, vrednost propisana Kriterijumima bezbednosti hrane nije postignuta do kraja eksperimentalnog perioda.

10. U varijantama uzoraka lososa sa BGBU1-4<sub>rif</sub> dobijeni su bolji rezultati antilisterijske aktivnosti u odnosu na uzorak sa PFMI565<sub>str</sub>. U uzorcima sa najmanjom primenjenom početnom koncentracijom *L. monocytogenes*, uticajem kombinacije sojeva BGBU1-4<sub>rif</sub> i PFMI565<sub>str</sub>, u 3. danu, dobijeni su najbolji rezultati antilisterijske aktivnosti, sa smanjenjem broja ćelija *L. monocytogenes* za 1 log, postižući nivo od  $10^2$  cfu/g na kom se zadržao do kraja eksperimenta. U varijanti lososa sa PFMI565<sub>str</sub>, u 3. danu se beleži pad od 0,23 log, a potom, počev od 7. dana, neveliki porast broja, tako da je u ovoj varijanti broj ćelija *L. monocytogenes* bio na nivou od  $10^3$  cfu/g od početka do kraja eksperimenta. U uzorcima sa inicijalnim brojem ćelija *L. monocytogenes*  $10^4$  cfu/g, 3. dana, najveći pad prouzrokovao je PFMI565<sub>str</sub>, gde je postigao smanjenje broja patogenih ćelija listerije do  $10^3$  cfu/g, a u ostalim uzorcima sa autohtonim sojevima BMK, pad do nivoa  $10^3$  cfu/g se dogodio 7. dana. Do kraja perioda skladištenja, broj ćelija *L. monocytogenes* u svim varijantama se održao na nivou  $10^3$  cfu/g.

U varijantama lososa sa početnim brojem *L. monocytogenes*  $10^5$  cfu/g, od 0 - 3. dana, u svim uzorcima sa autohtonim kulturama, beleži se pad od  $\sim 1$  logaritamske jedinice, pri čemu je najveće smanjenje broja ćelija *L. monocytogenes* zabeleženo delovanjem kombinacije sojeva. Za period skladištenja 3 - 7. dana, karakterističan je najveći pad u broju patogena pod uticajem soja PFMI565<sub>str</sub>, nakon čega, broj ćelija *L. monocytogenes* raste, opet za  $\sim 1$  logaritamsku jedinicu do 15. dana. Na kraju eksperimentalnog perioda, najbolje inhibitorno dejstvo pokazala je kombinacija sojeva, sa smanjenjem broja ćelija patogena za  $\sim 2$  logaritamske jedinice. Generalno se može izvesti zaključak da su selektovani antimikrobni sojevi ispoljili slabije inhibitorno delovanje prema *L. monocytogenes* u uzorcima lososa.

11. Broj testiranih autohtonih sojeva se održavao na visokom nivou u svim uzorcima ispitivane hrane. U siru od UF mleka uočena je bolja vijabilnost autohtonog soja BGBU1-4<sub>rif</sub> u odnosu na PFMI565<sub>str</sub> gde se broj laktokoka u poslednjoj tački merenja kretao  $\sim 8,7$  log cfu/g, dok je zabeležen pad broja enterokoka od početnih  $\sim 8,5$  do  $\sim 7,5$  log. U uzorcima kajmaka, do kraja perioda skladištenja, broj enterokoka se održavao na  $\sim 8,5$  do  $\sim 8,7$  log cfu/g, a broj laktokoka se kretao u opsegu vrednosti  $\sim 8,41$  do  $\sim 8,52$ . Tokom perioda skladištenja lososa, preživljavanje laktokoka bilo je bolje, a broj se, na kraju eksperimentalnog perioda, kretao  $\sim 8,23$  do  $\sim 8,32$  log cfu/g, u odnosu na broj enterokoka koji je iznosio  $\sim 7,56$  do  $\sim 7,65$  log cfu/g. Razlika u vijabilnosti sojeva mogla bi predstavljati jedan od razloga za evidentirano bolje antilisterijsko delovanje laktokoka u odnosu na enterokoke u lososu.

12. Autohtoni sojevi *E. durans* PFMI565 i *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* BGBU1-4<sub>rif</sub> su pokazali inhibitorno delovanje prema *L. monocytogenes* ATCC19111. Razmatrajući prikazane rezultate, dolazi se do zaključka da se radi o obećavajućim sojevima, sa neospornom

mogućnošću primene u proizvodnji hrane. Međutim, priroda antilisterijskog(ih) metabolita soja *E. durans* PFMI565 još uvek nije definisana, jer je ustanovljeno da se ne radi o dejstvu bakteriocina.

Mehanizam inhibitornog delovanja još uvek nije dovoljno ispitan, što bi moglo biti smernica za neka buduća istraživanja, s obzirom da bi sagledavanje ovog problema doprinelo boljoj kontroli patogena u industrijskoj proizvodnji hrane. Takođe, daljim istraživanjima, neophodno je utvrditi i prisustvo faktora virulencije, pre nego se soj *E. durans* PFMI565 primeni u komercijalne svrhe u svojstvu dodatne protektivne kulture, u proizvodnji hrane.

## 7. LITERATURA

- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M. and Hosseini, H. (2014): Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*. Elsevier Ltd. 35(1): 177–183. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.07.004.
- Adnan, M., Patel, M., Hadi, S. (2017): Functional and health promoting inherent attributes of *Enterococcus hirae* F2 as a novel probiotic isolated from the digestive tract of the freshwater fish *Catla catla*. *PeerJ*. 5:e3085. doi: 10.7717/peerj.3085.
- Adzitey, F. (2010): *Listeria monocytogenes* in foods: Incidences and possible control measures. *African Journal of Microbiology Research* 4(25). 2848–2855.
- Akalin, A. S., Gönç, S., Ünal, G., Ökten, S. (2006): Determination of some chemical and microbiological characteristics of Kaymak. *Grasas y Aceites*. 57(4): 429–432. doi: 10.3989/gya.2006.v57.i4.70.
- 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(17): 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
- Alshammari, E., Patel, M., Sachidanandan, M., Kumar, P., Adnan, M. (2019): Potential Evaluation and Health Fostering Intrinsic Traits of Novel Probiotic Strain *Enterococcus durans* F3 Isolated from the Gut of Fresh Water Fish *Catla catla*. *Food Science of Animal Resources*. 39(5): 844-861. doi: 10.5851/kosfa.2019.e57.
- Amaral, D.M.F., Silva, L.F., Casarotti, S.N., Nascimento, L.C.S. (2017): *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolated from cheese: Survival in the presence of medications under simulated gastrointestinal conditions and adhesion properties. *Journal of Dairy Science*. 100(2): 933-949. doi: 10.3168/jds.2016-11513.
- Ammor, M.S. and Mayo, B. (2007): Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science*. 76(1): 138–146. doi: 10.1016/j.meatsci.2006.10.022.
- Anacarso, I., Anacarso, I., Messi, P., Condò, C., Iseppi, R., Bondi, M., Sabia, C., de Niederhäusern, S. (2014): A bacteriocin-like substance produced from *Lactobacillus pentosus* 39 is a natural antagonist for the control of *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in fresh salmon fillets. *LWT - Food Science and Technology*. Elsevier Ltd. 55(2): 604–611. doi: 10.1016/j.lwt.2013.10.012.
- Ananou, S., Muñoz, A., Martínez-Bueno, M., González-Tello, P., Gálvez, A., Maqueda, M., Valdivia, E. (2010): Evaluation of an enterocin AS-48 enriched bioactive powder obtained by spray drying. *Food Microbiology*. 27(1): 58–63. doi: 10.1016/j.fm.2009.08.002.
- Anastasiadou, S., Papagianni, M., Filiouis, G., Ambrosiadis, I., Koidis, P. (2008): Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: Production conditions,

purification and characterization. *Biosource Technology*. 99(13): 5384-5390. doi: 10.1016/j.biortech.2007.11.015.

