

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Svetlana Z. Bogdanović

KARAKTERIZACIJA MIKROBIOTE PRIRODNO
FERMENTISANE PIROTSKE „PEGLANE“
KOBASICE TOKOM ZRENJA I GOTOVOG
PROIZVODA

doktorska disertacija

Beograd, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Svetlana Z. Bogdanović

CHARACTERIZATION OF THE MICROBIOTA
OF NATURALLY FERMENTED PIROT
“IRONED” SAUSAGE DURING MATURATION
AND THE FINISHED PRODUCT

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023.

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE

Mentori:

dr Slaviša Stanković, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

dr Ivica Dimkić, viši naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Tanja Berić, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

dr Olja Medić, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu – Biološki fakultet

dr Slavica Vesković Moračanin, naučni savetnik

Institut za higijenu i tehnologiju mesa u Beogradu

dr Aleksandra Jelušić, naučni saradnik

Univerzitet u Beogradu – Institut za multidisciplinarna istraživanja

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Eksperimentalni deo ove disertacije urađen je u laboratoriji Katedre za mikrobiologiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, laboratoriji Katedre za tehnologiju animalnih proizvoda, Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu i laboratoriji Odseka za poljoprivredno-prehrambene studije u Prokuplju.

Neizmernu zahvalnost dugujem mentoru prof. dr Slaviši Stankoviću, redovnom profesoru Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na ukazanom poverenju, razumevanju, stručnoj i nesebičnoj pomoći, bez koje ova doktorska disertacija ne bi bila realizovana. Hvala Vam na uloženom trudu za prevazilaženje prepreka tokom izvođenja celokupne disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem mentoru dr Ivici Dimkiću, višem naučnom saradniku Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na sugestijama tokom eksperimentalne izrade, tumačenju rezultata i tehničku izradu teze. Hvala za svaku pomoć tokom naše saradnje i za nesebičnu podršku tokom izrade i pisanja doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Tanji Berić, redovnom profesoru Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na stručnim savetima i kritičkoj oceni disertacije.

Neizmernu zahvalnost dugujem dr Olji Medić, naučnom saradniku Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na nesebično pruženim savetima tokom eksperimentalne izrade disertacije i kritičkoj oceni.

Veliku zahvalnost dugujem dr Slavici Vesković Moračanin, naučnom savetniku, Instituta za higijenu i tehnologiju mesa u Beogradu, na ukazanoj časti i korisnim savetima u završnoj fazi izrade doktorske disertacije.

Najsrdajnu zahvalnost dugujem dr Aleksandri Jelušić, naučnom saradniku Instituta za multidisciplinarna istraživanja, Univerziteta u Beogradu, koja je učestvovala u skoro svim fazama izrade ove doktorske disertacije. Hvala na tome što je bila moj prijatelj, na zajedničkom radu u laboratorijskim analizama i na stručnoj pomoći pri izradi disertacije. Beskrajno hvala na strpljenju, podršci i pomoći.

Zahvalnost dugujem dr Igoru Tomaševiću, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, na pomoći i savetima tokom eksperimentalne izrade disertacije.

Zahvaljujem se svim svojim kolegama sa Odseka za poljoprivredno-prehrambene studije u Prokuplju na svesrdnoj pomoći i strpljenju. Posebnu zahvalnost dugujem kolegi Miodragu Jovanoviću na pomoći oko prikupljanja neophodnog materijala za realizaciju istraživanja i kolegamicama Dobrili Randelović i Ivani Zlatković na nesebičnoj podršci i razumevanju tokom izrade disertacije.

Neizmerno se zahvaljujem svojim roditeljima i sestri na nesebično pruženoj pomoći. Bez njihove podrške i ljubavi tokom čitavog školovanja, tokom čitavog života, ova disertacija ne bi bila realizovana.

Zahvaljujem se Živku na ogromnoj ljubavi koju mi pruža i uz pomoć koje idem napred.

Uni i Maši.

Hvala vam što postojite i izvinite za svaki trenutak proveden bez mene.

Karakterizacija mikrobiote prirodno fermentisane pirotске „peglane“ kobasice tokom zrenja i gotovog proizvoda

Sažetak

Pirotска „peglana“ kobasica je tradicionalna, fermentisana kobasica, koja se pravi od različitih vrsta mesa, soli i začina, a bez dodatka starter kultura. Testirani su uzorci kobasica šest proizvođača od kojih su neki koristili standardnu a neki nestandardnu recepturu. Ukupni diverzitet bakterija je ispitivan u gotovom proizvodu i tokom zrenja u različitim vremenskim tačkama korišćenjem odgajivačkog i neodgajivačkog (sekvenciranje gena za 16S rRNK) pristupa. Genetički polimorfizam predstavnika različitih grupa bakterijskih izolata određivan je korišćenjem rep-PCR i RAPD-PCR tehnika sa specijalizovanim prajmerima. Rezultati identifikacije sekvenciranjem gena za 16S rRNK ukazuju na prisustvo samo dve vrste bakterija mlečne kiseline, *Lactobacillus sakei* (76%) i *Leuconostoc mesenteroides* (24%). U poređenju sa drugim prajmerima, najveću diskriminatornu moć pokazao je prajmer GTG₅, kod većine testiranih izolata. Sekvenciranjem naredne generacije utvrđena je dominacija predstavnika iz razdela *Proteobacteria* i *Firmicutes* u svim proučavanim uzorcima. Tokom procesa zrenja uočen je trend povećanja zastupljenosti predstavnika *Firmicutes* (sa 33,5% na 63,5%) i smanjenje udela *Proteobacteria* (sa 65,4% na 22,3%). Metabarkoding analiza je pokazala da su dominantni bakterijski rodovi tokom procesa zrenja kobasice bili: *Lactobacillus*, *Photobacterium*, *Leuconostoc*, *Weissella* i *Lactococcus*, dok su detektovani i *Carnobacterium*, *Brochothrix* i *Acinetobacter*. Odgajivačkim pristupom je utvrđeno prisustvo vrsta *Lactobacillus sakei* i *Leuconostoc mesenteroides* u svim fazama zrenja. Upoređen je sastav bakterijskih zajednica u gotovom proizvodu svakog testiranog proizvođača. U uzorcima PK1 i PK2 pokazano je najveće bogatstvo bakterijskih vrsta. Predstavnici razdela *Firmicutes* su bili dominantni u uzorcima PK3, PK4, PK5 i PK6, dok su predstavnici *Proteobacteria* bili najzastupljeniji u uzorcima PK1 i PK2. U zavisnosti od uzorka, dominiraju vrste roda *Lactobacillus*, *L. sakei* i *L. algidus*, dok je rod *Leuconostoc* nađen u svim uzorcima. U gotovom proizvodu i tokom zrenja u različitim vremenskim tačkama određivane su i fizičko-hemijske osobine kobasice. Primećeno je smanjenje pH vrednosti, aktivnosti vode i sadržaja vlage, i povećanje sadržaja proteina i masti. Različite recepture i različito vreme zrenja pirotске „peglane“ kobasice nisu imale značajan uticaj na profil masnih kiselina, ali su imale značajan efekat na instrumentalne parametre boje. Takođe, zabeležene su i statistički značajne razlike ispitivanih parametara teksture između kobasica proizvedenih po različitim recepturama. Različiti udeli upotrebljenog mesa prouzrokovali su značajne razlike u pogledu senzornih karakteristika.

Ključne reči: pirotска „peglana“ kobasica, metabarkoding, fizičko-hemijske analize, tehnološki parametri, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides*

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Mikrobiologija

Characterization of the Microbiota of Naturally Fermented Pirot “Ironged” Sausage During Maturation and the Finished Product

Summary

Pirot "ironed" sausage is a traditional fermented sausage made from various meats, salt, and spices, without the addition of starter cultures. Sausage samples from six producers were studied, some of which used standard and some non-standard recipes. Total bacterial diversity was studied in the finished product and during ripening at different time points using cultivating and non-cultivating methods. Genetic polymorphism of representatives of different groups of bacterial isolates was determined using rep-PCR and RAPD-PCR techniques with specific primers. The results of 16S rRNA gene sequencing indicated the presence of only two species of lactic acid bacteria, *Lactobacillus sakei* (76%) and *Leuconostoc mesenteroides* (24%). Compared to other primers, the GTG₅ primer showed the highest discriminatory power for most of the isolates tested. Next generation sequencing showed that representatives of Proteobacteria and Firmicutes dominated in all samples tested. During maturation, a trend of increasing the proportion of Firmicutes representatives (from 33.5% to 63.5%) and decreasing the proportion of Proteobacteria (from 65.4% to 22.3%) was observed. Metabarcoding analysis showed that the dominant bacterial genera during the sausage ripening process were the following: *Lactobacillus*, *Photobacterium*, *Leuconostoc*, *Weissella* and *Lactococcus*, while *Carnobacterium*, *Brochothrix* and *Acinetobacter* were also detected. The presence of the species *Lactobacillus sakei* and *Leuconostoc mesenteroides* at all stages of maturation was detected in the cultivation approach. The composition of bacterial communities in the final product of each tested producer was compared. Samples PK1 and PK2 showed the highest abundance of bacterial species. Representatives of the Firmicutes dominated in samples PK3, PK4, PK5 and PK6, while representatives of Proteobacteria were most abundant in samples PK1 and PK2. Depending on the sample, species of the genus *Lactobacillus*, *L. sakei* and *L. algidus* dominated, while the genus *Leuconostoc* was found in all samples. The physical and chemical properties of the sausage were also determined in the finished product and during ripening at different times. Decreases in pH, water activity, and moisture content were found, as well as increases in protein and fat content. Different recipes and different ripening times of Pirot "ironed" sausage had no significant effect on the fatty acid profile, but a significant effect on the instrumental color parameters. Statistically significant differences were also found in the investigated texture parameters between sausages produced according to different recipes. Different proportions of meat used resulted in significant differences in sensory properties.

Keywords: Pirot ‘ironed’ sausage, metabarcoding, physical and chemical analysis, technological parameters, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides*

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Microbiology

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Fermentisani proizvodi od mesa.....	1
1.2. Fermentisane kobasice	1
1.3. Značaj fermentisanih kobasica	2
1.4. Pirotška „peglana“ kobasica.....	3
1.5. Tehnološki postupak proizvodnje fermentisanih suvih kobasica.....	3
1.6. Sirovine potrebne za proizvodnju fermentisanih suvih kobasica.....	3
1.7. Mikroorganizmi od značaja u fermentisanim kobasicama.....	4
1.7.1. Bakterije mlečne kiseline	4
1.7.2. Koagulaza negativne koke	6
1.7.3. Kvasci i plesni.....	7
1.8. Metode za identifikaciju bakterija mlečne kiseline	8
1.8.1 Metagenomika.....	9
2. CILJEVI RADA.....	12
3. MATERIJAL I METODE	14
3.1. Medijumi za kultivaciju bakterija i rastvori.....	14
3.2 Metode.....	16
3.2.1 Priprema kobasica	16
3.2.2. Izolacija BMK.....	17
3.2.3. Biohemijska karakterizacija izolata	18
3.2.4. Molekularna karakterizacija izolata	18
3.2.4.1. Izolacija DNK.....	18
3.2.4.2. Genetičko profilisanje.....	18
3.2.4.3. Filogenetska analiza.....	19
3.2.5. Metabarkoding analiza.....	19
3.2.5.1. DNK izolacija, priprema biblioteka i NGS sekvenciranje.....	19
3.2.5.2. Obrada podataka	19
3.2.5.3. Bioinformatička analiza.....	20
3.2.5.4. Dostupnost podataka.....	20
3.2.6. Fizičko-hemijske analize.....	20
3.2.6.1. pH vrednost.....	20
3.2.6.2. Aktivnost vode (a_w vode)	21
3.2.6.3. Određivanje sadržaja ukupnog pepela kobasica	21

3.2.6.4.	Određivanje sadržaja hlorida	21
3.2.6.5.	Određivanje hemijskog sastava kobasica	21
3.2.7.	Određivanje oksidacije masti	21
3.2.8.	Određivanje profila masnih kiselina	21
3.2.9.	Određivanje profila aminokiselina.....	22
3.2.10.	Određivanje tehnoloških parametara.....	22
3.2.10.1.	Instrumentalno određivanje boje	22
3.2.10.2.	Instrumentalno određivanje teksture	22
3.2.11.	Senzorna analiza sa hedonskom skalom	23
3.2.12.	Mikrobiološka kontrola kvaliteta	23
3.2.13.	Statistička obrada podataka	23
4.	REZULTATI.....	25
4.1.	Fenotipska i molekularna identifikacija bakterijskih izolata pirotke „peglane“ kobasice.....	25
4.1.1.	Biohemijska identifikacija izolata.....	25
4.1.2.	Molekularna identifikacija	25
4.1.2.1.	Uporedni pregled izolata iz kobasica različitih proizvođača.....	31
4.2.	Fizičko-hemijske analize, tehnološke karakteristike i analiza bakterijskih zajednica tokom zrenja pirotke „peglane“ kobasice	34
4.2.1.	Fizičko-hemijske analize.....	34
4.2.2.	Instrumentalno određivanje boje i teksture	35
4.2.3.	Molekularna identifikacija kultivabilne bakteriobiote	37
4.2.4.	Ukupna bakteriobiota tokom zrenja.....	40
4.2.5.	Taksonomska anotacija ukupne bakteriobiote	42
4.3.	Fizičko-hemijske analize, tehnološke karakteristike i analiza bakterijskih zajednica gotovih proizvoda pirotke „peglane“ kobasice.....	45
4.3.1.	Hemijske analize	45
4.3.2.	Oksidacija masti.....	46
4.3.3.	Masnokiselinski sastav.....	46
4.3.4.	Aminokiselinski sastav	48
4.3.5.	Instrumentalno određivanje boje.....	49
4.3.6.	Instrumentalno određivanje teksture	49
4.3.7.	Senzorna analiza hedonskom skalom	51
4.3.8.	Mikrobiološka ispravnost kobasica.....	52
4.3.9.	Diverzitet i bakterijske zajednice	53
5.	DISKUSIJA	59

6.	ZAKLJUČCI.....	67
7.	LITERATURA.....	70
8.	PRILOZI	90

UVOD

1. UVOD

1.1. Fermentisani proizvodi od mesa

Meso zauzima važno mesto u ishrani čoveka i pripada grupi namirnica koje su značajne za njegovo dobro zdravlje i pravilan razvoj. Nutritivna vrednost mesa se, pre svega ogleda kroz značajnu zastupljenost proteina, a time i svih esencijalnih aminokiselina, vitamina B grupe (posebno vitamina B₁₂), gvožđa, fosfora i cinka (Williams, 2007, Hammes et al., 2008). Aktivnost vode u mesu se kreće u rasponu od 0,96 do 0,99, dok se pH vrednost svežeg mesa odmah nakon klanja 7.0 - 7,2 što ga sa posebnim proteinsko-ugljenohidratnim sastavom, čini mikrobiološki lakokvarljivom namirnicom (Hammes et al., 2008). Iz tog razloga su ljudi stalno tražili načine za očuvanje ove namirnice. Jedan od najpopularnijih načina očuvanja mesa je njegova fermentacija.

Fermentacija mesa je drevni postupak koji se izvorno koristio za produženje roka trajanja lako kvarljive sirovine i predstavlja biološku metodu dobijanja proizvoda sa jedinstvenim poželjnim karakteristikama, na koji utiču mnogi ekološki faktori (Ockerman & Basu, 2007). Cilj fermentacije je transformisati meso, podložno lakom kvaru, u stabilan i siguran proizvod sa optimalnom hranjivom vrednošću i senzornim kvalitetom. Sastav sirovine i aktivnost prisutnih ili dodatih mikroorganizama utiču na ishod fermentacionog procesa. Prema Hammes et al. (2008) meso koje nije podvrgnuto, ni na koji način, termičkom postupku, predstavlja sirovinu za sve fermentisane proizvode od mesa. Značajan tehnološki napredak i poboljšanja u vezi higijene mesa, koja su se desila pedesetih godina prošlog veka, doprinela su razvoju šireg asortimana ovih proizvoda. Njihova stabilnost se uglavnom određuje kombinacijom stepena acidifikacije kojoj doprinose bakterije mlečne kiseline i snižavanje aktivnosti vode (a_w) tokom sušenja. Kao rezultat nastaju biohemijske i fizičko-hemijske promene mesa i masti, što dovodi do širokog spektra dostupnih proizvoda od mesa (Vignolo et al., 2010).

1.2. Fermentisane kobasice

Pretpostavlja se da je sušenje jedan od najstarijih metoda čuvanja hrane. Sušenje, kao metod čuvanja namirnica počeo je da se koristi još pre 20 000 godina pre nove ere (p.n.e), što nam govore podaci dobijeni na osnovu nalaza fosilnih ostataka i crteža na zidovima pećina (Babić & Babić, 2000).

Prvi trag koji se povezuje sa fermentisanim kobasicama pronađen je na teritoriji današnjeg Iraka i datira iz 3000. godine p.n.e. Na osnovu ovog istraživanja, Sumeri se smatraju tvorcima fermentisanih kobasica. Kineska kobasica „làchàng“ spravljena od kozjeg i jagnječeg mesa prvi put se pominje 589. godine p.n.e. Ova kobasica specifična je po tome što se pored soli dodavala i veća količina šećera, radi produženja održivosti proizvoda (Cocolin et al., 2008). Homer u svom delu „Odiseja“ prvi put spominje određenu vrstu krvavice, dok starogrčki pisac Epihram oko 500-te godine p.n.e. piše komediju „Kobasica“. Jedan od značajnih dokaza o proizvodnji fermentisanih kobasica u Antičkoj Grčkoj predstavlja njihov naziv „salama“, za koji se pretpostavlja da potiče od imena grčkog grada Salamis, a koji se zadržao do danas (Zeuthen, 2007).

Prve fermentisane kobasice, prema istorijskim podacima, u Evropi potiču iz umerenih područja Sredozemlja. To su područja u kojima vlada odgovarajuća klima, odnosno temperatura i relativna vlažnost, koje su presudne za proces fermentacije i to tokom zimskih meseci kada su potrebni stabilni vlažni i prohladni uslovi. Poreklo fermentisanih kobasica može se pratiti unazad sa tačnošću do 1730. godine. Tada se u Italiji prvi put spominje naziv salama (Leistner, 1986). Literaturni podaci govore da se proizvodnja kobasice iz Italije proširila na Nemačku 1735. godine i Mađarsku 1835. godine (Hammes et al., 2008). Danas je dostupan veliki broj različitih vrsta fermentisanih kobasica širom sveta (Leistner, 1986).

1.3. Značaj fermentisanih kobasica

Fermentisane kobasice su popularne kod većine stanovništva, što potvrđuje i činjenica da imaju najveću stopu proizvodnje i potrošnje zbog njihove visoke hranjive vrednosti (Adiguzel & Atasever, 2009). Evropa je i danas glavni proizvođač i potrošač fermentisanih kobasica (Talon et al., 2004, Di Cango et al., 2008). U Evropskoj Uniji (EU) najveći proizvođači fermentisanih proizvoda od mesa su Nemačka, Italija, Španija i Francuska. U ovim zemljama se 20 do 40% prerađevina od mesa može klasifikovati kao fermentisani proizvodi od mesa (Hammes et al., 2008). Kvalitativne karakteristike fermentisanih kobasica zavise od kvaliteta sirovina, specifičnih uslova obrade i načina zrenja, ali i od sastava prisutne mikrobijalne zajednice. Nauka i tehnologija igraju važnu ulogu u poboljšanju kvaliteta i produženju vremena skladištenja ovih proizvoda, posebno u Evropi (Toldra & Hui, 2015).

Prema važećem Pravilniku o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa (Sl. glasnik RS, broj 50/2019), fermentisane kobasice predstavljaju proizvode od mesa domaćih papkara i kopitara prve i druge kategorije, mesa živine prve kategorije i mesa divljači, masnog tkiva i dodataka, koje se nakon punjenja u omotače konzervišu fermentacijom i sušenjem, sa ili bez dimljenja (Tabela 1). Dozvoljeni dodaci su so, soli za salamurenje, začini, ekstrakti začina, šećeri, aditivi, starter kulture, kao i vino, pivo i jaka alkoholna pića. U posebnim uslovima dozvoljeni su i sledeći dodaci: arome dima, prirodne arome, vlakna uključujući i inulin, omega 3-masne kiseline, vitamini, mineralne materije, ugljeni hidrati, mleko i proizvodi od mleka i belančevinasti proizvodi od mleka, hrana i proizvodi biljnog porekla i to pečurke, žitarice, povrće, voće i njihovi proizvodi.

Kao posledica različitih receptura koje se koriste u proizvodnji, danas u svetu postoji velika raznolikost fermentisanih kobasica. Uočljiva je razlika između proizvoda proizvedenih na severu u odnosu na proizvode umerene klime. Kobasice sa podneblja hladnije klime imaju pH ispod 5, dok se kod kobasica sa umerenijih podneblja pH kreće u rasponu od 5,3 – 6,2 (Talon et al., 2007).

Najvažnijim kriterijumom za podelu fermentisanih kobasica smatra se sadržaj vlage zbog uticaja na mikrobiološku bezbednost proizvoda). Toldra (2002) vrši klasifikaciju na osnovu sadržaja vlage u gotovom proizvodu i to na polusuve (gubitak težine tokom fermentacije manji od 20%) i suve fermentisane kobasice (gubitak težine tokom fermentacije veći od 30%). Polusuve kobasice imaju a_w od 0,90 do 0,95, dok suve kobasice imaju a_w manje od 0,90. Prema našim zakonskim normama suve kobasice sadrže najviše do 35% vode (Sl. glasnik RS, broj 50/2019).

Tabela 1. Podela fermentisanih kobasica prema Pravilniku o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa (Sl. glasnik RS, broj 50/2019)

Grupa proizvoda	Podgrupa proizvoda	Naziv	
Fermentisane kobasice	Fermentisane suve kobasice	Kulen	
		Domaći kulen	
		Zimska salama	
		Sremska kobasica	
		Sudžuk	
		Čajna kobasica	
		Proizvod pod drugim nazivom	
		Fermentisane polusuve kobasice	Panonska kobasica
			Čajni namaz
			Proizvod pod drugim nazivom

1.4. Pirotška „peglana“ kobasica

Pirotška „peglana“ kobasica je specijalitet proizveden od najkvalitetnijeg mesa preživara i/ili kopitara, soli, aleve paprike, bibera i belog luka. Ovaj tradicionalni proizvod nastao je u pirotskom kraju, na području jugoistočne Srbije, u ekološkoj sredini koju karakteriše čist vazduh i nezagađeno zemljište. Sama ishrana životinja, od čijeg se mesa ovaj proizvod priprema, igra presudnu ulogu u njegovom prepoznatljivom kvalitetu. Za pravljenje kobasice koristi se nemasno meso nekoliko različitih vrsta životinja, pre svega koza, ovaca i junadi. Ranije se ovaj proizvod pravio od magarećeg mesa. Meso se odvaja od loja i prisutnog vezivnog tkiva, melje i homogenizuje sa solju i začinima. Kobasica se nakon punjenja u suva creva vezuje u obliku latiničnog slova U i suši na promaji. Najbolji period za pravljenje kobasice je mesec novembar ili decembar, jer optimalna temperatura treba da bude između -5 i $+5$ °C, bez vlage i velikog mraza. Tokom perioda sušenja, kobasice se peglaju (pritiskaju staklenim flašama), zbog čega su i dobile naziv „peglane“. Na taj način se iz njih istiskuju voda i kiseonik, što ih čini dugotrajnim proizvodom (Slika 1). Važno je napomenuti da je „peglana“ kobasica neprerađen proizvod, pripremljen bez dodatnih konzervansa i drugih aditiva, kao i da se ne izlaže postupku dimljenja.

1.5. Tehnološki postupak proizvodnje fermentisanih suvih kobasica

U poslednjih nekoliko decenija značajnije je izučavana proizvodnja fermentisanih kobasica. Utvrđeni su parametri kvaliteta, ustanovljene određene greške nastale tokom pripreme i definisani principi proizvodnje. Vesković-Moračanin et al. (2011) smatraju da postoji značajna mogućnost unapređenja i standardizaciju postupaka tokom proizvodnje tradicionalnih fermentisanih kobasica. Postoji više vrsta suvih fermentisanih kobasica koje su tipične za određena geografska područja sa različitim istorijom, religijom i klimom. Većina evropskih fermentisanih kobasica i dalje sledi tradicionalne postupke u kojima fermentacija zavisi od aktivnosti heterogenih mikrobijalnih zajednica (Franciosa et al., 2018). Ovi proizvodi predstavljaju bitan deo lokalne ekonomije i gastronomskog nasleđa (Danilović et al., 2011). Zapravo, „tipična“ hrana nekog područja ima svoje karakteristike koje su ukorenjene u tradiciji, kao i u upotrebi lokalnih sastojaka i specifičnih tehnika proizvodnje (Franciosa et al., 2018). Specifičan sastav tzv. „kućne“ mikrobiote je odgovoran za specifičan kvalitet i ukus tradicionalnih zanatskih proizvoda (Ammor et al., 2005). Iako autohtona mikrobiota ima bitnu ulogu u stvaranju specifičnog ukusa, teksture i ostalih parametara kvaliteta, kao i bezbednosti finalnog proizvoda, varijabilnost u kvalitativnom i kvantitativnom sastavu bakterijskih vrsta može dovesti do značajnih razlika u njihovom kvalitetu, pa i problema vezanih za nastanak procesa kvarenja (Palavecino Prpich et al., 2014). Proizvodnja fermentisanih kobasica se može podeliti na tri faze. U prvoj fazi se vrši priprema proizvoda, u drugoj se stvaraju uslovi potrebni za fermentaciju i u trećoj se kroz više procesa formira tekstura, boja i specifičan ukus (Hutkins, 2006). Proizvodnja počinje mlevenjem ili usitnjavanjem mesa i masnog tkiva, uz dodavanje soli i začina. U nekim slučajevima se dodaje i začinsko bilje. Nakon homogenizacije, smesa se puni u odgovarajući omotač i podvrgava fermentaciji (Aquilanti et al., 2016). Tokom fermentacije, dolazi do smanjenja pH vrednosti usled delovanja bakterija. Zbog smanjenja pH vrednosti dešava se koagulacija proteina u mesu, nakon čega se stvara specifična tekstura (Ravyts et al., 2012).

1.6. Sirovine potrebne za proizvodnju fermentisanih suvih kobasica

Osnovne sirovine u proizvodnji fermentisanih suvih kobasica su meso i masno tkivo. Meso, prema Pravilniku (Sl. glasnik RS, broj 50/2019) čini skeletna mišićna masa sa pripadajućim masnim i vezivnim tkivom, kostima i hrskavicama, krvnim i limfnim sudovima, limfnim i drugim žlezdama i nervima domaćih papkara, kopitara, živine, lagomorfa i divljači. Potrebno je da potiče od zdravih, nestresiranih životinja. Meso mora biti bakteriološki ispravno, odnosno da sadrži minimalni broj nepoželjnih bakterija. Sadržaj mesa u suvim kobasicama se kreće oko 90% (Lücke, 2000). Pri izradi

tradicionalnih kobasica uglavnom se koristi meso starijih životinja, koje sadrži više suve materije, ima intenzivniju crvenu boju i čvršću teksturu (Toldrá, 2002).

Masno tkivo je tkivo koje sadrži pretežno masti i obuhvata masno tkivo životinja dobijeno odvajanjem od mesa i telesnih šupljina (Sl. glasnik RS, broj 50/2019). Utiče na sočnost i teksturu kobasica. Sadržaj masnog tkiva kod fermentisanih suvih i polusuvih kobasica kreće se u rasponu od 10% do 30%. Ruiz (2007) smatra da što je veći sadržaj masti, sušenje je duže zbog sporijeg odavanja vlage. Ukoliko je sadržaj masti manji dolazi do bržeg sušenja i samim tim do lošijih senzornih karakteristika gotovog proizvoda.

Kuhinjska so se od davnina dodaje u sve fermentisane proizvode od mesa (Ruiz, 2007). Dodaje se u udelu 2% - 3%. Količina soli utiče na senzorne karakteristike gotovog proizvoda, ali isto tako deluje na fizičke i biohemijske karakteristike. Ruusunen & Puolanne (2005) smatraju da kuhinjska so obogaćuje ukus oslobađanjem aromatičnih isparljivih sastojaka. S jedne strane, nedostatak soli se ne može nadoknaditi upotrebom drugih sastojaka, dok sa druge strane više od 4% soli daje slaniji ukus proizvodu koji nije prihvatljiv (Feiner, 2006).

Zrenje predstavlja fizičke, hemijske i enzimske promene na osnovu kojih fermentisane kobasice postaju stabilni i održivi proizvodi sa stabilnom bojom i karakterističnom teksturom. Tokom procesa fermentacije mesa nastaje specifičan mikrobiološki ekosistem, u kojem koegzistiraju bakterije, kvasci i plesni. Raznolikost mikrobiote, utiče na senzorne karakteristike fermentisanih kobasica, tako da ovaj tip istraživanja u oblasti mikrobiologije hrane postaju značajnija tokom poslednjih decenija. Mauriello et al. (2004) smatra da se fermentacija tradicionalnih suvih kobasica oslanja na autohtonu mikrobiotu, koja potiče iz sirovine ili okoline. Sojevi izolovani iz okoline, izolovani su i u sirovini, ali i u gotovom proizvodu. Proizvodno okruženje je izvor stalne inokulacije tokom fermentacije sojevima koji imaju uticaj na tehnološke karakteristike i karakteristike gotovog proizvoda (Greppi et al., 2015). Kroz ovaj proces, kvarljive sirovine, poput mesa i masti, mikrobiološki se transformišu u konačne proizvode sa jasno definisanim senzornim profilom. Kod tradicionalno fermentisanih kobasica potrebno je i dodavanje soli i drugih začina kako bi se povećao broj korisnih bakterija i redukovao broj nepoželjnih bakterija. Kombinacijom ovih činilaca, uz aktivnosti vode, doprinosi sigurnosti fermentisanih kobasica. Pretvaranjem šećera u mlečnu kiselinu metaboličkom aktivnošću, prvenstveno bakterijama mlečne kiseline, dolazi do smanjenja pH vrednosti (Leite et al., 2015). Pri a_w -vrednosti manjoj od 0,95 ne mogu da se razmnožavaju patogene bakterije. Završetak procesa fermentacije i početak proteolitičkih i lipolitičkih procesa, odnosno početak procesa zrenja počinje porastom vrednosti pH u odnosu na najnižu postignutu vrednost tokom procesa fermentacije (Salgado et al., 2005).

Za razliku od tradicionalne proizvodnje, industrijska proizvodnja se vrši pod posebnim higijenskim uslovima, u prostorijama sa dobro kontrolisanom temperaturom, protokom vazduha i relativnom vlažnošću (Toldra & Hui, 2015). Kao starter kulture, u industrijskoj proizvodnji, koriste se bakterije mlečne kiseline i koagulaza negativne koke, koje doprinose poboljšanje higijenskog i senzornog kvaliteta finalnog proizvoda (Talon & Leroy, 2011).

1.7. Mikroorganizmi od značaja u fermentisanim kobasicama

Mikrobiotu koja je identifikovana tokom fermentacije kobasica čine bakterije mlečne kiseline, koagulaza negativne koke, plesni i kvasci. Pretpostavlja se da mikrobiota mesnog nadeva potiče od mikroorganizama koji su tu dospeli u toku procesa proizvodnje. Faktori, kao što su pad pH vrednosti, smanjenje aktivnosti vode, temperatura, prisustvo aditiva i drugi, dovode do razvoja poželjne mikrobiote i sprečavaju razvoj patogena.

1.7.1. Bakterije mlečne kiseline

Bakterije mlečne kiseline (BMK) su od posebnog interesa za fermentisanu hranu (Ravyts et al., 2012). BMK su objedinjene u heterogenu grupu bakterija na osnovu njihovih morfoloških, metaboličkih, fizioloških i genetičkih karakteristika (Savić et al., 2007). Opisane su kao grupa mezofilnih, Gram pozitivnih, fakultativno anaerobnih koka i štapića, koje ne formiraju spore.

Katalaza-negativne su, ne sadrže hem-zavisnu katalazu, iako neke vrste sintetišu „pseudokatalazu“. Ne sadrže citohrome. Udeo G+C parova je manji od 50 mol%, na osnovu čega su filogenetski uključene u *Clostridium* granu Gram pozitivnih bakterija. Uspešno kolonizuju različita staništa usled velikog metaboličkog diverziteta, uključujući gastrointestinalni trakt životinja. BMK su u sirovom mesu prisutne u malom broju, $10^2 - 10^3$ CFU/g. U toku fermentacije vrlo brzo postaju dominante zbog povoljnih uslova za njihov rast, kao što su anaerobno okruženje i prisustvo NaCl (Rantsiou & Cocolin, 2006). Proizvode mlečnu kiselinu kao krajnji metabolit tokom fermentacije ugljenih hidrata (Savić, 2007; Sharma et al., 2020). Mlečna kiselina utiče na sprečavanje rasta patogenih mikroorganizama i na taj način produžava rok trajanja gotovog proizvoda. Koriste se kao starter kulture, ali i kao probiotici (Riboulet-Bisson et al., 2012). Poslednjih godina raste interesovanje za upotrebu bakteriocina i drugih inhibitornih supstanci koje proizvode BMK i koje su našle primenu u biokonzervaciji hrane (Bredholt et al., 2001). Međutim, neka istraživanja ukazuju na to da BMK mogu da učestvuju i u kvarenju hrane, posebno kobasica gde izazivaju stvaranje sluzi i kiselog mirisa. Na osnovu metabolizma ugljenih hidrata BMK se dele u tri grupe: Obavezno homofermentativne BMK (daju isključivo mlečnu kiselinu, Fermentišu heksoze preko Embden Meyerhof Parnas puta, Ne fermentišu pentoze); Obavezno heterofermentativne BMK (laktat i etanol iz heksoza i pentoza putem fosfoketolaze); Fakultativno heterofermentativne BMK (razgrađuju heksozu glikolizom, za razliku od obavezno heterofermentativnih BMK) (Ravyts et al., 2012). Vrste BMK koje se sreću tokom fermentacije hrane predstavljene su rodovima: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus*, *Weissella* (Toldrà et al., 2001).

Vrste roda *Lactobacillus*, koje se najčešće nalaze u proizvodima od mesa, uključujući i fermentisane kobasice, su *L. sakei*, *Lactobacillus curvatus* i *L. plantarum*. *L. sakei* je BMK koja se izoluje češće u odnosu na ostale, što se objašnjava njenim metabolizmom koji je uvek prilagođen sredini (uključujući put arginin deiminaze) (Ravyts et al., 2012). U odnosu na druge BMK, tolerantija je na nepovoljne uslove sredine kao što su niska temperatura, visoke koncentracije soli i variranje nivoa O_2 (McLeod et al., 2008). Mnogi sojevi poseduju sposobnost produkcije antibakterijskih supstanci, kao što su bakteriocini, koji se koriste u biokonzervaciji proizvoda (Eijsink et al., 1996). U španskim proizvodima od mesa identifikovana je u zavisnosti od proizvoda sa 76% do 89% (Aymerich et al., 2003). U francuskoj kobasici, u sirovom materijalu se *L. sakei* nalazi u malim količinama, dok je u gotovom proizvodu identifikovana u 95% izolata (Ammor et al., 2005). *L. curvatus* dominira u kobasicama sa severoistoka Italije i u kobasicama iz Grčke (Toldrà, & Hui, 2015). U manjem broju izolovane su vrste *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus ramnosus* (Rantsiou et al., 2006; Albano et al., 2009; Comi et al., 2005). Istraživanje koje je sproveo Papamanoli et al. (2003) pokazao je da 90% izolata BMK iz prirodno fermentisanih suvih kobasica pripada vrstama roda *Lactobacillus*. Primena roda *Lactobacillus* u proizvodnji fermentisanih kobasica, zasniva se na njihovoj sposobnosti acidifikacije, ali i poboljšanju arome, teksture i nutritivne vrednosti. U proizvodima od mesa dovode do naglog pada pH vrednosti usled proizvedene mlečne kiseline. Leroy i De Vuyst (2004) navode da proteolitička aktivnost i proizvodnja komponenti arome, bakteriocini i egzopolisaharidi imaju uticaja na kvalitet i nutritivnu vrednost proizvoda i da na taj način omogućavaju široku biotehnošku primenu laktobacila.

Pored laktobacila, u fermentisanim kobasicama sreću se i pediokoke, najčešće *Pediococcus pentosaceus* i *Pediococcus acidilactici*. Po poslednjim podacima postoje 13 vrsta (Haakensen et al., 2009). Koriste se kako bi se izbegla kontaminacija proizvoda (Porto et al., 2017), imaju sposobnost sinteze bakteriocina i na taj način dovode do smanjenja prisustva neželjene mikrobiote (*Listeria*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae*, itd.) tokom fermentacije mesa (Anastasiadou et al., 2008). Sve vrste pediokoka su Gram pozitivne i pokazuju toleranciju prema temperaturi, NaCl i pH. U Evropi, u proizvodima od mesa pediokoke se sreću u malom procentu, dok se u SAD, koriste kao starter kulture duže od 70 godina (Hutkins, 2006). Laktobacili i pediokoke su dominantne bakterijske vrste u

kobasicama sa kratkim vremenom zrenja, od početka do kraja procesa, zbog čega ova vrsta kobasica ima kiseliji ukus sa malo arome (Franciosa et al., 2018).

Leuconostoc spp., uz pediokoke i laktobacile ima važnu ulogu u fermentaciji kobasica. Predstavljaju grupu Gram pozitivnih katalaza negativnih, nepokretnih i asporogenih koka, koje za svoj rast i razviće zahtevaju niz faktora. Određeni sojevi roda *Leuconostoc* stvaraju isparljive komponente iz slobodnih aminokiselina koje potiču iz procesa proteolize. Utiču na lakše varenje i na smanjenje toksina (Aro Aro et al., 2010). Potvrđeno je da raste u skladištenom mesu, u sirovom i prerađenom mesu pakovanom u vakuumu ili atmosferi sa CO₂. Hutkins (2006) na osnovu genetičkih i fenotipskih karakteristika rod *Leuconostoc* deli na: *Ln. mesenteroides*, *Ln. lactis*, *Ln. pseudomesenteroides*, *Ln. carnosum*, *Ln. gelidum*, *Ln. fallax*, *Ln. citreum*, *Ln. argentinum*, *Ln. gasicomitatum*, *Ln. kimchi*, *Ln. ficulneum*, *Ln. fructosum* i *Ln. inhae*. Tradicionalna fermentisana kobasica iz centralne Italije, (ventričina) uključivala je *Ln. mesenteroides* i *L. sakei* (Tremonte et al., 2017). Petrovačke kobasice pripremljene od hladnog mesa sadržale su u većem broju samo predstavnike *Lb. sakei* i *Ln. mesenteroides*. U kontrolisanoj fermentaciji dolazilo je do smanjenja zastupljenosti laktobacila uz povećanje prisustva leukonostoka tokom trajanja fermentacije, dok se kod fermentacije u tradicionalnim uslovima povećavao sadržaj laktobacila uz smanjenje leukonostoka (Danilović et al., 2011).

Izučavajući grčke fermentisane kobasice, Collins et al. (1993) su identifikovali rod *Weissella*. Vrste roda *Weissella* spadaju u Gram pozitivne, katalaza negativne, heterofermentativne, nepokretne (sem *W. beninensis*) fakultativno anaerobne koke ili bacile koji ne formiraju endospore (Padonou et al., 2010). Do danas je opisano 19 vrsta (Fusco et al., 2015). Vrste *W. viridescens*, *W. halotolerans* i *W. hellenica*, uglavnom su povezane sa mesom i mesnim proizvodima. Takođe su odgovorane i za promene kvaliteta upakovanih i rashlađenih prehrambenih proizvoda (Pothakos et al., 2014). *W. viridescens* uzrokuje kvarenje suvomesnatih proizvoda formirajući zelenu boju (Fusco et al., 2015) i učestvuje u kvarenju vakuum pakovanih kuvanih kobasica (Iacumin et al., 2014).

Najčešće izolovane vrste enterokoka iz mesa i proizvoda od mesa su *Enterococcus faecalis* i *Enterococcus faecium*. Enterokoke se prirodno nalaze u gastrointestinalnom traktu životinja što predstavlja veliki rizik za kontaminaciju mesa tokom klanja (Foulquié Moreno et al., 2006). Zbog toga što spadaju u termotolerantne bakterije, koje rastu na temperaturi od 10°C do 45°C, mogu izazvati probleme u mesu koje je podvrgnuto zrenju (Hugas et al., 2003). Izolovane su u fermentisanim proizvodima od mesa sa 10⁵ CFU/g. Njihova tolerancija na NaCl i nitrate dozvoljava im da rastu i da se razmnožavaju tokom perioda fermentacije (Martin et al., 2005). Još uvek traju polemike oko imenovanja enterokoka za sigurne (Generally Recognized As Safe - GRAS) mikroorganizme. Istraživanja pokazuju da enterokoke u mesu pokazuju slabiji potencijal patogenosti od kliničkih sojeva. Neke vrste enterokoka se koriste kao starter i probiotske kulture (Martin et al., 2005).

1.7.2. Koagulaza negativne koke

Koagulaza negativne koke (KNK) čine prirodnu mikrobiotu fermentisanih proizvoda od mesa. Prisustvo KNK u toku fermentacije je potrebno kako bi se obezbedio senzorni kvalitet proizvoda. Odgovorni su za stabilizaciju proizvoda, ali i proteolizu i razgradnju slobodnih aminokiselina (Aquilanti et al., 2016). Značajne aminokiseline koje su povezane sa ukusom kobasica, kao što su leucin, izoleucin i valin, razlažu do alkohola, aldehida i kiselina (Montel et al., 1998). Tolerantni su prema NaCl i kiselinu. Bitna tehnološka svojstva KNK se ogledaju kroz podsticanje aktivnosti nitrat reduktaze koja ima važnu ulogu u formiranju crvene boje. Aktivnošću katalaze doprinose razgradnji peroksida i sprečavaju nastanak užeglosti proizvoda (Ravyts et al., 2012). Aktivnost esteraze dovodi do stvaranja jedinjenja poput etil acetata i da tokom spore fermentacije nastaju jedinjenja iz katabolizma aminokiselina i ugljenih hidrata, dok je β-oksidacija lipida uočljivija tokom brze fermentacije (Marco et al., 2008). Tehnološki važni rodovi KNK su *Staphylococcus* i *Kocuria*.

