

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKJE MEDICINE
Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla



Vukašin I. Tadić, DVM

**STARTER KULTURE KAO
POTENCIJALNI INHIBITORI *LISTERIA*
MONOCYTOGENES U FERMENTISANIM
KOBASICAMA**

-Doktorska disertacija-

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
Department of food hygiene i technology



Vukašin I. Tadić, DVM

**STARTER CULTURES AS POTENTIAL
INHIBITORS OF *LISTERIA*
MONOCYTOGENES IN FERMENTED
SAUSAGES**

-PhD Thesis -

Belgrade, 2019.

MENTOR:

Dr Mirjana Dimitrijević, redovni profesor
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE

Dr Milan Baltić, redovni profesor u penziji
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Vlado Teodorović, redovni profesor
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Dragan Vasilev, vanredni profesor
Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Brankica Lakićević, viši naučni saradnik
Institut za higijenu i tehnologiju mesa u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije

.....

Rezultati istraživanja ove doktorske disertacije deo su istraživanja u okviru projekta „Odabrane biološke opasnosti za bezbednost/kvalitet hrane animalnog porekla i kontrolne mere od farme do potrošača“ (Ev. br. TR 31034), koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije u periodu od 2011. do 2019. godine.

Zahvalnica

Ovom prilikom, uz duboko poštovanje, najiskrenije se zahvaljujem članovima Komisije, na korektnom i profesionalnom odnosu i nesebičnoj pomoći.

Iskreno se zahvaljujem koleginicama i kolegama koji su mi pružili veliku pomoć u naučno-istraživačkom radu i u pripremi i pisanju ove doktorske disertacije: dr Nataši Glamočiji, dr Mariji Bošković, dr Jeleni Ćirić, dr Jeleni Janjić, dr Radmili Mitrović, dr Vesni Janković, dr Tatjani Baltić, dr Jasni Đorđević, dr Branislavu Baltiću i DVM Milici Glišić.

Na ličnom angažovanju u toku izrade disertacije, ukazanoj mi stručnoj pomoći, kao i prijateljskoj podršci, posebnu zahvalnost dugujem profesorima dr Mirjani Dimitrijević i dr Milanu Baltiću.

Zahvaljujem se svojoj porodici na podršci, svakodnevnom zalaganju i poverenju.

STARTER KULTURE KAO POTENCIJALNI INHIBITORI *LISTERIA* *MONOCYTOGENES* U FERMENTISANIM KOBASICAMA

Rezime

Cilj ispitivanja u okviru ove doktorske disertacije odnosio se na mogućnost inaktivacije *Listeria monocytogenes* u fermentisanim kobasicama. Za potrebe ispitivanja proizvedene su kobasice kontaminirane sa *L. monocytogenes*, sa i bez dodate starter kulture. Kontrolne grupe kobasica nisu bile kontaminirane. U toku zrenja praćene su promene mikrobiološkog statusa fermentisanih kobasica i fizičko-hemijskih osobina. Za sva ispitivanja korišćene su standardne metode. U fermentisanim kobasicama užeg i šireg dijametra sa i bez dodate starter kulture u toku zrenja broj bakterija *L. monocytogenes* se smanjivao se posle trećeg dana zrenja. U uzorcima fermentisanih kobasica užeg dijametra, sa i bez dodate starter kulture, na kraju procesa zrenja (18. dan) nije utvrđeno prisustvo bakterija *L. monocytogenes*. U uzorcima fermentisanih kobasica šireg dijametra sa dodatom starter kulturom, *L. monocytogenes* nije izolovana 21. dana zrenja, a bez dodate starter kulture od 31. dana zrenja. Prosečan broj enterobakterija u uzorcima fermentisanih kobasica užeg dijametra, sa i bez dodate starter kulture smanjivao se od trećeg dana zrenja, a kod fermentisanih kobasica šireg dijametra od sedmog dana zrenja. Prisustvo enterobakterija nije utvrđeno u uzorcima kobasica užeg dijametra na kraju procesa zrenja (18. dan), a u uzorcima kobasica šireg dijametra 31. dana zrenja. Tokom svih dana ispitivanja broj bakterija mlečne kiseline (BMK) u fermentisanim kobasicama užeg, odnosno šireg dijametra bio je veći od broja u kobasicama bez dodate starter kulture. Broj BMK rastao je kod kobasica užeg dijametra do 14. dana, a zatim je opadao do 18. dana, dok je kod fermentisanih kobasica šireg dijametra rastao do 31. dana, a zatim opadao do 41. dana zrenja. Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija u fermentisanim kobasicama užeg, odnosno šireg dijametra rastao je do 14., odnosno 31. dana zrenja, a zatim je do kraja zrenja opadao. Između ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija u uzorcima fermentisanih kobasica oba dijametra tokom svih dana ispitivanja nije utvrđena razlika. Između pH vrednosti fermentisanih kobasica oba dijametra nultog i trećeg dana zrenja nije utvrđena razlika. Od sedmog dana, pa do kraja procesa zrenja u fermentisanim kobasicama oba dijametra pH vrednost kobasica sa dodatom starter kulturom bila je manja od pH vrednosti fermentisanih kobasica bez dodate starter kulture. U toku zrenja

svih ispitivanih grupa fermentisanih kobasica a_w vrednost se snižavala, a razlike između a_w vrednosti kobasica užeg, odnosno šireg dijametra nisu utvrđene. Pozitivna korelaciona zavisnost utvrđena je između broja bakterija *L. monocytogenes* i broja enterobakterija kod fermentisanih kobasica oba dijametra, dok je između broja *L. monocytogenes* i broja BMK, odnosno broja BMK i enterobakterija ustanovljena negativna korelaciona zavisnost. Između pH vrednosti kobasica oba dijametra i broja *L. monocytogenes*, odnosno broja enterobakterija, utvrđena je pozitivna korelaciona zavisnost, dok je odnos pH vrednosti i broja BMK ukazao na negativnu korelacionu zavisnost. Pozitivna korelaciona zavisnost utvrđena je između a_w vrednosti i broja bakterija *L. monocytogenes*, odnosno broja enterobakterija, kod fermentisanih kobasica oba dijametra. Odnos između a_w vrednosti i broja BMK u fermentisanim kobasicama oba dijametra ukazao je na negativnu korelacionu zavisnost. Između ispitivanih hemijskih parametara kvaliteta fermentisanih kobasica oba dijametra, sa i bez dodatih starter kultura, nisu utvrđene razlike.

Ključne reči: fermentisane kobasice, *Listeria monocytogenes*, starter kulture

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Higijena i tehnologija mesa

UDK broj: 636.6:664.933:579.86

STARTER CULTURES AS POTENTIAL INHIBITORS OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN FERMENTED SAUSAGES

Summary

The aim of the study under this doctoral dissertation was to address the possibility of inactivation of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages. For testing purposes, sausages contaminated with *L. monocytogenes* were produced, with and without the starter culture added. The sausage control groups were not contaminated. Changes in the microbiological status of fermented sausages and physicochemical properties were monitored during ripening. Standard methods were used for all tests. In fermented sausages of narrower and wider diameter with and without added starter culture during ripening, *L. monocytogenes* decreased after the third day of ripening. In samples of fermented short-diameter sausages, with and without added starter culture, no *L. monocytogenes* was detected at the end of the ripening process (day 18). In specimens of broad-diameter fermented sausages with added starter culture, *L. monocytogenes* was not isolated on day 21 of ripening, and without added starter culture from day 31 of ripening. The average number of enterobacteria in narrower diameter fermented sausage samples, with and without added starter culture, decreased from the third day of ripening, and in fermented sausages of wider diameter from the seventh day of ripening. The presence of *enterobacteria* was not detected in narrow-diameter sausage specimens at the end of the ripening process (day 18) and in broad-diameter sausage samples on the 31st day of ripening. During all test days, the number of lactic acid bacteria (LAB) in the fermented sausages of narrower or wider diameter was greater than the number in sausages without added starter culture. LAB number increased in narrower diameter sausages by day 14, then decreased by day 18, whereas in fermented sausages of wider diameter, it increased by day 31 and then decreased by day 41. The total number of aerobic mesophilic bacteria in the fermented sausages of narrower or wider diameter increased to the 14th and 31st day of ripening, and then decreased until the end of ripening. No difference was found between the total number of aerobic mesophilic bacteria in fermented sausage samples of both diameters during all test days. No difference was found between the pH values of fermented sausages of both diameters on zero and third day. From day 7 until the end of the ripening process in fermented sausages of both diameters, the pH value of sausages

with added starter culture was less than the pH value of fermented sausages without added starter culture. During the ripening of all test groups of fermented sausages, the a_w value decreased, and no differences were found between the a_w values of the sausages of the narrower or wider diameter. A positive correlation was found between the number of *L. monocytogenes* bacteria and the number of enterobacteria in fermented sausages of both diameters, while a negative correlation was found between the number of *L. monocytogenes* and the number of LABs, respectively. Between the pH of sausages of both diameters and the number of *L. monocytogenes*, that is, the number of enterobacteria, a positive correlation was found, while the ratio of pH and number of LAB indicated a negative correlation dependence. A positive correlation was found between the a_w values and the number of *L. monocytogenes* bacteria, and the number of enterobacteria, in fermented sausages of both diameters. The relationship between a_w values and the number of LABs in fermented sausages of both diameters indicated a negative correlation dependence. No differences were found between the tested chemical parameters of fermented sausage quality of both diameters, with and without added starter cultures.

Key words: fermented sausages, *Listeria monocytogenes*, starter cultures

Major Field of Study: Veterinary Medicine

Special Field of Study: Meat Hygiene i Technology

UDC Number: 636.6:664.933:579.86

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1 Fermentisane kobasice	3
2.2 Sirovine, dodaci i omotači u proizvodnji fermentisanih kobasice	6
2.3. Tehnološki postupak proizvodnje fermentisanih kobasica	9
2.4. Održivost fermentisanih kobasica	10
2.5. Kontaminacija fermentisanih kobasica sa <i>Listeria monocytogenes</i>	12
2.6. Bakteriocini	18
2.7 Uticaj bakteriocinogenih starter kultura na <i>Listeria monocytogenes</i>	20
3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA	23
4. MATERIJAL I METODE ISPITIVANJA	24
4.1. Priprema inokuluma	24
4.2 Izrada kobasica, inokulacija patogena i uzorkovanje	24
4.3 Mikrobiološke analize	25
4.5 Metode ispitivanja	25
4.6 Statistička obrada rezultata	26
5. REZULTATI ISPITIVANJA	28
5.1 Ispitivanje promene broja bakterija <i>Listeria monocytogenes</i> u uzorcima fermentisanih kobasica tokom zrenja	28
5.2 Ispitivanje promene broja enterobakterija u uzorcima fermentisanih kobasica tokom zrenja	33
5.3 Ispitivanje promene ukupnog broja bakterija mlečne kiseline u uzorcima fermentisanih kobasica tokom zrenja	37
5.4 Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija	42
5.5 Ispitivanje promene pH vrednosti u uzorcima fermentisanih kobasica tokom zrenja	45
5.6 Ispitivanje promene a_w vrednosti u uzorcima fermentisanih kobasica tokom zrenja	49
5.7 Ispitivanje korelacione zavisnosti između broja ispitivanih vrsta bakterija u uzorcima fermentisanih kobasica tokom zrenja	52

5.8 Ispitivanje korelacione zavisnosti između pH vrednosti i broja ispitivanih vrsta bakterija u uzorcima fermentisanih kobasica tokom zrenja.....	54
5.9 Ispitivanje korelacione zavisnosti između a_w vrednosti i broja ispitivanih vrsta bakterija u uzorcima fermentisanih kobasica tokom zrenja.....	56
5.10 Hemijski sastav fermentisanih kobasica.....	58
6. DISKUSIJA.....	61
6.1 Kontrola <i>Listeria monocytogenes</i> u fermentisanim kobasicama.....	63
6.2 Enterobakterije u fermentisanim kobasicama.....	77
6.3 Bakterije mlečne kiseline u fermentisanim kobasicama.....	85
6.4 Aerobne mezofilne bakterije u fermentisanim kobasicama.....	95
6.5 Vrednost pH fermentisanih kobasica.....	95
6.6 Vrednost a_w fermentisanih kobasica.....	102
6.7. Korelacione zavisnosti između ispitivanih vrsta, odnosno grupa bakterija.....	112
6.8 Korelacione zavisnosti između ispitivanih vrsta, odnosno grupa bakterija i pH i a_w vrednosti fermentisanih kobasica.....	112
6.9 Hemijski sastav ispitivanih grupa fermentisanih kobasica.....	114
7. ZAKLJUČCI.....	116
8.SPISAK LITERATURE.....	118

1. UVOD

U mnogim slučajevima listerioze ljudi, ustanovljeno je da su fermentisane kobasice kontaminirane bakterijom *Listeria monocytogenes* bile izvor oboljenja. S obzirom na ubicvitaru prirodu ove patogene bakterije, kontaminacija proizvoda se može pojaviti već kod sirovine, pa preko proizvodnog procesa, sve do samog finalnog proizvoda. Fermentisane kobasice spadaju u hranu spremnu za konzumiranje, koja je definisana kao „hrana namenjena za direktnu potrošnju, bez potrebe za toplotnom obradom, ili nekom drugom vrstom obrade čiji bi cilj bio da se eliminiše ili svede na prihvatljiv nivo broj mikroorganizama od značaja“. U sastav fermentisanih kobasica najčešće ulaze usitnjeno meso, čvrsto masno tkivo, nitritna so, šećer i začini. Nakon punjenja u omotače, kobasice se podvrgavaju zrenju, u toku koga dolazi do fizičkih, hemijskih i enzimskih promena koje osiguravaju održivost gotovog proizvoda, kao i karakteristične senzorne osobine. Nakon punjenja, kobasice se obično određeno vreme podvrgavaju hladnom dimljenju, a zatim suše do postizanja željene konzistencije. Kod kobasica šireg dijametra izraženiji su fermentativni procesi, dok kod kobasica užeg dijametra preovladavaju fizički procesi, odnosno sušenje proizvoda. Ovo ima za posledicu razlike u mikroflori i fizičkim i hemijskim promenama koje se odvijaju u toku zrenja, a koje utiču na kvalitet i bezbednost gotovog proizvoda. Veoma bitna karakteristika fermentisanih kobasica je da procesi njihove proizvodnje i pripreme za konzumaciju ne uključuju termičku obradu, koja bi eliminisala eventualno prisutne patogene mikroorganizme, naročito *L. monocytogenes*. Problem predstavlja takođe i to što one spadaju u kategoriju hrane spremne za konzumiranje koja podržava rast bakterije *Listeria monocytogenes*. Prisustvo i rast ove patogene bakterije u fermentisanim kobasicama mogli bi da predstavljaju ozbiljan zdravstveni problem za potrošača. Razumevanje prirode ovog patogena prenosivog hranom omogućilo je razvoj niza postupaka koji se mogu implementirati u proizvodni proces i efikasno ga eliminisati ili značajno smanjiti. Tokom procesa zrenja u kobasicama dolazi do fermentacije, koja može biti spontana, odnosno uslovljena prisustvom bakterija mlečne kiseline u nadevu kobasica, ili pak indukovana dodavanjem starter kultura u cilju efikasnije kontrole procesa. Kao starter kulture u ovu svrhu najčešće se koriste sledeći mikroorganizmi: *Lactobacillus sakei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. casei*, *Pediococcus*

pentosaceus i *Pediococcus acidilactici*. Fermentacija i sušenje kobasica, pored uloge u formiranju karakterističnog ukusa proizvoda, imaju za cilj i da se dobije bezbedan proizvod, koji ne sadrži patogene mikroorganizme, među koje spada i *Listeria monocytogenes*. Sposobnost bakterija mlečne kiseline da proizvode bakterocine, kao i duga istorija njihove bezbedne upotrebe u proizvodnji fermentisanih proizvoda, čine ih veoma atraktivnim za primenu u cilju dobijanja bezbednijih proizvoda. Primenom odabranih starter kultura, selekcionisanih bakterijskih vrsta i sojeva definisanog genetskog porekla, moguće je ciljano baktericidno delovati na određene patogene bakterije, eventualno prisutne u fermentisanim kobasicama. Na taj način se značajno utiče na povećanje bezbednosti ove vrste proizvoda i smanjenje rizika po zdravlje potrošača.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Fermentisane kobasice

2.1.1. Značaj i istorijat upotrebe fermentisanih kobasica

Fermentacija se, uz sušenje, dimljenje i soljenje, smatra jednom od najstarijih metoda za očuvanje hrane. Dobra održivost suvih fermentisanih proizvoda, koje nije neophodno čuvati na hladnim temperaturama, uz njihov karakterističan ukus, čine ovu vrstu proizvoda popularnom još od antičkih vremena.

Smatra se da se sa proizvodnjom suvih fermentisanih kobasica počelo u regionu Mediterana, i to još u vreme starog Rima. Popularni i uobičajeni naziv za fermentisane kobasice na više jezika je “salama”. Ovaj naziv se može dovesti u vezu sa imenom antičkog grada Salamisa, na istočnoj obali Kipra (Pedersen, 1979), ali je verovatnije da potiče od latinske reči za so - “sale” (Leistner, 1986). Dobra održivost ove vrste kobasica, uz visoku nutritivnu vrednost, učinila je da postanu sastavni deo obroka rimskih vojnika i da se sa širenjem Rimskog carstva prošire evropskim kontinentom (Shepard, 2000).

Početak proizvodnje suvih fermentisanih kobasica na način sličan tradicionalnoj proizvodnji koja se održala i danas vezuje se za Italiju, oko 1730. godine, odakle se proširila u Nemačku oko 1780. godine (Leistner, 1992). Oko 1830. godine italijanski majstori prenose veštinu proizvodnje ove vrste kobasica u Mađarsku. Prilagođavanjem proizvodnog procesa uslovima koji se razlikuju od onih u zemljama Mediterana, dobijeni su proizvodi koji se tradicionalno suše duži vremenski period, na nižim temperaturama, i to pre svega u zimskim mesecima, kakva je i poznata mađarska zimska salama (Incze, 1986). Iz Mađarske se tehnologija izrade fermentisanih kobasica raširila i u naše krajeve, i to najpre u Vojvodinu u drugoj polovini 19. veka (Radetić, 1997).

Modernizacija tehnološkog procesa, sa upotrebom starter kultura i mogućnošću potpune kontrole uslova temperature i vlažnosti vazduha u komorama za zrenje, značajno je izmenila način proizvodnje fermentisanih kobasica.

Način života diktira i nove trendove potrošnje hrane na svetskom tržištu. Globalizacija i olakšana trgovina između geografski i kulturološki udaljenih područja omogućila je da se danas sve više konzumiraju proizvodi koji ne spadaju u tradicionalnu ishranu stanovništva određenog područja. Fermentisane kobasice, kao proizvod koji se

smatra delikatesom, pojavljuju se i na tržištima na kojima ranije nisu bili prisutne ili su se koristile samo u manjoj meri. Svetski trend smanjenja veličine porodice na dva ili tri člana, i sve veći broj samaca, kao i popularnost hrane koja je spremna za jelo ili nije zahtevna za pripremu, utiču i na povećanje potrošnje fermentisanih kobasica, sa naročitim naglaskom na povećanje potrošnje prethodno narezanih i upakovanih proizvoda (Toldra, 2002).

Najveći proizvođači fermentisanih kobasica danas su Nemačka, Španija i Francuska. Tako je samo u Španiji 2000. godine proizvedeno 169,999 tona suvih fermentisanih kobasica. Između 50% i 60% od ukupne potrošnje svinjskog mesa u Španiji i Italiji konzumira se u vidu prerađenih proizvoda – suvomesnatih proizvoda i suvih fermentisanih kobasica (Cruz i Barreiro, 2001).

2.1.2. Fermentisane kobasice – opis proizvoda

Fermentisane kobasice su proizvodi od mesa dobijeni od mesa domaćih papkara i kopitara prve i druge kategorije, mesa živine prve kategorije i mesa divljači, masnog tkiva i dodataka, koji se posle punjenja u omotače konzervišu postupcima fermentacije i sušenja, odnosno zrenjem, sa dimljenjem ili bez dimljenja (Pravilnik o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa, Sl. glasnik RS 50/19).

Prema Pravilniku o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa (2019), fermentisane kobasice se na osnovu stepena sušenja i zrenja dele na suve fermentisane kobasice i polusuve fermentisane kobasice. Polusuve fermentisane kobasice dele se na polusuve fermentisane kobasice za narezivanje i polusuve fermentisane kobasice za mazanje. Proizvodnja suvih i polusuvih fermentisanih kobasica razlikuje se u dužini trajanja i uslovima zrenja. Zrenje polusuvih fermentisanih kobasica odvija se na nešto višim temperaturama i kraće traje, tako da se dobijaju proizvodi sa nižom pH vrednošću i kiselkastom aromom na fermentaciju, dok zrenje i sušenje suvih fermentisanih kobasica traje duže i odvija se na nižim temperaturama, tako da se dobijaju proizvodi sa niskom aktivnošću vode i dobrom održivošću (Vuković, 2006).

Fermentisane suve kobasice se proizvode i stavljaju u promet pod nazivom domaći kulen, kulen, zimski salama, sremska kobasica, sudžuk i čajna kobasica, a mogu se proizvoditi i proizvodi pod drugim nazivom koji nije definisan pravilnikom.

Fermentisane polusuve kobasice se proizvode i stavljaju u promet pod nazivom panonska kobasica i čajni namazi, ili pod drugim nazivom koji nije definisan Pravilnikom (Pravilnik o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa, Sl. glasnik RS 50/19).

2.1.3. Kvalitet fermentisanih kobasica

Zahtevi za kvalitet fermentisanih kobasica dati su u Pravilniku o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa (2019).

Fermentisane suve kobasice u proizvodnji i prometu moraju da ispunjavaju sledeće zahteve kvaliteta:

- 1) da površina nije deformisana, da omotač nije oštećen i da dobro prileže uz nadev,
- 2) da nadev na preseku ima izgled mozaika sastavljenog od pretežno ujednačenih komadića mesa i masnog tkiva, koji su ravnomerno raspoređeni i međusobno povezani,
- 3) da na preseku nema šupljina i pukotina,
- 4) da imaju stabilnu boju i prijatan i karakterističan miris i ukus,
- 5) da imaju čvrstu konzistenciju,
- 6) da se sastojci nadeva prilikom narezivanja ne razdvajaju,
- 7) da je pH vrednost najmanje 5,0, ukoliko to nije drukčije propisano pravilnikom,
- 8) da je sadržaj vlage najviše do 35%,
- 9) da je sadržaj proteina mesa najmanje 20% i sadržaj kolagena u proteinima mesa najviše 15% (najviše 10% kod proizvoda od mesa živine), ukoliko nije drukčije propisano pravilnikom.

Veći sadržaj proteina mesa propisan je za kulen, gde treba da je najmanje 24%, kao i za zimsku salamu, gde je najmanje 22%. U proizvodima koji se stavljaju u promet pod drugim nazivom, odnosno nazivom koji nije propisan pravilnikom, sadržaj proteina mesa i ukupnih proteina je najmanje 20% (Pravilnik o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa Sl. glasnik RS 50/19). Viša pH vrednost od najmanje 5,3 propisana je za kulen i zimsku salamu (Pravilnik o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa Sl. glasnik RS 50/19).

Fermentisane polusuve kobasice u proizvodnji i prometu moraju da ispunjavaju sledeće zahteve kvaliteta:

- 1) da površina nije deformisana i da omotač dobro prileže uz nadev,
- 2) da nadev grublje usitnjenog proizvoda ima izgled mozaika sastavljenog od pretežno ujednačenih komadića mesa i masnog tkiva, a da je nadev fino usitnjenih proizvoda homogen bez vidljivih delova tkiva,
- 3) da su sastojci nadeva ravnomerno raspoređeni i povezani,
- 4) da na preseku kobasica nema šupljina i pukotina,
- 5) da imaju stabilnu boju i prijatan kiselkasti miris i ukus na fermentaciju i začine,
- 6) da je u proizvodu koji ima konzistenciju za narezivanje sadržaj proteina mesa najmanje 16% i sadržaj kolagena u proteinima mesa najviše 15% (najviše 10% kod proizvoda od mesa živine),
- 7) da je u proizvodu koji ima konzistenciju za mazanje sadržaj proteina mesa najmanje 14% i sadržaj kolagena u proteinima mesa najviše 15% (najviše 10% kod proizvoda od mesa živine).

2.2. Sirovine, dodaci i omotači u proizvodnji fermentisanih kobasica

2.2.1. Meso i masno tkivo

Osnovna sirovina za proizvodnju fermentisanih kobasica su meso i masno tkivo. Može se koristiti meso goveda, svinja, ovaca, živine, konja, riba, divljači i drugih životinja, ali se najčešće koristi svinjsko i goveđe meso. Prednost u proizvodnji ima meso starijih životinja, koje ima čvršću strukturu i sadrži više suve materije. Količina mesa kod većine suvih i polusuvih kobasica je 70-85%. Preporučuje se da pH vrednost svinjskog mesa bude ispod 6,0, a pH vrednost goveđeg mesa ispod 5,8 (Vuković, 2006). Niže pH vrednosti mesa omogućavaju bolje otpuštanje vode i lakšu difuziju soli.

Masno tkivo koje se koristi za proizvodnju fermentisanih kobasica je najčešće čvrsto masno tkivo svinja, dok se u nekim tipovima kobasica koje se regionalno proizvode može koristiti i potkožno masno tkivo goveda i ovaca (Toldra, 2007). Meko masno tkivo nije pogodno za izradu fermentisanih kobasica s obzirom da prilikom usitnjavanja ne daje jasno definisane čestice što dovodi do razmazanog i mutnog preseka gotovog proizvoda.

2.2.2. Kuhinjska so, nitriti i nitrati

Količina kuhinjske soli koja se dodaje nadevu fermentisanih kobasica iznosi 2,4 do 3,0% (Vuković, 2006). Sadržaj kuhinjske soli u gotovom proizvodu uvek je veći nego u nadevu, zbog gubitka vode tokom sušenja. Uobičajeni sadržaj soli u gotovom proizvodu iznosi 3,0 do 4,5% (Heinz i Hautzinger, 2007).

Uloga kuhinjske soli u proizvodu je višestruka. Dodata so ima direktan uticaj na ukus proizvoda, ali i potencira aromatična svojstva drugih sastojaka. Dodavanje soli u količinama do 5% povećava sposobnost vezivanja vode. Uticaj dodate soli na mikroorganizme ogleda se u povećanju osmotskog pritiska i snižavanju a_w vrednosti, odnosno smanjenju količine vode koja je na raspolaganju mikroorganizmima.

Kuhinjska so se takođe koristi i kao nosač za nitrite, uglavnom u obliku “nitritne soli za salamurenje”, koja predstavlja smešu kuhinjske soli i nitrita (najčešće natrijum-nitrita) u količini 0,5-0,6%.

2.2.3. Šećeri i aditivi

U proizvodnji fermentisanih kobasica šećeri se dodaju u količini 0,2 do 0,5% i služe kao supstrat mikroorganizmima za fermentaciju (Vuković, 2006). Mogu se koristiti dekstroza, saharoza, laktoza, maltoza, maltodekstrin ili njihove kombinacije. Dodavanje prostih šećera kao što su dekstroza ili fruktoza koje mikroorganizmi lako razlažu dovodi do brzog pada pH vrednosti, dok je razlaganje složenih šećera proces koji duže traje (Heinz i Hautzinger, 2007).

Glukono-delta-lakton (GdL) se koristi kao aditiv u proizvodnji fermentisanih kobasica sa kraćim vremenom zrenja, kao što su polusuve kobasice i kobasice za mazanje, u cilju ubrzanja procesa zrenja. Upotreba u suvim fermentisanim kobasicama se izbegava jer inhibira rast mikroorganizama bitnih za odigravanje procesa zrenja (Heinz i Hautzinger, 2007).

2.2.3. Začini

Vrsta i količina upotrebljenih začina, kao i njihova interakcija sa ostalim sastojcima, u značajnoj meri utiču na ukus i miris gotovog proizvoda. Kod nas se u proizvodnji fermentisanih kobasica najčešće koriste beli luk, biber, slatka i ljuta paprika, u količinama 0,3-0,5%.

2.2.4. Starter kulture

Starter kulture su proizvodi koji sadrže od jednu ili više vrsta mikroorganizama, a primenjuju se u proizvodnji proizvoda u cilju ubrzanja i stabilizacije zrenja (Pravilnik o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa Sl. glasnik RS 50/19).

Starter kulture su kultivisani sojevi odabranih vrsta bakterija, kvasaca i plesni, koji učestvuju u zrenju fermentisanih kobasica i utiču na formiranje karakterističnih osobina gotovih proizvoda. Mikrokoke i apatogene stafilokoke (*M. aurantiacus* M53, *M. varians*, *S. carnosus*, *S. xylosus*) poseduju enzime koji redukuju nitrate do nitrita, a laktobacili (*L. plantarum*, *L. sake*, *L. curvatus*, *L. pentosus*), pediokoke (*P. cerevisiae*, *P. acidilactici* i *P. pentosaceus*) i kvasci (*Debaryomyces*, *Streptomyces*) enzime koji fermentišu šećere do mlečne kiseline (Vuković, 2006).

2.2.5. Omotači

U proizvodnji fermentisanih kobasica koriste se prirodni i veštački omotači, koji treba da su čvrsti, elastični, retraktivni i propustljivi za dim, vodenu paru i gasove. Naročito je značajno da omotač dobro naleže na nadev, i to ne samo nakon punjenja već i tokom perioda sušenja, kada se zapremina nadeva smanjuje (Heinz i Hautzinger, 2007).

2.3. Tehnološki postupak proizvodnje fermentisanih kobasica

Pripremljena sirovina za proizvodnju fermentisanih kobasica se najpre usitnjava i meša, odnosno priprema se nadev za punjenje, različitog stepena usitnjenosti u zavisnosti od vrste kobasica koje se proizvode. Pripremljeni nadev puni se u omotače i napunjene kobasice se kače na štapove i slažu na kolica, a zatim odnose na zrenje.

Tokom perioda zrenja fermentisane kobasice dobijaju karakterističnu aromu i konzistenciju i postaju održivi proizvodi spremni za jelo. Proces zrenja obuhvata promene fizičke, hemijske i enzimske prirode, pri čemu značajnu ulogu imaju mikroorganizmi, i to pre svega mikroflora ohlađenog mesa i dodate starter kulture.

Za odvijanje procesa zrenja značajni su i temperatura, vlažnost i cirkulacija vazduha. Osnovni činilac koji utiče na brzinu zrenja kobasica je temperatura, pri čemu se zrenje brže odvija na višim temperaturama. Uobičajene temperature prilikom zrenja fermentisanih kobasica kreću se u rasponu 12-25 °C. Kobasice se obično dīme na početku zrenja, pri čemu intenzitet dimljenja zavisi od vrste proizvoda.

Osnovna fizička promena koja se odigrava tokom procesa zrenja je sušenje, tokom koga se smanjuju sadržaj vode i a_w vrednost. Aktivnost vode fermentisanih suvih kobasica je od 0,80 do 0,90 (Vuković, 2006).

Tokom zrenja dolazi i do snižavanja pH vrednosti kobasica, što je posledica fermentacije šećera do mlečne kiseline pod dejstvom mikroorganizama mlečno-kiselinskog vrenja, i to bakterija rodova *Lactobacillus*, *Pediococcus* i *Streptococcus* i kvasaca rodova *Debaryomyces* i *Streptomyces*. Ovi mikroorganizmi fermentišu dodate šećere i ugljene hidrate koji se nalaze u mesu, pri čemu se u nadevu nakupljaju proizvodi fermentacije, pre svega mlečna i pirogroždana kiselina, koji snižavaju pH (Vuković, 2006). Brzina snižavanja pH vrednosti zavisi u prvom redu od temperature zrenja, odnosno na višim temperaturama zrenja dolazi do bržeg pada pH vrednosti. Brzina snižavanja pH može se povećati dodavanjem aditiva, kao što je glukono-delta-lakton.

2.4. Održivost fermentisanih kobasica

U procesu proizvodnje fermentisanih kobasice ne primenjuje se toplotna obrada, tako da se ove kobasice često nazivaju “sirovim” (Vuković, 2006; Radetić, 1997). Ovi proizvodi karakterišu se dobrom održivošću, zbog čega se često nazivaju i “trajnim” kobasicama. Dobra održivost fermentisanih kobasica zasniva se pre svega na niskim a_w vrednostima (Vuković, 2006).

Za održivost gotovog proizvoda (fermentisanog proizvoda) od posebnog značaja su činioci koji sprečavaju (inhibiraju) rast patogenih bakterija. Među tim činiocima su posebno značajni pH i a_w vrednost, a zatim temperaturni uslovi u toku proizvodnje i prometa, količina soli i mikrobiota (BMK). Ostali činioci koji utiču na održivost fermentisanih kobasica su sadržaj vode, način pakovanja (MAP, vakuum), začini i ekstrakti začina, upotreba etarskih ulja itd.

Propisani sadržaj vlage za fermentisane suve kobasice je najviše do 35%, dok kod polusuvih fermentisanih kobasica sadržaj vlage nije ograničen (Pravilnik o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa Sl. glasnik RS 50/19). Sadržaj vlage od 35% odgovara a_w vrednostima od 0,90 i niže, što pod uobičajenim uslovima čuvanja (pri temperaturama do 25 °C relativnom vlažnošću vazduha od 70-75%) omogućava da proizvodi budu održivi više od godinu dana (Heinz i Hautzinger, 2007). Niske vrednosti a_w suvih fermentisanih kobasica (0,80-0,90) omogućavaju njihovu dobru održivost i pored relativno visokih pH vrednosti (5,6-6,0). Održivost fermentisanih polusuvih kobasica, čije su a_w vrednosti veće od 0,90, zasniva se pre svega na niskim (4,6-5,0) pH vrednostima (Vuković, 2006). Polusuve fermentisane kobasice trebalo bi čuvati na temperaturama do 15°C, a suve fermentisane kobasice na temperaturama do 25°C, u cilju kontrole značajnijih patogena kao što su *Salmonella enteritica*, *Staphylococcus aureus* i *Listeria monocytogenes* (Lücke, 1998).

Prema Pravilniku o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa (2019) fermentisane suve kobasice i fermentisane polusuve kobasice za narezivanje čuvaju se na temperaturi koju je odredio proizvođač, a upakovani naresci ovih kobasica na temperaturi od 0 do 7 °C. Fermentisane polusuve kobasice za mazanje čuvaju se na temperaturi od 0 do 7 °C.

Hemijske i fizičko-hemijske promene tokom skladištenja fermentisanih kobasica značajne su za njihovu održivost. Negativne promene kvaliteta tokom skladištenja fermentisanih kobasica ogledaju se u promeni boje, razvoju neprijatne arome i ukusa, presušivanja i gubitku težine (Toldra, 2007). Tokom skladištenja kobasica na sobnim temperaturama može doći i do neprihvatljivog povećanja koncentracije biogenih amina u proizvodu (Komprda i sar., 2004).

Ponekad se kao kriterijum za održivost proizvoda od mesa uzima odnos vlage i proteina poznat kao MPR odnos („moisture protein ratio“). Ovaj odnos je kod nekih suvomesnatih proizvoda 3,7:1, a može da bude i 0,75:1 („beef jerky“). Suve kobasice moraju da imaju prema FSIS standardu MPR odnos $\leq 3,1:1$, a pH vrednost $\leq 5,0$. Odnosi MPR za pojedine proizvode od mesa prikazani su u tabeli 2.1.

Tabela 2.1 MPR odnosi kod pojedinih proizvoda od mesa

Cepano sušeno meso	1,6:1	Ukrajinska kobasica	2,0:1
Sušena govedina	0,75:1	Dimljena govedina	2,03:1
Peperoni kobasica	1,6:1	Suva salama	1,9:1
Suva kobasica	1,9:1	Đenovljanska salama	2,3:1
Sušena svinjetina	3,25:1	Sicilijanska salama	2,3:1
Turinger kobasica	3,7:1	Italijanska salama	1,9:1
Sušeno meso	2,04:1	Konzervirana pečena govedina	2,25:1
Usoljena sušena govedina	2,04:1	Letnja kobasica	1,9:1

Izvor: Prilagođeno prema FSIS standardu (2005)

Za stabilnost (održivost) fermentisanih kobasica značajna je i količina soli (nitritna so) kao i upotreba starter kultura. Šećeri se dodaju u nadev fermentisanih kobasica, a pored drugih funkcija (ukus, smanjivanje a_w vrednosti) značajni su za rast bakterija koje se dodaju kao starter kulture, čime posledično dolazi do smanjenja pH vrednosti proizvoda usled fermentacije šećera.

Polusuve fermentisane kobasice sadrže 56,7% vode, MPR odnos je 3,28:1, sadržaj masti 21,2%, soli 3,4%, pH je 4,4, a a_w vrednost 0,964. Sa druge strane, suve kobasice

(peperoni), proizvod dobijen uz upotrebu starter kultura, sadrži 26,0% vode, MPR odnos je 1,4:1, sadržaj masti 46%, soli 4,05%, pH je 4,7, a a_w vrednost 0,896.

Fermentisane suve kobasice mogu da se svrstaju u proizvode za koje se koristi termin “shelf-stable products“ (SSP proizvodi) koji označava proizvod koji ne mora da se čuva u uslovima hlađenja ili zamrzavanja, a da pri tom ne menja senzorna svojstva. Često se ovi proizvodi čuvaju na „sobnoj“ temperaturi (ambijentalna temperatura) u odgovarajućim pakovanjima. Izuzetno, ukoliko su suve fermentisane kobasice narezane treba da se čuvaju pri temperaturama od 0 do 7 °C. Kod ovih proizvoda mogu da se kontrolišu (prate) oksidacioni procesi i spreči potencijalni rast plesni. Održivost ovih proizvoda može da ugrozi rast mikroorganizama, kao i oksidativne promene. Na njihovu održivost značajno utiče proizvodni proces koji treba da bude zasnovan na principima dobre proizvođačke prakse, dobre higijenske prakse, standardnim operativnim procedurama, HACCP sistemu, a sve u cilju smanjenja nivoa kontaminacije sirovine u toku proizvodnog procesa.