Araújo, T.F. and Ferreira, C.L. de L.F. (2013): The genus enterococcus as probiotic: Safety concerns. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 56(3): 457–466. doi: 10.1590/S1516-89132013000300014.

Arefin, S., Sarker, M.A.H., Islam, M. A., Harun-ur-Rashid, M., Islam, M.N. (2017): Use of Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in raw cow's milk preservation. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*. 4(4): 371–377. doi: 10.5455/javar.2017.d236.

Arqués, J.L., Rodriguez, E., Langa, S., Landete, J.M., Medina, M. (2015): Antimicrobial activity of lactic acid bacteria in dairy products and gut: Effect on pathogens. *BioMed Research International*. doi: 10.1155/2015/584183.

Axelsson, L. (2004): Lactic acid bacteria: classification and physiology. Pears in: Salminen, S., Wright, A., Ouwehand, A. (Eds.), *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. 3rd rev. and exp. ed., Marcel Dekker Inc., New York, pp. 1–66.

Baccouri, O., Boukerb, A.M., Farhat, L.B., Zébré, A., Zimmermann, K., Domann, E., Cambronel, M., Barreau, M., Maillot, O., Rincé, I., Muller, C., Marzouki, M. N., Feuilloley, M., Abidi, F., Connil, N. (2019): Probiotic Potential and Safety Evaluation of *Enterococcus faecalis* OB14 and OB15, Isolated from Traditional Tunisian Testouri Cheese and Rigouta, Using Physiological and Genomic Analysis. *Frontiers in Microbiology*. 10(APR). doi: 10.3389/fmicb.2019.00881.

Barancelli, G.V., Camargo, T.M., Reis, C.M.F., Porto, E., Hofer, E., Oliveira, C.A.F. (2011): Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese manufacturing plants from the northeast region of São Paulo, Brazil. *Journal of Food Protection*. 74(5): 816–819. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-10-489.

Barancelli, G.V., Camargo, T.M., Gagliardi, N.G., Porto, E., Souza, R.A., Campioni, F., Falcão, J.P., Hofer, E., Cruz, A.G., Oliveira, C.A.F. (2014): Pulsed-Field Gel Electrophoresis characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from cheese manufacturing plants in São Paulo, Brazil. *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V. 173: 21–29. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.018.

Batt, C. A. (2014): *Lactococcus*: Introduction. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*. 2: 439–441. doi: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00181-6.

Bigwood, T. et al. (2012): Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Enterococcus mundtii* isolated from soil. *Food Microbiology*. Elsevier Ltd, 32(2): 354–360. doi: 10.1016/j.fm.2012.07.015.

Bintsis, T. (2018): Lactic acid bacteria: their applications in foods. *Journal of Bacteriology and Mycology: Open Access*. 6(2): 89–94. doi: 10.15406/jbmoa.2018.06.00182.

Blázquez, I.O., Burgos, M.J.G., Pérez-Pulido, R., Gálvez, A., Lucas, R. (2018): Treatment with high-hydrostatic pressure, activated film packaging with thymol plus enterocin AS-48, and its combination modify the bacterial communities of refrigerated sea bream (*Sparus aurata*) fillets. *Frontiers in Microbiology*. 9(FEB): 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2018.00314.

- Benkerroum, N. (2013): Traditional fermented foods of north African countries: technology and food safety challenges with regard to microbiological risks. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 12: 54–89. doi: 10.1111/j.1541-4337.2012.00215.
- Ben Braïek, O. and Smaoui, S. (2019): Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics. *BioMed research international*. p. 5938210. doi: 10.1155/2019/5938210.
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M. (2001): Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*. 11(4–7): 259–274. doi: 10.1016/S0958-6946(01)00056-5.
- Bojanić Rasović, M., Mayrhofer, S., Martinović, A., Dürr, K., Domig, K. J. (2017): Lactococci of Local Origin as Potential Starter Cultures for Traditional Montenegrin Cheese Production. *Food Technol. Biotechnol.* 55(1): 55-66.
- Buchanan, R.L., Gorris, L.G.M., Hayman, M.M., Jackson, T.C., Whiting, R.C. (2017): A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*. Elsevier Ltd. 75: 1–13. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.12.016.
- Burgos, M.J.G., Pulido, R.P., Aguayo, M.C.L., Gálvez, A., Lucas, R. (2014): The cyclic antibacterial peptide enterocin AS-48: Isolation, mode of action, and possible food applications. *International Journal of Molecular Sciences*. 15(12): 22706–22727. doi: 10.3390/ijms151222706.
- Buyong, N., Kok, J., Luchansky, J.B. (1998): Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(12): 4842-4845.
- Byappanahalli, M.N., Nevers, M.B., Korajkic, A., Staley, Z.R., Harwood, V.J. (2012): Enterococci in the Environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 76(4): 685–706. doi: 10.1128/mubr.00023-12.
- CAC (2003): Recommended International code of practice general principles of food hygiene CAC/RCP 1-1969, Rev. 4-2003, pp. 1–31.
- CAC/GL (2007): Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *listeria monocytogenes* in foods. 61: 1–28. [http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10740/CXG\\_061e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10740/CXG_061e.pdf).
- Cakmakci, S. and Hayaloglu, A.A. (2011): Evaluation of the chemical, microbiological and volatile aroma characteristics of Ispir Kaymak, a traditional Turkish dairy product. *International Journal of Dairy Technology*. 64(3): 444–450. doi: 10.1111/j.1471-0307.2011.00687.
- Campagnollo, F.B., Margalho, L.P., Kamimura, B.A., Feliciano, M.D., Freire, L., Lopes, L.S., Alvarenga, V.O., Cadavez, V.A.P., Gonzales-Barron, U., Schaffner, D.W., Sant'Ana, A.S. (2018): Selection of indigenous lactic acid bacteria presenting anti-listerial activity, and their role in reducing the maturation period and assuring the safety of traditional Brazilian cheeses. *Food microbiology*. 73(18): 288-297.