Staphylococcus je reprezentativni rod grupe Gram i katalaza pozitivnih koka (Morot-Bizot et al., 2006). Pripada redu *Bacillales*, familiji *Staphylococcaceae*. U ovom trenutku rod sadrži 53 vrste

i 28 podvrsta (www.bacterio.net; Leibniz Institute DSMZ, 2019). Tehnološka svojstva koagulaza negativnih stafilokoka se ogledaju u podsticanju aktivnosti nitrat-reduktaze i u stabilizaciji boje. Takođe, imaju učešća i u aktivnosti katalaze koja razgrađuje peroksid u cilju sprečavanja užeglosti i u aktivnosti lipolize i proteolize koje učestvuju u konverziji masnih kiselina i aminokiselina (Ravyts et al., 2012). Tipičnu mikrobiotu u kobasicama čine *St. xylosus*, *St. saprophyticus* i *St. equorum*, ali su nađene i vrste poput *St. succinus*, *St. warneri*, *St. vitulinus*, *St. pasteurii*, *St. epidermidis*, *St. leutus* i *St. haemolyticus* (Cocolin et al., 2001.; Sánchez Mainar et al., 2017). *St. xylosus* čak i kada nije dominantan u nadevu, u gotovom proizvodu je identifikovan u 11% do 100% izolata u zavisnosti od vrste kobasice (Toldra & Hui, 2015). *St. saprophyticus* dominira u suvim fermentisanim kobasicama iz Argentine (Fontana et al., 2005). U tradicionalno spremljenim fermentisanim francuskim kobasicama dominira *St. equorum* (Morot-Bizot et al., 2006). *St. carnosus*, vrsta koja se često koristi kao komercijalna starter kultura KNK-a u Europi, u tradicionalno fermentisanim kobasicama samo je marginalno prisutna. Ove bakterije su slabo konkurentne u prisustvu acidofilnih BMK. Iacumin et al. (2006) i Quijada et al. (2018) su proučavali ekologiju i dinamiku stafilokoka različitih proizvođača u kobasicama proizvedenim po tradicionalnoj recepturi. Kod različitih proizvođača nađene su iste vrste (*St. xylosus*, *St. saprophyticus*, *St. equorum*, *St. warneri*, *St. pasteurii*, i *St. epidermidis*), ali je distribucija zavisila od proizvođača. Ovi rezultati potvrđuju da se selekcija mikrobiote, koja utiče na krajnju senzoričku proizvodnju, vrši u proizvodnim pogonima.

Sa sigurnošću se ne može još uvek reći koje su vrste KNK najznačajnije za poboljšanje ukusa tokom proizvodnje. Søndergaard & Stahnke (2002) smatraju da upotreba *St. xylosus* doprinosi manje kiselim ukusu u odnosu na *St. saprophyticus*, *St. equorum* i *St. carnosus*. Drugi autori smatraju da *St. carnosus* daje najbolji ukus fermentisanim suvim kobasicama (Berdague et al., 1993; Tjener et al., 2004). Stahnke et al. (2002) navode da bi *St. carnosus* mogao ubrzati fermentaciju. Treba imati na umu da proces fermentacije zavisi i od početnih uslova. Tako, na primer, više početne vrednosti pH favorizuju *St. carnosus*, dok smanjuju uticaj *St. xylosus* (Olesen et al., 2004), dok viša početna temperatura doprinosi formiranju metil-razgranatih aldehida i njihovih alkohola pogodnih za rast *St. xylosus*, ali ne i za rast *St. xylosus* (Stahnke, 1999).

Iz roda *Kocuria*, u fermentisanim kobasicama pronađene su *K. varians* i *K. kristinae* (Franciosa et al., 2018). Spadaju u nepokretne koke sa optimalnim rastom na temperaturi od 30 do 37°C i pH 7 do 8. Filogenetske i hemotaksonomske analize su dovele do formiranja roda *Kocuria* 1995. godine, koji sadrži do sada opisanih 17 vrsta (Yun Ji-Hyun et al., 2011).

1.7.3. Kvasci i plesni

U nekim fermentisanim kobasicama na senzorna svojstva proizvoda utiče i razvoj površinske mikrobiote koja se sastoji od plesni i kvasaca. Tokom fermentacije BMK menjaju okolinu što favorizuje razvoj kvasaca. Nastala mlečna kiselina, kao i snižena aktivnost vode, stvaraju modifikovane uslove životne sredine koji ometaju rast bakterija i favorizuju rast kvasaca koji u takvim okolnostima koriste dostupnu hranljivu materiju za sopstveni rast (Dillon & Board, 1991).

U tradicionalno fermentisanim kobasicama koje su bez dodatka starter kultura, kvasci se nalaze do 10⁶ CFU/g (Rodríguez et al., 2001). Koncentracija kvasaca opada tokom zrenja, ali se mogu naći u gotovom proizvodu ukoliko je aktivnost vode veća od 0,85 (Rodríguez et al., 2001). I pored ograničenih istraživanja o distribuciji kvasaca, Gardini et al. (2001) su utvrdili da spontanu fermentaciju karakteriše prisustvo *Debaryomyces hansenii*, uz prisustvo više vrsta iz roda *Candida*. Takođe, Martin et al. (2002) su pokazali da pojedini sojevi *D. hansenii* pokazuju proteolitičko delovanje, kao i da doprinose slabijem razvoju žute površinske masti koja se koristi kao indeks stepena užeglosti (Rodríguez et al., 2001). *Yarrowia lipolytica* ima visoki tehnološki potencijal zbog svoje lipolitičke i proteolitičke aktivnosti. Pozitivan učinak sojeva *Y. lipolytica* je povezan sa postojanjem slobodnih masnih kiselina koje se transformišu u poželjna aromatična jedinjenja. Potvrđen je uticaj na stvaranje isparljivih jedinjenja tokom fermentacije (Flores et al., 2004). Kvasci mogu dovesti do stabilizacije crvene boje fermentisanih kobasica (Olesen & Stahnke, 2000). Mogu imati uticaj na aromu zbog metabolizma organskih kiselina, mlečne i sirćetne kiseline. Sinergijski

odnos kvasaca i BMK potvrđen je prisustvom veće koncentracije mlečne kiseline u kobasicama sa manjim brojem ćelija kvasca (Wolter et al., 2000).

Kvasci su na početku procesa fermentacije dominantni na površini kobasica, sa udelom od oko 95% u ukupnoj mikrobioti. U drugoj nedelji fermentacije njihova zastupljenost je izjednačena sa zastupljenošću plesni, da bi na kraju fermentacije dominirale plesni (Andersen et al., 1995). U mnogim evropskim zemljama (Rumunija, Bugarska, Italija, Švajcarska, Francuska i Nemačka) plesni se koriste za površinsku kolonizaciju omotača fermentisanih mesnih proizvoda. Micelijum sprečava prekomerno isušivanje, smanjuje nivo O₂ čime se poboljšava boja proizvoda i na kraju olakšava ljuštenje kobasice (Spotti et al., 2008). Pitt & Hocking (2009) smatraju da je za ubrzan rast plesni zaslužno smanjenje aktivnosti vode i način rasta plesni uz pomoć hifa. Kserotolerantne i kserofilne plesni imaju ulogu u fermentaciji zbog svojih lipolitičkih i proteolitičkih aktivnosti, zbog čega daju specifičan ukus i aromu gotovog proizvoda (Sonjak et al., 2011). Vrste roda *Penicillium* koje se najčešće sreću u površinskoj mikrobioti fermentisanih kobasica su *P. nalgiovense*, i u manjoj meri *P. chrysogenum* (Lopez-Diaz et al., 2001). Plesni koje se još sreću na kobasicama pripadaju rodovima *Mucor*, *Cladosporium* i *Scopulariopsis*. U tradicionalnim fermentisanim kobasicama u početku dominiraju hidrofilne plesni koje pred kraj fermentacije zamenjuju kserotolerantne plesni (Baldini et al., 2000). Po nekim autorima, glavni problem sa kserotolerantnim plesnima je mogućnost nastanka mikotoksina. Najveći rizik u proizvodnji kobasica predstavlja prisustvo ohratoksina A (OTA), sekundarnog toksičnog metabolita koji proizvodi *Penicillium nordicum* (Pitt & Hocking, 2009). Vrste rodova *Cladosporium* i *Scopulariopsis* stvaraju površinske crne mrlje, čime kvare izgled gotovog proizvoda. Takođe, doprinose promeni ukusa gotovog proizvoda (Spotti et al., 2008). Plesni štite od užeglosti i omogućavaju zadržavanje boje, smanjujući nivo O₂ čime se izbegava oksidacija.

1.8. Metode za identifikaciju bakterija mlečne kiseline

U ekološkim studijama spontano fermentisanih kobasica, aktuelna su dva pristupa u postupcima izolacije i identifikacije BMK. Prvi pristup predstavlja tradicionalne mikrobiološke metode koje su bazirane na procesima kultivacije mikroorganizama i zasnivaju se na rastu mikroorganizama na sintetičkim podlogama koje simuliraju ekološke uslove staništa iz kojeg su oni izolovani. Izolacijom i biohemijskom identifikacijom, uočavaju se mikroorganizmi koji se mogu lako kultivisati, dok ne postoji informacija o mikroorganizmima kojima treba postupak obogaćivanja ili koji se nalaze su u subletalnom ili fiziološkom stanju (Rantisou et al., 2005). Neke vrste nisu u stanju da rastu *in vitro* ili su inferiornije u odnosu na vrste koje obilnije rastu. Ukoliko je broj izolata premali, a uslovi u kojima rastu restriktivni, pregled date mikrobiote neće biti reprezentativan, a njihov pravi diverzitet biće potcenjen (Ndoye et al., 2011). U stvari, tradicionalne mikrobiološke tehnike ne daju tačan pregled mikrobiološkog diverziteta. Ove metode, takođe, su nedovoljne za praćenje dinamike mikroorganizama tokom proizvodnje i fermentacije (Denis et al., 2001). Prednost fenotipskih metoda je u niskoj ceni i jednostavnosti, dok je nedostatak nedovoljna osetljivost. Ove tehnike oduzimaju i dosta vremena zbog dugih perioda kultivacije, tako da se danas uglavnom koriste za preliminarnu identifikaciju i grupisanje BMK (Juste et al., 2008).

Drugi pristup je predstavljen primenom molekularnih metoda koje karakteriše pouzdanost, viši nivo ponovljivosti i brzina (Cocolin et al., 2004). Poslednjih 30 godina razvijen je veliki broj tehnika koje su omogućile proučavanje mikrobiote hrane kao i specifičnih tehnika za identifikaciju različitih vrsta BMK i KNK (Rossi et al., 2001, Blaiotta et al., 2005). Molekularne tehnike koje se koriste za razlikovanje laktobacila su RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction) i rep-PCR (Repetitive Sequence-Based PCR).

RAPD-PCR je tehnika koja koristi proizvoljno dizajnirane oligonukleotidne prajmere nasumične sekvence duge 10-12 baznih parova. Poslednjih godina zabeležen je veliki broj radova u kojima se primenjuje RAPD-PCR tehnika za identifikaciju korisnih i patogenih mikroorganizama u fermentisanoj hrani i u industrijskim postrojenjima (Andrighetto et al., 2001; Carminati et al., 2004; Ammo et al., 2005; Greco et al., 2005). U istraživanju ekologije BMK u tri prirodno fermentisane

kobasice proizvedene na severoistoku Italije korišćen je RAPD-PCR za karakterizaciju sojeva koji pripadaju istoj vrsti, ali izolovanih u različitim kobasicama, korišćenjem prajmera M13 (Urso et al., 2006). U mikrobiološkoj studiji tradicionalnih fermentisanih kobasica bez starter kultura, Comi et al. (2005) su pratili tri fermentacije u različitim godišnjim dobima. Najbrojniji su bili *L. curvatus* i *L. sakei*, to su ujedno i bile jedine zajedničke vrste za sve tri fermentacije. Fontana et al. (2005) proučavali su mikrobiotu argentinske tradicionalne suve fermentisane kobasice. U radu je izvršena RAPD-PCR analiza prajmerima M13, XD9, RAPD1 i RAPD2 koja je pokazala prisustvo 100 različitih sojeva BMK i KNK. U istraživanju mikrobiote italijanske suve kobasice rezultati su pokazali da određeni parametri životne sredine dozvoljavaju razvoj određenih sojeva tokom fermentacije u trajanju od dva meseca. Dominantni sojevi iz KNK grupe pripadali su vrstama *St. xylosus* i *St. sciuri* i dok su iz BMK grupe dominirali *L. sakei* i *L. plantarum* (Rebecchi et al., 1998). Hyytiä – Trees et al. (1999) navode da RAPD-PCR može biti dovoljno diskriminatoran za *L. sakei* uz rep-PCR. *L. lactis* subsp. *lactis* i *L. lactis* subsp. *cremoris* predstavljaju dve podvrste koje imaju različita tehnološka svojstva, a zbog široke primene u prehrambenoj industriji potrebno ih je razlikovati. Prajmeri CORR1, P16, P17 i P2, korišćeni u studiji Prodešalová et al. (2005), su genotipski jasno razdvojili pomenute podvrste. Abdollahniya et al. (2018) su RAPD-PCR tehnikom detektovali i klasifikovali laktobacile fermentisanih proizvoda iz Bukana, koristeći šest različitih prajmera.

Uloga *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* u mešovitim populacijama fermentisane hrane je veoma značajna, zato je potrebna pouzdana metoda za identifikaciju. RAPD-PCR se pokazala kao dobra metoda za generisanje paterni vrsta roda *Leuconostoc* (Moschetti et al., 2000; Kaur et al., 2017).

rep-PCR tehnika koristi repetitivne elemente koji se nalaze u genomima brojnih bakterija i arhea za dobijanje jedinstvenih DNK profila pojedinačnih sojeva mikroorganizama (Ishii & Sadowsky, 2009). Gevers (2001) sa saradnicima zaključuje da (GTG₅)-PCR predstavlja brzu i preciznu tehniku za tipizaciju laktobacila i drugih BMK važnih za industriju fermentisane hrane (De Urazza et al. 2000; Sawitzki et al., 2009; Nguyen et al., 2013). Identifikacija i karakterizacija nativnih BMK „Nem chua“, tradicionalne vijetnamske fermentisane kobasice, ukazuje da su i rep-PCR i PFGE prihvatljive u pogledu pouzdanosti, međutim autori prednost daju PFGE metodi zbog veće diskriminatorne moći (Tran et al., 2011). Pothakos et al. (2014) su ustanovili upotrebom rep-PCR tehnike i AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) da su *Ln. gelidum* subsp. *gasicomitatum*, *Ln. gelidum* subsp. *gelidum*, *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus algidus* i *Lactococcus piscium* dominantne vrste koje mogu ostati dugo neotkrivene standardnim protokolima. U italijanskim kobasicama, zvanim „salami“, identifikovane su izolovane *Staphylococcace* i BMK. Rezultati su pokazali da su tokom sazrevanja najdominantnije vrste *St. succinus*, *St. xylosus* i *L. sakei*. rep-PCR je izolovane *St. succinus* i *St. xylosus* grupisao zajedno, čime je ukazano na moguću kontaminaciju tokom proizvodnog procesa (Greppi et al, 2015).

Kombinovana upotreba RAPD-PCR i rep-PCR poslužila je za karakterizaciju *St. xylosus* izolovanih iz kobasica iz različitih delova Italije (Iacumin et al., 2006). Analiza rep-PCR profila izolata kobasice iz Srbije ukazuje na veliko prisustvo *L. sakei* i *L. mesenteroides*, što je u suprotnosti sa ostalim studijama, gde je *Ln. mesenteroides* izolovan u malom procentu. Takođe, je i *Pediococcus pentosaceus* izolovan u velikom procentu, dok su *E. durans* i *E. caseliflavus* bili prisutni sa malim udelom (Danilović et al., 2011).

1.8.1 Metagenomika

Poslednjih decenija napravljen je veliki korak u otkrivanju i u identifikaciji mikroorganizama molekularnim metodama. Danas se u analizi biodiverziteta najčešće koristi metagenomski pristup u kombinaciji sa tradicionalnim tehnikama kultivacije bakterija. Ove metode, nezavisne od kultivisanja, zajedno sa „Next Generation Sequencing“ (NGS) tehnologijom, korišćene su uspešno za razumevanje dinamike i diverziteta mikroorganizama tokom zrenja kobasica (Cocolin et al., 2011).

Pristupi metagenomike su doprineli boljem i tačnijem opisu ekosistema i mikroorganizama uključenih u proces fermentacije (Bigot et al., 2015). Handelsman (1998) je kreirao termin „metagenomika“ da bi objasnio nov način istraživanja u kome se analizira ukupan genetički materijal dobijen direktno iz sredine. Metagenomika pruža direktan pristup genetičkom sadržaju mikrobijalnih zajednica, koristeći skup molekularnih metoda i bioinformatičkih alata (Thomas et al., 2012). U odnosu na filogenetske metode, metagenomika pruža uvid u funkcionalni genetički sastav zajednica, ali ovim pristupom se ne izoluju mikroorganizmi, već se stiču znanja o njihovom prisustvu (Thomas et al., 2012).

Mikroorganizmi tradicionalne fermentisane kobasice od laminog mesa proučavani su NGS pristupom zasnovanim na „Illumina MiSeq“ sekvenciranju V3 i V4 regiona 16S rRNK, u kombinaciji sa RAPD-PCR upotrebom RAPD2 i M13 prajmera. Ovim pristupom praćene su sukcesije bakterijskih zajednica tokom zrenja fermentisanih kobasica od laminog mesa. Upotreba više od jedne metode pružila je bolji pregled diverziteta mikroorganizama (Fontana et al., 2016).

CILJEVI RADA

2. CILJEVI RADA

Pirotska „peglana“ kobasica predstavlja sušen, termički netretiran, visoko kvalitetan proizvod od mesa, bez dodatih konzervanasa. Imajući u vidu odsustvo tehnološke prerade, karakterističan sastav mesa, kao i poseban način pripreme ovih kobasica sa određenog geografskog područja, ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. Morfološka, biohemijska i molekularno-genetička karakterizacija izolata bakterija mlečne kiseline iz gotovih proizvoda kobasica različitih proizvođača u zavisnosti od godine uzrokovanja izolata i procentualne zastupljenosti različitih vrsta mesa;
2. Genetički polimorfizam i klasterizacija predstavnika različitih grupa bakterijskih izolata korišćenjem različitih metoda pomoću specijalizovanih prajmera;
3. Određivanje fizičko-hemijskih i tehnoloških svojstava kobasica odabranog proizvođača tokom različitih faza zrenja, uz određivanje ukupnog broja BMK i mezofilnih bakterija odgajivačkim metodama i praćenjem promena sastava bakteriote metabarkoding pristupom;
4. Određivanje fizičko-hemijskih i tehnoloških svojstava u gotovim proizvodima različitih proizvođača kobasica standardne recepture u odnosu na kobasice nestandardnih proizvođača;
5. Kontrola kvaliteta gotovih proizvoda kobasica različitih receptura, korišćenjem klasičnih mikrobioloških tehnika i metabarkoding pristupa.

MATERIJAL I METODE

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Medijumi za kultivaciju bakterija i rastvori

MRS agar (Torlak, Srbija)

Pepton Torlak	10,0 g
Mesni ekstrakt	10,0 g
Ekstrakt kvasca	5,0 g
Dekstroza	20,0 g
Kalijum-hidrogenfosfat	2,0 g
Natrijum-hlorid	5,0 g
Natrijum-acetat	2,5 g
Magnezijum-sulfat	1,1 g
Mangan-sulfat	0,2 g
Agar	12,0 g

Hranljivi bujon (HiMedia Laboratories)

Govedi ekstrakt	1,0 g
Ekstrakt kvasca	2,0 g
Pepton	5,0 g
NaCl	5,0 g
dH ₂ O	1000 ml

LA

Kazein hidrolizat	10 g
Ekstrakt kvasca	5 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
dH ₂ O	1000 ml

Podloga za ukupan broj bakterija (eng. Plate Count Agar - PCA; HiMedia Laboratories)

PCA	23,5 g
dH ₂ O	1000 ml

Podloga za aktivnost arginin dehidrolaze (Torlak)

Pepton	1,0 g
NaCl	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
Fenol crveno	0,01 g
Arginin (HCl)	10,0 g
Agar	3,0 g
dH ₂ O	1000 ml

Podloga za hidrolizu eskulina (Torlak)

Pepton	10 g
Eskulin	1 g
Feriamonijum citrat	0,5 g
Agar	12 g
dH ₂ O	1000 ml

Rastvor KOH (3%)

KOH	3 g
dH ₂ O	100 ml

Kristal violet

Kristal violet	2 g
Etanol 96%	20 ml
Amonijum oksalat	0,8 g
dH ₂ O	80 ml

Lugolov rastvor

Kristalni jod	1 g
Kalijum-jodid (KI)	2 g
dH ₂ O	300 ml

Safranin

Safranin	0,25 g
Etanol 96%	10 ml
dH ₂ O	100 ml

TE pufer, pH 7,6

10 mM TRIS	0,036 g
0,5 mM EDTA	60 µl
dH ₂ O	30 ml

5 × TBE, pH 8,0

0,5 M EDTA	10 ml
50 mM TRIS	54,48 g
Borna kiselina	27g
dH ₂ O	1000ml

3.2 Metode

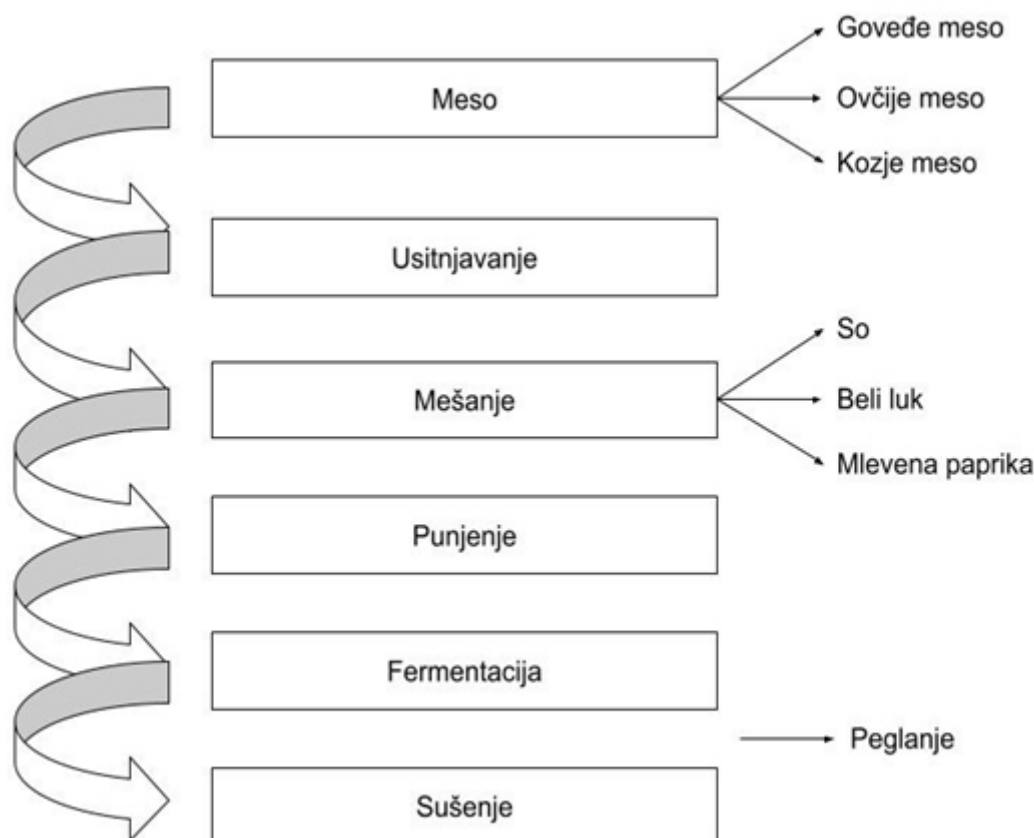
3.2.1 Priprema kobasica

Pirotska „peglana“ kobasica pripremana je u domaćinstvima pirotskog okruga, tradicionalnim porodičnim recepturama, u periodu od decembra do februara 2013. i 2014. godine. Za potrebe prve faze ovog istraživanja, kobasice su spravljane u šest različitih domaćinstava, sa različitim udelima i vrstom upotrebljenog mesa, kao i dužinom sušenja (Tabela 2).

Tabela 2. Pregled udela i vrsta mesa različitih proizvođača pirotške „peglane“ kobasice

Proizvođač	Vrsta i udeo mesa	Dužina sušenja
Proizvođač 1	Juneće 40% Ovčije 30% Kozije 30%	25 dana
Proizvođač 2	Juneće 30% Kozije 15% Magareće 40% Ovčije 15%	23 dana
Proizvođač 3	Juneće 60% Ovčije 15% Kozije 15% Konjsko 10%	23 dana
Proizvođač 4	Juneće 40% Ovčije 10% Kozije 25% Magareće 25%	30 dana
Proizvođač 5	Juneće 50% Ovčije 20% Kozije 20% Magareće 10%	28 dana
Proizvođač 6	Juneće 60% Ovčije 25% Kozije 10% Magareće 5%	20 dana

Nadev je pripreman od prethodno ohlađenog i usitnjenog mesa različitih vrsta životinja (juneće, ovčije, kozije, magareće, konjsko) pomešanog sa začinima (beli luk, mlevena paprika) i solju. Punjen je u prirodni omotač – tanko goveđe crevo, nakon čega su krajevi kobasica vezivani i formatirani u obliku slova „U“. Kobasice su podvrgnute postupku zrenju, pri temperaturi od -5°C do +5°C. Tokom perioda sušenja, kobasice su peglane staklenom flašom svakog drugog dana (Slika 1). Uzorci za mikrobiološku analizu uzeti su nakon završenog perioda zrenja u zavisnosti od recepture proizvođača, kao što je prikazano u Tabeli 2.



Slika 1. Šematski prikaz procesa proizvodnje fermentisanih kobasica

Za potrebe druge faze istraživanja, odabran je jedan proizvođač za pripremu piroške „peglane“ kobasice. Priprema kobasica je započela u novembru 2018. godine od najvrednijeg goveđeg i kozjeg mesa, odnosno, jaretine (u odnosu 50:50), prethodno očišćenog od vidljive masnoće. U usitnjeno meso je dodavana so i prirodni začini, beli luk i ljuta mlivena paprika. Ovako pripremljeno mesno testo je punjeno u tanka goveđa creva prečnika 40 mm, a sama kobasica je formirana u obliku potkovice. Kobasice su sušene do 28 dana u komori za sušenje uz relativnu vlažnost vazduha od 75% do 85%, bez protoka vazduha. U periodu sušenja kobasice su tri puta nedeljno presovane staklenom flašom. Za potrebe treće faze istraživanja analizirane su kobasice šest različitih proizvođača (Tabela 2).

3.2.2. Izolacija BMK

Nasumično birane kobasice zasecane su na 5 do 6 mesta sterilnim skalpelom. Po 10 g unutrašnjeg dela kobasice aseptično je preneseno u 90 ml sterilisanog fiziološkog rastvora u kome je prethodno dodato 0,9 g peptona. Smeša je mešana 20 minuta. Metodom sukcesivnog razblaženja utvrđivan je broj mikroorganizama. Metoda podrazumeva prenošenje određenih razblaženja na čvrste podloge: hranljivi agar (HiMedia, India) i MRS agar (Torlak, Srbija). Ploče sa MRS agarom su nakon nanošenja 1 ml određenog razblaženja, nalivene dodatnim slojem podloge radi postizanja mikroaerofilnih uslova. Posle 5 dana inkubacije na 30°C, kolonije različitih morfologija su presejane u MRS bujon i inkubirane 48 h na 30°C. Iz bujona kulture su zasejane na Petrijeve šolje i izvršeno je trostruko prečišćavanje izolata. Izolati su stokirani u 30% glicerolu i čuvani na temperaturi od -20°C do dalje upotrebe. Izolati dobijeni 2013. godine bili su označeni prefiksom pK, dok su izolati iz 2014. bili bez prefiksa, a prvi broj je predstavljao serijski broj proizvođača. Proizvođači su birani na osnovu vrsta mesa koje se koristi tokom procesa pravljenja kobasica, kao i u odnosu na varijacije u procentualnoj zastupljenosti mesa.

U drugoj fazi istraživanja za praćenje rasta korišćeni su MRS agar, LA agar i PCA agar. Za ispitivanje fizičko-hemijskih i tehnoloških parametara tokom procesa zrenja piroške „peglane“ kobasice, uzorci su sakupljeni u pet vremenskih perioda (0., 7., 14., 21. i 28. dan sa tri kobasice po uzorku i odvojeno su analizirani), dok su sukcesije nekulturable i kulturable bakterijskih zajednica praćene tokom šest vremenskih perioda {0. dan (uzorak Z2), 2. dan (uzorak Z3), 7. dan (uzorak Z4), 10. dan (uzorak Z5), 14. dan (uzorak Z6) i 21. dan (uzorak Z7) dan sa tri kobasice prema vremenskoj tački uzrokovanja objedinjene u jedan uzorak na kraju}, uključujući i uzorak tankog goveđeg creva (uzorak Z1). Uzorci su upakovani u vakuumu tokom svih vremenskih tačaka sakupljanja, a zatim su u rashladnim kutijama transportovani do laboratorije.

3.2.3. Biohemijska karakterizacija izolata

Svi dobijeni izolati, za potrebe prve faze istraživanja, nakon bojenja po Gramu i ispitivanja sposobnosti sinteze katalaze sa 30% H₂O₂, podvrgnuti su daljem ispitivanju. Svi izolati su ispitani na produkciju gasa, sposobnost rasta na različitim temperaturama (+15 °C i +45 °C), toleranciju na različite koncentracije soli (4 i 6,5% NaCl), a dodatno je utvrđena i sposobnost hidrolize arginina i eskulina (Greco et al., 2005).

3.2.4. Molekularna karakterizacija izolata

3.2.4.1. Izolacija DNK

Za potrebe prve i druge faze istraživanja, ekstrakcija ukupne DNK iz čistih kultura izvršena je prema modifikovanom protokolu Le Marrec et al. (2000). Prekonoćne kulture su centrifugirane na 13000 rpm u trajanju od 5 min, ćelije su resuspendovane u 500 µl pufera za lizu (PP pufer, pH 8; 0,3% NH₄-acetat; 0,02% Mg-acetat; 20% saharoza) sa 10 mg/ml lizozima i nakon toga su inkubirane na 37°C u trajanju od 30 min. Sadržaj je potom centrifugiran na 13000 rpm u trajanju od 5 min, a pelet ispran u 500 µl TEN pufera (50 mM TRIS, pH 8; 10 mM EDTA, pH 8; 50 mM NaCl). Reakcija je zaustavljena sa 250 µl 2% SDS-om i dodavanjem 250 µl donje faze neutralnog fenola. Dve faze su formirane ponovnim centrifugiranjem na 13000 rpm u trajanju od 10 minuta. Gornja faza je prebačena u nove tube. Nakon dodavanja 1/10 volumena 3M Na-acetata (pH 4.8) i 1 volumena izopropanola sadržaj je centrifugiran na 13000 rpm u trajanju od 15 minuta. U završnoj fazi dodat je 1 ml hladnog 70% etanola, potom je sadržaj centrifugiran na 13000 rpm (5 min) i odliven etanol. DNK je resuspendovana u 50 µl TE pufera sa dodatkom smeše RNAza (1 µl stoka 10 mg/ml u 49 µl TE pufera). Dobijeni uzorci izolovane DNK su inkubirani 15 min na 37°C i nakon toga čuvani na -20°C do reakcije umnožavanja PCR-om.

3.2.4.2. Genetičko profilisanje

Za prvu fazu istraživanja PCR reakciona smeša (25 µl) za RAPD-PCR i rep-PCR analizu sastojala se od 1 µl totalne DNK; 1.5 µl 25 mg MgCl₂ (KAPA Biosystems, SAD); 0.5 µl dNTP (10 mM svaki) smeše (KAPA Biosystems, SAD); 2.5 µl 10 × KAPA Taq pufera; 1.9 µl prajmera (10 µM); 17.5 µl ultra čiste vode, oslobođene DNaza/RNaza (Gibco, UK) i 0.1 µl (5U/µl) KAPA Taq polimeraze (KAPA Biosystems, SAD).

Tabelarni pregled rep-PCR i RAPD-PCR reakcija, kao i reakcija korišćenih u drugoj fazi istraživanja dat je u Prilogu 1 za svaki od prajmera.

Horizontalna elektroforeza umnoženih produkata, rađena je na 1% agaroznim gelovima. Gelovi su pravljani otapanjem agaroze u 0,5 × TBE puferu uz dodavanje etidijum-bromida (0,5 µg/ml). 0,5 × TBE pufer je korišćen i kao pufer za elektroforezu. 5 µl uzoraka mešano je sa 1.5 µl nalivajuće boje (Thermo Scientific 6 × DNA Loading Dye, SAD), nakon čega su nanošeni na gel. Elektroforeza je trajala 2 h pri naponu od 90 V i jačini struje od 300 mA. Veličine linearnih DNK fragmenata, upoređivane su sa dužinom pređenog puta DNK analiziranih fragmenata u odnosu na dužinu puta DNK fragmenta poznate veličine (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder 100-5000 bp) (Fermentas UAB, Vilnius, Litvanija). Nakon elektroforeze, pod UV osvetljenjem na transiluminatoru (Biometre, Getingen, Nemačka) fotografisani su gelovi.

3.2.4.3. Filogenetska analiza

Totalna DNK iz odabranih izolata korišćena je za PCR amplifikaciju 16S rRNK gena sa univerzalnim prajmerima UN116SF (GAGAGTTTGATCCTGGC) i UN116SR (AGGAGGTGATCCAGCCG). Smeša za PCR pripremljena je prema prethodno opisanoj recepturi. PCR reakcije su izvedene zagrevanjem prajmera na temperaturu od 50 °C u trajanju od 1 minuta. Dobijene sekvence su pretražene na homologiju sa deponovanim genima korišćenjem BLAST pretraživačkog programa Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (*engl.* National Center for Biotechnology Information). Sve sekvence su poravnate korišćenjem ClustalW opcije za višestruko poravnavanje sekvenci implementirane u program BioEdit 7.1.3. Filogenetsko stablo je konstruisano u MEGA 6 programu korišćenjem Neighbour-joining metode koje je zasnovano na matriksu distance po paru sa Kimura dvoparametarskim nukleotidnim modelom zamene. Uz pomoć dobijenih fotografija pravljene su dendogrami u programu PyElph 1 (Pavel & Vasile, 2012). Klasterisanje rezultata je vršeno pomoću UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) algoritma sa „bootstrap“ vrednošću 100.

3.2.5. Metabarkoding analiza

3.2.5.1. DNK izolacija, priprema biblioteka i NGS sekvenciranje

U drugoj fazi istraživanja uzorci su uzeti iz nasumično odabranih delova kobasica u prethodno opisanoj dinamici, praveći sterilnim skalpelom prave male rezove na nekoliko mesta. Svi delovi sakupljeni iz tri kobasice su spojeni i pomešani u jedan uzorak. Ekstrakcija DNK je obavljena korišćenjem Zymo BIOMICS DNA Mini Kit (Zymo Research, USA) od najmanje 200 mg/zbirnog uzorka iz svake vremenske tačke, u skladu sa protokolom proizvođača. Koncentracija izolovane DNK je merena korišćenjem uređaja Qubit Fluorometric Quantitation (Qubit 4 Fluorometer, Invitrogen, USA). Sekvenciranje amplikona je obavljeno komercijalno (FISABIO, Valensija u Španiji) korišćenjem spojenih krajeva (*engl. paired-end*) od 2×300 bp na MiSeq sekvenceru prema uputstvima proizvođača (Illumina, SAD) za sekvenciranje. Da bi se identifikovale bakterijske zajednice, amplifikovan je V3-V4 region gena 16S rRNA sa definisanim forward (5'-CCTAGCGGGNGGCVCAG-3') i reverznim (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') prajmerima (Klindworth et al., 2013).

U trećoj fazi istraživanja, po 10 g od svakog uzorka kobasice (od svakog uzorka zasecano je na oko 5 cm dužine kobasice) izmrvljeno je do praškaste konzistencije korišćenjem tečnog azota. Ekstrakcija ultra čiste DNK iz svih uzoraka kobasica, približne težine od oko 250 mg, izvedena je korišćenjem ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep kitom (D4300T, Zymo Research) kao pet nezavisnih replika po proizvođaču, u skladu sa protokolom proizvođača. Ekstrahovana DNK iz svake replike kobasice je objedinjena u jedan uzorak po proizvođaču, dok je koncentracija DNK merena korišćenjem Qubit Fluorometric Quantitation (Qubit 4 Fluorometer, Invitrogen™, SAD). Sekvenciranje sledeće generacije (NGS) i komparativna analiza bakterijske 16S rRNK su komercijalno urađene kao i u drugoj fazi istraživanja (FISABIO, Valensija, Španija). Za iniciranje protokola korišćeno je ukupno 5 ng/μL ekstrahovane DNK, dok je korak pravljenja biblioteka izveden korišćenjem Nextera XT Index Kit (FC-131-1096). Nakon potvrde veličine (~550 bp) na Bioanalyzer DNK 1000 čipu, biblioteke su sekvencirane korišćenjem 2 × 300 bp uparenih krajeva (MiSeq Reagent kit) na MiSeq sekvenceru, prema uputstvu Illumina platforme.

3.2.5.2. Obrada podataka

Procena kvaliteta sekvence je izvršena korišćenjem DADA2 R paketa (Callahan, 2016). Trimovanje prajmera je izvedeno Bbduk-om (Bushnell et al., 2017) korišćenjem istih prajmera kao i tokom sekvenciranja, prema navedenim funkcijama: $ktrim = 1$ (sečenje na levom kraju), $hdist = 1$ (Hamingovo rastojanje), $mm=f$ (zanemarujući srednju osnovu kmer), sa dužinom k-mera 15. Sve forward sekvence su trimovane na dužinu od 250 bp; dok su reverzne sekvence bile trimovane na 200 bp, zajedno sa svim očitanjima čiji je Phred skor bio niži od 6. Sve sekvence koje su imale više od četiri procenjene greške napred i reverzno (izračunate kao $zbir(10^{-(Q/10)})$, gde je Q Phred skor)

su isključene (argument: $\text{maxEE} = c(3,2)$), kao i sva očitavanja sa nedefinisanim bazama (N), i sekvence koje su bile kraće od 50 bp. Spajanje sekvenci je izvedeno sa minimalnim preklapanjem od 20 baza bez nepodudaranja. Himerne sekvence su uklonjene korišćenjem podrazumevanih parametara u paketu DaDa2 R, a sve sekvence kraće od 400 bp i duže od 429 bp su eliminisane. Taksonomska anotacija sekvenci 16S rRNA izvršena je korišćenjem baze podataka SILVA132 (<https://zenodo.org/record/1172783>, pristupljeno bazi 21.08.2021). RDP Naïve Bayesian Classifier (Wang et al., 2007) sa podrazumevanim opcijama implementiran u DADA2 paketu korišćen je za klasifikaciju taksonomije do OTU (engl. *Operational Taxonomic Unit*) nivoa. Sve sekvence koje su bile predstavljene hloroplastom, mitohondrijama ili neidentifikovanim brojem na nivou razdela nisu uzeta u obzir za dalju analizu. Homologija identifikovanih OTU-a je dodatno izvršena na osnovu BLASTn najboljeg rezultata (pristupljeno: 25.08.2020.) u NCBI bazi podataka za 16S, a prvi Top5 pogoci sa najbližom taksonomijom vrsta korišćeni su za analizu korišćenjem „Joint Genome Project Taxonomy” servera (<https://takonomi.jgi-psf.org/>).

Procena kvaliteta za treću fazu istraživanja vršena je korišćenjem prinseq-lite programa (Schmieder & Edwards, 2011) sa standardizovanim parametrima [min_length (50), trim_qual_right (30), trim_qual_type (mean), and trim_qual_window (20)], dok su R1 i R2 sekvence bile spojene pomoću flash programa (Magoč & Salzberg, 2011). Kako bi se procenila ukupna raznovrsnost, izvršena je rarifikaciona analiza i analiza parova (Wilcoxon i Kruskal-Wallis testovi) između različitih faktora metapodataka (standardna i nestandardna receptura kobasica). Jaccard i Sorensen distance, analiza glavnih komponentata (PCoA) i analize grupisanja korišćene su za određivanje beta diverziteta u zajednicama uzoraka. Alfa i beta diverzitet bakterijskih zajednica upoređene su na različitim taksonomskim nivoima (razdeo, familija i rod).

3.2.5.3. Bioinformatička analiza

Alfa raznovrsnost je procenjena korišćenjem programa Phyloseq R (McMurdie & Holmes, 2014) na svim taksonomskim nivoima do OTU nivoa. Korišćeni su indeksi alfa diverziteta u smislu bogatstva vrsta ACE, Chao1 i broj zabeleženih vrsta (OBS). Diverzitet je prikazan korišćenjem Shannon, Simpson i Fisher indeksa. U početku je diverzitet između različitih uzoraka (beta diverziteta) procenjen na nivou OTU i određen korišćenjem dvostruke analize glavnih komponentata (engl. *Double Principle Coordinate Analysis*, DPCoA) (Pavoine et al., 2004). Poravnanje sekvence je izvršeno pomoću DECIPHER::AlignSeqs sa podrazumevanim argumentima (Wright, 2015). Ovo poravnanje je korišćeno za kreiranje neighbor-joining stabla preko paketa phangorn 2.5.5 (Schliep, 2011). Dendrogram je ukorenjen prema midpoint-u (https://vvv.mun.ca/biologi/scarr/Panda_midpoint_rooting.html). Međutim, transformacija koja stabilizuje varijansu je implementirana u DESeq2 paketu, a višedimenzionalna transformacija skaliranjem (engl. *MultiDimensional Scaling transformation*, MDS) je izvedena korišćenjem ponderisanih UniFrac udaljenosti (Lozupone et al., 2007). Pre izračunavanja rastojanja, uzorci su rarefikovani do jednake dubine (depth) (prema uzorku sa najmanjim brojem sekvenci) i transformisani $\log(1 + x)$ transformacijom.

3.2.5.4. Dostupnost podataka

Neobrađeni podaci mogu se naći u bazi podataka pod brojem BioProject (NCBI) PRJNA910955 (od pristupnih brojeva SAMN32154226 do SAMN32154232) i PRJNA685022 (pod sledećim pristupnim brojevima: SAMN17075223, SAMN17075224, SAMN17075225, SAMN17075226, SAMN17075227, 75N17075227, 75N17075227, 75N175227, 75N17075227, 75N175227, 75N16210 proizvođača 1 do proizvođača 6, respektivno)

3.2.6. Fizičko-hemijske analize

3.2.6.1. pH vrednost

Uzorci su homogenizovani seckalicom (Blixer 2, Robot Coupe, Francuska). Vrednost pH je merena digitalnim pH metrom (CyberScan pH 510, Eutech, Singapur). Uređaj je pre upotrebe

kalibrisan standardnim puferima (pH pufera za kalibraciju bio je 7.00 i 4.00 na 20°C). Rezultat je prikazan kao srednja vrednost tri meranja određenog preseka prema prethodno određenoj dinamici.

3.2.6.2. Aktivnost vode (a_w vode)

Aktivnost vode Fast-lab merena je meračem aktivnosti vode (Gbx, Romans sur Isère Cédex, Francuska). Merač aktivnosti vode prethodno je kalibrisan NaOH i K₂SO₄. Rezultat je prikazan kao srednja vrednost tri meranja određenog preseka prema prethodno određenoj dinamici.