2.5. Kontaminacija fermentisanih kobasica sa *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes je mikroorganizam koji je široko rasprostranjen u životnoj sredini. Smatra se da su zemljište i voda primarni izvor kontaminacije biljaka, životinja, hraniva za životinje i hrane (Linke i sar., 2014). *L. monocytogenes* može mesecima da preživi u zemljištu, pa čak i da se umnožava pod povoljnim uslovima (Dowe i sar., 1997). Zemljište i druge površine na farmama su često kontaminirane sa *L. monocytogenes* i predstavljaju značajan izvor kontaminacije sirovina koje se koriste u izradi proizvoda (Nightingale i sar., 2004).

U protekloj deceniji opisano je nekoliko novih vrsta u okviru roda *Listeria*, koji danas obuhvata 17 vrsta (Orsi i Wiedmann, 2016). Od svih vrsta u okviru roda *Listeria*, *L. monocytogenes* je daleko najznačajnija sa stanovišta uticaja na zdravlje ljudi. Sledi je *L. ivanovii* koja se u retkim slučajevima može naći u hrani. Oralni put infekcije je najznačajniji i pretpostavlja se da je 99% slučajeva listerioze ljudi poreklom od hrane (Orsi i sar., 2011).

Sojeve *L. monocytogenes* možemo grupisati u četiri evolucione linije (I-IV) i 13 serotipova. Od toga su samo tri serotipa (1/2a iz linije II, 1/2b i 4b iz linije I) povezani sa

98% svih slučajeva listerioze kod ljudi (Orsi i sar., 2011). Sojevi serotipa 1 se najčešće identifikuju u hrani, ali su epidemije listerioze obično vezane za serotip 4 (Bunčić i sar., 2001).

Kontaminirana sirovina, kao i unakrsna kontaminacija tokom proizvodnje mogu uticati na prisustvo i koncentraciju *L. monocytogenes* u gotovom proizvodu. Uticaj kontaminirane sirovine se povećava obrnuto proporcionalno stepenu obrade namirnice, tako da je značajniji kod onih proizvoda koji se koriste sirovi ili delimično obrađeni i kod kojih proizvodni proces nije dovoljno efikasan da smanji ili eliminiše ovaj mikroorganizam iz gotovog proizvoda (EFSA, 2018). U ovim slučajevima kontaminirana sirovina lako uzrokuje kontaminaciju radnih površina. Smatra se da je najznačajniji put kontaminacije gotovog proizvoda preko radnih površina. Iz spoljašnje sredine, putem kontaminirane sirovine, životinja, prljavštine ili vode, *L. monocytogenes* se prenosi na radne površine u objektu za preradu hrane. Naročito su rizični periodi kada je higijenski nivo u objektu smanjen, kao na primer tokom izvođenja građevinskih radova i rekonstrukcija, kada *L. monocytogenes* uneta iz spoljne sredine kolonizuje radne površine u objektu (Reij i sar., 2004). Jednom prisutna na radnim površinama, bakterija se može raširiti po proizvodnom objektu putem aerosola, zaposlenih i kontaminiranih materijala. Faktori kao što su neodgovarajući dizajn opreme, adaptacija na uslove mikrosredine i formiranje biofilma mogu dovesti do perzistentne kontaminacije, koju je jako teško eliminisati (Carpentier i Cerf, 2011).

Efikasnost kontrolnih mera za eliminaciju patogena tokom procesa proizvodnje hrane spremne za konzumiranje zavisi od tipa hrane i proizvodnih koraka. Hrana spremna za jelo može biti i naknadno kontaminirana prilikom dalje obrade i rukovanja, kao što su koraci narezivanja i pakovanja, pri čemu se verovatnoća kontaminacije povećava sa povećanjem intenziteta daljeg rukovanja. Pri tome izvori kontaminacije mogu biti radne površine, oprema ili zaposleni koji rukuju sa hranom.

Naknadna kontaminacija proizvoda moguća je i u prodavnicama, restoranima ili drugim objektima u kojima se rukuje sa otpakovanom hranom radi pripreme za prodaju kranjem kupcu ili za posluživanje. *L. monocytogenes* je izolovana iz maloprodajnih objekata i smatra se da je široko rasprostranjena (Gombas i sar., 2003; Pradhan i sar., 2011). Rukovanje hranom u maloprodaji može dovesti do ukrštene kontaminacije sa jednog proizvoda na drugi, preko radnih površina, opreme ili od strane zaposlenih.

Pokazano je da delikatesne mesne prerađevine kojima je rukovano u maloprodaji imaju veći stepen kontaminacije od prethodno upakovanih proizvoda (FDA i FSIS, 2003).

Regulativom Evropske komisije br. 2073/2005 definisani su kriterijumi bezbednosti hrane u odnosu na prisustvo *Listeria monocytogenes* u hrani spremnoj za konzumiranje („Ready-To-Eat“ – RTE hrana). Ovaj propis je usklađen sa našim Pravilnikom o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa (Sl. glasnik RS br. 72/10). Pod hranom spremnom za konzumiranje podrazumeva se „hrana koju su proizvođač ili prerađivač namenili za ishranu ljudi bez potrebe za toplotnom obradom ili nekom drugom vrstom obrade, čiji bi cilj bio da se eliminiše ili svede na prihvatljiv nivo broj mikroorganizama od značaja“ (Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa, 2010). Fermentisane kobasice, kao kobasice koje su spremne za jelo bez dodatne pripreme, spadaju u ovu grupu proizvoda.

Nakon unošenja u organizam oralnim putem i prolaska kroz želudac, *L. monocytogenes* se umnožava u crevima, prolazi kroz intestinalnu barijeru, ulazi u krvotok i akumulira se u jetri i slezini. Odatle bakterija može ponovo ući u krvotok i dovesti do infekcije centralnog nervnog sistema ili do abortusa (Vazquez-Bolii sar., 2001). Kod osoba dobrog zdravstvenog stanja infekcija najčešće dovodi samo do pojave gastroenteritisa (Ooi i Lorber, 2005), čak i u slučaju kada je nivo kontaminacije u unetoj hrani visok (Dalton i sar., 1997).

U skladu se Odlukom br. 1082/2013 Evropskog Parlamenta i Saveta o ozbiljnim pretnjama po zdravlje, slučajevi invazivne listerioze kod ljudi se obavezno prijavljuju u državama EU i državama članicama Evropskog ekonomskog područja (Island, Norveška. Švajcarska i Lihenštajn). U toku 2013. godine, u državama članicama EU prijavljeno je 1,763 potvrđenih slučajeva listerioze i 191 smrtni slučaj. Broj prijavljenih slučajeva iznosio je 0,44 slučaja na 100,000 stanovnika, što je povećanje od 8,6% u odnosu na 2012. godinu. Uočeno je i statistički značajno povećanje trenda u odnosu na 2009., 2010. i 2011. godinu. U periodu od 2008. do 2015. godine, učestalost pojave infektivne listerioze povećala se sa 0,30 na 0,46 slučajeva na 100,000 stanovnika. U istom periodu broj prijavljenih slučajeva povećao se za 60%, sa 1,381 na 2,206 prijavljenih slučajeva. U 2015. godini prijavljeno je 270 potvrđenih smrtnih slučajeva u EU, što je najveći broj od 2008. godine (EFSA i ECDC, 2015).

Preko 70% slučajeva listerioze javlja se kod imunokompromitovanih pojedinaca, sa nekom hroničnom bolešću kao što su oboljenje jetre, rak ili dijabetes (Goulet i sar., 2012). Najveći broj prijavljenih slučajeva je kod starijih osoba od preko 65 godina, kao i kod male dece ispod godinu dana života (EFSA, 2018). Smatra se da je najverovatniji uzrok povećanja broja slučajeva listerioze u EU u periodu od 2008. do 2015. godine povećan broj osoba koje su podložnije pojavi oboljenja, uključujući i starije osobe (EFSA, 2018).

Najveći broj slučajeva listerioze su sporadični, tako da veliki broj ovih slučajeva ili ostaje nepotvrđen ili nije moguće utvrditi vezu sa hranom koja bi mogla biti izvor kontaminacije. Smatra se da je broj stvarnih slučajeva listerioze dvostruko veći od broja prijavljenih slučajeva, barem u Velikoj Britaniji i SAD (EFSA, 2018).

Direktiva EU o zoonozama br. 2003/99/EC obavezuje države članice da prikupljaju i prilažu podatke, između ostalog, i o pojavi epidemija zoonoza vezanih za hranu. U periodu od 2008. do 2015. godine u državama članicama EU i Evropske ekonomske zone prijavljeno je 37 potvrđenih epidemija listerioze, sa 525 obolelih, od čega je 182 zahtevalo bolničko lečenje, uz 37 smrtnih slučajeva (EFSA i ECDC, 2015). Ne karakterišu se sve epidemije teškom sistemskom formom listerioze. Na primer, u 2015. godini u Nemačkoj je prijavljena velika epidemija listerioze sa 159 potvrđenih slučajeva, od čega je za samo dva slučaja bilo potrebno bolničko lečenje (EFSA, 2018). Najveći broj ovih epidemija bio je prouzrokovan proizvodima životinjskog porekla, pre svega mlečnim proizvodima, ribom i morskim plodovima i mesom i mesnim prerađevinama. Ove tri kategorije hrane označene su kao uzrok u 59% potvrđenih epidemija. U proteklih nekoliko godina, pre svega u SAD, prijavljeno je nekoliko epidemija uzrokovanih hranom koja ranije nije smatrana hranom visokog rizika (Garner i Kathariou, 2016). U 2011. godini 147 prijavljenih slučajeva u SAD povezano je sa epidemijom za koju su dinje sa jedne farme u Koloradu potvrđene kao uzrok. U 2015. godini potvrđeno je 35 slučajeva oboljenja vezanih za konzumaciju karamelizovanih jabuka. Epidemija listerioze vezana za konzumaciju kontaminiranog sladoleda u SAD, jasno je pokazala je da i proizvodi koji ne podržavaju rast *L. monocytogenes* i imaju nizak nivo kontaminacije bakterijom mogu da budu uzročnik epidemije ukoliko je izložen posebno osetljiv deo populacije.

Na nivou EU, baza podataka Sistema brzog uzbunjivanja za hranu i hranivo (RASFF) daje podatke o vrstama hrane u kojima je nađena *L. monocytogenes*. Hrana spremna za jelo bilo je uključena u 91% od 760 obaveštenja vezanih za *L. monocytogenes* od 2008. godine (EFSA, 2018). Najveći broj obaveštenja bio je vezan za sledeće tri kategorije hrane: riba i proizvodi od ribe (N=282), mleko i mlečni proizvodi (N=186) i meso i mesne preradevine, izuzev mesa živine (N=112).

Prema podacima iz monitoringa ispunjenosti kriterijuma bezbednosti hrane koji se odnose na *L. monocytogenes* prikupljenim u državama članicama EU, u periodu od 2008. do 2015. godine (EFSA, 2018), pozitivni uzorci uzeti u objektima za preradu hrane, poreklom od proizvoda spremnih za jelo koji uključuju i fermentisane kobasice činili su između 0% i 0,6% od ukupnog broja uzoraka.

Prevalenca *L. monocytogenes* u proizvodima od mesa na kraju roka trajanja procenjena je na 2,07%, dok je procenjena prevalenca u uzorcima proizvoda od ribe 1,7%, a 0,47% u mlečnim proizvodima. Procenjeno je i da procenat uzoraka proizvoda od mesa u kojima broj *L. monocytogenes* na kraju roka trajanja prelazi granicu od 100 CFU/g iznosi 0,43% (EFSA, 2013).

Prema navodima iz literature (Thévenot i sar., 2005a) u slučaju kontaminacije fermentisanih kobasica, broj *Listeria monocytogenes* se obično smanjuje tokom zrenja, pre svega zbog procesa sušenja. Takođe, ukazano je da poreklo *L. monocytogenes*, odnosno prilagođenost supstratu u značajnoj meri utiču na rast u nadevu fermentisanih kobasica. Sojevi *L. monocytogenes* koji su dobro prilagođeni supstratu (izolovani iz kobasica) pokazali su se kao otporniji (smanjenje 1,5 log₁₀) od neadaptiranih sojeva (smanjenje 3 log₁₀) do 35. dana zrenja (Thévenot i sar., 2005b).

Procena rizika za pojavu *L. monocytogenes* u delikatesnim proizvodima od mesa predviđa da se 63-84% slučajeva listerioze kod ljudi vezanih za delikatesne proizvode od mesa može povezati sa narezivanjem proizvoda u maloprodaji (Gombas i sar., 2003; FSIS, 2010; Pradhan i sar., 2011). Ukrštena kontaminacija u maloprodaji sa druge hrane ili radnih površina najznačajniji je faktor koji utiče na relativni rizik od pojave listerioze i smrtnih slučajeva koji se mogu povezati sa listeriozom (Pradhan i sar., 2011). Proizvodi narezani u maloprodaji predstavljaju dva do četiri puta veći rizik od unapred upakovanih narezanih proizvoda (Endrikat i sar., 2010; Gallagher i sar., 2013).

L. monocytogenes može opstati mesecima ili čak godinama na površinama u objektu za proizvodnju hrane, uključujući i rashladne komore (Møretrø i Langsrud, 2004; Keto-Timonen i sar., 2007). Još uvek nije u potpunosti razjašnjeno u kojoj meri je *L. monocytogenes* sposobna da formira biofilm (Barbosa dos Reis-Teixeira i sar., 2017), s obzirom da je većina ispitivanja na ovu temu sprovedena u laboratorijskim uslovima koji ne odgovaraju stvarnim uslovima u proizvodnom pogonu, pri čemu su neki od sojeva bili u stanju da formiraju biofilm, dok drugi nisu (Borucki i sar., 2003).

L. monocytogenes sposobna je da opstane u širokom rasponu temperaturnih uslova (2-45 °C), i to tako što dolazi do promene u sastavu masnih kiselina u ćelijskoj membrani (Annous i sar., 1997). Adaptacija na hladnoću ovog mikroorganizma je od naročtog značaja, s obzirom da mu omogućava preživljavanje i rast kako u industrijskim hladnjačama u objektima za proizvodnju hrane, tako i u kućnim frižiderima u domaćinstvu. *L. monocytogenes* poseduje više mehanizama koji joj omogućavaju otpornost na hladnoću, uključujući i grupu proteina koji joj omogućavaju adaptaciju, kao i sposobnost akumulacije krioprotektanata, kao što su alicin-betain i karnitin (Tasara i Stephan, 2006). Sposobna je da preživi, pa i da raste, na vrednostima pH od 4,1 do 9,6 (Lungu i sar., 2009). Aktiviranje sistema odgovora za podnošenje kisele sredine (ATR sistem) i sistema glutamat-dekarboksilaze (GAD sistem) omogućava ovoj bakteriji preživljavanje i adaptaciju na uslove niskog pH i do vrednosti 3,5 (O'Driscoll i sar., 1996; Cotter i sar., 2001).

L. monocytogenes je dobro adaptirana i na osmotski stres, posebno na visoke koncentracije soli (Gihi i Chikindas, 2007). Uticaj gubitka vode i stresa od isušivanja nije dovoljno proučen (Burgess i sar., 2016), ali su pozitivni uzorci izolovani iz većeg broja proizvoda sa niskom aktivnošću vode.

Danas se smatra da značajnu ulogu u otpornosti *L. monocytogenes* ima prateći genom bakterije (lociran na plazmidima i drugim pokretnim elementima kao što su transpozoni) i da se očuvanjem i prenošenjem pratećeg genoma može objasniti razlika u otpornosti bakterija različitih sojeva (Fagerlund i sar., 2016), s obzirom da je utvrđeno da je osnovni genom bakterije stabilan (Kuenne i sar., 2013; Moura i sar., 2017).

Distribucija *L. monocytogenes* i *Listeria* spp. u fermentisanim kobasicama prikazana je u tabeli 2.2.

Tabela 2.2 Distribucija *L. monocytogenes* i *Listeria* spp. u fermentisanim kobasicama

Meseci (2004-2005)	Broj uzoraka	Uzorci pozitivni na <i>Listeria</i>	Uzorci pozitivni na <i>L. monocytogenes</i>	Pozitivno na <i>Listeria</i> (%)	Pozitivno na <i>L. monocytogenes</i> (%)
Februar-mart	50	6	4	12	8
April-maj	50	10	5	20	10
Jun-jul	50	8	3	16	6
Avgust-septembar	50	10	8	20	16
Oktobar-novembar	50	16	9	32	18
Decembar-januar	50	13	6	26	12
Ukupno	300	63	35	21	11,6

Izvor: Colak i sar., 2005

2.6. Bakteriocini

Bakteriocini su proizvodi bakterija mlečne kiseline, ribozomalno sintetisani proteini ili peptidi, koji deluju antimikrobno na srodne bakterije (Tagg i sar., 1976). Proteinska priroda bakteriocina podrazumeva osetljivost na proteolitičke enzime, kao što su tripsin, a-himotripsin i pepsin, što se koristi kao jedan od testova prilikom karakterizacije novotkrivenih bakteriocina.

Sa primenom bakteriocina nizina kao aditiva počelo se još pedesetih godina prošlog veka, a 1998. godine odobrena je njegoova upotreba u pasterizovanim prerađenim sirnim namazima u SAD od strane Agencije za hranu i lekove (FDA). Do danas je nizin ostao komercijalno najznačajniji bakteriocin, iako su u međuvremenu otkriveni i testirani i drugi bakteriocini (Chikindas i Montville, 2002). Bakteriocini poreklom od bakterija mlečne kiseline imaju prednost u upotrebi u prehrambenim proizvodima, s obzirom da se bakterija mlečne kiseline i njihovi metaboliti već generacijama koriste i konzumiraju putem hrane. Pored toga što se bakterije mlečne kiseline i njihovi metaboliti smatraju bezbednim za upotrebu u hrani, bakteriocini poreklom od bakterija mlečne kiseline su i efikasni protiv značajnih gram-pozitivnih patogena, uključujući *L. monocytogenes*.

Proizvodnja bakteriocina evolucioni je mehanizam koji pomaže bakterijama da se izbore sa konkurencijom u određenoj ekološkoj niši (Dykes, 1995). Bakteriocini su samo jedna od kategorija substanci koje bakterije proizvode, a koje su inhibitorne prema drugim bakterijama i imaju sličnu ulogu kao i antibiotici, toksini, bakteriolitički enzimi, bakteriofagi, kao i neki proizvodi bakterijskog metabolizma kao što su organske kiseline, vodonik peroksid i diacetil.

Uobičajen metod za ispitivanje aktivnosti bakteriocina je upotrebom agar podloge na Petrijevim pločama. Postoji više varijanti ovih testova, od kojih je test direktne simulacije najjednostavniji. U ovom testu se bakteriocin proizvodeća i indikatorska kultura inkubiraju direktno na podlogu, nakon čega se prati zona inhibicije. Složenije metode omogućavaju izolovanje promjenljivih kao što su vreme i uslovi inkubacije i često su osjetljivije od direktnog testa vrste (Tagg i sar., 1976).

Prvi opisani bakteriocini bili su poreklom od gram-negativnih bakterija. „Princip V“ koji je 1925. otkrio Gratia, proizvodio je jedan soj *E. coli*, sa inhibitornim dejstvom na drugi soj iste bakterije. Izraz „kolicin“ danas označava bakteriocine koje proizvode *E. coli* i srodne *Enterobacteriaceae* (Konisky, 1982). Bakteriocini poreklom od gram-pozitivnih bakterija otkriveni su nešto kasnije i po nekim svojim osobinama razlikuju se od bakteriocina poreklom od gram-negativnih bakterija. Za razliku od bakteriocina poreklom od gram-negativnih bakterija, bakteriocini gram-pozitivnih bakterija obično nemaju određeni receptor za koji se vezuju, obično su niže molekularne mase i imaju širi spektar ciljanih bakterija sa različitim mehanizmima oslobađanja i ćelijskog transporta.

Većina bakteriocina poreklom od bakterija mlečne kiseline su katjonski, hidrofobni ili amfifilni molekuli, sastavljeni od 20 do 60 amino kiselina (Nes i Holo, 2000). Ovi bakteriocini se obično klasifikuju u 3 grupe, koje uključuju i bakteriocine poreklom od drugih gram-pozitivnih bakterija.

Bakteriocini se mogu aplikovati kao sirovi, prečišćeni ili delimično prečišćeni, ili se mogu dodati bakteriocinogen proizvodeći sojevi bakterija (O’Sullivan i sar., 2002).

2.7. Uticaj bakteriocinogenih starter kultura na *Listeria monocytogenes*

Smatra se da delotvornost bakteriocinogenih starter kultura u kontroli *L. monocytogenes* u velikoj meri zavisi od supstrata u kojem se primjenjuju, kao i od uspostavljanja optimalnih uslova u kojima bi mogli ispoljiti svoju optimalnu aktivnost (Hugas i sar., 1997).

Zaključeno je da na proizvodnju bakteriocina utiče veliki broj faktora sredine, kao što su temperatura, pH, kompetitivna mikroflora, nivo CO₂, soli, nitrita i drugo (Gálvez i sar., 2007). Primena bakteriocinogenih starter kultura sama po sebi ne garantuje da će doći do proizvodnje bakteriocina u nadevu već se moraju obezbediti i optimalni uslovi za njihov rast. U svom ispitivanju Yang i Ray (1994) su zaključili da optimalni uslovi rasta dovode do veće proizvodnje nizina od strane *L. lactis*, pediocina AcH od *P. acidilactici*, leukonocina Lcm1 od *Leuconostoc carnosum* Lm1 i sakacina A od *L. sakei* Lb 706.

Kouakou i sar. (2009) su pokazali da nitrit značajno redukuje proizvodnju bakteriocina od strane *L. curvatus* CWBI-B28 u svinjskom mesu. Proizvodnja bakteriocina od strane *L. buchneri* je u najvećoj meri uslovljena temperaturom, kao i sastavom atmosfere, pri čemu su temperatura od 30°C i atmosfera sa 100% N₂ dali najbolje rezultate (Minor-Pérez i sar., 2005). Aymerich je sa saradnicima (2000) ispitivao uticaj začina i aditiva na proizvodnju enterocina od strane *E. faecium* CTC 492. Pokazali su da je kod testiranih dadataka (soli, nitrata, nitrita i crnog bibera), osim kod nitrata, smanjena produkcija enterocina A i B.

S druge strane, pokazano je stres uzrokovan dodavanjem umerene količine soli stimuliše proizvodnju bakteriocina od strane *Lactobacillus pentosus* B96 (Delgado i sar., 2005) i *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 (Neysens i sar., 2003). Stres uzrokovan prisustvom kompetitivnih Gram-pozitivnih organizama povećao je sintezu plantaricina od strane *L. plantarum* (Maldonado i sar., 2004).

Predložena je upotreba bakteriocinogenih bakterija prirodno prisutnih u određenim proizvodima kao starter kultura, iz razloga što su visoko adaptirane na tu sredinu (Villani i sar., 2007) i mogu proizvoditi značajne količine bakteriocina (Työppönen i sar., 2003). Albano je sa saradnicima (2007) ispitao antimikrobni kapacitet 226 sojeva bakterija mlečne kiseline izolovanih iz tipične prirodno fermentisane portugalske kobasice. Ovi sojevi su testirani protiv patogena kao što su *L. monocytogenes*,

S. aureus, *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* i *Salmonella enteritidis*. Pokazano je da je 14 sojeva imalo antimikrobnu aktivnost protiv *L. monocytogenes*, 4 soja su bili aktivni protiv *S. aureus*, dok ni jedan od sojeva nije bio aktivan protiv Gram-negativnih bakterija. I autori koji su ispitivali efekat sojeva laktobacila i pediokoka izolovanih iz turskog sudžuka pokazali su da imaju inhibitornu aktivnost prema *L. monocytogenes* i preporučena je upotreba ovih sojeva kao starter kultura u proizvodnji sudžuka (Çon i sar., 2001; Cosansu i sar., 2010).

Talon sa saradnicima (2008) je ispitivao efekte upotrebe autohtonih bakterija mlečne kiseline kao starter kultura u francuskim suvim kobasicama. Izolovali su i identifikovali tri soja (*L. sakei*, *Staphylococcus equorum* i *Staphylococcus succinus*), koje su iskoristili kao starter kulture u izradi proizvoda koje su uporedili sa tradicionalnim kobasicama kod kojih je fermentacija bila prirodna. Zaključili su da je upotrebom autohtonih starter kultura smanjen nivo štetnih biogenih amina u proizvodu, značajno smanjena oksidacija masti i da je populacija *L. monocytogenes* zadržana ispod propisanog nivoa, bez uticaja na senzorne osobine proizvoda.

U istraživanju Lahti i sar. (2001) primenjene su bakteriocinogene starter kulture *Pc. acidilactici* PA-2 i *Lb. bavaricus* MI-401 u kombinaciji sa *Staphylococcus xylosus* DD-34 i nebakteriocinogena starter kultura *Lb. curvatus* Lb3 sa *Staphylococcus carnosus* MIII u proizvodnji fermentisanih kobasica inokuliranih različitim koncentracijama *L. monocytogenes* (5,05-5,41; 2,92-3,35 log CFU/g). Kod kobasica s manjim stepenom kontaminacije *L. monocytogenes* nije utvrđena u gotovom proizvodu (zrenje 49 dana), dok je veći inicijalni broj *L. monocytogenes* uslovio i njen nalaz na kraju zrenja. Međutim, upotrebom bakteriocinogenih starter kultura zabeležena je značajno veća redukcija patogena u nadevu (< 2 log CFU/g nakon 21. dana zrenja).

Työppönen i sar. (2003) su uporedili efikasnost komercijalne starter kulture *Pc. pentosaceus* RM2000 i probiotskih zaštitnih kultura *Lb. rhamnosus* E-97800, *Lb. rhamnosus* LC-705 i *Lb. plantarum* ALCO1 u inhibiciji *L. monocytogenes* u severnoevropskom tipu fermentisanih kobasica. U uzorcima sa pH 5,0-5,2 *L. monocytogenes* je eliminisana iz nadeva do 21. dana zrenja (od 28 dana) nezavisno od vrste primenjene starter kulture. Pri nižem pH (4,7 – 4,9) zabeležena je brža eliminacija patogena upotrebom zaštitnih kultura (7. dana) nego u kobasicama proizvedenim s komercijalnom starter kulturom *Pc. pentosaceus* RM2000 (28. dana). Navedene razlike u

stupnju inhibicije patogena autori pripisuju uticaju brojnih faktora, među njima i pH, na aktivnost antimikrobnih produkata (bakteriocina i drugih inhibitora malih molekulskih masa) u nadevu.

3. CILJ I ZADACI ISPITIVANJA

Cilj ispitivanja u okviru ove doktorske disertacije bio je da se ispita efikasnost primene odabranih bakteriocinogenih starter kultura, selekcionisanih bakterijskih vrsta i sojeva definisanog genetskog porekla, kao potencijalnih inhibitora *Listeria monocytogenes* u fermentisanim kobasicama. Pri tome su korišćene starter kulture - jedna komercijalna, koja se već upotrebljava u praksi (starter kultura A - *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus carnosus* i *Staphylococcus xylosus*), dok je druga formulisana za primenu u proizvodnji fermentisanih kobasica i stvara bakteriocine pediocin i bavaricin, a koji deluju inhibitory na *L. monocytogenes* (starter kultura B - *Dabaryomyces hensenii*, *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus carnosus* i *Staphylococcus xylosus*).

Za ostvarenje ovog cilja, u kontrolisanim proizvodnim uslovima, tokom sušenja fermentisanih kobasica dijametara 55 mm i 30 mm, u trajanju do 41 dan, odnosno 18 dana, pri prosečnoj temperaturi od 17°C i relativnoj vlažnosti vazduha od 75%, kontaminiranih koktelom različitih sojeva *Listeria monocytogenes*, u koje su u toku procesa pripreme nadeva i punjenja u omotače dodate starter kulture, praćene su promene broja bakterija *Listeria monocytogenes*.

Takođe, tokom proizvodnog procesa praćen je ukupan broj enterobakterija i broj bakterija mlečne kiseline.

U okviru ove doktorske disertacije pored mikrobiološkog statusa, praćene su i promene odabranih fizičko-hemijskih parametara kvaliteta (pH, a_w vrednost) i hemijski sastav (sadržaj vode, masti, proteina, pepela) fermentisanih kobasica.

4. MATERIJAL I METODE ISPITIVANJA

4.1. Priprema inokuluma

Četiri soja *L. monocytogenes*, serotip 4b ATCC 19115, serotip 4b NCTC 11994 (www.atcc.org), serotip 4b NCTC 11994 i serotip 1/2a prethodno izlovan iz dimljenog lososa, inokulisani su u fermentisane kobasice. Sojevi su uzgajani dva puta u BHI infuziji srca i mozga (Oxoid, UK), nakon čega su inkubirani na 37 °C tokom 24 sata, a zatim razblaženi sa BHI kako bi se postigla krajnja koncentracija od 10⁶ CFU/ml. Željena koncentracija bakterijskih ćelija u suspenziji procenjena je McFarli-ovom skalom. Kombinovanjem jednakih delova standardizovanih suspenzija ćelija pripremljen je koktel sa približno 6 log CFU/ml od svakog soja.

4.2 Izrada kobasica, inokulacija patogena i uzorkovanje

Fermentisane kobasice korišćene u ispitivanju pripremljene su od mlevenog svinjskog mesa (75%) i svinjskog masnog tkiva (25%) od svinja istog porekla, mešavine rasa Jorkšir i Landras, zaklanih u lokalnoj klanici. Zamrznuto meso i masno tkivo su samleveni do veličine od 8 mm i umešani sa 2,3% nitritne soli (mešavina 0,6% natrijum nitrita i 99,4% NaCl) i mešavinom začina "Čajna nova" (4 g/kg; Raps, Austrija). Pripremljena mešavina inokulisana je sa koktelom *L. monocytogenes*. Koktel sa patogenom dodat je postepeno u masu za punjenje tokom mešanja, kako bi se osigurala ravnomerna distribucija inokuluma i krajnja koncentracija od 10⁶ CFU/g. Nakon inokulacije patogena, smesa za punjenje kobasica podeljena je u tri jednaka dela. Jedan deo smese je ostavljen bez starter kulture (kontrola), u jedan deo je dodata starter kultura (Biostart Sprint, RAPS GMBH, Obertrum, Austria) sa *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus carnosus* i *Staphylococcus xylosus* (grupa E1) i u jedan deo je dodata starter kultura (BACTOFERM™ BLC-007, The Craft Butchers Pantry, US) sa *Debaryomyceshenseni*, *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus carnosus* i *Staphylococcus xylosus* (grupa E2). Pripremljena masa za punjenje napunjena je na vakuum punilici u kolagene omotače prečnika 55mm i 30 mm, tako da su dobijene 42 kobasice od po približno 450g u svakoj grupi. Kobasice

su hladno dimljene tokom 8 sati pri temperaturi 20-23 °C, a zatim su sazrevale u klimakomori tokom 41 dan, na temperaturi od 17 °C, sa relativnom vlažnošću vazduha od 80-85%. Uzorkovanje je sprovedeno 0., 3., 7., 14., 18., 21., 31. i 41. dana i uzorci su podvrgnuti mikrobiološkim analizama i merenju pH.

4.3 Mikrobiološke analize

Za mikrobiološke analize omotači su aseptično uklonjeni, a zatim je uzorak kobasice od 10 g dodat u 90 ml sterilnog BPW (Buffered Peptone Water) rastvora i homogenizovan u blenderu (Stomacher 400 Circulator, Seward, UK) tokom 2 minuta. Pripremljena su serijska decimalna razblaženja i 1 ml ili 0,1 ml od odgovarajućeg razblaženja su izliveni na podlogu radi prebrojavanja. Brojanje *L. monocytogenes* izvršeno je na Ottaviani i Agosti listerija agaru (ALOA, Oxoid), nakon inkubacije na 37 °C tokom 24 h (ISO 11290-2:2017). Bakterije mlečne kiseline prebrojavane su na MRS agaru (Merck, Germany) nakon inkubacije na 37 °C tokom 24 h (ISO 21528-2:2017). Nakon inkubacije, ploče su vizualno pregledane kako bi se uočile tipične kolonije, određen je broj kolonija i rezultati su zabeleženi kao broj jedinica sposobnih da formiraju kolonije po gramu (CFU/g).

4.5 Metode ispitivanja

Mikrobiološke metode su podrazumevale ispitivanje:

1. Određivanje prisustva i određivanje broja *Listeria monocytogenes* i *Listeria spp.* prema ISO 11290-2:2017, Mikrobiologija lanca hrane - Horizontalna metoda za otkrivanje i određivanje broja *Listeria monocytogenes* i *Listeria spp.*. Deo 2: Metoda određivanja broja.
2. Određivanje broja bakterija iz familije *Enterobacteriaceae* prema ISO 21528-2:2009, Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalna metoda za otkrivanje i određivanje broja *Enterobacteriaceae* - Deo 2: Metoda brojanja kolonija;
3. Određivanje broja bakterija mlečne kiseline prema metodi ISO 15214:1998 (MRS, Merck);

Za ispitivanje osnovnog hemijskog sastava i fizičko hemijskih osobina korišćene su sledeće metode:

1. Određivanje sadržaja vode - određivanje gubitka mase pri sušenju homogenizovanog uzorka pri 105 ± 1 °C do konstantne mase (SRPS ISO 1442:1998)
2. Određivanje sadržaja masti - metoda po Soxhletu, ekstrakcijom masti iz osušenog uzorka petrol etrom, destilacijom i sušenjem pri 105 ± 1 °C do konstantne mase (SRPS ISO 1443:1992)
3. Određivanje sadržaja proteina - metoda po Kjeldalh-u primenom uređaja firme "Tecator" (SRPS ISO 937:1992)
4. Određivanje pepela- sagorevanje uzorka pri 550 °C do konstantne mase (SRPS ISO 936: 1999)
5. Određivanje sadržaja nitrita- po metodi SRPS ISO 2198 (1999)
6. Određivanje vrednosti pH uzoraka fermentisanih kobasica - korišćena je direktna metoda ubodnim pH- metrom Testo 150 (Testo, Nemačka), prema uputstvu proizvođača
7. Određivanje a_w vrednost prema postupku Giménez i Dalgaard (2004)
8. Određivanje natrijum hlorida- metoda po Volhardu SRPS ISO 1841-1 (1999).

4.6 Statistička obrada rezultata

Ispitivanje je organizovano u vidu 3x7 (3 tretmana, 7 dana uzorkovanja) sa 6 ponavljanja za svaki tretman. Brojevi bakterija (CFU/g) prenešeni su u logaritme (log) i zatim statistički analizirani. Statistička analiza rezultata sprovedena je upotrebom softvera GraphPad Prism verzija 6.00 za Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com). Rezultati su izraženi kao srednja vrednost±standardna devijacija i prikazani tabelarno. Uticaj različitih starter kultura tokom perioda zrenja procenjen je jednofaktorijalnom analizom varijanse (ANOVA) sa Tukey testom višestrukog poređenja sa nivoom sigurnosti od 95% (razlika se smatra značajnom ukoliko je $p<0,05$).

U statističkoj analizi dobijenih rezultata izvedenog eksperimenta, kao osnovne statističke metode korišćeni su deskriptivni statistički parametri (aritmetička sredina, standardna devijacija, standardna greška, minimalna vrednost, maksimalna vrednost i koeficijent varijacije).

Za testiranje i utvrđivanje statistički značajnih razlika između ispitivanih grupa korišćena su dva testa. Za ispitivanje značajnosti razlika između srednjih vrednosti dve ispitivane grupe korišćen je t-test. Za ispitivanje značajnosti razlika između tri i više posmatranih tretmana korišćen je grupni test, ANOVA, a zatim su pojedinačnim Tukey testom ispitane statistički značajne razlike između tretmana. Značajnost razlika utvrđena je na nivoima značajnosti od 5% i 1%. Svi dobijeni rezultati prikazani su tabelarno i grafički.

5. REZULTATI ISPITIVANJA

5.1 Ispitivanje promene broja bakterija *Listeria monocytogenes* u uzorcima fermentisanih kobasica tokom zrenja

U nadevu fermentisanih kobasica na početku ispitivanja prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* kod kontaminiranih fermentisanih kobasica (grupa K – kontrolna grupa bez dodate starter kulture, E1 – grupa sa dodatom starter kulturom sa *Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus carnosus* i *Staphylococcus xylosus* i E2 - grupa sa dodatom starter kulturom sa *Debaryomyces hansenii*, *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Staphylococcus carnosus* i *Staphylococcus xylosus*) bio je od $6,30 \pm 0,02$ do $6,35 \pm 0,05$ log CFU/g (tabela 5.1 i grafikon 5.1). Između prosečnog broja bakterija u nadevu fermentisanih kobasica nultog dana ispitivanja nije utvrđena statistički značajna razlika. Rezultati ispitivanja promene broja bakterija *Listeria monocytogenes* u fermentisanim kobasicama užeg i šireg dijametra prikazani su u dva odvojena potpoglavlja.

5.1.1 Ispitivanje promene broja bakterija *Listeria monocytogenes* u uzorcima fermentisanih kobasica užeg dijametra tokom zrenja

Trećeg dana ispitivanja prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* u uzorcima fermentisanih kobasica užeg dijametra bio je od $6,16 \pm 0,01$ do $6,20 \pm 0,02$. Razlike između prosečnog broja bakterija *L. monocytogenes* između ispitivanih grupa fermentisanih kobasica nisu bile statistički značajne. Prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* sedmog dana ispitivanja kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica užeg dijametra ($4,90 \pm 0,05$ log CFU/g) bio je statistički značajno veći ($p < 0,05$) od prosečnog broja bakterija *L. monocytogenes* E1 grupe ($4,50 \pm 0,06$ log CFU/g), odnosno E2 grupe ($4,35 \pm 0,04$ log CFU/g). U nadevu fermentisanih kobasica užeg dijametra 14. dana ispitivanja prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* bio je od $2,02 \pm 0,03$ log CFU/g (E2 grupa) do $2,78 \pm 0,02$ log CFU/g (kontrolna grupa fermentisanih kobasica). Na kraju procesa zrenja u nadevu fermentisanih kobasica užeg dijametra nije utvrđeno prisustvo *L. monocytogenes*, odnosno broj bakterija *L. monocytogenes*.