- Caplice, E. and Fitzgerald, G.F. (1999): Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 50(1–2): 131–149. doi: 10.1016/S0168-1605(99)00082-3.
- Catarino, I., Martins, A.P.L., Duarte, E., Prudêncio, E.S., De Pinho, M.N. (2013): Rennet coagulation of sheep milk processed by ultrafiltration at low concentration factors. *Journal of Food Engineering*. Elsevier Ltd. 114(2): 249–254. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2012.08.013.
- Champagne, C.P., Gardner, N.J. and Roy, D. (2005): Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 45(1): 61–84. doi: 10.1080/10408690590900144.
- Cintas, L.M., Casaus, P., Håvarstein, L.S., Hernández, P.E. and Nes, I.F. (1997): Biochemical and genetic characterization of enterocin P, a novel sec-dependent bacteriocin from *Enterococcus faecium* P13 with a broad antimicrobial spectrum. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4321–4330.
- Commission regulation (EC) (2005): No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*. 2073: 1-19.
- Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C. (2013): Bacteriocins-a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*. 11(2): 95-105. doi: 10.1038/nrmicro2937.
- Coelho, M.C., Silva, C.C.G., Ribeiro, S.C., Dapkevicius, M.L.N.E., Rosa, H.J.D. (2014): Control of *Listeria monocytogenes* in fresh cheese using protective lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V. 191: 53–59. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.029.
- Collins, M. D., Farrow, J. A. E. and Jones, D. (1986): *Enterococcus mundtii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 36(1): 8–12. doi: 10.1099/00207713-36-1-8.
- Costa, N.E., O’Callaghan, D.J., Mateo, M.J., Chaurin, V., Castillo, M., Han-non, A.J., McSweeney, P.L.H., Beresford, T.P. (2012): Influence of an exopolysaccharides produced by a starter on milk coagulation and curd syneresis. *International Dairy Journal*. 22: 48-57.
- Čabarkapa, I. (2015): Sposobnost formiranja biofilma različitih sojeva *Salmonella enteritidis* i inhibitorni efekat etarskih ulja na inicijalnu adheziju i formirani biofilm. *Doktorska disertacija*. Tehnološki fakultet Univerziteta u Novom Sadu.
- Da Costa, R.J., Voloski, Flávia L.S., Mondadori, R.G., Duval, E.H., Fiorentini, Â.M. (2019): Preservation of Meat Products with Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat. *Journal of Food Quality*. doi: 10.1155/2019/4726510.
- D’Amico, D.J., Druart, M.J. and Donnelly, C.W. (2008): 60-day aging requirement does not ensure safety of surface-mold-ripened soft cheeses manufactured from raw or pasteurized milk when *Listeria monocytogenes* is introduced as a postprocessing contaminant. *Journal of Food Protection*. 71(8): 1563–1571. doi: 10.4315/0362-028X-71.8.1563.
- Damir, A.A., Salama, A.A. and Mohamed, M.S. (1992): Acidity, microbial, organic and free amino acids development during fermentation of skimmed milk, Kishk. *Food Chemistry*. 43(4): 265–269. doi: 10.1016/0308-8146(92)90210-S.



- De Angelis, M., Corsetti, A., Tosti, N., Rossi, J., Corbo, M.R., Gobbetti, M. (2001): Characterization of Non-Starter Lactic Acid Bacteria from Italian Ewe Cheeses Based on Phenotypic, Genotypic, and Cell Wall Protein Analyses. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(5): 2011–2020. doi: 10.1128/AEM.67.5.2011-2020.2001.
- De Martinez, Y.B., Ferrer, K. and Salas, E.M. (2002): Combined effects of lactic acid and nisin solution in reducing levels of microbiological contamination in red meat carcasses. *Journal of Food Protection*. 65(11): 1780–1783. doi: 10.4315/0362-028X-65.11.1780.
- Di Ciccio, P., Meloni, D., Festino, A.R., Conter, M., Zanardi, E., Ghidini, S., Vergara, A., Mazzette, R., Ianieri, A. (2012): Longitudinal study on the sources of *Listeria monocytogenes* contamination in cold-smoked salmon and its processing environment in Italy. *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V. 158(1): 79–84. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.06.016.
- Dillon, V.M. (2014): Natural Anti-Microbial Systems: Preservative Effects During Storage. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*. Second Edi. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00238-X.
- Dygico, L.K., Gahan, C.G.M., Grogan, H., Burgess, C.M. (2020): The ability of *Listeria monocytogenes* to form biofilm on surfaces relevant to the mushroom production environment. *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V. 317. p. 108385. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108385.
- Đukić Vuković, A.J., Mojović, L.J.V., Pejin, D., Vukašinović-Sekulić, M., Rakin, M., Nikolić, S., Pejin, J. (2011): Novi pravci i izazovi u proizvodnji mlečne kiseline na obnovljivim sirovinama. *Hem. Ind.* 65(4): 411–422. doi: 10.2298/HEMIND110114022D.
- EFSA and ECDC (2016): The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*. 14(12): 4634–4865.
- EFSA and ECDC (2017): The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 15(12). doi: 10.2903/j.efsa.2012.2597.
- EFSA and ECDC (2019): The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA Journal*. 17(12). doi: 10.2903/j.efsa.2019.5926.
- El-Gazzar, F.E., Bohner, H.F. and Marth, E.H. (1992): Antagonism Between *Listeria monocytogenes* and Lactococci During Fermentation of Products from Ultrafiltered Skim Milk. *Journal of Dairy Science*. Elsevier. 75(1): 43–50. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(92)77736-4.
- Ennahar, S., Aoude-Werner, D., Assobhei, O., Hasselmann, C. (1998): Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. *Journal of Applied Microbiology*. 85: 521-526.
- Eyad, A., Mitesh, P., Manojkumar, S., Prashant, K. and Mohd, A. (2019): Potential Evaluation and Health Fostering Intrinsic Traits of Novel Probiotic Strain *Enterococcus durans* F3 Isolated

- from the Gut of Fresh Water Fish *Catla catla*. *Food Sci. Anim. Resour.* 39(5): 844-861. doi: 10.5851/kosfa.2019.e57.
- Farber, J.M. (1991): *Listeria monocytogenes* in fish products. *Journal of Food Protection.* 54(12): 922–924. doi: 10.4315/0362-028x-54.12.922.
- FDA (2012): *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Bad Bug Book Second Edition.* Available from: <https://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/>.
- Fernandez-Garcia, E. and McGregor, J.U. (1994): Determination of Organic Acids During the Fermentation and Cold Storage of Yogurt. *Journal of Dairy Science.* Elsevier. 77(10): 2934–2939. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(94)77234-9.
- Fetsch, A. and Johler, S. (2018): *Staphylococcus aureus* as a Foodborne Pathogen. *Current Clinical Microbiology Reports.* *Current Clinical Microbiology Reports.* 5(2): 88–96. doi: 10.1007/s40588-018-0094-x.
- Fisher, K. and Phillips, C. (2009): The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology.* 155(6): 1749–1757. doi: 10.1099/mic.0.026385-0.
- Foulquié Moreno, M.R. et al. (2006): The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology.* 106(1): 1–24. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026.
- Frece, J., Kos, B., Beganović, J., Vuković, S., Šušković, J. (2005): In vivo testing of functional properties of three selected probiotic strains. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 21(8–9): 1401–1408. doi: 10.1007/s11274-005-5741-8.
- Gaamouche, S., Arakrak, A., Bakkali, M., Laglaoui, A. (2014): Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and bacteriocins isolated from a traditional brine table olives against pathogenic bacteria. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 3(11): 657–666. Available at: <http://www.ijcmas.com>.
- Gao, Z., Daliri, E.B.M., Wang, J.U.N., Liu, D., Chen, S., Ye, X., Ding, T. (2019): Inhibitory effect of lactic acid bacteria on foodborne pathogens: A review. *Journal of Food Protection.* 82(3): 441–453. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-18-303.
- Ganguly, S. (2013): Basic principles for effective food preservation: A review. *Int. J. Pure App. Biosci.* 1(6): 84–85.
- Giraffa, G. (2014): Overview of the ecology and biodiversity of the LAB. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy.* 9781444333: 45–54. doi: 10.1002/9781118655252.ch4.
- Golić, N., Čadež, N., Terzić-Vidojević, A., Šuranská, H., Beganović, J., Lozo, J., Kos, B., Šušković, J., Raspor, P., Topisirović, Lj. (2013): Evaluation of lactic acid bacteria and yeast diversity in traditional white pickled and fresh soft cheeses from the mountain regions of Serbia and lowland regions of Croatia. *International Journal of Food Microbiology.* 166(2): 294–300. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.032.