3.2.6.3. Određivanje sadržaja ukupnog pepela kobasica

Sadržaj ukupnog pepela određen je prema metodi SRPS ISO 936 (1999). Princip metode se zasniva na sušenju uzorka, koji se potom ugljeniše i žari na temperaturi od 550±25° C. Nakon hlađenja uzorka, izmerena je masa. Rezultati su izraženi u procentima mase (% , g).

3.2.6.4. Određivanje sadržaja hlorida

Sadržaj hlorida određen je prema metodi SRPS ISO 1841-1 (1999), tzv. metodi po Volhardu. Princip metode se zasniva na ekstrakciji uzorka vrućom vodom i taloženju proteina. Nakon završetka filtracije i zakišeljavanja, dobijenom ekstraktu dodaje se rastvor srebrno nitrata u višku, koji se potom titrira rastvorom kalijum tiocijanata. Rezultati sadržaja hlorida su izraženi u procentima (%).

3.2.6.5. Određivanje hemijskog sastava kobasica

Određivanje sadržaja proteina prema metodi po Kjeldalh-u - SRPS ISO 937:1978;

Određivanje sadržaja ukupne masti - SRPS ISO 1444:1996;

Određivanje sadržaja vlage - SRPS ISO 1442:1997.

Rezultati svih merenja prikazani su kao srednja vrednost tri meranja preseka prema prethodno određenoj dinamici.

3.2.7. Određivanje oksidacije masti

TBARS (TBA reaktivno jedinjenje) test je urađen prema metodi Bostoglo et al. (1994), uz određene modifikacije. Ovim testom se određuje količina sekundarnog razgrađenog produkata, malondialdehida, koji reaguje sa 2-tiobarbiturnom kiselinom kada se zagreva u kiselom rastvoru. U uzorku je dodata je ukupna zapremina trihlorosirćetne kiseline (TCA), nakon čega je izvršena ekstrakcija u ultrazvučnom kupatilu XUB 12 (Grant Instruments, Cambridge, UK). Za analize je korišćen spektrofotometar tipa Jenway 6300 (Jenway, Felsted, UK). Vrednosti TBARS su izražene u miligramima malondialdehida po kilogramu uzorka (mg/kg).

3.2.8. Određivanje profila masnih kiselina

Profili masnih kiselina su definisani kroz tri posebne faze: u prvoj fazi je realizovan proces ekstrakcije lipida u skladu sa metodom opisanom od strane Folch et al. (1957), u drugoj fazi su upotrebljene smeše bor trifluorida i metanola kako bi se formirali metil-estri masnih kiselina, a prema metodi Verešbaranji (1996) i u trećoj fazi su u skladu sa metodom Popovića et al. (2017) izvedene separacija, detekcija, identifikacija i kvantifikacija. Osnova principa ove metode se zasniva na ekstrakciji lipida, zatim na formiranju metil-estara masnih kiselina. Na kraju je upotrebom kapilarne gasne hromatografije sa plamenojonizujućim detektorom izvršena separacija, detekcija, identifikacija i kvantifikacija. Sadržaj masnih kiselina izražen je kao procenat mase ukupnih masnih kiselina. U prvoj fazi, postupkom hladne ekstrakcije, odnosno mešanjem i homogenizacijom uzorka sa smešom hloroforma i metanola (u razmeri 2:1, v/v) ekstrahovani su ukupni lipidi (Folch et al., 1957). U drugoj fazi, derivatizacijom ekstrahovanih lipida iz prve faze su pripremljeni metil-estri masnih kiselina, i to reakcijom transmetilacije pomoću 14% rastvora bor trifluorida u metanolu (Verešbaranji, 1996) i uz upotrebu azota za sušenje i uklanjanje zaostalog n-heptana. U trećoj fazi, izvršena je separacija, detekcija, identifikacija i kvantifikacija metil-estara masnih kiselina i to kapilarnom gasnom hromatografijom sa plameno-jonizujućim detektorom (GCFID) na uređaju Agilent 789A (Agilent

Technologies Inc., Palo Alto, CA, SAD) koji je opremljen modulom za automatsko ubrizgavanje tečnosti i visoko polarnom kapilarnom kolonom SP-2560 (100 m x 0,25 m, I.D., 0,20 μm ; Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka). Kvantifikacija metil-estara masnih kiselina izvršena je uz pomoć kalibracionih kriva koje su napravljene iz smeše standarda metil-estara masnih kiselina. Prema sastavu masnih kiselina pokazani su odnosi ZMK/NZMK i n-6/n-3.

3.2.9. Određivanje profila aminokiselina

Određivanje profila aminokiselina vršeno je kroz dve odvojene faze. U prvoj fazi sproveden je postupak hidrolize prema metodi AOAC 982.30 (2006), a u drugoj fazi sprovedena je derivatizacija slobodnih aminokiselina prema Stocchi et al. (1989). Metoda je zasnovana na hidrolizi uzorka, prekolonskoj derivatizaciji slobodnih aminokiselina, nakon koje sledi separacija, detekcija, identifikacija i kvantifikacija upotrebom reverzno-fazne tečne hromatografije visokih performansi. Sadržaj aminokiselina izražen je u miligramima na 100 grama proteina (mg/100g).

3.2.10. Određivanje tehnoloških parametara

3.2.10.1. Instrumentalno određivanje boje

Za potrebe ove faze, boja je merena u pet prethodno određenih preseka. Praćena je boja u tri parametra i to:

- Boja spoljašnje površine sa omotačem tokom celog perioda zrenja,
- Boja spoljašnje površine sa skinutim omotačem,
- Boja poprečnog preseka tokom celog perioda zrenja.

Boja spoljašnje površine sa omotačem i boja poprečnog preseka praćeni su tokom celog perioda zrenja. Boja spoljašnje površine sa skinutim omotačem praćena je u tri preseka (14. dan, 21. dan i 28. dan). U prva dva preseka (0. dan i 7. dan) ovaj parametar nije praćen jer na „sirovim“ kobasicama nije bilo moguće skinuti omotač. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost određenih preseka.

Kompjuterski vizuelni system (CVS) primenjen je za merenje vrednosti kolorimetrijskih karakteristika po CIE $L^*a^*b^*$ sistemu (CIE, 1976). Zasnovan je na tri koordinate preko kojih su definisane boje uzoraka: L^* (svetloća boje), a^* (udeo crvene boje ($+a^*$) ili zelene boje ($-a^*$)) i b^* (udeo žute boje ($+b^*$) ili plave boje ($-b^*$)). Parametri boje određeni su Sony Alpha DSLR-A200 (10,2 MP) digitalnim fotoaparatom prema metodi koju su opisali Tomašević et al. (2019). Digitalna kamera je bila postavljena na 30 cm od uzorka. Uzorci su osvetljeni fluorescentnim lampama (Master Graphica TLD 965). Četiri lampe su postavljene pod uglom od 45° radi postizanja difuznog osvetljenja. Kalibracija kamere izvršena je uz pomoć kalibracione pločice (X-Rite Colourchecker Passport, Michigan, USA). Pločica sadrži 24 standardne boje koje su predstavljene kvadratima. Kalibracija podrazumeva fotografisanje pločice i upoređivanje specijalnim softverom (ColourChecker Passport 1,0,1, X-Rite Inc.). Softver automatski prepoznaje vrednost boja i kreira digitalni negativ profila na osnovu date slike (Tomašević et al., 2019).

3.2.10.2. Instrumentalno određivanje teksture

Tekstura kobasice je merena u tri preseka tokom zrenja. U prva dva preseka (1. i 7. dan) nije bilo moguće odrediti teksturu kobasice iz tehničkih razloga. U svakom od tri preseka tokom zrenja, analizirane su po tri kobasice korišćenjem maksimalnog mogućeg broja tehničkih replikata (8-12 puta je merena tekstura na istoj kobasici). Praćeni parametri su čvrstoća (N) i žilavost ($N \times \text{sec}$). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost određenih preseka.

Instrumentalno merenje teksture kobasice određeno je Warner-Bratzlerovim testom sile smicanja (WBSF) (De Huidobro et al., 2005). Ispitivanja su izvršena pomoću univerzalnog uređaja za testiranje (TA.XT plus Stable Micro System Corporation, UK) određivanjem sile potrebne za presecanje uzorka kobasica. Merenja su vršena aparatom Warner-Blatzler sa ćelijom za sečenje, pri čemu je opterećenje ćelije bilo 50 kg, odnosno brzina noža tokom testa je bila 1,5 mm/s. Prečnik uzorka bio

je oko 10 mm. U drugoj fazi istraživanja merena su dva parametra: čvrstoća - maksimalno smicanje sila (N) i žilavost - rad smicanja (N x sec).

U trećoj fazi istraživanja, nakon dobijene krive deformacije ispitivanih uzorka, uz korišćenje softvera određena su svojstva teksture: tvrdoća, adhezivnost, elastičnost, gumzivost, kohezivnost i žvakljivost.

3.2.11. Senzorna analiza sa hedonskom skalom

Senzorna analiza je izvršena korišćenjem Smart Sensory Box software (Smart Sensory Solutions S.r.l., Sassari, Italija). Ukupno je 50 potrošača iz Beograda, učestvovalo je u ocenjivanju boje, mirisa, ukusa, ali i u ocenjivanju ukupnog kvaliteta piroške „peglane“ kobasice proizvedenih kod 6 različitih individualnih proizvođača. Korišćena je hedonska skala od 9 podeoka (Peryam & Pilgrim, 1957). Centralna vrednost hedonske skale (5) opisuje indiferentan stav potrošača prema proizvodu (“niti mi se dopada, niti mi se ne dopada”). Od centralne vrednosti u desnu stranu povećava se stepen dopadanja (najviša ocena 9 = izuzetno se sviđa), dok se u levu stranu povećava stepen nedopadanja (najniža ocena 1 = ekstremno mi se ne dopada) (Lawless & Heymann, 2010).

3.2.12. Mikrobiološka kontrola kvaliteta

Mikrobiološka kontrola kvaliteta obuhvatala je detekciju *Salmonella* spp. prema standardu SRPS ISO 6579-1:2008, *Listeria monocytogenes* prema standardu SRPS ISO 11290-1:2010 i *Enteriobacteriace* prema standardu SRPS ISO 21528-2:2009. Ukupan broj aerobnih mikroorganizama odrađen je prema standardu SRPS EN ISO 4833-1:2014.

3.2.13. Statistička obrada podataka

U cilju poređenja prosečnih vrednosti posmatranih parametara korišćene su i parametaraske i neparametaraske metode, u zavisnosti od toga da li je raspodela analiziranih podataka značajno odstupala od normalne raspodele. Odstupanje raspodele podataka od normalne raspodele je testirano testom Kolmogorov-Smirnova. Za poređenje parametara sa normalnom raspodelom korišćena je jednofaktorska ANOVA (One-way ANOVA), a za višestruko poređenje (pojedinačno poređenje parova) kao Posthoc test korišćeni su LSD (Least Significant Difference) i Tukeyev HSD (Honest Significant Difference) testovi. Kod parametara čija je raspodela vrednosti značajno odstupala od normalne raspodele za poređenje je korišćen Kruskal-Wallisov test. Nakon toga, za višestruko poređenje (pojedinačno poređenje parova) korišćen je Mann-Whitney test. Za prag statističke značajnosti, u svim primenjenim procedurama je izabrana vrednost $P \leq 0,05$. Sve statističke analize su izvršene korišćenjem softverskog programa IBM SPSS Statistics v.23 (IBM SPSS Inc., Armonk, Njujork, SAD).

REZULTATI

4. REZULTATI

Pirotska „peglana“ kobasica predstavlja termički netretiran, ali mikrobiološki stabilan visoko kvalitetan proizvod od mesa, bez dodatih konzervanasa proizveden u određenom geografskom području sa visokim ekološkim kvalitetom. Imajući u vidu odsustvo tehnološke prerade, poseban način pripreme i karakterističan sastav mesa ovih kobasica rezultati su podeljeni u tri celine. Prva celina obuhvatila je fenotipsku i molekularnu identifikaciju BMK izolata pirotske „peglane“ kobasice. Druga celina obuhvatala je ispitivanje fizičko-hemijskih i tehnoloških karakteristika pirotske „peglane“ kobasice, kao i analizu sukcesije bakterijskih zajednica tokom zrenja, kultivabilnim i nekultivabilnim pristupom. Treća celina odnosila se na ispitivanje fizičko-hemijskih i tehnoloških karakteristika gotovih proizvoda pirotske „peglane“ kobasice različitih proizvođača u odnosu na karakterizaciju bakterijskih zajednica kultivabilnim i nekultivabilnim pristupom.

4.1. Fenotipska i molekularna identifikacija bakterijskih izolata pirotske „peglane“ kobasice

4.1.1. Biohemijska identifikacija izolata

Preliminarna fenotipska karakterizacija 120 izolata ukazala je na postojanje dva različita morfološka tipa kolonije. Analizom su obuhvaćeni izolati uzorkovani u dvogodišnjem periodu (2013. i 2014.) prvog (27 izolata), trećeg (32 izolata) i četvrtog proizvođača (29 izolata), dok su u slučaju drugog (10 izolata) petog (12 izolata) i šestog proizvođača (10 izolata), uzorci uzimani samo 2014. godine. Izolati dobijeni 2013. godine označeni su prefiksom pK, dok izolati iz 2014. godine nemaju prefiks i prvi broj predstavlja serijski broj proizvođača. Prvi morfološki tip je bila bela, glatka i neprozirna kolonija, dok su drugi tip činile sluzave i prozirne kolonije. Bojenje po Gramu je pokazalo da svi izolati pripadaju Gram pozitivnim bacilima ili kokoidnim bacilima, što ukazuje da su verovatno pripadali vrstama rodova *Lactobacillus* i *Leuconostoc*. Biohemijskim testovima, je utvrđeno da svi izolati imaju sposobnost rasta na 15°C, dok nijedan izolat nije pokazao sposobnost rasta na 45°C. Takođe, ni jedan izolat nije pokazao sposobnost produkcije gasa, ni hidrolize arginina ni eskulina. Svi testirani izolati pokazali su sposobnost rasta na MRS agaru uz dodatak 4% i 6,5% NaCl.

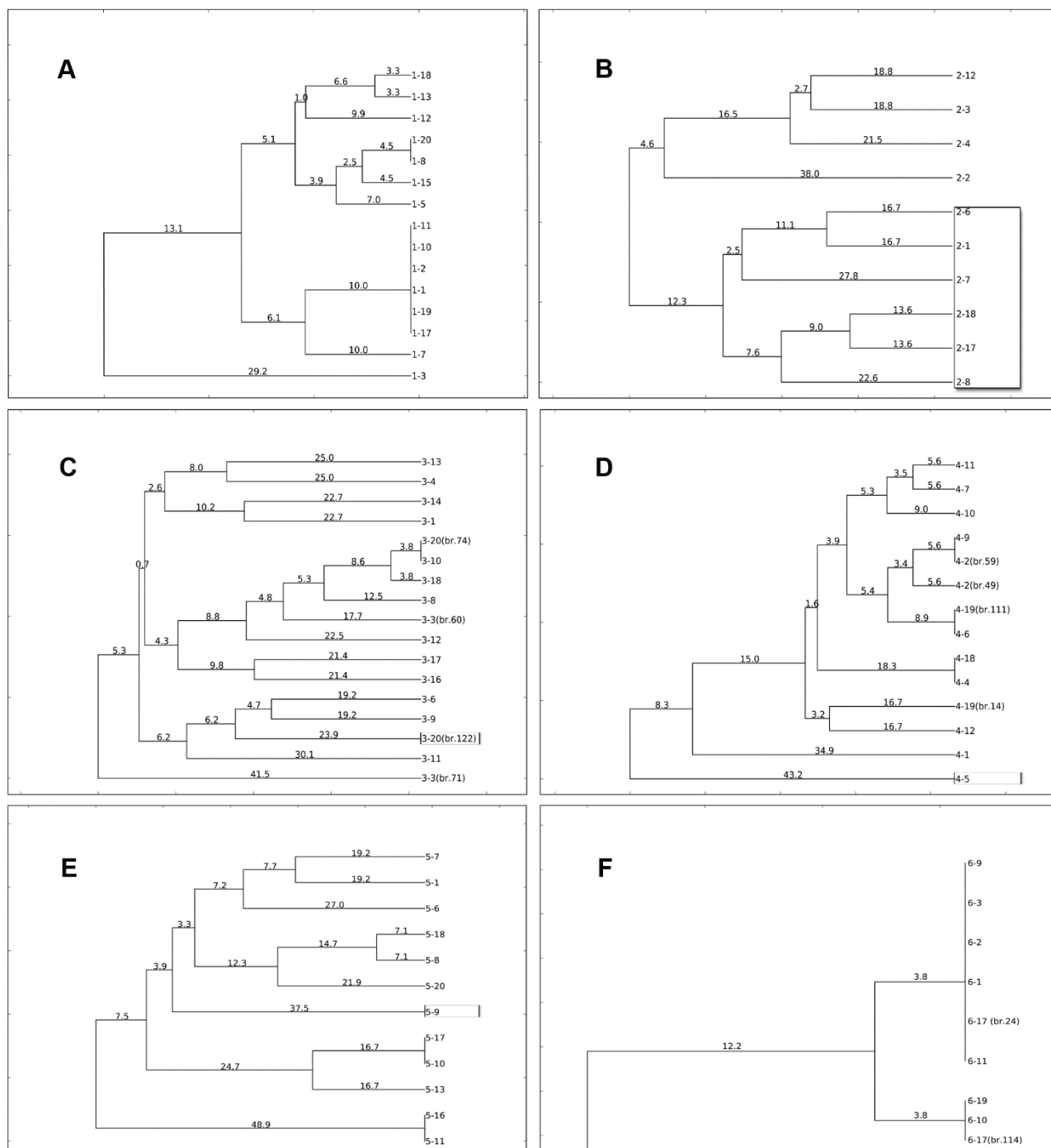
4.1.2. Molekularna identifikacija

Radi određivanja najbolje diskriminatorne DNK „fingerprinting“ metode, kao i za procenu biodiverziteta bakterijskih izolata, korišćene su dve DNK „fingerprinting“ tehnike, rep-PCR i RAPD PCR. Za testiranje selektovanih 77 izolata na osnovu biohemijskih karakteristika, uzorkovanih od šest proizvođača 2014. godine, korišćeni su REP, BOX, GTG5 (rep-PCR) i M13 (RAPD) prajmeri. U Tabeli 3 su predstavljeni zbirni rezultati broja različitih „fingerprinting“ profila dobijenih dendogramskom analizom.

Tabela 3. Broj različitih „fingerprinting“ profila dobijenih upotrebom različitih prajmera svih proizvođača

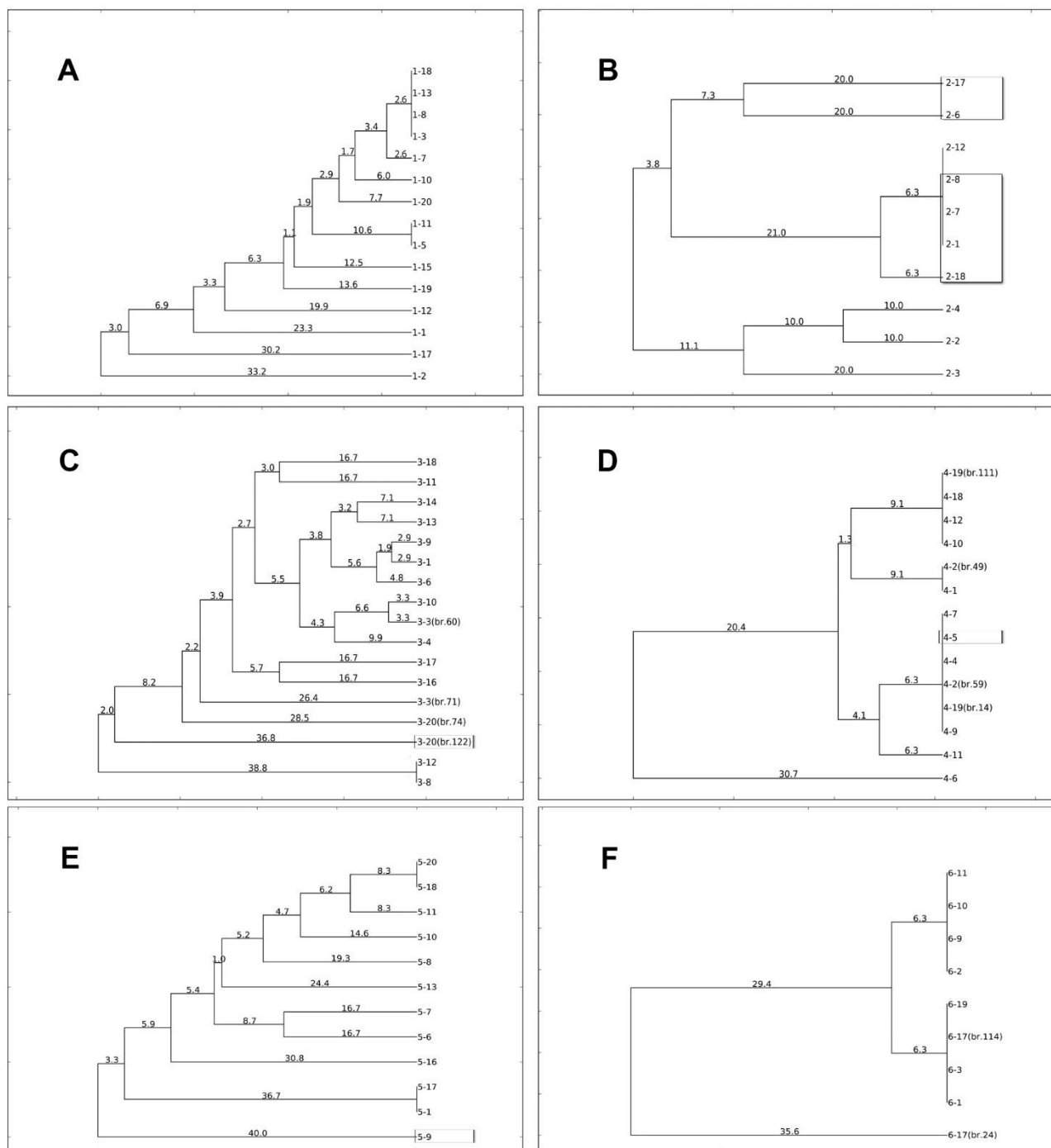
Proizvođač	Broj testiranih izolata	REP	BOX	GTG ₅	M13
1	15	7	10	6	6
2	10	5	4	7	3
3	17	6	11	11	10
4	14	6	3	8	7
5	12	5	8	7	7
6	9	4	2	2	4
Σ	77	33	38	41	37

GTG₅ PCR je proizveo najveći broj različitih paterna, 41 od 77 testiranih izolata, u odnosu na druge testirane prajmere (Slika 2).

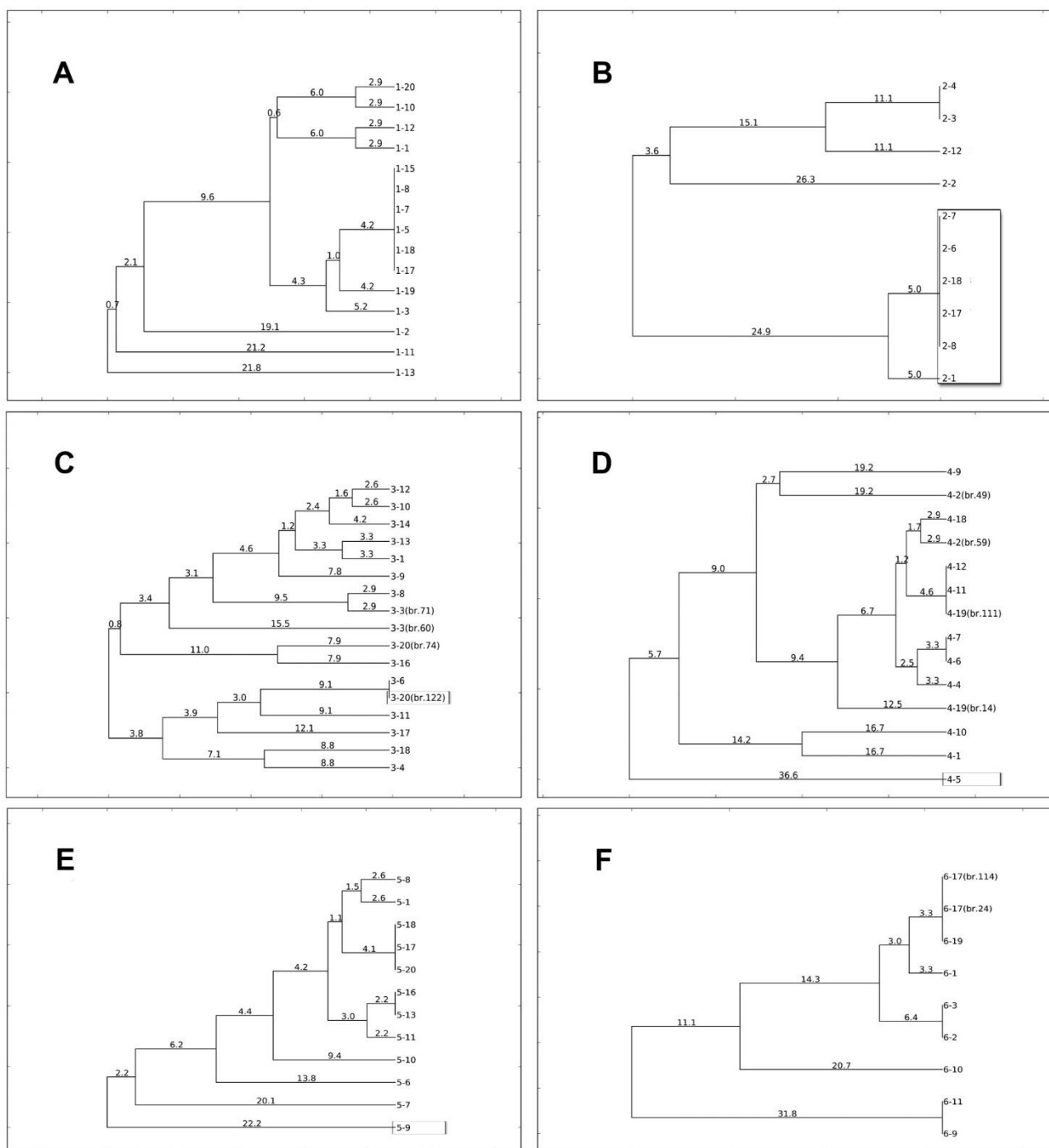


Slika 2. Dendrogram dobijen UPGMA analizom testiranih izolata prvog (A), drugog (B), trećeg (C), četvrtog (D), petog (E) i šestog (F) proizvođača primenom GTG₅ PCR. Brojevima na dendrogramima su iskazane genetičke distance. Izolati u pravougaonicima su identifikovani kao *Ln. mesenteroides*

Manju moć diskriminacije od GTG₅ PCR pokazali su BOX i M13 prajmeri, koji su proizveli 38 odnosno 37 paterna (Slika 3 i Slika 4).

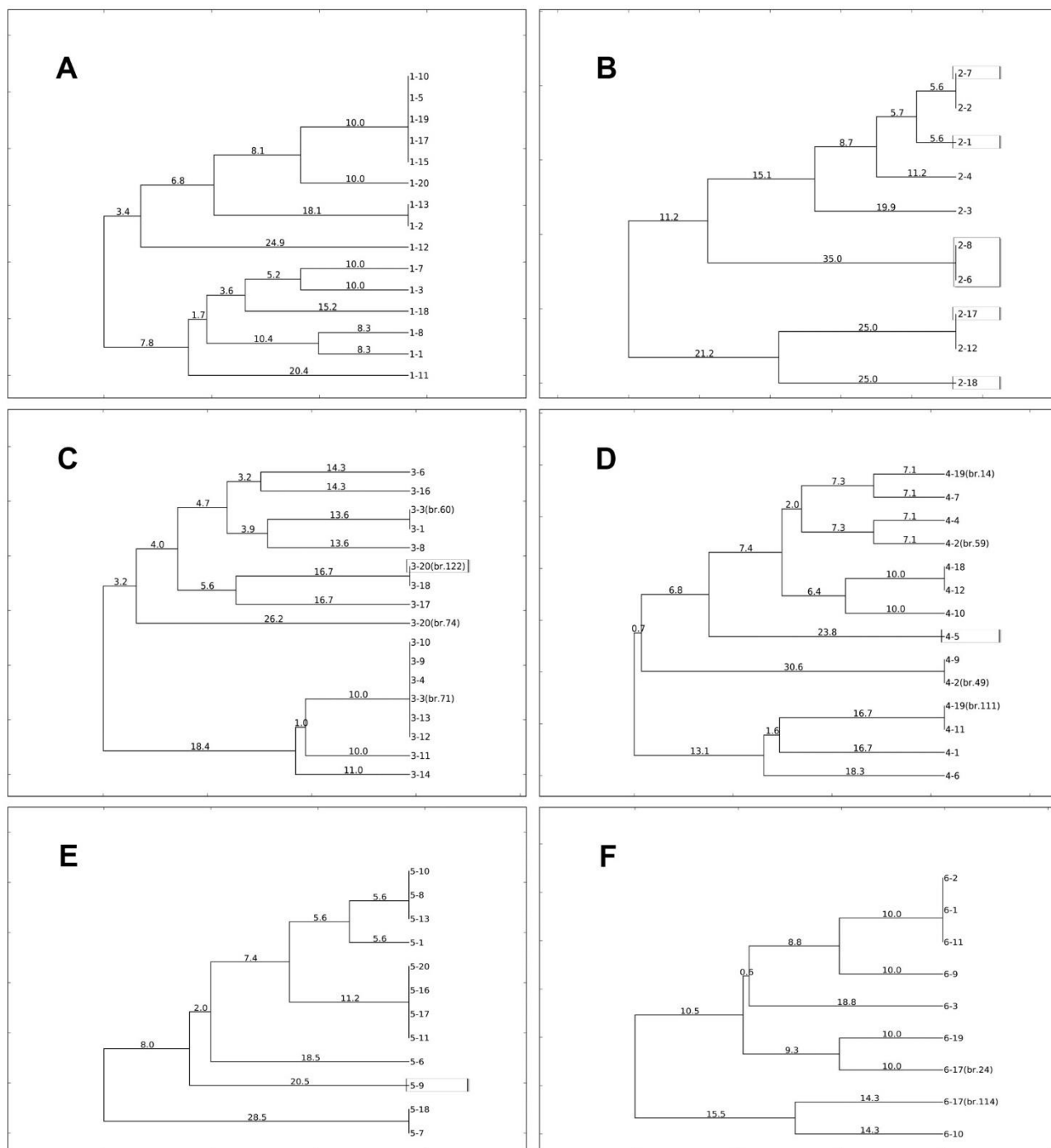


Slika 3. Dendrogram dobijen UPGMA analizom testiranih izolata prvog (A), drugog (B), trećeg (C), četvrtog (D), petog (E) i šestog (F) proizvođača primenom BOX PCR. Brojevima na dendrogramima su iskazane genetičke distance. Izolati u pravougaonicima su identifikovani kao *Ln. mesenteroides*



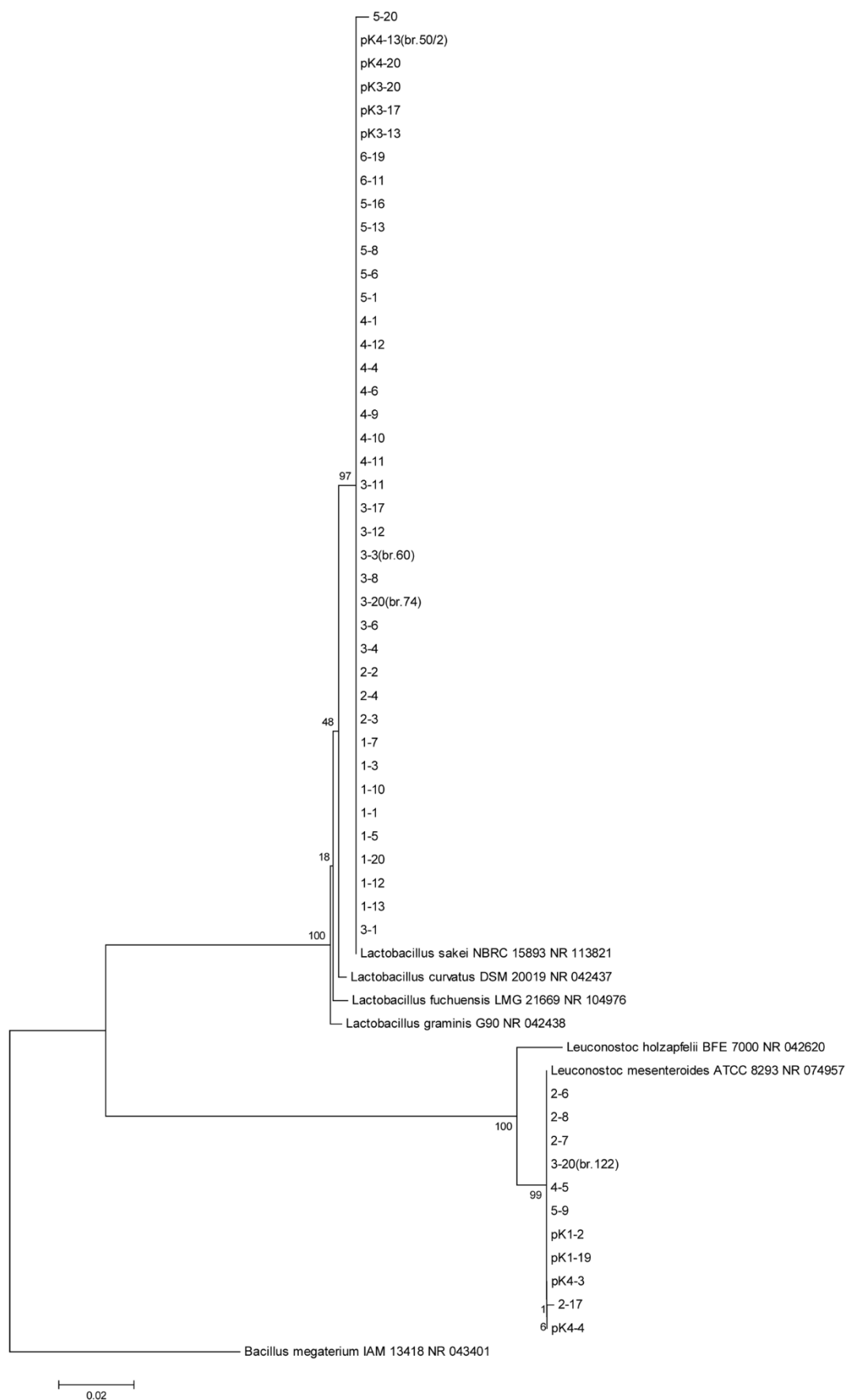
Slika 4. Dendrogram dobijen UPGMA analizom testiranih izolata prvog (A), drugog (B), trećeg (C), četvrtog (D), petog (E) i šestog (F) proizvođača primenom M13 RAPD PCR. Brojevima na dendrogramima su iskazane genetičke distance. Izolati u pravougaonicima su identifikovani kao *Ln. mesenteroides*

Koristeći REP-PCR, detektovana je najmanja heterogenost izolata sa 33 različita paterna (Slika 5).



Slika 5. Dendrogram dobijen UPGMA analizom testiranih izolata prvog (A), drugog (B), trećeg (C), četvrtog (D), petog (E) i šestog (F) proizvođača primenom REP PCR. Brojevima na dendrogramima su iskazane genetičke distance. Izolati u pravougaonicima su identifikovani kao *Ln. mesenteroides*

Nakon izbora GTG₅ PCR kao najboljeg metoda za profilisanje, skrinovana je kompletna kolekcija (svih 120 izolata) korišćenjem ovog prajmera. Odabran je 51 izolat sa različitim paternima za sekvenciranje 16S rRNK gena. Izolati su bili jasno grupisani u dva klastera na filogenetskom stablu (Slika 6).

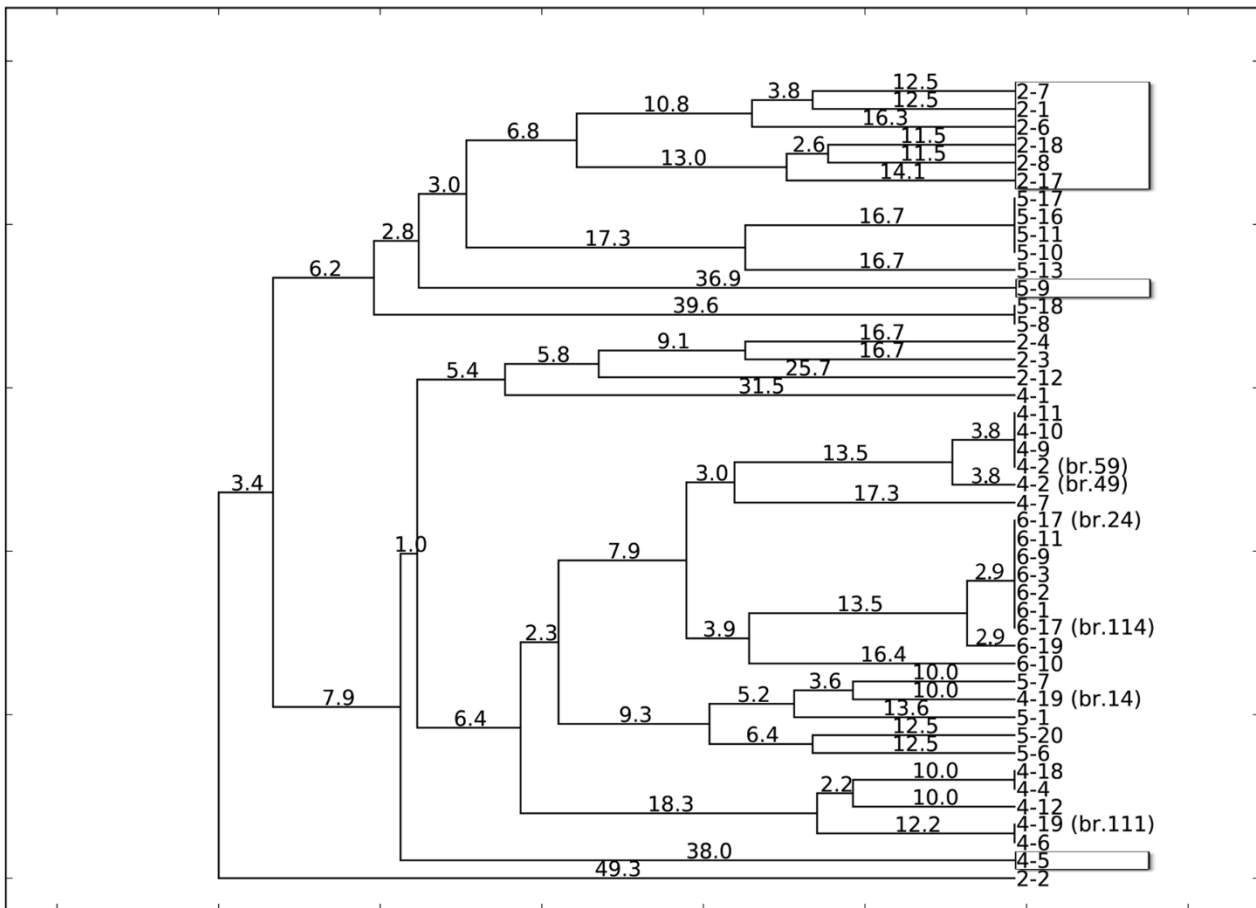


Slika 6. Neighbor-joining filogenetsko stablo na osnovu sekvenciranja 16S rDNK gena odabranih izolata svih šest proizvođača piroške „peglane“ kobasice

Većina izolata (76%) je bila grupisana zajedno sa referentnim sojem *L. sakei* NBRC 15893, dok su ostali izolati (24%) bili grupisani sa referentnim sojem *Ln. mesenteroides* ATCC 8293. U ovoj studiji, svi dobijeni izolati koji su pripadali prvom i šestom proizvođaču identifikovani su kao *L. sakei*, iako su bili raspoređeni u čak šest različitih klastera na osnovu GTG₅ sličnosti paterna (poput izolata iz kobasica prvog proizvođača). Međutim, BMK sadržaj kobasica napravljenih od strane proizvođača 2 pokazao je veće prisustvo *Ln. mesenteroides* (izolati 2-1; 2-6; 2-7; 2-8; 2-17 i 2-18). Iz pirotske „peglane“ kobasice proizvođača 3, 4 i 5, dominantnom vrstom se pokazao *L. sakei*. *Ln. mesenteroides* predstavljen je samo kao jedna monofiletska grana sa izolatima 3-20, 4-5 i 5-9, respektivno. Svi su pokazali visoke nivoe sličnosti sa drugim sojevima *L. sakei*.

4.1.2.1. Uporedni pregled izolata iz kobasica različitih proizvođača

Kako bismo otkrili potencijalne razlike u dominantnoj mikroflori među kobasicama drugog, četvrtog, petog i šestog proizvođača koje su imale isti sastav, ali različitu procentualnu zastupljenost upotrebljenih vrsta mesa i različit period sušenja, uporedili smo GTG₅ PCR paterne (Slika 7).