Tabela 5.1. Broj *L. monocytogenes* (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama užeg dijametra tokom zrenja ($\bar{X} \pm Sd$)

Dan zrenja	Kontrola	Grupa E1	Grupa E2
0	6,35±0,05 ^A	6,33±0,03 ^A	6,30±0,02 ^A
3	6,17±0,04 ^A	6,20±0,02 ^A	6,16±0,01 ^A
7	4,90±0,05 ^A	4,50±0,06 ^B	4,35±0,04 ^B
14	2,78±0,02 ^B	2,32±0,02 ^B	2,02 ±0,03 ^C
18	<2	<2	<2

U svakom redu, vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{A,B,C} p<0.05;

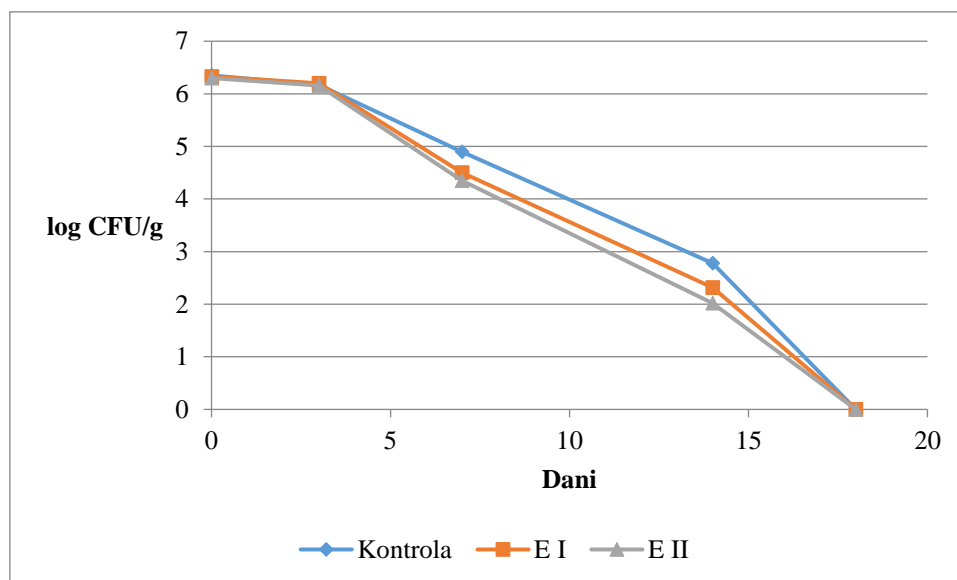
Kontrolna grupa – fermentisane kobasice bez dodate starter kulture

Grupa E1 – fermentisane kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom

Grupa E2 – fermentisane kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom

Grafikonom 5.1 prikazan je trend promene broja bakterija *L. monocytogenes* kod kontrolne i eksperimentalne grupe fermentisanih kobasica užeg dijametra. Trend promene broja bakterija *L. monocytogenes* kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica definisan je jednačinom $y = -0,346x + 6,947$, pri čemu je $R^2 = 0,946$, kod E1 grupe jednačinom $y = -0,355x + 6,852$, pri čemu je $R^2 = 0,970$ i kod E2 grupe jednačinom $y = -0,359x + 6,785$, pri čemu je $R^2 = 0,979$.

Od nultog do trećeg dana proizvodnje log CFU/g broja bakterija *L. monocytogenes* u fermentisanim kobasicama užeg dijametra smanjen je za 0,18 (kontrolna grupa), odnosno za 0,13 (E1 grupa) i 0,14 (E2 grupa). U odnosu na nulti dan, sedmog dana proizvodnje log CFU/g broja bakterija *L. monocytogenes* kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica užeg dijametra smanjen je za 1,45, kod E1 grupe za 1,83 i kod E2 grupe za 1,95, da bi u odnosu na nulti dan 14. dana zrenja smanjenje broja bakterija *L. monocytogenes* bilo kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica užeg dijametra 3,57, kod E1 grupe 4,01 i kod E2 grupe 4,28.



Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture ($y = -0,346x + 6,947$; $R^2 = 0,946$); E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom ($y = -0,355x + 6,852$; $R^2 = 0,970$); E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom ($y = -0,359x + 6,785$; $R^2 = 0,979$).

Grafikon 5.1 Trend promene broja *L. monocytogenes* (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama užeg dijametra tokom ispitivanja

5.1.2 Ispitivanje promene broja bakterija *Listeria monocytogenes* u uzorcima fermentisanih kobasica šireg dijametra tokom zrenja

U nadevu fermentisanih kobasica šireg dijametra broj bakterija *L. monocytogenes* na početku ispitivanja (nultog dana) bio je identičan broju bakterija kod fermentisanih kobasica užeg dijametra, budući da se radilo o istom nadevu koji je posle pripreme punjen u omotače dva različita dijametra (uži i širi). Trećeg dana ispitivanja prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* u nadevu fermentisanih kobasica šireg dijametra bio je u kontrolnoj grupi kobasica $6,22 \pm 0,08$ log CFU/g i bio je statistički značajno veći ($p < 0,05$) od prosečnog broja bakterija *L. monocytogenes* u nadevu fermentisanih kobasica E2 grupe ($6,09 \pm 0,02$ log CFU/g). Prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* u nadevu fermentisanih kobasica E1 grupe ($6,16 \pm 0,08$ log CFU/g) nije se statistički značajno razlikovao od prosečnog broja bakterija *L. monocytogenes* u nadevu fermentisanih kobasica kontrolne i E2 grupe. Prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* sedmog dana ispitivanja bio je od $4,23 \pm 0,07$ log CFU/g (E2 grupa) do $5,00 \pm 0,10$ log CFU/g (kontrolna grupa). Između prosečnog broja bakterija *L. monocytogenes* sedmog dana ispitivanja u

fermentisanim kobasicama šireg dijametra utvrđene su statistički značajne razlike ($p < 0,05$). Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između broja bakterija 14. dana ispitivanja utvrđene su takođe između sve tri grupe fermentisanih kobasica šireg dijametra. Prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* u fermentisanim kobasicama šireg dijametra bio je od $2,15 \pm 0,05$ log CFU/g (E2 grupa) do $4,11 \pm 0,05$ log CFU/g (kontrolna grupa). Prosečan broj bakterija *L. monocytogenes* u nadevu kontrolne grupe fermentisanih kobasica šireg dijametra 21. dana bio je $2,06 \pm 0,08$ log CFU/g. Istog dana ispitivanja broj bakterija *L. monocytogenes* u nadevu fermentisanih kobasica šireg dijametra E1 i E2 grupe bio je ispod praga detekcije. U daljem procesu zrenja, to jest 31., odnosno 41. dana, *L. monocytogenes* nije utvrđena u nadevu ispitivanih grupa fermentisanih kobasica šireg dijametra. Rezultati ispitivanja prisustva *L. monocytogenes* u fermentisanim kobasicama šireg dijametra prikazani su u tabeli 5.2.

Tabela 5.2. Broj *L. monocytogenes* (logCFU/g) u fermentisanim kobasicama šireg dijametra tokom zrenja ($\bar{X} \pm Sd$)

Dan zrenja	Kontrola	Grupa E1	Grupa E2
0	$6,35 \pm 0,12$	$6,33 \pm 0,07$	$6,30 \pm 0,06$
3	$6,22^A \pm 0,08$	$6,16^{AB} \pm 0,08$	$6,09^B \pm 0,02$
7	$5,00^A \pm 0,10$	$4,41^B \pm 0,02$	$4,23^C \pm 0,07$
14	$4,11^A \pm 0,07$	$2,44^B \pm 0,06$	$2,15^C \pm 0,05$
21	$2,06 \pm 0,08$	<2	<2
31	<2	<2	<2
41	<2	<2	<2

U svakom redu, vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{A,B,C} $p < 0,05$;

Kontrolna grupa – fermentisane kobasice bez dodate starter kulture

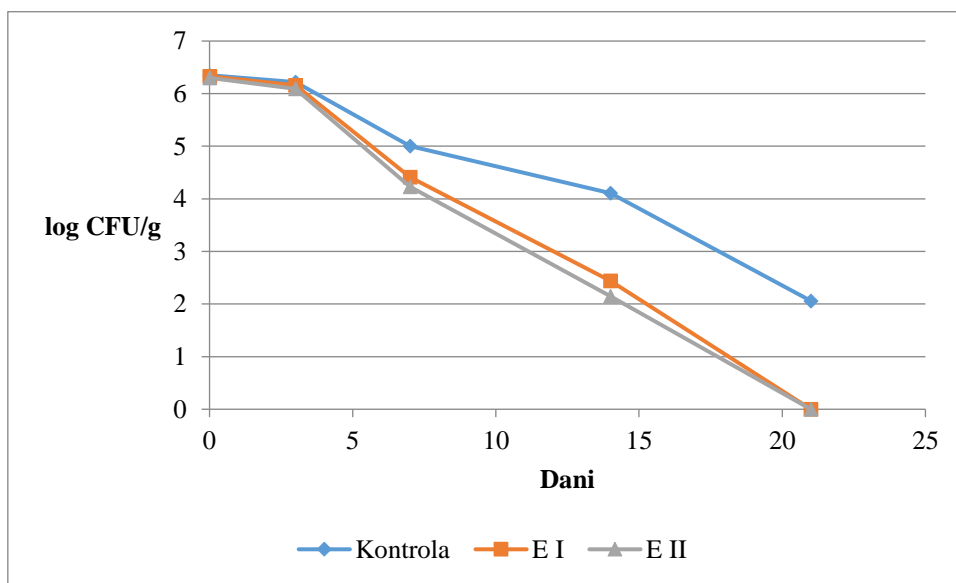
Grupa E1 – fermentisane kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom

Grupa E2 – fermentisane kobasice sa dodatom BACTOFORM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom

Trend promene broja bakterija *L. monocytogenes* u fermentisanim kobasicama šireg dijametra tokom zrenja prikazan je grafikonom 5.2. Promena broja bakterija *L. monocytogenes* u fermentisanim kobasicama šireg dijametra kontrolne grupe definisana je jednačinom $y = -0,204x + 6,585$, pri čemu je $R^2 = 0,972$, kod fermentisanih kobasica

E1 grupe jednačinom $y = -0,312x + 6,678$, pri čemu je $R^2 = 0,988$, i kod fermentisanih kobasica E2 grupe jednačinom $y = -0,313x + 6,576$, pri čemu je $R^2 = 0,989$.

Broj bakterija *L. monocytogenes* prikazan kao log CFU/g smanjuje se od nultog do trećeg dana zrenja kod fermentisanih kobasica kontrolne grupe za 0,13, kod fermentisanih kobasica E1 grupe za 0,17 i kod fermentisanih kobasica E2 grupe za 0,21. Smanjenje broja bakterija *L. monocytogenes* izraženo kao log CFU/g sedmog dana zrenja bilo je kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica u odnosu na nulti dan 1,35, kod E1 grupe 1,92, a kod E2 grupe 2,87, dok je 14. dana zrenja u odnosu na nulti dan smanjenje broja bakterija *L. monocytogenes* bilo kod kontrolne grupe 2,24, kod E1 grupe 3,89, a kod E2 grupe 4,15. Broj bakterija *L. monocytogenes* kod E1 i E2 grupe bio je 21. dana ispod limita detekcije, dok je kod kontrolne grupe smanjenje broja bakterija *L. monocytogenes* u odnosu na nulti dan bilo 4,29.



Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture ($y = -0,204x + 6,585$; $R^2 = 0,972$); E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom ($y = -0,312x + 6,678$; $R^2 = 0,988$); E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom ($y = -0,313x + 6,576$; $R^2 = 0,989$).

Grafikon 5.2 Trend promene broja *L. monocytogenes* (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama šireg dijametra tokom ispitivanja

5.2 Ispitivanje promene broja enterobakterija u uzorcima fermentisanih kobasica tokom zrenja

U nadevu za punjenje fermentisanih kobasica užeg, odnosno šireg dijametra, prosečan broj enterobakterija bio je od $4,44 \pm 0,07$ log CFU/g do $4,48 \pm 0,05$ log CFU/g. Nisu utvrđene statistički značajne razlike između broja enterobakterija nultog dana u nadevu fermentisanih kobasica šireg, odnosno užeg dijametra (tabele 5.3 i 5.4). Rezultati ispitivanja promene broja enterobakterija u fermentisanim kobasicama užeg i šireg dijametra prikazani su u dva odvojena potpoglavlja.

5.2.1 Ispitivanje promene broja enterobakterija u uzorcima fermentisanih kobasica užeg dijametra tokom zrenja

Trećeg dana ispitivanja prosečan broj enterobakterija u nadevu fermentisanih kobasica užeg dijametra bio je od $4,34 \pm 0,04$ log CFU/g do $4,38 \pm 0,05$ log CFU/g. Između prosečnog broja enterobakterija trećeg dana ispitivanja nisu utvrđene statistički značajne razlike. Prosečan broj enterobakterija u nadevu fermentisanih kobasica užeg dijametra sedmog dana ispitivanja bio je od $2,80 \pm 0,05$ log CFU/g do $2,91 \pm 0,06$ log CFU/g. Razlika između prosečnog broja enterobakterija sedmog dana ispitivanja nije bila statistički značajna. Četrnaestog dana ispitivanja prosečan broj enterobakterija u nadevu kontrolne grupe ($1,91 \pm 0,04$ log CFU/g) bio je statistički značajno veći ($p < 0,05$) u odnosu na prosečan broj enterobakterija u nadevu fermentisanih kobasica užeg dijametra E1 grupe ($1,36 \pm 0,03$ log CFU/g), odnosno E2 grupe ($1,59 \pm 0,06$ log CFU/g). Utvrđena je takođe statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između prosečnog broja bakterija u nadevu fermentisanih kobasica šireg dijametra E1 i E2 grupe 14. dana ispitivanja. Osamnaestog dana ispitivanja nije utvrđeno prisustvo enterobakterija u nadevu fermentisanih kobasica užeg dijametra. Rezultati ispitivanja prosečnog broja bakterija u nadevu ispitivanih grupa fermentisanih kobasica prikazani su u tabeli 5.3.

Tabela 5.3. Broj *Enterobacteriaceae* (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama užeg dijametra tokom zrenja ($\bar{X} \pm Sd$)

Dan zrenja	Kontrola	Grupa E1	Grupa E2
0	4,44±0,07 ^A	4,48±0,05 ^A	4,47±0,06 ^A
3	4,36±0,05 ^A	4,34±0,04 ^A	4,38±0,05 ^A
7	2,91±0,06 ^A	2,80±0,05 ^A	2,87±0,05 ^A
14	1,91±0,04 ^A	1,36±0,03 ^B	1,59±0,06 ^C
18	<2	<2	<2

U svakom redu, vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{A,B} $P < 0,05$;

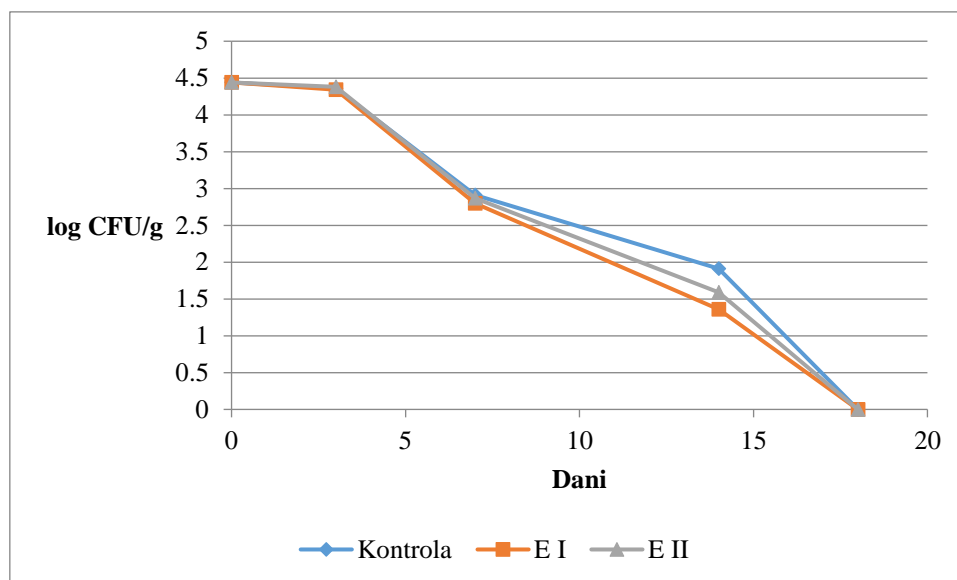
Kontrolna grupa – fermentisane kobasice bez dodate starter kulture

Grupa E1 – fermentisane kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom

Grupa E2 – fermentisane kobasice sa dodatom BACTOFORM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom

Trend promene broja bakterija *Enterobacteriaceae* u fermentisanim kobasicama užeg dijametra tokom zrenja prikazan je grafikonom 5.3. Promena broja bakterija *Enterobacteriaceae* u toku zrenja kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica definisana je formulom $y = -0,240x + 4,746$, pri čemu je $R^2 = 0,950$, kod fermentisanih kobasica E1 grupe formulom $y = -0,253x + 4,715$, pri čemu je $R^2 = 0,979$, a kod fermentisanih kobasica E2 grupe formulom $y = -0,248x + 4,747$, pri čemu je $R^2 = 0,969$.

Broj bakterija *Enterobacteriaceae* izražen kao log CFU/g u fermentisanim kobasicama užeg dijametra u odnosu na nulti dan kod kontrolne grupe je trećeg dana smanjen za 0,08, kod E1 grupe za 0,14, a kod E2 grupe za 0,9. Sedmog dana ispitivanja u odnosu na nulti dan broj bakterija *Enterobacteriaceae* u fermentisanim kobasicama užeg dijametra smanjen je za 1,53 kod kontrolne grupe, kod E1 grupe za 1,68, a kod E2 grupe za 1,60. U toku zrenja, broj bakterija *Enterobacteriaceae* u fermentisanim kobasicama užeg dijametra se i dalje smanjivao, tako da je 14. dana kod kontrolne grupe kobasica u odnosu na nulti dan bio manji za 2,53, kod E1 grupe za 3,12, a kod E2 grupe za 2,58.



Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture ($y = -0,240x + 4,746$; $R^2 = 0,950$); E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom ($y = -0,253x + 4,715$; $R^2 = 0,979$); E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom ($y = -0,248x + 4,747$; $R^2 = 0,969$).

Grafikon 5.3 Trend promene broja *Enterobacteriaceae* (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama užeg dijametra tokom ispitivanja

5.2.2 Ispitivanje promene broja enterobakterija u uzorcima fermentisanih kobasica šireg dijametra tokom zrenja

U nadevu fermentisanih kobasica kontrolne grupe šireg dijametra trećeg dana ispitivanja prosečan broj enterobakterija bio je $4,57 \pm 0,18$ log CFU/g i bio je statistički značajno veći ($p < 0,05$) od prosečnog broja enterobakterija u nadevu fermentisanih kobasica E1 ($4,29 \pm 0,10$ log CFU/g) i E2 grupe ($4,24 \pm 0,07$ log CFU/g). Sedmog dana ispitivanja prosečan broj enterobakterija u nadevu kontrolne grupe ($4,36 \pm 0,16$ log CFU/g) bio je statistički značajno veći ($p < 0,05$) od prosečnog broja enterobakterija E1 grupe ($3,96 \pm 0,07$ log CFU/g) odnosno E2 grupe ($4,00 \pm 0,10$ log CFU/g). Identični odnosi, odnosno statistički značajne razlike ($p < 0,05$) utvrđene su i 14. dana ispitivanja (prosečan broj enterobakterija bio je od $3,05 \pm 0,08$ log CFU/g kod E1 grupe, do $3,41 \pm 0,16$ log CFU/g kod kontrolne grupe), odnosno 21. dana ispitivanja (prosečan broj enterobakterija bio je od $2,09 \pm 0,07$ log CFU/g kod E1 grupe, do $2,41 \pm 0,10$ log CFU/g kod kontrolne grupe). 31. odnosno 41. dana ispitivanja u nadevu fermentisanih kobasica šireg dijametra

nije utvrđeno prisustvo enterobakterija (ispod praga detekcije). Rezultati ovog dela ispitivanja prikazani su u tabeli 5.4.

Tabela 5.4. Broj *Enterobacteriaceae* (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama šireg dijametra tokom zrenja (srednja vrednost±značajna razlika)

Dan zrenja	Kontrola	Grupa E1	Grupa E2
0	4,44±0,16	4,44±0,16	4,44±0,16
3	4,57 ^A ±0,18	4,29 ^B ±0,10	4,24 ^B ±0,07
7	4,36 ^A ±0,16	3,96 ^B ±0,07	4,00 ^B ±0,10
14	3,41 ^A ±0,16	3,05 ^B ±0,08	3,06 ^B ±0,07
21	2,41 ^A ±0,10	2,09 ^B ±0,07	2,10 ^B ±0,06
31	<2	<2	<2
41	<2	<2	<2

U svakom redu, vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{A,B} $P < 0,05$;

Kontrolna grupa – fermentisane kobasice bez dodate starter kulture

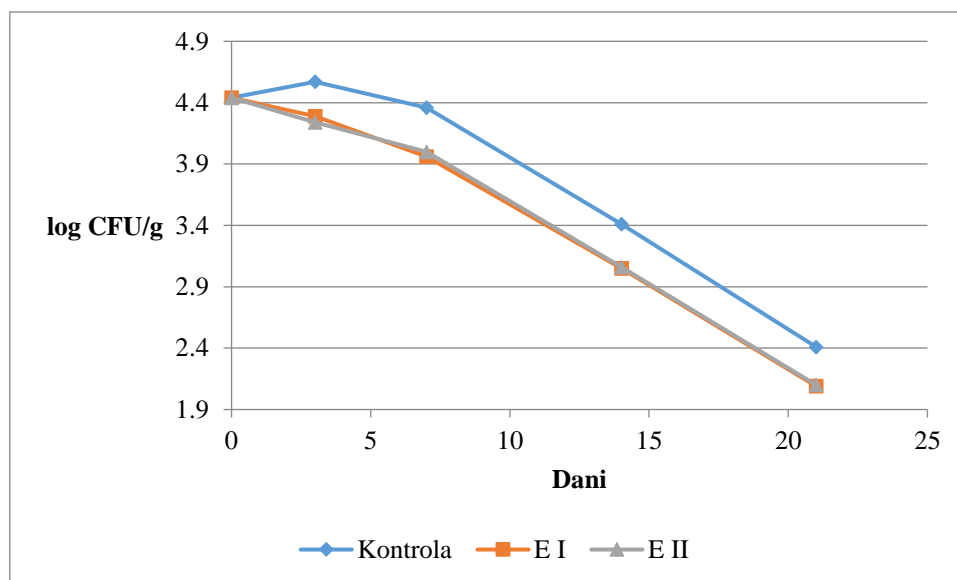
Grupa E1 – fermentisane kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom

Grupa E2 – fermentisane kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom

Grafikonom 5.4 prikazan je trend promene broja bakterija *Enterobacteriaceae* u fermentisanim kobasicama šireg dijametra, pri čemu je promena broja bakterija *Enterobacteriaceae* kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica definisana formulom $y = -0,103x + 4,773$, pri čemu je $R^2 = 0,922$, kod fermentisanih kobasica E1 grupe formulom $y = -0,114x + 4,599$, pri čemu je $R^2 = 0,982$, i kod fermentisanih kobasica E2 grupe formulom $y = -0,113x + 4,589$, pri čemu je $R^2 = 0,979$.

Broj bakterija *Enterobacteriaceae* izražen kao log CFU/g u fermentisanim kobasicama šireg dijametra kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica je trećeg dana zrenja u odnosu na nulti dan povećan za 0,13, dok je kod E1 grupe smanjen za 0,15, a kod E2 grupe smanjen za 0,20. Kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica šireg dijametra broj bakterija *Enterobacteriaceae* sedmog dana ispitivanja u odnosu na nulti dan povećan je za svega 0,08, a znatno više je povećan kod E1 grupe (0,48), odnosno E2 grupe (0,44). Značajniji pad broja bakterija *Enterobacteriaceae* zabeležen je kod kontrolne grupe kobasica 14. dana ispitivanja, kada je iznosio 1,3. Istog dana ispitivanja

kod E1 grupe zabeležen je pad broja bakterija *Enterobacteriaceae* u odnosu na nulti dan za 1,39, a kod E2 grupe za 1,38. Broj bakterija *Enterobacteriaceae* kod kontrolne grupe kobasica šireg dijametra 21. dana zrenja u odnosu na nulti dan smanjen je za 2,83, a kod E1 grupe za 2,35 i kod E2 grupe za 2,36.



Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture ($y = -0,103x + 4,773$; $R^2 = 0,922$); E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom ($y = -0,114x + 4,599$; $R^2 = 0,982$); E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom ($y = -0,113x + 4,589$; $R^2 = 0,979$).

Grafikon 5.4 Trend promene broja *Enterobacteriaceae* (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama šireg dijametra tokom ispitivanja

5.3 Ispitivanje promene ukupnog broja bakterija mlečne kiseline u uzorcima fermentisanih kobasica tokom zrenja

U pripremljenom nadevu za punjenje omotača užeg, odnosno šireg dijametra prosečan broj bakterija mlečne kiseline bio je $4,52 \pm 0,09$ log CFU/g (tabele 5.5 i 5.6). Utvrđeno je da je prosečan broj bakterija mlečne kiseline u fermentisanim kobasicama užeg, odnosno šireg dijametra $5,37 \pm 0,19$ log CFU/g (E1 grupa), odnosno $5,09 \pm 0,17$ log CFU/g (E2 grupa), bio statistički značajno veći ($p < 0,05$) od prosečnog broja bakterija mlečne kiseline u kontrolnoj grupi ($4,52 \pm 0,22$ log CFU/g). Rezultati ispitivanja promene broja bakterija mlečne kiseline u fermentisanim kobasicama užeg i šireg dijametra prikazani su u dva odvojena potpoglavlja.

5.3.1 Ispitivanje promene ukupnog broja bakterija mlečne kiseline u uzorcima fermentisanih kobasica užeg dijametra tokom zrenja

Trećeg dana ispitivanja prosečan broj bakterija mlečne kiseline bio je od $6,06 \pm 0,07$ log CFU/g (kontrolna grupa) do $7,33 \pm 0,06$ log CFU/g (E1 grupa). Prosečan broj bakterija mlečne kiseline u nadevu fermentisanih kobasica E2 grupe bio je $6,97 \pm 0,09$ log CFU/g. Utvrđeno je da je prosečan broj bakterija mlečne kiseline u nadevu fermentisanih kobasica užeg dijametra trećeg dana ispitivanja bio statistički značajno različit ($p < 0,05$) između sve tri poređene grupe. Prosečan broj bakterija mlečne kiseline 7., 14. i 18. dana ispitivanja bio je statistički značajno veći ($p < 0,05$) u nadevu kobasica E1, odnosno E2 grupe, u odnosu na prosečan broj bakterija mlečne kiseline u nadevu fermentisanih kobasica užeg dijametra kontrolne grupe. Tako je broj bakterija mlečne kiseline u nadevu kontrolne grupe sedmog dana ispitivanja bio $7,23 \pm 0,36$ log CFU/g, 14. dana $8,13 \pm 0,05$ log CFU/g, a 18. dana $7,94 \pm 0,15$ log CFU/g. U nadevu eksperimentalnih grupa fermentisanih kobasica sedmog dana ispitivanja prosečan broj bakterija mlečne kiseline bio je $8,96 \pm 0,20$ log CFU/g (E1 grupa), odnosno $8,82 \pm 0,05$ log CFU/g (E2 grupa), 14. dana ispitivanja $9,19 \pm 0,07$ log CFU/g (E1 grupa) i $9,14 \pm 0,07$ log CFU/g (E2 grupa), 18. dana ispitivanja $9,11 \pm 0,06$ log CFU/g (E1 grupa), odnosno $9,04 \pm 0,06$ log CFU/g (E2 grupa).

Tabela 5.5. Broj bakterija mlečne kiseline (logCFU/g) u fermentisanim kobasicama užeg dijametra tokom zrenja ($\bar{X} \pm Sd$)

Dan zrenja	Kontrola	Grupa E1	Grupa E2
0	$4,52^A \pm 0,09^A$	$5,37^B \pm 0,07^B$	$5,09 \pm 0,07^B$
3	$6,06 \pm 0,07^A$	$7,33 \pm 0,06^B$	$6,97 \pm 0,09^C$
7	$7,23 \pm 0,36^A$	$8,96 \pm 0,20^B$	$8,82 \pm 0,05^B$
14	$8,13 \pm 0,05^A$	$9,19 \pm 0,07^B$	$9,14 \pm 0,07^B$
18	$7,94 \pm 0,15^A$	$9,11 \pm 0,06^B$	$9,04 \pm 0,06^B$

U svakom redu, vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike $^{A,B,C}P < 0,05$;

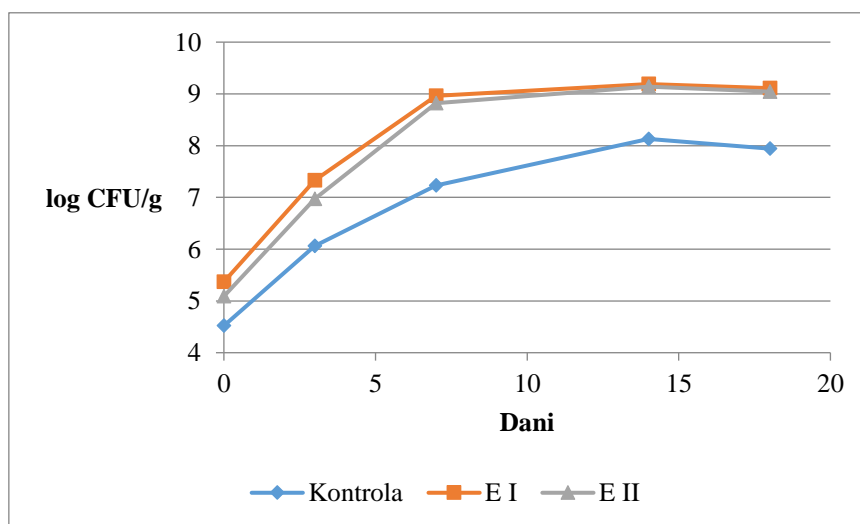
Kontrolna grupa – fermentisane kobasice bez dodatke starter kulture

Grupa E1 – fermentisane kobasice sa dodatkom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom

Grupa E2 – fermentisane kobasice sa dodatkom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom

Trend promene broja BMK u fermentisanim kobasicama užeg dijametra tokom zrenja prikazan je grafikonom 5.5. Promena broja BMK u kontrolnoj grupi fermentisanih kobasica užeg dijametra definisana je formulom $y = 0,181x + 5,249$, pri čemu je $R^2 = 0,827$, kod E1 grupe fermentisanih kobasica formulom $y = 0,185x + 6,437$, pri čemu je $R^2 = 0,705$, i kod E2 grupe fermentisanih kobasica formulom $y = 0,200x + 6,125$, pri čemu je $R^2 = 0,732$.

Broj BMK u fermentisanim kobasicama užeg dijametra izražen kao log CFU/g kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica porastao je trećeg dana za 1,54, kod E1 grupe za 1,96, a kod E2 grupe 1,88. Trend porasta nastavio se i sedmog dana, tako da je broj BMK u odnosu na nulti dan kod kontrolne grupe kobasica porastao za 2,71, kod E1 grupe za 3,59 i kod E2 grupe za 3,73. Kod kontrolne grupe kobasica broj BMK u fermentisanim kobasicama užeg dijametra 14. dana ispitivanja u odnosu na nulti dan porastao je za 3,61, kod fermentisanih kobasica E1 grupe za 3,82 i kod fermentisanih kobasica E2 grupe za 4,05. Na kraju procesa zrenja, odnosno 18. dana, broj BMK kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica u odnosu na nulti dan bio je veći za 3,42, kod E1 grupe za 3,74 i kod E2 grupe za 3,95. Iz ovih podataka uočljivo je da je broj BMK 18. dana bio manji nego 14. dana zrenja.



Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture ($y = 0,181x + 5,249$; $R^2 = 0,827$); E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom ($y = 0,185x + 6,437$; $R^2 = 0,705$); E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom ($y = 0,200x + 6,125$; $R^2 = 0,732$).

Grafikon 5.5 Trend promene broja bakterija mlečne kiseline (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama užeg dijametra tokom ispitivanja

5.3.2 Ispitivanje promene ukupnog broja bakterija mlečne kiseline u uzorcima fermentisanih kobasica šireg dijametra tokom zrenja

Prosečan broj bakterija mlečne kiseline u fermentisanim kobasicama šireg dijametra svih dana ispitivanja (3., 7., 14., 21. i 41. dan) bio je statistički značajno veći ($p < 0,05$) u nadevu E1 i E2 grupe fermentisanih kobasica šireg dijametra u odnosu na broj bakterija mlečne kiseline u nadevu fermentisanih kobasica kontrolne grupe. Broj bakterija mlečne kiseline u nadevu kontrolne grupe rastao je od $6,42 \pm 0,17$ log CFU/g do $8,23 \pm 0,15$ log CFU/g (41. dan). U fermentisanim kobasicama E1 grupe prosečan broj bakterija mlečne kiseline bio je $7,25 \pm 0,17$ log CFU/g, da bi 41. dana porastao na $9,05 \pm 0,27$ log CFU/g. Slični odnosi zabeleženi su kod E2 grupe, gde je broj bakterija bio $7,17 \pm 0,16$ log CFU/g, a 41. dana $8,97 \pm 0,08$ log CFU/g (tabela 5.6).

Tabela 5.6. Broj bakterija mlečne kiseline (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama šireg dijametra tokom zrenja ($\bar{X} \pm Sd$)

Dan zrenja	Kontrola	Grupa E1	Grupa E2
0	$4,52^A \pm 0,22$	$5,37^B \pm 0,19$	$5,09^B \pm 0,17$
3	$6,42^A \pm 0,17$	$7,25^B \pm 0,17$	$7,17^B \pm 0,16$
7	$7,64^A \pm 0,14$	$8,81^B \pm 0,22$	$8,78^B \pm 0,16$
14	$8,33^A \pm 0,15$	$9,32^B \pm 0,13$	$9,12^B \pm 0,13$
21	$8,54^A \pm 0,18$	$9,49^B \pm 0,13$	$9,28^B \pm 0,14$
31	$8,38^A \pm 0,18$	$9,27^B \pm 0,18$	$9,15^B \pm 0,14$
41	$8,23^A \pm 0,15$	$9,05^B \pm 0,27$	$8,97^B \pm 0,08$

U svakom redu, vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike $^{A,B}P < 0,05$;

Kontrolna grupa – fermentisane kobasice bez dodate starter kulture

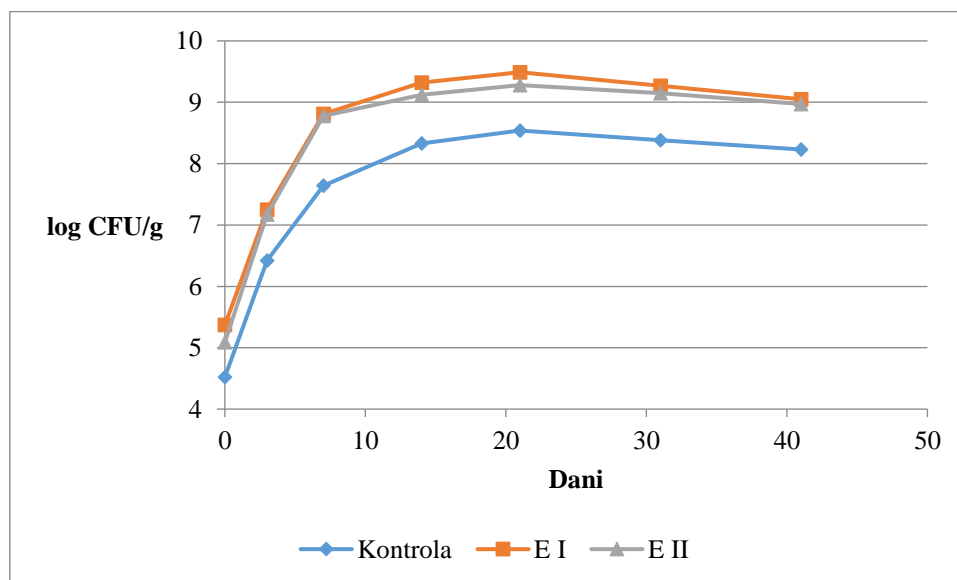
Grupa E1 – fermentisane kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom

Grupa E2 – fermentisane kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom

Trend promene broja BMK u fermentisanim kobasicama šireg dijametra prikazan je grafikonom 5.6. Promena broja BMK kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica šireg dijametra definisana je formulom $y = 0,069x + 6,278$, pri čemu je $R^2 = 0,506$, kod E1

grupe formulom $y = 0,067x + 7,242$, pri čemu je $R^2 = 0,449$, i kod E2 grupe formulom $y = 0,068x + 7,074$, pri čemu je $R^2 = 0,447$.

U fermentisanim kobasicama šireg dijametra broj BMK izražen kao log CFU/g trećeg dana ispitivanja u odnosu na nulti dan porastao je kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica za 1,90, kod E1 grupe za 1,88 i kod E2 grupe za 2,08. Dalji porast broja BMK zapažen je sedmog dana zrenja, tako da je kod kontrolne grupe u odnosu na nulti dan bio veći za 3,12, kod E1 grupe za 3,44, a kod E2 grupe za 3,69. Povećanje broja BMK zabeleženo je i 14. dana, i kod kontrolne grupe u odnosu na nulti dan iznosilo je 3,81, kod E1 grupe 3,95 i kod E2 grupe 4,03. Neznatno povećanje broja BMK zabeleženo je i 21. dana zrenja kada je kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica u odnosu na nulti dan povećanje bilo 4,02, kod E1 grupe 4,12 i kod E2 grupe 4,19. Od 21. dana zrenja broj BMK u fermentisanim kobasicama šireg dijametra izražen kao log CFU/g je opadao. Tako je 31. dana zrenja broj BMK kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica u odnosu na nulti dan bio veći za 3,86, kod E1 grupe 3,90 i kod E2 grupe za 4,06, da bi pad povećanja 41. dana bio kod kontrolne grupe za 3,71 u odnosu na nulti dan, kod E1 grupe za 3,68 i kod E2 grupe za 3,88.



Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture ($y = 0,069x + 6,278$; $R^2 = 0,506$); E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom ($y = 0,067x + 7,242$; $R^2 = 0,449$); E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom ($y = 0,068x + 7,074$; $R^2 = 0,447$).

Grafikon 5.6 Trend promene broja bakterija mlečne kiseline (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama šireg dijametra tokom ispitivanja

5.4 Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija (AMB)

Ukupan broj AMB u fermentisanim kobasicama užeg i šireg dijametra prikazan je u dva odvojena potpoglavlja. Broj AMB nultog dana ispitivanja u nadevu kobasica užeg i šireg dijametra bio je identičan.

5.4.1 Ukupan broj AMB u fermentisanim kobasicama užeg dijametra

U tabeli 5.7 prikazan je ukupan broj AMB (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama užeg dijametra od nultog do 18. dana zrenja. Iz prikazanih rezultata se uočava da je ukupan broj AMB rastao do 7. dana zrenja i da je rast bio naročito izražen do 3. dana, a da je porast od 3. do 7. dana bio manje izražen. Od 7. dana zrenja broj AMB stagnira, a 18. dana je manji u odnosu na 7. i 14. dan. Nisu utvrđene statistički značajne razlike između broja AMB kod ispitivanih grupa kobasica istih dana ispitivanja.

Tabela 5.7 Ukupan broj bakterija (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama užeg dijametra tokom zrenja ($\bar{X} \pm Sd$)

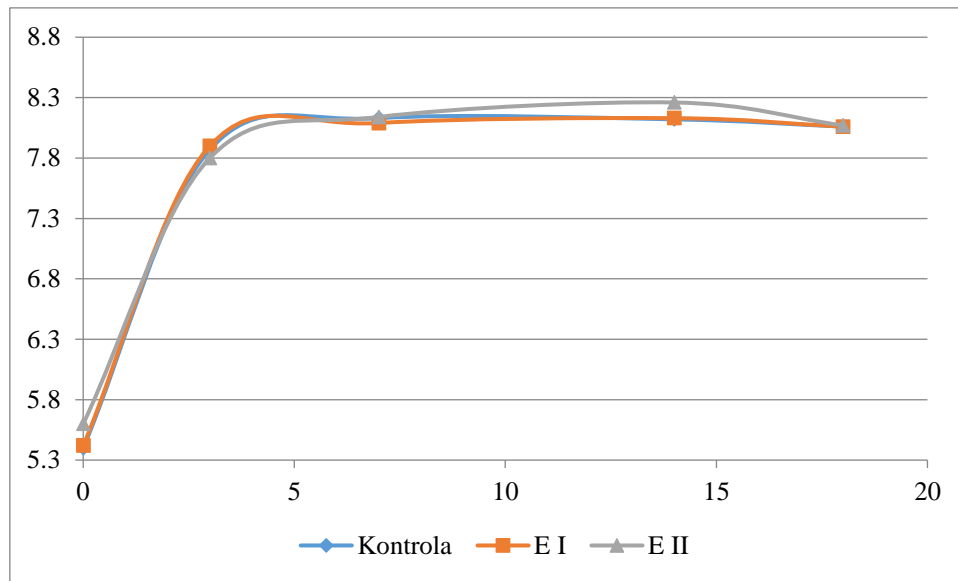
Dan zrenja	Kontrola	Grupa E1	Grupa E2
0	5,40±0,16	5,42±0,17	5,60±0,18
3	7,87±0,17	7,90±0,14	7,80±0,22
7	8,13±0,12	8,09±0,16	8,14±0,11
14	8,12±0,12	8,13±0,14	8,26±0,37
18	8,06±0,11	8,06±0,12	8,07±0,12

Kontrolna grupa – fermentisane kobasice bez dodate starter kulture

Grupa E1 – fermentisane kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom

Grupa E2 – fermentisane kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom

Trend promena AMB u fermentisanim kobasicama užeg dijametra prikazan je grafikonom 5.7. Promena broja AMB kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica užeg dijametra definisana je formulom $y = 0,104x + 6,635$, pri čemu je $R^2 = 0,438$, kod E1 grupe formulom $y = 0,103x + 6,647$, pri čemu je $R^2 = 0,438$, i kod E2 grupe formulom $y = 0,102x + 6,709$, pri čemu je $R^2 = 0,478$.



Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture ($y = 0.104x + 6.635$; $R^2 = 0.438$); E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom ($y = 0.103x + 6.647$; $R^2 = 0.438$); E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom ($y = 0.102x + 6.709$; $R^2 = 0.478$).

Grafikon 5.7 Trend promene ukupnog broja bakterija (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama užeg dijametra tokom ispitivanja

5.4.2 Ukupan broj AMB u fermentisanim kobasicama šireg dijametra

Ukupan broj AMB (log CFU/g) u nadevu fermentisanih kobasica šireg dijametra (tabela 5.8) naglo je porastao od nultog do 3. dana, a zatim je rast bio usporen sve do 31. dana zrenja, da bi 41. dana zrenja bio manji u odnosu na 31. dan. Između ukupnog broja AMB kod poređenih grupa kobasica u istim danim ispitivanja nisu utvrđene statistički značajne razlike.

Tabela 5.8 Ukupan broj bakterija (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama šireg dijametra tokom zrenja ($\bar{X} \pm Sd$)

Dan zrenja	Kontrola	Grupa E1	Grupa E2
0	5,40±0,16	5,42±0,17	5,60±0,18
3	8,19±0,12	8,24±0,13	8,28±0,14
7	8,28±0,15	8,31±0,14	8,31±0,09
14	8,39±0,16	8,37±0,13	8,37±0,08

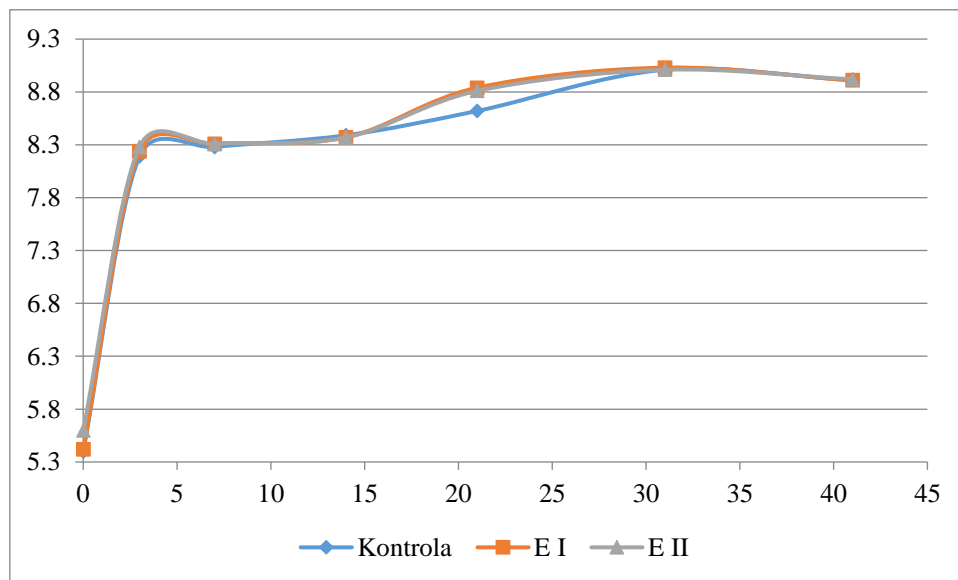
21	8,62±0,48	8,84±0,19	8,81±0,12
31	9,01±0,15	9,03±0,10	9,01±0,11
41	8,91±0,13	8,91±0,07	8,92±0,10

Kontrolna grupa – fermentisane kobasice bez dodate starter kulture

Grupa E1 – fermentisane kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom

Grupa E2 – fermentisane kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom

Grafikonom 5.8 prikazan je trend promena AMB u fermentisanim kobasicama šireg dijametra. Promena broja AMB kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica šireg dijametra definisana je formulom $y = 0,055x + 7,191$, pri čemu je $R^2 = 0,459$, kod E1 grupe formulom $y = 0,055x + 7,237$, pri čemu je $R^2 = 0,449$, i kod E2 grupe formulom $y = 0,052x + 7,308$, pri čemu je $R^2 = 0,455$.



Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture ($y = 0.055x + 7.191$; $R^2 = 0.459$); E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom ($y = 0.055x + 7.237$; $R^2 = 0.449$); E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom ($y = 0.052x + 7.308$; $R^2 = 0.455$).

Grafikon 5.8 Trend promene ukupnog broja bakterija (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama šireg dijametra tokom ispitivanja

5.5 Ispitivanje promene pH vrednosti u uzorcima fermentisanih kobasica tokom zrenja

U nadevu fermentisanih kobasica pre punjenja u omotače, nultog dana, pH vrednost bila je od $6,03 \pm 0,08$ do $6,05 \pm 0,07$. Rezultati ispitivanja promene pH vrednosti bakterija u fermentisanim kobasicama užeg i šireg dijametra prikazani su u dva odvojena potpoglavlja.

5.5.1 Ispitivanje promene pH vrednosti u uzorcima fermentisanih kobasica užeg dijametra tokom zrenja

U nadevu fermentisanih kobasica užeg dijametra trećeg dana zrenja pH vrednost bila je od $5,78 \pm 0,08$ (K1 grupa) do $5,86 \pm 0,06$ (kontrolna grupa). Između pH vrednosti sve tri ispitivane grupe fermentisanih kobasica (tabela 5.9) utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,05$). Sedmog dana ispitivanja nastavljen je pad pH vrednosti u nadevu fermentisanih kobasica užeg dijametra. Vrednost pH kontrolne grupe fermentisanih kobasica ($5,51 \pm 0,06$) bila je statistički značajno veća ($p < 0,05$) od pH vrednosti fermentisanih kobasica K1 grupe ($5,42 \pm 0,04$), odnosno kobasica K2 grupe ($5,41 \pm 0,03$). Slični rezultati dobijeni su i 14. dana ispitivanja, budući da je pH vrednost kontrolne grupe fermentisanih kobasica ($5,34 \pm 0,03$) bila statistički značajno veća ($p < 0,05$) od prosečnih vrednosti pH kod K1 grupe ($5,20 \pm 0,03$), odnosno K2 grupe ($5,19 \pm 0,02$). Na kraju procesa zrenja, odnosno 18. dana, pH vrednost kod K1 grupe ($5,18 \pm 0,02$) i K2 grupe ($5,16 \pm 0,03$) bila je statistički značajno manja ($p < 0,05$) od pH vrednosti nadeva ($5,28 \pm 0,03$) fermentisanih kobasica užeg dijametra.

Tabela 5.9 Vrednost pH fermentisanih kobasica užeg dijametra tokom zrenja ($\bar{X} \pm Sd$)

Dan zrenja	Kontrola	Grupa K1	Grupa K2
0	$6,05 \pm 0,07$	$6,03 \pm 0,08^A$	$6,05 \pm 0,05^A$
3	$5,86 \pm 0,06^A$	$5,78 \pm 0,08^A$	$5,81 \pm 0,05^A$
7	$5,51 \pm 0,06^A$	$5,42 \pm 0,04^B$	$5,41 \pm 0,03^B$
14	$5,34 \pm 0,03^A$	$5,20 \pm 0,03^B$	$5,19 \pm 0,02^B$

18 $5,28 \pm 0,03^A$ $5,18 \pm 0,02^B$ $5,16 \pm 0,03^B$

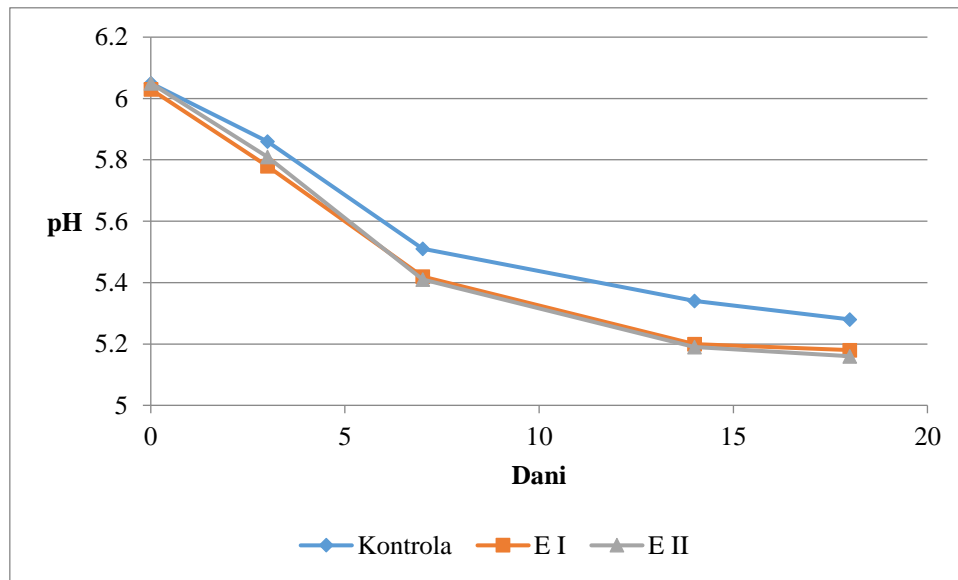
U svakom redu, vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike $^{A,B}P < 0,05$;

Kontrolna grupa – fermentisane kobasice bez dodate starter kulture

Grupa K1 – fermentisane kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom

Grupa K2 – fermentisane kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom

Trend promene pH vrednosti fermentisanih kobasica užeg dijametra prikazan je grafikonom 5.9, i kod kontrolne grupe definisan je formulom $y = -0,042x + 5,965$, pri čemu je $R^2 = 0,911$, kod K1 grupe formulom $y = -0,047x + 5,917$, pri čemu je $R^2 = 0,898$ i kod K2 grupe formulom $y = -0,049x + 5,940$, pri čemu je $R^2 = 0,899$.



Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture ($y = -0,042x + 5,965$; $R^2 = 0,911$); K1 - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom ($y = -0,047x + 5,917$; $R^2 = 0,898$); K2 - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom ($y = -0,049x + 5,940$; $R^2 = 0,899$).

Grafikon 5.9 Trend promene pH vrednosti u fermentisanim kobasicama užeg dijametra tokom ispitivanja

5.5.2 Ispitivanje promene pH vrednosti u uzorcima fermentisanih kobasica šireg dijametra tokom zrenja

U nadevu fermentisanih kobasica šireg dijametra trećeg dana ispitivanja pH vrednost kontrolne grupe fermentisanih kobasica ($5,85 \pm 0,06$) bila je statistički značajno veća ($p < 0,05$) od pH vrednosti K1 grupe fermentisanih kobasica ($5,75 \pm 0,04$). Nije

utvrđena statistički značajna razlika između pH vrednosti K2 grupe ($5,80 \pm 0,06$) i pH vrednosti kontrolne grupe fermentisanih kobasica. Sedmog dana ispitivanja pH vrednost kontrolne grupe fermentisanih kobasica ($5,47 \pm 0,03$) bila je statistički značajno veća ($p < 0,05$) od pH vrednosti nadeva fermentisanih kobasica šireg dijametra K1 i K2 grupe (u oba slučaja $5,38 \pm 0,02$). Pad pH vrednosti nadeva fermentisanih kobasica šireg dijametra nastavljen je, pa je 14. dana zrenja prosečna pH vrednost fermentisanih kobasica kontrolne grupe bila $5,25 \pm 0,03$ i bila je statistički značajno veća ($p < 0,05$) od prosečne pH vrednosti K1 ($5,21 \pm 0,02$), odnosno K2 grupe ($5,20 \pm 0,02$). Treće nedelje ispitivanja (21. dan) pH vrednosti fermentisanih kobasica šireg dijametra bile su od $5,15 \pm 0,01$ do $5,18 \pm 0,02$ i nisu se međusobno statistički značajno razlikovale. pH vrednost fermentisanih kobasica šireg dijametra kontrolne grupe (5. dana) bila je $5,24 \pm 0,03$ i bila je statistički značajno veća ($p < 0,05$) od pH vrednosti fermentisanih kobasica K1 grupe ($5,20 \pm 0,01$), odnosno K2 grupe ($5,22 \pm 0,02$). Na kraju procesa zrenja (41. dan) prosečne pH vrednosti nadeva fermentisanih kobasica šireg dijametra bile su od $5,29 \pm 0,02$ do $5,31 \pm 0,02$ i nisu se međusobno statistički značajno razlikovale (tabela 5.10). Trend promene pH vrednosti u fermentisanim kobasicama šireg dijametra tokom ispitivanja prikazan je u grafikonu 5.10, iz koga se uočava da pH vrednost u sve tri grupe fermentisanih kobasica opada do 21. dana, a zatim dolazi do blagog porasta pH vrednosti.

Tabela 5.10 Vrednost pH fermentisanih kobasica šireg dijametra tokom zrenja ($\bar{X} \pm Sd$)

Dan zrenja	Kontrola	Grupa K1	Grupa K2
0	$6,05 \pm 0,07$	$6,03 \pm 0,08$	$6,05 \pm 0,05$
3	$5,85^A \pm 0,06$	$5,75^B \pm 0,04$	$5,80^{AB} \pm 0,06$
7	$5,47^A \pm 0,03$	$5,38^B \pm 0,02$	$5,38^B \pm 0,02$
14	$5,25^A \pm 0,03$	$5,21^{AB} \pm 0,02$	$5,20^B \pm 0,02$
21	$5,18 \pm 0,02$	$5,15 \pm 0,01$	$5,15 \pm 0,02$
31	$5,24^A \pm 0,03$	$5,20^B \pm 0,01$	$5,22^{AB} \pm 0,02$
41	$5,31 \pm 0,02$	$5,29 \pm 0,02$	$5,30 \pm 0,01$

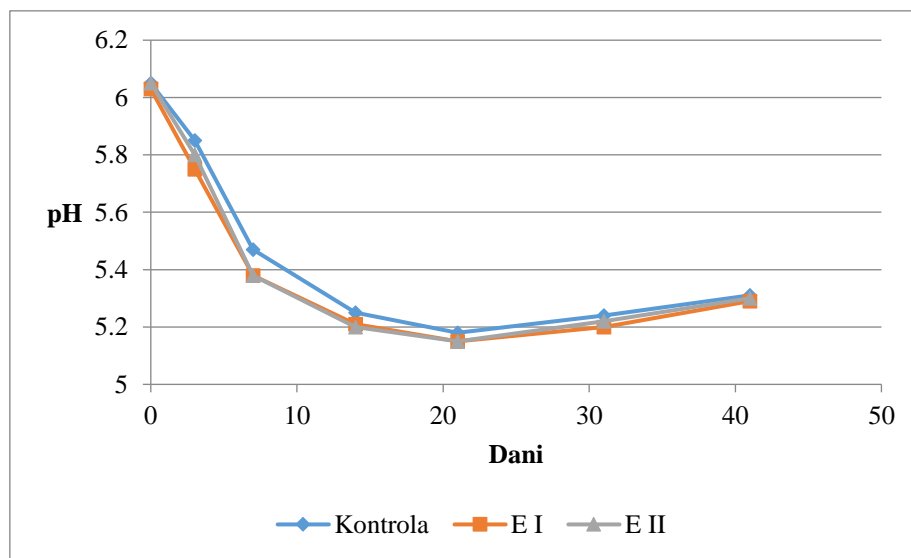
U svakom redu, vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike $^{A,B}P < 0,05$;

Kontrolna grupa – fermentisane kobasice bez dodate starter kulture

Grupa K1 – fermentisane kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom

Grupa K2 – fermentisane kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom

Trend promene pH vrednosti fermentisanih kobasica šireg dijametra tokom zrenja prikazan je grafikonom 5.10 i karakteriše ga pad pH vrednosti do 21. dana, a zatim porast do 41. dana zrenja. Promena pH vrednosti fermentisanih kobasica šireg dijametra kontrolne grupe definisana je formulom $y = -0,016x + 5,753$, pri čemu je $R^2 = 0,540$, kod K1 grupe formulom $y = -0,015x + 5,686$, pri čemu je $R^2 = 0,490$ i kod K2 grupe formulom $y = -0,015x + 5,705$, pri čemu je $R^2 = 0,476$. Trend promene kod K1 i K2 grupe fermentisanih kobasica šireg dijametra je vrlo približan što se vidi iz formula, a takođe i iz grafičkog prikaza.



Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture ($y = -0,016x + 5,753$; $R^2 = 0,540$); K1 - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom ($y = -0,015x + 5,686$; $R^2 = 0,490$); K2 - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom ($y = -0,015x + 5,705$; $R^2 = 0,476$).

Grafikon 5.10 Trend promene pH vrednosti u fermentisanim kobasicama šireg dijametra tokom ispitivanja

5.6 Ispitivanje promene a_w vrednosti u uzorcima fermentisanih kobasica tokom zrenja

Aktivnost vode (a_w) nadeva fermentisanih kobasica pre punjenja bila je $0,968 \pm 0,001$. Rezultati ispitivanja promene a_w vrednosti u fermentisanim kobasicama užeg i šireg dijametra prikazani su u dva odvojena potpoglavlja.

5.6.1 Ispitivanje promene a_w vrednosti u uzorcima fermentisanih kobasica užeg dijametra tokom zrenja

Trećeg dana ispitivanja a_w vrednost fermentisanih kobasica užeg dijametra bila je od $0,961 \pm 0,001$ (kontrolna grupa) do $0,963 \pm 0,001$ (K1 grupa). Sedmog dana ispitivanja a_w vrednost bila je od $0,952 \pm 0,001$ (K1 i K2 grupa) do $0,948 \pm 0,004$ (kontrolna grupa). U toku zrenja a_w vrednost nadeva fermentisanih kobasica užeg dijametra je i dalje opadala, tako da je 14. dana bila od $0,928 \pm 0,001$ do $0,929 \pm 0,001$ (K1 i K2 grupa). Na kraju procesa zrenja a_w vrednosti nadeva fermentisanih kobasica užeg dijametra bile su od $0,909 \pm 0,001$ do $0,912 \pm 0,002$ (K1 i K2 grupa). Svih dana ispitivanja između a_w vrednosti ispitivanih grupa fermentisanih kobasica užeg dijametra nisu utvrđene statistički značajne razlike (tabela 5.11). Trend promene a_w vrednosti fermentisanih kobasica užeg dijametra tokom zrenja prikazan je grafikonom 5.11.

Tabela 5.11 a_w vrednost u fermentisanim kobasicama užeg dijametra tokom zrenja ($\bar{X} \pm Sd$)

Dan zrenja	Kontrola	Grupa K1	Grupa K2
0	$0,968 \pm 0,001^A$	$0,968 \pm 0,001^A$	$0,968 \pm 0,001^A$
3	$0,961 \pm 0,001^A$	$0,963 \pm 0,001^A$	$0,962 \pm 0,002^A$
7	$0,948 \pm 0,004^A$	$0,952 \pm 0,001^A$	$0,952 \pm 0,001^A$
14	$0,928 \pm 0,001^A$	$0,929 \pm 0,001^A$	$0,929 \pm 0,001^A$
18	$0,909 \pm 0,001^A$	$0,912 \pm 0,001^A$	$0,912 \pm 0,002^A$

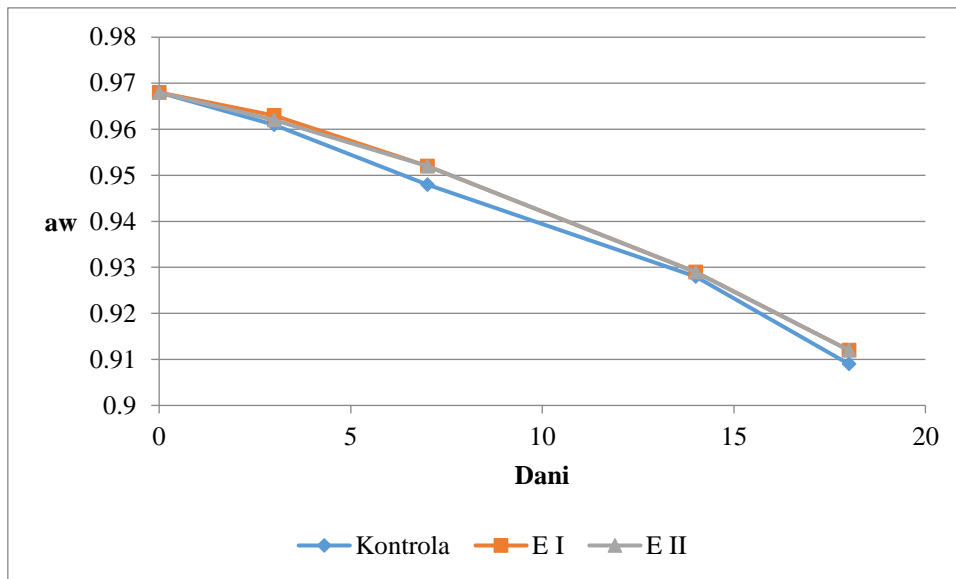
U svakom redu, vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike $^{A,B}P < 0,05$;

Kontrolna grupa – fermentisane kobasice bez dodate starter kulture

Grupa K1 – fermentisane kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom

Grupa K2 – fermentisane kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom

Trend promene a_w vrednosti fermentisanih kobasica užeg dijametra prikazan je grafikonom 5.11, i za kontrolnu grupu trend je definisan formulom $y = -0,003x + 0,969$, pri čemu je $R^2 = 0,990$, za K1 grupu formulom $y = -0,003x + 0,971$, pri čemu je $R^2 = 0,986$ i za K2 grupu formulom $y = -0,003x + 0,970$, pri čemu je $R^2 = 0,987$.



Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture ($y = -0,003x + 0,969$; $R^2 = 0,990$); K1 - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom ($y = -0,003x + 0,971$; $R^2 = 0,986$); K2 - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom ($y = -0,003x + 0,970$; $R^2 = 0,987$).

Grafikon 5.11 Trend promene a_w vrednosti u fermentisanim kobasicama užeg dijametra tokom ispitivanja

5.6.2 Ispitivanje promene a_w vrednosti u uzorcima fermentisanih kobasica šireg dijametra tokom zrenja

Kod fermentisanih kobasica šireg dijametra a_w vrednosti trećeg dana ispitivanja kod ispitivanih grupa fermentisanih kobasica bile su identične ($0,967 \pm 0,001$). Sedmog dana ispitivanja a_w vrednost kontrolne grupe fermentisanih kobasica ($0,960 \pm 0,001$) bila je statistički značajno manja ($p < 0,05$) od a_w vrednosti K1, odnosno K2 grupe ($0,962 \pm 0,001$). Posle 14 dana zrenja a_w vrednosti fermentisanih kobasica šireg dijametra bile su od $0,948 \pm 0,001$ do $0,949 \pm 0,001$, 21. dana bile su identične kod sve tri grupe fermentisanih kobasica ($0,939 \pm 0,001$), a 31. dana bile su od $0,927 \pm 0,001$ do $0,928 \pm 0,001$. Na kraju procesa zrenja (41. dan) kod fermentisanih kobasica šireg dijametra a_w vrednosti bile su od $0,910 \pm 0,001$ do $0,911 \pm 0,001$. Iz rezultata prikazanih u tabeli 5.12 zapaža se da su razlike u a_w vrednosti utvrđene samo sedmog dana, dok ostalih dana ispitivanja nisu utvrđene statistički značajne razlike. Promene a_w vrednosti kobasica šireg dijametra prikazane su grafikonom 5.12.

Tabela 5.12 a_w vrednost u fermentisanim kobasicama šireg dijametra tokom zrenja ($\bar{X} \pm Sd$)

Dan zrenja	Kontrola	Grupa K1	Grupa K2
0	0,968±0,00	0,968±0,00	0,967±0,00
3	0,967±0,00	0,967±0,00	0,967±0,00
7	0,960 ^A ±0,00	0,962 ^B ±0,00	0,962 ^B ±0,00
14	0,948±0,00	0,949±0,00	0,949±0,00
21	0,939±0,00	0,939±0,00	0,939±0,00
31	0,927±0,00	0,928±0,00	0,928±0,00
41	0,910±0,00	0,911±0,00	0,911±0,00

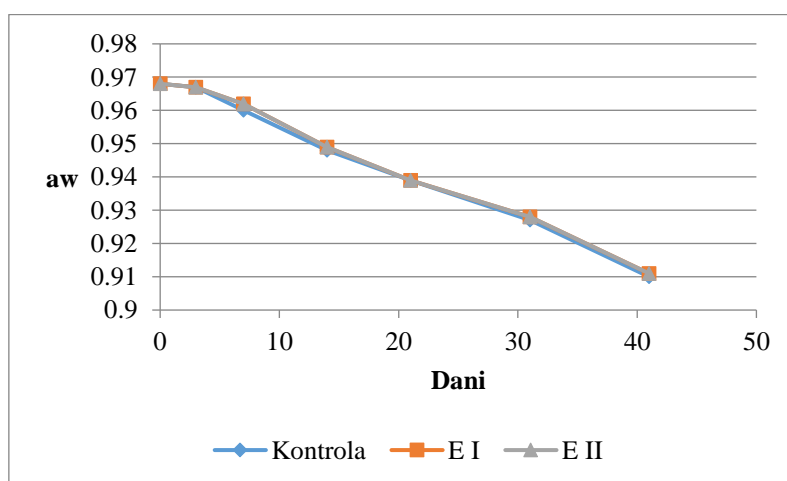
U svakom redu, vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{A,B}p<0,05;

Kontrolna grupa – fermentisane kobasice bez dodate starter kulture

Grupa K1 – fermentisane kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom

Grupa K2 – fermentisane kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom

Trend promene a_w vrednosti fermentisanih kobasica šireg dijametra prikazan je grafikonom 5.12. Formule koje definišu trend promene a_w vrednosti u sve tri grupe kobasica su gotovo identične, što se vidi iz grafičkog prikaza.



Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture ($y = -0,001x + 0,969$; $R^2 = 0,995$); K1 - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom ($y = -0,001x + 0,969$; $R^2 = 0,949$); K2 - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom ($y = -0,001x + 0,97$; $R^2 = 0,994$).

Grafikon 5.12 Trend promene a_w vrednosti u fermentisanim kobasicama šireg dijametra tokom ispitivanja

5.7 Ispitivanje korelacione zavisnosti između broja ispitivanih vrsta bakterija u uzorcima fermentisanih kobasica tokom zrenja

Rezultati ispitivanja korelacione zavisnosti između broja ispitivanih vrsta bakterija u uzorcima fermentisanih kobasica užeg i šireg dijametra tokom zrenja prikazani su u dva odvojena potpoglavlja.

5.7.1 Ispitivanje korelacione zavisnosti između broja ispitivanih vrsta bakterija u uzorcima fermentisanih kobasica užeg dijametra tokom zrenja

Ispitivanje korelacione zavisnosti između broja ispitivanih vrsta bakterija u uzorcima fermentisanih kobasica užeg dijametra tokom zrenja prikazano je u tabelama 5.13 i 5.14. Između broja bakterija *L. monocytogenes* i enterobakterija, kako kod kontrolne tako i kod eksperimentalnih grupa fermentisanih kobasica, utvrđena je pozitivna jaka statistički značajna korelaciona zavisnost, koja je bila nešto izraženija kada su poređene vrednosti broja bakterija *L. monocytogenes* i enterobakterija kod E1 i E2 grupe (tabela 5.13). Negativna jaka statistički značajna korelaciona zavisnost utvrđena je između broja bakterija *L. monocytogenes* i BMK i ona je bila izraženija između broja bakterija *L. monocytogenes* i BMK kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica.

Tabela 5.13 Korelaciona zavisnost i značajnost razlika između broja bakterija *L. monocytogenes* i broja *Enterobacteriaceae*, odnosno broja bakterija mlečne kiseline (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama užeg dijametra tokom procesa zrenja

Vrsta bakterije	Grupa	Koeficijent korelacije (r)	Tumačenje korelacione zavisnosti*	Značajnost razlike
<i>Enterobacteriaceae</i>	Kontrola	0,977	jaka	p<0,05
	E I	0,996	jaka	p<0,05
	E II	0,994	jaka	p<0,05
Bakterije mlečne kiseline	Kontrola	- 0,884	jaka	p<0,05
	E I	- 0,819	jaka	p<0,05
	E II	- 0,844	jaka	p<0,05

* Izvor: Colton, 1974.

Korelaciona zavisnost između broja enterobakterija i broja BMK u fermentisanim kobasicama užeg dijametra u toku zrenja prikazana je u tabeli 5.14. Utvrđena je negativna jaka statistički značajna korelaciona razlika između broja enterobakterija i BMK, s tim što je zavisnost nešto izraženija između broja enterobakterija i BMK kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica.

Tabela 5.14 Korelaciona zavisnost i značajnost razlika između broja broja *Enterobacteriaceae* i broja bakterija mlečne kiseline (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama užeg dijametra tokom procesa zrenja

Vrsta bakterije	Grupa	Koeficijent korelacije (r)	Tumačenje korelacione zavisnosti*	Značajnost razlike
Bakterije mlečne kiseline	Kontrola	- 0,912	jaka	p<0,05
	E I	- 0,852	jaka	p<0,05
	E II	- 0,875	jaka	p<0,05

* Izvor: Colton, 1974.

5.7.2 Ispitivanje korelacione zavisnosti između broja ispitivanih vrsta bakterija u uzorcima fermentisanih kobasica šireg dijametra tokom zrenja

U tabeli 5.15 prikazana je korelaciona zavisnost između broja bakterija *L. monocytogenes* i broja enterobakterija, odnosno broja BMK. Utvrđena je jaka statistički značajna korelaciona zavisnost između broja bakterija *L. monocytogenes* i enterobakterija. Jaka negativna statistički značajna korelaciona zavisnost utvrđena je između broja bakterija *L. monocytogenes* i BMK, s tim što je bila nešto izraženija između broja bakterija *L. monocytogenes* i BMK kod eksperimentalnih grupa fermentisanih kobasica šireg dijametra.

Tabela 5.15 Korelaciona zavisnost i značajnost razlika između broja bakterija *L. monocytogenes* i broja *Enterobacteriaceae*, odnosno broja bakterija mlečne kiseline (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama šireg dijametra tokom procesa zrenja

Vrsta bakterije	Grupa	Koeficijent korelacije (r)	Tumačenje korelacione zavisnosti*	Značajnost razlike
<i>Enterobacteriaceae</i>	Kontrola	0,957	jaka	p<0,05
	E I	0,973	jaka	p<0,05
	E II	0,960	jaka	p<0,05
Bakterije mlečne kiseline	Kontrola	- 0,815	jaka	p<0,05
	E I	- 0,862	jaka	p<0,05
	E II	- 0,839	jaka	p<0,05

* Izvor: Colton, 1974.

Između broja enterobakterija i broja BMK u fermentisanim kobasicama šireg dijametra tokom zrenja utvrđena je negativna jaka statistički značajna korelaciona zavisnost, s tim što je bila izraženija između broja enterobakterija i broja BMK kod eksperimentalnih grupa fermentisanih kobasica šireg dijametra (tabela 5.16).

Tabela 5.16 Korelaciona zavisnost i značajnost razlika između broja *Enterobacteriaceae* i broja bakterija mlečne kiseline (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama šireg dijametra tokom procesa zrenja

Vrsta bakterije	Grupa	Koeficijent korelacije (r)	Tumačenje korelacione zavisnosti*	Značajnost razlike
Bakterije mlečne kiseline	Kontrola	- 0,691	jaka	p<0,05
	E I	- 0,773	jaka	p<0,05
	E II	- 0,736	jaka	p<0,05

* Izvor: Colton, 1974.

5.8 Ispitivanje korelacione zavisnosti između pH vrednosti i broja ispitivanih vrsta bakterija u uzorcima fermentisanih kobasica tokom zrenja

Rezultati ispitivanja korelacione zavisnosti između pH vrednosti i broja ispitivanih vrsta bakterija u uzorcima fermentisanih kobasica užeg i šireg dijametra tokom zrenja prikazani su u dva odvojena potpoglavlja.

5.8.1 Ispitivanje korelacione zavisnosti između pH vrednosti i broja ispitivanih vrsta bakterija u uzorcima fermentisanih kobasica užeg dijametra tokom zrenja

U tabeli 5.17 prikazana je korelaciona zavisnost između pH vrednosti i broja ispitivanih vrsta bakterija u uzorcima fermentisanih kobasica užeg dijametra tokom zrenja. Utvrđeno je da između pH vrednosti nadeva fermentisanih kobasica užeg dijametra i broja bakterija *L. monocytogenes* postoji jaka statistički značajna korelaciona zavisnost, koja je izraženija kod eksperimentalnih grupa fermentisanih kobasica. Takođe, utvrđena je i jaka statistički značajna korelaciona zavisnost između pH vrednosti i broja enterobakterija kod ispitivanih grupa fermentisanih kobasica. Negativna jaka statistički značajna razlika utvrđena je između pH vrednosti i broja BMK.

Tabela 5.17 Korelaciona zavisnost i značajnost razlika između broja bakterija (log CFU/g) i pH vrednosti u fermentisanim kobasicama užeg dijametra tokom procesa zrenja

Vrsta bakterije	Grupa	Koeficijent korelacije (r)	Tumačenje korelacione zavisnosti*	Značajnost razlike
<i>L. monocytogenes</i>	Kontrola	0,919	jaka	p<0,05
	E I	0,932	jaka	p<0,05
	E II	0,940	jaka	p<0,05
<i>Enterobacteriaceae</i>	Kontrola	0,963	jaka	p<0,05
	E I	0,951	jaka	p<0,05
	E II	0,961	jaka	p<0,05
Bakterije mlečne kiseline	Kontrola	- 0,951	jaka	p<0,05
	E I	- 0,948	jaka	p<0,05
	E II	- 0,962	jaka	p<0,05

* Izvor: Colton, 1974.

5.8.2 Ispitivanje korelacione zavisnosti između pH vrednosti i broja ispitivanih vrsta bakterija u uzorcima fermentisanih kobasica šireg dijametra tokom zrenja

U tabeli 5.18 prikazana je korelaciona zavisnost između pH vrednosti i broja ispitivanih vrsta bakterija u uzorcima fermentisanih kobasica šireg dijametra. Jaka pozitivna statistički značajna korelaciona zavisnost utvrđena je između broja bakterija *L. monocytogenes* i pH vrednosti nadeva fermentisanih kobasica. Uočava se da je

korelaciona zavisnost bila izraženija kod eksperimentalnih grupa fermentisanih kobasica. Slična zapažanja uočavaju se i pri poređenju korelacione zavisnosti između pH vrednosti i broja enterobakterija kod fermentisanih kobasica šireg dijametra. Negativna jaka statistički značajna korelaciona zavisnost utvrđena je između broja BMK i pH vrednosti fermentisanih kobasica šireg dijametra. Ova zavisnost bila je izraženija kod eksperimentalnih grupa fermentisanih kobasica.