- Guidone, A., Braghieri, A., Cioffi, S., Claps, S., Genovese, F., Morone, G., Napolitano, F., Parente, E. (2015): Effect of adjuncts on microbiological and chemical properties of Scamorza cheese. *Journal of Dairy Science*. Elsevier. 98(3): 1467–1478. doi: 10.3168/jds.2014-8554.
- Guinane, C.M., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. (2005): Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. *Journal of Applied Microbiology*. 98(6): 1316-1325. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02552.x.
- Güler, Z., Gürsoy-Balci, A.C. (2011): Evaluation of volatile compounds and free fatty acids in set types yogurts made of ewes', goats' milk and their mixture using two different commercial starter cultures during refrigerated storage. *Food chemistry*. 127(3): 1065-1071. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.01.090.
- Haghshenas, B., Haghshenas, M., Nami, Y., Khosroushahi, A.Y., Abdullah, N., Barzegari, A., Rosli, R., Hejazi, M.S. (2016): Probiotic assessment of *Lactobacillus plantarum* 15HN and *Enterococcus mundtii* 50H isolated from traditional dairies microbiota. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 6(1): 37-47. doi: 10.15171/apb.2016.07.
- Hammami, R., Fernandez, B., Lacroix, C., Fliss, I. (2013): Anti-infective properties of bacteriocins: An update. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 70(16): 2947-2967. doi: 10.1007/s00018-012-1202-3.
- Hanchi, H., Hammami, R., Kourda, R. Hamida, J.B., Fliss, I. (2014): Bacteriocinogenic properties and in vitro probiotic potential of enterococci from Tunisian dairy products. *Archives of Microbiology*. 196(5): 331–344. doi: 10.1007/s00203-014-0978-y.
- Hanchi, H., Mottawea, W., Sebei, K., Hammami, R. (2018): The genus *Enterococcus*: Between probiotic potential and safety concerns-an update. *Frontiers in Microbiology*. 9(AUG): 1–16. doi: 10.3389/fmicb.2018.01791.
- Hancock, L.E., Murray, B. E. and Sillanpää, J. (2014): *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection, Enterococcal Cell Wall Components and Structures*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24649506>.
- Harris, L.J., Daeschel, M.A., Stiles, M.E., Klaenhammer, T.R. (1989): Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 52(6): 384–387. doi: 10.4315/0362-028x-52.6.384.
- Harvey, J., Keenan, K.P. and Gilmour, A. (2007): Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology*. 24(4): 380–392. doi: 10.1016/j.fm.2006.06.006.
- Hashemi, S.M.B., Khaneghah, A.M., Kontominas, I.E., Sant Ana, A., Martinez, R.C.R., Djamal, D. (2017): Fermentation of sarshir (kaymak) by lactic acid bacteria: Antibacterial activity, antioxidant properties, lipid and protein oxidation and fatty acid profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. doi: 10.1002/j.
- Hayaloglu, A.A., Tolu, C., Yasar, K., Sahingil, D. (2013): Volatiles and sensory evaluation of goat milk cheese Gokceada as affected by goat breeds (Gokceada and Turkish Saanen) and starter culture systems during ripening. *Journal of Dairy Science*. Elsevier. 96(5): 2765–2780. doi:

- Heiman, K.E., Garalde, V. B., Gronostaj, M., Jackson, K.A., Beam, S., Joseph, L., Saupe, A., Ricotta, E., Waechter, H., Wellman, A., Adams-Cameron, M., Ray, G., Fields, A., Chen, Y., Datta, A., Burall, L., Sabol, A., Kucerova, Z., Trees, E., Metz, M., Leblanc, P., Lance, S., Griffin, P. M., Tauxe, R. V., Silk, B. J. (2016): Multistate outbreak of listeriosis caused by imported cheese and evidence of cross-contamination of other cheeses, USA, 2012. *Epidemiology and Infection*. 144(13): 2698–2708. doi: 10.1017/S095026881500117X.
- Hertzberger, R., Arents, J., Dekker, H.L., Pridmore, D., Gysler, C., Kleerebezem, M., Jppst Teixeira de Mattos, M. (2014): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production in Species of the *Lactobacillus acidophilus* Group: a Central Role for a Novel NADH-Dependent Flavin Reductase. *Applied and environmental microbiology*. 80(7): 2229–2239. doi: 10.1128/AEM.04272-13.
- Hladíková, Z., Smetanková, J., Greif, G., Greifová, M. (2012): Antimicrobial activity of selected lactic acid cocci and production of organic acids. *Acta Chimica Slovaca*. 5(1): 80–85. doi: 10.2478/v10188-012-0013-3.
- Van Hoorde, K., Heyndrickx, M., Vandamme, P., Huys, G. (2010): Influence of pasteurization, brining conditions and production environment on the microbiota of artisan Gouda-type cheeses. *Food Microbiology*. Elsevier Ltd. 27(3): 425–433. doi: 10.1016/j.fm.2009.12.001.
- Huang, E., Zhang, L., Chung, Y.K., Zheng, Z., Yousef, A.E. (2013): Characterization and application of enterocin RM6, a bacteriocin from enterococcus faecalis. *BioMed Research International*. 2013: 1–6. doi: 10.1155/2013/206917.
- Hughenoltz, J. and Starrenburg, M.J.C. (1992): Applied Microbiology Biotechnology Diacetyl production by different strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis*. 38: 17–22.
- Hwanhlem, N., Buradaleng, S., Wattanachant, S., Benjakul, S., Tani, A., Maneerat, S. (2011): Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food Control*. Elsevier Ltd. 22(3–4): 401–407. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.09.010.
- Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut" (2017): Izveštaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2016. godinu. <http://www.batut.org.rs/download/izvestaji/zarazneBolestiGodisnjiIzvestaj2016.pdf>.
- Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut" (2019): Izveštaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2018. godinu. <https://www.batut.org.rs/download/izvestaji/GodisnjiIzvestajZaraznimBolestima2018.pdf>
- Institut za javno zdravlje Srbije "Dr Milan Jovanović Batut" (2020): Izveštaj o zaraznim bolestima u Republici Srbiji za 2019. godinu. <https://www.batut.org.rs/download/izvestaji/Godisnji%20izvestaj%20o%20zaraznim%20bolestima%202019.pdf>
- Ito, A., Sato, Y., Kudo, S., Sato, S., Nakajima, H., Toba, T. (2003): The screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria and their application to inactivating psychrotrophic

food-borne pathogens. *Current Microbiology*. 47(3): 231–236. doi: 10.1007/s00284-002-3993-1.

Ivanović, M. (2015): Kriterijumi higijene u restoranima kolektivne ishrane Zlatiborskog okruga. Specijalistički rad. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu.

Ivanovic, M., Mirkovic, N., Mirkovic, M., Miocinovic, J., Radulovic, A., Solevic Knudsen, T., Radulovic, Z. (2021): Autochthonous *Enterococcus durans* PFMI565 and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGBU1–4 in Bio-Control of *Listeria monocytogenes* in Ultrafiltered Cheese. *Foods*. 1: 1–14. doi: doi.org/10.3390/foods10071448.

Jackson, K.A., Gould, L.H., Hunter, J.C., Kucerova, Z., Jackson, B. (2018): Listeriosis Outbreaks Associated with. *Centers for Disease Control and Prevention*. 24(6): 1116–1118.