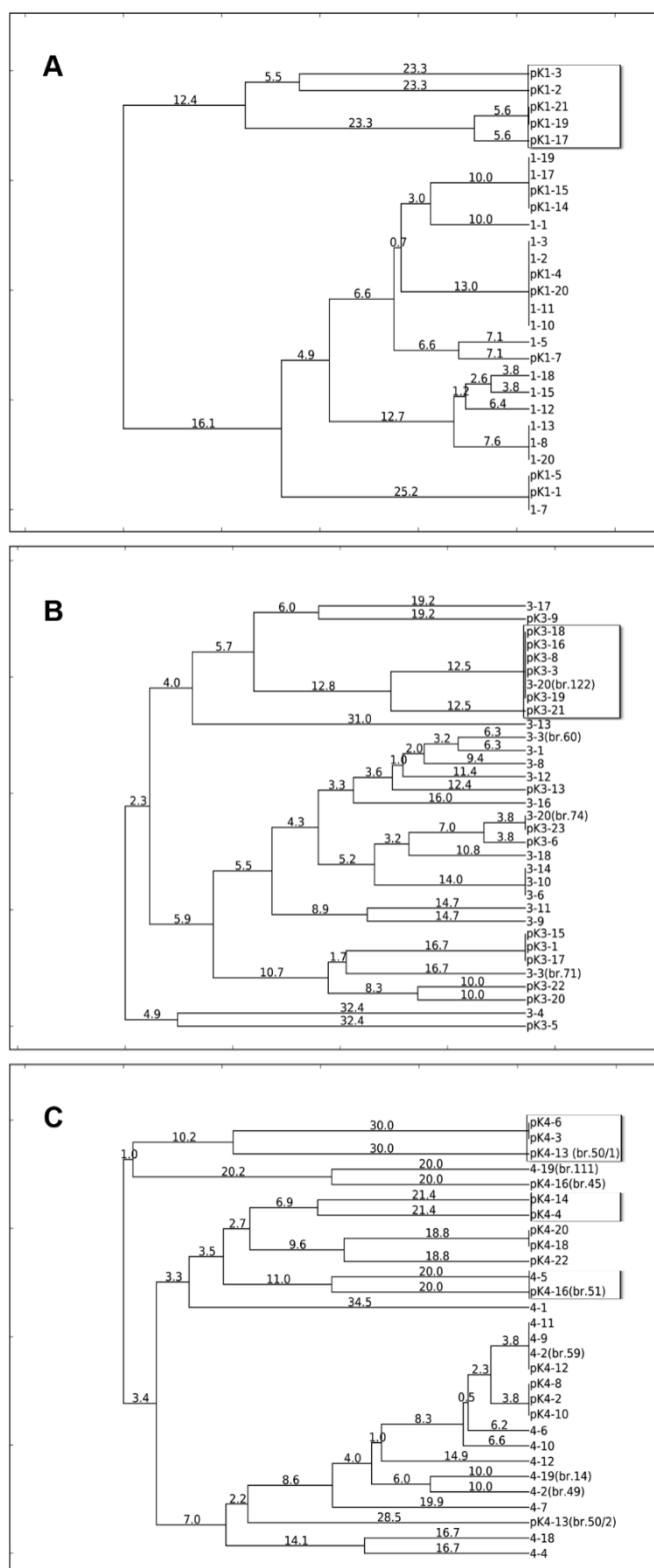
Slika 7. Dendrogram dobijen UPGMA analizom testiranih izolata drugog, četvrtog, petog i šestog proizvođača primenom GTG₅ prajmera. Brojevima na dendrogramima su iskazane genetičke distance. Izolati u pravougaonicima su identifikovani kao *Ln. mesenteroides*.

Dominantna vrsta mesa u kobasicama proizvedenim od strane proizvođača 4, 5 i 6 bila je junetina, dok je kod proizvođača 2 dominiralo magareće meso. U kobasicama proizvođača 2 i 5 nalazio se skoro isti procenat kozijeg i ovčijeg mesa. Iz uzorka kobasice drugog proizvođača izdvojila su se dva klastera i jedna zasebna monofiletička grana sa izolatom 2-2. Izolati drugog i petog

proizvođača grupisani su u okviru prvog klastera, dok su izolati četvrtog i šestog proizvođača povezani u drugi klaster. Izolat iz kobasica petog proizvođača (5-7), u okviru drugog klastera, identičan je izolatu 4-19 iz kobasica četvrtog proizvođača. Izolati *Ln. mesenteroides* grupisani su zajedno i jasno su odvojeni od izolata *L. sakei*. Kod kobasica četvrtog i petog proizvođača, dva izolata *Ln. mesenteroides* (4-5 i 5-9) su činila pojedinačne udaljene grane.

Radi utvrđivanja razlika u distribuciji bakterijskih zajednica kod uzoraka različitog sastava mesa tokom dve godine uzorkovanja, formirani su dendogrami (Slika 8).

U kobasicama prvog proizvođača, kod velikog broja izolata uočava se jasna razlika u grupisanju izolata prema godini uzorkovanja. Takođe, uočeno je da su izolati 1-1, 1-17 i 1-19 iz 2014. godine identični izolatima pK1-14 i pK1-15 iz 2013. godine, a prema analizi pripadaju vrsti *L. sakei*. Genetički su slični izolatima iz 2013. (pK1-4 i pK1-20) i 2014. godine (1-2, 1-3, 1-10 i 1-11) koji su okarakterisani kao isti i smešteni u isti klaster. Međutim, pet izolata (pK1-2, pK1-3, pK1-17, pK1-19, pK1-21) identifikovani kao *L. mesenteroides*, otkriveni su samo u uzorcima iz 2013. godine. Kod trećeg proizvođača (Slika 8B) ne uočava se značajnije grupisanje izolata. Na dendogramu su se izdvojila tri klastera. U okviru prvog klastera, većina izolata je grupisana zajedno. Određeni broj izolata iz 2013. godine (pK3-3, pK3-8, pK3-16, pK3-18, pK3-19 i pK3-21) bio je grupisan sa izolatima iz 2014. godine (3-20 (br. 122)) i identifikovani su kao *Ln. mesenteroides*, dok su ostali identifikovani kao *L. sakei*. Nije uočeno preklapanje između izolata iz drugog klastera, ali je uočena genetička sličnost izolata: 3-20 (br. 74) sa pK3-6 i pK3-23 i 3-3 (br. 71) sa izolatima pK3-1, pK3-15 i pK3-17. Do razdvajanja izolata na tri klastera uočeno je i kod četvrtog proizvođača (Slika 8C). U prvom klasteru dominira *Ln. mesenteroides* tokom obe godine. U drugom klasteru dominirali su izolati uzorkovani u 2013. godini (*Ln. mesenteroides* i *L. sakei*). U trećem klasteru, izdvaja se grupa izolata iz 2014. godine, sa *L. sakei* kao ekskluzivnom vrstom.

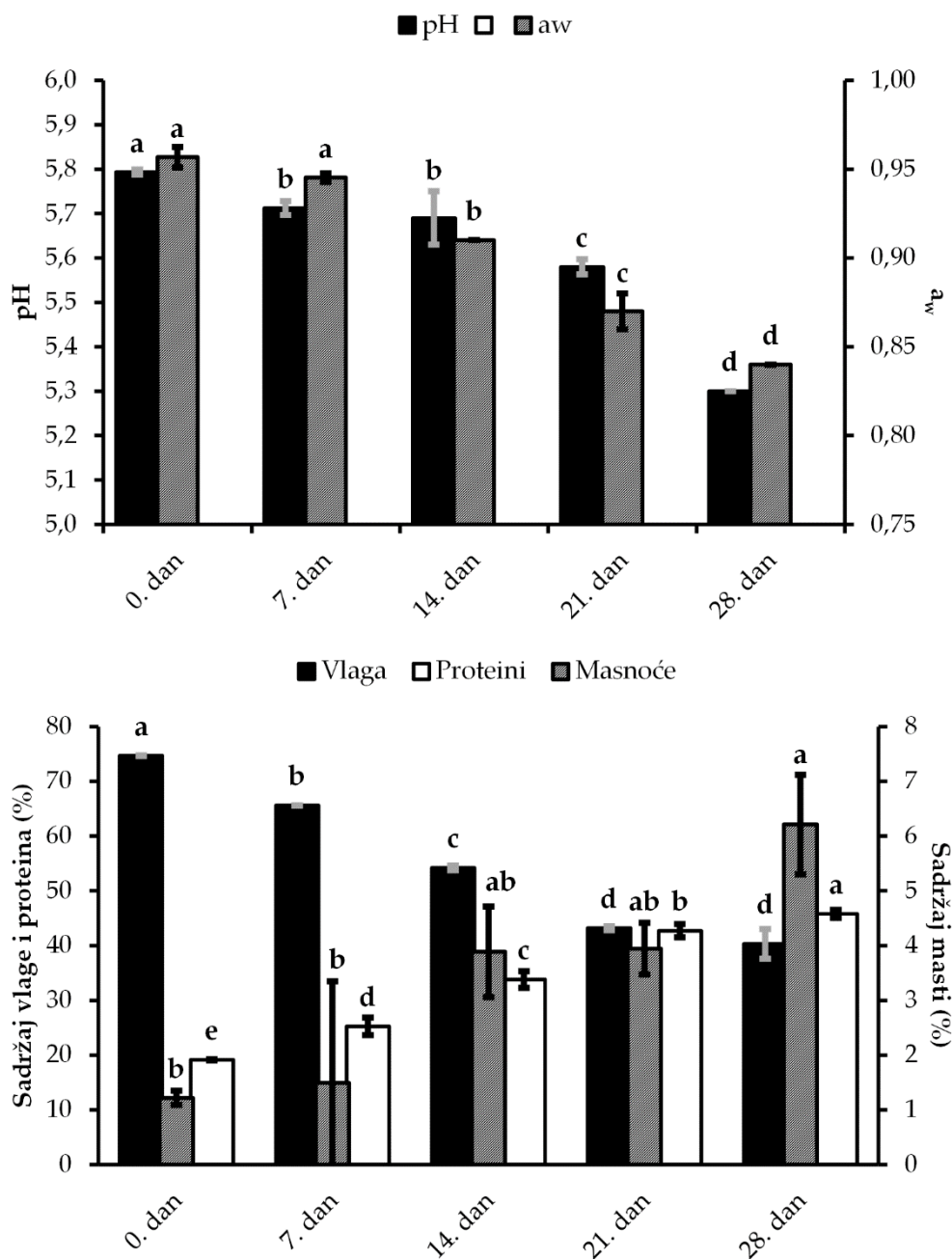


Slika 8. Dendrogram dobijen UPGMA analizom testiranih izolata prvog (A), trećeg (B) i četvrtog (C) proizvođača primenom GTG_5 prajmera. Brojevima na dendrogramima su iskazane genetičke distance. Izolati u pravougaonicima su identifikovani kao *L. mesenteroides*. Izolati uzorkovani 2013. godine označeni su prefiksom pK, dok su izolati iz 2014. godine bez prefiksa, gde prvi broj predstavlja redni broj proizvođača.

4.2. Fizičko-hemijske analize, tehnološke karakteristike i analiza bakterijskih zajednica tokom zrenja piroške „peglane“ kobasice

4.2.1. Fizičko-hemijske analize

Tokom zrenja piroške peglane kobasice pH vrednosti su se značajno smanjivale i bile su u pozitivnoj korelaciji sa aktivnošću vode i prosečnim sadržajem vlage. Maksimalne pH vrednosti su izmerene 0. dana i iznosile su 5,79, dok su minimalne vrednosti pH izmerene poslednjeg, 28. dana fermentacije i iznosile su 5,30. Vrednost a_w kretala se od 0,956 do 0,839 (Slika 9).



Slika 9. Rezultati merenja vrednosti fizičko-hemijskih analiza tokom zrenja piroške „peglane“ kobasice

Pregled vrednosti ispitivanih fizičko-hemijskih analiza dat je u Prilogu 2. Analizom rezultata ispitivanja sadržaja osnovnih parametara kobasica tokom njihovog zrenja uočava se da je gubitak vode praćen povećanjem sadržaja masti i proteina. Početni sadržaj vlage je veći od očekivanog i iznosio je 74,72%, zbog upotrebe mesa u proizvodnji kobasica koje je „očišćeno“ od pratećeg masnog tkiva. Sadržaj vlage je imao pozitivnu korelaciju sa a_w vrednostima. Prema srednjoj razlici između vremenskih tačaka zrenja, izražena je statistička značajnost uočena između svih uzoraka, osim između uzoraka 7. i 14. dana za pH, odnosno 0 i 7. dana za a_w vrednosti, kao i 21. dana. i 28. dana za sadržaj vlage. Prosečan početni sadržaj masti je nešto niži od proseka čije su početne vrednosti bile 1,22%, dok su maksimalne vrednosti izmerene 28. dana iznosile 6,21%. Najniže vrednosti pH, a_w – vrednosti i prosečan sadržaj vlage bile su karakteristične za 28. dan zrenja sa 5,30, 0,84 i 40%, respektivno. Prosečan početni sadržaj masti u kobasicama bio je niži i umeren u odnosu na ukupan sadržaj proteina. Smanjenje vlage tokom zrenja značajno je doprinelo povećanju sadržaja masti (šestostruko više) i proteina (2,5 puta više) sa maksimalnim vrednostima merenim 28. dana. Samo sadržaj masti bio je statistički značajan između 0. i 28. dana i između 7. i 28. dana, dok je sadržaj proteina bio značajan tokom perioda zrenja.

4.2.2. Instrumentalno određivanje boje i teksture

Tokom instrumentalnog ispitivanja boje praćeni su parametri boje spoljašnje površine kobasice sa omotačem i poprečnog preseka kobasice tokom celog perioda zrenja, dok su parametri boje spoljašnje površine sa skinutim omotačem praćeni od 14. dana iz razloga što na sirovim kobasicama nije bilo moguće skinuti omotač.



Slika 10. Kolorimetrijske karakteristike merene boje površine kobasice sa i bez omotača (a, c) i površine poprečnog preseka (b).

Početa L* vrednost boje površine kobasice sa omotačem je značajno smanjena do kraja merenja, dok je vrednost a* takođe dvostruko smanjena (Tabela 4). Dalje, zabeleženo je značajno smanjenje vrednosti L* i a* tokom zrenja za uzorke poprečnog preseka i kobasice bez omotača. Razlika u boji bila je još uočljivija za vrednosti b* sa negativnim rezultatom na kraju procesa zrenja za boju površine kobasice sa i bez omotača. Izmerene vrednosti su pokazale da je boja kobasice postala plava jer su vrednosti bile negativne (Slika 10). Vrednosti L* i a* su se značajno smanjile dva puta tokom perioda zrenja. Prema razlici srednjih vrednosti između vremenskih tačaka zrenja očigledno je da je postignuta jaka statistička značajnost za vrednosti a* i b* uočene među svim uzorcima za uzorke poprečnog preseka i kobasice sa omotačem (uglavnom na P<0,001), osim između 14. i 21. dan, odnosno 21. i 28. dana za a*. Vrednosti a* i b* između uzoraka 0-og i 7. dana za uzorke poprečnog preseka nisu se statistički razlikovale.

Rezultati instrumentalnog ispitivanja teksture dati su u tabeli 4. Tekstura kobasice je merena u tri preseka tokom zrenja, 14., 21. i 28. dana zrenja. U prva dva preseka, 0. i 7. dana, nije bilo moguće meriti teksturu jer je dolazilo do raspadanja proizvoda tokom merenja. U svakom od tri preseka tokom zrenja, analizirane su po tri kobasice korišćenjem maksimalnog mogućeg broja tehničkih replikata.

Tabela 4. Kolorimetrijska i teksturalna karakterizacija tokom zrenja piroške „peglane“ kobasice.

Zrenje	Parametri boje			Zrenje	Parametri teksture	
	L*	a*	b*		Čvrstoća (N)	Žilavost (N s)
Boja površine kobasice sa omotačem						
0. dan	33,3 ± 1,71 ^a	14,9 ± 0,32 ^a	4,4 ± 0,20 ^a	0. dan	-	-
7. dan	29,6 ± 1,57 ^{ab}	12,2 ± 0,50 ^b	2,8 ± 0,41 ^{ab}	7. dan	-	-
14. dan	21,4 ± 0,94 ^c	9,8 ± 0,82 ^c	1,8 ± 0,26 ^{bc}	14. dan	20,3 ± 4,12 ^c	86,4 ± 14,27 ^c
21. dan	22,8 ± 1,81 ^{bc}	8,4 ± 0,50 ^{cd}	-0,7 ± 1,02 ^{cd}	21. dan	31,8 ± 1,98 ^b	165,7 ± 5,31 ^b
28. dan	25,0 ± 4,95 ^{bc}	7,0 ± 0,80 ^d	-0,04 ± 1,55 ^d	28. dan	42,9 ± 4,98 ^a	231,0 ± 20,17 ^a
Boja površine kobasice bez omotača						
0. dan	-	-	-			
7. dan	-	-	-			
14. dan	24,3 ± 0,83 ^a	10,2 ± 0,50 ^a	1,7 ± 0,97 ^a			
21. dan	23,2 ± 1,04 ^{ab}	8,8 ± 0,57 ^{ab}	-0,4 ± 0,07 ^b			
28. dan	21,4 ± 0,94 ^b	7,7 ± 1,46 ^b	-0,71 ± 0,36 ^b			
Boja površine poprečnog preseka Kobasica						
	L*	a*	b*			
0. dan	25,1 ± 1,8 ^{ab}	25,4 ± 0,47 ^a	15,9 ± 0,44 ^a			
7. dan	25,3 ± 0,60 ^a	25,7 ± 0,92 ^a	15,5 ± 1,29 ^a			
14. dan	24,2 ± 0,46 ^{ab}	19,3 ± 0,53 ^b	6,0 ± 0,98 ^b			
21. dan	23,9 ± 1,34 ^{ab}	16,3 ± 0,67 ^c	1,8 ± 0,37 ^c			
28. dan	22,1 ± 1,15 ^b	12,9 ± 1,77 ^d	0,5 ± 1,13 ^c			

Vrednosti unutar iste kolone tokom zrenja praćene različitim slovima su značajno različite (P<0,05), prema Tukey-evom HSD testu.

Čvrstoća i žilavost, kao parametri teksture su se povećavali tokom zrenja. Tako je najniža vrednost čvrstoće (N), zabeležena 14-og dana iznosila 20,3, a najviša vrednost, zabeležena 28-og dana iznosila je 42,9. Takođe, najniža vrednost žilavosti (N s) izmerena je 14-og dana i iznosila je 86,4, dok je najviša vrednost iznosila 231,0 i zabeležena je 28-og dana.

4.2.3. Molekularna identifikacija kultivabilne bakteriote

Prateći rast na različitim podlogama i morfologiju akseničnih bakterijskih kultura, dobijeno je 157 izolata (Prilog 3). Međutim, samo su 32 različite i jedinstvene vrste određene analizom sekvenci 16S rRNK (Tabela 5).

Tabela 5. Diverzitet vrsta u analiziranim uzorcima creva i kobasica u različitim vremenskim tačkama zrenja kultivabilnim pristupom

Poreklo izolata	Broj ukupnih izolata	Ukupan broj vrsta za uzorke
Z1 (crevo)	8	5
Z2 (0 dan)	28	8
Z3 (2. dan)	26	9
Z4 (7. dan)	28	10
Z5 (10. dan)	24	8
Z6 (14. dan)	20	7
Z7 (21. dan)	23	6
Σ	157	32
Z1 Z2 Z3 Z4 Z5 Z6 Z7	1	<i>Latilactobacillus sakei</i> (basonim <i>Lactobacillus sakei</i>)
Z2 Z3 Z4 Z5 Z6 Z7	1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Z1 Z2 Z5 Z6	1	<i>Enterococcus faecium</i>
Z1 Z2 Z7	1	<i>Bacillus toyonensis/wiedmannii/sanguinis</i>
Z3 Z5 Z6	1	<i>Carnobacterium divergens</i>
Z2 Z7	1	<i>Bacillus tropicus/paramycooides/luti</i>
Z3 Z4	1	<i>Macrococcus canis</i>
Z6 Z7	1	<i>Lactococcus garvieae</i>
Z1	2	<i>Enterococcus hirae</i> ; <i>Enterococcus durans</i>
Z2	3	<i>Corynebacterium lipophiloflavum</i> ; <i>Marichromatium purpuratum</i> ; <i>Macrococcus caseolyticus</i>
Z3	5	<i>Pectobacterium wasabiae</i> ; <i>Hafnia alvei</i> ; <i>Serratia proteamaculans</i> ; <i>Bacillus licheniformis</i> ; <i>Hafnia paralvei</i>
Z4	7	<i>Kocuria kristinae</i> ; <i>Pantoea agglomerans</i> / <i>Enterobacter ludwigii</i> / <i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i> ; <i>Enterococcus pallens</i> ; <i>Weissella cibaria</i> ; <i>Citrobacter murlinae</i> ; <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordniae</i> (basonim <i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carnosus</i>); <i>Enterobacter aerogenes</i>
Z5	4	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> ; <i>Moraxella osloensis</i> ; <i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carnosus</i> ; <i>Enterococcus casseliflavus</i>
Z6	2	<i>Shigella sonnei</i> ; <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
Z7	1	<i>Leuconostoc rapi</i>

Najmanji broj izolata dobijen je iz uzorka tankog goveđeg creva i većina izolata pripada vrstama roda *Enterococcus* (*E. faecium*, *E. hirae* i *E. durans*). *L. sakei* je bila jedina zajednička vrsta za sve uzorke, dok je *Ln. mesenteroides* dominirao brojem izolata tokom procesa zrenja, i nije

4.2.4. Ukupna bakteriobiota tokom zrenja

Ukupno 1.053.569 sirovih sekvenci je dobijeno sekvenciranjem gena za 16S (od 107.113 do 189.000 po uzorku). Nakon uklanjanja prajmera, uklanjanja šuma, kvalitetnog filtriranja, trimovanja i uklanjanja himera, broj sekvenci se kretao od 86.161 do 146.679 (Tabela 6).

Tabela 6. Ukupan broj očitanih sekvenci i njihovo filtriranje

Uzorak	Sirove sekvence	Uklanjanje prajmera	Kvalitativno filtriranje	Filtriranje F	Filtriranje R	Spojene	Uklonjene himere	Finalni broj sekvenci %
Z1	169672	168669	156105	154649	154959	148160	127677	75,25
Z2	127184	117614	109826	109178	109328	105343	96909	76,20
Z3	148238	142399	133327	132649	132808	127148	114558	77,28
Z4	107113	104776	99454	98977	99092	95421	86161	80,44
Z5	166600	162465	152607	151885	152033	145402	128808	77,32
Z6	189000	184973	174132	173236	173503	166585	146679	77,61
Z7	145762	141171	133262	132584	132710	126288	108690	74,57
Ukupno/sr. vrednost	1053569	1022067	958713	953158	954433	914347	809482	76,95

Prosečna dužina dobijenih OTU sekvenci je bila 415, a ukupno je dobijeno 1035 OTU sekvenci. Na osnovu alfa rarefakcione krive, pošto su postojale evidentne razlike u očitavanju između uzoraka; indeksi diverziteta su procenjeni nakon rarefikovanja do ravnomerne dubine prema uzorku sa najmanjim brojem sekvenci (uzorak Z4).

Diverzitet i bogatstvo bakterijskih zajednica ispitivani su u različitim vremenskim tačkama uzorkovanog materijala tokom procesa zrenja na četiri taksonomska nivoa (razdeo, familija, rod i OTU) kao što je prikazano u Tabeli 7. Indeksi koji označavaju bogatstvo bakterijskih vrsta (OBS, Chao1 i ACE) pokazali su da je u poređenju sa svim proučavanim taksonomskim hijerarhijama, osim na nivou razdela, najveće bogatstvo vrsta zabeleženo za tanko goveđe crevo.

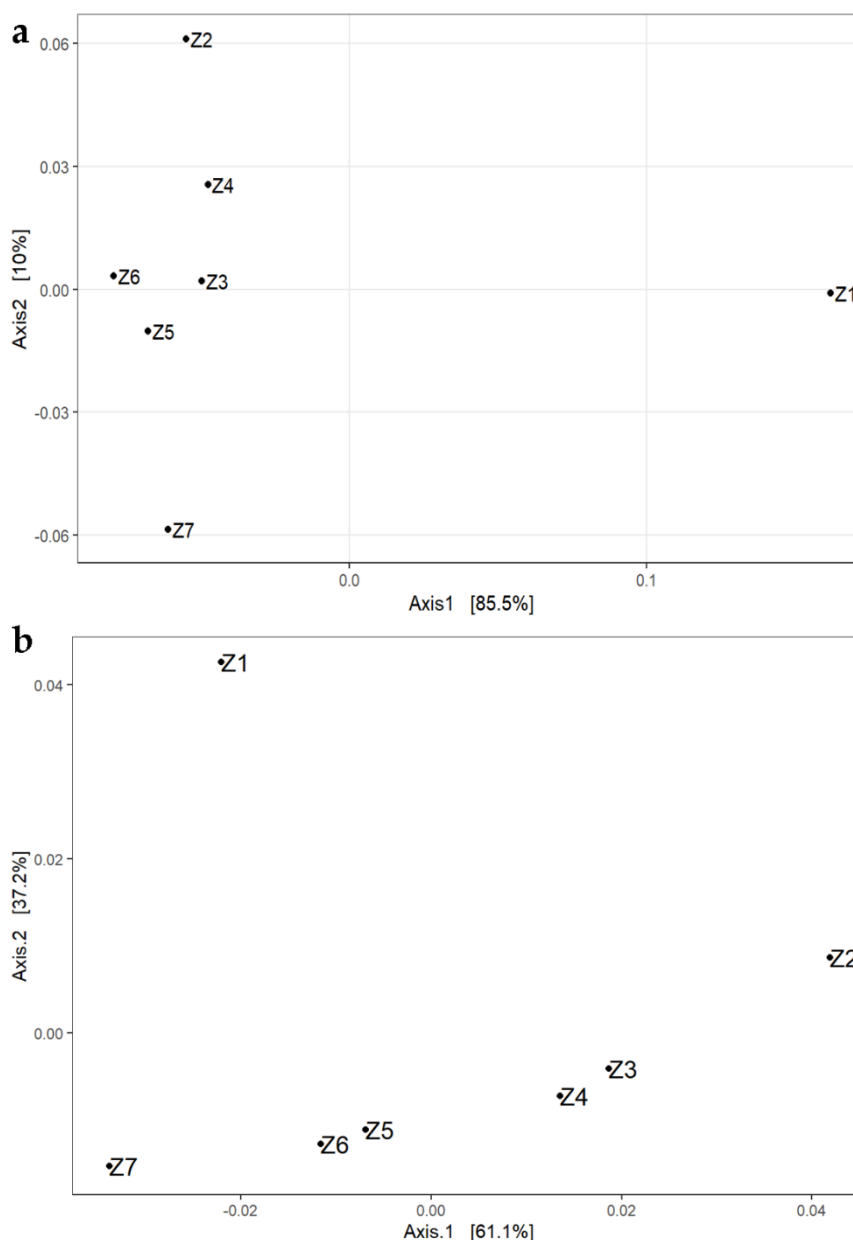
Što se tiče indeksa koji ukazuju na bakterijski diverzitet, OTU indeksi (Shannon, Simpson i Fisher) ukazuju na visok nivo bakterijskog diverziteta u uzorku creva, dok za uzorke prikupljene tokom zrenja kobasica niži. Na nivou razdela nije bilo razlike, a zabeležen je očekivano najniži nivo diverziteta. Međutim, razlike između uzoraka tokom zrenja nisu uočene na svim praćenim taksonomskim nivoima.

Na osnovu rezultata može se zaključiti da su uzorci iz procesa zrenja združeni zajedno, i potpuno udaljeni od uzorka creva prema glavnoj osi (85,5%). Uzorci sa početka i kraja procesa zrenja Z2 i Z7 pokazali su najveću udaljenost od ostalih uzoraka dobijenih tokom zrenja. Međutim, prikladnija stabilizacija varijanse je izvršena kasnije, a rezultati su dobijeni multidimenzionim skaliranjem vrednosti (MDS ili PCoA) na osnovu korišćenja ponderisanih UniFrac distanci (Slika 13). Slična raspodela je prikazana među uzorcima. Štaviše, uzorci Z3 i Z4, kao i Z5 i Z6 bili su usko povezani sa ostalim uzorcima tokom procesa zrenja. Vrednosti na osama su skalirane na osnovu njihovih vrednosti. Najveći diverzitet zabeležen je za uzorak creva (uzorak Z1) koji objašnjava 61,1% i 37,2% varijabilnosti, respektivno prema vrednostima osa.

Tabela 7. Alfa diverzitet u analiziranim uzorcima creva i kobasica tokom različitih vremenskih tačaka zrenja, predstavljen na nivou razdela, familije, roda i OTU.

Uzorak	Crevo/zrenje*	OBS	Chao1	SE Chao1	ACE	SE ACE	Shannon	Simpson	Inv Simpson	Fisher	Taksonomski rank
Z1	crevo	279	279.5	0.99	280.0	7.75	3.8	1.0	24.0	33.9	OTU
		95	95.0	0.00	95.0	4.64	2.8	0.9	10.9	10.1	Rod
		42	42.0	0.00	42.0	2.76	2.0	0.8	5.6	4.1	Familija
		8	8.0	0.00	8.0	1.22	0.8	0.5	2.0	0.7	Razdeo
Z2	0	126	126.3	0.66	127.1	5.28	2.7	0.9	6.9	14.3	OTU
Z3	2	132	133.7	2.20	133.5	5.52	2.8	0.9	8.5	14.7	
Z4	7	118	121.0	3.18	120.8	5.37	2.7	0.9	8.4	13.5	
Z5	10	132	139.0	6.65	136.6	5.06	2.8	0.9	8.5	14.5	
Z6	14	121	121.8	1.26	122.7	5.36	2.5	0.9	6.9	13.0	
Z7	21	127	128.9	2.26	130.0	5.07	2.6	0.9	7.6	14.2	
Z2	0	38	38.0	0.00	38.0	3.01	1.4	0.6	2.4	3.7	
Z3	2	47	47.3	0.74	47.6	3.38	1.5	0.7	3.0	4.6	
Z4	7	40	40.0	0.16	40.3	3.15	1.5	0.7	3.3	4.0	
Z5	10	38	38.0	0.16	38.5	2.50	1.5	0.7	3.2	3.6	
Z6	14	40	40.1	0.44	41.1	3.15	1.4	0.7	3.2	3.8	
Z7	21	40	40.2	0.62	41.1	3.00	1.5	0.7	3.2	3.9	
Z2	0	26	26.0	0.00	26.0	2.43	1.3	0.6	2.4	2.5	Familija
Z3	2	31	31.0	0.16	31.3	2.62	1.4	0.6	2.8	2.9	
Z4	7	28	28.0	0.16	28.3	2.50	1.4	0.7	3.1	2.7	
Z5	10	23	23.0	0.00	23.0	1.98	1.4	0.7	3.1	2.1	
Z6	14	27	27.1	0.49	28.6	2.61	1.3	0.7	3.1	2.5	
Z7	21	25	25.3	0.73	26.5	2.51	1.4	0.7	3.1	2.3	
Z2	0	7	7.0	0.00	7.0	0.93	0.9	0.5	2.1	0.6	
Z3	2	7	7.0	0.00	7.0	1.20	0.9	0.6	2.3	0.6	
Z4	7	7	7.0	0.00	7.0	1.31	1.0	0.6	2.4	0.6	
Z5	10	7	7.0	0.00	7.0	0.93	0.8	0.5	2.2	0.6	
Z6	14	8	8.0	0.00	8.0	1.22	0.9	0.6	2.2	0.6	
Z7	21	6	6.0	0.00	6.0	0.91	0.7	0.5	1.9	0.5	

zrenje* u danima



Slika 13. PCoA (a) i MDS (b) analiza na nivou OTU. Crevo (uzorak Z1); dani zrenja: nulti (uzorak Z2); 2. dan (uzorak Z3); 7. dan (uzorak Z4); 10. dan (uzorak Z5); 14. dan (uzorak Z6); 21. dan (uzorak Z7)

4.2.5. Taksonomska anotacija ukupne bakteriote

Dominacija razdela *Proteobacteria* i *Firmicutes* zabeležena je za sve proučavane uzorke, uključujući i uzorak creva (37,9% i 59,1%, respektivno). Dva puta veća zastupljenost *Firmicutes* (sa 33,5% na 63,5%) uz istovremeno smanjenje *Proteobacteria* (sa 65,4% na 22,3%) bio je karakterističan trend tokom procesa zrenja, uključujući i nepoznate sekvence cijanobakterija, kasnije potvrđene kao hloroplast, nadalje uklonjene iz analize. Preostali razdeli, kao što su *Bacteroidetes*, *Epsilonbacteraeota* i *Actinobacteria*, takođe su pronađeni u uzorku creva. Razdeli sa znatno nižom relativnom zastupljenošću (RA) bili su WPS-2 i *Fusobacteria*. Bakterijski taksoni koje su dominirali tokom celog procesa zrenja i koji su se nalazili u većoj ili manjoj relativnoj zastupljenosti (RA) pripadale su rodovima *Lactobacillus*, *Photobacterium*, *Leuconostoc*, *Weissella* i *Lactococcus*. Nasuprot tome, *Carnobacterium*, *Brochothrix* i *Acinetobacter* pronađeni su u zanemarljivoj RA u poređenju sa prethodnim rodovima (Slika 14).

Poslednja taksonomska kategorija	Crevo	Dani zrenja					
		0	2	7	10	14	21
<i>Lactobacillus</i>	12,4	4,4	11,0	21,2	32,1	39,6	44,3
<i>Photobacterium</i>	0,1	61,8	53,6	48,6	44,1	37,6	31,5
<i>Leuconostoc</i>	0,1	5,4	10,1	8,2	9,3	8,4	11,8
<i>Weissella</i>	0,1	8,6	11,1	8,0	4,8	4,6	5,3
<i>Lactococcus</i>	2,6	2,0	2,2	1,2	2,1	0,7	1,9
<i>Carnobacterium</i>	0,0	0,6	0,4	0,2	0,5	0,2	0,7
<i>Brochothrix</i>	0,0	0,5	0,7	0,6	0,5	0,6	0,8
<i>Acinetobacter</i>	1,9	0,3	0,6	0,7	0,7	0,4	1,0
<i>Vagococcus</i>	3,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,1	0,4
<i>Pseudomonas</i>	0,2	0,3	0,2	0,2	0,4	0,1	0,4
<i>Pantoea</i>	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Enterococcus</i>	3,9	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1
<i>Psychrobacter</i>	0,0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,3
<i>Myroides</i>	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,1
<i>Macrococcus</i>	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,1
<i>Clostridium sensu stricto 1</i>	15,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Hafnia-Obesumbacterium</i>	11,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Aeromonas</i>	4,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Lelliottia</i>	2,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Enterobacteriaceae</i>	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Serratia</i>	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Rahnella</i>	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Enterobacter</i>	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
<i>Anaerococcus</i>	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Raoultella</i>	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Prevotella</i>	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Shewanella</i>	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Escherichia/Shigella</i>	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Finegoldia</i>	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Paraclostridium</i>	13,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Citrobacter</i>	10,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Clostridium sensu stricto 2</i>	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Kluyvera</i>	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Prevotella_9</i>	2,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Romboutsia</i>	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Clostridium sensu stricto 5</i>	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Streptococcus</i>	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Buttiauxella</i>	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Arcobacter</i>	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Epulopiscium</i>	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Comamonas</i>	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Dysgonomonas</i>	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Proteocatella</i>	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Clostridium sensu stricto 13</i>	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Clostridium sensu stricto 3</i>	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Slika 14. Relativna zastupljenost bakterijskih taksona na nivou roda prema SILVA 132 bazi podataka. Različite boje ukazuju na nisku ili visoku zastupljenost (plava, žuta i crvena boja - najniža, srednja i najviša relativna zastupljenost).

Promene u zajednici su praćene porastom *Lactobacillus* od početka zrenja, dok su *Photobacterium* i *Weissella* imali negativnu korelaciju i smanjenje brojnosti. *Leuconostoc* i drugi navedeni rodovi su zabeleženi više-manje u istom broju tokom procesa zrenja. Najzastupljeniji taksoni značajni za diverzitet crevnih zajednica (koje su se i u zanemarljivom manjem obimu mogle naći tokom procesa zrenja kobasica) bili su *Clostridium sensu stricto 1*, *Lactobacillus*, *Hafnia-Obesumbacterium*, *Aeromonas*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Lactococcus*, *Lelliottia*, *Acinetobacter* i nepoznati predstavnici familije *Enterobacteriaceae*. Pored toga, taksoni koji se nalaze isključivo u niši tankog creva u relativno većoj zastupljenosti bili su *Paraclostridium*, *Citrobacter*, *Clostridium sensu stricto 2*, *Kluyvera*, *Prevotella 9*, *Romboutsia*, *Clostridium sensu stricto 5*, *Streptococcus* i *Buttiauxella*. Svi ostali taksoni pronađeni su u RA manje od 0,5% i nemaju značajan doprinos sazrevanju ispitivanih uzoraka. Zanimljivo je da je prema Bray-Curtis-ovim razlikama na nivou OTU, grupisanje između uzoraka tokom zrenja pokazalo varijabilnost unutar uzoraka i blisku povezanost za uzorke Z6 i Z2 (Slika 15).

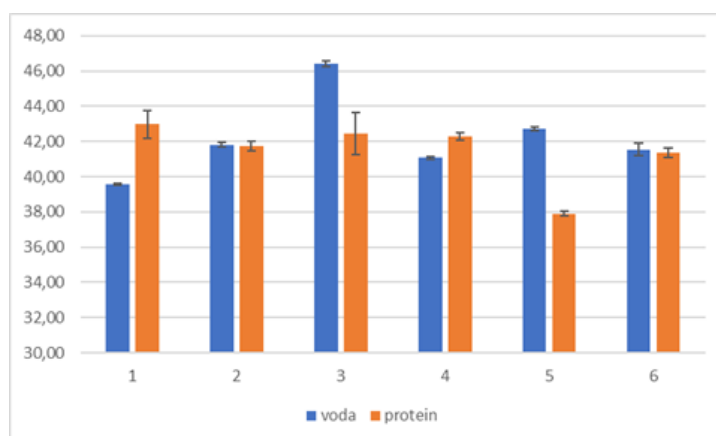
Nakon taksonomske anotacije zasnovane na homologiji OTU sa BLASTn u bazi podataka NCBI za 16S, dobijen je diverzitet taksona na nivou vrsta u toku procesa zrenja (Prilog 4).

Iako su dužine sekvenci u proseku bile veće od 400 bp, može se primetiti određena distribucija vrsta. Rod *Photobacterium* je bio zastupljen vrstama *P. carnosum*, *P. phosphoreum*, *P. iliopiscarium*, i *P. piscicola*, dok su najzastupljenije vrste roda *Lactobacillus* bile *L. sakei*, *L. algidus* i *L. graminis* (među 11 različitih vrsta koje su ukupno bile zastupljene iz ovog roda). Identifikovano je i šest vrsta roda *Leuconostoc* (*Ln. gelidum*, *Ln. mesenteroides*, *Ln. pseudomesenteroides*, *Ln. carnosum*, *Ln. holzapfelii*, i *Ln. lactis*) i tri vrste roda *Weissella* (*W. fabalis*, *W. korensis*, and *W. cibaria*). Rod *Lactococcus* je bio zastupljen sa četiri vrste (*Lc. raffinolactis*, *Lc. lactis*, *Lc. garvieae*, i *Lc. piscium*), dok je rod *Carnobacterium* zastupljen sa tri različite vrste (*C. divergens*, *C. gallinarum*, i *C. jeotgali*). Identifikovana je i *Brochothrix thermosphacta*, kao i 12 različitih vrsta koje pripadaju rodu *Acinetobacter*.

4.3. Fizičko-hemijske analize, tehnološke karakteristike i analiza bakterijskih zajednica gotovih proizvoda pirotske „peglane“ kobasice

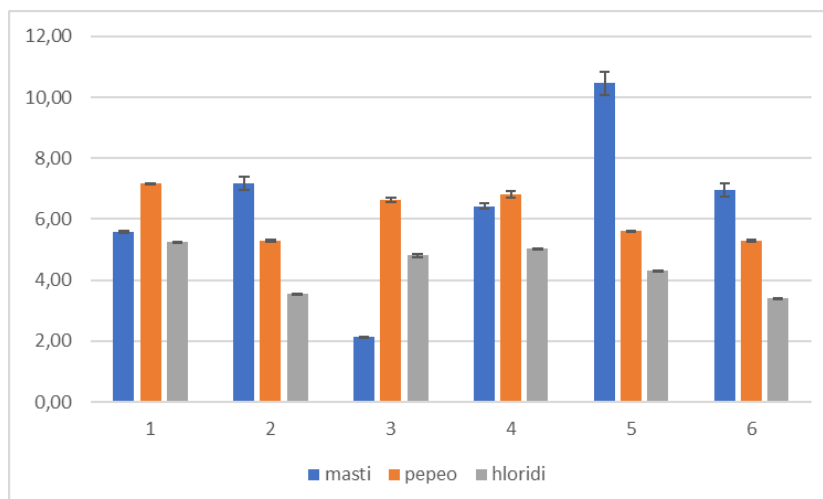
4.3.1. Hemijske analize

Usporedna analiza hemijskih karakteristika svih ispitivanih proizvoda pokazala je da nije bilo značajnih razlika, mada je primetno da su sve razlike, sem kod proteina, veoma blizu praga značajnosti od 0,05. Kako se može videti na osnovu prikazanih rezultata, sadržaj vlage je varirao od 39,57%, kod proizvođača 1, do 46,41% kod proizvođača 3. Predočeni rezultati ukazuju da je najniži sadržaj proteina zabeležen kod proizvođača 5 (37,90%), dok je najviši zabeležen kod proizvođača 1 (42,98%) (Slika 16).



Slika 16. Usporedan prikaz sadržaja vlage i proteina različitih proizvođača

Sadržaj masti se kretao od 2,14% koji je utvrđen kod proizvođača 3, do 10,47% kod proizvođača 5. Sadržaj pepela i hlorida je najniži kod proizvođača 3 i iznosio je 5,28%, odnosno 3,39%, dok je najviša vrednost sadržaja pepela i hlorida zabeležena kod proizvođača 1 i iznosila je 7,17%, odnosno 5,25% (Slika 17). Tabelarni prikaz dobijenih rezultata hemijske analize dat je u Prilogu 5.



Slika 17. Uporedni prikaz sadržaja masti, pepela i hlorida različitih proizvođača

4.3.2. Oksidacija masti

Na osnovu dobijenih rezultata, prikazanih u tabeli 8, može se zaključiti da se prosečne vrednosti TBARS značajno razlikuju. Utvrđeno je da postoje statistički značajne razlike između svaka dva proizvođača, osim između proizvođača 2 i 6. Najviša vrednost TBARS, prema podacima prikazanim u tabeli zabeležena je u kobasici proizvođača 4, dok je najniža vrednost zabeležena u kobasici kod proizvođača 3.

Tabela 8. Vrednosti oksidacije masti kobasica različitih proizvođača

Proizvođač	TBARS
1	0,37 ^d ±0,03
2	0,12 ^b ±0,00
3	0,08 ^a ±0,00
4	0,43 ^e ±0,01
5	0,18 ^c ±0,00
6	0,22 ^b ±0,14

Vrednosti su prikazane kao aritmetička sredina± stdev. Vrednosti sa različitim malim slovima (a-e) u istoj koloni značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

4.3.3. Masnokiselinski sastav

Rezultati ispitivanja masnokiselinskog sastava kobasica različitih proizvođača predstavljeni su u Tabeli 9. Upotrebom Kolmogorov-Smirnov testa utvrđeno je da dobijeni rezultati značajno odstupaju od normalne raspodele, te je za poređenje masnokiselinskog profila različitih proizvođača korišćen Kruskal-Wallis test. Statističkom analizom nije zabeležena statistički značajna razlika u sastavu masnih kiselina. Dobijeni rezultati ispitivanja piroške „peglane“ kobasice proizvođača 1 ukazuju na to da je udeo zasićenih masnih kiselina 47,92%, nezasićenih 52,08% od kojih su mononezasićene 39,74, a polinezasićene masne kiseline 12,34. Udeo zasićenih masnih kiselina kobasice proizvođača 2, iznosi 45,27, a udeo nezasićenih masnih kiselina je 54,73 (mononezasićene

42,99 i polinezasićene masne kiseline 11,74). Kako je predstavljeno u tabeli udeo zasićenih i nezasićenih masnih kiselina kobasica proizvođača 3, iznosi 44,79, odnosno 55,21, od kojih su mononezasićene 38,17 i polinezasićene masne kiseline 17,04. Ujedno, kod proizvođača 3 uočen je najveći udeo polinezasićenih masnih kiselina.