Tabela 5.18 Korelaciona zavisnost i značajnost razlika između broja bakterija (log CFU/g) i pH vrednosti u fermentisanim kobasicama šireg dijametra tokom procesa zrenja

Vrsta bakterije	Grupa	Koeficijent korelacije (r)	Tumačenje korelacione zavisnosti*	Značajnost razlike
<i>L. monocytogenes</i>	Kontrola	0,760	jaka	p<0,05
	E I	0,926	jaka	p<0,05
	E II	0,940	jaka	p<0,05
<i>Enterobacteriaceae</i>	Kontrola	0,821	jaka	p<0,05
	E I	0,854	jaka	p<0,05
	E II	0,844	jaka	p<0,05
Bakterije mlečne kiseline	Kontrola	- 0,955	jaka	p<0,05
	E I	- 0,971	jaka	p<0,05
	E II	- 0,962	jaka	p<0,05

* Izvor: Colton, 1974.

5.9 Ispitivanje korelacione zavisnosti između a_w vrednosti i broja ispitivanih vrsta bakterija u uzorcima fermentisanih kobasica tokom zrenja

Rezultati ispitivanja korelacione zavisnosti između a_w vrednosti i broja ispitivanih vrsta bakterija u uzorcima fermentisanih kobasica užeg i šireg dijametra tokom zrenja prikazani su u dva odvojena podpoglavlja.

5.9.1 Ispitivanje korelacione zavisnosti između a_w vrednosti i broja ispitivanih vrsta bakterija u uzorcima fermentisanih kobasica užeg dijametra tokom zrenja

U tabeli 5.19 prikazana je korelaciona zavisnost između a_w vrednosti nadeva i broja ispitivanih vrsta bakterija u uzorcima fermentisanih kobasica užeg dijametra.

Utvrđeno je da je korelaciona zavisnost između broja bakterija *L. monocytogenes* i a_w vrednosti kod ispitivanih grupa fermentisanih kobasica jaka i statistički značajna. Isto je utvrđeno i kod poređenja korelacione zavisnosti između broja enterobakterija i a_w vrednosti. Negativna jaka statistički značajna korelaciona zavisnost utvrđena je između broja BMK i a_w vrednosti fermentisanih kobasica šireg dijametra, s tim što je bila izraženija između broja BMK i a_w vrednosti kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica.

Tabela 5.19 Korelaciona zavisnost i značajnost razlika između broja bakterija (log CFU/g) i a_w vrednosti u fermentisanim kobasicama užeg dijametra tokom procesa zrenja

Vrsta bakterije	Grupa	Koeficijent korelacije (r)	Tumačenje korelacione zavisnosti*	Značajnost razlike
<i>L. monocytogenes</i>	Kontrola	0,986	jaka	p<0,05
	E I	0,992	jaka	p<0,05
	E II	0,987	jaka	p<0,05
<i>Enterobacteriaceae</i>	Kontrola	0,976	jaka	p<0,05
	E I	0,983	jaka	p<0,05
	E II	0,973	jaka	p<0,05
Bakterije mlečne kiseline	Kontrola	- 0,856	jaka	p<0,05
	E I	- 0,772	jaka	p<0,05
	E II	- 0,792	jaka	p<0,05

* Izvor: Colton, 1974.

5.9.2 Ispitivanje korelacione zavisnosti između a_w vrednosti i broja ispitivanih vrsta bakterija u uzorcima fermentisanih kobasica šireg dijametra tokom zrenja

Rezultati ispitivanja korelacione zavisnosti između a_w vrednosti i broja bakterija *L. monocytogenes* kod fermentisanih kobasica šireg dijametra prikazani su u tabeli 5.20 U istoj tabeli prikazane su i korelacione zavisnosti između a_w vrednosti i broja enterobakterija, odnosno broja BMK kod fermentisanih kobasica šireg dijametra. Između broja bakterija *L. monocytogenes* i a_w vrednosti fermentisanih kobasica šireg dijametra utvrđena je jaka statistički značajna korelaciona zavisnost. Takođe, utvrđena je i jaka statistički značajna korelaciona zavisnost između broja enterobakterija i a_w vrednosti kod fermentisanih kobasica šireg dijametra, s tim što je ona bila izraženija između broja enterobakterija i a_w vrednosti kod eksperimentalnih grupa fermentisanih kobasica. Negativna srednja statistički značajna korelaciona zavisnost utvrđena je između broja

BMK i a_w vrednosti fermentisanih kobasica šireg dijametra, s tim što je bila izraženija između broja BMK i a_w vrednosti kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica.

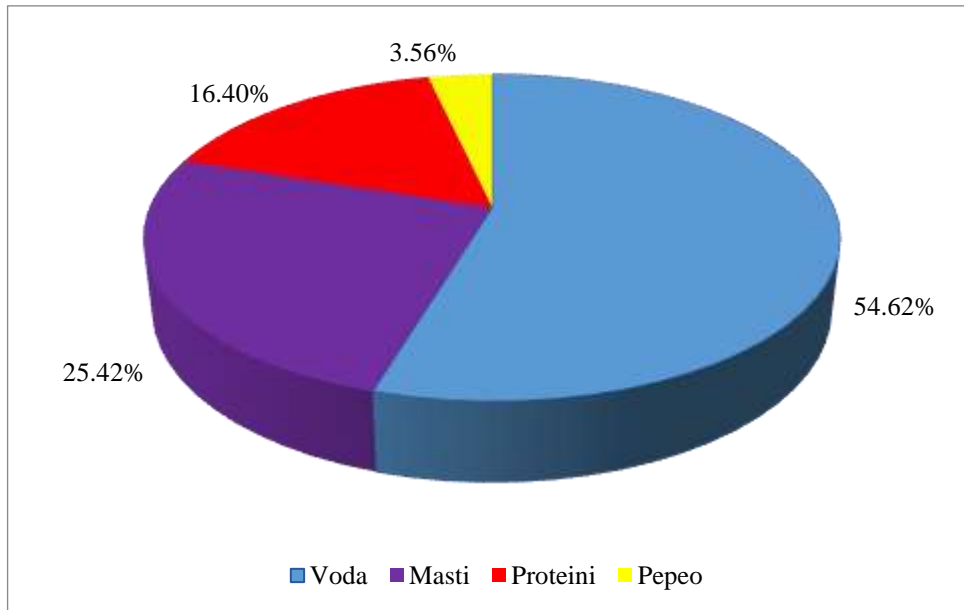
Tabela 5.20 Korelaciona zavisnost i značajnost razlika između broja bakterija (log CFU/g) i a_w vrednosti u fermentisanim kobasicama šireg dijametra tokom procesa zrenja

Vrsta bakterije	Grupa	Koeficijent korelacije (r)	Tumačenje korelacione zavisnosti*	Značajnost razlike
<i>L. monocytogenes</i>	Kontrola	0,976	jaka	p<0,05
	E I	0,981	jaka	p<0,05
	E II	0,975	jaka	p<0,05
<i>Enterobacteriaceae</i>	Kontrola	0,961	jaka	p<0,05
	E I	0,993	jaka	p<0,05
	E II	0,991	jaka	p<0,05
Bakterije mlečne kiseline	Kontrola	- 0,697	srednja	p<0,05
	E I	- 0,631	srednja	p<0,05
	E II	- 0,629	srednja	p<0,05

* Izvor: Colton, 1974.

5.10 Hemijski sastav fermentisanih kobasica

U nadevu fermentisanih kobasica ispitan je hemijski sastav na osnovu koga je utvrđeno da je nultog dana sadržaj vode bio 54,62%, masti 25,42%, proteina 16,40% i 3,56% pepela. Prosečan hemijski sastav nadeva fermentisanih kobasica prikazan je grafikonom 5.13.



Grafikon 5.13 Prosečan hemijski sastav nadeva fermentisanih kobasica

Prosečan hemijski sastav fermentisanih kobasica užeg, odnosno šireg dijametra, prikazan je u tabelama 5.21 i 5.22. Utvrđeno je da je prosečni sadržaj vode u fermentisanim kobasicama užeg dijametra bio od $29,00 \pm 0,47$ do $29,50 \pm 0,42$, prosečni sadržaj masti od $40,23 \pm 0,61$ do $40,62 \pm 0,70$, a prosečni sadržaj proteina od $25,06 \pm 0,33$ do $25,17 \pm 0,35$. Utvrđeno je da je prosečni sadržaj pepela bio od $5,20 \pm 0,05$ do $5,27 \pm 0,04$, sadržaj soli od $3,95 \pm 0,02$ do $4,10 \pm 0,03$, a sadržaj nitrita od $0,050 \pm 0,001$ do $0,055 \pm 0,001$. Između prosečnih sadržaja ispitivanih parametara fermentisanih kobasica užeg dijametra nije utvrđena statistički značajna razlika.

Tabela 5.21 Prosečan hemijski sastav fermentisanih kobasica užeg dijametra (n=6)

Parametar	Grupa		
	K	E1	E2
Voda	$29,50 \pm 0,42$	$29,00 \pm 0,47$	$29,05 \pm 0,44$
Mast	$40,23 \pm 0,61$	$40,62 \pm 0,70$	$40,52 \pm 0,74$
Proteini	$25,06 \pm 0,33$	$25,11 \pm 0,36$	$25,17 \pm 0,37$
Pepeo	$5,21 \pm 0,5$	$5,27 \pm 0,04$	$5,20 \pm 0,05$
NaCl	$3,95 \pm 0,02$	$4,01 \pm 0,03$	$4,10 \pm 0,03$
Nitriti	$0,055 \pm 0,001$	$0,051 \pm 0,001$	$0,050 \pm 0,001$

Prosečan sadržaj vode u fermentisanim kobasicama šireg dijametra bio je od $29,49 \pm 0,48$ do $29,61 \pm 0,50$, prosečan sadržaj masti od $39,42 \pm 0,67$ do $39,96 \pm 0,71$, a prosečan sadržaj proteina od $25,25 \pm 0,56$ do $25,81 \pm 0,42$. Sadržaj pepela u ovoj grupi kobasica bio je $5,18 \pm 0,12$ do $5,23 \pm 0,10$, sadržaj soli od $3,97 \pm 0,10$ do $4,00 \pm 0,08$, dok je sadržaj nitrita bio od $0,053 \pm 0,011$ do $0,055 \pm 0,002$.

Tabela 5.22 Prosečan hemijski sastav fermentisanih kobasica šireg dijametra (n=6)

Parametar	Grupa		
	K	E1	E2
Voda	$29,61 \pm 0,50$	$29,55 \pm 0,42$	$29,49 \pm 0,48$
Mast	$39,96 \pm 0,71$	$39,42 \pm 0,67$	$39,66 \pm 0,64$
Proteini	$25,25 \pm 0,56$	$25,81 \pm 0,42$	$25,62 \pm 0,48$
Pepeo	$5,18 \pm 0,12$	$5,22 \pm 0,14$	$5,23 \pm 0,10$
NaCl	$4,00 \pm 0,08$	$3,97 \pm 0,10$	$3,99 \pm 0,08$
Nitriti	$0,055 \pm 0,002$	$0,053 \pm 0,011$	$0,053 \pm 0,002$

Izračunate MRP vrednosti za obe grupe kobasica (užeg i šireg dijametra) bile su od 1,15:1 do 1,17:1.

6. DISKUSIJA

6.1 Fermentisane kobasice

Fermentisane kobasice imaju dugu proizvodnu tradiciju. Njihova proizvodnja može da se veže za domaćinstvo, gde je najpre i počela, zatim za zanatske objekte (mali pogoni) i konačno za industrijske objekte. Proizvodnja u domaćinstvima i u većini zanatskih objekata je sezonska, odnosno obavlja se u hladnije doba godine (kasna jesen i zima) i u nekontrolisanim mikroklimatskim uslovima (temperatura, vlažnost vazduha, cirkulacija), uz povremeno hladno dimljenje. Proizvodnja u domaćinstvima i u zanatskim uslovima se u velikoj meri zasniva na empirijskom iskustvu proizvođača, pa i kvalitet proizvoda zavisi od njegovog stečenog znanja i iskustava. I danas ova proizvodnja, i pored industrijske proizvodnje, nije napuštena, pa su čak i neki tradicionalni proizvodi zaštićeni oznakom geografskog porekla, tako da se i dalje proizvode u domaćinstvima i malim pogonima za preradu mesa (Karabasil i sar., 2018, Janković i sar., 2017). Ovi proizvodi namenjeni su daleko manjem broju potrošača od industrijski proizvedenih fermentisanih kobasica. U industrijskim uslovima proizvodnja fermentisanih kobasica je kontrolisana, kako u pogledu mikroklimatskih uslova (temperatura, vlažnost vazduha, cirkulacija vazduha), tako i u pogledu režima (dinamike) dimljenja i izbora drveta (bukva). Industrijski proizvedene fermentisane kobasice, proizvedene od različitih vrsta mesa i punjene u omotače različitih prečnika, široko su zatupljene na tržištu i pripadaju najkvalitetnijoj, pa i najskupljoj grupi kobasica koja se nudi potrošaču. Industrijski proizvedene fermentisane kobasice, pored toga što se proizvode u kontrolisanim uslovima, razlikuju se od fermentisanih kobasica proizvedenih u malim pogonima, a naročito od onih proizvedenih u domaćinstvima, i po načinu proizvodnje, počevši od izbora sirovine, pripreme nadeva, načina punjenja kobasica, izboru soli i začina, upotrebi starter kultura, izboru omotača itd. Tako se u industrijskoj proizvodnji fermentisanih kobasica kao sirovina koristi zamrznuto meso različitih životinjskih vrsta, kao i zamrznuto čvrsto masno tkivo, pa je i temperatura pripremljenog nadeva niska (oko 0°C) U pripremi nadeva u industrijskim uslovima koristi se definisana količina nitritne soli i začinskih smeša. Količina koja se dodaje je standardizovana za svaku vrstu kobasica istog proizvođača. Za punjenje omotača koriste se vakuum punilice. Prečnik i dužina kobasica

su standardizovani. U malim pogonima, a naročito u domaćinstvima, kao sirovina koristi se uglavnom ohlađeno meso i masno tkivo (ponekad čak i toplo). Usitnjavanje se obavlja u mašinama za mlevenje, pri čemu su otvori na pločama različiti (najčešće 8 mm, mada mogu da budu i manji i veći). U pripremi nadeva obično se u domaćinstvima ne koriste nitrinna so i starter kulture. Izbor i količina dodatih začina (uglavnom beli luk i paprika) nisu standardizovani i mešanje nadeva u domaćinstvima je uglavnom ručno i za punjenje se ne koriste vakuum punilice. Prednost industrijske proizvodnje fermentisanih kobasica odnosi se na standardizaciju proizvodnje, što je jedan od osnovnih faktora kvaliteta proizvoda i njegove prepoznatljivosti od strane potrošača. Ako je kvalitet fermentisanih kobasica istog proizvođača nstandardizovan, potrošač nije u mogućnosti da stekne naviku i memoriše njegove osobine (pre svega senzorne) i to može biti razlog njegovog daljeg neopredeljenja za potrošnju proizvoda. Poznato je da izbor hrane zavisi od brojnih faktora (cena, ponuda, dostupnost), ali u velikoj meri i od navika, odnosno od onog što zadovoljava potrošača, naročito u pogledu senzornih osobina (Novelli i sar., 2017).

Karakteristične senzorne osobine fermentisanih kobasica posledica su fermentacionih procesa u toku proizvodnje, koji uključuju razgradnju ugljenih hidrata primarno od prisutnih BMK (Leroy i sar., 2006). Kod tradicionalnih proizvoda fermentacija nastaje kao posledica prisustva bakterija u nadevu, među kojima su i BMK (Škaljac i sar., 2014). Za tok željene fermentacije odgovorna je prisutna mikrobiota, čija aktivnost dovodi do tipičnog ukusa, izgleda i teksture fermentisanih kobasica (Vuković i sar., 2012). Konzervišući efekat kod fermentisanih kobasica primarno se zaniva na dve fizičke osobine, odnosno na smanjenju pH i a_w vrednosti nadeva, ali i na prisustvu soli, začina i starter kultura. Smanjena a_w vrednost prevenira rast bakterija kvara, kojima je za rast potrebna veća a_w vrednost od potrebne a_w vrednosti za rast BMK, odnosno fermentativnih bakterija. U uslovima visokih temperatura zrenja i velikog početnog broja bakterija u nadevu, same fermentativne bakterije nisu dovoljne za preveniranje kvara kobasica. Zbog toga je neophodno da se kontroliše mikroklima u komorama, odnosno da se kontroliše temperatura, vlažnost vazduha i cirkulacija vazduha (Rašeta i sar., 2010). Brojni su faktori koji utiču na inaktivaciju patogena u nadevu fermentisanih kobasica i među tim patogenima je i *L. monocytogenes*. Nadev (matriks) kobasica je jedan složen i dinamičan sistem sa brojnim mogućnostima interakcije među mikrobiotom nadeva, pa i sa različitim ishodima interakcija. Jedan od ključnih elemenata u usmeravanju procesa

fermentacije u nadevu kobasica je upotreba odabranih starter kultura. U okviru ove doktorske disertacije korišćena je za prvu eksperimentalnu grupu (E1) starter kultura koja u sebi sadrži tri bakterijske vrste (*Lactobacillus sakei*, *Staphylococcus carnosus* i *Staphylococcus xylosus*), komercijalni naziv BioStart, dok je za proizvodnju druge eksperimentalne grupe (E2), pored ove tri bakterije, starter kultura sadržala i *Debaryomyces hansenii*, *Pediococcus acidilactici* i *Pediococcus pentosaceus*, komercijalni naziv BaktoFerm BLC-007.

6.1 Kontrola *Listeria monocytogenes* u fermentisanim kobasicama

Fermentisane kobasice pripadaju grupi proizvoda koji se definišu kao “Ready-to-eat” (RTE –spremni za jelo) i koji zbog svojih osobina podržavaju rast *L. monocytogenes* (Cabedo i sar., 2008; Di Pinto i sar., 2010; Dimitrijević i sar., 2011). *L. monocytogenes* je ubikvitaran mikroorganizam, psihrotrofan i čest je kontaminant različite RTE hrane, najčešće kao posledica kontaminacije sa radnih površina i opreme koja se koristi za pripremu hrane (npr. narezivanje) i pakovanje. Učestalost kontaminacije RTE proizvoda naročito je izražena u hladnom prostoru i kod vlažnih površina na kojima *L. monocytogenes* može da stvara biofilm (Ben Hammou i sar., 2010). Poznato je da *L. monocytogenes* može da raste pri temperaturi hlađenja, pa i minimalna kontaminacija ovom bakterijom može da predstavlja opasnost za zdravstvenu bezbednost tokom skladištenja (Lianou i Sofos, 2007). Podaci EFSA ukazuju da je broj slučajeva oboljenja ljudi od listerioze u blagom porastu od 2008. do 2012. godine i da je letalitet visok (17,8%).

U nadevu fermentisanih kobasica patogene bakterije mogu da se inaktiviju delovanjem, odnosno inetrakcijom nekoliko različitih činilaca, kao što su prisustvo mlečne kiseline, smanjenje pH i a_w vrednosti, inhibitorni efekat komponenti dima, kao i aktivnost dodatih starter kultura i njihovih metabolita (bakteriocini) u toku zrenja (Ammor i Mayo, 2007; Holck i sar., 2017).

Od svih serotipova *L. monocytogenes*, serotipovi 1/2a, 1/2b i 1/2c su najčešće izolovani iz hrane (Swaminathan i Gerner –Smidt, 2007; Martin i sar., 2014), te su iz tog razloga oni korišćeni za kontaminaciju nadeva u ovom ogledu.

Mora se napomenuti i da je u kontrolnoj grupi fermentisanih kobasica, kojoj nije dodata starter kultura, došlo do inhibicije rasta bakterija *L. monocytogenes*, što može da se objasni prisustvom BMK kao kontaminenata u nadevu kobasica i posledične spontane fermentacije. BMK (dominantno laktobacili) brzo smanjuju broj neželjenih vrsta bakterija (npr. enterobakterija). Autohtone BMK su prepoznate kao dobri kompetitori i imaju bioprotektivni i inhibitorni efekat prema bakterijama u nadevu. Rezultat njihovog delovanja zasniva se na kompeticiji ili stvaranju bakteriocina ili drugih antagobiotskih komponenti, kao što su organske kiseline, vodonik-peroksid i enzimi (Pragati i sar., 2007).

Više različitih činilaca može uticati na inhibiciju *L. monocytogenes* u fermentisanim kobasicama, uključujući početnu koncentraciju mikroorganizama, broj i rast kompetitivnih bakterija, pH i a_w vrednosti (Lücke, 2000). U ovoj studiji, uprkos visokoj koncentraciji *L. monocytogenes* koja nije uobičajena u fermentisanim kobasicama, broj bakterija je značajno umanjen, verovatno kao rezultat sinergističkog efekta fermentacije, sušenja i antimikrobnih komponenti. Podaci iz literature upućuju na to da se rast *L. monocytogenes* prekida kada prirodno prisutna mikroflora hrane, kao što su bakterije mlečne kiseline, uđe u stacionarnu fazu (Al-Zeyara i sar., 2011). Značajno smanjenje broja *L. monocytogenes* u fermentisanim kobasicama pokazano je i u prethodnim ispitivanjima (Bošković i sar., 2017; Zdolec i sar., 2007). Intenzivnije smanjenje broja *L. monocytogenes* u fermentisanim kobasicama tokom prvih dana zrenja zapaženo je u radu Tolvanen i sar. (2008), dok je u ispitivanju Silinsa (2014), kao i u ovom ispitivanju, verovatno usled veće početne koncentracije *L. monocytogenes*, smanjenje broja bilo manje intenzivno tokom prvih nekoliko dana, nakon čega je usledilo značajnije smanjenje (smanjenje između 2 i 4 log CFU/g).

Kriterijumi za bezbednost hrane koji se odnose na hranu za konzumiranje, a koja podržava rast *L. monocytogenes* prikazani su u Slici 6.1a, a uključuju plan uzorkovanja, granične vrednosti (m, M), referentne metode ispitivanja i fazu u kojoj se kriterijum primenjuje. U Slici 6.2a date su karakteristike hrane za konzumiranje na primeru *L. monocytogenes*. Slika 6.2b odnosi se na kriterijume za *L. monocytogenes* u hrani spremnoj za konzumiranje, a Slika 6.2c na kriterijume kod kategorije hrane spremne za konzumiranje koja podržava rast *L. monocytogenes*.

Поглавље 1. Критеријуми безбедности хране

Категорија хране	Микроорганизми/ њихови токсини, метаболити	План узорковања (1)		Граничне вредности (2)		Референтна метода испитивања (3)	Фаза у којој се критеријум примењује
		n	c	m	M		
1.1. Храна спремна за конзумирање која подржава раст <i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 cfu/g ⁽⁵⁾		EN ISO 11290-2 ⁽⁶⁾	Производ у промету током његовог рока употребе
		5	0	Не сме бити у 25 g ⁽⁷⁾		EN ISO 11290-1	Пре него што храна престане да буде под непосредном контролом субјекта који је произвео

Izvor: Pravilnik o izmeni i dopuni Pravilnika o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa („Službeni glasnik RS”, broj 62/18)

Slika 6.1a. Kriterijumi za bezbednost hrane koji se odnose na hranu za konzumiranje koja podržava rast *L. monocytogenes*

1.2.	Храна спремна за конзумирање која не подржава раст <i>L. monocytogenes</i> (4) (8)	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 cfu/ g	EN ISO 11290-2 ⁽⁶⁾	Производ у промету током његовог рока употребе
------	--	-------------------------------	---	---	------------	-------------------------------	--

Izvor: Pravilnik o izmeni i dopuni Pravilnika o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa („Službeni glasnik RS”, broj 62/18)

Slika 6.1b. Kriterijumi za bezbednost hrane koji se odnose na hranu za konzumiranje koja podržava rast *L. monocytogenes*

Bliži uslovi koji se odnose na hranu spremnu za konzumiranje na primeru *L. monocytogenes* dati su u slikama 6.2a, 6.2b i 6.2c.

6.2.6. Карактеристике хране спремне за конзумирање

Када се утврђује рок употребе хране спремне за конзумирање, значајно је да се узме у обзир у којим условима *L. monocytogenes* може да се размножава у храни. Преживљавање и размножавање *L. monocytogenes* у храни спремној за конзумирање је у функцији карактеристика хране и услова под којима се она производи, пакује и складишти, а те карактеристике хране су у литератури описане као унутрашња (састав и физичко-хемијске карактеристике) и спољашња својства, тј. фактори околине (релативна влажност, температура, концентрација гасова) хране спремне за конзумирање.

Најважније карактеристике производа које утичу на преживљавање и размножавање *L. monocytogenes* у храни спремној за конзумирање су рН, активност воде (a_w) и температура, као и дужина складиштења производа. Поред тога, конзерванси и заштитна микрофлора, посебно стартер културе, могу да имају значајан утицај на преживљавање и размножавање *L. monocytogenes* у производу.

На основу познавања карактеристика (нпр. рН, a_w , температура складиштења) хране спремне за конзумирање, субјект у пословању храном одређује да ли постоји могућност да *L. monocytogenes* преживи или се размножава у одређеној храни. Те информације такође омогућавају субјекту у пословању храном да измени карактеристике производа, како би спречио или свео на минимум преживљавање или размножавање *L. monocytogenes*.

Izvor: Vodič za primenu mikrobioloških kriterijuma za hranu, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije, 2011.

Slika 6.2a. Karakteristike hrane spremne za konzumiranje na primeru *L. monocytogenes*

6.3. Критеријуми за *L. monocytogenes* у храни спремној за конзумирање

Код дефинисања критеријума безбедности хране за испитивање хране спремне за конзумирање на присуство бактерије *L. monocytogenes*, Правилник о микробиолошким критеријумима узима у обзир својства хране и њену намену, поштујући различитост хране која погодује или не погодује расту и развоју ове бактерије. При избору критеријума безбедности хране у односу на који се врши испитивање усаглашености хране спремне за конзумирање, мора да се одреди категорија хране. На основу могућности раста *L. monocytogenes* храна се може сврстати у једну од две категорије:

- **храна спремна за конзумирање која подржава размножавање *L. monocytogenes*;**
- **храна спремна за конзумирање која не подржава раст *L. monocytogenes*.**

У сврху дефинисања којој категорији храна припада (као што је наведено у фусоти за критеријум из тачке 1.3. Поглавља 1, Прилога 1. Правилника о микробиолошким критеријумима), сматра се да храна која има следећа својства **не погодује** расту и развоју *L. monocytogenes*:

- **pH < 4.4 или $a_w \leq 0.92$;**
- **pH < 5.0 и $a_w \leq 0.94$;**
- **рок употребе < 5 дана.**

Осим хране са наведеним својствима, субјект може у категорију „Храна спремна за конзумирање која **не подржава раст** *L. monocytogenes*“, да сврста и другу храну, уколико може научно да докаже да таква храна није погодна за раст *L. monocytogenes*.

Izvor: Vodič za primenu mikrobioloških kriterijuma za hranu, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije, 2011.

Slika 6.2b Критеријуми за *L. monocytogenes* у храни спремној за конзумирање

Код категорије „Храна спремна за конзумирање која **подржава раст** *L. monocytogenes*“, постављен је критеријум 100 cfu/g током рока употребе, који се примењује уколико је предходно субјект извео истраживања, а резултати истраживања показују да *L. monocytogenes* у производу не прелази границу од 100 cfu/g у периоду рока употребе. Субјект може да утврди и привремене граничне вредности током процеса, које морају да буду довољно ниске да би гарантовале да до краја рока употребе број *L. monocytogenes* неће прећи границу од 100 cfu/g.

Када субјект не може на задовољавајући начин да докаже да *L. monocytogenes* у производу неће прећи границу од 100 cfu/g, примењује се критеријум „**не сме бити**“/одсуство *L. monocytogenes* у 25 g.

Izvor: Vodič za primenu mikrobioloških kriterijuma za hranu, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije, 2011.

Slika 6.2c Критеријуми код категорије хране спремне за конзумирање која подржава раст *L. monocytogenes*

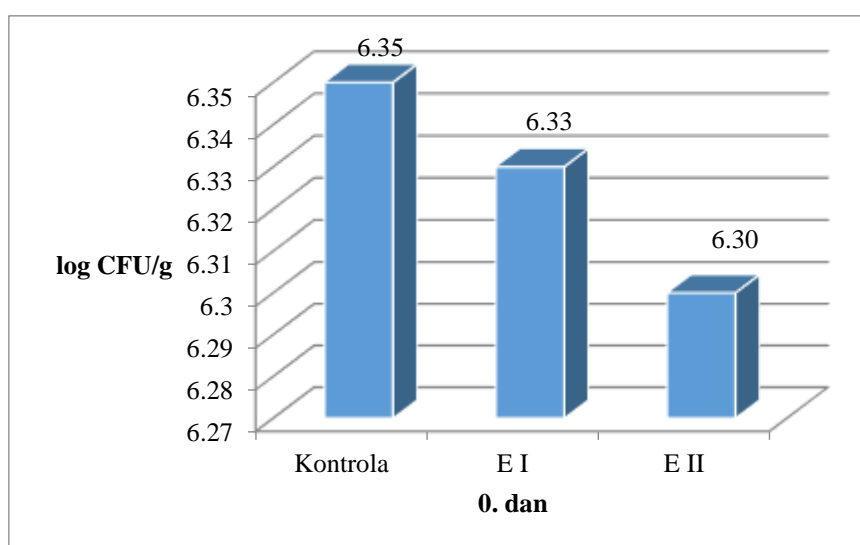
Učestalost nalaza *L. monocytogenes* u prirodno kontaminiranim fermentisanim kobasicama Mediterana prikazana je u tabeli 6.1. Iz tabele se uočava da je učestalost nalaza *L. monocytogenes* u fermentisanim kobasicama vrlo varijabilna, budući da se kreće od 3,25 do 44%.

Tabela 6.1 Učestalost *L. monocytogenes* u prirodno kontaminiranim fermentisanim kobasicama Mediterana*

Vrsta fermentisane kobasice Mediterana	Učestalost %	Podaci o koncentraciji	pH vrednost gotovog proizvoda	a _w vrednost gotovog proizvoda
Fermentisana kobasica**	10	<3 CFU/g	4,7–5,4	0,78–0,90
Italijanska kobasica šireg dijametra**	13,3	Prisustvo in 25 g	4,8–5,2	0,85–0,90
Sudžuk**	7	Prisustvo in 25 g	4,9–6,7	np
Fermentisana kobasica**	3,25	Prisustvo in 25 g	np	np
Fermentisana kobasica**	20	Prisustvo in 25 g	np	np
Fermentisana kobasica**	19,05	Prisustvo in 25 g	np	np
Fermentisana kobasica**	44	Prisustvo in 25 g	np	np
Fermentisana kobasica**	20	Prisustvo in 25 g	np	np
Kobasica šireg dijametra**	16,67	Prisustvo in 25 g	np	np
Kobasica užeg dijametra**	11,54	Prisustvo in 25 g	np	np
Fermentisana kobasica**	20	Prisustvo in 25 g	np	np
Kobasica šireg dijametra**	10	Prisustvo in 25 g	np	np
Kobasica šireg dijametra**	16	Prisustvo in 25 g	np	np
Kobasica šireg dijametra**	5	20 CFU/g	np	np
Fermentisana kobasica**	10	Prisustvo in 25 g	np	np
Kobasica šireg dijametra**	40	Prisustvo in 25 g	np	np
Španska kobasica užeg dijametra**	3,70	Prisustvo in 25 g	np	np
Kobasica užeg dijametra***	20	Prisustvo in 25 g	5,32	0,90
Salsiccia Sarda****	8	Prisustvo in 25 g	5,37	0,91

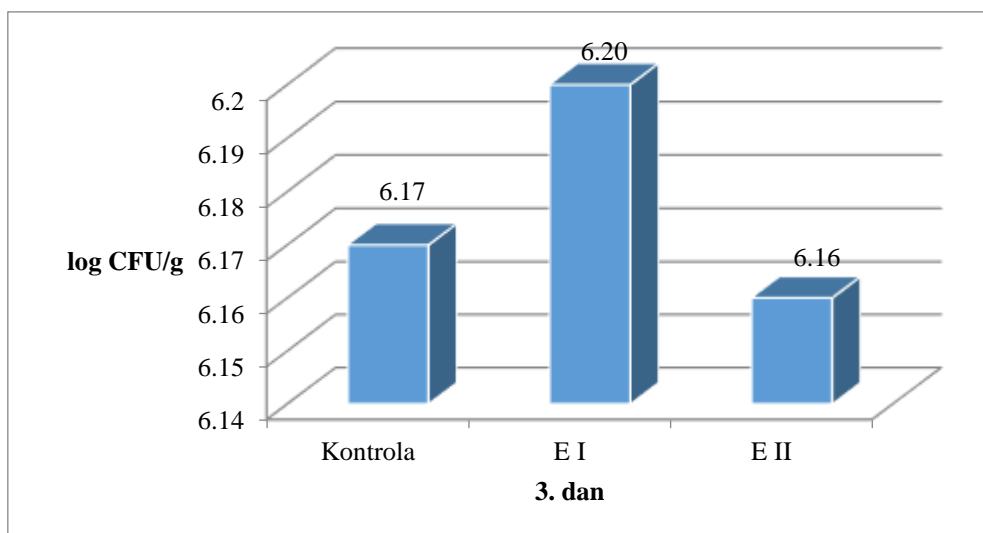
Legenda: * Modifikovano prema Skandaminis and Nychas, 2007; np: nema podataka. Bazirano na: ** Skandaminis i Nychas, 2007; *** Meloni i sar., 2009; **** Meloni i sar., 2014.

Uporedna analiza smanjenja broja bakterija *L. monocytogenes* izražena kao log CFU/g u fermentisanim kobasicama užeg dijametra trećeg dana ispitivanja pokazuje da je to smanjenje izraženije kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica (0,18 log CFU/g) nego kod E1 grupe fermentisanih kobasica (0,13 log CFU/g), odnosno E2 grupe (0,16 log CFU/g). Grafikonom 6.1. prikazan je broj *L. monocytogenes* (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama užeg dijametra nultog dana ispitivanja, a grafikonom 6.2. broj *L. monocytogenes* (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama užeg dijametra trećeg dana ispitivanja.



Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

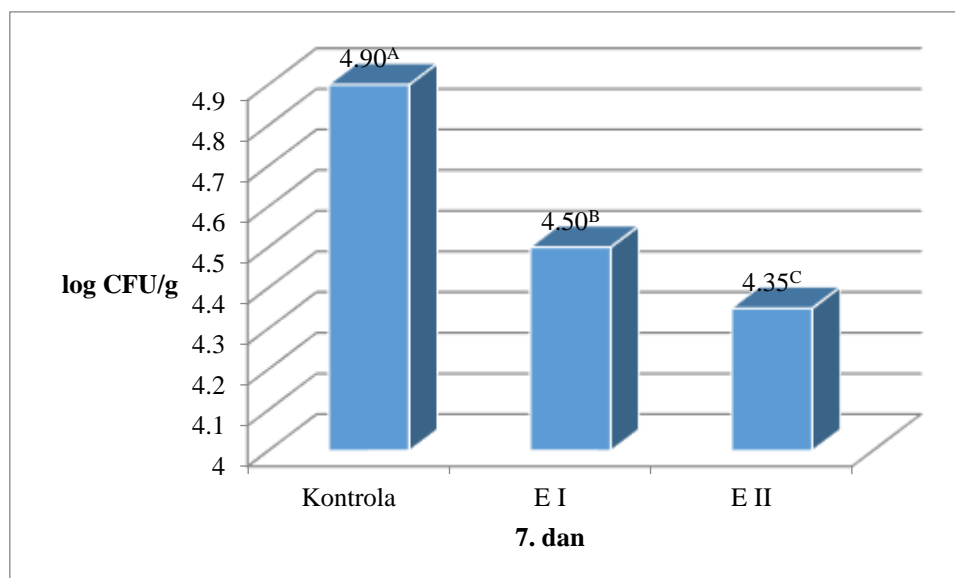
Grafikon 6.1 Broj *L. monocytogenes* (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama užeg dijametra nultog dana ispitivanja



Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.2. Broj *L. monocytogenes* (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama užeg dijametra trećeg dana ispitivanja

Razlike u ukupnom broju bakterija *L. monocytogenes* nisu bile statistički značajne između poređenih grupa fermentisanih kobasica, kako nultog tako ni trećeg dana ispitivanja. Međutim, sedmog dana ispitivanja smanjenje broja bakterija *L. monocytogenes* kod eksperimentalnih grupa fermentisanih kobasica užeg dijametra bilo je kod E1 grupe 1,83 log CFU/g, kod E2 grupe 1,95 log CFU/g, dok je smanjenje broja bakterija *L. monocytogenes* u fermentisanim kobasicama kontrolne grupe bilo 1,45 log CFU/g (grafikon 6.3).