Jeršek, B., Gilot, P., Gubina, M., Klun, N., Mehle, J., Tcherneva, E., Rijpens, N., Herman, L. (1999): Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence- based PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(1): 103–109. doi: 10.1128/jcm.37.1.103-109.1999.

Johanningsmeier, S.D., Franco, W., Perez-Diaz, I. and McFeeters, R.F. (2012): Influence of Sodium Chloride, pH, and Lactic Acid Bacteria on Anaerobic Lactic Acid Utilization during Fermented Cucumber Spoilage. *Journal of Food Science*. 77: 397-404. doi: 10.1111/j.1750-3841.2012.02780.x.

Johnson, E.M., Jung, Y.G., Jin, Y.Y., Jayabalan, R., Yang, S.H., Suh, J.W. (2018): Bacteriocins as food preservatives: Challenges and emerging horizons. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 58(16): 2743–2767. doi: 10.1080/10408398.2017.1340870.

Jokovic, N., Nikolic, M., Begovic, J., Jovcic, B., Savic, D., Topisirovic, Lj. (2008): A survey of the lactic acid bacteria isolated from Serbian artisanal dairy product kajmak. *International Journal of Food Microbiology*. 127(3): 305–311. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.026.

Jordan, K. and McAuliffe, O. (2018): *Listeria monocytogenes* in Foods. 1st edn. *Advances in Food and Nutrition Research*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/bs.afnr.2018.02.006.

Jovcic, B., Begovic, J., Lozo, J., Topisirovic, L., Kojic, M. (2009): Dynamics of sodium dodecyl sulfate utilization and antibiotic susceptibility of strain *Pseudomonas* sp. ATCC19151. *Archives of Biological Sciences*. 61(2): 159–164. doi: 10.2298/abs0902159j.

Juodeikiene, G., Bartkiene, E., Viskelis, P., Urbonaviciene, D., Eidukonyte, D., Bobinas, C. (2012): Fermentation Processes Using Lactic Acid Bacteria Producing Bacteriocins for Preservation and Improving Functional Properties of Food Products. *Advances in Applied Biotechnology*. 2012: 63-100. doi: 10.5772/30692.

Juven, B.J. and Pierson, M.D. (1996): Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantitation. *Journal of Food Protection*. 59(11): 1233-1241. doi: 10.4315/0362-028X-59.11.1233

Kara, R. and Aslan, S. (2020): Investigation of *Listeria monocytogenes* in workers, equipment and environments at Kaymak processing plants. *Food Science and Technology*. 2061: 2–5. doi:

- Karimi, R., Mortazavian, A.M., Da Cruz, A.G. (2011): Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: A review. *Dairy Sci. Technol.* (91): 283–308.
- Kawasaki, S., Satoh, T., Todoroki, M., Niimura, Y. (2009): B-type dihydroorotate dehydrogenase is purified as a H<sub>2</sub>O 2-forming NADH oxidase from *Bifidobacterium bifidum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 75(3): 629–636. doi: 10.1128/AEM.02111-08.
- Khalid, K. (2011): An overview of lactic acid bacteria. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 1(3): 1–13.
- Khay, E.O., Idaomar, M., El Moussaoui, N., Abrini, J. (2014): Application of a bacteriocin-like inhibitory substance producing *Enterococcus durans* E204 strain, isolated from camel milk, to control *Listeria monocytogenes* CECT 4032 in goat jben. *Annals of Microbiology*, 64(1): 313–319. doi: 10.1007/s13213-013-0666-1.
- Klein, G. (2003): Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*. 88(2-3): 123-131.
- Kojic, M., Svircevic, J., Banina, A., Topisirovic, L. (1991): Bacteriocin-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* S50. *Applied and Environmental Microbiology*. American Society for Microbiology (ASM), 57(6): 1835–1837. doi: 10.1128/aem.57.6.1835-1837.1991.
- Kubota, H., Tsuji, H., Matsuda, K., Kurakawa, T., Asahara, T. and Nomoto, K. (2010): Detection of Human Intestinal Catalase-Negative, Gram-Positive Cocci by rRNA-Targeted Reverse Transcription-PCR. *Applied And Environmental Microbiology*. 76(16): 5440–5451.
- Kuzmanović, J., Ašanin, R., Baltić Mišić, D., Dimitrijević, M., Stojanović, M., Ašanin, N., Kovačević, I. K. (2011): Presence of *Listeria* spp. in fish samples, fish products and sea products. *Acta Veterinaria*. 61(2–3): 193–203. doi: 10.2298/AVB1103193K.
- Kučerová, K., Korbová, I., Horáčková, Š., Šviráková, E., Plocková, M. (2009): Influence of enterococci and lactobacilli on listeria. *Czech Journal of Food Sciences*. 27(SPECIAL ISSUE 2). doi: 10.17221/676-cjfs.
- Lanciotti, R., Patrignani, F., Bagnolini, F., Guerzoni, M.E., Gardini, F. (2003): Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology*. 20(5): 537–543. doi: 10.1016/S0740-0020(02)00159-4.
- Laranjo, M., Potes, M. E. and Elias, M. (2019): Role of starter cultures on the safety of fermented meat products. *Frontiers in Microbiology*. 10(APR): 1–11. doi: 10.3389/fmicb.2019.00853.
- Lauková, A., Czikková, S., Laczková, S., Turek, P. (1999): Use of enterocin CCM 4231 to control *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated dry fermented Hornad salami. *International Journal of Food Microbiology*, 52(1–2): 115–119. doi: 10.1016/S0168-1605(99)00125-7.

- Lauková, A., Guba, P., Nemcová, R., Vasilková, Z. (2003): Reduction of Salmonella in gnotobiotic Japanese quails caused by the enterocin A-producing EK13 strain of *Enterococcus faecium*. *Veterinary Research Communications*. 27(4): 275–280. doi: 10.1023/A:1024027923824.
- Li, B., Zhan, M., Evvie, S.E., Jin, D., Zhao, L., Chowdhury, S., Sarker, S.K., Huo, G., Liu, F. (2018): Evaluating the safety of potential probiotic *Enterococcus durans* KLDS6.0930 using whole genome sequencing and oral toxicity study. *Frontiers in Microbiology*. 9(AUG): 1–15. doi: 10.3389/fmicb.2018.01943.
- Li, C., Zeng, H., Ding, X., Chen, Y., Liu, X., Zhou, L., Wang, X., Cheng, Y., Hu, S., Cao, Z., Liu, R., Yin, C. (2020): Perinatal listeriosis patients treated at a maternity hospital in Beijing, China, from 2013–2018. *BMC Infectious Diseases*. *BMC Infectious Diseases*. 20(1): 1–9. doi: 10.1186/s12879-020-05327-6.
- Lozo, J., Mirkovic, N., O'Connor, P.M., Malesevic, M., Miljkovic, M., Polovic, N., Jovcic, B., Cotter, P.D., Kojic, M. (2017): Lactolisterin BU, a novel class II broad-spectrum bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* bv. *diacetylactis* BGBU1-4. *Applied and Environmental Microbiology*. 83(21). doi: 10.1128/AEM.01519-17.
- Macciola, V., Candela, G., De Leonardis, A. (2008): Rapid gas-chromatographic method for the determination of diacetyl in milk, fermented milk and butter. *Food control*. 19(9): 873-878. doi: 10.1016/j.foodcont.2007.08.014
- Marshall, M.N., Cocolin, L., Mills, D.A., VanderGheynst, J.S. (2003): Evaluation of PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities in compost. *Journal of Applied Microbiology*. 95(5): 934–948. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.02062.x.
- Martín, R. and Suárez, J.E. (2010): Biosynthesis and degradation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by vaginal lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(2): 400–405. doi: 10.1128/AEM.01631-09.
- Martinović, A., Abrahamsen, R.K. and Obradović, D. (2006): Biohemijske aktivnosti selektovanih sojeva bakterija mlečne kiseline. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 22: 139–151.
- Mathur, S. and Singh, R. (2005): Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - A review. *International Journal of Food Microbiology*. 105(3): 281–295. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008.
- Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., Saarela, M. (2002): Technological challenges for future Probiotic foods. *International Dairy Journal*. 12(2–3): 173–182. doi: 10.1016/S0958-6946(01)00099-1.
- McAuley, C.M., Gobius, K.S., Britz, M.L., Craven, H.M. (2012): Heat resistance of thermotolerant enterococci isolated from milk. *International journal of food microbiology*. 154: 162–168. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.033.
- McGaw, L.J., Jäger, A.K. and Van Staden, J. (2002): Antibacterial effects of fatty acids and related compounds from plants. *South African Journal of Botany*. 68(4): 417–423. doi: 10.1016/S0254-6299(15)30367-7.