Tabela 9. Rezultati ispitivanja masnokiselinskog sastava kobasica različitih proizvođača

Sadržaj masnih kiselina (g/100g)	Proizvođač					
	1	2	3	4	5	6
C10:0	0.09±0.01	0.06±0.01	0.17±0.02	0.05±0.00	0.07±0.00	0.12±0.08
C12:0	0.11±0.01	0.07±0.00	0.12±0.05	0.06±0.01	0.08±0.00	0.07±0.00
C14:0	2.65±0.21	1.83±0.01	1.59±0.22	1.76±0.65	2.25±0.06	1.91±0.01
C14:1	0.6±0.02	0.34±0.02	0.25±0.05	0.24±0.04	0.21±0.02	0.36±0.02
C16:0	27.05±0.03	25.66±1.34	21.43±1.80	25.06±1.34	25.00±0.83	25.37±0.94
C16:1	2.97±0.55	3.59±0.06	3.11±0.20	3.23±0.31	3.02±0.04	3.61±0.06
C17:0	1.33±0.05	0.96±0.00	1.43±0.11	1.06±0.16	1.46±0.01	0.92±0.00
C17:1	0.74±0.00	0±0.00	1.10±0.04	0.64±0.02	0.86±0.00	0.86±0.00
C18:0	16.3±0.22	16.33±0.64	21.15±1.87	17.73±0.85	19.06±0.89	15.40±0.64
C18:1n9t	1.97±0.46	0.74±0.01	0.80±0.11	1.68±0.36	1.45±0.04	0.99±0.01
C18:1n9c	33.03±2.82	38.07±0.82	30.50±1.25	37.80±1.97	37.89±1.34	36.46±1.53
C18:2n6t	0.23±0.09	0.13±0.01	0.30±0.02	0.18±0.02	0.22±0.01	0.13±0.01
C18:2n6c	8.88±0.00	7.59±0.09	7.30±0.13	7.03±0.88	5.06±0.05	8.66±0.79
C20:0	0.21±0.01	0.20±0.02	0.32±0.02	0.21±0.00	0.23±0.01	0.18±0.02
C20:1n9	0.38±0.00	0.25±0.09	0.22±0.07	0.32±0.07	0.30±0.03	0.17±0.00
C18:3n3	1.46±0.00	0.86±0.01	2.25±0.08	0.97±0.09	1.61±0.03	0.93±0.01
C20:2	0.14±0.00	0.11±0.01	1.77±0.05	0.15±0.05	0.10±0.00	0.12±0.01
C22:0	0.08±0.00	0.10±0.09	0.21±0.08	0.09±0.06	0.06±0.00	0.10±0.01
C20:3n6	0.19±0.00	0.55±0.00	1.31±0.05	0.28±0.08	0.10±0.04	0.65±0.00
C22:1n9	0.04±0.00	0±0.00	1.64±0.00	0±0.00	0.07±0.01	0.04±0.00
C20:3n3	0.72±0.00	1.75±0.00	1.11±0.08	0.92±0.10	0.45±0.01	2.31±0.00
C20:4n6	0.12±0.00	0.15±0.00	0.40±0.00	0.16±0.04	0.19±0.00	0±0.00
C22:2n6	0.27±0.00	0.15±0.00	0.89±0.00	0.14±0.03	0.08±0.00	0.20±0.00
C24:0	0.1±0.00	0.06±0.00	0±0.00	0.08±0.00	0.04±0.00	
C20:5n3	0.26±0.00	0.25±0.00	0.45±0.00	0.13±0.00	0.05±0.00	0.33±0.00
C22:6n3	0.06±0.00	0.19±0.00	0.16±0.00	0.04±0.01	0.07±0.01	0.10±0.00
Zasićene masne kiseline	47.92	45.27	44.79	46.10	48.24	44.08
Mononezasićene MK	39.74	42.99	38.17	43.90	43.82	42.49
Polinezasićene MK	12.34	11.74	17.04	10.00	7.94	13.30
Nezasićene MK	52.08	54.73	55.21	53.90	51.76	55.79
ZMK/NMK	0.92	0.83	0.81	0.86	0.93	0.79
n-6	9.47	8.45	9.54	7.61	5.43	9.51
n-3	2.50	3.06	5.50	2.06	2.18	3.68
n-6/n-3	3.79	2.76	1.74	3.69	2.49	2.59

Rezultati analize kobasice proizvođača 4 pokazuju da je udeo zasićenih masnih kiselina 46,10. Udeo mononezasićenih i polinezasićenih masnih kiselina iznosi 43,90, odnosno 10,00, što predstavlja najveći udeo mononezasićenih masnih kiselina u odnosu na kobasice ostalih proizvođača.

Na osnovu predstavljenih rezultata uočeno je da je kod kobasica proizvođača 5 najveći udeo zasićenih masnih kiselina i iznosi 48,24, dok je kod proizvođača 6 zabeležen najveći udeo nezasićenih masnih kiselina (55,79). Kod svih proizvođača najzastupljenija zasićena masna kiselina je palmitinska kiselina, dok je od nezasićenih najzastupljenija oleinska kiselina. Lignocerinska kiselina nije zabeležena kod proizvođača 3 i 6. Kod proizvođača 2 nije zabeležena cis-10-heptadekanska kiselina i eručna kiselina, koja nije uočena ni kod proizvođača 4.

4.3.4. Aminokiselinski sastav

Sadržaj ukupnih aminokiselina značajno se razlikuje u odnosu na recepturu proizvođača i kreće se u rasponu od 509,86, zabeleženo kod proizvođača 1, do 846,25 kod proizvođača 6. U pirotskoj „peglanoj“ kobasici, spravljenoj po recepturi proizvođača 1 najzastupljenije aminokiseline su alanin, serin i glutaminska kiselina koje pripadaju neesencijalnim aminokiselinama, dok je najmanja vrednost sadržaja triptofana koji predstavlja esencijalnu aminokiselinu. Najzastupljenije aminokiseline u kobasici proizvođača 2 su glutaminska kiselina, prolin i lizin, dok su tirozin i triptofan najslabije zastupljene. Prema datim rezultatima, kobasica proizvođača 3 sadrži najviše glutaminsku kiselinu, alanin i leucin. Najslabije zastupljene su tirozin i arginin. Aminokiselinski profil kobasice spravljene po recepturi proizvođača 4 pokazuje najveću zastupljenost serina, glutaminske kiseline i alanina, dok najmanju zastupljenost pokazuje triptofan. Rezultati prikazani za proizvođača 5 pokazuju najveću zastupljenost glutaminske kiseline, leucina i alanina i najmanju zastupljenost tirozina i arginina, kao u slučaju proizvođača 3. Kobasica proizvođača 6 najviše sadrži glutaminsku kiselinu, prolin i leucin, a najslabije su zastupljeni tirozin i triptofan (Tabela 10).

Tabela 10. Rezultati ispitivanja aminokiselinskog sastava kobasica različitih proizvođača

Sastav slobodnih aminokiselina (mg/100 g)	Proizvođač					
	1	2	3	4	5	6
Aspartic	11,477557	37,108132	33,343572	16,83665	38,275693	37,33729
Treonin	19,12779	47,308391	44,793675	26,1121	51,350059	47,891683
Serin	62,59758	58,821706	22,835627	71,57623	18,680745	59,639507
Glutaminska	53,01126	153,974316	156,615627	69,68057	177,213249	155,00248
Prolin	40,57932	85,170281	44,600687	56,95120	32,016003	78,218427
Glicin	21,60095	38,607321	33,01987	23,97853	43,630436	39,049319
Alanin	63,93237	74,352704	71,609429	67,98918	74,85277	73,372285
Cistein	26,45865	21,781332	21,868276	31,30675	25,349725	21,572765
Valin	25,88627	51,298741	47,116167	33,35334	56,761173	52,08222
Metionin	12,92981	22,396096	20,291083	16,28701	26,276537	23,063506
Izoleucin	19,83067	38,281152	33,271328	26,39833	40,606111	39,578897
Leucin	38,47786	75,708957	64,109264	50,33224	93,918189	77,78989
Tirozin	15,05152	2,597208	1,927479	19,93239	1,546589	3,027097
Fenil alanin	11,01826	20,583111	20,733754	15,51556	29,23879	22,404498
Histidin	10,11577	18,212919	18,382158	13,61028	18,229515	19,492837
Triptofan	3,072941	4,099021	3,267534	4,735155	6,692456	5,413771
Lizin	38,46087	77,697818	51,23811	49,30180	46,096186	77,489541
Arginin	36,22586	12,333374	2,042542	41,64774	1,856208	13,821358
Ukupne aminokiseline (TAA)	509,86	840,33	691,07	635,55	782,59	846,25

4.3.5. Instrumentalno određivanje boje

U okviru instrumentalnog ispitivanja boje vršeno je određivanje boje spoljašnje površine kobasica i boje poprečnog preseka ispitivanih kobasica. Rezultati ovih ispitivanja predstavljeni su u Tabeli 11. Vrednosti L* kretale su se 12,07 do 14,47. Najniža vrednost L* spoljašnje površine kobasica zabeležena je kod proizvođača 4 sa najdužim periodom sušenja (30 dana). Kod istog proizvođača zabeležena je i najniža vrednost a*, koja se kretala u rasponu od 5,56 do 8,31. Vrednost b* se kretala od -1,11 do 2,67. Najniža b* vrednost zabeležena kod proizvođača 2, u čijoj recepturi je udeo magarećeg mesa iznosio 40%. Najviše vrednosti L*, a* i b* zabeležene su kod proizvođača 5. Za sve posmatrane parametre boje, zabeležene su značajne promene ($p < 0,05$) u odnosu na recepture proizvođača. Vrednost L* poprečnog preseka kobasica najniža je, kao u slučaju spoljašnje površine, kod proizvođača 4 i kretala se od 12,22 do 14,03. Vrednost a* kretala se u rasponu od 8,16 do 13,19. Takođe, najniža vrednost a* poprečnog preseka uočena je kod proizvođača 4. Vrednost b* se kretala od -0,67 do 3,91, a najniža vrednost b* uočena je kod proizvođača 3 sa udelom junećeg mesa od 60%. Najviša vrednost L* uočena je kod proizvođača 6, koji ujedno ima i najkraći period sušenja (20 dana). Kobasica proizvođača 2 ima najvišu vrednost a*, dok kobasica proizvođača 5 ima najvišu vrednost b*. Parametri boje površine poprečnog preseka kobasica se takođe, značajno razlikuju ($p < 0,05$) između proizvođača.

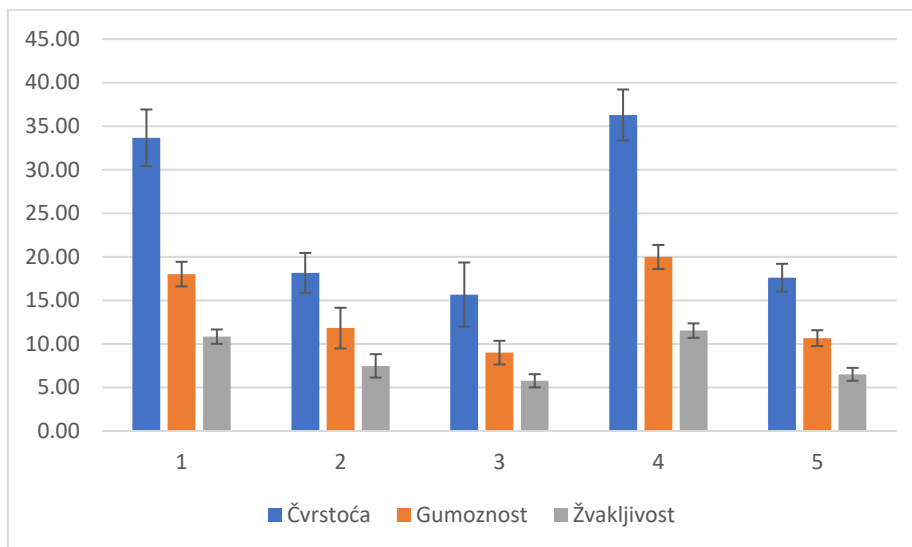
Tabela 11. Instrumentalno određivanje boje spoljašnje površine kobasice i poprečnog preseka kobasice

Boja spoljašnje površine	L*	a*	b*
Proizvođač 1	13.40 ^{ab} ±3.93	5.67 ^{ab} ±0.74	-0.87 ^a ±1.12
Proizvođač 2	12.07 ^a ±3.95	5.85 ^b ±1.87	-1.11 ^a ±0.93
Proizvođač 3	13.74 ^{ab} ±2.25	6.63 ^c ±1.01	-0.74 ^a ±0.98
Proizvođač 4	12.76 ^b ±2.80	5.56 ^{ac} ±1.23	-1.04 ^a ±1.46
Proizvođač 5	14.47 ^b ±3.07	8.31 ^d ±1.51	2.62 ^b ±1.34
Proizvođač 6	14.37 ^{ab} ±2.99	6.19 ^{abc} ±0.99	-0.72 ^a ±0.99
Boja poprečnog preseka	L*	a*	b*
Proizvođač 1	13.66 ^a ±2.76	9.20 ^a ±2.18	-0.66 ^a ±1.42
Proizvođač 2	13.87 ^a ±2.05	14.48 ^b ±2.19	1.53 ^b ±1.56
Proizvođač 3	13.67 ^a ±3.06	9.06 ^a ±3.14	-0.67 ^a ±1.36
Proizvođač 4	12.22 ^b ±2.09	8.16 ^c ±1.45	0.03 ^c ±1.33
Proizvođač 5	15.83 ^c ±3.19	13.19 ^d ±2.43	3.91 ^d ±2.48
Proizvođač 6	14.03 ^a ±2.023	11.94 ^e ±2.84	1.22 ^b ±1.76

Vrednosti su prikazane kao aritmetička sredina ± st. devijacija. Vrednosti sa različitim malim slovima (a-e) u istoj koloni značajno se razlikuju ($p < 0,05$)

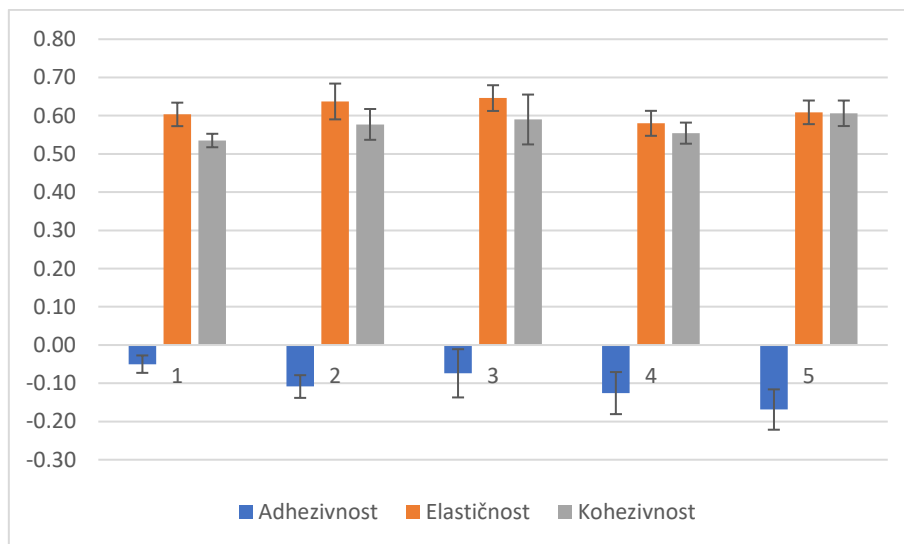
4.3.6. Instrumentalno određivanje teksture

Kod svih ispitivanih parametara teksture, u odnosu na različite recepture proizvođača utvrđeno je da postoje statistički značajne razlike. Pojedinačni parovi proizvođača testirani su Mann Whitney-vim testom. Različiti udeli upotrebljenog mesa prouzrokovali su značajne razlike u pogledu tvrdoće, adhezivnosti i žvackljivosti.



Slika 18. Uporedni prikaz čvrstoće, gumoznosti i žvkljivosti različitih proizvođača piroške „peglane“ kobasice

Kako se iz prikazanih rezultata može videti vrednosti tvrdoće su varirale od 15,67 do 36,29, pri čemu je najniža vrednost uočena kod proizvođača 3 čija receptura jedino sadrži konjsko meso sa udelom od 10%, dok je najviša vrednost zabeležena kod proizvođača 4 sa najdužim periodom sušenja. Rezultati pokazuju da se adhezivnost kretala od -0,17 do -0,05. Gumoznost se značajno razlikuje u odnosu na proizvođača, pa se tako vrednost kretala od 9,01 do 19,98 (Slika 18 i 19). Promene instrumentalnih parametara teksture date su u Prilogu 6.



Slika 19. Uporedni prikaz adhezivnosti, elastičnosti i kohezivnosti različitih proizvođača piroške „peglane“ kobasice

Rezultati statističke analize pojedinačnih poređenja parova kobasica različitih proizvođača Mann Whitneye-vim testom prikazani su u Tabeli 12. Svaki parametar teksture ispitivanih kobasica poreden je između različitih proizvođača. Statistički značajna razlika u tvrdoći kobasice zabeležena je kod kobasica proizvođača 1 u poređenju sa kobasicom proizvođača 2, 3 i 6. Takođe, značajna razlika postoji i u poređenju kobasica proizvođača 2 sa proizvođačem 4; proizvođača 3 sa proizvođačem 4 i proizvođača 4 sa proizvođačem 6. Kako se iz prikazanih rezultata može uočiti, statistički značajna razlika u adhezivnosti kobasice zabeležena je između kobasica proizvođača 1 sa

kobasicama proizvođača 2, 4 i 6. Kod ovog parametra uočena je i značajna razlika između proizvođača 2 i 6 i između proizvođača 3 i 6. Značajna razlika u elastičnosti kobasica zabeležena je između proizvođača 2 i 4 i proizvođača 3 i 4. Kod kohezivnosti kobasica značajna razlika zabeležena je između kobasica proizvođača 1 i 6 i proizvođača 4 i 6. Kod gumoznosti kobasica uočene su najveće razlike među proizvođačima. Kobasice proizvođača 1 i 3 se po pitanju gumavosti značajno razlikuju od kobasica ostalih proizvođača. Takođe, značajna razlika je uočena između kobasica proizvođača 2 i 4 i proizvođača 4 i 6. Prema prikazanim rezultatima, rastegljivost se značajno razlikuje između kobasica proizvođača 1 sa proizvođačima 2, 3 i 6, kao i između kobasica proizvođača 2 sa proizvođačima 3 i 4. Rastegljivost se, takođe, značajno razlikuje između kobasica proizvođača 3 sa proizvođačem 4 i proizvođača 4 sa proizvođačem 6.

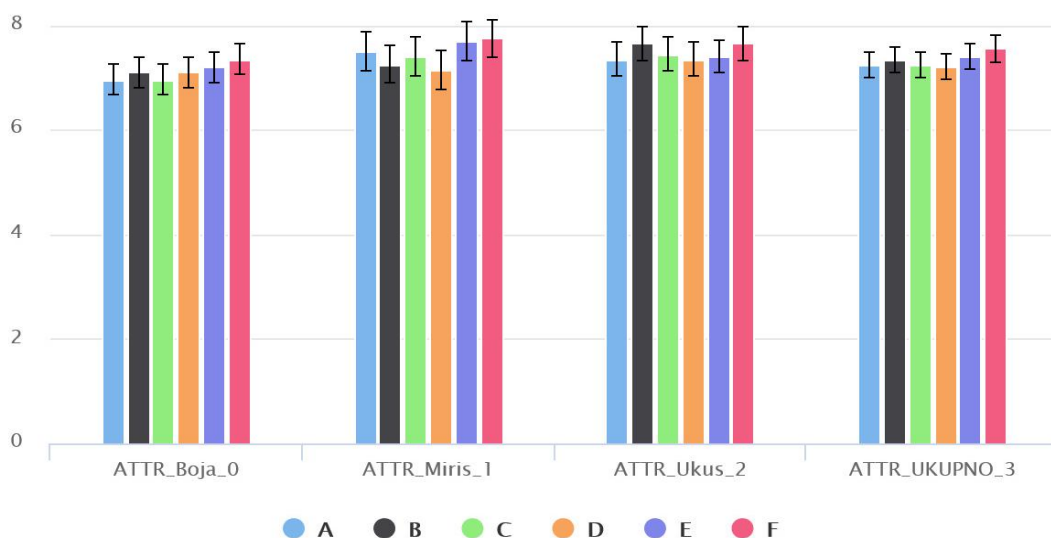
Tabela 12. Pojedinačna poređenja parova pojedinačnih parametara teksture različitih proizvođača

Parametri teksture	Proizvođači	Proizvođač 1	Proizvođač 2	Proizvođač 3	Proizvođač 4
tvrdoća	Proizvođač 2	0,001			
	Proizvođač 3	0,004	0,073		
	Proizvođač 4	0,138	0,001	0,003	
	Proizvođač 6	0,001	0,867	0,524	0,000
adhezivnost	Proizvođač 2	0,005			
	Proizvođač 3	0,792	0,343		
	Proizvođač 4	0,006	0,902	0,202	
	Proizvođač 6	0,001	0,029	0,019	0,121
elastičnost	Proizvođač 2	0,181			
	Proizvođač 3	0,062	0,876		
	Proizvođač 4	0,366	0,038	0,018	
	Proizvođač 6	0,755	0,189	0,093	0,094
kohezivnost	Proizvođač 2	0,073			
	Proizvođač 3	0,126	1,000		
	Proizvođač 4	0,234	0,318	0,343	
	Proizvođač 6	0,001	0,152	0,435	0,009
gumoznost	Proizvođač 2	0,001			
	Proizvođač 3	0,004	0,073		
	Proizvođač 4	0,035	0,001	0,003	
	Proizvođač 6	0,001	0,336	0,019	0,000
rastegljivost	Proizvođač 2	0,001			
	Proizvođač 3	0,004	0,048		
	Proizvođač 4	0,138	0,001	0,003	
	Proizvođač 6	0,001	0,189	0,093	0,000

*crvenom bojom su označene statistički značajne razlike

4.3.7. Senzorna analiza hedonskom skalom

Ocene pojedinačnih senzornih karakteristika ispitivanih kobasica različitih proizvođača, kao i ukupna ocena senzornog kvaliteta, prikazani su u Prilogu 7. Kobasice svih šest proizvođača ocenjene su visokim ocenama. Opseg ocena boje kretao se od 5 do 8, mirisa i ukusa od 5 do 9. Najveću ukupnu ocenu (7,55) dobila je kobasica proizvođača 6, dok je najslabiju ocenu dobila kobasica proizvođača 4 (7,20). Prema ocenama predstavljenim u tabeli, boja i miris kobasice su najbolje ocenjeni kod proizvođača 6, sa ocenama 7,35, odnosno 7,75. Najslabije ocenjenu boju imaju proizvođači 1 i 3 (6,95), dok je miris najslabije ocenjen kod proizvođača 4 sa ocenom 7,15. Najbolje ocenjen ukus imaju kobasice proizvođača 2 i 6 (7,65). Kobasice proizvođača 1 i 4 imaju najslabije ocenjen ukus sa ocenom 7,35. Statističkom analizom senzornih ocena, nije zabeležena značajna razlika među proizvođačima ($P < 0,05$). Na Slici 20. prikazana je uporedna analiza ocena senzornih karakteristika piroške „peglane“ kobasice proizvedene od strane različitih proizvođača.



Slika 20. Uporedni prikaz ocena senzornih karakteristika kobasica različitih proizvođača

4.3.8. Mikrobiološka ispravnost kobasica

Mikrobiološki testovi rađeni po ISO standardima, koji se koriste za otkrivanje uzročnika kvarenja hrane i potencijalnih oportunističkih patogena kod ljudi, pokazali su manju učestalost pripadnika iz familije Enterobacteriaceae i odsustvo *Salmonella* spp. i *L. monocytogenes*. Vrednosti broja aerobnih mikroorganizama su bile više kod standardnih proizvođača PK1 i PK6, dok su najniže za nestandardne PK2 i PK3 (Tabela 13).

Tabela 13. Rezultati mikrobiološke ispravnosti kobasica

Mikroorganizmi	Granične vrednosti (cfu/g)		Oznaka metode	Utvrđena vrednost	
	m	M			
<i>Salmonella</i> spp.	ne sme biti u 25g		SRPS EN ISO 6579-1:2008	PK 1: PK 3: PK 5:	PK 2: PK 4: PK 6:
Enterobacteriaceae	10 ² CFU/g	10 ³ CFU/g	SRPS EN ISO 21528-2:2009	PK 1:< 10 CFU/g PK 3:< 10 CFU/g PK 5:< 10 CFU/g	PK 2:< 10 CFU/g PK 4:< 10 CFU/g PK 6:< 10 CFU/g
<i>L. monocytogenes</i>	ne sme biti u 25g		SRPS EN ISO 11290-1:2010	PK 1: PK 3: PK 5:	PK 2: PK 4: PK 6:
Ukupan broj aerobnih mikroorganizama	nije specifično		SRPS EN ISO 4833-1:2014	PK1: 8.8 × 10 ⁵ CFU/g PK3: 4.3 × 10 ⁵ CFU/g PK5: 6.4 × 10 ⁵ CFU/g	PK2: 4.7 × 10 ⁵ CFU/g PK4: 6.9 × 10 ⁵ CFU/g PK6: 1.6 × 10 ⁶ CFU/g

4.3.9. Diverzitet i bakterijske zajednice

Sekvenciranjem gena za 16S rDNK na platformi Illumina utvrđen je sastav bakterijskih zajednica za svakog proizvođača bez obzira da li su kobasice spravljene prema standardnoj (70% goveđe, 10% ovčije, 20% kozije meso) ili nestandardnoj recepturi (različite kombinacije odnosa i vrsta upotrebljenog mesa). Najmanji broj sekvenci prema Tabeli 14 je utvrđen za PK1 (75.993), dok je najveći broj pronađen za PK6 (133.481).

Tabela 14. Ukupan broj sekvenci prema proizvođaču nakon procesovanja

Proizvođač	Sirove sekvence	Filtrirane	Utišane	Spojene	Bez himera
PK1	99416	84247	84247	80378	75993
PK2	115594	97139	97139	92346	85897
PK3	117042	101812	101812	97378	84284
PK4	109267	95179	95179	92263	80760
PK5	111366	97278	97278	96053	94625
PK6	176922	152901	152901	148985	133481

Shannon i Fisher Alpha indeksi diverziteta ukazuju na visoku bakterijsku raznolikost u uzorcima PK1, PK2 i PK6 i nešto manju raznolikost za uzorke PK4 i PK5 (Tabela 15).

Tabela 15. Alfa diverzitet i bogatstvo vrsta

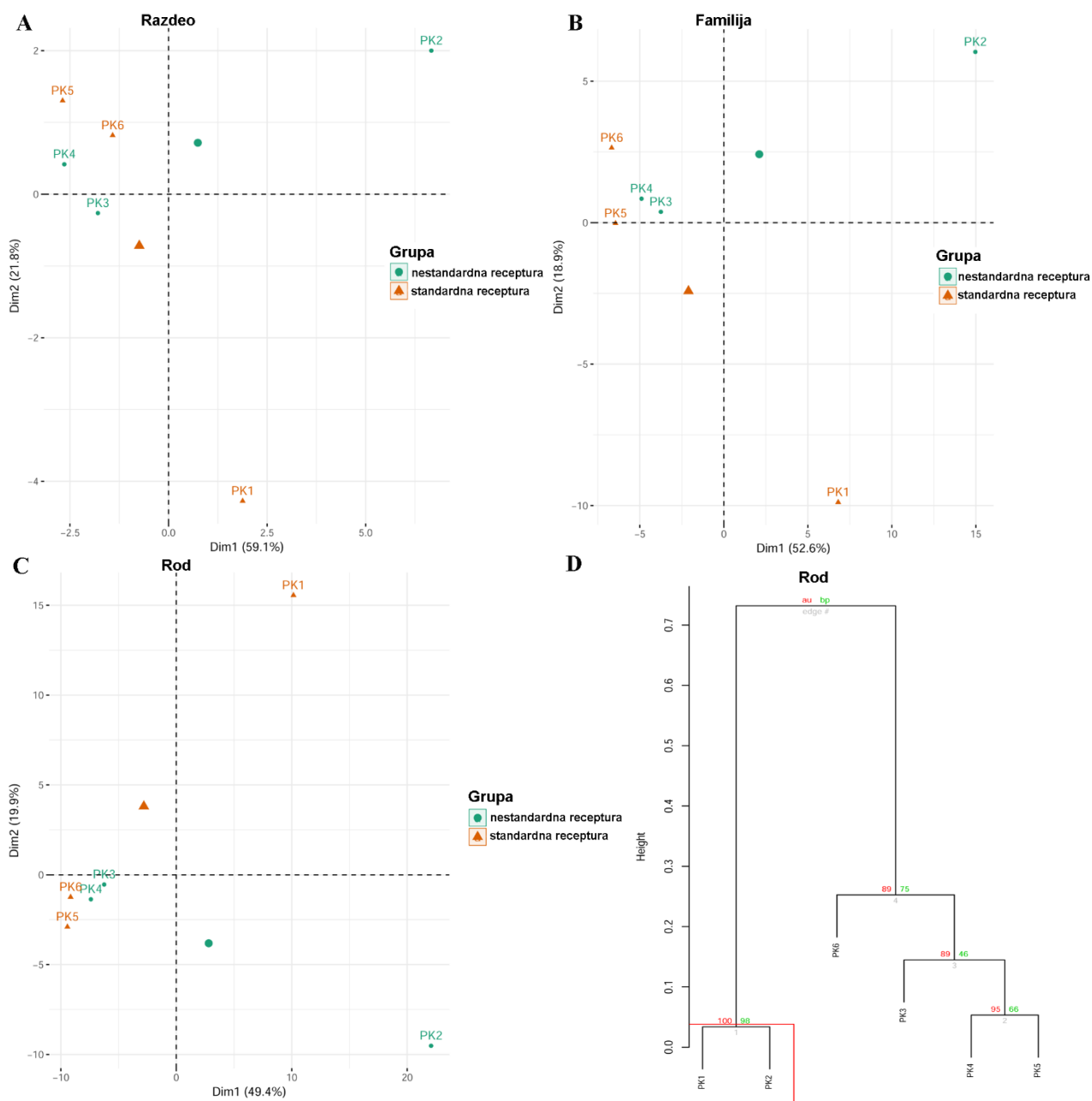
Proizvođač	OBS	Chao1	Chao1.SE	ACE	ACE.SE	Shannon	Simpson	invSimpson	FisherAlpha	Taksonomski rank
Nestandardna receptura										
PK2	15	15	0	15	1.93	1.45	0.71	3.43	1.36	Razdeo
	90	90	0	90	4.01	2.45	0.84	6.23	9.93	Familija
	171	171	0	171	5.54	2.74	0.85	6.48	20.5	Rod
	218	218	0	218	6.52	2.83	0.85	6.51	27.03	OTU
PK3	7	7	0	NA	NA	0.98	0.53	2.12	0.59	
	46	46	0	46	3.12	1.7	0.67	3.07	4.7	
	68	68	0	68	3.94	1.75	0.68	3.09	7.27	
	78	78	0	78	4.16	2.2	0.82	5.42	8.47	
PK4	7	7	0	NA	NA	0.64	0.33	1.5	0.59	
	33	33	0	33	2.56	1.6	0.69	3.27	3.26	
	50	50	0	50	3.51	1.63	0.69	3.27	5.18	
	59	59	0	59	3.81	1.8	0.74	3.79	6.23	
Standardna receptura										
PK1	10	10	0	10	1.26	1.54	0.75	3.95	0.88	Razdeo
	74	74	0	74	3.62	2.59	0.87	7.83	8.09	Familija
	149	149	0	149	5.17	2.86	0.88	8.2	17.83	Rod
	185	185	0	185	5.75	2.95	0.88	8.33	22.81	OTU
PK5	10	10	0	10	1.26	0.46	0.21	1.26	0.86	
	48	48	0	48	3.45	1.37	0.66	2.93	4.86	
	72	72	0	72	4.18	1.4	0.66	2.93	7.64	
	78	78	0	78	4.38	1.46	0.67	3.02	8.36	
PK6	13	13	0	13	1.52	0.98	0.54	2.16	1.11	
	65	65	0	65	3.72	1.91	0.8	4.88	6.55	
	117	117	0	117	5.28	1.95	0.8	4.91	12.63	
	134	134	0	134	5.66	2.13	0.82	5.71	14.7	

Kod uzoraka PK1 i PK2 pokazano je najveće bogatstvo bakterijskih vrsta, dok je kod uzoraka PK3, PK4 i PK5 pokazano najmanje, posebno na nivou OTU. Indeksi Chao1 i ACE otkrili su pozitivnu korelaciju između dobijenog (OBS) i procenjenog bogatstva. Najniži nivo bogatstva vrsta uočen je u uzorcima PK4 i PK5. Najniži nivo bogatstva je u pozitivnoj korelaciji sa Simpsonovim indeksom. Upotrebom Wilcoxon i Kruskal-Wallis neparametrisjkih testova nisu pronađene statističke razlike ($p < 0,05$) na svim indeksima alfa diverziteta i bogatstva (OBS/Chao1, Shannon, Simpson, FisherAlpha) između standardnih i nestandardnih receptura koji se koriste u proizvodnji pirotske „peglane“ kobasice (Tabela 16).

Tabela 16. Neparametrijski testovi u poređenju nestandardne i standardne recepture zasnovani na indeksima alfa diverziteta

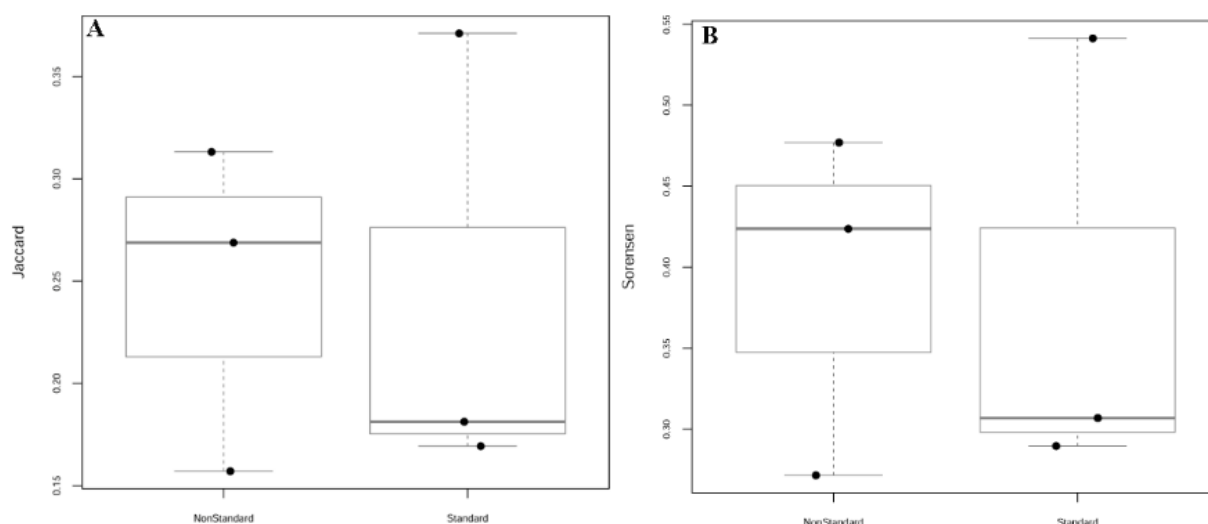
	OBS/Chao1	Shannon	Simpson	invSimpson	FisherAlpha	Taksonomski rank
Nestandardna receptura	9.667	1.023	0.523	2.350	0.847	Razdeo
Standardna receptira	11.000	0.993	0.500	2.457	0.950	
Wilcoxon	0.653	1.000	1.000	1.000	0.658	Familija
Kruskal-Wallis	0.500	1.000	0.827	0.827	0.507	
	56.333	1.917	0.733	4.190	5.963	
	62.333	1.957	0.777	5.213	6.500	
	0.663	1.000	1.000	1.000	0.663	Rod
	0.513	0.827	0.827	0.827	0.513	
	96.333	2.040	0.740	4.280	10.983	
	112.667	2.070	0.780	5.347	12.700	
	0.663	1.000	1.000	1.000	0.663	OTU
	0.513	0.827	0.827	0.827	0.513	
	118.333	2.277	0.803	5.240	13.910	
	132.333	2.180	0.790	5.687	15.290	
	0.825	1.000	1.000	1.000	1.000	
	0.658	0.827	1.000	0.827	0.827	

Razlike u beta diverzitetu između uzoraka su predstavljene analizom glavnih koordinata (PCoA) i grupisanjem (Slika 21). Uzorci PK3, PK4, PK5 i PK6 su se pokazali međusobno sličnim, dok su uzorci PK1 i PK2 bili udaljeni iz razloga što su vrednosti glavne ose razdvajanja bile visoke na svim taksonomskim nivoima poređenja. Vrednost Dim1 je bio u rasponu od 49,4% do 59,1%. Uzorci PK3, PK4, PK5 i PK6 pokazali su manju različitost od PK2 uzorka prema Dim2 sa prosečnom vrednošću od 20% na svim taksonomskim nivoima. Hijerarhijska klaster analiza je pokazala na osnovu specifičnih zastupljenosti taksona da su uzorci PK1 i PK2 najbliži, kao i PK4 i PK5 (Slika 21D).



Slika 21. Analiza glavnih komponenti (PCoA) bakterijskog diverziteta u različitim uzorcima na taksonomskim nivoima razdela (A), familije (B) i roda (C) i klusterska analiza na nivou roda (D)

Sa druge strane, Jaccard i Sorensen udaljenosti nisu pokazale statistički značajnu razliku između standardnih i nestandardnih recepata svih šest analiziranih uzoraka piroške „peglane“ kobasice (Slika 22).



Slika 22. Jaccard (A) i Sorensen (B) udaljenosti na nivou roda između standardne i nestandardne recepture proizvođača pirotske “peglane” kobasice

Razdeo *Firmicutes* uočen je kao dominantan u uzorcima PK3, PK4, PK5 i PK6 sa relativnom zastupljenošću između 63% - 89%. Razdeo *Proteobacteria* se pokazao najzastupljenijim u uzorcima PK1 i PK2. Takođe su, mada u manjoj meri, uočeni i *Actinobacteria* i *Bacteroidetes*. Razdeo *Fusobacteria* sa familijom *Fusobacteriaceae* bio je prevalentan samo u PK1 (Slika 23). Familija *Lactobacillaceae* sa rodom *Lactobacillus* dominirali su u uzorcima proizvođača PK3, PK4, PK5 i PK6. Njihova relativna zastupljenost je bila u opsegu od 31% do 54%. U uzorcima PK4 i PK5 dominirao je *L. sakei*, dok je u uzorcima PK3 i PK6 dominantan bio *L. algidus*. Rod *Leuconostoc* iz familije *Leuconostocaceae* pronađen je u svim uzorcima, dok je u nešto većem procentu uočen u uzorcima PK4 i PK5, a najzastupljeniji je bio u uzorku PK6. Iz familije *Listeriaceae*, vrsta *Brochothrix thermosphacta* dominirala je u uzorcima od PK3 do PK6, sa najvećom zastupljenošću u PK4 i PK5 uzorcima. U uzorcima PK3, PK5 i PK6 iz familije *Vibrionaceae* dominirao je rod *Photobacterium*. Familija *Pseudomonadaceae* sa vrstom *Pseudomonas psychrophila* karakterisali su uzorke PK2, PK3, PK4 i PK6. Bitno je napomenuti da su u uzorku PK 1 *Streptococcus parauberis*, *Cetobacterium*, *Serratia* i *Hafnia-Obesumbacterium* bili zastupljeniji. Takođe, *Aeromonas* je zabeležen u uzorcima PK1 i PK3, dok su *Weissella*, *Vagococcus*, *Psychrobacter*, *Staphylococcus*, *Pantoea*, *Enterococcus*, *Kosakonia*, *Myroides*, *Acinetobacter*, *Corynebacterium* 1, *Bacillus*, *Xanthomonas* i *Providencia* bile zajedničke za PK1 i PK2. *Carnobacterium* imao je najveću zastupljenost u uzorcima PK1 i PK5, dok se u ostalim uzorcima, javljao na granici detekcije ili nije otkriven. Posmatranje prostorne dinamike kroz taksonomske nivoe razdela i familije je u skladu sa otkrivenim jedinstvenim rodovima. Prema Kruskal-Wallis testu sve korelacije kod detektovanih rodova su bile statistički neznačajne, osim u slučaju *Carnobacterium* (više je bio zastupljen u kobasicama standardne recepture) i *Pseudoalteromonas* (više zastupljen u kobasicama nestandardne recepture) koji su jedini pokazali statističku značajnost (0,049534613 i 0,036903954) u pogledu proizvođača standardne i nestandardne recepture.