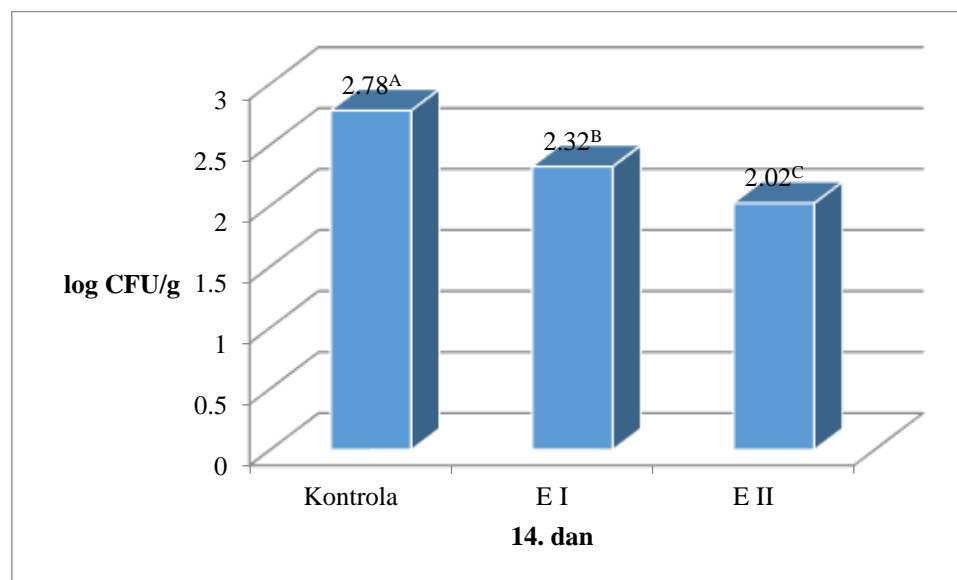


Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{ABC} $p < 0,05$;
 Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERMTM B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.3 Broj *L. monocytogenes* (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama užeg dijametra sedmog dana ispitivanja

Izrazitije smanjenje broja bakterija *L. monocytogenes* uzrokovalo je statistički značajne razlike između broja bakterija *L. monocytogenes* kod eksperimentalnih i kontrolne grupe fermentisanih kobasica. Sedmog dana ispitivanja pH vrednost kontrolne grupe fermentisanih kobasica bila je veća od pH vrednosti fermentisanih kobasica eksperimentalne grupe (tabela 5.9). Istog dana ispitivanja prosečan broj BMK izražen kao log CFU/g kod fermentisanih kobasica užeg dijametra bio je statistički značajno manji kod kontrolne grupe u odnosu na broj BMK kod fermentisanih kobasica E1 i E2 grupe (tabela 5.7). Izrazitije smanjenje broja bakterija *L. monocytogenes* kod eksperimentalnih grupa uzrokovano je prema tome većim brojem BMK kod fermentisanih kobasica E1 i E2 grupe, kao i manjom pH vrednošću kod ovih grupa fermentisanih kobasica. Karakteristično je da je i pored manjeg broja BMK kod E2 grupe, u odnosu na E1 grupu, smanjenje broja bakterija *L. monocytogenes* bilo izrazitije kod E1 grupe, što može da ukaže na veći bakteriocidni efekat starter kulture koja je korišćena u proizvodnji E2 grupe fermentisanih kobasica. I 14. dana ispitivanja u odnosu na nulti dan smanjenje broja

bakterija *L. monocytogenes* bilo je izraženije kod eksperimentalnih grupa fermentisanih kobasica, nego kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica (grafikon 6.4).

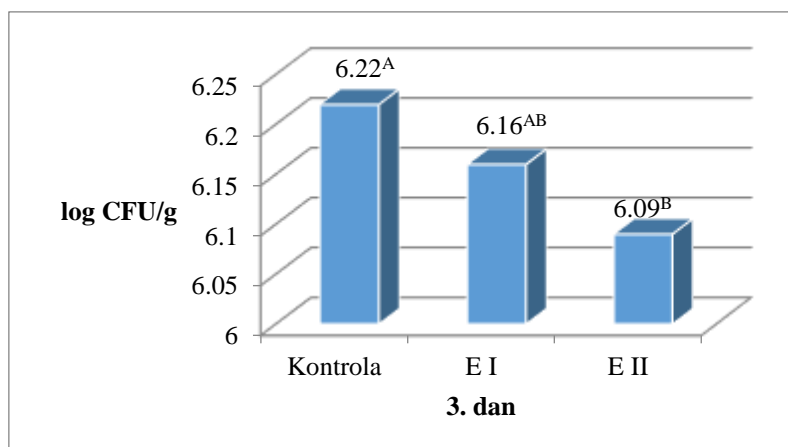


Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{ABC} $p < 0,05$; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.4. Broj *L. monocytogenes* (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama užeg dijametra 14. dana ispitivanja

Kao i sedmog dana, smanjenje broja bakterija *L. monocytogenes* kod E2 grupe fermentisanih kobasica bilo je izraženije u odnosu na smanjenje broja bakterija *L. monocytogenes* kod E1 grupe fermentisanih kobasica. I ovde se razlike mogu objasniti boljim bakteriocidnim efektom starter kulture koja je korišćena u proizvodnji E2 grupe fermentisanih kobasica.

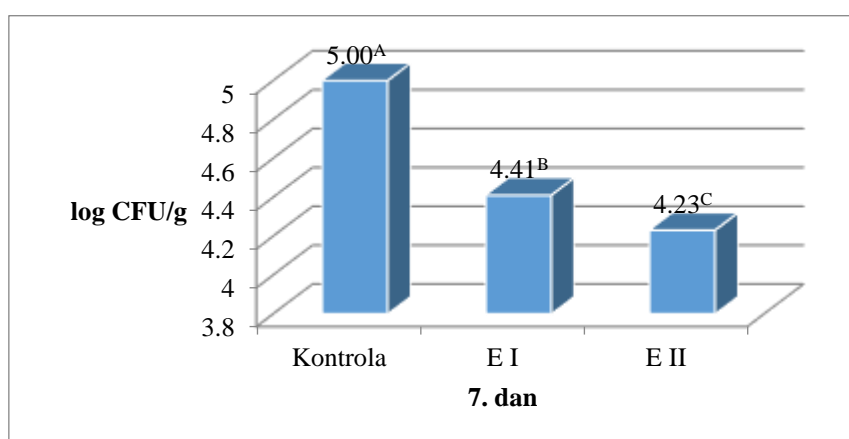
Kod fermentisanih kobasica šireg dijametra, već trećeg dana zrenja smanjenje broja bakterija *L. monocytogenes* u odnosu na nulti dan iskazano kao log CFU/g bilo je izraženije kod E1 i E2 grupe (0,17 i 0,21 log CFU/g) nego kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica (smanjenje za 0,13 log CFU/g) (grafikon 6.5).



Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB}p<0,05; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

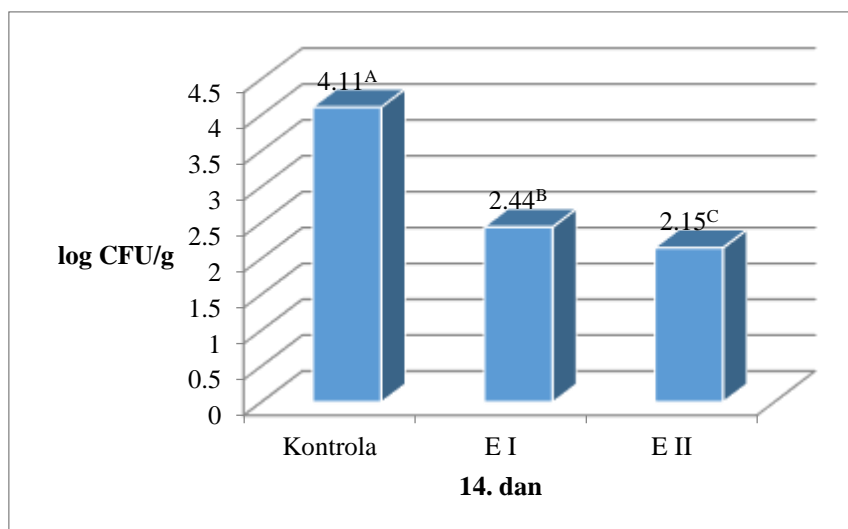
Grafikon 6.5. Broj *L. monocytogenes* (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama šireg dijametra trećeg dana ispitivanja

Razlike su bile još izraženije sedmog, a naročito 14. dana zrenja što je prikazano grafikonima 6.6. i 6.7.



Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{ABC}p<0,05; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

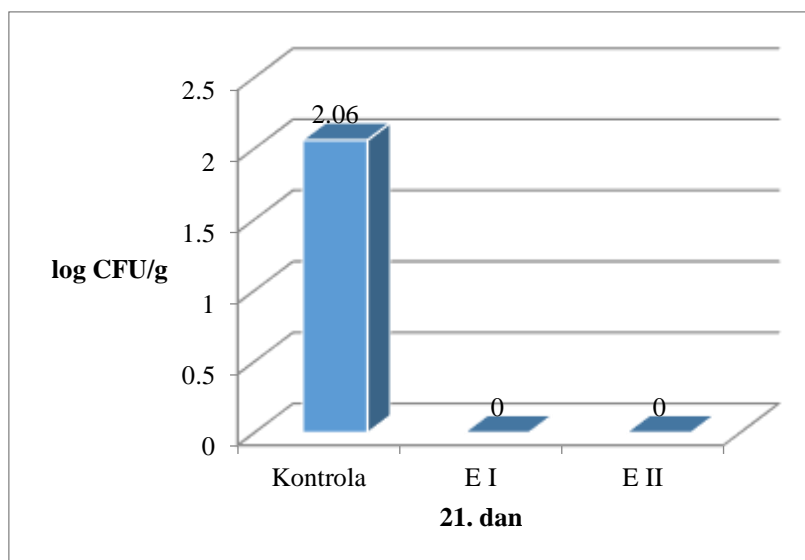
Grafikon 6.6. Broj *L. monocytogenes* (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama šireg dijametra sedmog dana ispitivanja



Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{ABC} $p < 0,05$; Kontrolna grupa - kobasice bez dodatke starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.7. Broj *L. monocytogenes* (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama šireg dijametra 14. dana ispitivanja

Razlike u smanjenju broja bakterija *L. monocytogenes* su posledica činjenice da je pH vrednost fermentisanih kobasica šireg dijametra eksperimentalnih grupa bila statistički značajno manja, a broj BMK značajno veći u odnosu na pH vrednost, odnosno broj BMK kod fermentisanih kobasica kontrolne grupe (tabela 5.10 i tabela 5.6). Sedmog dana ispitivanja je a_w vrednost eksperimentalnih grupa fermentisanih kobasica bila veća u odnosu na a_w vrednost kontrolne grupe fermentisanih kobasica, ali se ostalih dana ispitivanja a_w vrednost ispitivanih grupa fermentisanih kobasica širokog dijametra nije statistički značajno razlikovala (tabela 5.12). O značaju upotrebe starter kultura u proizvodnji fermentisanih kobasica govori podatak da *L. monocytogenes* nije dokazana u eksperimentalnim grupama fermentisanih kobasica 21. dana zrenja, a da je kod fermentisanih kobasica kontrolne grupe ova bakterija još uvek bila prisutna ($2,06 \pm 0,08$ log CFU/g) (grafikon 6.8).



Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.8. Broj *L. monocytogenes* (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama šireg dijametra 21. dana ispitivanja

L. monocytogenes kod sve tri grupe fermentisanih kobasica šireg dijametra nije utvrđena 31. i 41. dana ispitivanja (tabela 5.2).

Uporedna analiza smanjenja broja bakterija *L. monocytogenes* kod fermentisanih kobasica užeg i šireg dijametra pokazuje izraženije smanjenje kod fermentisanih kobasica užeg dijametra 3., 7. i 14. dana (tabele 5.1 i 5.2). Vrednosti pH bile su približno iste (5,86 za užu dijametar i 5,85 za širi dijametar). Kod kobasica šireg dijametra uočava se u daljem procesu zrenja dalji pad pH vrednosti i značajnije povećanje broja BMK. Na razlike u smanjenju broja bakterija *L. monocytogenes* između kontrolne grupe fermentisanih kobasica užeg i šireg dijametra mogle su da utiču značajno razlike u a_w vrednosti koje su uočene već trećeg dana, budući da su kod fermentisanih kobasica šireg dijametra u odnosu na fermentisane kobasice užeg dijametra bile veće za 0,007, sedmog dana za 0,012, a 14. dana za 0,020.

Kod eksperimentalne grupe E1, smanjenje broja bakterija *L. monocytogenes* izraženo kao log CFU/g bilo je izraženije kod fermentisanih kobasica šireg dijametra, a 14. dana kod fermentisanih kobasica užeg dijametra. Kako su vrednosti pH svih dana ispitivanja (3., 7, 14. dan) kod fermentisanih kobasica užeg i šireg dijametra bile bliske

kao što je u istim danima bio blizak i broj BMK, to se veće razlike u smanjenju broja bakterija *L. monocytogenes* 14. dana u odnosu na nulti dan kod fermentisanih kobasica užeg dijametra mogu povezati sa razlikama u a_w vrednosti. Ona je kod fermentisanih kobasica šireg dijametra bila veća za 0,020. Slični odnosi smanjenja broja bakterija, pH i a_w vrednosti, kao i broja BMK, zapaženi su i kod fermentisanih kobasica E2 grupe.

Prema nalazima Drosinos i sar. (2005) broj bakterija *L. monocytogenes* brzo opada za 3-4 log CFU/g u toku 28 dana zrenja, mada broj bakterija može da opadne i za 4-5 log CFU/g. Nasuprot tome, Dučić i sar. (2016), saopštavaju da se bez dodavanja starter kultura broj bakterija *L. monocytogenes* redukuje za svega 0,5 do 0,8 log CFU/g, iako je početan broj patogena *L. monocytogenes* bio visok (preko 6 log CFU/g). Razlike u odnosu na istraživanje u ovoj doktorskoj disertaciji mogu da budu posledica razlika u izboru serotipova, kao i u toku samog proizvodnog procesa.

Antimikrobne komponente (bakteriocini) koje proizvode bakterije mlečne kiseline, naročito u eksponencijalnoj fazi rasta, mogu biti dodatni faktor za inhibiciju *L. monocytogenes* (Cocolin i sar. 2005) i bakteriocinogene bakterije mlečne kiseline se uspešno koriste u kontroli *L. monocytogenes* u fermentisanim proizvodima od mesa (Pidcock i sar., 2002). Na efekat bakteriocina mogu uticati brojni faktori, uključujući stepen difuzije u matriksu, vezivanje sa lipidima i drugo (Zdolec i sar., 2005). *Lb. sakei*, prisutna u obe korišćene komercijalne starter kulture, može proizvoditi bakteriocine koji pokazuju široku antimikrobnu aktivnost prema patogenim mikroorganizmima, uključujući i *L. monocytogenes* (Gao i sar., 2014; Pérez-Ibarrechei sar., 2016). *Pediococcus acidilactici* koji proizvodi pediocin i koji se nalazi u sastavu komercijalne starter kulture dodate u E2 grupu kobasica, takođe je mogao doprineti inhibiciji *L. monocytogenes*, s obzirom da je broj *L. monocytogenes* u ovoj grupi bio najniži u poređenju sa ostalim grupama.

6.2 Enterobakterije u fermentisanim kobasicama

Našim propisima koji se odnose na kriterijum higijene u procesu proizvodnje propisane su vrednosti koje se odnose na prisustvo enterobakterija na trupovima zaklanih životinja, i to na trupovima goveda, ovaca, koza i konja, kao i na trupovima svinja. Kriterijumima su definisane granične vrednosti (m i M), faze u kojima se kriterijum primenjuje, kao i mere koje se primenjuju u slučaju nezadovoljavajućih rezultata (tabela 6.2).

Tabela 6.2 Kriterijumi higijene u procesu proizvodnje koji se odnose na prisustvo enterobakterija na trupovima zaklanih životinja

Kategorija hrane	Granične vrednosti		Referentni metod ispitivanja	Faza u kojoj se kriterijum primenjuje	Mera u slučaju nezadovoljavajućih rezultata
	m	M			
Trupovi goveda, ovaca, koza i konja	1,5 log cfu/cm ² dnevne srednje log vrednosti	2,5 log cfu/cm ² dnevne srednje log vrednosti	EN ISO 21528-2	Trupovi posle obrade, ali pre hlađenja	Poboljšanje higijene klanja i preispitivanje kontrole procesa
Trupovi svinja	2,0 log cfu/cm ² dnevne srednje log vrednosti	3,0 log cfu/cm ² dnevne srednje log vrednosti			

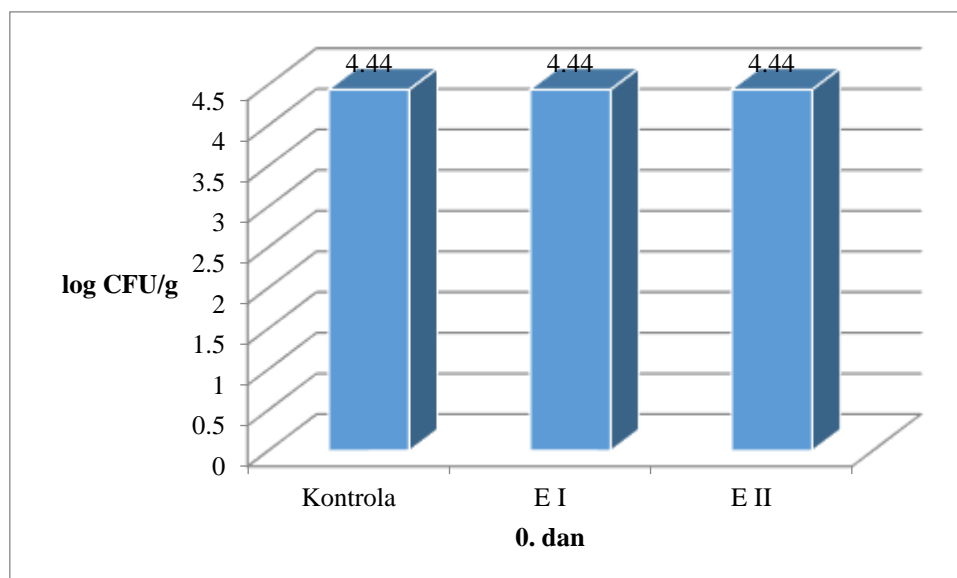
Izvor: Prilagođeno prema Pravilniku o izmeni i dopuni Pravilnika o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa („Službeni glasnik RS”, broj 62/18).

Nizak nivo enterobakterija je posebno važan za dobijanja kvalitetnog i bezbednog proizvoda (Rubio, 2013). U ovom ogledu broj enterobakterija bio je relativno visok, što je posledica higijenskog statusa ulazne sirovine (mesa), odnosno higijenskih uslova u samom proizvodnom (priprema nadeva) procesu (Dučić i sar., 2016). Ipak, broj enterobakterija smanjuje se u toku procesa zrenja i pada ispod nivoa detekcije kod svih

fermentisanih kobasica užeg dijametra na kraju procesa zrenja, što se može tumačiti brzim procesom fermentacije, ali i padom pH i a_w vrednosti. Rezultati pokazuju da je smanjenje broja enterobakterija karakteristično i za kontrolnu gupu fermentisanih kobasica kojoj nije dodata starter kultura. To znači da su autohtone BMK svojom aktivnošću dovele do smanjenja broja enterobakterija.

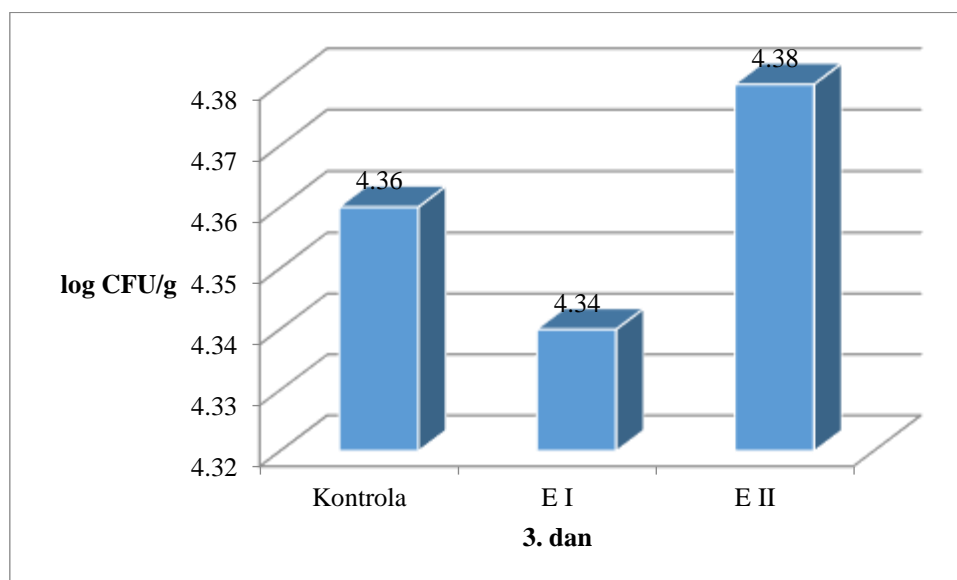
Visok nivo *Enterobacteriaceae* na početku ispitivanja može biti posledica lošeg higijenskog statusa sirovine ili proizvodnog objekta u kojem je pripremljena masa za punjenje kobasica (Dučići sar., 2016; Boškovići sar., 2017). U ovom ispitivanju broj *Enterobacteriaceae* je bio ispod nivoa detekcije ($<2 \log \text{CFU/g}$) u svim kobasicama 31. dana zrenja. Slični rezultati su dokumentovani od strane Bošković i sar. (2017), koji nisu detektovali ovu grupu bakterija u kobasicama užeg dijametra nakon 18. dana zrenja. Veće smanjenje broja *Enterobacteriaceae* do 21. dana u kobasicama sa dodatom starter kulturom može se pripisati inhibitornom efektu bakteriocina proizvedenog od strane inokulisane probiotske kulture i većeg smanjenja pH u ovim grupama. Ipak, nakon 31. dana ova grupa bakterija nije detektovana ni u kontrolnoj grupi kobasica, što može biti rezultat aktivnosti autohtonih bakterija mlečne kiseline.

Promena broja enterobakterija u toku zrenja fermentisanih kobasica prikazana je u poglavlju Rezultati ispitivanja (tabela 5.3. i grafikon 5.3. za fermentisane kobasice užeg dijametra i tabela 5.4. i grafikon 5.4. za fermentisane kobasice šireg dijametra). Kod fermentisanih kobasica užeg dijametra broj enterobakterija izražen kao $\log \text{CFU/g}$ smanjio se od nultog do trećeg dana za svega $0,08 \log \text{CFU/g}$, kod fermentisanih kobasica E1 grupe za $0,14 \log \text{CFU/g}$, a kod fermentisanih kobasica E2 grupe za $0,09 \log \text{CFU/g}$ (grafikon 6.9 i 6.10).



Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

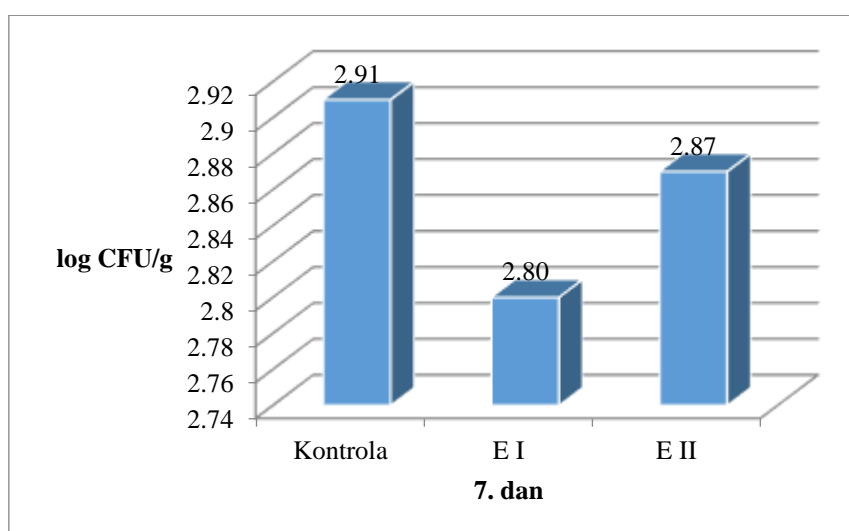
Grafikon 6.9. Broj *Enterobacteriaceae* (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama nultog dana ispitivanja



Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.10. Broj *Enterobacteriaceae* (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama užeg dijametra trećeg dana ispitivanja

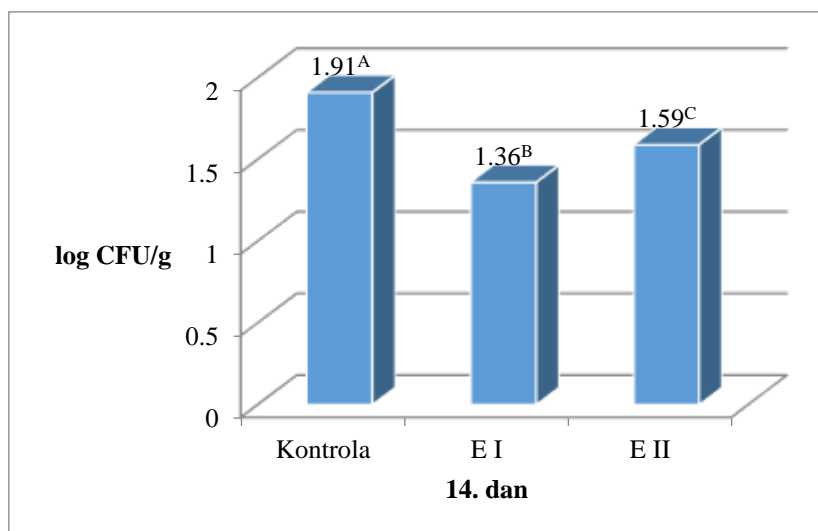
Mala promena (smanjenje) broja enterobakterija i pored porasta broja BMK za skoro 2 log i blagog pada pH vrednosti, kao i povoljnih temperaturnih uslova, posledica je nemogućnosti da BMK za dva dana zrenja kobasica stvore dovoljne količine bakteriocina koji bi uticali na smanjenje broja enterobakterija. Ne bi se moglo reći da je a_w vrednost uticala na rast enterobakterija, jer se nije značajno smanjila od nultog do trećeg dana (tabela 5.9 i 5.10). Sedmog dana zrenja broj enterobakterija u fermentisanim kobasicama u odnosu na nulti dan smanjen je za 1,3 log CFU/g kod fermentisanih kobasica užeg dijametra, za 1,68 log CFU/g kod fermentisanih kobasica E1 grupe, i za 1,60 log CFU/g kod fermentisanih kobasica E2 grupe (grafikon 6.11).



Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.11. Broj *Enterobacteriaceae* (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama užeg dijametra sedmog dana ispitivanja

Izraženije razlike smanjenja logaritma broja enterobakterija zapažaju se između kontrolne i eksperimentalnih grupa fermentisanih kobasica 14. dana zrenja.

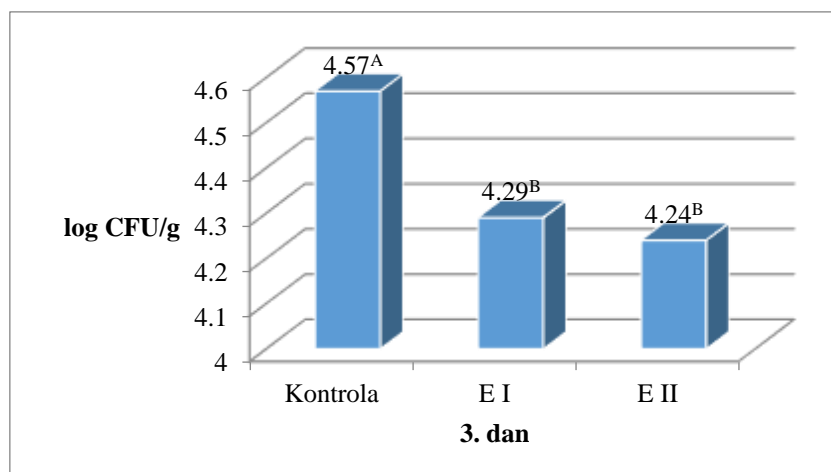


Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike $^{ABC}p < 0,05$; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.12 Broj *Enterobacteriaceae* (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama užeg dijametra 14. dana ispitivanja

Tako je u odnosu na nulti dan zrenja smanjenje broja bakterija kod kontrolne grupe bilo 1,53 log CFU/g, kod E1 grupe 3,12 log CFUg, a kod E2 grupe 2,88 log CFU/g. Razlozi izrazitijeg smanjenja logaritma broja bakterija od nultog do 14. dana posledice su smanjenja pH i a_w vrednosti u nadevu fermentisanih kobasica, kao i znatnog povećanja broja BMK (tabela 5.7 i 5.9, grafikon 6.12).

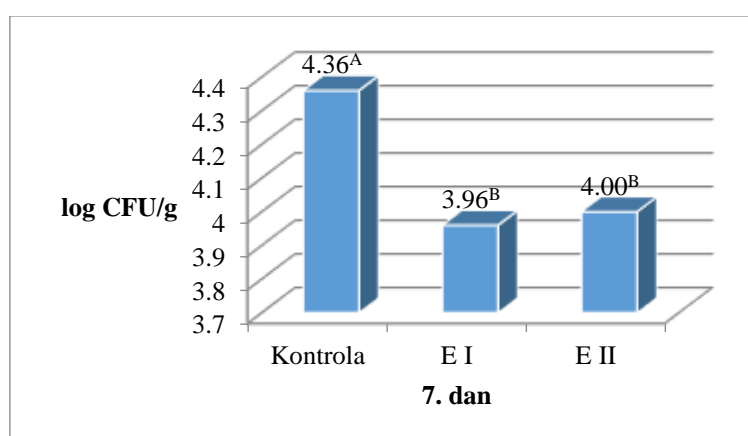
Promena logaritma broja enterobakterija kod fermentisanih kobasica šireg dijametra prikazane su u tabeli 5.4 i grafikonu 5.4. Kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica od nultog do trećeg dana broj enterobakterija povećao se za 0,13 log CFU/g, dok se kod E1 grupe smanjio za 0,15 log CFU/g, a kod E2 grupe za 0,20 log CFU/g (grafikon 6.13).



Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB}p<0,05; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.13. Broj *Enterobacteriaceae* (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama šireg dijametra trećeg dana ispitivanja

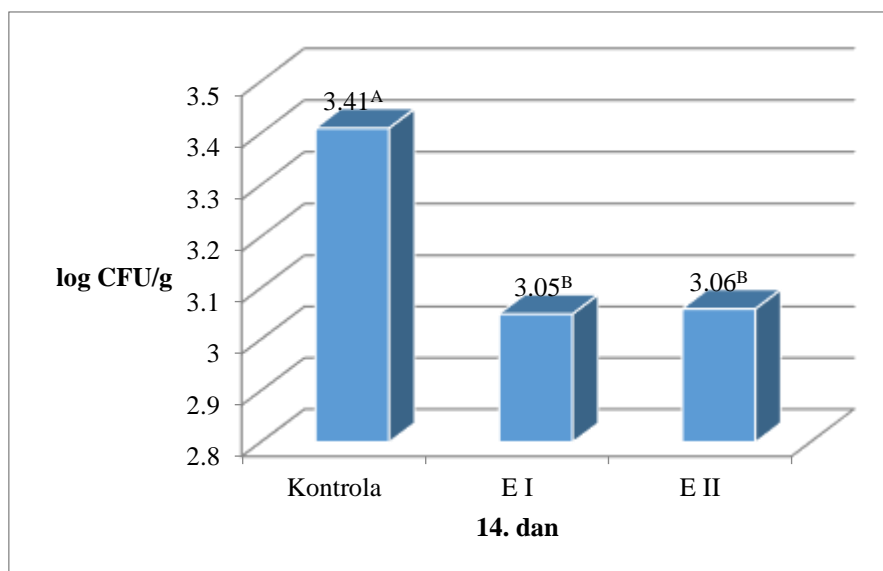
Sedmog dana zrenja broj enterobakterija kontrolne grupe fermentisanih kobasica u odnosu na nulti dan smanjen je za svega 0,08 log CFU/g, kod E1 grupe za 0,48 log CFU/g i kod E2 grupe za 0,44 log CFU/g (grafikon 6.14).



Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB}p<0,05; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.14. Broj *Enterobacteriaceae* (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama šireg dijametra sedmog dana ispitivanja

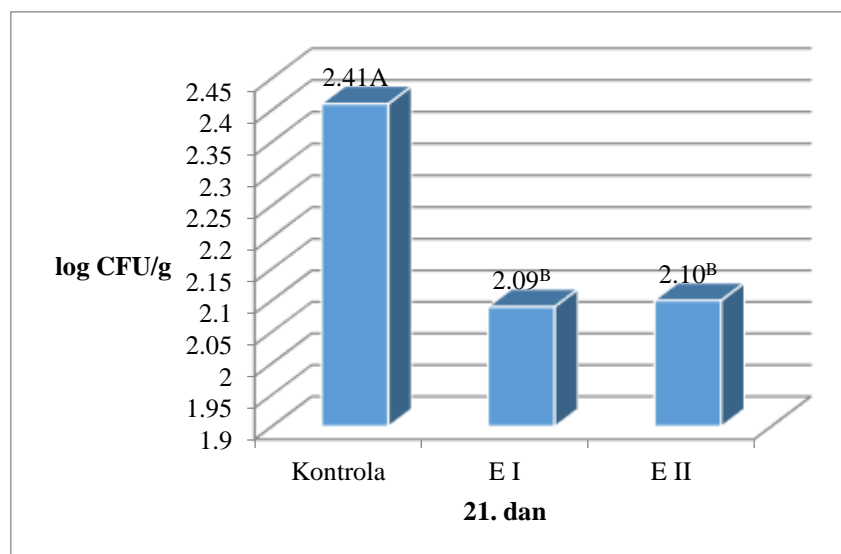
Pad broja enterobakterija u fermentisanim kobasicama šireg dijametra 14. dana zrenja u odnosu na 7. dan bio je približno za 1 log CFU/g, a u odnosu na nulti dan kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica bio je manji za 1,03 log CFU/g, kod E1 grupe za 1,39 log CFU/g i kod E2 grupe za 1,48 log CFU/g (grafikon 6.15).



Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB}p<0,05; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.15 Broj *Enterobacteriaceae* (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama šireg dijametra 14. dana ispitivanja

Od 14. do 21. dana zrenja pad broja enterobakterija kod fermentisanih kobasica šireg dijametra bio je približno za još 1 log, a u odnosu na nulti dan kod kontrolne grupe fermentisanih kobasica iznosio je 2,3 log CFU/g, kod E1 grupe 2,35, a kod E2 grupe 2,26 log CFU/g (grafikon 6.16).



Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB} $p < 0,05$;
 Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.16. Broj *Enterobacteriaceae* (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama šireg dijametra 21. dana ispitivanja

Kao i kod fermentisanih kobasica užeg dijametra smanjenje broja enterobakterija pratilo je smanjenje pH i a_w vrednosti, kao i povećanje broja BMK u nadevu.

Uporedna analiza promena logaritma enterobakterija kod fermentisanih kobasica užeg i šireg dijametra pokazuje da se broj enterobakterija brže smanjuje kod fermentisanih kobasica užeg dijametra. Tako je i smanjenje broja enterobakterija sedmog dana zrenja kod fermentisanih kobasica užeg dijametra bilo veće nego smanjenje broja enterobakterija kod fermentisanih kobasica šireg dijametra 14. dana zrenja. O znatnijem smanjenju broja enterobakterija govori podatak da 18. dana zrenja (kraj proizvodnje) kod fermentisanih kobasica užeg dijametra nije utvrđeno prisustvo enterobakterija, dok su kod fermentisanih kobasica šireg dijametra enterobakterije dokazane i 21. dana zrenja (grafikon 5.3 i 5.4) Ovo može da se objasni smanjenjem a_w vrednosti koje je izraženije kod fermentisanih kobasica užeg dijametra. Vrednost pH nije se značajnije razlikovala, i 18. dana zrenja kod fermentisanih kobasica užeg dijametra bila je na nivou pH vrednosti fermentisanih kobasica šireg dijametra 21. dana, što nije podudarno sa brojem BMK.

6.3 Bakterije mlečne kiseline u fermentisanim kobasicama

Dodate starter kulture u nadev kobasica utiču na to da fermentacija bude usmerena u željenom pravcu, da se dobiju proizvodi željenih (karakterističnih) senzornih osobina, zdravstveno bezbedni, ujednačenog, standardnog kvaliteta i održivi u odgovarajućim uslovima skladištenja (Cleaveland i sar., 2001). One stvaraju organske kiseline, prevashodno mlečnu kiselinu, povećavaju kiselost nadeva (pad pH vrednosti), što je od posebnog značaja za inaktivaciju patogenih mikroorganizama. Laktobacili imaju sposobnost stvaranja bakteriocina, peptida ili proteinskih strukturnih elemenata koji imaju bakteriocidno ili bakteriostatsko delovanje, primarno na filogenetski slične mikroorganizme. Mehanizam delovanja bakteriocina je različit, kao što su različite i njihove fizičko-hemijske osobine, pa su prema tome veoma heterogena grupa jedinjenja. Za više izolovanih bakteriocina je utvrđeno da imaju sličan efekat prema homolognim bakterijskim grupama. Više studija je pokazalo da bakteriocini mogu da inhibišu rast *L. monocytogenes* (Martinez i De Martinis, 2005). Upotreba BMK koje imaju sposobnost stvaranja baktericina ili sami izolovani bakteriocini imaju praktičnu primenu i predstavljaju barijeru za rast patogenih mikroorganizama. U fermentisanoj hrani, pa i u fermentisanim kobasicama doprinose povećanju bezbednosti proizvoda (Deegan i sar., 2006). Značajno je istaći da bakteriocini nisu štetni za zdravlje ljudi, budući da ih proteaze digestivnog trakta razgrađuju (Cleaveland i sar., 2001).

Završna a_w i pH vrednost i sadržaj soli i začina zaustavljaju ili inhibiraju rast patogenih mikroorganizama u fermentisanim kobasicama, mada *L. monocytogenes* može da opstane i u ovim uslovima (Benkerroum i sar., 2005). Ovo je razlog što se u nadev fermentisanih kobasica češće dodaju starter kulture koje imaju sposobnost stvaranja bakteriocina. Dodavanje starter kultura je od praktičnog značaja za mikrobiološku stabilnost fermentisanih kobasica koje nisu dovoljno suve, kao što je to slučaj kod Čajne kobasice (Meloni, 2015). *Lactobacillus sakei* se nalazi u obe kulture koje su korišćene kao starteri za eksperimentalne grupe kobasica. Ovaj mikroorganizam može da stvara bakteriocine, što utiče na rast patogena, a među njima i na rast *L. monocytogenes* (Gao i sar., 2014; Perez-Ibarreche i sar., 2016). Rezultati ove studije ukazuju da *Lactobacillus sakei* kao deo starter kulture za fermentisane kobasice ima značajnu ulogu u kontroli *L. monocytogenes*. Takođe, i *Pediococcus acidilactici* stvara pediocin koji doprinosi

inhibiciji *L. monocytogenes* u drugoj eksperimentalnoj grupi kojoj je dodat u starter kulturi za ovu grupu kobasica.