- Melo, J., Andrew, P.W. and Faleiro, M.L. (2015): *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. *Food Research International*. Elsevier Ltd. 67: 75–90. doi: 10.1016/j.foodres.2014.10.031.
- Mijačević, Z. and Otenhaj, I. (1989): Antibakterijska aktivnost laktoperoksidaza-tiocijanat vodonikperoksid sistema u mleku (The Antimicrobial Effect of the Lactoperoxidase Thiocyanate — Hydrogen Peroxide System in Milk). (39): 199–204.
- Miller, W.R., Munita, J.M. and Arias, C.A. (2014): Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*. Expert Reviews Ltd.: 1221–1236. doi: 10.1586/14787210.2014.956092.
- Ministarstvo poljoprivrede, trgovine, šumarstva i vodoprivrede (2011): Vodič za primenu mikrobioloških kriterijuma za hranu.
- Miočinović, J., Puđa, P., Radulović, Z., Pavlović, V., Miloradović, Z., Radovanović, M., Paunović, D. (2011): Development of low fat UF cheese technology. *Mljekarstvo*. 61(1): 33–44.
- Mirković, N. (2016): Karakterizacija i determinacija bakteriocina autohtonih laktokoka: Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet Univerzitet u Beogradu.
- Mirkovic, N., Kulas, J., Miloradovic, Z., Miljkovic, M., Tucovic, D., Miocinovic, J., Jovcic, B., Mirkovic, I., Kojic, M. (2020): Lactolisterin BU-producer *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* BGBU1-4: Bio-control of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in fresh soft cheese and effect on immunological response of rats. *Food Control*. Elsevier. 111(October 2019). p. 107076. doi: 10.1016/j.foodcont.2019.107076.
- Molimard, P. and Spinnler, H.E. (1996): Review: Compounds Involved in the Flavor of Surface Mold-Ripened Cheeses: Origins and Properties. *Journal of Dairy Science*. Elsevier. 79(2): 169–184. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(96)76348-8.
- Molinos, A.C., Abriouel, H., Ben Omar, N., Valdivia, E., López, R.L., Maqueda, M., Cañamero, M.M., Gálvez, A. (2005): Effect of immersion solutions containing enterocin AS-48 on *Listeria monocytogenes* in vegetable foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(12): 7781–7787. doi: 10.1128/AEM.71.12.7781-7787.2005.
- Montville, T.J. and Chikindas, M.L. (2012): Pears. In: Doyle, M.P., Burchanan, R.L. (Eds.), *Biological control of foodborne bacteria*, Chapter 21: Food microbiology. *Fundamentals and Frontiers*, 4th Edition. doi: 10.1128/9781555818463.ch31.
- Mora-Villalobos, J.A., Montero-Zamora, J., Barboza, N., Rojas-Garbanzo, C., Usaga, J., Redondo-Solano, M., Schroedter, L., Olszewska-Widdrat, A., López-Gómez, J.P. (2020): Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations - A Review. *Fermentation*.
- Mullan, W.M.A. (2014): Starter Cultures: Importance of Selected Genera. Second Edition, *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*. Second Edition. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00321-9.
- Muñoz, A., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Rodríguez, A., Valdivia, E. (2004): Biocontrol of psychrotrophic enterotoxigenic *Bacillus cereus* in a nonfat hard cheese by an



- enterococcal strain-producing enterocin AS-48. *Journal of Food Protection*. 67(7): 1517–1521. doi: 10.4315/0362-028X-67.7.1517.
- Muñoz, A., Ananou, S., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M., Rodríguez, A., Maqueda, M., Valdivia, E. (2007): Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: Bactericidal synergism with heat. *International Dairy Journal*. 17(7): 760–769. doi: 10.1016/j.idairyj.2006.09.006.
- Ness, I.F., Diep, D.B. and Ike, Y. (2014): Enterococcal Bacteriocins and Antimicrobial Proteins that Contribute to Niche Control. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. 1–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24649514>.
- Ngasotter, S., Waikhom, D., Mukherjee, S., Devi, M.S., Singh, A.S. (2020): Diversity of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Fermented Fish Products: A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9(5): 2238–2249. doi: 10.20546/ijcmas.2020.905.255.
- Obradović, D., Radin, D. i Radulović, Z. (2007): Potencijali primene dopunskih kultura u proizvodnji sireva. *Savremena poljoprivreda*. 56: 75–80.
- Olasupo, N.A., Olukoya, D.K. and Odunfa, S.A. (1995): Studies on bacteriocinogenic *Lactobacillus* isolates from selected Nigerian fermented foods. *Journal of Basic Microbiology*. 35(5): 319–324. doi: 10.1002/jobm.3620350507.
- Park, D.H. (2018): Effects of carbon dioxide on metabolite production and bacterial communities during kimchi fermentation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. Taylor and Francis, 82(7): 1234–1242. doi: 10.1080/09168451.2018.1459462.
- Penna, A.L.B. (2017): *Enterococcus faecium* and *Enterococcus durans* isolated from cheese: Survival in the presence of medications under simulated gastrointestinal conditions and adhesion properties. *Journal of Dairy Science*. American Dairy Science Association. 100(2): 933–949. doi: 10.3168/jds.2016-11513.
- Pravilnik o kvalitetu proizvoda od mleka i starter kultura (2010): 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 RS, 72/2010, 62/2018.
- Puđa, P., Radovanović, M. i Đerovski, J. (2006): Proizvodnja i svojstva kajmaka. 56(4): 221–231.
- Radovanović, R., Popov-Raljić, J. (2001): Senzorna analiza prehrambenih proizvoda. Poljoprivredni fakultet. Univerzitet u Beogradu. Beograd.
- Radulović, Z., Obradović, D., Fira, Đ. (2000): Karakteristike rasta i aktivnosti laktobacila u UF mleku. *Acta periodica technologica*. 31: 145–152.
- Radulović, Z. (2007): Izolacija i selekcija autohtonih bakterija mlečne kiseline i njihova primena u standardizaciji sira u tipu sjeničkog. Doktorska disertacija. Poljoprivredni fakultet. Univerzitet u Beogradu.