		Proizvođači					
		PK1	PK2	PK3	PK4	PK5	PK6
A	Razdeo						
	<i>Proteobacteria</i>	23,60	23,59	13,90	7,61	6,78	13,88
	<i>Firmicutes</i>	17,52	11,20	64,47	80,59	88,82	63,13
	<i>Fusobacteria</i>	3,12	0,00	0,12	0,00	0,00	0,04
	<i>Actinobacteria</i>	1,96	3,00	0,12	0,02	0,03	0,08
	<i>Bacteroidetes</i>	1,33	1,84	0,11	0,31	0,16	0,47
B	Familija						
	<i>Enterobacteriaceae</i>	7,67	7,76	1,23	0,59	0,13	0,40
	<i>Aeromonadaceae</i>	6,22	0,10	1,35	0,01	0,00	0,34
	<i>Lactobacillaceae</i>	6,10	2,02	54,34	48,25	42,17	31,44
	<i>Fusobacteriaceae</i>	3,12	0,00	0,12	0,00	0,00	0,04
	<i>Enterococcaceae</i>	2,59	2,15	0,47	0,00	0,00	0,27
	<i>Leuconostocaceae</i>	2,34	2,02	2,56	7,04	5,25	25,50
	<i>Moraxellaceae</i>	2,33	3,25	0,20	1,56	0,10	0,13
	<i>Staphylococcaceae</i>	1,80	2,42	0,15	0,09	0,28	0,17
	<i>Carnobacteriaceae</i>	1,59	0,16	0,31	0,26	1,41	0,33
	<i>Streptococcaceae</i>	1,39	0,14	0,07	0,27	0,03	0,04
	<i>Pseudomonadaceae</i>	0,97	1,76	1,98	2,90	0,13	2,09
	<i>Micrococcaceae</i>	0,78	0,79	0,00	0,01	0,00	0,03
	<i>Flavobacteriaceae</i>	0,71	1,08	0,05	0,24	0,00	0,04
	<i>Burkholderiaceae</i>	0,70	1,01	0,06	0,00	0,01	0,06
	<i>Bacillaceae</i>	0,60	1,31	0,03	0,00	0,00	0,02
	<i>Corynebacteriaceae</i>	0,58	1,41	0,04	0,00	0,00	0,01
	<i>Xanthomonadaceae</i>	0,51	0,75	0,02	0,01	0,00	0,03
	<i>Wohlfahrtiimonadaceae</i>	0,29	0,58	0,01	0,00	0,00	0,03
	<i>Listeriaceae</i>	0,25	0,35	6,47	24,56	39,51	5,00
<i>Vibrionaceae</i>	0,07	0,58	7,43	1,65	6,33	8,95	
C	Rod						
	<i>Aeromonas</i>	6,22	0,10	1,35	0,01	0,00	0,34
	<i>Lactobacillus</i>	6,10	2,02	54,18	48,25	42,17	31,43
	<i>Cetobacterium</i>	3,12	0,00	0,12	0,00	0,00	0,04
	<i>Enterobacteriaceae</i>	2,80	2,65	0,28	0,06	0,03	0,13
	<i>Weissella</i>	2,03	1,56	0,55	0,08	0,26	0,24
	<i>Vagococcus</i>	1,84	1,43	0,43	0,00	0,00	0,25
	<i>Psychrobacter</i>	1,58	1,97	0,07	1,01	0,08	0,05
	<i>Staphylococcus</i>	1,55	2,16	0,13	0,09	0,28	0,16
	<i>Carnobacterium</i>	1,54	0,08	0,31	0,26	1,41	0,32
	<i>Streptococcus</i>	1,07	0,05	0,03	0,00	0,01	0,02
	<i>Hafnia-Obesumbacterium</i>	1,07	0,00	0,07	0,00	0,00	0,02
	<i>Serratia</i>	1,03	0,36	0,04	0,28	0,00	0,04
	<i>Pseudomonas</i>	0,97	1,76	1,98	2,90	0,13	2,09
	<i>Pantoea</i>	0,76	1,58	0,56	0,25	0,06	0,10
	<i>Enterococcus</i>	0,75	0,72	0,04	0,00	0,00	0,02
	<i>Kosakonia</i>	0,71	1,50	0,22	0,00	0,00	0,05
	<i>Myroides</i>	0,67	1,03	0,05	0,23	0,00	0,04
	<i>Acinetobacter</i>	0,65	1,08	0,13	0,55	0,02	0,08
	<i>Corynebacterium 1</i>	0,58	1,41	0,04	0,00	0,00	0,01
<i>Bacillus</i>	0,47	0,89	0,02	0,00	0,00	0,02	
<i>Xanthomonas</i>	0,33	0,54	0,02	0,01	0,00	0,02	
<i>Providencia</i>	0,33	0,54	0,02	0,00	0,00	0,03	
<i>Leuconostoc</i>	0,31	0,47	2,01	6,96	4,99	25,27	
<i>Brochothrix</i>	0,25	0,35	6,47	24,56	39,51	5,00	
<i>Photobacterium</i>	0,07	0,58	7,43	1,60	6,05	8,95	
D	Vrsta						
	<i>Lactobacillus sakei</i>	4,40	0,17	4,72	43,43	40,90	3,91
	<i>Streptococcus parauberis</i>	1,06	0,00	0,03	0,00	0,00	0,02
	<i>Myroides</i> sp. TSM13032	0,47	0,59	0,03	0,00	0,00	0,03
	<i>Pseudomonas psychrophila</i>	0,29	0,59	1,88	2,75	0,13	1,97
	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	0,25	0,35	6,47	24,56	39,51	5,00
<i>Lactobacillus algidus</i> DSM 15638	0,09	0,20	36,94	4,60	1,21	26,18	

Slika 23. Relativna brojnost bakterijskih taksona na osnovu sekvenciranja gena 16S rRNK na nivou razdela (A), familije (B), roda (C) i vrste (D). Prikazane su samo vrednosti iznad 0,5% relativne zastupljenosti, kao i vrste sa potpunom identifikacijom.

DISKUSIJA

5. DISKUSIJA

Domaće fermentisane kobasice su tradicionalni fermentisani proizvodi od mesa koji se po različitim recepturama proizvode u mnogim zemljama širom sveta. Usled različite recepture i postupaka izrade, uočavaju se razlike u postupcima njihove izrade, kao i u senzorskim svojstvima, ne samo između država, već u okviru različitih regiona jedne države. Jedan takav proizvod je i pirotška „peglana“ kobasica, koja je nastala u staroplaninskim selima pirotške okoline. Među lokalnim stanovništvom predstavljala je oduvek bio visoko cenjeni proizvod od mesa, specijalitet od odabranog mesa vrhunskog kvaliteta, proizveden isključivo od stoke uzgajane na staroplaninskim pašnjacima. Specifičan način pripreme, meso od različitih životinja, bez upotrebe veštačkih aditiva i konzervanasa, odsustvo komplikovane tehnološke prerade, uz specifičnu klimu pirotskog regiona, čine ovaj proizvod posebnim.

U prvoj fazi istraživanja, preliminarna fenotipska i biohemijska identifikacija, svih 120 izolata BMK, ukazuje na to da pripadaju rodovima *Lactobacillus* i *Leuconostoc*, što je u skladu sa literaturnim podacima istraživanja (Danilović et al., 2011; Čolo et al., 2015). Fenotipska identifikacija i karakterizacija se pokazala kao nedovoljno diskriminatorska, iz razloga što mnogi bakterijski sojevi imaju sličnu morfologiju, fiziologiju i rastu pod sličnim uslovima. Zbog svega navedenog, postoji potreba da se rezultati fenotipske karakterizacije dopune genetičkom karakterizacijom (Mohammed et al., 2009). REP, BOX, GTG₅ i M13 predstavljaju visoko konzervisane repetitivne DNK elemente koji se koriste za rep-PCR profilisanje, odnosno za RAPD-PCR profilisanje i široko su rasprostranjeni u genomima velikog broja bakterijskih grupa (De Vuyst et al., 2008). Upravo zbog svoje široke distribucije u malim genomima prokariotskih organizama, mogu se koristiti kao brze i pouzdane metode za tipizaciju širokog spektra Gram negativnih i nekih Gram pozitivnih bakterija (De Urazza et al., 2000; Lanoot et al., 2004; Wieser et al., 2009). Rep-PCR tehnike su korišćene ranije i tada je utvrđeno da je ova tehnika pogodna za tipizaciju sojeva *Lactobacillus* gde su oligonukleotidni prajmeri kao što su ERIC (Stephenson et al., 2009) ili BOX (Gevers et al., 2001; Tran et al., 2011) korišćeni zajedno sa GTG₅ prajmerima. Hyytia-Trees et al. (1999) sugerisali su da se upotrebom kombinacije rep-PCR (BOX i REP) i RAPD prajmera može postići adekvatan nivo diskriminacije među sojevima *L. sakei*. Nasuprot tome, Tran et al. (2011) ukazali su na to da molekularni paterni generisani pomoću REP i BOX prajmera nisu bili dovoljno diskriminatorski za izolate iz Vijetnamske fermentisane kobasice, za razliku od GTG₅, koji je dao kompleksnije i raznovrsnije paterne. Gevers et al. (2001) je, takođe, utvrdio da se diskriminatorski značaj nije promenio pri kombinovanju BOX, REP i GTG₅ prajmera, i da se tipizacija sojeva BMK može izvesti samo pomoću GTG₅ prajmera. Pokazalo se i da je rep-PCR fingerprinting korišćenjem GTG₅ prajmera, efikasna i jednostavna tehnika za diferencijaciju širokog spektra laktobacila iz hrane do nivoa vrste i podvrste. Na osnovu podataka o sekvenciranju i poređenju između profila, bilo je jasno da bi GTG₅ PCR mogao biti metod izbora za dalje istraživanje polimorfizma unutar vrsta BMK iz Pirotške „peglane“ kobasice. Rezultati sekvenciranja izolata iz „peglane“ kobasice ukazali su na postojanje samo dve vrste, *L. sakei* i *L. mesenteroides*. Među laktobacilima, *L. sakei* se pokazao kao vrsta koja je najbolje prilagođena procesu fermentacije, te ne čudi što je pronađen u ovoj vrsti proizvoda od mesa (Papamanoli et al., 2003; Urso et al., 2006). Dominacija *L. sakei* u fermentisanim kobasicama je ustanovljena od strane većeg broja autora (Cocolin et al., 2004; Comi et al., 2005; Bonomo et al., 2008). *Leuconostoc mesenteroides* se u analiziranim kobasicama nalazio u malom procentu. Slaba procentualna zastupljenost *L. mesenteroides* potvrđena je i u ranijim studijama (Comi et al., 2005; Rantsiou et al., 2005; Urso et al., 2006). U Petrovačkoj kobasici, koja je takođe tradicionalno proizveden proizvod, *L. mesenteroides* (37,1%) obuhvata dominantnu mikrofloru laktobacila (Danilović et al., 2011). Generalno, *Leuconostoc* vrste su heterofermentativne i nepoželjne u proizvodima od mesa zbog njihove sposobnosti proizvodnje CO₂ i formiranja rupe u proizvodima (Ammor & Mayo, 2007). S druge strane, proizvode sirćetnu kiselinu, acetaldehid, diacetil i etanol, koji formiraju karakterističan ukus i aromu proizvoda (Lee et al., 2006).

Prema našoj analizi, sadržaj mesa i udeo različitih vrsta mesa, kao i trajanje sušenja, nije značajno uticalo na mikrobni sastav kobasica. Nije bilo korelacije između određene mešavine

mesa u kobasicama i različitim profilima BMK izolata. Rantsiou et al. (2005) testirali su tri vrste kobasica sa različitim količinama i odnosima različitih vrsta mesa, pokazujući da je, uprkos ovim razlikama i razlikama u dužini fermentacije i sušenja, uvek bila prisutna ista vrsta *Lactobacillus* (*L. curvatus* u grčkim kobasicama; *L. sakei* u mađarskim i *L. curvatus* i *L. sakei* u italijanskim kobasicama). Papamanoli et al. (2003) su ukazali da ne postoje značajne razlike u mikrobijalnom sastavu između dva vrste grčkih kobasica, od goveđeg i svinjskog mesa, sa različitim udelom mesa, fermentacijom i trajanjem sušenja. Klaster analiza predstavljena u ranijem istraživanju profila *Laktobacillus* vrsta, pokazala je da su neki sojevi grupisani u klastere koji su specifični za uslove fermentacije, koji se razlikuju na osnovu upotrebljenih sastojaka u toku proizvodnje (Comi et al., 2005). U istoj studiji, *L. sakei* je pokazao viši stepen heterogenosti, što je i potvrđeno sojevima koji nisu ravnomerno grupisani. Rezultati ovog istraživanja su utvrdili prisustvo *Ln. mesenteroides* u 2013. godini što bi moglo biti posledica faktora koje nismo pratili. Jedan od razloga bi mogao biti i godišnja serija ovčijih tankih creva koja se koristila kao prirodni omotač za nadev kobasica i/ili serija začina koji su bili upotrebljeni za sušenje kobasice (beli luk, biber i slatka ili ljuta mlevena paprika).

Osim izrazitog prisustva *Ln. mesenteroides* u uzorcima tokom 2013. godine, naši rezultati ukazuju na to da na distribuciju izolata *L. sakei* ne utiče godina proizvodnje ni na koji način, čime je potvrđena činjenica da se tradicionalno fermentisane kobasice u potpunosti oslanjaju na mikrobijalnu zajednicu životne sredine (Santos et al., 1998). Dakle, razlike se mogu pojaviti kao posledica različitih faktora okoline, kao što su temperatura ili vlažnost, ponekad i ljudski faktor. Meso može doći u kontakt sa mikroorganizmima životne sredine na mnogo različitih načina. Neke bakterije se zadržavaju na životinjskoj koži ili unutar prirodnih omotača koji se koriste tokom procesa pravljenja tradicionalnih kobasica. Takođe, svaki segment proizvodnje baziran je na visokoj mogućnosti kontaminacije bakterijama iz životne sredine, prvenstveno, kontaktom preko opreme i alata (noževi, radne površine), kao i putem odeće i ruku radnika.

Jedan od nedostataka prilikom pripreme piroške „peglane“ kobasice je taj što ne postoji univerzalna receptura za proizvodnju, već svaki proizvođač ima svoju recepturu - odnos i veličina sastojaka se razlikuje od proizvođača do proizvođača. Stoga se mogu očekivati neke razlike u autohtonom mikrobiomu. Prema našim rezultatima iz treće faze na kobasicama istih proizvođača iz inicijalne faze istraživanja, različite vrste mesa, njihovi različiti udeli, kao i vreme sušenja u standardnoj i nestandardnoj recepturi utiču na mikrobiološki sastav piroških kobasica različitih proizvođača. Takođe, priprema tradicionalnih fermentisanih proizvoda, zbog nedostatka precizne standardizacije, može usloviti nastanak neočekivanih problema vezanih za njihovu bezbednost i kvalitet. Studija Ambrosiadis et al. (2004) je ukazala na visoku populaciju *B. thermosphacta* i pseudomonada (slično nekim proizvođačima u našem istraživanju), koje se smatraju nepoželjnom mikroflorom kvarenja uglavnom zbog kontaminacije mesne mešavine. Kao bliži srodnik rodovima *Lactobacillus* i *Listeria*, *B. thermosphacta* može rasti na rashlađenom mesu, niske pH vrednosti i visoke koncentracije soli uz prisustvo kiseonika. *Brochothrix thermosphacta* predstavlja ekonomski važnog kontaminant mesnih proizvoda, koji u anaerobnim uslovima može biti zamenjen *Lactobacillus* vrstama (Gribble & Brightwell, 2013). Ove karakteristike su uočene kod dva proizvođača (PK4 i PK5) uz istovremenu visoku zastupljenost *B. thermosphacta* i *L. sakei* verovatno pod uticajem faktora koji mogu da kontrolišu nivo kiseonika u vakuumskim kobasicama. Visoka zastupljenost *L. sakei* u tradicionalnim kobasicama može lako da inhibira rast patogenih bakterija (Ambrosiadis et al., 2004). Druga istraživanja su, takođe, dokazala da je ova vrsta najprilagođenija u fermentisanim kobasicama (Comi et al., 2005; Hugo & Hugo, 2015). Štaviše, za mađarske i italijanske kobasice, uprkos razlikama u sadržaju mesa, fermentaciji i dužini sušenja, dominantno prisustvo *L. sakei* je uvek bilo potvrđeno (Rantsiou et al., 2005). Nasuprot tome, kod dva proizvođača je utvrđena veća zastupljenost *L. algidus* u kobasicama (uz istovremeno niži sadržaj *B. thermosphacta*), koji predstavlja dominantni uzročnik kvarenja hrane na rashlađenom i upakovanom mesu (Sade et al., 2020). Međutim, prema Mansur et al. (2019) neke specifične populacije *L. algidus* mogu biti korisne za kvalitet mesa i mogu da inhibiraju druge bakterije odgovorne za proizvodnju metabolita povezanih sa kvarenjem. Takođe, informacije o promenama u mikrobiomu mesa i

senzornom kvalitetu mesa izazvanim *L. aligidusom* su oskudne verovatno zbog njegovog slabog rasta na podlozi koja se koristi za uzgoj bakterija koje kvare hranu i potrebna su dodatna istraživanja (Säde et al., 2020). Štaviše, u nekim od naših uzoraka utvrđeno je prisustvo *Photobacterium* spp., za koje je već dokazano da predstavljaju sveprisutne psihrofilne bakterije na svim uobičajenim vrstama mesa uključujući i kobasice (Fuertes-Perez et al., 2019). *Photobacterium* spp. su pronađene su i u kineskim suvosušenim i dimljenim kobasicama, verovatno zbog lošeg higijenskog kvaliteta izazvanog spontanom fermentacijom (Wang et al., 2018). Iako u manjim procentima, neki od taksona otpornih na hladnoću, pronađeni su u dva uzorka (PK1 i PK2) kao što su Enterobacteriaceae, *Serratia* i *Hafnia* koji mogu doprineti kvarenju rashlađenog mesa. Utvrđeno je i prisustvo drugih sveprisutnih bakterija poput *Staphilococcus* i *Weissella* koje se retko prikazuju kao bakterije kvarenja mesa (Bahlinger et al., 2021).

U ispitivanim kobasicama sadržaj miristinske kiseline (C14:0) nije bio veći od 3%, što je u saglasnosti sa podacima iz literature (Rubio et al., 2008). Na osnovu dobijenih rezultata piroška „peglana“ kobasica se ne može smatrati važnim izvorom miristinske kiseline, što je značajno za potrošače iz razloga što se ishrana bogata ovom kiselinom dovodi u vezu sa srčanim problemima (Madruga & Bressan, 2011). Palmitinska kiselina (C16:0) je bila najzastupljenija zasićena masna kiselina i kretala se u intervalu od 21,43 do 27,05. Iz grupe nezasićenih masnih kiselina, najzastupljenija je bila oleinska kiselina (C18:1). Sadržaj oleinske kiseline se kretao u intervalu od 30,50 do 38,07. Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima (Rubio et al., 2008). Oleinska i palmitinska kiselina, za razliku od miristinske, imaju višestruke pozitivne efekte na život i zdravlje ljudi. Odnos ZMK/NZMS kod svih proizvođača se kretao u opsegu preporučenog intervala od 0,4 do 1 (Jiménez-Colmenero, 2007).

Aminokiseline predstavljaju deo proteina i peptida sa važnom ulogom u metabolizmu, u funkcionisanju nervnog, digestivnog i kardiovaskularnog sistema, stvaranju antioksidanasa i drugo (Simon-Sarkadi, 2019). Ukupne vrednosti aminokiselina su iznosile od 509,86 do 846,25. Od kojih su najzastupljenije bile glutaminska kiselina i alanin. Najmanju zastupljenost imale su triptofan, tirozin i arginin. U istraživanju Gallego et al. (2018) ispitivan je aminokiselinski sastav tri tipa fermentisanih kobasica iz Španije, Italije i Belgije. Glutaminska kiselina je bila najzastupljenija aminokiselina u sva tri uzorka. Prilikom poređenja između uzoraka, sadržaj glutaminske kiseline i serina bio je znatno veći u belgijskoj kobasici. S druge strane, aminokiselina arginin nije pronađena u italijanskim i belgijskim uzorcima kobasica.

Dobijene prosečne vrednosti ukupne ocene senzorne analize piroške „peglane“ kobasice su veće od 7,20, što pokazuje da je senzorni kvalitet na visokom nivou. Salgado et al. (2005) i Valencia et al. (2006) su prilikom ocenjivanja senzornih karakteristika fermentisanih kobasica došli do sličnih rezultata.

U drugoj fazi istraživanja smo potvrdili da je proučavanje ekologije fermentisanih kobasica od suštinskog značaja za razumevanje fizičkih i hemijskih promena koje nastaju tokom fermentacije i zrenja. Štaviše, specifična bakteriobiota kobasica je odgovorna za definisanje karakteristika krajnjeg proizvoda. Mikroorganizmi prisutni u početnim fazama procesa zrenja uglavnom potiču iz upotrebljenih sirovina, začina i životne sredine (Comi et al., 2005). Broj bakterija mlečne kiseline na početku procesa fermentacije može značajno da varira. Ovi mikroorganizmi se veoma brzo razmnožavaju i preovlađuju u prvim danima fermentacije. Ovaj broj ostaje stabilan tokom zrenja, uz mogućnost smanjenja stope preživljavanja tokom faze dehidracije (Papamanoli et al., 2003; Comi et al., 2005; Greco et al., 2005). Prisutna mikrobiota doprinosi fermentaciji, posebno tokom sazrevanja kobasica. Raznovrsnost bakterija može se istražiti odgajivačkim i neodgajivačkim metodama. Međutim, neodgajivački pristup NGS sekvenciranjem može se koristiti za precizniju karakterizaciju mikrobijalnog diverziteta kako bi se pokrile složene zajednice i mikroorganizmi sa malom zastupljenošću (Zhang et al., 2021). Ranije studije su konstatovale da većina sekvenci iz suvih fermentisanih kobasica pripada razdelima *Proteobacteria* i *Firmicutes*, koje čine više od 90% ukupne zastupljenosti (Juárez-Castelán et al., 2019; Zhang et al., 2021), što je bio slučaj i u našoj studiji. Dominantni rodovi tokom čitavog procesa zrenja piroške peglane kobasice su bili *Lactobacillus*

(nedavno reklasifikovanim u *Latilactobacillus* (Zheng et al., 2020), *Photobacterium*, *Leuconostoc*, *Weissella*, i *Lactococcus*. U toku zrenja udeo *Lactobacillus* se povećao, dok je zastupljenost *Photobacterium* i *Weissella* opala. Slične nalaze potvrdili su i Wang et al. (2019), gde je *Lactobacillus* porastao do RA od 56% i postao dominantan rod na kraju zrenja, kao i u ovom istraživanju. Nekoliko studija je pokazalo da je ova vrsta najprilagođenija u fermentisanim kobasicama i poznato je da je među najčešćim otkrivenim psihrotrofnim laktobacilima (Comi et al., 2005; Fuka et al., 2020). U govedim proizvodima su se uglavnom nalazili *L. curvatus*, *L. sakei* i *Leuconostoc* spp. (Doulgeraki et al., 2012). *Leuconostoc mesenteroides* je potvrđen u piroškoj peglanoj kobasici različitih proizvođača u našoj studiji (Bogdanović et al., 2019). Uloga koju *Leuconostoc* spp. igra u fermentisanim kobasicama nije detaljno proučavana i njihovo prisustvo je prilično kontroverzno. *Leuconostoc* spp., kao heterofermentativni soj, proizvodi CO₂, koji stvara rupe u mesnim proizvodima, koje se smatraju neželjenim karakteristikama (Ammor & Mayo, 2007). S druge strane, doprinose karakterističnom ukusu i aromi fermentisanih kobasica, zahvaljujući sposobnosti fermentacije citrata i proizvodnji sirćetne kiseline, acetaldehida, diacetila i etanola (Lee et al., 2006). *Leuconostoc* spp. uglavnom nisu prisutne ili su veoma slabo zastupljene u suvim fermentisanim kobasicama (Milicevic et al., 2014) i retko su deo dominantne mikrobiote (Danilović et al., 2011). Zajednica BMK u Ventričini, tradicionalnoj fermentisanoj kobasici iz centralne Italije, sadržala je *L. mesenteroides* i *L. sakei* (kao najzastupljeniju vrstu), kao uobičajenu mikrobiotu u tradicionalnoj kobasici (Tremonte et al., 2017). Rod *Lactococcus* se ne nalazi uvek u suvim fermentisanim kobasicama, međutim, najčešće izolovana vrsta je *Lactococcus lactis* (Danilović et al., 2011). U našem istraživanju, osim *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*, izolovali smo i *Lactococcus garvieae*, što je podržano podacima metabarkodiranja. Pored ovih vrsta, *Lactococcus raffinolactis* je bio dominantan u OTU. Ranije je pokazano da je *L. raffinolactis* dominantan kod tradicionalnih suvih kobasica iz severoistočne Kine. *L. lactis* pokazala je pozitivnu korelaciju sa ukusom i njenim učešćem u formiranju ukusa i arome (Hu et al., 2020). Smanjenje prisustva bakterija iz roda *Lactococcus* tokom fermentacije uzrokovano je njihovom osetljivošću na niže pH vrednosti i veće koncentracije soli (Mangia et al., 2008).

RA potencijalno kvarljivih i štetnih bakterija (osim *Photobacterium*), kao što su *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Brochothrix*, *Psychrobacter*, *Serratia*, *Rahnella*, *Shewanella*, *Escherichia*, *Moraxella*, *Hafnia* pronađeno je u zanemarljivom procentu tokom procesa zrenja. Međutim, neke od njih su izolovane odgajivačkim pristupom, ali samo sa nekoliko izolata. Štaviše, rast ovih bakterija u fermentisanoj kobasici može biti posledica kontaminacije u procesima rukovanja i skladištenja proizvoda (De Filippis et al., 2017). Prema rezultatima NCBI, u našim uzorcima je pronađena samo *B. thermosphacta* kao vrsta, a poznato je da je prirodni zagađivač u hrani i neizbežno se nalazi u fabrikama za preradu mesa. Međutim, *Brochothrix* spp. predstavlja manji problem kod svežeg mesa čije su pH vrednosti 5,3 ili 5,5 i koje se često čuva na nižim temperaturama tokom distribucije (Robinson, 2014). Nasuprot tome, *Photobacterium* spp., koje su dokazano sveprisutne psihrofilne bakterije na svim uobičajenim vrstama mesa uključujući i kobasice (Fuertes-Perez et al., 2019) nađene su u većem RA u našim uzorcima, posebno na početku zrenja. Naša studija je utvrdila prisustvo četiri OTU-a *Photobacterium* (*P. carnosum*, *P. phosphoreum*, *P. iliopiscarium* i *P. piscicola*, pri čemu je prvi bio najprisutniji). Osobine *P. carnosum* ukazuju na dobru adaptaciju na okruženje bogato mesom, kao što je ranije navedeno (Hilgarth et al., 2018). *P. carnosum*, *P. phosphoreum* i *P. iliopiscarium* pronađeni su u pakovanjima ispravnog i pokvarenog mesa u modifikovanoj atmosferi (Hilgarth et al., 2018). Ranije je utvrđeno da vrste *Photobacterium* su prisutne u govedini uskladištenoj na vazduhu ili u vakuumu i da bi mogle biti relevantnije za kvarenje mesa nego što se ranije mislilo (Nieminen et al., 2016). RA svih detektovanih *Photobacterium* se postepeno smanjivao na dva puta manji procenat na kraju zrenja i bio je u pozitivnoj korelaciji sa porastom prisutnosti *Lactobacillus*. Ovo je takođe potvrđeno u studiji Fuertes-Perez et al. (2019), gde je *L. sakei* takođe bila istaknuta vrsta na kraju sazrevanja čoriza španskog tipa. U svakom slučaju, uticaj *Photobacterium* spp. u kvarenju mesa ostaje da se razjasni u daljim studijama. Iako je primećeno postepeno smanjenje prisutnosti *Weissella* vrsta iz familije *Leuconostocaceae* tokom

zrenja, uglavnom u fermentisanim kobasicama, *Lactobacillus* i *Weissella* se smatraju glavnim BMK (Zhang et al., 2021). Naši rezultati su ukazali na postojanje tri vrste *Weissella* (*W. fabalis*, *W. koreensis* i *W. cibaria*). Do sada su *W. cibaria*, *W. paramesenteroides*, *W. hellenica* i *W. viridescens* često detektovani u fermentisanim kobasicama (Fessard et al., 2017), dok je *W. koreensis* detektovana tokom kimči fermentacije (Jeong et al., 2018). Iz turskih suvih kobasica izolovane su *W. viridescens* i *W. confusa* (Adiguzel & Atasever 2009), a prisustvo roda *Weissella* potvrđeno je i u bosanskom sudžuku (Čolo et al., 2015). Prisustvo *W. fabalis* u procesu zrenja kobasica je prvi put uočeno u ovom istraživanju, dok je prethodno izolovana tokom spontane fermentacije kakaa (Snauwaert et al., 2013).

U okviru naše studije, identifikovane su *Carnobacterium divergens* i *Carnobacterium maltaromaticum*. U saglasnosti sa našom studijom je analiza fermentisanih kobasica od mesa divljači u kojima je registrovano prisustvo *Carnobacterium* u malom broju (Maksimovic et al., 2018). Obično se mogu naći u prehrambenim mesnim proizvodima i još uvek nije dokazano da su ljudski patogeni. Vrste roda *Carnobacterium* izazivaju kvarenje hrane, čak i na niskim temperaturama (Doulgeraki et al., 2012). Za *C. divergens* je dokazano da dominira u sirovom mesu bez obzira na uslove pakovanja, dok se za *C. maltaromaticum* pretpostavlja da se njena stvarna uloga u senzornom kvarenju mesa može smatrati zanemarljivom (Casaburi et al., 2011). U sastav mikrobiote zanatske Petrovačke kobasice, koji je sličan načinu proizvodnje i procesu sušenja pirotske „peglana“ kobasice, ulaze i *E. durans* i *E. casseliflavus* (Danilović et al., 2011), koje su takođe izolovane u našim studija. U prethodnoj studiji za *E. casseliflavus*, izolovanu iz italijanskih kobasica, potvrđena je proizvodnja antilisterijskog bakteriocina enterocina 416K1 (Sabia et al., 2002). Naša studija je takođe potvrdila prisustvo dve vrste iz roda *Hafnia* (*H. alvei* i *H. paralvei*). Komensal *H. alvei* se koristi za fermentaciju u mlečnoj industriji, a odnedavno i kao probiotik u proizvodnji dijetetskih suplemenata (Legrand et al., 2020). Takođe su izolovni i predstavnici *Moraxella osloensis*, *Citrobacter murlinae*, *Macrococcus canis*, *Macrococcus caseolyticus*, *Marichromatium purpuratum*, *Serratia proteamaculans*, *Pantoea agglomerans/Enterobacter ludwigii/Enterobacter cloacae*, *Shigella sonnei*, i *Kocuria kristinae*. Sve navedene bakterije su kategorisane kao patogene ili neželjene bakterije i pretpostavlja se da se pojavljuju usled loših higijenskih uslova skladištenja. Međutim, za neke od njih, kao što su *S. proteamaculans*, *H. alvei*, *H. paralvei* i *Citrobacter* sp., potvrđeno je da mogu da prevladavaju u svinjskom, goveđem i mesu divljači tokom prvih sedam dana fermentacije (Charmpi et al., 2020). Zanimljivo je da je za *M. purpuratum* pokazano da je normalan deo prirodnih omotača dobijenih iz dela svinjskog creva (Rebecchi et al., 2015). Na kraju, *Pectobacterium wasabiae* iz familije *Enterobacteriaceae*, je biljni patogen (Kim et al., 2009), nije registrovana ni u jednoj sličnoj studiji procesa zrenja kobasica.

U radu Simeunović et al. (2019) opisane su hemijske promene pirotske „peglane“ kobasice u toku perioda zrenja. Primećeno je značajno linearno smanjenje pH vrednosti što je u saglasnosti sa literaturnim podacima vezanim za tradicionalno pripremane kobasice (Lorenzo et al., 2000; Kovačević et al., 2016). Tokom fermentacije Petrovačke kobasice, takođe je uočen pad pH vrednosti, dok je nakon dva dana fermentacije zabeležen nagli rast ukupnog broja mezofilnih bakterija i broja BMK (Danilović et al. 2011). Smanjenje pH vrednosti se objašnjava delovanjem bakterija koje vrše konverziju šećera u mlečnu kiselinu (Leite et al., 2015). Iako se u tradicionalnoj proizvodnji kobasica ne dodaju šećeri, oni se u određenoj koncentraciji nalaze u drugim sastojcima. Tako na primer, začinska paprika sadrži 9,6–13,2% šećera koje mikroflora kobasice fermentiše za vreme prve faze zrenja do mlečne kiseline (Vuković et al., 2012). Na kraju zrenja Petrovačke kobasice uočen je porast pH vrednosti koji su prijavili i drugi autori (Casiraghi et al., 1996; Savić et al., 2001; Gasparik-Reichardt et al., 2005). Salgado et al. (2005) navode da porast vrednosti pH u odnosu na najnižu postignutu vrednost tokom procesa fermentacije označava završetak procesa fermentacije i početak proteolitičkih i lipolitičkih procesa, odnosno početak procesa zrenja. Prosečna pH vrednost u finalnom proizvodu od 5,3 prema Vuković et al. (2012) značajna je za otpuštanje vlage (sušenje), održivost i formiranje boje, konzistencije i arome tradicionalno fermentisane kobasice.

Rezultati naših ispitivanja aktivnosti vode pirotske peglane kobasice posle zrenja od 28 dana, pri temperaturi koja varira od 0°C do 5°C, imali su trend smanjenja vrednosti. Pri a_w -vrednosti

manjoj od 0,95 ne mogu da se razmnožavaju patogene bakterije. Na osnovu toga možemo zaključiti da pirotska „peglana“ kobasica postaje bakteriološki stabilan proizvod još u toku zrenja, pa je i njihovo čuvanje moguće na temperaturama ambijenta (Vesković-Moračanin et al., 2011). Sniženje vrednosti aktivnosti vode sa 0,96 (sirovi nadev) na 0,84 (nakon 28 dana proizvodnje) uglavnom je posledica sušenja, odnosno smanjenja sadržaja vlage sa početnih 74,72% na krajnjih 40,32%. Prosečan početni udeo vlage je veći od podataka zabeleženih u literaturi (Herrero et al., 2007), ali je identičan u poređenju sa Lemeškim kulenom (Vuković et al., 2012). Ovo se može objasniti time, što se za spravljanje pirotske „peglane“ kobasice koristi isključivo meso, bez dodatka masti. Takođe, udeo vlage u našem radu je opadao brže tokom zrenja u odnosu na kobasice koje su u sebi sadržale svinjsku mast (Lorenzo et al., 2000; Herrero et al., 2007). Jedan od razloga brzog gubitka vlage je peglanje kobasica staklenom flašom, zbog čega je odnos površine i zapremine povoljan za isparavanje vode. Prema Fanco et al. (2002) smanjenje vlage tokom zrenja dovodi do povećanja sadržaja masti i proteina, što potkrepljuju rezultati našeg istraživanja. Sadržaj proteina u pirotskoj peglanoj kobasici je znatno viši u odnosu na ostale kobasice koje se u Srbiji proizvode tradicionalno (Ikonić et al., 2010; Saccani et al. 2013). Sadržaj proteina bio je veći i u odnosu na kobasice spravljene od konjskog mesa iako konjsko meso sadrži veću količinu proteina u poređenju sa govedinom (Markov et al., 2010). Početna prosečna vrednost sadržaja proteina je bliska onoj izmerenoj u Petrovačkoj kobasici (Ikonić et al., 2010). Prosečan početni sadržaj masti (1,22%) u kobasicama bio je znatno niži u odnosu na petrovačku i sremsku kobasicu (Ikonić et al., 2010; Saccani et al., 2013). Sadržaj masti u finalnim proizvodima je bio manji u odnosu na sadržaj masti zabeležen za sremsku kobasicu, kobasicu spravljenu od konjskog mesa ili neke tradicionalne španske kobasice (Tojagić, 1997; Lorenzo et al., 2000; Salgado et al., 2005; Markov et al., 2010). Nizak sadržaj masti se objašnjava upotrebom govedine i kozijeg mesa, bez dodatka masti.

Kod tradicionalnih fermentisanih kobasica proizvedenih bez dodatka nitrata i nitritne soli, proces formiranja boje je složen. Dodatak crvene začinske paprike može doprineti razvoju boje. Na vrednost L^* , a^* i b^* kobasica utiču nivo masti, temperatura i vreme zrenja i interakcija temperature i vremena zrenja. Visoka temperatura zrenja i nizak sadržaj masti dovode do boljeg razvoja boje (Soyer et al., 2005). Analiza svetlosti boje pirotske peglane kobasice (L^*) pokazala je smanjenje vrednosti, što je slučaj i kod španske fermentisane kobasice „Galicijski čorizo“ i Petrovačke kobasice (Fernández-Fernández et al., 1998; Škaljac et al., 2019). Škaljac et al., (2019) objašnjava opadanje vrednosti svetloće boje (L^*) na početku procesa, uticajem samog procesa dimljenja, zbog taloženja komponenti dima na površinu omotača koja na taj način postaje tamnija, što kod nas nije slučaj. Bozkut & Bairam (2006), takođe, navode da je smanjenje L^* vrednosti povezano sa formiranjem tamne boje kobasice. Tokom procesa sušenja dolazi do daljeg smanjenja vrednosti svetloće boje (L^*) sa smanjenjem sadržaja vlage. Pérez-Alvarez et al. (1999a) zaključili da gubitak vlage utiče na smanjenje vrednosti L^* , prethodno iskazane tokom procesa zrenja. Rosmini et al. (2005) su dokazali da dodavanje kuhinjske soli i paprike u model sistem fermentisanih sušenih kobasica utiče na smanjenje L^* vrednosti, dok dodavanje vode utiče na povećanje. Smanjenje L^* vrednosti tokom zrenja uočeno je i pri merenju boje poprečnog preseka i kod kobasice sa skinutim omotačem. Pérez-Alvarez et al. (1999a) su smanjenje vrednosti svetloće boje (L^*) na preseku fermentisanih kobasica tokom procesa sušenja doveli, takođe, u korelaciju sa smanjenjem vlage. Slično, crvena boja (a^*) pirotske peglane kobasice opada tokom procesa sušenja, što je u saglasnosti sa ranijim istraživanjima (Fernández-Fernández et al., 1998; Škaljac et al., 2019). Delimična ili potpuna denaturacija nitrozilmioglobina usled stvaranja mlečne kiseline i smanjenje sadržaja vode u proizvodu na početku procesa fermentacije bili su razlog za smanjenje a^* vrednosti (Perez-Alvarez et al., 1999; Bozkut & Bayram, 2006).

Tokom procesa sušenja pirotske peglane kobasice vrednosti udela žute boje (b^*) na površini i preseku kobasica su uglavnom opadale. Nadalje, dobijeni rezultati sa smanjeni udelom žute boje (b^*) u pirotskoj „peglanoj“ kobasici objašnjavaju se potrošnjom O_2 od strane mikroorganizama, što dalje dovodi do smanjenja oksimioglobina koji pogoduje razvoju žute boje (Bozkut & Bayram, 2006). Konverzija boje kobasica na višim temperaturama je brža u poređenju sa nižim temperaturama, što

je najuočljivije kada se promeni vrednost b^* (Soyer et al., 2005). Papadima & Blukas (1999) su potvrdili da nivo masti i vreme skladištenja značajno utiču na L^* , a^* i b^* vrednosti grčkih kobasica, dok je sadržaj masti proporcionalan povećanju L^* vrednosti. Na veći deo žute boje utiče i manji sadržaj NaCl i niže vrednosti pH (Gimeno et al., 2001).

Tekstura fermentisanih kobasica je senzorno svojstvo koje se formira tokom zrenja zbog procesa koji dovode do stvaranja čvršće konzistencije i procesa proteolize koji dovodi do omekšavanja i boljeg žvakanja proizvoda. Tokom zrenja formira se kompaktnost punjenja, odnosno čvrsta konzistencija kobasica. U našem istraživanju došlo je do povećanja čvrstoće i žilavosti tokom zrenja, što je bilo slično rezultatima dobijenim za neke druge proizvode (Saccani et al., 2013). Ispitivanjem teksture suve italijanske salame tokom 55 dana sušenja i zrenja uočena je znatno manja sila probijanja u odnosu na naše istraživanje (Severini et al., 2003). Uočeno je da je rast merenih vrednosti tekstura kod kobasica sa dužim zrenjem sporije, dok je kod kobasica sa kraćim zrenjem, brži (Gonzalez-Fernandez et al., 2006; Spaziani et al., 2009). Smanjenje masti u suvim fermentisanim kobasicama značajno je uticalo na teksturu kobasice. Značajno povećanje tvrdoće usled smanjenja masti primećeno je samo pri dužim vremenima zrenja usled gubitka sadržaja vlage.

Vrlo specifična metoda proizvodnje čini pirotsku „peglanu“ kobasicu jedinstvenim proizvodom, a ova studija mikrobiote je prvi rezultat zasnovan na integrativnim metodama koje uključuju bakterijsku zajednicu u kombinaciji sa fizičko-hemijskim parametrima i tehnološkim karakteristikama. Sinergija podataka dobijenih korišćenjem i tradicionalnih i NGS metoda omogućava najtačniju bakterijsku identifikaciju i pruža mogućnost i osnovu za proučavanje i drugih proizvoda koji imaju za cilj da dobiju uz zaštićeno geografsko poreklo Srbije i sastav svoje mikrobiote.

ZAKLJUČCI

6. ZAKLJUČCI

1. Rezultati dobijeni na osnovu morfoloških i biohemijskih analiza pokazuju da su svi bakterijski izolati iz pirotskih kobasica pripadali Gram-pozitivnim bakterijama. Biohemijskim testovima je potvrđeno da nijedan izolat ne vrši produkciju gasa, niti ima sposobnost hidrolize arginina i eskulina. Takođe, nijedan od izolata nije rastao na 45 °C, dok je rast na 15 °C uz dodatak 4, 6.5 i 8% NaCl pokazan za većinu izolata.
2. Na osnovu dobijenih rezultata pokazano je da GTG₅ prajmer daje profile najveće kompleksnosti i pokazuje najveći potencijal za razlikovanje izolata, izdvojivši 41 izolat od ukupno 77 testiranih iz 2014. godine, na osnovu čega je ova metoda postala izbor u daljem istraživanju.
3. Većina izolata (76%) je bila grupisana zajedno sa referentnim sojem *L. sakei* NBRC 15893, dok su ostali izolati (24%) bili grupisani sa referentnim sojem *Ln. mesenteroides* ATCC 8293. Svi dobijeni izolati koji su pripadali prvom i šestom proizvođaču identifikovani su kao *L. sakei*, iako su bili raspoređeni u šest različitih klastera na osnovu GTG₅. U kobasicama proizvođača 2 dominantni izolati su identifikovani kao *Ln. mesenteroides*, a u kobasicama proizvođača 3, 4 i 5, kao *L. sakei*.
4. Neodgajivačkim pristupom utvrđena je dominacija predstavnika iz razdela *Proteobacteria* i *Firmicutes* u svim proučavanim uzorcima. Tokom procesa zrenja uočen je trend povećanja zastupljenosti predstavnika *Firmicutes* (sa 33,5% na 63,5%) i smanjenje udela *Proteobacteria* (sa 65,4% na 22,3%). Bakterijski rodovi koji su dominirali tokom procesa zrenja su bili: *Lactobacillus*, *Photobacterium*, *Leuconostoc*, *Weissella* i *Lactococcus*, dok su detektovani i *Carnobacterium*, *Brochothrix* i *Acinetobacter*.
5. Analiza izolata različitih proizvođača sa istim sastavom, ali različitim udelom upotrebljenih vrsta mesa za proizvodnju kobasice, je potvrdila da su bakterijske zajednice drugog i petog proizvođača, kao i četvrtog i šestog međusobno slične. U uzorcima PK1 i PK2 pokazano je najveće bogatstvo bakterijskih vrsta. Predstavnici razdela *Firmicutes* su bili dominantni u uzorcima PK3, PK4, PK5 i PK6, dok su predstavnici *Proteobacteria* bili najzastupljeniji u uzorcima PK1 i PK2.
6. Dinamika promene pH vrednosti i a_w tokom zrenja, u potpunosti je odgovarala načinu pripreme i tipu proizvoda. Najniže pH vrednosti a_w bile su karakteristične za 28. dan zrenja i iznosile su 5,30, odnosno 0,84.
7. Dinamika promene u sadržaju vlage, sadržaju masti i sadržaju proteina, je u potpunosti odgovarala načinu pripreme i tipu proizvoda. Najniža prosečna vrednost vlage zabeležena je 28. dana zrenja i iznosila je 40%. Prosečan početni sadržaj masti u kobasicama bio je niži i u skladu sa sadržajem proteina. Smanjenje vlage tokom zrenja značajno je doprinelo povećanju sadržaja masti (6 puta više) i proteina (2,5 puta više) sa maksimalnim vrednostima izmerenim 28. dana.