Usled dobre prilagođenosti na mesni supstrat i posledično brži rast, koji je uočen tokom procesa zrenja (Silins, 2014; Drosinon i sar., 2005), bakterije mlečne kiseline su postale dominantna grupa bakterija u ispitivanim kobasicama do sedmog dana. Eksponecijalna faza rasta bakterija mlečne kiseline završena je 14. dana, kada je otpočela stacionarna faza. Jedan od osnovnih faktora koji značajno utiče na rast bakterija mlečne kiseline u fermentisanim kobasicama je a_w vrednost, koja se smanjuje tokom procesa zrenja usled dehidracije (Comi i sar., 2005). Minimalne vrednosti a_w za rast bakterija prisutnih u starter kulturi *L. sakei*, *S. xylosum* i *D. hanseii*, su 0,91, 0,86 i 0,81 (Leroy i De Vuyst, 1999; Terra i sar., 2007; Aggarwal i Mondal, 2008; Silins, 2014), što su niže vrednosti od izmerenih vrednosti a_w tokom procesa zrenja u ovom ispitivanju. Takođe, dodatak NaCl, usled vezivanja vode i anjonskih karakteristika, utiče na metabolizam starter kultura u fermentisanim kobasicama. Dodatak soli u koncentraciji 2% ili manje, može pozitivno uticati na rast bakterija mlečne kiseline, dok koncentracije soli veće od 3% inhibiraju rast ove grupe bakterija (Samapundo i sar. 2010, Silins 2014). Dodatak 2,3% nitritne soli u ovom ispitivanju izgleda da nije doveo do značajnije inhibicije bakterija starter kulture, mada je moguće da je ovo razlog blagog smanjenja broja bakterija mlečne kiseline nakon 21. dana zrenja. Podaci iz literature ukazuju da su homofermentativne vrste bakterija mlečne kiseline rezistentnije na so u odnosu na heterofermentativne vrste kao što je *L. sakei*, komponenta obe starter kulture korišćene u ovom ispitivanju (Silins, 2014).

Komercijalni značaj metaboličkih produkata bakterija mlečne kiseline prikazan je u tabeli 6.3, antibakterijski metaboliti bakterija mlečne kiseline u tabeli 6.4, a sinteza bakteriocina bakterija mlečne kiseline prikazan je tabelom 6.5.

Tabela 6.3 Komercijalni značaj metaboličkih produkata bakterija mlečne kiseline

Parametar	Korisno dejstvo	Nepoželjno dejstvo
Mlečna kiselina	Inhibicija patogena	Zakišeljavanje
Sirćetna kiselina	Aroma	Nesvojstven ukus
Diacetil	Aroma (mlečni proizvodi)	Nesvojstven ukus (pivo)

CO ₂	Konzervisanje, obogaćivanje ukusa	Stvaranje gasa (nadimanje)
H ₂ O ₂	Inhibicija patogena	Dekolorizacija
Biogeni amini	-	Zdravlje (intoksikacija hranom)
Sluzi (egzopolisaharidi)	Stabilizacija (npr. jogurt)	Senzorika
Metan-tiol, H ₂ S	Aroma	Nesvojstven ukus i miris
Bakteriocini	Inhibicija patogena	Inhibicija korisnih BMK
Širok spektar antimikrobnih supstanci	Inhibicija patogena i mikroorganizama kvara	Rezistencija intestinalnih mikroorganizama

Izvor: O' Sullivan i sar., 2002.

Tabela 6.4 Antibakterijski metaboliti bakterija mlačne kiseline

Produkti	Glavne grupe mikroorganizama na koje deluju
Mlečna kiselina	Truležne i gram negativne bakterije, neke plesni
Sirćetna kiselina	Truležne bakterije, neki kvasci i plesni
Vodonik peroksid	Patogeni i mikroorganizmi kvara, posebno u hrani bogatoj proteinima
Laktoperoksidazni sistem sa vodonik-peroksidom	Patogeni i mikroorganizmi kvara
Lizozim (rekombinantna DNK)	Nepoželjne gram pozitivne bakterije
Reuterin	Širok spektar bakterija, kvasaca i plesni
Diacetil	Gram negativne bakterije
Masne kiseline Bakteriocini	Različite bakterije
Nizin	Neke BMK, gram pozitivne i sporogene bakterije
Drugi	Gram pozitivne bakterije, različit inhibitorni spektar prema tipu bakteriocina

Izvor: O' Sullivan i sar., 2002.

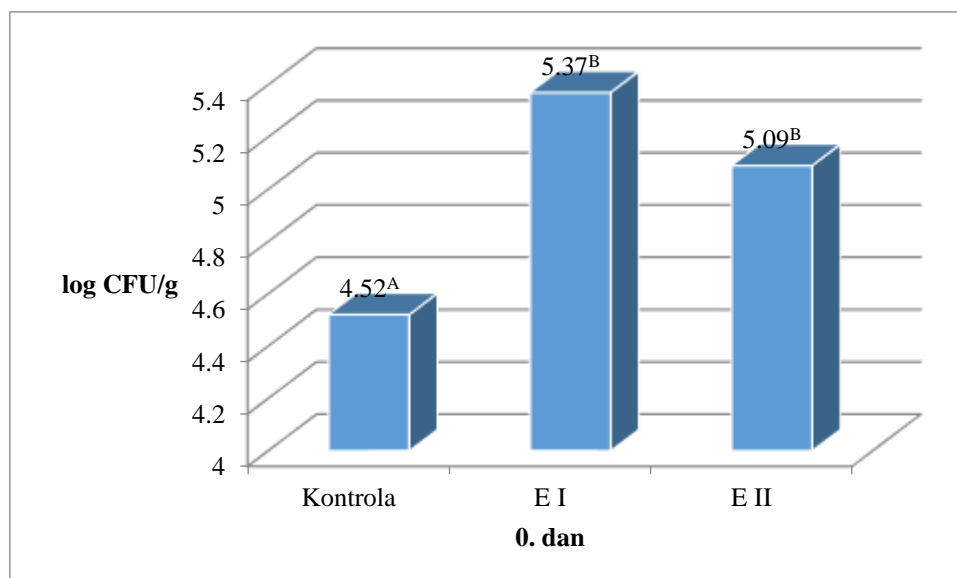
Tabela 6.5 Sinteza bakteriocina bakterija mlečne kiseline

Bakteriocini roda <i>Lactococcus</i> spp.	
Bakteriocin	Bakterija
Nizin, lakticin 481	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
Diplokokcin	<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>
Laktostrepcin	<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
Bakteriocin S50	<i>L. lactis</i>
Bakteriocini roda <i>Lactobacillus</i> sp.	
Bakteriocin	Bakterija
ND – nije definisano	<i>L. fermenti</i> 466
Laktocin 27	<i>L. helveticus</i> 27
Halveticin J	<i>L. helveticus</i>
Laktacin B, laktacin F	<i>L. acidophilus</i>
Plantaricin A	<i>L. plantarum</i>
Sakacin A	<i>L. sake</i> Lb 706
Laktocin S	<i>L. sake</i> L45
Kaseicin 80	<i>L. casei</i>

Izvor: O'Sullivan i sar., 2002.

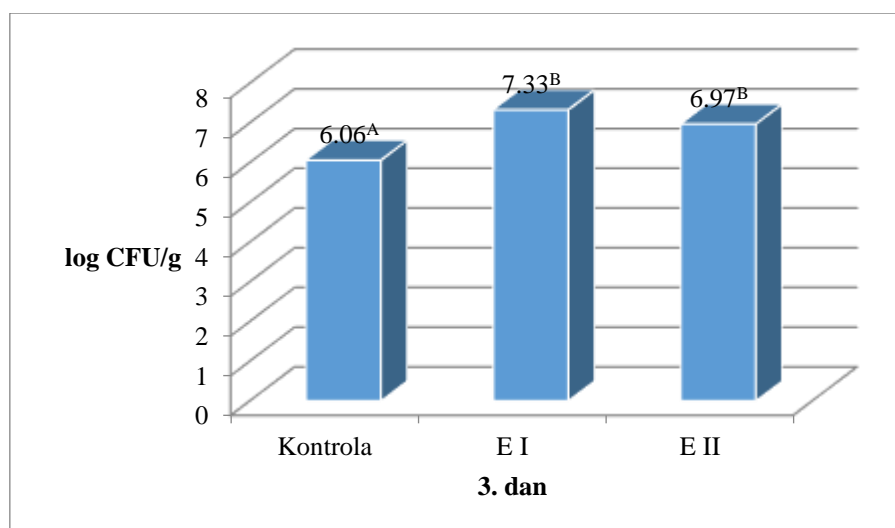
Broj BMK kod fermentisanih kobasica užeg i šireg dijametra je u toku zrenja rastao za razliku od broja bakterija *L. monocytogenes*, kao i enterobakterija čiji broj se smanjivao. Kod obe grupe kobasica već nultog dana broj BMK bio je statistički značajno veći kod eksperimentalnih grupa kobasica, što je sasvim razumljivo s obzirom na činjenicu da su u nadev ovih kobasica dodate starter kulture (tabela 5.5 i 5.6). U toku čitavog procesa zrenja taj odnos BMK kod kontrolne i eksperimentalnih grupa kobasica ostao je nepromenjen, odnosno uvek je broj BMK bio veći kod E1 i E2 grupe fermentisanih kobasica nego kod kontrolne grupe. Iz analize porasta broja BMK kod fermentisanih kobasica užeg dijametra uočava se porast logaritma broja BMK do 14. dana zrenja i to kod kontrolne grupe za 3,61 log CFU/g, kod E1 grupe za 3,82 log, kod E2 grupe za 4,05 log CFU/g (grafikoni 6.17 do 6.19).

Na kraju zrenja broj bakterija BMK se prema rezultatima Silinsa (2014) smanjuje, što je podudarno sa našim rezultatima, kao što je podudaran i rezultat da pri kraju procesa zrenja dolazi do povećanja pH vrednosti fermentisanih kobasica.



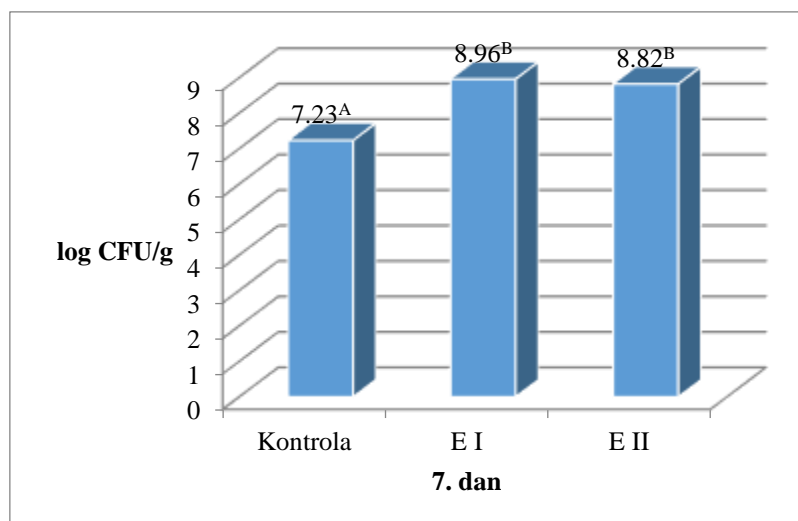
Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB}p<0,05; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.17 Broj bakterija mlečne kiseline (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama nultog dana ispitivanja



Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB}p<0,05; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

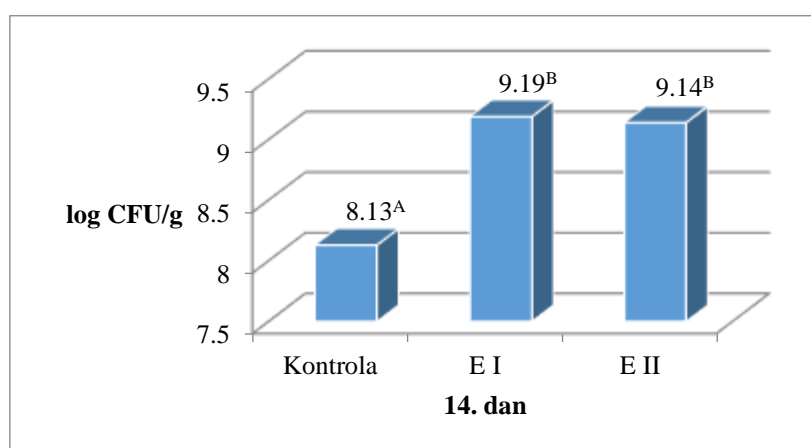
Grafikon 6.18. Broj bakterija mlečne kiseline (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama užeg dijametra trećeg dana ispitivanja



Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB}p<0,05; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

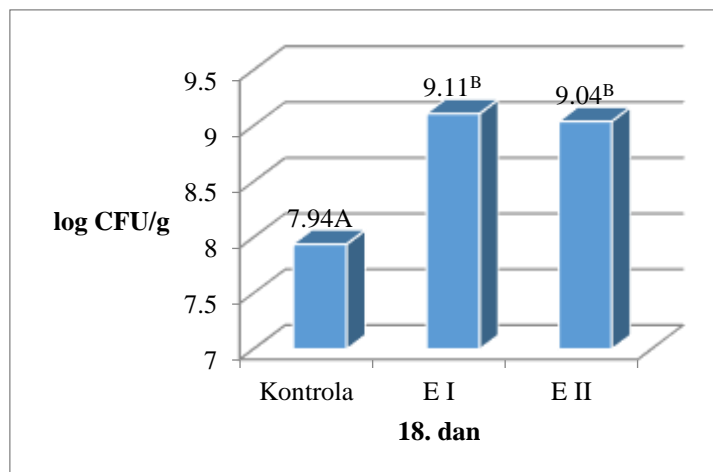
Grafikon 6.19 Broj bakterija mlečne kiseline (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama užeg dijametra sedmog dana ispitivanja

Od 14. do 18. dana zrenja broj BMK kod fermentisanih kobasica užeg dijametra blago opada ili bolje rečeno stagnira (tabela 5.5 i grafikon 5.5) (grafikon 6.20 i 6.21).



Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB}p<0,05; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

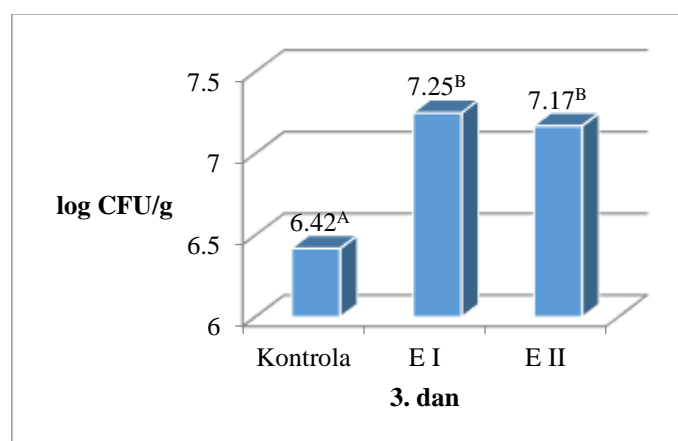
Grafikon 6.20 Broj bakterija mlečne kiseline (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama užeg dijametra 14. dana ispitivanja



Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB}p<0,05; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERMTM B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

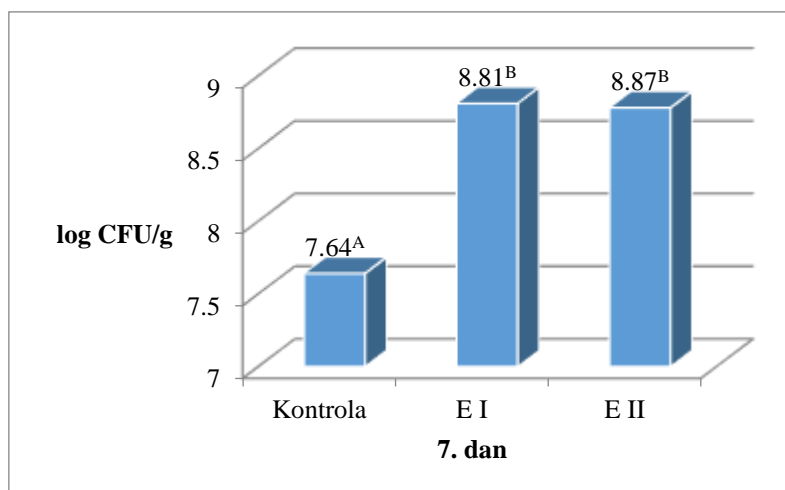
Grafikon 6.21 Broj bakterija mlečne kiseline (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama užeg dijametra 18. dana ispitivanja

Broj BMK kod fermentisanih kobasica šireg dijametra je u stalnom porastu od nultog do 21. dana kada je povećan kod kontrolne grupe za 4,02 log CFU/g, kod E1 grupe za 4,12 log CFU/g, a kod E2 grupe za 4,19 log CFU/g (grafikoni 6.22 do 6.25).



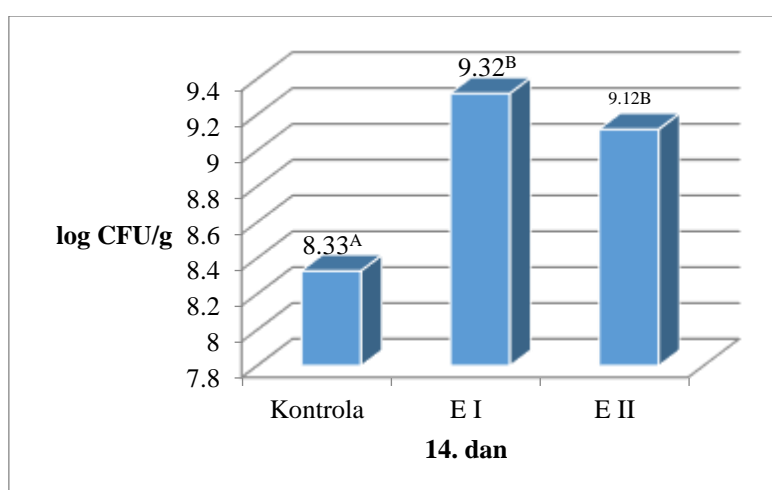
Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB}p<0,05; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERMTM B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.22 Broj bakterija mlečne kiseline (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama šireg dijametra trećeg dana ispitivanja



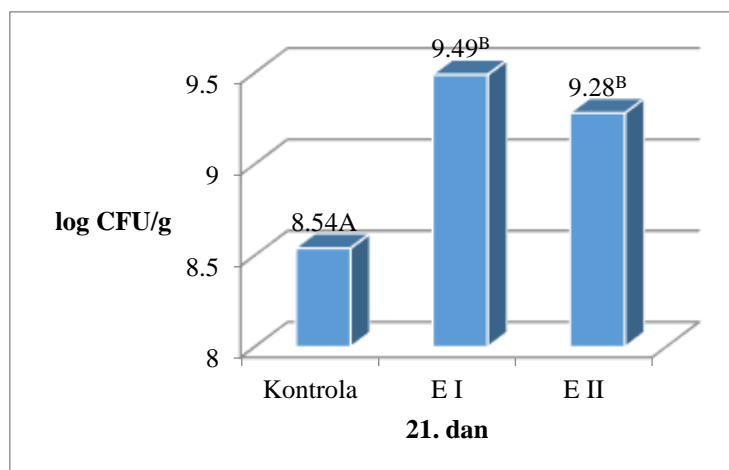
Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB} $p < 0,05$; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERMTM B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.23 Broj bakterija mlečne kiseline (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama šireg dijametra sedmog dana ispitivanja



Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB} $p < 0,05$; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERMTM B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

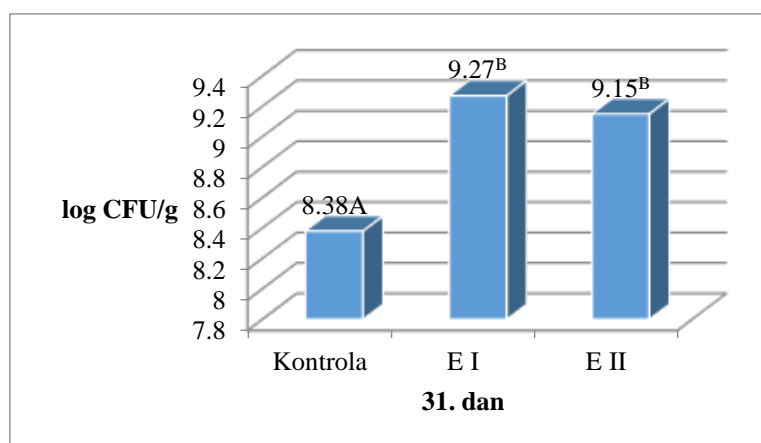
Grafikon 6.24 Broj bakterija mlečne kiseline (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama šireg dijametra 14. dana ispitivanja



Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB} $p < 0,05$;
 Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

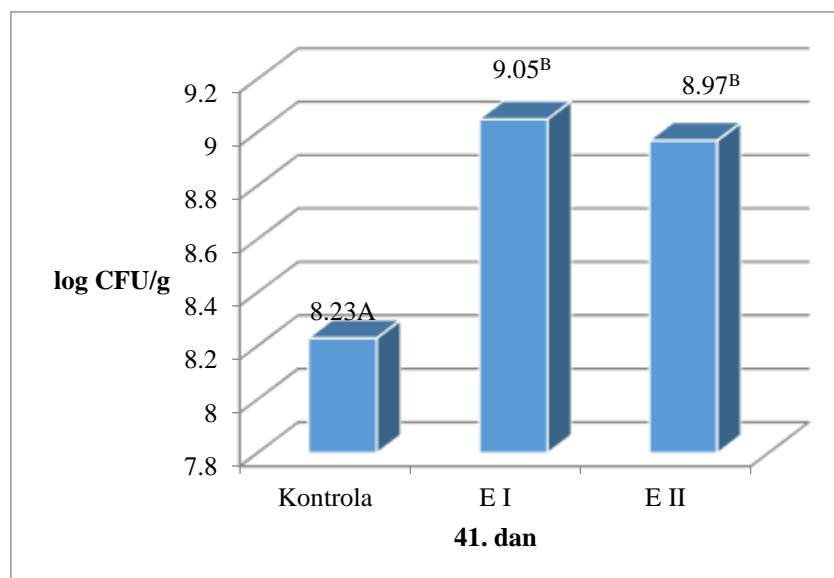
Grafikon 6.25 Broj bakterija mlečne kiseline (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama šireg dijametra 21. dana ispitivanja

Kao kod fermentisanih kobasica užeg dijametra, tako i kod fermentisanih kobasica šireg dijametra dolazi do blagog pada ili stagniranja broja BMK, ali ne od 14., već od 21. dana zrenja (grafikon 6.26 i 6.27).



Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB} $p < 0,05$;
 Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.26 Broj bakterija mlečne kiseline (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama šireg dijametra 31. dana ispitivanja



Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB}p<0,05; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERMTM B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.27 Broj bakterija mlečne kiseline (log CFU/g) u fermentisanim kobasicama šireg dijametra 41. dana ispitivanja

Iz uporednog pregleda povećanja broja BMK kod fermentisanih kobasica užeg i šireg dijametra uočava se da je porast broja BMK nešto veći kod fermentisanih kobasica šireg dijametra, što može da se dovede u vezu sa većom a_w vrednošću kod ove grupe fermentisanih kobasica. Niske a_w vrednosti kod fermentisanih kobasica užeg dijametra (od 0,909 do 0,912) 18. dana ispitivanja, odnosno od 41. dana kod fermentisanih kobasica šireg dijametra (od 0,910 do 0,911), imale su za posledicu i smanjenje logaritma BMK od 14. dana kod fermentisanih kobasica užeg dijametra, i u odnosu na 21. dan kod fermentisanih kobasica šireg dijametra (tabela 5.9 i 5.10). Pad broja BMK kod fermentisanih kobasica užeg dijametra od 14. dana, odnosno kod fermentisanih kobasica šireg dijametra od 21. dana, može da bude i posledica nedostatka supstrata, odnosno hranjivih materija koje bakterije koriste za rast i razmnožavanje (grafikon 5.5 i 5.6).

6.4. Aerobne mezofilne bakterije (AMB) u fermentisanim kobasicama

Poređenjem porasta broja AMB u fermentisanim kobasicama užeg i šireg dijametra u toku zrenja zapaža se da je broj bakterija AMB u nadevu kobasica užeg dijametra od nultog do 3. dana porastao za 2,47 log CFU/g (kontrolna grupa), 2,48 log CFU/g (E1 grupa) i 2,2 log CFU/g (E2 grupa). Porast AMB od nultog do 7. dana kod fermentisanih kobasica šireg dijametra bio je za 2,73 log CFU/g (kontrolna grupa), 2,67 log CFU/g (E1 grupa) i 2,54 log CFU/g (E2 grupa). Kod kobasica šireg dijametra porast broja AMB od nultog do 3. dana bio je za 2,79 log CFU/g (kontrolna grupa), 2,82 log CFU/g (E1 grupa) i 2,68 log CFU/g (E2 grupa), a od nultog do 7. dana 2,88 log CFU/g (kontrolna grupa), 2,89 log CFU/g (E1 grupa) i 2,71 log CFU/g (E2 grupa). Porast broja bakterija AMB bio je dakle veći kod kobasica šireg dijametra, kako od nultog do 3. dana, tako i od nultog do 7. dana. Karakteristično je i da je porast broja bakterija najizraženiji u ispitivanim periodima kod kobasica E1 grupe. Ako se ovi rezultati poredi sa porastom broja BMK kod kobasica užeg dijametra, uočava se da je porast AMB bio veći od porasta broja BMK za isto vreme, odnosno od nultog do 3. dana. Međutim, kada se poredi porast broja AMB i broja BMK od nultog do 7. dana tada se uočava da je porast BMK u ovom periodu znatno veći od porasta broja AMB. Ova pojava uočena je kako kod kobasica užeg tako i kod kobasica šireg dijametra. Kod obe grupe kobasica broj AMB, kao i broj BMK se na kraju procesa zrenja smanjio u odnosu na prethodno ispitivanje, odnosno kod kobasica užeg dijametra 18. dana bio je manji u odnosu na 14. dan, a kod kobasica šireg dijametra 41. dana bio je manji u odnosu na 31. dan.

6.5. Vrednost pH fermentisanih kobasica

Važan faktor sredine od koga zavisi rast mikroorganizama je pH vrednost (tabela 6.6). Inhibitorni efekat delovanja pH vrednosti zavisi od brojnih faktora, kao što je to npr. tip kiseline koja snižava pH i temperaturni uslovi. Tako je pH vrednost za rast *E. coli* O157:H7 u principu 4,4, ali ova bakterija može da opstane i na nižim pH vrednostima u uslovima hlađenja.

Tabela 6.6 Minimalne pH vrednosti za rast određenih mikroorganizama

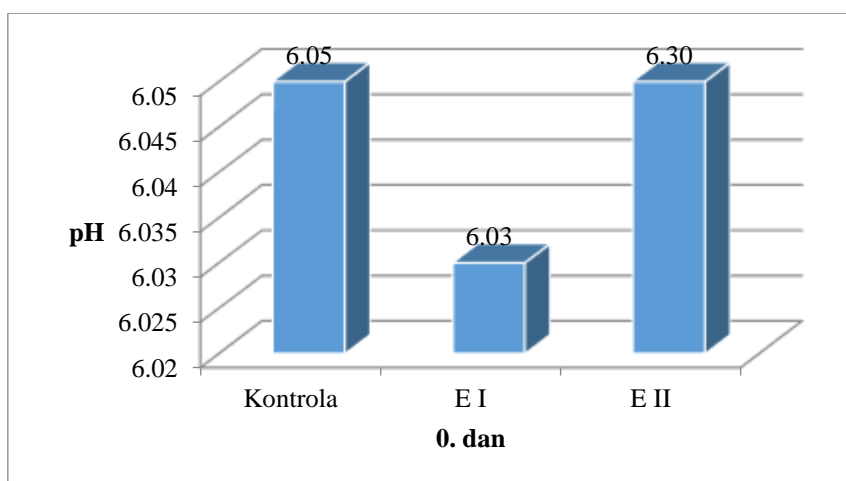
Mikroorganizam	pH vrednost
<i>Clostridium perfringens</i>	5,0
<i>Campylobacter</i>	4,9
<i>Clostridium botulinum</i> (proteolitički)	4,6
<i>E. coli O157:H7</i>	4,0-4,4
<i>Pseudomonas</i>	4,4
<i>Listeria monocytogenes</i>	4,4
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,0
<i>Salmonella</i>	3,8
Većina BMK	3,0-3,5
<i>Aspergillus flavus</i>	2,0

Mataragas i sar. (2015) ukazali su da do inaktivacije *L. monocytogenes* dolazi kada su pH vrednosti i a_w vrednosti nepovoljne za rast patogena ($pH \leq 5,0$ i $a_w \leq 0,94$). U ovoj studiji a_w vrednost je 18. dana bila niža od 0,94 (od 0,909 do 0,912). Vrednost pH opada brže u fermentisanim kobasicama sa dodatom starter kulturom, nego kod fermentisanih kobasica bez dodatog startera i statistički je značajno niža kod kobasica sa starter kulturom, što ukazuje na značaj starter kulture u fermentacionim procesima. Stoga je pH kobasica 18. dana nešto veći od 5 (od 5,16 do 5,28). Vrednosti pH i a_w su značajni faktori u inaktivaciji *L. monocytogenes* u fermentisanim kobasicama, ali se ne može zanemariti ni temperaturni režim u toku zrenja. Tako je temperatura od 20° C i više neophodna, naročito u prvih 48 sati zrenja, za što bržu inaktivaciju *L. monocytogenes* (Mataraga i sar., 2015). Značajnija redukcija ovog patogena može da se pripiše visokoj temperaturi u prva tri dana zrenja.

Povećanje broja bakterija mlečne kiseline praćeno je smanjenjem pH do 21. dana, dok je u drugom delu perioda zrenja nakon 21. dana pH blago rastao do kraja zrenja (Zdolec i sar., 2007). Smanjenje pH do 21. dana posledica je rasta bakterija mlečne kiseline i nakupljanja kiseline (Vermeiren i Debevere, 2004), što je uobičajeno na početku

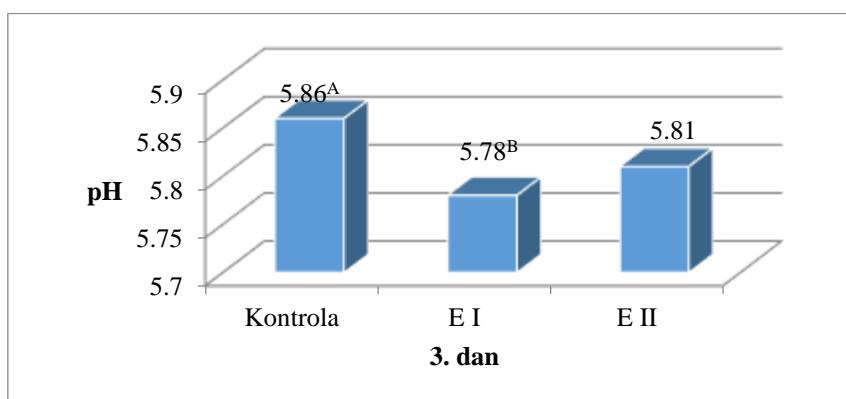
fermentacije. Blag porast pH koji je uočen od 21. dana do kraja zrenja može biti posledica aktivnosti mikrokokka, bakterija aktivnih u fazi zrenja, koje su sposobne da neutrališu kiselinu koju proizvode bakterije mlečne kiseline (Comi i sar., 2005).

Vrednosti pH kod fermentisanih kobasica užeg dijametra nultog i trećeg dana nisu se statistički značajno razlikovale (grafikon 6.28 i 6.29).



Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

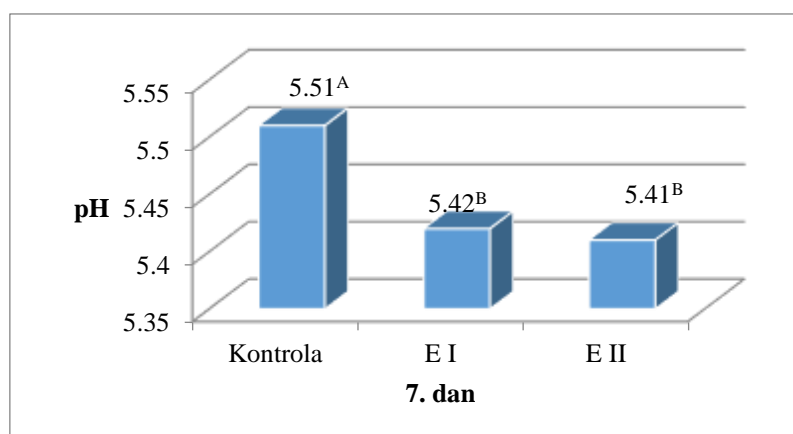
Grafikon 6.28 pH vrednosti u fermentisanim kobasicama nultog dana ispitivanja



Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB} $p < 0,05$; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

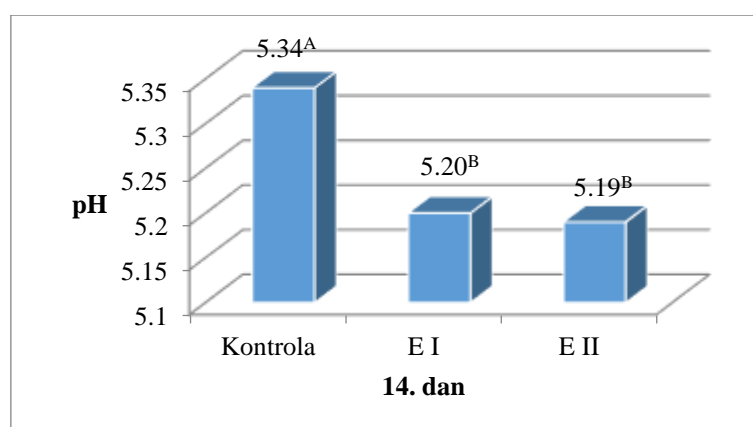
Grafikon 6.29 Vrednosti pH u fermentisanim kobasicama užeg dijametra trećeg dana ispitivanja

Vrednosti pH su izrazitije kod eksperimentalnih grupa fermentisanih kobasica u odnosu na kontrolnu grupu, što je posledica većeg broja BMK, pa i veće količine stvorene mlečne kiseline (tabela 5.9 i grafikon 5.9), što se vidi iz pada pH vrednosti 7. i 14. dana ispitivanja u fermentisanim kobasicama užeg dijametra (grafikon 6.30 i 6.31).



Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB} $p < 0,05$; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERMTM B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

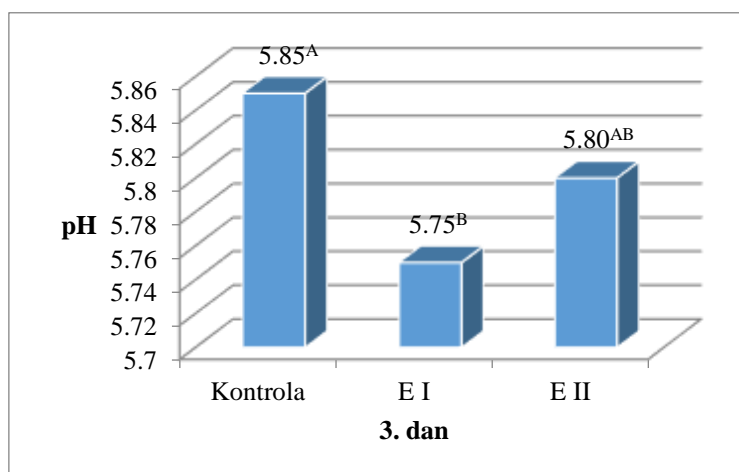
Grafikon 6.30 Vrednosti pH u fermentisanim kobasicama užeg dijametra sedmog dana ispitivanja



Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB} $p < 0,05$; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERMTM B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

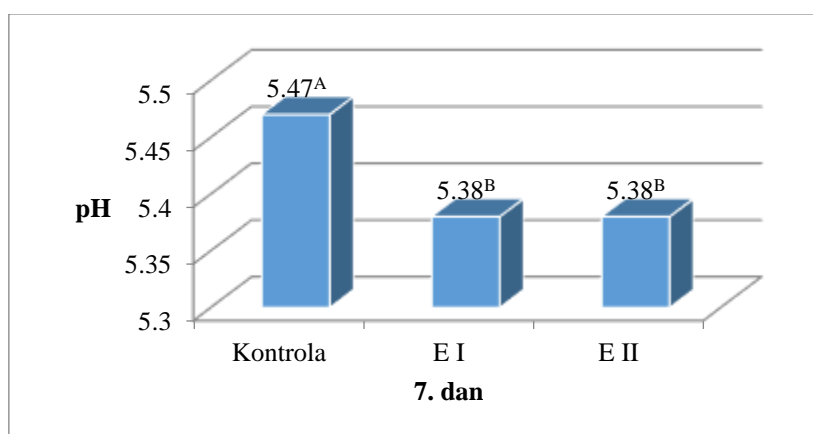
Grafikon 6.31 Vrednosti pH u fermentisanim kobasicama užeg dijametra 14. dana ispitivanja

Slični odnosi zapaženi su i kod fermentisanih kobasica šireg dijametra, kada je broj BMK kod sve tri grupe fermentisanih kobasica šireg dijametra 21. dana dostigao svoj maksimum (grafikoni od 6.32 do 6.35).