- Radulović, Z., Radin, D., Barać, M., Đerovski, J., Paunović, D., Obradović, D. (2009): Karakterizacija autohtonih bakterija mlečne kiseline izolovanih iz belih sireva u salamuri. *Hrana i ishrana*. 50(3-4): 37-41.
- Radulović, Z., Petrović, T., Nedović, V., Dimitrijević, S., Mirković, N., Petrušić, M., Paunović, D. (2010): Characterization of autochthonous *Lactobacillus paracasei* strains on potential probiotic ability. *Mljekarstvo*. 60(2): 86–93.
- Radulović, Z., Miočinović, J., Pudja, P., Barać, M., Miloradović, Z., Paunović, D., Obradović, D. (2011): The application of autochthonous lactic acid bacteria in white brined cheese production. *Mljekarstvo* 61(1): 15–25.
- Radulović, Z., Mirković, M. (2016): Probiotici i prebiotici. Poljoprivredni fakultet. Univerzitet u Beogradu.
- Radulović, Z., Miočinović, J., Mirković, N., Mirković, M., Paunović, D., Ivanović, M., Seratlić, S. (2017): Survival of spray-dried and free-cells of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* 564 in soft goat cheese. *Animal Science Journal*. 88(11): 1849–1854. doi: 10.1111/asj.12802.
- Ramaswamy, V., Cresence, V.M., Rejitha, J.S., Lekshmi, M.U., Dharsana, K. S., Prasad, S.P., Vijila, H.M. (2007): *Listeria* - Review of epidemiology and pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 40(1): 4–13.
- Rea, M.C., Ross, R.P., Cotter, P.D., Hill, C. (2011): Classification of bacteriocins from Gram-positive bacteria. In: Drider, D., Rebuffat, S. (Eds.), *Prokaryotic antimicrobial peptides from genes to applications*. Springer New York Dordrecht Heidelberg London, pp: 29-53.
- Ricke, S.C. (2003): Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Science*. 82(4): 632–639. doi: 10.1093/ps/82.4.632.
- Richelieu, M., Houlberg, U., Nielsen, J. C. (1997): Determination of  $\alpha$ -Acetolactic Acid and Volatile Compounds by Headspace Gas Chromatography. *Journal of Dairy Science*. 80(9): 1918-1925. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76132-0.
- Rivas, F.P., Castro, M.P., Vallejo, M., Marguet, E., Campos, C.A. (2012): Antibacterial potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from ewes' milk and cheese. *LWT - Food Science and Technology*. Elsevier Ltd. 46(2): 428–436. doi: 10.1016/j.lwt.2011.12.005.
- Rynne, N.M., Beresford, T.P., Kelly, A.L., Tunick, M.H., Malin, E., Guinee, T.P. (2007): Effect of exopolysaccharide-producing adjunct starter cultures on the manufacture, composition and yield of half-fat Cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*. 62: 12-18.
- Saithong, P., Panthavee, W., Boonyaratanakornkit, M., Sikkhamondhol, C. (2010): Use of a starter culture of lactic acid bacteria in pla-som, a Thai fermented fish. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. The Society for Biotechnology, Japan, 110(5): 553–557. doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.06.004.
- Šalomskiene, J., Jonkuvienė, D., MacIoniene, I., Narkevičius, R., Riešute, R. (2020): Impact of antimicrobials, naturally produced by lactic acid bacteria, on the *Listeria monocytogenes* growth in minced salmon. *Czech Journal of Food Sciences*. 38(5): 280–286. doi: 10.17221/342/2019-CJFS.

- Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M. (2011): Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*. 17(1): 7–15. doi: 10.3201/eid1701.P11101.
- Scatassa, M.L., Gaglio, R., Cardamone, C., Macaluso, G., Arcuri, L., Todaro, M., Mancuso, I. (2017): Anti-listeria activity of lactic acid bacteria in two traditional sicilian cheeses. *Italian Journal of Food Safety*. 6(1): 13–17. doi: 10.4081/ijfs.2017.6191.
- Scott, K.P. (2002): The role of conjugative transposons in spreading antibiotic resistance between bacteria that inhabit the gastrointestinal tract. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 59(12): 2071–2082. doi: 10.1007/s000180200007.
- Shah, N. (2007): Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*. 17(11): 1262–1277. doi: 10.1016/j.idairyj.2007.01.014.
- Sheela, M.M. and Shrinithiviahshini, N. (2017): Pervasiveness of *Listeria monocytogenes* in Milk and Dairy Products. *Journal of Food: Microbiology, Safety and Hygiene*. 02(03). doi: 10.4172/2476-2059.1000125.
- Silva, C.C.G., Silva, S.P.M. and Ribeiro, S.C. (2018): Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation. *Frontiers in Microbiology*. 9(4). doi: 10.3389/fmicb.2018.00594.
- Smit, G., Vlieg, J.E., Smit, B.A., Ayad, E.H. and Engels, W.J. (2002): Fermentative formation of flavour compounds by lactic acid bacteria. *Australian Journal of Dairy Technology*. 57: 61-68.
- Song, A.A.L., In, L.L.A., Lim, S.H.E., Rahim, R.A. (2017): A review on *Lactococcus lactis*: From food to factory. *Microbial Cell Factories*. BioMed Central. 16(1): 1–15. doi: 10.1186/s12934-017-0669-x.
- Sousa, M.J., Ardö, Y. and McSweeney, P.L.H. (2001): Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *International Dairy Journal*. 11(4–7): 327–345. doi: 10.1016/S0958-6946(01)00062-0.
- Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. (1997): Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. 36(1): 1–29. doi: 10.1016/S0168-1605(96)01233-0.
- Stupar, J., Holøymoén, I.G., Hoel, S., Lerfall, J., Jakobsen, A.N., Rustad, T. (2021): Diversity and antimicrobial activity towards *Listeria* spp. and *Escherichia coli* among lactic acid bacteria isolated from ready-to-eat seafood. *Foods*. 10(2). doi: 10.3390/foods10020271.
- Thomas, E.L., Milligan, T.W., Joyner, R.E., Jefferson, M.M. (1994): Antibacterial activity of hydrogen peroxide and the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate system against oral streptococci. *Infection and Immunity*. 62(2): 529–535. doi: 10.1128/iai.62.2.529-535.1994.
- Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. (2006): Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria: Comparison of the bacteriocins. *Process Biochemistry*. 41(1): 11-19. doi: 10.1016/j.procbio.2005.01.026.