8. Tokom zrenja piroške peglane kobasice menjali su se instrumentalni parametri boje (L^* , a^* , b^*). Početna L^* vrednost boje površine kobasice sa omotačem je značajno smanjena do kraja merenja, dok je a^* vrednost smanjena skoro dvostruko. Vrednosti L^* i a^* su značajno smanjene tokom zrenja i u uzorcima poprečnog preseka i kobasice bez omotača. Razlika u boji bila je najuočljivija za vrednosti b^* sa negativnim rezultatom na kraju procesa zrenja za boju površine kobasice sa i bez omotača. Parametri instrumentalne teksture ukazuju na trend značajnog postepenog povećanja čvrstoće i žilavosti tokom zrenja.
9. Različite recepture i različito vreme zrenja piroške “peglane” kobasice nisu imale značajan uticaj na profil masnih kiselina, tako da je najzastupljenija zasićena masna kiselina bila palmitinska kiselina, dok je od nezasićenih najzastupljenija bila oleinska kiselina. Odnos ZMK/NZMS kod svih proizvođača je bio u opsegu preporučenog intervala od 0,4–1.
10. Različite recepture i različito vreme zrenja piroške “peglane” kobasice imale su značajan uticaj na instrumentalne parametre boje. Uticaj se ogledao kako na boje spoljašnje površine kobasica, tako i na boje poprečnog preseka kobasica. Kod svih ispitivanih parametara teksture utvrđeno je da postoje statistički značajne razlike u odnosu na različite recepture. Različiti udeli upotrebljenog mesa prouzrokovali su značajne razlike u pogledu senzornih karakteristika.

LITERATURA

7. LITERATURA

- Abdollahniyal, D., Hosseini, S.M., Baghbaderani, B.K., Mordadi, A., Arabestani, M.R. (2018). Identification of Lactobacillus Species Isolated From Traditional Dairy Products Using RAPD-PCR. Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection. 5(2), pp. 7-13.
- Adiguzel, G.C., Atasever, M. (2009). Phenotypic and Genotypic Characterization of lactic acid bacteria isolated from Turkish dry fermented sausage. Romanian Biotechnological Letters, 14 (1), pp. 4130-4138.
- Albano, H., van Reenen, C.A., Todorov, S.D., Cruz, D., Fraga, L., Hogg, T., Dicks, L., Teixeira, P. (2009). Phenotypic and genetic heterogeneity of lactic acid bacteria isolated from “Alheira”, a traditional fermented sausage produced in Portugal, Meat Science, 82, pp. 389–398. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.02.009>
- Ambrosiadis, J., Soultos, N., Abraham, A., Bloukas, J.G. (2004). Physicochemical, microbiological and sensory attributes for the characterization of Greek traditional sausages. Meat Science, 66(2), pp. 279-287. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(03\)00100-1](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(03)00100-1)
- Ammor, M.S., Mayo B. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. Meat Science, 76, pp. 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.10.022>
- Ammor, S., Rachman, C., Chaillou, S., Prevost, H., Dousset, X., Zagorec, M., Dufour, E., Chevallier, I. (2005). Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from a small-scale facility producing traditional dry sausages. Food Microbiology, 22, pp. 373–382. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.11.005>
- Anastasiadou, S., Papagianni, M., Filiou, G., Ambrosiadis, I., Koidis, P. (2008). Growth and metabolism of a meat isolated strain of *Pediococcus pentosaceus* in submerged fermentation: Purification, characterization and properties of the produced pediocin SM-1, Enzyme and Microbial Technology, 43, pp. 448–454. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2008.05.007>
- Andersen, S.J. (1995). Compositional changes in surface mycoflora during ripening of naturally fermented sausages. J Food Prot 58, pp. 426–429. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-58.4.426>
- Andrighetto, C., Zampese, L., Lombardi, A. (2001). RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meat plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). Letters in Applied Microbiology, 33, pp. 26-30. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2001.00939.x>
- Aquilanti, L., Garofalo, C., Osimani, A., Clementi, F. (2016). Ecology of lactic acid bacteria and coagulase negative cocci in fermented dry sausages manufactured in Italy and other Mediterranean countries: an overview. International Food Research Journal, 23(2), pp. 429-445.
- Aro Aro, J.M., Nyam-Osor, P., Tsuji, K., Shimada, K., Fukushima, M., Sekikawa, M. (2010). The effect of starter cultures on proteolytic changes and amino acid content in fermented sausages, Food Chem., 119, pp. 279–285.
- Aymerich, T., Martin, B., Garriga, M., Hugas, M. (2003). Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid

sausages. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (8), 4583-94. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.4583-4594.2003>

Babić, Lj., Babić, M. (2000). Sušenje i skladištenje, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Bahlinger, E., Dorn-In, S., Beindorf, P.M., Mang, S., Kaltner, F., Gottschalk, C., Gareis, M., Schwaiger, K. (2021). Development of two specific multiplex qPCRs to determine amounts of *Pseudomonas*, Enterobacteriaceae, *Brochothrix thermosphacta* and *Staphylococcus* in meat and heat-treated meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 337, p.108932. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108932>

Baldini, P., Cantoni, E., Colla, F., Diaferia, C., Gabba, L., Spotti, E., Marchelli, R., Dossena, A., Virgili, E., Sforza, S., Tenca, P., Mangia, A., Jordano, R., Lopez, M.C., Medina, L., Coudurier, S., Oddou, S., Solignat G. (2000). Dry sausages ripening: Influence of thermohygro-metric conditions on microbiological, chemical and physico-chemical characteristics. *Food Research International*, 33, pp. 161–170. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00030-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00030-2)

Barbieri, F., Tabanelli, G., Montanari, C., Dall’Osso, N., Šimat, V., Smole Možina, S., Baños, A., Özogul, F., Bassi, D., Fontana, C. (2021). Mediterranean spontaneously fermented sausages: Spotlight on microbiological and quality features to exploit their bacterial biodiversity. *Foods*, 10, 2691. <https://doi.org/10.3390/foods10112691>.

Bardakci F. (2001). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Turkish Journal of Biology*, 25, pp. 185–196. <https://journals.tubitak.gov.tr/biology/vol25/iss2/10>

Belleggia, L., Ferrocino, I., Reale, A., Boscaino, F., Di Renzo, T., Corvaglia, M.R., Cocolin, L., Milanovic, V., Cardinali, F., Garofalo, C. (2020). Portuguese cacholeira blood sausage: A first taste of its microbiota and volatile organic compounds. *Food Research International*, 136, p. 109567. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109567>

Berdagué, J.L., Monteil, P., Montel, M.C., Talon, R. (1993). Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausage. *Meat Science*, 35, pp. 275-287. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(93\)90033-E](https://doi.org/10.1016/0309-1740(93)90033-E)

Bigot, C., Meile, J-C., Remize, F., & Strub, C. (2015). Applications of Metagenomics to Fermented 789 Foods. In D. Monet & R.C. Ray (Eds.), *Fermented Foods, Part I, Biochemistry and Biotechnology*, pp. 333 – 346, CRC Press

Blaiotta, G., Casaburi, A., Villani, F. (2005). Identification and differentiation of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* by species-specific PCR assays of *sodA* genes. *Systematic and Applied Microbiology*, 28 (6), pp. 519-526. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.03.007>

Bogdanović, S., Jelušić, A., Berić, T., Nikolić, I., Danilović, B., Stanković, S., Dimkić, I. (2019). Genetic polymorphism of lactic acid bacteria isolated from “Pirót ‘ironed’ sausage” from Serbia. *Archives of Biological Sciences*, 71(1), pp. 95-102. <https://doi.org/10.2298/ABS180920051B>

Bonomo, M.G., Ricciardi, A., Zotta, T., Parente, E., Salzano, G. (2008). Molecular and technological characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy). *Meat Science*, 80 (4), pp. 1238-1248. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.05.032>

Botsoglou, N.A., Fletouris, D.J., Papageorgiou, G.E., Vassilopoulos, V. N., Mantis, A.J., Trakatelliss, A.G. (1994). Rapid, Sensitive, and Specific Thiobarbituric Acid Method for Measuring Lipid

Peroxidation in Animal Tissue, Food, and Feedstuff Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (9), pp. 1931-1937.

Bozkurt H., Bayram M. (2006). Colour and textural attributes of sucuk during ripening. *Meat Science*, 73 (2), pp. 344–350. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.01.001>

Braïek, O.B., Smaoui, S. (2019). Enterococci: Between Emerging Pathogens and Potential Probiotics. *BioMed Research International*, ID 5938210 <https://doi.org/10.1155/2019/5938210>

Bredholt, S., Nesbakken, T., Holck, A. (2001). Industrial application of an antilisterial strain of *Lactobacillus sakei* as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum-packaged meats. *Int J Food Microbiol* 66, pp. 191– 196. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00519-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00519-5)

Bushnell, B., Rood, J., Singer, E. (2017). BBMerge—accurate paired shotgun read merging via overlap. *PloS One*, 12(10), e0185056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185056>

Callahan, J.B., McMurdie, P.J., Rosen, M.J., Han, A.W., Johnson, A.J.A., Holmes, S.P. (2016). DADA2: High resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7), pp. 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

Carminati, D., Tidona, F., Fornasari, M.E., Rossetti, L., Meucci, A., Giraffa, G. (2014). Biotyping of cultivable lactic acid bacteria isolated from donkey milk. *Letters in Applied Microbiology*, 59, pp. 299-305. <https://doi.org/10.1111/lam.12275>

Casaburi, A., Nasi, A., Ferrocino, I., Di Monaco, R., Mauriello, G., Villani, F., Ercolini, D. (2011). Spoilage-related activity of Carnobacterium maltaromaticum strains in air-stored and vacuum-packed meat. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, pp. 7382–7393. <https://doi.org/10.1128/AEM.05304-11>

Casiraghi, E., Pompei, C., Dellaglio, S., Parolari, G., Virgili, R. (1996). Quality attributes of Milano salami, an Italian dry-cured sausage. *J. Agric. Food Chem.*, 44, pp. 1248– 1252. <https://doi.org/10.1021/jf950496h>

Charmpi, C., Van Reckem, E., Sameli, N., Van der Veken, D., De Vuyst, L., Leroy, F. (2020). The use of less conventional meats or meat with high pH can lead to the growth of undesirable microorganisms during natural meat fermentation. *Foods*, 9(10), 1386. <https://doi.org/10.3390/foods9101386>

Cocolin, L., Dolci P., Rantsiou K. (2008). Meat Biotechnology. In Fidel Toldrá (Edt.), *Meat Biotechnology*. Springer-Verlag, pp. 91–127. https://doi.org/10.1007/978-0-387-79382-5_4

Cocolin, L., Dolci, P., Rantsiou, K. (2011). Biodiversity and dynamics of meat fermentations: The contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem. *Meat Science*, 89, pp. 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.011>

Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Urso, R., Cantoni, C., Comi, G. (2004). Study of the Ecology of Fresh Sausages and Characterization of Populations of Lactic Acid Bacteria by Molecular Methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (4), 1883-1894. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.1883-1894.2004>

Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G. (2001). Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population

during fermentation of Italian sausages. *Applied Environmental Microbiology*, 67 (11), pp. 5113-5121. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5113-5121.2001>

Collins, M. D., Samelis, J., Metaxopoulos, J., Wallbanks, S. (1993). Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, pp. 595–603. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb01600.x>

Comi, G., Urso, R., Iacumin, L., Rantsiou, K., Cattaneo, P., Cantoni, C., Cocolin, L. (2005). Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. *Meat Science*, 69, pp. 381-392. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.08.007>

Cotter, P.D., Hill, C. (2003). Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67 (3), pp. 429–453. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.3.429-453.2003>

Čolo, J., Mihajlović, S., Tolinački, M., Alkić, M., Popović, D., Kojić, M., Terzić-Vidojević, A. (2015). Characterization of lactic acid bacteria isolated from bosnian artisanal dry fermented sausage (sudžuk) during fermentation. *Genetika*, 47 (3), pp. 819-832. <https://doi.org/10.2298/GENSR1503819C>

Danilović, B., Joković, B., Petrović, Lj., Veljović, K., Tolinački, M., Savić, D. (2011). The characterization of lactic acid bacteria during the fermentation of an artisan Serbian sausage (Petrovska Klobasa). *Meat Science*, 88, pp. 668-674. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.02.026>

De Filippis, F., Parente, E., Ercolini, D. (2017). Metagenomics insights into food fermentations. *Microbial biotechnology*, 10(1), pp. 91-102. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12421>

De Huidobro, F.R., Miguel, E., Blázquez, B., Onega, E. (2005). A comparison between two methods (Warner–Bratzler and texture profile analysis) for testing either raw meat or cooked meat. *Meat Science*, 69 (3), pp. 527–536. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.09.008>

De Urazza, P.J., Gomez-Zavaglia, A., Lozano, M.E., Ramanowski, V., De Antoni, G. (2000). DNA finferprinting of thermophilic lactic acid bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Journal of Dairy Research*, 67 (63), pp. 381-392. <https://doi.org/10.1017/S002202990000426X>

De Vuyst, L., Camu, N., De Winter, T., Vandemeulebroecke, K., Van de Perre, V., Vancanneyt, M., De Vos, P., Cleenwerck, I. (2008). Validation of the (GTG)₅-rep-PCR fingerprinting technique for rapid classification and identification of acetic acid bacteria, with a focus on isolates from Ghanaian fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 125, pp. 79-90. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.030>

Denis, C., Gueguen, M., Henry, E., Levert, D., 2001. New media for the numeration of cheese surface bacteria. *Le Lait* 81, 365–379. <https://doi.org/10.1051/lait:2001138>

Di Cagno, R., Cháves López, C., Tofalo, R., Gallo, G., De Angelis, M., Paparella, A., Hammes, W., Gobbetti, M. (2008). Comparison of the compositional, microbiological, biochemical and volatile profile characteristics of three Italian PDO fermented sausages. *Meat Science*, 79, 224-235. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.09.006>

Dillon, V.M., Board, R.G. (1991). Yeasts associated with red meats. *Journal of Applied Bacteriology*, 71(2), pp. 93-108. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb02962.x>

- Doulgeraki, A.I., Ercolini, D., Villani, F., Nychas, G.J.E. (2012). Spoilage microbiota associated to the storage of raw meat in different conditions. *International journal of food microbiology* 157(2), pp. 130-141. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.020>
- Fanco, I., Prieto, B., Cruz, J.M., Lopez, M., Carballo, J. (2002). Study of the biochemical changes during processing of Androlla, a Spanish drycured pork sausage. *Food Chemistry*, 78, pp. 339-345. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00118-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00118-8)
- Feiner, G. (2006). 12 - Cooked sausages. In: *Feiner, G. (Ed.), Meat Products Handbook, Practical science and technology, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK, pp. 239-286.* <https://doi.org/10.1533/9781845691721.2.239>
- Fernández-Fernández, E., Vázquez-Odériz, M.L., Romero-Rodríguez, M.A. (1998). Colour changes during manufacture of Galician chorizo sausage. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A*, 207, pp. 18–21.
- Fessard, A., Remize, F. (2017). Why are *Weissella* spp. not used as commercial starter cultures for food fermentation?. *Fermentation*, 3(3), 38. <https://doi.org/10.3390/fermentation3030038>
- Folch, J., Lees, M. B., Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissue. *Journal of Biological Chemistry*, 226 (1), pp. 497-509. <http://www.jbc.org/content/226/1/497.short>
- Fontana, C., Bassi, D., López, C., Pisacane, V., Otero, M.C., Puglisi, E., Rebecchi, A. Cocconcelli, P.S., Vignolo, G. (2016). Microbial ecology involved in the ripening of naturally fermented llama meat sausages. A focus on lactobacilli diversity. *International Journal of Food Microbiology*, 236, pp. 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.002>
- Fontana, C., Cocconcelli, P.S., Vignolo, G., (2005). Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages, *International Journal of Food Microbiology*, 103, pp. 131-142. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.11.046>
- Foulquie Moreno, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. (2006). The role and application of enterococci in food and health, *International Journal of Food Microbiology*, 106, pp. 1–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.026>
- Franciosa, I., Alessandria, V., Dolci, P., Rantsiou, K., Cocolin, L. (2018). Sausage fermentation and starter cultures in the era of molecular biology methods. *International journal of food microbiology*, 279, pp. 26-32. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.038>
- Fuertes-Perez, S., Hauschild, P., Hilgarth, M., Vogel, R.F. (2019). Biodiversity of *Photobacterium* spp. isolated from meats. *Frontiers in Microbiology*, 10, p.2399. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02399>
- Fuka, M.M., Tanuwidjaja, I., Maksimovic, A.Z., Zunabovic-Pichler, M., Kublik, S., Hulak, N., Domig, K.J., Schloter, M. (2020). Bacterial diversity of naturally fermented game meat sausages: Sources of new starter cultures. *Lwt* 118, p.108782. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108782>
- Fusco, V., Quero, G.M., Cho, G-S., Kabisch, J., Meske, D., Neve, H., Bockelmann, W., Franz, CMAP. (2015). The genus *Weissella*: taxonomy, ecology and biotechnological potential. *Frontiers in Microbiology*, 6, 155. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00155>

- Galanis, A., Kourkoutas, Y., Tassou, C.C., Chorianopoulos, N. (2015). Detection and Identification of Probiotic *Lactobacillus plantarum* Strains by Multiplex PCR Using RAPD-Derived Primers. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), pp. 25141-25153. <https://doi.org/10.3390/ijms161025141>
- Gallego, M., Mora, L., Escudero, E., Toldrá, F. (2018). Bioactive peptides and free amino acids profiles in different types of European dry-fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 276, pp. 71-78. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.009>
- García, M.L., Dominguez, R., Galvez, M.D., Casas, C., Selgas, M.D. (2002). Utilization of cereal and fruit fibres in low fat dry fermented sausages. *Meat Science*, 60, pp. 227–236. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(01\)00125-5](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(01)00125-5)
- Gasparik-Reichardt, J., Tóth, S., Cocolin, L., Comi, G., Drosinos, E., Cvrtila, Z., Kozačinski, L., Smajlović, A., Saičić, S., Borović, B. (2005). Technological, physicochemical and microbiological characteristics of traditionally fermented sausages in Mediterranean and central European countries. *Meat Technology*, 46, pp. 143-153.
- Gevers, D., Huys G., Swings J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, 205 (1), pp. 31-36. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10921.x>
- Gimeno, O., Astiasaran, I., Bello, J. (2001). Calcium ascorbate as a potential partial substitute NaCl in dry fermented sausages: effect on colour, texture and hygiene quality at different concentrations. *Meat Science*, 57, pp. 23-29. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00070-X](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00070-X)
- González-Fernández, C., Santos, E.M., Rovira, J., Jaime, I. (2006). The effect of sugar concentration and starter culture on instrumental and sensory textural properties of *chorizo*-Spanish dry-cured sausage. *Meat Science*, 74 (3), pp. 467-475. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.04.019>
- Greco, M., Mazzette, R., De Santis, E.P.L., Corona, A., Cosseddu, A.M. (2005). Evolution and identification of lactic acid bacteria isolated during the ripening of Sardinian sausages. *Meat Science*, 69, pp. 733-739. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.11.004>
- Greppi, A., Ferrocino, I., La Stora, A., Rantsiou, K., Ercolini, D., Cocolin, L. (2015). Monitoring of the microbiota of fermented sausages by culture independent rRNA-based approaches. *International Journal of Food Microbiology*, 212(6), pp. 67-75. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.016>
- Gribble, A., Brightwell, G. (2013). Spoilage characteristics of *Brochothrix thermosphacta* and *campestris* in chilled vacuum packaged lamb, and their detection and identification by real time PCR. *Meat Science*, 94(3), pp. 361-368. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.03.016>
- Haakensen, M., Vickers, D.M., Ziola, B. (2009). Susceptibility of *Pediococcus* isolates to antimicrobial compounds in relation to hop-resistance and beer-spoilage. *BMC Microbiology*, 9, 190. <https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-9-190>
- Hammes, W., D. Haller and M. Gänzle, 2008. Fermented Meat. In: E. Farnworth (Editor), *Handbook of fermented functional foods*. CRC Press, pp. 291-321.
- Hammes, W.P., Knauf, H.J. (1994). Starters in the processing of meat products. *Meat Science*, 36 (1–2), pp. 155-168. [https://doi.org/10.1016/0309-1740\(94\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0309-1740(94)90039-6)

- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S., Clardy, J. Goodman, R. M. (1998). Molecular biology provides access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*, 5 (10), R245-R249. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(98\)90108-9](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(98)90108-9)
- Heinz, G., Hautzinger, P. (2007). *Meat Processing Technology for Small to Medium Scale Producers*. RAP Publication 2007/20. FAO, Bangkok.
- Herrero, A.M., Ordóñez, J.A., de Avila, R., Herranz, B., de la Hoz, L., Cambero, M.I. (2007). Breaking strength of dry fermented sausages and their correlation with texture profile analysis (TPA) and physico-chemical characteristics. *Meat Science*, 77, pp. 331– 338. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.03.022>
- Hilgarth, M., Fuertes, S., Ehrmann, M., Vogel, R.F. (2018). *Photobacterium carnosum* sp. nov., isolated from spoiled modified atmosphere packaged poultry meat. *Systematic and Applied Microbiology*, 41 (1), pp. 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2017.11.002>
- Hu, Y., Zhang, L., Liu, Q., Wang, Y., Chen, Q., Kong, B. (2020). The potential correlation between bacterial diversity and the characteristic volatile flavour of traditional dry sausages from Northeast China. *Food Microbiology* 91, p.103505. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103505>
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T. (2003). Functionality of enterococci in meat products, *International Journal of Food Microbiology* 88, pp. 223– 233. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00184-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00184-3)
- Hugo, C.J., Hugo, A., (2015). Current trends in natural preservatives for fresh sausage products. *Trends in Food Science & Technology*, 45(1), pp. 12-23. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.05.003>
- Hutkinks,R.(2006). Meat fermentation. In R.Hutkins (Ed.), *Microbiology and technology of fermented foods*. Ames: Blackwell publishing professional. pp. 207-303.
- Hyytia-Trees, E., Lyhs, U., Korkeala, H., Bjorkroth, J. (1999). Characterisation of ropy slime-producing *Lactobacillus sakei* using repetitive element sequence-based PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 50(3), 215-219. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(99\)00104-x](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(99)00104-x)
- Iacumin, L., Andyanto, D., Manzano, M., Comuzzo, P., Comi, G. (2014). A case of spoilage in wurstel sold in an Italian supermarket. *Food Control* 43, pp. 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.021>
- Iacumin, L., Comi, G., Cantoni, C., Cocolin, L. (2006). Ecology and dynamics of coagulase-negative cocci isolated from naturally fermented Italian sausages, *Systematic and Applied Microbiology* 29, pp. 480-486. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2005.11.006>
- Ikonić, P., Petrović, Lj., Tasić, T., Džinić, N., Jokanović, M., Tomović, V. (2010). Physicochemical, biochemical and sensory properties for the characterization of Petrovská klobása (traditional fermented sausage). *Acta Periodica Technologica*, 41, pp. 19-31.
- Ishii, S., Sadowsky, M.J. (2009). Applications of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity, ecology and evolution. *Environmental Microbiology*, 11(4), pp. 733–740. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01856.x>

Jiménez-Colmenero, F. (2007). Healthier lipid formulation approaches in meat-based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats. *Trends in Food Science and Technology*, 18 (11), pp. 567-578. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.05.006>

Jeong, S.E., Chun, B.H., Kim, K.H., Park, D., Roh, S.W., Lee, S.H., Jeon, C.O. (2018). Genomic and metatranscriptomic analyses of *Weissella koreensis* reveal its metabolic and fermentative features during kimchi fermentation. *Food microbiology* 76, pp. 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.04.003>

Juárez-Castelán, C., García-Cano, I., Escobar-Zepeda, A., Azaola-Espinosa, A., Álvarez-Cisneros, Y., Ponce-Alquicira, E. (2019). Evaluation of the bacterial diversity of Spanish-type chorizo during the ripening process using high-throughput sequencing and physicochemical characterization. *Meat science*, 150, pp. 7-13. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.09.001>

Justé, A., Thomma, B.P.H.J., Lievens, B. (2008). Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiology* 25 (6), pp. 745-761. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.04.009>

Kaur, J., Lee, S., Park, Y.S., Sharma, A. (2017). RAPD analysis of *Leuconostoc mesenteroides* strains associated with vegetables and food products from Korea. *LWT*, 77, pp. 383-388. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.11.078>

Kim, H.S., Ma, B., Perna, N.T., Charkowski, A.O. (2009). Phylogeny and Virulence of Naturally Occurring Type III Secretion System-Deficient *Pectobacterium* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (13), pp. 4539–4549. <https://doi.org/10.1128/AEM.01336-08>

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn M., Glöckner, F.O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research* 41(1): e1-e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>

Kovacevic, D., Mastanjevic, K., Pleadin, J., Frece, J. (2016). Physicochemical, microbiological and colour attributes of horse salami established during the ripening period. *Italian Journal of Food Science*, 28(1), pp. 96-106. <https://doi.org/10.14674/1120-1770/ijfs.v463>

Lanoot, B., Vancanneyt, M., Dawyndt, P., Cnockaert, M., Zhang, J., Huang, Y., Liu, Z., Swings, J., (2004). BOX-PCR fingerprinting as a powerful tool to reveal synonymous names in the genus *Streptomyces*. Emended Descriptions are Proposed for the Species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeopurpureus*. *Systematic and Applied Microbiology*, 27, pp. 84-92. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00257>

Lawless, H. and Heymann, H. (2010). *Sensory Evaluation of Food Science Principles and Practices*. Chapter 1, 2nd ed., Ithaca, New York. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4419-6488-5>

Lawless, H. T. and Heymann, H. (2010): *Sensory Evaluation of Food: Principles and Practices* (Second Edition ed.). Springer Science and Business Media, LLC, New York.

Le Marrec, C., Hyronimus, B., Bressollier, P., Urdaci, M.C. (2000). Isolation, biochemical and genetic characterization of coagulin from *Bacillus coagulans* I4, a new pediocin-like bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 5213-5220. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5213-5220.2000>

- Lee, J.Y., Kim, C.J., Kunz B. (2006). Identification of lactic acid bacteria isolated from kimchi and studies on their suitability for application as starter culture in the production of fermented sausages. *Meat Science* 72 (3), pp. 437–445. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.08.013>
- Legrand, R., Lucas, N., Dominique, M., Azhar, S., Deroissart, C., Le Sollicec, M.A., Rondeaux, J., Nobis, S., Guérin, C., Léon, F., Do Rego, J.C. (2020). Commensal *Hafnia alvei* strain reduces food intake and fat mass in obese mice—A new potential probiotic for appetite and body weight management. *International Journal of Obesity*, 44(5), pp. 1041-1051. <https://doi.org/10.1038/s41366-019-0515-9>
- Leistner, L. (1986). Allgemeines über Rohwurst, Fleischwirtschaft, 66, pp. 290–300.
- Leite, A., Rodrigues, S., Pereira, E., Paulos, K., Oliveira A.F., Lorenzo, J.M., Teixeira, A. (2015). Physicochemical properties, fatty acid profile and sensory characteristics of sheep and goat meat sausages manufactured with different pork fat levels. *Meat Science*, 105, pp. 114– 120. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.03.015>
- Leriche, V., Carpentier, B., (2000). Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stain less steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. *J. Appl. Microbiol.* 88, pp. 594-605. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01000.x>
- Leroy, F., De Vuyst, L., (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science and Technology*, 15 (2), pp. 67-78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>
- López-Díaz, T.M., Santos, J.A., García-López, M.L., Otero, A. (2001). Surface mycoflora of a Spanish fermented meat sausage and toxigenicity of *Penicillium* isolates. *International Journal of Food Microbiology*, 68, 1–2, pp. 69-74. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00472-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00472-X)
- Lorenzo, J. M., Michinel, M., López, M., Carballo, J. (2000). Biochemical characteristics of two Spanish traditional dry-cured sausage varieties: Androlla and Botillo. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13 (5), pp. 809-817. <https://doi.org/10.1006/jfca.2000.0927>
- Lozupone, C.A., Hamady, M., Kelley, S.T., Knight, R. (2007). Quantitative and qualitative diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, pp. 1576 – 1585. <https://doi.org/10.1128/AEM.01996-06>
- Lücke, F.K., (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat, *Meat Science* 56 (2), pp. 105– 115. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(00\)00029-2](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(00)00029-2)
- Madrugá, M.S., Bressan, M.C. (2011). Goat meats: Description, rational use, certification, processing and technical developments. *Small Ruminant Research*, 98 (1-3), pp. 39-45. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.03.015>
- Magoč, T, Salzberg, S.L. (2011). FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 27(21), pp. 2957–2963. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>
- Maksimovic, A. Z., Zunabovic-Pichler, M., Kos, I., Mayrhofer, S., Hulak, N., Domig, K. J. (2018). Microbiological hazards and potential of spontaneously fermented game meat sausages: A focus on lactic acid bacteria diversity. *LWT-Food Science and Technology*, 89, pp. 418–426. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.017>

- Mangia, N.P., Murgia M.A., Garau, G., Sanna, M.G., Deiana P. (2008). Influence of selected lab cultures on the evolution of free amino acids, free fatty acids and Fiore Sardo cheese microflora during the ripening. *Food Microbiology* 25, pp. 366–377. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.09.009>
- Mansur, A.R., Song, E.J., Cho, Y.S., Nam, Y.D., Choi, Y.S., Kim, D.O., Seo, D.H., Nam, T.G. (2019). Comparative evaluation of spoilage-related bacterial diversity and metabolite profiles in chilled beef stored under air and vacuum packaging. *Food Microbiology*, 77, pp. 166-172. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.006>
- Marco, A., Navarro, J., Flores, M. (2008): The sensory quality of dry fermented sausages as affected by fermentation stage and curing agents. *European Food Research and Technology*, 226, pp. 449–458. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0556-x>
- Markov, K., Frece, J., Čvek, D., Trontel, A., Slavica, A., Kovačević, D. (2010). Dominantna mikroflora fermentiranih kobasica od konjskog mesa. *Meso*, XII, pp. 217-221.
- Martin, B., Garriga, M., Hugas, M., Aymerich, T. (2005). Genetic diversity and safety aspects of enterococci from slightly fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*. 98 (5), pp. 1177-1190. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02555.x>
- Martín, B., Corominas, L., Garriga, M., Aymerich, T. (2009). Identification and tracing of *Enterococcus* spp. by RAPD-PCR in traditional fermented sausages and meat environment. *Journal of Applied Microbiology*, 106, pp. 66–77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03976.x>
- Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G., Villani, F., (2004). Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy, *Meat Science*, 67 (1), pp. 49–158. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2003.10.003>
- McLeod, A., Nyquist, L., Snipen, L., Naterstad, K., Axelsson, L. (2008). Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods. *Systematic and Applied Microbiology*, 31 (5), pp. 393-403. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2008.06.002>
- McMurdie, P.J., Holmes, S. (2013). phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, 8, e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- McMurdie, P.J., Holmes, S. (2014). Waste not, want not why rarefying microbiome data is inadmissible. *PLoS Comput Biol* 10(4), e1003531. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003531>
- Milicevic, B., Danilovic, B., Zdolec, N., Kozachinski, L., Dobranic, V., Savic, D. (2014). Microbiota of the fermented sausages: Influence to product quality and safety. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 20(5), pp. 1061–1078.
- Mohammed, M., El-Aziz, H.A., Omran, N., Anwar, S., Awad, S., El-Soda, M. (2009). Rep- PCR characterization and biochemical selection of lactic acid bacteria isolated from the Delta area of Egypt. *International Journal of Food Microbiology*, 128, pp. 417-423. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.09.022>
- Montel, M.C., Masson, F., Talon, R. (1998). Bacterial role in flavour development, *Meat Science*, 49, S111–S124. PMID: 22060704

- Montel, M.C., Masson, F., Talon, R. (1998). Bacterial role in flavour development. *Meat Science*, 49 (1), pp. S111-S123. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(98\)90042-0](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(98)90042-0)
- Morot-Bizot, S.C., Leroy, S., Talon, R. (2006). Monitoring of staphylococcal starters in two French processing plants manufacturing dry fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 102 (1), pp. 238-244. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03041.x>
- Moschetti, G., Blaiotta, G., Villani, F., Coppola, S. (2000). Specific Detection of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* with DNA Primers Identified by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (1), pp. 422–424. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.422-424.2000>
- Natrajan, R., Reis-Filho, J.S. (2011) Next-generation sequencing applied to molecular diagnostics. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 11, pp. 425–444. <https://doi.org/10.1586/erm.11.18>
- Ndoye B., Rasolofo E., Lapointe G., Roy D. (2011). A review of the molecular approaches to investigate the diversity and activity of cheese microbiota. *Dairy Science & Technology*, 5, pp. 495–524. <https://doi.org/10.1007/s13594-011-0031-8>
- Nes, I.F., Diep, D.B., Håvarstein, L.S., Brurberg, M.B., Eijsink, V., Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70, pp. 113–28. <https://doi.org/10.1007/BF00395929>
- Nguyen, D.T.L., Van Hoorde, K., Cnockaert, M., De Brandt, E., Aerts, M., Thanh, L.B., Vandamme, P. A description of the lactic acid bacteria microbiota associated with the production of traditional fermented vegetables in Vietnam. *International Journal of Food Microbiology*, 163, pp. 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.024>
- Nieminen, T.T., Dalgaard, P., Björkroth, J. (2016). Volatile organic compounds and *Photobacterium phosphoreum* associated with spoilage of modified-atmosphere-packaged raw pork. *International journal of food microbiology*, 218 (2), pp. 86-95. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.003>
- Ockerman, H.W., Basu, L. (2007). Handbook of Fermented Meat and Poultry. In Fidel Toldrá (Edt.), *Production and Consumption of Fermented Meat Products*. Blackwell Publishing, pp. 9-15.
- Olesen, P. T., Stahnke, L. H., Talon, R. (2004). Effect of ascorbate, nitrate and nitrite on the amount of flavour compounds produced from leucine by *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus*. *Meat Science*, 68, pp. 193–200. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.02.017>
- Olivares, A., Navarro, J. L., Salvador, A., & Flores, M. (2010). Sensory acceptability of slow fermented sausages based on fat content and ripening time. *Meat science*, 86(2), pp. 251-257. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.04.005>
- Padonou, S. W., Schillinger, U., Nielsen, D. S., Franz, C. M., Hansen, M., Hounhouigan, J. D. (2010). *Weissella beninensis* sp. nov., a motile lactic acid bacterium from submerged cassava fermentations, and emended description of the genus *Weissella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, pp. 2193–2198. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.014332-0>
- Palavecino Prpich, N.Z., Castro, M.P., Cayré, M.E., Garro, O.A., Vignolo, G.M. (2014). Autochthonous starter culture selection to keep traditions in the manufacture of dry sausages alive. *Annals of Microbiology*, 65, pp. 1709–1719. <https://doi.org/10.1007/s13213-014-1010-0>

Papadima, S.N., Bloukas, J.G. (1999). Effect of fat level and storage conditions on quality characteristics of traditional Greek sausages. *Meat Science*, 51 (2), pp. 103–113. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(98\)00103-X](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(98)00103-X)

Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E., Kotzekidou, P., (2003). Characterisation of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry/fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties, *Meat Science* 65, pp. 859-867. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00292-9](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00292-9)

Pavoine, S., Dufour, A. B., Chessel, D. (2004). From dissimilarities among species to dissimilarities among communities: a double principal coordinate analysis. *Journal of Theoretical Biology*, 228, pp. 523–537. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2004.02.014>

Pérez-Alvarez, J.A., Sayas-Barberá, M.E., Fernández-López, J., Aranda-Catalá, V. (1999a). Physicochemical characteristics of Spanish-type dry-cured sausage. *Food Research International*, 32, pp. 599-607.

Peryam, D. R., & Pilgrim, F. J. (1957). Hedonic scale method of measuring food preferences. *Food Technology*, 11, pp. 9–14.

Pitt, J.I., Hocking A.D.. *Fungi and food spoilage*. Vol. 519. New York: Springer, 2009.

Planchon, S., Gaillard-Martinie, B., Leroy, S., Bellon-Fontaine, M.N., Fadda, S. and Talona, R. (2007). Surface properties and behaviour on abiotic surfaces of *Staphylococcus carnosus*, a genetically homogeneous species. *Food Microbiology*, 24, pp. 44– 51. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.03.010>

Popović, S., Čolović, D., Ikonić, P., Tasić, T., Kostadinović, Lj., Lević, J. (2017). Influence of temperature regime in gas chromatography on polyunsaturated fatty acid determination in Petrovská klobasá. *Romanian Biotechnological Letters*, 22 (4): 12812-12820. <https://erepository.org/rbl/vol.22/iss.4/16.pdf>

Popović, S., Čolović, D., Ikonić, P., Tasić, T., Kostadinović, Lj., Lević, J. (2017). Influence of temperature regime in gas chromatography on polyunsaturated fatty acid determination in Petrovská klobasá. *Romanian Biotechnological Letters*, 22 (4), pp. 12812-12820. <https://erepository.org/rbl/vol.22/iss.4/16.pdf>

Porto, M.C., Kuniyoshi, T.M., Azevedo, P.O., Vitolo, M., Oliveira, R.P. (2017). *Pediococcus* spp.: an important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Biotechnology Advances*, 35 (3), pp. 361–374. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.004>

Pothakos, V., Snauwaert, C., De Vos, P., Huys, G., Devlieghere, F. (2014). Psychrotrophic members of *Leuconostoc gasicomitatum*, *Leuconostoc gelidum* and *Lactococcus piscium* dominate at the end of shelf-life in packaged and chilled-stored food products in Belgium. *Food Microbiology*, 39, pp. 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.11.005>

Pothakos, V., Taminiau, B., Huys, G., Nezer, C., Daube, G., Devlieghere, F. (2014). Psychrotrophic lactic acid bacteria associated with production batch recalls and sporadic cases of early spoilage in Belgium between 2010 and 2014. *International Journal of Food Microbiology*, 191, pp. 157–163. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.013>

Pravilnik o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa, Sl. glasnik RS, broj 50/2019.

Prodělalová, J., Španová, A., Rittich, B. (2005). Application of PCR, rep-PCR and RAPD techniques for typing of *Lactococcus lactis* strains, *Folia Microbiologica*, 50(2), pp. 150–154. <https://doi.org/10.1007/BF02931464>

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glöckner F.O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41, pp. 590–596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>

Quijada, N.M., De Filippis, F., Sanz, J.J., del Camino García-Fernández, M., Rodríguez-Lázaro, D., Ercolini, D. (2018). Different *Lactobacillus* populations dominate in “Chorizo de León” manufacturing performed in different production plants. *Food Microbiology*, 70, pp. 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.09.009>

Rademaker, J.L.W., Louws, F.J., Versalovic, J., de Bruijn, F.J. (2004) Characterization of the diversity of ecological important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: Kowalchuk, G.A., de Bruijn, F.J., Head, I.M., Akkermans, A.D., van Elsas, J.D. (Eds.) *Molecular Microbial Ecology Manual*, Second Edition, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Chapter 5.3.2, pp. 1-33.

Rahiman, F.O.M., Balasubramanian, T., Pawan, K., Shejina, M. (2015). National Conference on Advances in Laboratory Medicine: P-44 Random Amplified polymorphic DNA (RAPD) - A Tool for Gene Mapping. National Conference on Advances in Laboratory Medicine, pp. 163- 167.

Rantsiou K., Drosinos E. H., Gialitaki M., Urso R., Krommerc J., Gasparik-Reichardt J., Toth S., Metaxopoulos I., Comi G., Cocolin L. (2005). Molecular characterization of *Lactobacillus* species isolated from naturally fermented sausages produced in Greece, Hungary and Italy. *Food Microbiology*, 22, pp. 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.05.001>

Rantsiou, K., Cocolin, L. (2006). New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: A review, *International Journal of Food Microbiology*, 108, 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.013>

Ravyts, F., De Vuyst, L., Leroy, F. (2012). Bacterial diversity and functionalities in food fermentations. *Engineering in Life Sciences*, 12(4), pp. 356–367. <https://doi.org/10.1002/elsc.201100119>

Rebecchi, A., Pisacane, V., Miragoli, F., Polka, J., Falasconi, I., Morelli, L., Puglisi, E. (2015). High-throughput assessment of bacterial ecology in hog, cow and ovine casings used in sausages production. *International Journal of Food Microbiology*, 212, pp. 49-59. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.047>

Rebecchi, A., Crivori, S., Sarra, P.G., Cocconcelli, P.S. (1998). Physiological and molecular techniques for the study of bacterial community development in sausage fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 84, pp. 1043–1049. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00442.x>

Riboulet- Bisson, E., Sturme, M. H. J., Jeffery, I. B., O'Donnell, M.M., Neville, B.A., Forde, B.M., Claesson, M.J., Harris, H., Gardiner, G.E., Casey, P.G., Lawlor, P.G., O'Toole, P.W., Ross, P.P. (2012). Effect of *Lactobacillus salivarius* bacteriocin Abp118 on the mouse and pig intestinal microbiota. *Plos One*, 7 (2), 1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031113>

Robinson, R.K. (2014). *Encyclopedia of food microbiology*, 2nd ed.; Academic press.: Jamestown Road, London NW1 7BY, UK, Corporate Drive, Suite 400, Burlington MA 01803, USA.