- Tomar, O. and Akarca, G. (2019): Critical control points and food pathogen presence in dairy plants from Turkey. *Food Science and Technology*. 39(2): 444–450. doi: 10.1590/fst.29717.
- Tomás, M.S.J., Otero, M.C., Ocaña, V., Nader-Macías, M.E. (2004): Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria I: determination of hydrogen peroxide. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 268: 337–346. doi: 10.1385/1-59259-766-1:337.
- Tomé, E., Gibbs, P.A. and Teixeira, P.C. (2008): Growth control of *Listeria innocua* 2030c on vacuum-packaged cold-smoked salmon by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 121(3): 285–294. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.015.
- Tremblay, Y.D.N., Hathroubi, S. and Jacques, M. (2014): Les biofilms bactériens: Leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 78(2): 110–116.
- Urbiene, S. and Leskauskaite, D. (2006): Formation of some organic acids during fermentation of milk. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences* (Poland). 15(3): 277–281.
- Vénica, C.I., Perotti, M.C., Bergamini, C.V. (2014): Organic acids profiles in lactose-hydrolyzed yogurt with different matrix composition. *Dairy Sci. and Technol.* 94: 561–580. <https://doi.org/10.1007/s13594-014-0180-7>
- Vinicius De Melo Pereira, G., De Carvalho Neto, D.P., Junqueira, A.C.D.O., Karp, S.G., Letti, L.A.J., Magalhães Júnior, A.I. and Soccol, C.R. (2019): A Review of Selection Criteria for Starter Culture Development in the Food Fermentation Industry. *Food Reviews International*. pp. 1–33. doi:10.1080/87559129.2019.1630636.
- Vongkamjan, K., Fuangpaiboon, J., Jirachotrapee, S., Turner, M.P. (2015): Occurrence and diversity of *Listeria* spp. in seafood processing plant environments. *Food Control*. Elsevier Ltd. 50: 265–272. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.09.001.
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., Geng, W. (2021): Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 9(5): 1-19. doi: 10.3389/fbioe.2021.612285.
- Wemmenhove, E., van Valenberg, H.J.F., van Hooijdonk, A.C.M., Wells-Bennik, M.H.J., Zwietering, M.H. (2018): Factors that inhibit growth of *Listeria monocytogenes* in nature-ripened Gouda cheese: A major role for undissociated lactic acid. *Food Control*. Elsevier Ltd. 84(1662): 413–418. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.08.028.
- Werner, G., Coque, T.M., Franz, C.M.A.P., Grohmann, E., Hegstad, K., Jensen, L., van Schaik, W., Weaver, K. (2013): Antibiotic resistant enterococci-Tales of a drug resistance gene trafficker. *International Journal of Medical Microbiology*. *Int J Med Microbiol.* pp 360–379. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.03.001.
- Wiernasz, N., Leroi, F., Chevalier, F., Cornet, J., Cardinal, M., Rohloff, J., Passerini, D., Skirnisdóttir, S., Pilet, M.F. (2020): Salmon Gravlox Biopreservation With Lactic Acid Bacteria: A Polyphasic Approach to Assessing the Impact on Organoleptic Properties,

- Microbial Ecosystem and Volatilome Composition. *Frontiers in Microbiology*. 10(January): 1–20. doi: 10.3389/fmicb.2019.03103.
- Williams-Campbell, A.M. and Jay, J.M. (2002): Effects of diacetyl and carbon dioxide on spoilage microflora in ground beef. *Journal of Food Protection*. 65(3): 523–527. doi: 10.4315/0362-028X-65.3.523.
- Xiao, Y., Miao, J.L., Zheng, Y.R., Liu, Z.M. (2012): Effects of Carrageenan and Xanthan Gum on Texture of Processed Acid-coagulated Cheese. *Food Science*. 33(23): 93-97.
- Yap, P.C., MatRahim, N.A., AbuBakar, S., Lee, H.Y. (2021): Antilisterial Potential of Lactic Acid Bacteria in Eliminating *Listeria monocytogenes* in Host and Ready-to-Eat Food Application. *Microbiology Research*. 12(1): 234–257. doi: 10.3390/microbiolres12010017.
- Yilsay, Z. and Bay, A.A. (2002): Bursa İlinde Tüketilen Kaymakların Mikrobiyolojik Özellikleri ve Bazı Patojen Bakterilerin Aranması. pp. 77–86.
- Yuyama, K.T., Rohde, M., Molinari, G., Stadler, M., Abraham, W.R. (2020): Unsaturated fatty acids control biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and other gram-positive bacteria. *Antibiotics*. 9(11): 1–11. doi: 10.3390/antibiotics9110788.
- Zakon o bezbednosti hrane (2009): Službeni glasnik RS, 41/2009, 17/2019.
- Zhang, S. and Farber, J.M. (1996): The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. *Food Microbiology*. 13(4): 311–321. doi: 10.1006/fmic.1996.0037.
- Zhang, L., Li, X., Ren, H., Liu, L., Ma, L., Li, M., Bi, W. (2015): Impact of using exopolysaccharides (EPS)-producing strain on qualities of half-fat cheddar cheese. *International Journal of Food Properties*. 18(7): 1546–1559. doi: 10.1080/10942912.2014.921198.
- Zhao, X., Zhen, Z., Wang, X., Guo, N. (2017): Synergy of a combination of nisin and citric acid against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*. 34(12): 2058–2068. doi: 10.1080/19440049.2017.1366076.

## **8. SPISAK SKRAĆENICA**

BMK – bakterije mlečne kiseline

DNK – dezoksi-ribonukleinska kiselina

RNK – ribonukleinska kiselina

rRNK – transportna ribonukleinska kiselina

NCBI – baza podataka

ANOVA – analiza varijanse

UF – ultrafiltracija

ATCC – american type culture collection

GMP – dobra proizvođačka praksa

GHP – dobra higijenska praksa

HACCP – analiza rizika i kritične kontrolne tačke

PCR – polimerazna lančana reakcija

EPS – egzopolisaharidi

HSS – uređaj za statičko headspace uzorkovanje

GC – gasna hromatografija

ECD – detektor sa zahvatom elektrona

## 9. BIOGRAFIJA AUTORA

Marina P. Ivanović je rođena 17.04.1975. u Priboju, Republika Srbija. Fakultet Zdravstvenih nauka, Panevropskog Univerziteta Apeiron Banja Luka, Studijski program Sanitarni inženjering, završila je 2009. godine odbranom diplomskog rada "HACCP – nivo znanja u preduzećima koja posluju sa hranom" sa najvišom ocenom. Master studije završila školske 2014. godine na Departmanu za ekologiju Fakulteta za inženjerski menadžment i ekonomiju Novi Sad, odbranom Master rada "Komparativna analiza nekih hemijskih parametara organski i konvencionalno proizvedenog meda na području zapadne Srbije".

U Sektoru za sanitarni nadzor Ministarstva za zdravlje, radila je u periodu 1998-2014. godine na poslovima Republičkog, a potom i Pokrajinskog sanitarnog inspektora. Od 2014. godine zaposlena u Visokoj zdravstvenoj školi strukovnih studija u Beogradu, u zvanju predavača na studijskim programima Sanitarno-ekološko inženjerstvo i Nutricionizam i dijetetika na predmetima: Inspekcijski nadzor, Inspekcijske procedure, Bezbednost hrane i sistemi upravljanja, Standardi o hrani, Tehnologija hrane, Metodika sanitarno-ekološkog nadzora, Zdravstvena ispravnost predmeta opšte upotrebe, Prehrambena tehnologija 1 i 2.

Specijalističke akademske studije prehrambene tehnologije, Modul Tehnološka mikrobiologija Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, upisala je školske 2013/2014., a završila školske 2014/2015. godine, odbranom rada "Kriterijumi higijene u restoranima kolektivne ishrane Zlatiborskog okruga".

Doktorske akademske studije na studijskom programu Prehrambena tehnologija, Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu, upisala je školske 2015/2016. godine.

U zajednici sa drugim autorima, objavila je i saopštila više naučnih i stručnih radova iz oblasti tehnološke mikrobiologije, bezbednosti hrane, sanitarnog inženjerstva, od kojih je 1 štampan u vrhunskom međunarodnom časopisu, 1 u istaknutom međunarodnom časopisu, 1 u nacionalnom časopisu međunarodnog značaja.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Марина Ивановић

Број индекса 4-ТХ150004

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Потенцијал примене аутохтоних бактерија млечне киселине као антилистеријских култура у производњи хране**

- 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 Марина Ивановић

Број индекса 4-ТХ150004

Студијски програм Прехрамбена технологија

Наслов рада Потенцијал примене аутохтоних бактерија млечне киселине као антилистеријских култура у производњи хране

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:

### **Потенцијал примене аутохтоних бактерија млечне киселине као антилистеријских култура у производњи хране**

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.