- Rosmini, M. R., Zogbi, A. P. (2005). Effect of Water, Sodium Chloride, Lactic Acid, Sodium Nitrite, Sodium Ascorbate and Paprika upon Lightness (L*) in a Dry-cured Sausages Model System. *Journal of Food Technology*, 3, pp. 555-562. <https://medwelljournals.com/abstract/?doi=jftech.2005.555.562>
- Rossi, F., Tofalo, R., Torriani, S. and Suzzi, G. (2001) Identification by 16S-23S rDNA intergenic region amplification, genotypic and phenotypic clustering of *Staphylococcus xylosum* strains from dry sausages. *Journal of Applied Microbiology* 90, pp. 365–371. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01254.x>
- Rubio, B., Martínez, B., García-Cachán, M., Rovira, J., Jaime, I. (2008). Effect of the packaging method and the storage time on lipidoxidation and colour stability on dry fermented sausage salchichón manufactured with raw material with a high level of mono and polyunsaturated fatty acids. *Meat Science*, 80, 1182–1187. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.05.012>
- Ruiz, J. (2007). *Ingredients*. Edited by F. Toldrá, Y.H. Hui, I. Astiasarán, W.K. Nip, J.G. Sebranek, E.T.F. Silveira, L.H. Stahnke, R. Talon, Handbook of fermented meat and poultry, Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing. pp. 59-76.
- Ruusunen, M., Puolanne, E. (2005). Reducing Sodium Intake from Meat Products. *Meat Science*, 70, pp. 531-541. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.07.016>
- Sabia, C., Manicardi, G., Messi, P., De Niederhäusern, S., Bondi, M. (2002). Enterocin 416K1, an antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 isolated from Italian sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 75(1-2), pp. 163-170. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00741-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00741-3)
- Saccani, G., Fornelli, G., Zanardi, E. (2013). Characterization of Textural Properties and Changes of Myofibrillar and Sarcoplasmic Proteins in Salame Felino During Ripening. *International Journal of Food Properties*, 16, 1460 - 1471. <https://doi.org/10.1080/10942912.2011.595027>
- Säde, E., Johansson, P., Heinonen, T., Hultman, J., Björkroth, J. (2020). Growth and metabolic characteristics of fastidious meat-derived *Lactobacillus algidus* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 313, p.108379 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108379>
- Salgado, A., Fontan, M.C.G., Franco, I., Lopez, M., Carballo, J. (2005). Biochemical changes during the ripening of Chorizo de cebolla, a Spanish traditional sausage. Effect of the system of manufacture (homemade or industrial). *Food Chemistry*, 92 (3), pp. 413–424. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.07.032>
- Sánchez Mainar, M., Stavropoulou, D. A., Leroy, F. (2017). Exploring the metabolic heterogeneity of coagulase-negative staphylococci to improve the quality and safety of fermented meats: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 247, pp. 24–37. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.021>
- Santos, E.M., Gonzáles-Fernández, C., Jaime, I., Rovira, J. (1998). Comparative study of lactic acid bacteria house flora isolated in different varieties of ‘chorizo’. *International Journal of Food Microbiology*, 39, pp. 123-128. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00128-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00128-1)
- Savić, D., Savić, T., Škrinjar, M., Joković, N. (2007). Profile of lactic acid bacteria in rye flour and sourdough. *Journal of Culture Collections*, 5, pp. 38-45.

Savić, S., Bunčić, O., Uzelac B., Tripković J. (2001). Mikroflora "Sremske salame" proizvedene sa i bez starter-kulture. Tehnologija Mesa, 42, pp. 71-74.

Sawitzki, M.C., Fiorentini, Â.M., Bertol, T.M., Sant'Anna, E.S. (2009). Lactobacillus plantarum strains isolated from naturally fermented sausages and their technological properties for application as starter cultures. Food Science and Technology. 29 (2), pp. 340-345. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612009000200016>

Schliep, K.P. (2011). phangorn: phylogenetic analysis in R. Bioinformatics 27(4), pp. 592–593. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706>

Schmieder, R., Edwards, R. (2011). Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. Bioinformatics, 27(6), pp. 863–864. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr026>

Severini, C., De Pilli, T., Baiano, A. (2003). Partial substitution of pork backfat with extra-virgin olive oil in “salami” products: effects on chemical, physical and sensorial quality. Meat Science, 64(3), pp. 323-331. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00204-8](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00204-8)

Sharma, A., Gupta, G., Ahmad, T., Kaur., B., Hakeem, K.R. (2020). Tailoring cellular metabolism in lactic acid bacteria through metabolic engineering. Journal of Microbiological Methods, 170, 105862. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105862>

Simon-Sarkadi, L. (2019). Amino acids and biogenic amines as food quality factors. Pure and Applied Chemistry, 91, (2), pp. 289-300. <https://doi.org/10.1515/pac-2018-0709>

Simunović, S., Djordjević, V., Bogdanović, S., Dimkić, I., Stanković, S., Novaković, S., Tomasević, I. (2019). Changes in chemical attributes during ripening of traditional fermented sausage, “Pirot ironed”. The 60th International Meat Industry Conference MEATCON2019, IOP Conference Series: Earth and Environmental Science 333, 012100. <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/333/1/012100>

Sleator, R.D., Shortall, C., Hill, C. (2008). Metagenomics. Letters in Applied Microbiology, 47, pp. 361–366. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02444.x>

Snauwaert, I., Papalexandratou, Z., De Vuyst, L., Vandamme, P. (2013). Characterization of strains of Weissella fabalis sp. nov. and Fructobacillus trophaeoli from spontaneous cocoa bean fermentations. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 63(Pt_5), pp. 1709-1716. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.040311-0>

Søndergaard, A.K., Stahnke, L.H. (2002). Growth and aroma production by *Staphylococcus xylosus*, *S. carnosus* and *S. equorum*—a comparative study in model systems. International Journal of Food Microbiology, 75, pp. 99– 109. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00729-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00729-2)

Sonjak, S., Ličen, M., Frisvad, J. C., Gunde-Cimerman N. (2011). The mycobiota of three dry-cured meat products from Slovenia. Food Microbiology, 28 (3), pp. 373-376. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.09.007>

Soyer, A., Ertas, A., Üzümcüoğlu, U. (2005). Effect of processing conditions on the quality of naturally fermented Turkish sausages (sucuks). Meat Science, 69 (1), pp. 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2004.06.015>

- Spaziani, M., Del Torre, M., Stecchini, M.L. (2009). Changes of physicochemical, microbiological, and textural properties during ripening of Italian low-acid sausages. Proteolysis, sensory and volatile profiles. *Meat Science*, 81 (1), pp. 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2008.06.017>
- Spotti, E., Berni, E., Cacchioli, C. (2008). Characteristics and Applications of Molds. In: Toldrá, F. (eds) *Meat Biotechnology*. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-0-387-79382-5_8
- Stahnke, L. H., Holck, A., Jensen, A., Nilsen, A., Zanardi, E. (2002). Maturity acceleration of Italian dried sausage by *Staphylococcus carnosus* - relationship between maturity and flavor compounds. *Journal of Food Science*, 67, pp. 1914–1921. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08746.x>
- Stahnke, L.H. (1999). Volatiles Produced by *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* during Growth in Sausage Minces Part II. The Influence of Growth Parameters. *LWT - Food Science and Technology* 32 (6), pp. 365-371. <https://doi.org/10.1006/food.1999.0560>
- Stephenson, D.P., Moore, R.J., Allison, G.E. (2009). Comparison and utilization of Repetitive-Element PCR Techniques for typing *Lactobacillus* isolates from the chicken gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (21), pp. 6764-6776. <https://doi.org/10.1128/AEM.01150-09>
- Stocchi, V., Piccoli, G., Magnani, M., Palma, F., Biagiarelli, B., Cucchiari, L. (1989). Reversed-phase high-performance liquid chromatography separation of dimethylaminoazobenzene sulfonyl- and dimethylaminoazobenzene thiohydantoin-amino acid derivatives for amino acid analysis and microsequencing studies at the picomole level. *Analytical Biochemistry*, 178 (1), pp. 107-117. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90364-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90364-3)
- Škaljac, S., Jokanović, M., Tomović, V., Peulić, T., Ikonić, P., Šojić, B., Ivić, M., Petrović, Lj., Babić J., Hromiš N. (2019). Uticaj dimljenja na formiranje boje i sadržaj policikličnih aromatičnih jedinjenja u tradicionalnoj fermentisanoj kobasici. *Glasnik hemičara, tehnologa i ekologa Republike Srpske*, 15, pp. 25-32. <https://doi.org/10.7251/GHTE1915025S>
- Taleski, V., Dimkić, I., Boev, B., Boev, I., Živković, S., Stanković, S. (2020). Bacterial and fungal diversity in the lorandite (TlAsS₂) mine 'Allechar' in the Republic of North Macedonia. *FEMS Microbiology Ecology*, 96(9), p.fiaa155. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa155>
- Talon, R., & Leroy, S. (2011). Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. *Meat science*, 89(3), pp. 303-309. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.04.029>
- Talon, R., Leroy, S., Lebert, I. (2007). Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: the importance of indigenous starters. *Meat Science*, 77(1), pp. 55-62. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2007.04.023>
- Talon, R., Leroy-Sétrin, S., Fadda, S. (2004). *Dry Fermented sausages*. Edited by Y.H. Hui, L. Meunier Goddik, A.S. Hansen, J. Josephsen, W.-K. Nip, P.S. Stanfield, F. Toldrá, *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology* (1st ed.), New York: Marcel Dekker Inc. pp. 397-416.
- Thomas, T., Gilbert, J., Meyer, F. (2012). Metagenomics: A guide from sampling to data analysis. *Microbial Informatics and Experimentation*, 2, p. 3. <https://doi.org/10.1186/2042-5783-2-3>
- Tjener, K., Stahnke, L. H., Andersen, L., Martinussen, J. (2004). The pH-unrelated influence of salt, temperature and manganese on aroma formation by *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus carnosus* in a fermented meat model system.

International Journal of Food Microbiology, 97, pp. 31–42.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.04.007>

Tobes, R., Ramos, J.L. (2014). REP code: defining bacterial identity in extragenic space. *Environmental Microbiology*, 7 (2), pp. 225-228. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00704.x>

Tojagić, S.N. (1997). Potreba standardizacije sremske kobasice kao nacionalnog proizvoda. *Tehnologija mesa*, 38 (6), pp. 265- 267.

Toldrá F. & Hui Y.H. (2015). *Handbook of Fermented Meat and Poultry* (2nd ed.), In Fidel Toldrá, *Dry-Fermented Sausages and Ripened Meats: An Overview*. Wiley-Blackwell. pp. 3-6.

Toldrá, F. (2002). *Dry-cured meat products. A Historical Perspective*. Trumbull, Connecticut: Food & Nutrition press, inc. pp. 1-5. <https://doi.org/10.1002/9780470385111.ch1>

Toldrá, F., Sanz, Y., Flores, M. (2001). *Meat fermentation technology*. Edited by Y.H. Hui, W.K. Nip, R.W. Rogers, O.A. Young, *Meat Science and Applications*, New York: Marcel Dekker, Inc. pp. 537- 561.

Tomasevic, I., Tomovic, V., Ikonic, P., Lorenzo Rodriguez, J.M., Barba, F.J., Djekic, I., Zivkovic, D. (2019). Evaluation of poultry meat colour using computer vision system and colourimeter: Is there a difference? *British Food Journal*, 121 (5), pp. 1078–1087. <https://doi.org/10.1108/BFJ-06-2018-0376>

Tomasevic, I., Tomovic, V., Milovanovic, B., Lorenzo, J., Đorđević, V., Karabasil, N., Djekic, I. (2019). Comparison of a computer vision system vs. traditional colorimeter for color evaluation of meat products with various physical properties. *Meat Science*, 148, pp. 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.09.015>

Tran, K.T.M., May, B.K., Smooker, P.M., Van, T.T. H., Coloe, P.J. (2011). Distribution and genetic diversity of lactic acid bacteria from traditional fermented sausage. *Food Research International*, 44, pp. 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.010>

Tremonte, P., Sorrentino, E., Pannella, G., Tipaldi, L., Sturchio, M., Masucci, A., Maiuro, L., Coppola, R., Succi, M. (2017). Detection of different microenvironments and *Lactobacillus sakei* biotypes in Ventricina, a traditional fermented sausage from central Italy. *International journal of food microbiology*, 242, pp. 132-140. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.009>

Urso, R., Comi, G., Cocolin, L. (2006). Ecology of lactic acid bacteria in Italian fermented sausages: isolation, identification and molecular characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 29, pp. 671-680. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2006.01.012>

Valencia, I., Ansorena, D., Astiasarán, I. (2006). Stability of linseed and antioxidants containing dry fermented sausages: A study of the lipid fraction during different storage conditions. *Meat Science*, 73, pp. 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.12.002>

Van der Walt, J.P. & Yarrow, D. (1984). *Methods for the isolation, maintenance, classification and identification of yeast*, The yeast, a taxonomic study, Kreger-van Rij N.J.W. Ed, Elsevier science publishers B. V., Amsterdam, pp. 45-104.

van Hijum, S.A., Vaughan, E.E., Vogel, R.F. (2013). Application of state-of-art sequencing technologies to indigenous food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology* 24, pp. 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.004>

- Verešbaranji, I. (1996). Animal and vegetable fats and oils - Preparation of methyl esters of fatty acids. In: Karlović, Đ., Andrić, N., Jakovljević, J. B., Tanasković, V. R., Berić, B. (Eds.), *Kontrola kvaliteta semena uljarica*. Tehnološki fakultet Novi Sad, Savezni zavod za standardizaciju, Beograd, Srbija, pp. 311-314.
- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F.J., Lupski, J.R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5 (1), pp. 25-40.
- Vesković Moračanin, S., Karan, D., Okanović, Đ., Jokanović, M., Džinić, N., Parunović, N., Trbović, D. (2011). Colour and texture properties of traditionally fermented “Sremska” sausage. *Tehnologija mesa*, 52 (2), pp. 245–251.
- Vignolo, G., Fontana, C. Fadda, S. (2010). Semidry and Dry Fermented Sausages. In Fidel Toldrá (Edt.), *Handbook of meat processing*. Blackwell Publishing, pp. 379-398.
- Vuković, I., Vasilev, D., Saičić, S., Ivanković, S. (2012). Ispitivanje važnijih promena u toku zrenja tradicionalne fermentisane kobasice lemeški kulen. *Tehnologija mesa*, 53 (2), pp. 140–147.
- Wang J., Hou J., Zhang X., Hu J., Yu Z., Zhu Y. (2022). Improving the flavor of fermented sausage by increasing its bacterial quality via inoculation with *Lactobacillus plantarum* MSZ2 and *Staphylococcus xylosum* YCC3. *Foods*, 11, 736. <https://doi.org/10.3390/foods11050736>
- Wang X., Zhang Y., Ren H., Zhan Y. (2018). Comparison of bacterial diversity profiles and microbial safety assessment of salami, Chinese dry-cured sausage and Chinese smoked-cured sausage by high-throughput sequencing. *LWT*, 90, pp. 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.011>
- Wang Y., Li F., Chen J., Sun Z., Fu L. (2021). High-throughput sequencing-based characterization of the predominant microbial community associated with characteristic flavor formation in Jinhua ham. *Food Microbiology*, 94, 103643. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103643>
- Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., Cole, J.R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), pp. 5261-5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>
- Wang, X., Wang, S., Zhao, H. (2019). Unraveling microbial community diversity and succession of Chinese Sichuan sausages during spontaneous fermentation by high-throughput sequencing. *Journal of Food Science and Technology*, 56(7), pp. 3254-3263. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03781-y>
- Welch, A.B. & Maxcy, R.B. (1975). Characterization of radiation-resistant vegetative bacteria in beef. *Applied Microbiology*, 30 (2), pp. 242-250. <https://doi.org/10.1128/am.30.2.242-250.1975>
- Wieser, M., Busse, H.J., (2000). Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, pp. 1087–1093. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-3-1087>
- Williams, P. (2007). Nutritional composition of red meat. *Nutrition & Dietetics*, 64 (s4): S113- S119. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0080.2007.00197.x>
- Wright, E.S. (2015). DECIPHER: harnessing local sequence context to improve protein multiple sequence alignment. *BMC Bioinformatics*, 16(1), pp. 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0749-z>

Xiao Y., Liu Y., Chen C., Xie T., Li P. (2021). Effect of *Lactobacillus plantarum* and *Staphylococcus xylosus* on flavor development and bacterial communities in Chinese dry fermented sausages. *Food Research International*, 135, 109247. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109247>

Yun, J.H., Roh, S.W., Jung, M.J., Kim, M.S., Park, E.J., Shin, K.S., Nam, Y.D., Bae, J.W. (2011). *Kocuria salsicia* sp. nov., isolated from salt-fermented seafood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, pp. 286–289. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.021469-0>

Zeuthen, P. (2007). Handbook of Fermented Meat and Poultry, In Fidel Toldrá (Edt.) A Historical Perspective of Meat Fermentation. Blackwell Publishing. pp. 3-8

Zhang, Q. Q., Jiang, M. X. Rui, W. Li, X. H. Chen, M. S. and Dong, M. S. 2017. Effect of rose polyphenols on oxidation, biogenic amines and microbial diversity in naturally dry fermented sausages. *Food Control*, 78, pp. 324–330. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.054>

Zhang, Q.Q. Li, D. Zhang, W. Jiang, M., Chen, X.H., Dong, M.S. (2021). Comparative analysis of the bacterial diversity of Chinese fermented sausages using high-throughput sequencing. *LWT*, 150, p.111975. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111975>

Zhang, Y., Zhang, Y., Zhou, X., Wang, S., Li, P. (2021). Salt Replacement Changed the Bacterial Community Composition and Physicochemical Characteristics of Sodium-Reduced Fermented Sausages during Fermentation and Ripening *Foods*, 10(3), 630. <https://doi.org/10.3390/foods10030630>

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C.M., Harris, H.M., Mattarelli, P., O'Toole, P.W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology*, 70(4), 2782-2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

PRILOZI

8. PRILOZI

Prilog 1. Uslovi amplifikacije i prajmeri.

Prajmer	Sekvenca prajmera (5'-3')	Uslovi amplifikacije
REP1R-I REP2-I	IIICGICGICATCIGGC IIICGNCGNCATCNGGC	1. Inicijalna denaturacija 95 °C 7 min 2. 35 ciklusa: denaturacija - 94 °C 1 min hibridizacija – 40 °C 1 min elongacija – 65 °C 8 min 3. Finalna elongacija 65 °C 16 min
BOXA1R	CTACGGCAAGGCGACGCTGACG	1. Inicijalna denaturacija 95 °C 7 min 2. 30 ciklusa: denaturacija - 94 °C 1 min hibridizacija – 52 °C 1 min polimerizacija – 65 °C 8 min 3. Finalna elongacija 65°C 16 min
GTG₅	GTGGTGGTGGTGGTG	1. Inicijalna denaturacija 95 °C 5 min 2. 35 ciklusa: denaturacija - 94 °C 30 sek hibridizacija – 45 °C 1 min polimerizacija – 72 °C 4 min 3. Finalna elongacija 72 °C 4 min
M13	GAGGGTGGCGGTTCT	1. Inicijalna denaturacija 95 °C 5 min 2. 35 ciklusa: denaturacija - 94 °C 1 min hibridizacija – 40 °C 20 sek polimerizacija – 72 °C 2 min 3. Finalna elongacija 75 °C 5 min
27F 1523R	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG AGGAGGTGATCCAGCCG	1. Inicijalna denaturacija 95 °C 5 min 2. 33 ciklusa: denaturacija - 95 °C 1 min hibridizacija – 50 °C 1 min polimerizacija – 72 °C 1 min 3. Finalna elongacija 72 °C 7 min

Prilog 2. Fizičko-hemijski parametri kao srednje razlike statističke značajnosti tokom zrenja pirotske „peglane“ kobasice.

	Zrenje (I)	Zrenje (J)	Razlika (I-J)	Značajnost	
pH	0. dan	7. dan	0,08111*	0,040	
		14. dan	0,10333*	0,009	
		21. dan	0,21333*	0,000	
		28. dan	0,49333*	0,000	
	6. dan	14. dan	0,02222	0,874	
		21. dan	0,13222*	0,002	
		28. dan	0,41222*	0,000	
	14. dan	21. dan	0,11000*	0,006	
		28. dan	0,39000*	0,000	
	21. dan	28. dan	0,28000*	0,000	
	a_w	0. dan	7. dan	0,01144	0,132
			14. dan	0,04667*	0,000
21. dan			0,08667*	0,000	
28. dan			0,11667*	0,000	
7. dan		14. dan	0,03522*	0,000	
		21. dan	0,07522*	0,000	
		28. dan	0,10522*	0,000	
14. dan		21. dan	0,04000*	0,000	
		28. dan	0,07000*	0,000	
21. dan		28. dan	0,03000*	0,000	
Masti (%)		0. dan	7. dan	-0,27667	0,999
			14. dan	-2,67	0,138
	21. dan		-2,72667	0,127	
	28. dan		-4,99333*	0,004	
	7. dan	14. dan	-2,39333	0,206	
		21. dan	-2,45	0,190	
		28. dan	-4,71667*	0,006	
	14. dan	21. dan	-0,05667	1,000	
		28. dan	-2,32333	0,226	
	21. dan	28. dan	-2,26667	0,245	
	Vlaga (%)	0 dan	7 dan	9,12333*	0,000
			14 dan	20,52333*	0,000
21 dan			31,53333*	0,000	
28 dan			34,39333*	0,000	
7 dan		14 dan	11,40000*	0,000	
		21 dan	22,41000*	0,000	
		28 dan	25,27000*	0,000	
14 dan		21 dan	11,01000*	0,000	
		28 dan	13,87000*	0,000	
21 dan		28 dan	2,86	0,081	
Proteini (%)		0 dan	7 dan	-6,11444*	0,000
			14 dan	-14,69333*	0,000
	21 dan		-23,58333*	0,000	
	28 dan		-26,67333*	0,000	
	7 dan	14 dan	-8,57889*	0,000	
		21 dan	-17,46889*	0,000	
		28 dan	-20,55889*	0,000	
	14 dan	21 dan	-8,89000*	0,000	
		28 dan	-11,98000*	0,000	
	21 dan	28 dan	-3,09000*	0,026	

Prilog 3. Lista ukupnih bakterijskih izolata dobijenih kultivabilnim pristupom.

Šifra izolata	Naziv vrste	Najbliži referentni soj
Crevo		
C1	<i>Enterococcus faecium</i>	NR 115764
C2	<i>Enterococcus faecium</i>	NR 115764
C3	<i>Enterococcus durans</i>	NR 113900
C4	<i>Enterococcus durans</i>	NR 113900
C5	<i>Lactobacillus sakei</i>	NR 113821
haC1	<i>Enterococcus hirae</i>	NR 114783
haC3	<i>Enterococcus faecium</i>	NR 115764
haC8	<i>Bacillus toyonensis/wiedmannii/sanguinis</i>	NR 121761/NR 152692/NR 175555
0. dan		
0/1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
0/2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
0/5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
0/6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
0/7	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
0/8	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
0/9	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
0/10	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
0/11	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
0/12	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
0/13	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
0/14	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
0/15	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
0/16	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
0/17	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
0/18	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
0/19	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
0/20	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
0/21	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
0/22	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
ha0/0	<i>Lactobacillus sakei</i>	NR 113821
ha0/1	<i>Bacillus tropicus/paramycooides/luti</i>	NR 157736/NR 157734/NR 157730
ha0/2	<i>Marichromatium purpuratum</i>	NR 116469
ha0/3	<i>Bacillus toyonensis/wiedmannii/sanguinis</i>	NR 121761/NR 152692/NR 175555
ha0/10	<i>Enterococcus faecium</i>	NR 115764
ha0/12	<i>Bacillus tropicus/paramycooides/luti</i>	NR 157736/NR 157734/NR 157730
ha0/13	<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	NR 119262
ha0/20	<i>Corynebacterium lipophiloflavum</i>	NR 026370
2. dan		
2/1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
2/2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
2/3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
2/5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
2/7	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
2/8	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
2/9	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957

2/10	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
2/11	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
2/12	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
2/13	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
2/15	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
2/16	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
2/17	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
2/18	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
2/19	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
2/20	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
ha2/1	<i>Lactobacillus sakei</i>	NR 113821
ha2/2	<i>Serratia proteamaculans</i>	NR 025341
ha2/4	<i>Hafnia alvei</i>	NR 044729
ha2/7	<i>Hafnia paralvei</i>	NR 116898
ha2/9	<i>Carnobacterium divergens</i>	NR 113798
ha2/10	<i>Serratia proteamaculans</i>	NR 025341
ha2/13	<i>Bacillus licheniformis</i>	NR 118996
ha2/17	<i>Macrococcus canis</i>	NR 156154
ha2/20	<i>Pectobacterium wasabiae</i>	NR 118294
7. dan		
7/1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
7/2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
7/3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
7/4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
7/5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
7/6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
7/7	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
7/8	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
7/9	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
7/10	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
7/11	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
7/12	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
7/14	<i>Weissella cibaria</i>	NR 036924
7/15	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
7/16	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
7/17	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
7/18	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
7/19	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
7/20	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
ha7/0	<i>Lactobacillus sakei</i>	NR 113821
ha7/3	<i>Citrobacter murliniae</i>	NR 028688
ha7/7	<i>Pantoea agglomerans/Enterobacter ludwigii/Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>	NR 111998/NR 042349/NR 118011
ha7/8	<i>Enterococcus pallens</i>	NR 043794
ha7/10	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>hordniae</i>	NR 113958
ha7/11	<i>Enterobacter aerogenes</i>	NR 113614
ha7/13	<i>Macrococcus canis</i>	NR 156154
ha7/15	<i>Kocuria kristinae</i>	NR 026199

ha7/20	<i>Pantoea agglomerans</i> / <i>Enterobacter ludwigii</i> / <i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>	NR 111998/NR 042349/NR 118011
--------	--	-------------------------------

10. dan

10/1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
10/4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
10/6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
10/7	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
10/8	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
10/9	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
10/10	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
10/11	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
10/12	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
10/13	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
10/14	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
10/15	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
10/16	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
10/17	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
10/18	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
ha10/1	<i>Enterococcus faecium</i>	NR 115764
ha10/3	<i>Lactobacillus sakei</i>	NR 113821
ha10/4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
ha10/6	<i>Enterococcus faecium</i>	NR 115764
ha10/7	<i>Carnobacterium divergens</i>	NR 113798
ha10/8	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	NR 104560
ha10/11	<i>Moraxella osloensis</i>	NR 113392
ha10/13	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	NR 044710
ha10/15	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i>	NR 104208

14. dan

14/3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
14/4	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	NR 040814
14/5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
14/6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
14/7	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
14/9	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
14/10	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
14/11	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
14/12	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
14/13	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
14/14	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
14/16	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
14/17	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
14/18	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
ha14/1	<i>Lactobacillus sakei</i>	NR 113821
ha14/2	<i>Lactobacillus sakei</i>	NR 113821
ha14/3	<i>Carnobacterium divergens</i>	NR 113798
ha14/4	<i>Shigella sonney</i>	NR 104826
ha14/7	<i>Enterococcus faecium</i>	NR 115764
ha14/10	<i>Lactococcus garvieae</i>	NR 113268

21. dan

21/1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
21/2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
21/3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
21/4	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
21/5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
21/6	<i>Leuconostoc rapi</i>	NR 136799
21/7	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
21/8	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
21/10	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
21/11	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
21/13	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
21/14	<i>Lactococcus garvieae</i>	NR 113268
21/15	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
21/16	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
21/17	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	NR 074957
ha21/1	<i>Lactobacillus sakei</i>	NR 113821
ha21/4	<i>Bacillus tropicus/paramycoides/luti</i>	NR 157736/NR 157734/NR 157730
ha21/5	<i>Lactobacillus sakei</i>	NR 113821
ha21/6	<i>Lactobacillus sakei</i>	NR 113821
ha21/7 (1)	<i>Bacillus toyonensis/wiedmannii/sanguinis</i>	NR 121761/NR 152692/NR 175555
ha21/7 (2)	<i>Bacillus toyonensis/wiedmannii/sanguinis</i>	NR 121761/NR 152692/NR 175555
ha21/11	<i>Lactobacillus sakei</i>	NR 113821
ha21/14	<i>Lactobacillus sakei</i>	NR 113821

Prilog 4. Homologija identifikovanih OTU-ova na osnovu BLASTn najboljeg bitnog rezultata prema NCBI bazi podataka za 16S.

Br.	Qseq ID	Sseq ID	Ident. (%)	Dužina	E vrednost	Bit skor	Ime vrste
1	seq_001	gi 1397641705 ref NR_156814.1	100	427	0	789	
16	seq_004	gi 1397641705 ref NR_156814.1	99,766	427	0	784	
161	seq_033	gi 1397641705 ref NR_156814.1	99,766	427	0	784	
196	seq_040	gi 1397641705 ref NR_156814.1	99,532	427	0	778	
216	seq_044	gi 1397641705 ref NR_156814.1	99,766	427	0	784	
231	seq_047	gi 1397641705 ref NR_156814.1	99,532	427	0	778	
256	seq_052	gi 1397641705 ref NR_156814.1	99,532	427	0	778	<i>Photobacterium carnosum</i>
336	seq_068	gi 1397641705 ref NR_156814.1	99,766	427	0	784	
376	seq_076	gi 1397641705 ref NR_156814.1	99,532	427	0	778	
526	seq_106	gi 1397641705 ref NR_156814.1	99,766	427	0	784	
531	seq_107	gi 1397641705 ref NR_156814.1	99,766	427	0	784	
1176	seq_236	gi 1397641705 ref NR_156814.1	100	418	0	773	
1291	seq_259	gi 1397641705 ref NR_156814.1	100	427	0	789	
41	seq_009	gi 631252986 ref NR_114184.1	100	427	0	789	
276	seq_056	gi 631252986 ref NR_114184.1	99,766	427	0	784	<i>Photobacterium phosphoreum</i>
56	seq_012	gi 631252986 ref NR_114184.1	99,766	427	0	784	
46	seq_010	gi 631250795 ref NR_111990.1	100	427	0	789	
51	seq_011	gi 631250795 ref NR_111990.1	99,766	427	0	784	<i>Photobacterium iliopiscarium</i>
151	seq_031	gi 631250795 ref NR_111990.1	99,532	427	0	778	
406	seq_082	gi 631250795 ref NR_111990.1	99,766	427	0	784	
71	seq_015	gi 672239090 ref NR_125679.1	100	427	0	789	<i>Photobacterium piscicola</i>
11	seq_003	gi 631252623 ref NR_113821.1	100	427	0	789	
441	seq_089	gi 631252623 ref NR_113821.1	99,766	427	0	784	
446	seq_090	gi 631252623 ref NR_113821.1	99,766	427	0	784	<i>Lactobacillus sakei</i>
511	seq_103	gi 631252623 ref NR_113821.1	99,766	427	0	784	
716	seq_144	gi 631252623 ref NR_113821.1	99,766	427	0	784	
1876	seq_376	gi 631252623 ref NR_113821.1	100	427	0	789	
6	seq_002	gi 265678315 ref NR_028617.1	100	427	0	789	
1496	seq_300	gi 265678315 ref NR_028617.1	96,487	427	0	706	<i>Lactobacillus algidus</i>
1766	seq_354	gi 265678315 ref NR_028617.1	100	427	0	789	
1661	seq_333	gi 265678315 ref NR_028617.1	100	420	0	776	
121	seq_025	gi 343201712 ref NR_042438.1	99,766	427	0	784	
366	seq_074	gi 343201712 ref NR_042438.1	99,532	427	0	778	<i>Lactobacillus graminis</i>
881	seq_177	gi 343201712 ref NR_042438.1	99,532	427	0	778	
246	seq_050	gi 559795383 ref NR_104976.1	100	427	0	789	<i>Lactobacillus fuchuensis</i>
616	seq_124	gi 672238974 ref NR_125563.1	100	427	0	789	<i>Lactobacillus nenjiangensis</i>
1151	seq_231	gi 645319700 ref NR_117065.1	100	427	0	789	<i>Lactobacillus ultunensis</i>
1506	seq_302	gi 1491505234 ref NR_159082.1	99,766	427	0	784	<i>Lactobacillus allii</i>
1676	seq_336	gi 631253167 ref NR_114365.1	99,063	427	0	767	<i>Lactobacillus iwatensis</i>
1761	seq_353	gi 343198639 ref NR_043148.1	100	427	0	789	<i>Lactobacillus oligofermentans</i>
1816	seq_364	gi 631253053 ref NR_114251.1	98,829	427	0	761	<i>Lactobacillus senmaizukei</i>
2006	seq_402	gi 1199303358 ref NR_147709.1	98,829	427	0	761	<i>Lactobacillus wasatchensis</i>
21	seq_005	gi 959494902 ref NR_133769.1	100	427	0	789	
2001	seq_401	gi 959494902 ref NR_133769.1	99,766	427	0	784	<i>Leuconostoc gelidum</i>
1591	seq_319	gi 959494902 ref NR_133769.1	98,656	372	0	660	

61	seq_013	gi 1269801505 ref NR_074997.2	100	427	0	789	
101	seq_021	gi 1441204190 ref NR_157602.1	100	427	0	789	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
791	seq_159	gi 631250774 ref NR_109004.1	99,766	427	0	784	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>
166	seq_034	gi 343200124 ref NR_040811.1	100	427	0	789	<i>Leuconostoc carnosum</i>
1011	seq_203	gi 343202334 ref NR_042620.1	100	427	0	789	<i>Leuconostoc holzapfelii</i>
1786	seq_358	gi 631252057 ref NR_113255.1	100	427	0	789	<i>Leuconostoc lactis</i>
26	seq_006	gi 566085118 ref NR_108858.1	99,061	426	0	765	
146	seq_030	gi 566085118 ref NR_108858.1	98,826	426	0	760	
316	seq_064	gi 566085118 ref NR_108858.1	98,826	426	0	760	<i>Weissella fabalis</i>
321	seq_065	gi 566085118 ref NR_108858.1	98,826	426	0	760	
1886	seq_378	gi 566085118 ref NR_108858.1	99,061	426	0	765	
96	seq_020	gi 265678736 ref NR_029041.1	100	427	0	789	
236	seq_048	gi 265678736 ref NR_029041.1	99,766	427	0	784	<i>Weissella koreensis</i>
296	seq_060	gi 265678736 ref NR_029041.1	99,766	427	0	784	
832	seq_167	gi 310975060 ref NR_036924.1	100	427	0	789	<i>Weissella cibaria</i>
191	seq_039	gi 631252761 ref NR_113959.1	100	427	0	789	
516	seq_104	gi 631252761 ref NR_113959.1	99,766	427	0	784	<i>Lactococcus raffinolactis</i>
901	seq_181	gi 631252761 ref NR_113959.1	99,766	427	0	784	
273	seq_055	gi 631252762 ref NR_113960.1	100	427	0	789	<i>Lactococcus lactis</i>
358	seq_072	gi 631252070 ref NR_113268.1	100	427	0	789	<i>Lactococcus garvieae</i>
76	seq_016	gi 343204087 ref NR_043739.1	100	427	0	789	<i>Lactococcus piscium</i>
156	seq_032	gi 631252600 ref NR_113798.1	100	427	0	789	<i>Carnobacterium divergens</i>
696	seq_140	gi 343201367 ref NR_042093.1	99,532	427	0	780	<i>Carnobacterium gallinarum</i>
991	seq_199	gi 636560400 ref NR_116460.1	100	427	0	789	<i>Carnobacterium jeotgali</i>
126	seq_026	gi 631252389 ref NR_113587.1	100	427	0	789	<i>Brochothrix thermosphacta</i>
176	seq_036	gi 631252148 ref NR_113346.1	98,135	429	0	747	
291	seq_059	gi 631252148 ref NR_113346.1	97,902	429	0	741	<i>Acinetobacter lwoffii</i>
1346	seq_270	gi 631252148 ref NR_113346.1	100	428	0	791	
326	seq_066	gi 645320413 ref NR_117624.1	99,065	428	0	769	
456	seq_092	gi 645320413 ref NR_117624.1	99,533	428	0	780	
566	seq_114	gi 645320413 ref NR_117624.1	99,766	428	0	785	
586	seq_118	gi 645320413 ref NR_117624.1	99,766	428	0	785	
916	seq_184	gi 645320413 ref NR_117624.1	99,533	428	0	780	<i>Acinetobacter johnsonii</i>
921	seq_185	gi 645320413 ref NR_117624.1	99,065	428	0	769	
986	seq_198	gi 645320413 ref NR_117624.1	99,766	428	0	785	
1051	seq_211	gi 645320413 ref NR_117624.1	99,533	428	0	780	
1071	seq_215	gi 645320413 ref NR_117624.1	98,832	428	0	763	
751	seq_151	gi 1341394069 ref NR_153741.1	99,533	428	0	780	
1701	seq_341	gi 1341394069 ref NR_153741.1	98,832	428	0	763	<i>Acinetobacter celticus</i>
846	seq_170	gi 645320481 ref NR_117677.1	97,436	429	0	730	
1741	seq_349	gi 645320481 ref NR_117677.1	97,669	429	0	736	<i>Acinetobacter baumannii</i>
651	seq_131	gi 961554986 ref NR_133953.1	97,902	429	0	741	
1386	seq_278	gi 961554986 ref NR_133953.1	100	428	0	791	<i>Acinetobacter gandensis</i>
1566	seq_314	gi 961554986 ref NR_133953.1	98,14	429	0	747	
976	seq_196	gi 1137647852 ref NR_145641.1	99,533	428	0	780	
1276	seq_256	gi 1137647852 ref NR_145641.1	98,598	428	0	758	<i>Acinetobacter albensis</i>
806	seq_162	gi 1146059109 ref NR_145841.1	99,766	428	0	785	
891	seq_179	gi 1146059109 ref NR_145841.1	98,364	428	0	752	<i>Acinetobacter movanagherensis</i>

941	seq_189	gi 645320415 ref NR_117626.1	100	428	0	791	<i>Acinetobacter guillouiae</i>
1261	seq_253	gi 645320419 ref NR_117629.1	99,533	428	0	780	<i>Acinetobacter tjernbergiae</i>
1296	seq_260	gi 1230874683 ref NR_148844.1	97,196	428	0	725	<i>Acinetobacter dispersus</i>
1356	seq_272	gi 1397641879 ref NR_156989.1	98,832	428	0	763	<i>Acinetobacter defluvii</i>
691	seq_139	gi 1277396356 ref NR_152069.1	98,598	428	0	758	<i>Acinetobacter pragensis</i>

Prilog 5. Rezultati ispitivanja hemijskih parametara različitih proizvođača piroške „peglane“ kobasice

	Sadržaj vlage (%)	Sadržaj proteina (%)	Sadržaj masti (%)	Sadržaj pepela (%)	Sadržaj hlorida (%)
Proizvođač 1	39,57±0,06	42,98±0,78	5,57±0,04	7,17±0,02	5,25±0,02
Proizvođač 2	41,81±0,14	41,75±0,27	7,16±0,21	5,29±0,03	3,53±0,01
Proizvođač 3	46,41±0,17	42,44±1,19	2,14±0,01	6,63±0,08	4,81±0,05
Proizvođač 4	41,08±0,08	42,28±0,22	6,43±0,08	6,80±0,11	5,02±0,01
Proizvođač 5	42,70±0,10	37,90±0,13	10,47±0,37	5,60±0,01	4,31±0,01
Proizvođač 6	41,54±0,36	41,38±0,28	6,97±0,22	5,28±0,04	3,39±0,02
Značajnost	0,061	0,109	0,061	0,063	0,056

Prilog 6. Promene instrumentalnih parametara profila teksture različitih proizvođača piroške „peglane“ kobasice

Parametar	Proizvođač 1	Proizvođač 2	Proizvođač 3	Proizvođač 4	Proizvođač 6	Značajnost
tvrdća (N)	33,67±3,25	18,16±2,29	15,67±3,68	36,29±2,92	17,60±1,61	0,00
adhezivnost (N × s)	-0,05±0,02	-0,11±0,02	-0,07±0,06	-0,13±0,05	-0,17±0,05	0,003
elastičnost	0,60±0,03	0,64±0,04	0,64±0,33	0,58±0,03	0,61±0,03	0,040
kohezivnost	0,54±0,01	0,58±0,04	0,59±0,07	0,55±0,03	0,61±0,03	0,019
gumoznost (N × mm)	18,02±1,41	11,82±2,33	9,01±1,35	19,98±1,38	10,67±0,91	0,000
žvakljivost	10,84±0,82	7,48±1,34	5,77±0,76	11,53±0,83	6,51±0,74	0,000
rastegljivost	0,15±0,01	0,15±0,01	0,16±0,03	0,16±0,01	0,17±0,02	0,252

Prilog 7. Senzorna ocena piroške „peglane“ kobasice različitih proizvođača

Proizvođač	Boja	Miris	Ukus	Ukupna ocena
Proizvođač 1	6,95±1,00	7,50±1,19	7,35±1,14	7,25±0,91
Proizvođač 2	7,10±0,85	7,25±0,95	7,65±0,81	7,35±0,67
Proizvođač 3	6,95±1,91	7,40±1,35	7,45±1,23	7,25±0,97
Proizvođač 4	7,10±0,72	7,15±1,30	7,35±1,09	7,20±0,70
Proizvođač 5	7,20±0,83	7,70±1,03	7,40±0,78	7,40±0,68
Proizvođač 6	7,35±0,93	7,75±1,12	7,65±0,99	7,55±0,76
Značajnost	0,747	0,525	0,860	0,749

BIOGRAFIJA

Svetlana Z. Bogdanović rođena je 15.01.1984. godine u Prokuplju. Osnovnu školu i Gimnaziju završila je u Prokuplju sa odličnim uspehom. Školske 2002/2003 upisala je osnovne studije na Prirodno matematičkom fakultetu, Univerziteta u Nišu na Odseku Biologija sa ekologijom. Diplomirala je septembra 2007. godine sa ocenom 10 na diplomskom ispitu. Školske 2013/2014 godine upisala je specijalističke akademske studije, drugog stepena na studijskom programu Mikrobiologija, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, a dana 19. maja 2015. godine odbranila je završni rad pod nazivom „Ispitivanje antimikrobnog efekta aditiva hrane, propilparabena i metilparabena na odabrane sojeve mikroorganizama“ i stekla akademski naziv specijalista biolog. Prosečna ocena na specijalističkim studijama je 9,67. Doktorske akademske studije upisala je školske 2014/15 na Biološkom fakultetu u Beogradu, na modulu Mikrobiologija. Od januara 2011. godine zapošljena je kao saradnik u nastavi na Visokoj poljoprivredno - prehrambenoj školi strukovnih studija u Prokuplju. Od 2016. do 2019. godine radila je kao asistent na predmetu Mikrobiologija na studijskim programima Zaštita bilja, Ratarstvo i povrtarstvo, Voćarstvo i vinogradarstvo, Stočarstvo i Strukovna veterina i na predmetima Opšta mikrobiologija i Mikrobiologija hrane na studijskom programu Prehrambena tehnologija. Integracijom škole u Topličku akademiju strukovnih studija postala je radnik Akademije i zapošljena je na mestu predavača na predmetima iz oblasti Biologije.

Do sada je objavila 3 rada u međunarodnim naučnim časopisima i 4 rada u časopisima od nacionalnog značaja. Na domaćim i inostranim naučnim skupovima učestvovala je sa 27 saopštenja.

образац изјаве о ауторству

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Светлана З. Богдановић

Број индекса Б3027/2014

Изјављујем


да је докторска дисертација под насловом

Карактеризација микробиоте природно ферментисане пиротске „пеглане“ кобасице током зрења и готовог производа

- 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 Светлана З. Богдановић

Број индекса Б3027/2014

Студијски програм Биологија

Наслов рада Карактеризација микробиоте природно ферментисане пиротске „пеглане“ кобасице током зрења и готовог производа

Ментор др Славиша Станковић и др Ивица Димкић

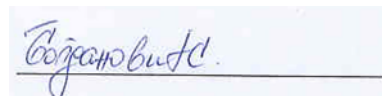
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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:

Карактеризација микробиоте природно ферментисане пиротске „пеглане“ кобасице током зрења и готовог производа

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 (CreativeCommons) 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.** Дозвољава се 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.** Дозвољава се 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.** Дозвољава се 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.** Дозвољава се 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.** Дозвољава се 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.** Дозвољава се 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.