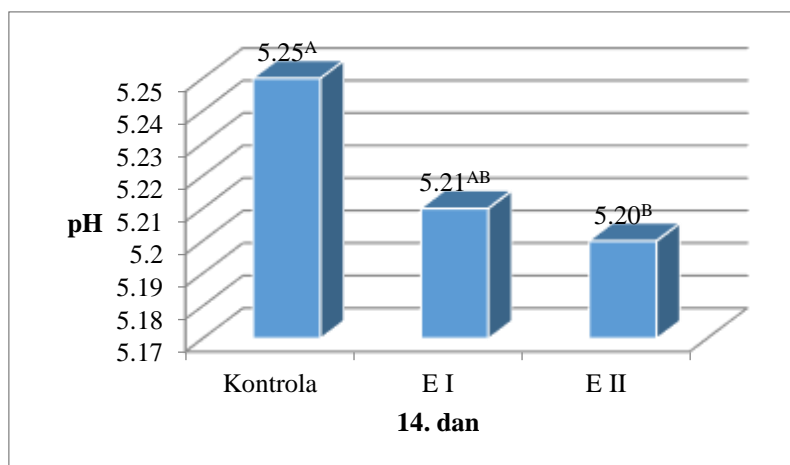
Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB} $p < 0,05$; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERMTM B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.32 Vrednosti pH u fermentisanim kobasicama šireg dijametra trećeg dana ispitivanja



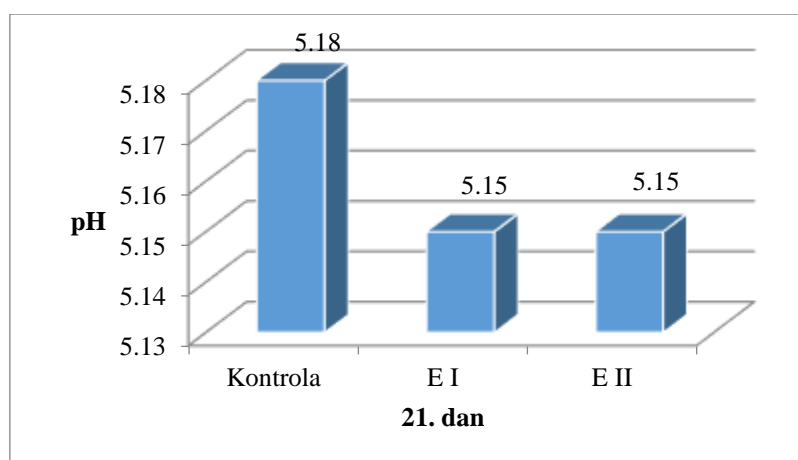
Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB} $p < 0,05$; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERMTM B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.33 Vrednosti pH u fermentisanim kobasicama šireg dijametra sedmog dana ispitivanja



Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB} $p < 0,05$; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERMTM B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.34 Vrednosti pH u fermentisanim kobasicama šireg dijametra 14. dana ispitivanja

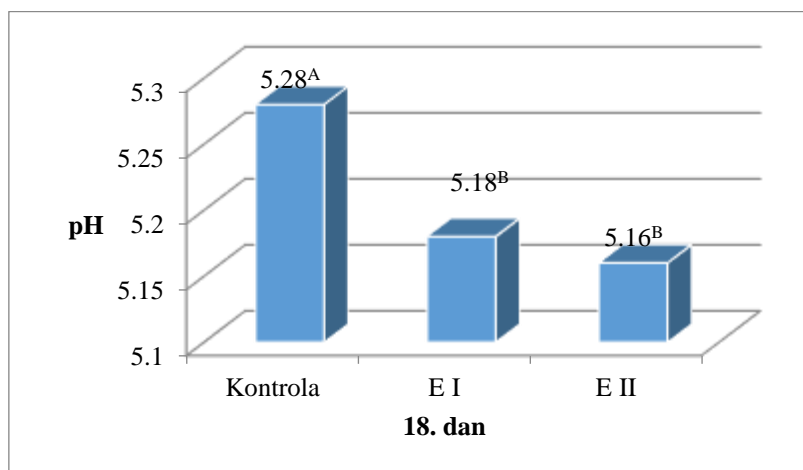


Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERMTM B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.35 Vrednosti pH u fermentisanim kobasicama šireg dijametra 21. dana ispitivanja

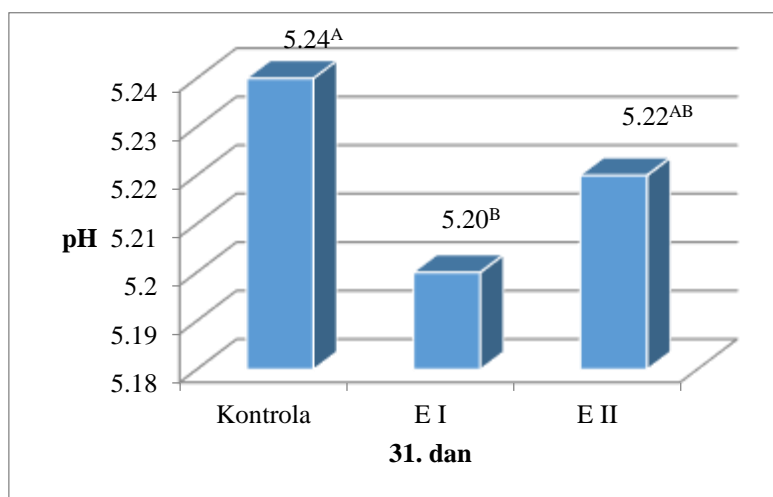
Vrednosti pH nadeva fermentisanih kobasica užeg dijametra na kraju zrenja bile su gotovo identične vrednostima pH u kobasicama šireg dijametra 31. dana zrenja (grafikoni 6.36 i 6.37) (tabela 5.10 i grafikon 5.10). Na kraju procesa zrenja kobasica

šireg dijametra pH vrednost nadeva u fermentisanim kobasicama porasla je u odnosu na 31. dan (grafikon 6.38).



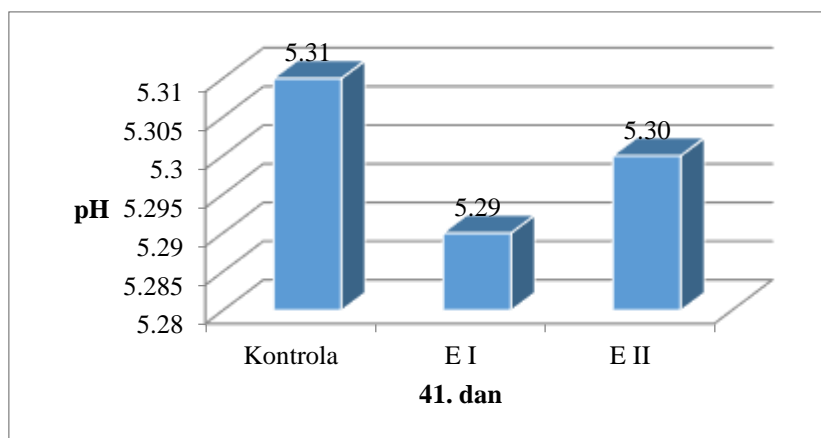
Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB} $p < 0,05$; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERMTM B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.36 Vrednosti pH u fermentisanim kobasicama užeg dijametra na kraju zrenja (18. dana ispitivanja)



Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB} $p < 0,05$; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERMTM B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.37 Vrednosti pH u fermentisanim kobasicama šireg dijametra 31. dana ispitivanja



Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.38 Vrednosti pH u fermentisanim kobasicama šireg dijametra na kraju zrenja (41. dana ispitivanja)

6.6. Vrednost a_w fermentisanih kobasica

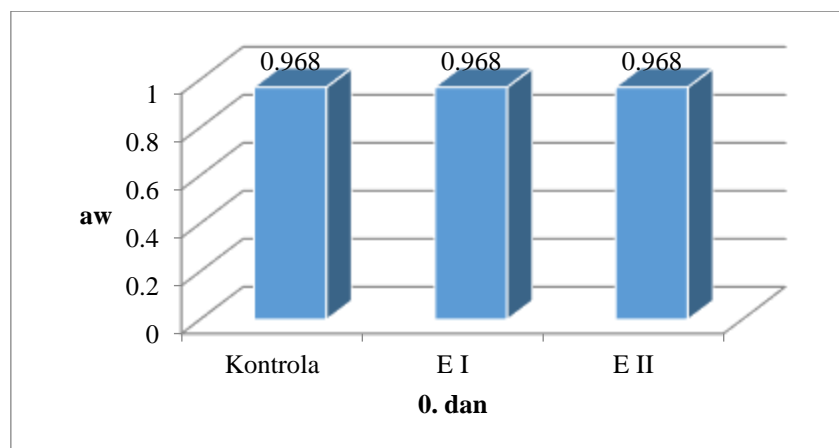
Za postizanje zdravstvene bezbednosti namirnica posebno je značajno sprečiti rast patogenih bakterija. Poznato je da za rast patogenih bakterija u nekom matriksu treba da postoji i odgovarajuća a_w vrednost tog matriksa (sredine). U tabeli su prikazane minimalne a_w vrednosti za pojedine mikroorganizma (tabela 6.7).

Tabela 6.7 Minimalne a_w vrednosti za rast određenih mikroorganizama

<i>Campylobacter</i>	0,98	<i>E. coli O157:H7</i>	0,95
<i>Pseudomonas</i>	0,97	<i>Listeria monocytogenes</i>	0,92
<i>Clostridium botulinum</i> (ne-proteolitički)	0,96	Neke BMK	0,92
<i>Clostridium botulinum</i> (proteolitički)	0,93	<i>Staphylococcus aureus</i> (anaerobni)	0,90
<i>Clostridium perfringens</i>	0,93	<i>Staphylococcus aureus</i> (aerobni)	0,85
Većina BMK	0,95	<i>Aspergillus flavus</i>	0,80
<i>Salmonella</i>	0,94		

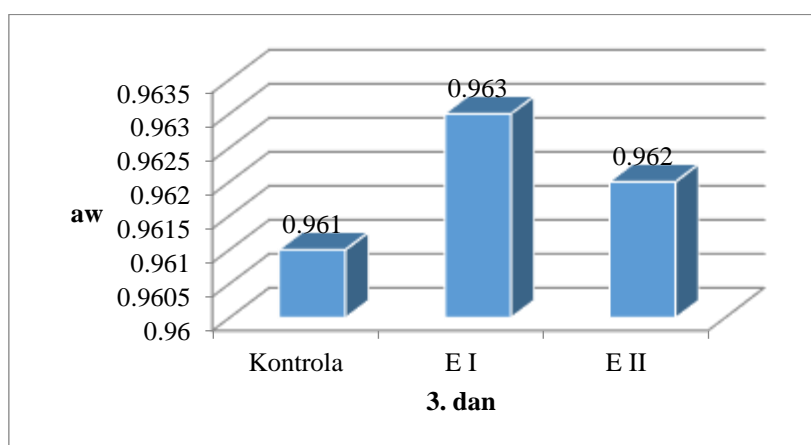
Izvor: Anon., 2008.

U fermentisanim kobasicama užeg dijametra, kao i u fermentisanim kobasicama šireg dijametra a_w vrednost se u toku zrenja smanjivala. Međutim, u ispitivanim danima uzorkovanja (0., 3., 7., 14. i 18. dan) nije utvrđena statistički značajna razlika između a_w vrednosti kod ispitivanih grupa fermentisanih kobasica užeg dijametra (grafikoni od 6.39 do 6.47).



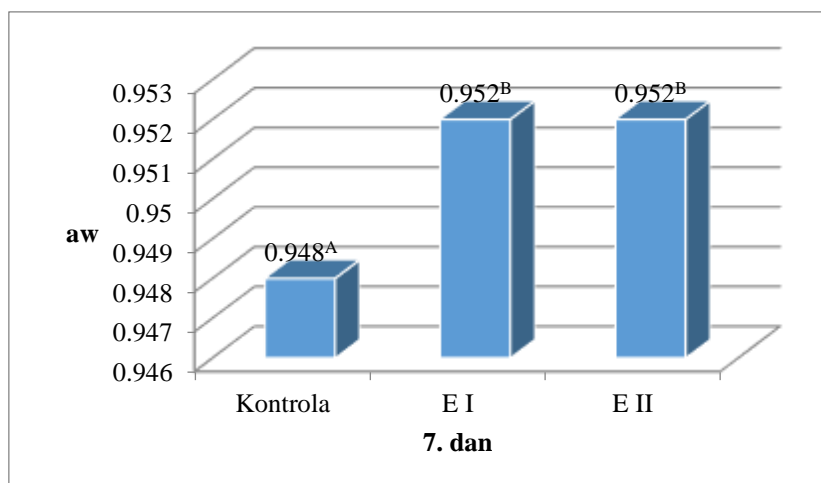
Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.39 Vrednosti a_w u fermentisanim kobasicama nultog dana ispitivanja



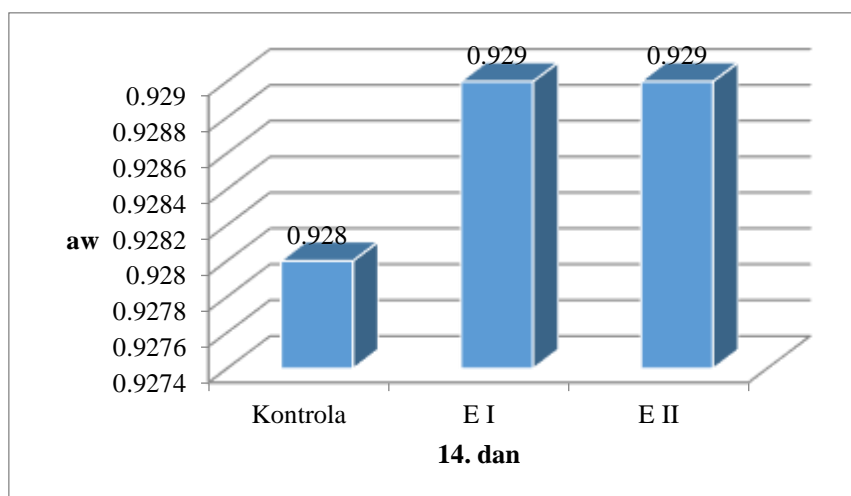
Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.40 Vrednosti a_w u fermentisanim kobasicama užeg dijametra trećeg dana ispitivanja



Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB}p<0,05; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

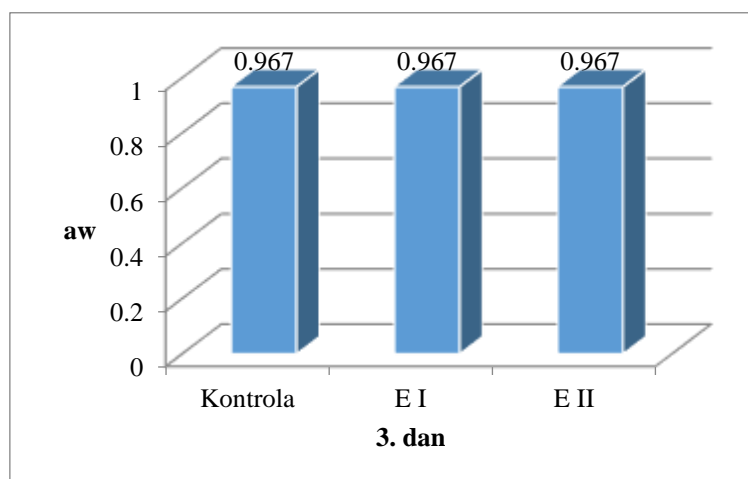
Grafikon 6.41 Vrednosti a_w u fermentisanim kobasicama užeg dijametra sedmog dana ispitivanja



Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB}p<0,05; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

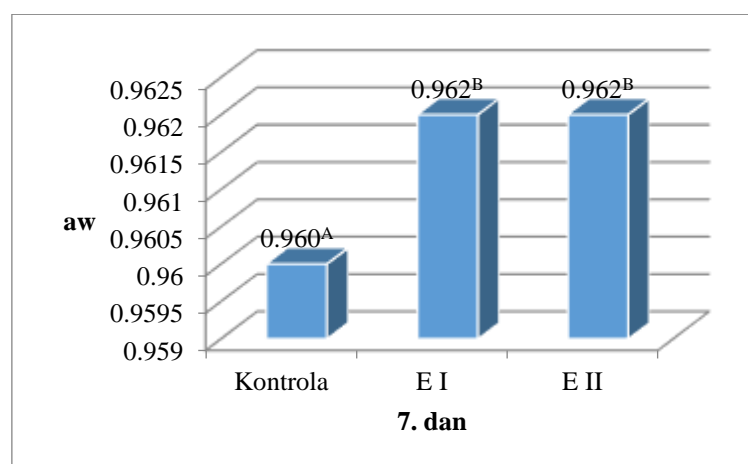
Grafikon 6.42 Vrednosti a_w u fermentisanim kobasicama užeg dijametra 14. dana ispitivanja

Slični su odnosi i kod fermentisanih kobasica šireg dijametra, s tom razlikom što je sedmog dana ispitivanja a_w vrednost eksperimentalnih grupa fermentisanih kobasica bila statistički značajno veća od a_w vrednosti kontrolne grupe.



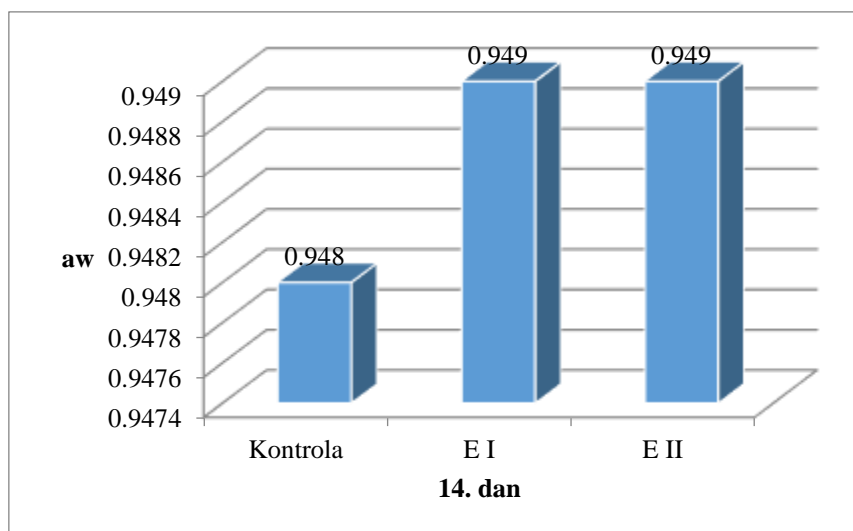
Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.43 Vrednosti a_w u fermentisanim kobasicama šireg dijametra trećeg dana ispitivanja



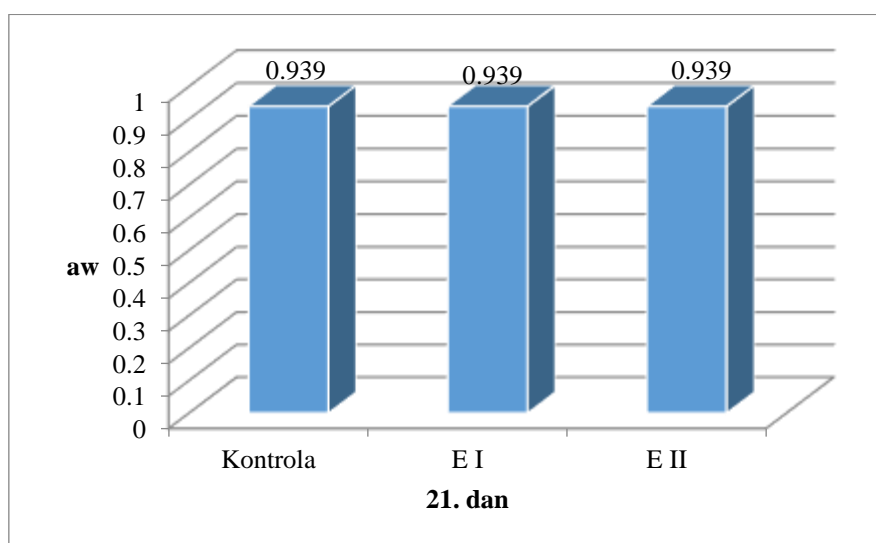
Legenda: Vrednosti sa različitim slovom ukazuju na značajne razlike ^{AB} $p < 0,05$; Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.44 Vrednosti a_w u fermentisanim kobasicama šireg dijametra sedmog dana ispitivanja



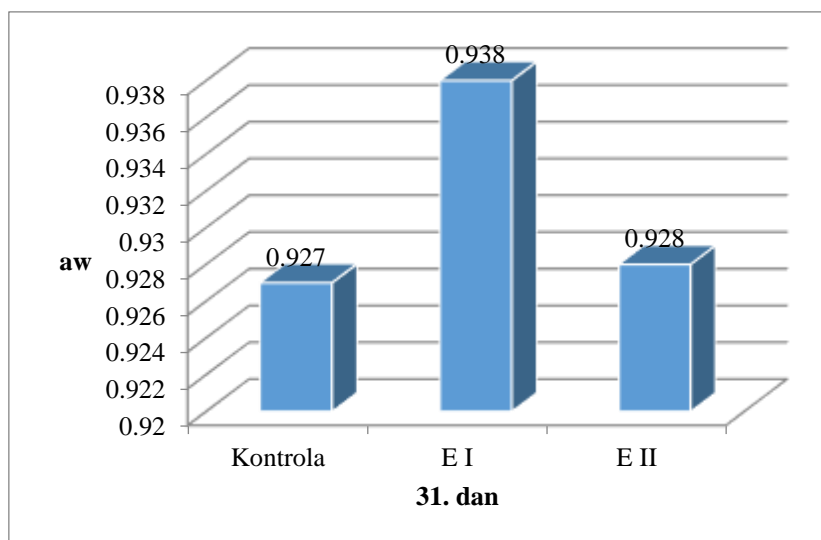
Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.45 Vrednosti a_w u fermentisanim kobasicama šireg dijametra 14. dana ispitivanja



Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

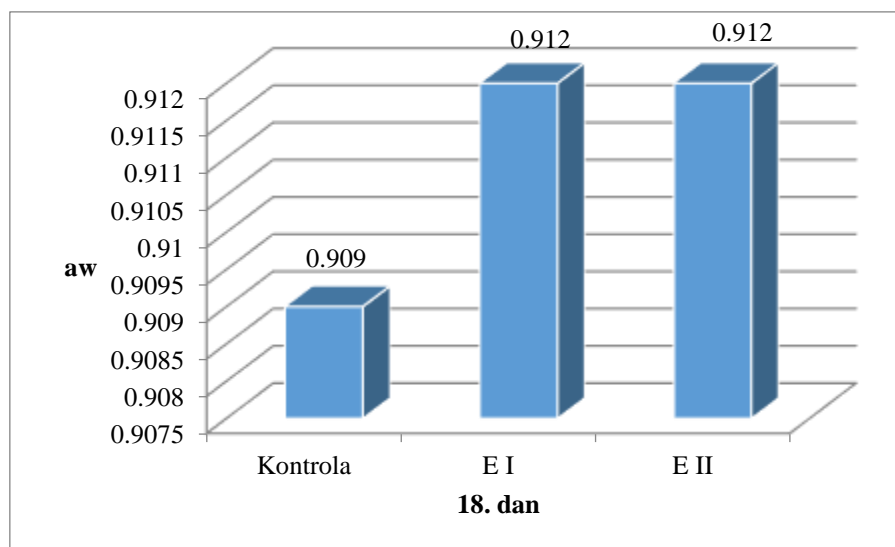
Grafikon 6.46 Vrednosti a_w u fermentisanim kobasicama šireg dijametra 21. dana ispitivanja



Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

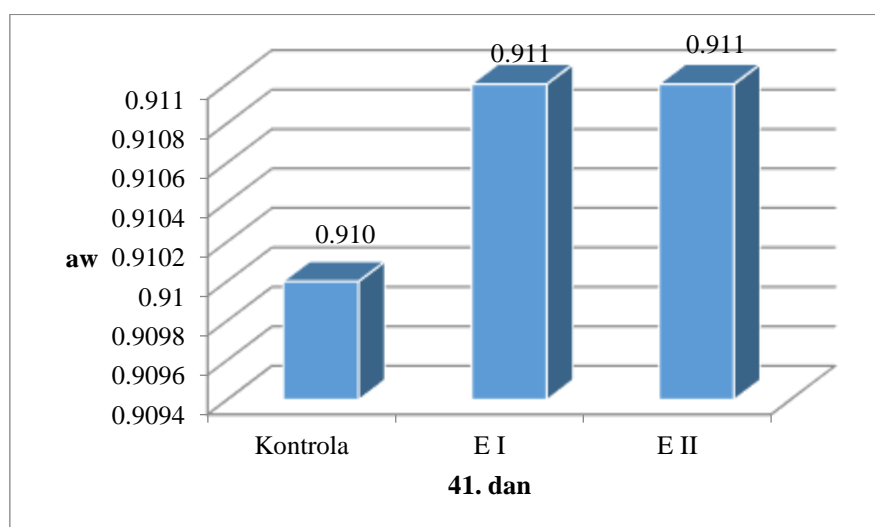
Grafikon 6.47 Vrednosti a_w u fermentisanim kobasicama šireg dijametra 31. dana ispitivanja

Na kraju procesa zrenja, odnosno proizvodnje, a_w vrednosti fermentisanih kobasica užeg dijametra (od 0,909 do 0,912) bile su gotovo identične kao a_w vrednosti fermentisanih kobasica šireg dijametra 41. dana zrenja (kraj proizvodnje), kada su te vrednosti bile od 0,910 do 0,911, što znači gotovo identične onim koje su utvrđene kod fermentisanih kobasica užeg dijametra na kraju proizvodnog procesa (grafikon 6.48 i 6.49).



Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.48 Vrednosti a_w u fermentisanim kobasicama užeg dijametra na kraju zrenja (18. dana ispitivanja)



Legenda: Kontrolna grupa - kobasice bez dodate starter kulture; E I - kobasice sa dodatom Biostart Sprint komercijalnom starter kulturom; E II - kobasice sa dodatom BACTOFERM™ B-LC-007t komercijalnom starter kulturom.

Grafikon 6.49 Vrednosti a_w u fermentisanim kobasicama šireg dijametra na kraju zrenja (41. dana ispitivanja)

Vrednost a_w je veoma varijabilna kod pojedinih vrsta namirnica, pa je tako kod svežeg mesa, voća i povrća veća od 0,98, kod fermentisanih kobasica i kondenzovanog mleka od 0,85 do 0,93, meda i čokolade ispod 0,60, kod suvog mesa i nekih polusuvih kobasica je od 0,85 do 0,93, a kod nekih suvomesnatih proizvoda (npr. sušena govedina) ispod 0,88, a kod suve svinjske kože manja od 0,30.

Uslovi održivosti namirnica nisu uslovljeni samo sa a_w i pH vrednošću, već zavise i od drugih činioca, kao što su temperatura, prisustvo aditiva, začina, konzervansa itd. Održivost proizvoda zavisi od više činilaca i njihovog mogućeg sinergetskog delovanja što je poznato kao „*hurdle effect*“. Kod fermentisanih proizvoda dva su osnovna činioca koja utiču na održivost i bezbednost proizvoda, a to su pH i a_w vrednost. Pravilnik o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa (Sl. glasnik RS, 50/2019) u zahtevima za kvalitet fermentisanih kobasica, između ostalih parametara pominje i sadržaj vlage u kobasicama, sadržaj proteina i pH vrednost koji treba da imaju ovi proizvodi u prometu. Ovaj Pravilnik ne pominje a_w vrednost kao kriterijum koji treba da ispunjavaju fermentisane kobasice u prometu. Međutim, u Vodiču za primenu mikrobioloških kriterijuma za hranu (2011) kod hrane spremne za konzumiranje koja podržava, odnosno ne podržava rast *L. monocytogenes*, a_w vrednost se definiše kao kriterijum bezbednosti ovog proizvoda.

Rezultati prosečnih a_w i pH vrednosti različitih sušenih proizvoda prikazani su u tabeli 6.8. i 6.9.

Tabela 6.8 Pregled rezultata za hladno dimljeno i sušeno meso, salame i kobasice

Brend ^a	Tip proizvoda ^b	Proizvedeno na mestu kupovine ^c	Ohlađeno ^d	Srednja pH vrednost (n=2)	Srednja a_w vrednost (n=4)
1	Seljačka salama	Ne	Ne	5,4	0,89
1	Salama sa biberom	Ne	Ne	4,6	0,84
1	Salama sa biberom	Ne	Ne	4,9	0,78
1	Letnja salama	Ne	Ne	5,5	0,82
2	Portugalska salama	Da	Ne	5,6	0,95
3	Goveđa slama u đenovljanskom stilu	Ne	Ne	5,1	0,88

4	Pick salama	Da	Ne	6,1	0,82
4	Slama sa začinskom paprikom	Da	Ne	5,4	0,84
5	Chabi kobasica	Da	Ne	5,7	0,94
6	Domaća dimljena kobasica	Da	Ne	5,0	0,86
7	Italijanska salama	Ne	Ne	5,8	0,86
8	Deli štapići	Da	Ne	5,7	0,87
8	Landjaegar salama	Da	Ne	5,8	0,87
8	Dimljena šunka	Da	Da	6,0	0,93
9	Mađarska salama	Ne	Ne	6,3	0,94
9	Mađarska salama	Ne	Da	6,4	0,95
10	Portugalska salama	Da	Ne	4,8	0,88
10	Portugalska salama	Da	Ne	5,5	0,95
11	Portugalska salama	Da	Da	5,6	0,97
12	Goveđa salama	Ne	Da	4,6	0,93
12	Nemačka salama	Ne	Da	6,3	0,93
12	Mađarska salama	Ne	Ne	6,2	0,95
13	Pick salama	Ne	Da	6,3	0,85
14	Nemačka salama	Ne	Ne	4,6	0,89
14	Ciganska salama	Ne	Da	4,70	0,90
14	Jugoslovenska salama	Ne	Ne	4,9	0,90
14	Jugoslovenska salama	Ne	Ne	4,9	0,65
14	Kaiser salama	Ne	Ne	4,3	0,93
14	Mailander salama	Ne	Ne	4,9	0,69
14	Šumska salama	Ne	Ne	4,6	0,79
14	Salama sa paprikom	Ne	Da	4,9	0,89
14	Segedinska salama	Ne	Ne	5,1	0,83
14	Segedinska salama	Ne	Ne	5,5	0,79
14	Jugoslovenska salama	Ne	Da	5,1	0,86

14	Jugoslovenska salama	Ne	Da	5,0	0,88
15	Đenovljanska salama	Ne	Da	4,9	0,87
16	Suva salama	Ne	Ne	4,5	0,90
17	Csabai slama	Da	Ne	4,9	0,89
18	Originalna mađarska salama	Ne	Ne	5,2	0,83
19	Kamperska salama	Ne	Da	5,0	0,91
19	Csabai	Da	Ne	5,3	0,87
20	Nemačka salama	Ne	Da	4,7	0,93
20	Nemačka salama	Ne	Da	4,6	0,95
20	Mađarska salama	Ne	Da	4,8	0,95
20	Mađarska salama	Ne	Da	4,7	0,96
20	Kaiser salama	Ne	Da	4,7	0,94
20	Meksička salama	Ne	Da	4,8	0,90
20	Slama sa slačicom	Ne	Da	4,9	0,90
20	Salama sa biberom	Ne	Ne	4,4	0,77

^aSvacom brendu je dodeljen broj. ^bNazivi se odnose na trgovinske marke. ^cNeki proizvodi su proizvedeni na mestu kupovine (da), dok su drugi proizvedeni van mesta gde su kupljeni (ne) ^dOhlađeno podrazumeva kontinualno skladištenje na 5 °C.

Izvor: Lee i Styliadis, 1996

Tabela 6.9 Pregled rezultata za sušene salame italijanskog tipa (bez dimljenja)

Brend ^a	Tip proizvoda ^b	Proizvedeno na mestu kupovine ^c	Ohlađeno ^d	Srednja ph vrednost (n=2)	Srednja a _w vrednost (n=4)
21	Italijanska salama	Ne	Ne	5,2	0,86
21	Salametti	Ne	Ne	5,5	0,90
21	Soppressata	Ne	Ne	5,4	0,86
22	Kalabrezijska salama	Ne	Da	5,4	0,87
22	Suppressata	Ne	Da	5,6	0,85
23	Kalabrezijska salama	Ne	Ne	5,2	0,88
23	Đenovljanska salama	Ne	Da	4,9	0,92

23	Đenovljanska salama	Ne	Ne	4,9	0,88
24	Italijanska salama	Ne	Da	5,2	0,78
25	Đenovljanska salama	Ne	Da	5,2	0,78
26	Đenovljanska salama	Ne	Ne	4,8	0,88
27	Caslaingo salama	Ne	Ne	5,0	0,83
27	Đenovljanska salama	Ne	Ne	4,8	0,86

^aSvakom brendu je dodeljen broj. ^bNazivi se odnose na trgovinske marke. ^cNeki proizvodi su proizvedeni na mestu kupovine (da), dok su drugi proizvedeni van mesta gde su kupljeni (ne) ^dOhlađeno podrazumeva kontinualno skladištenje na 5°C.

Izvor: Lee i Styliadis, 1996

6.7. Korelacione zavisnosti između ispitivanih vrsta, odnosno grupa bakterija

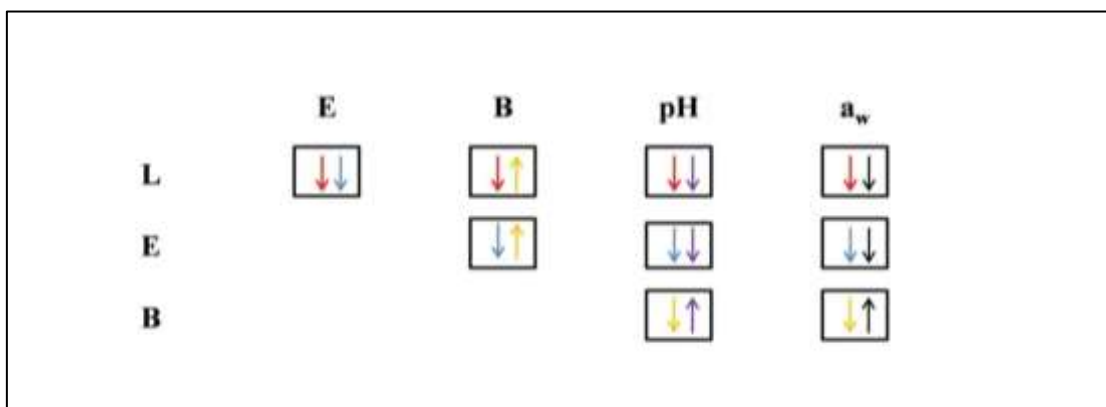
Korelaciona zavisnost između promene broja bakterija *L. monocytogenes* i enterobakterija bila je pozitivna, jaka i statistički značajna, što znači da je broj *L. monocytogenes* i enterobakterija u toku zrenja opadao. Između broja bakterija *L. monocytogenes* i broja BMK korelaciona zavisnost bila je jaka, negativna i statistički značajna, što znači da je broj bakterija *L. monocytogenes* opadao, a broj BMK rastao. Takođe, između broja enterobakterija i BMK utvrđena je jaka, negativna i statistički značajna razlika, što znači da je broj enterobakterija opadao, a broj BMK rastao. Izračunate korelacione zavisnosti odnose se kako na kobasice užeg, tako i na kobasice šireg dijametra.

6.8 Korelacione zavisnosti između ispitivanih vrsta, odnosno grupa bakterija i pH i a_w vrednosti fermentisanih kobasica

Između promene broja *L. monocytogenes*, kao i broja enterobakterija i pH, odnosno a_w vrednosti fermentisanih kobasica utvrđena je jaka, pozitivna i statistički značajna razlika kod obe grupe kobasica (užeg i šireg dijametra), što znači da je smanjenje broja bakterija *L. monocytogenes*, odnosno enterobakterija pratilo smanjenje pH, odnosno

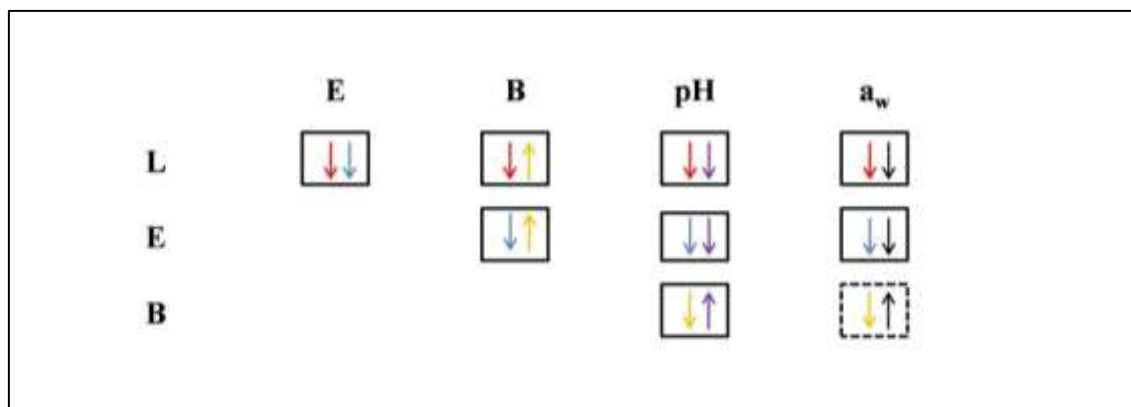
a_w vrednosti. Između broja BMK i pH, odnosno a_w vrednosti utvrđena je jaka, negativna i statistički značajna korelaciona zavisnost, što znači da je sa porastom broja BMK opadala pH, odnosno a_w vrednost kod fermentisanih kobasica užeg dijametra. Kod kobasica šireg dijametra utvrđena je jaka, negativna i statistički značajna korelaciona zavisnost između broja BMK i pH vrednosti, a srednja, negativna, statistički značajna razlika između promene broja BMK i a_w vrednosti.

Korelaciona zavisnost između broja bakterija *L. monocytogenes* i BMK kod kobasica sa starter kulturom je $r = -0,865$, a bez starter kulture $r = -0,873$ (statistički značajno $p < 0,05$). Između broja bakterija *L. monocytogenes* i pH vrednosti korelacione zavisnosti bile su kod istih uzoraka fermentisanih kobasica $r = 0,609$, odnosno $r = 0,765$, i nisu bile statistički značajne. Između broja bakterija *L. monocytogenes* i a_w vrednosti, korelacione zavisnosti kod uzoraka fermentisanih kobasica sa starter kulturom bile su $r = 0,867$, a bez starter kulture $r = 0,980$ ($p < 0,05$). Utvrđena je takođe i statistički značajna korelaciona zavisnost ($p < 0,05$) između broja bakterija *L. monocytogenes* i sadržaja soli ($r = -0,954$, kobasica sa starter kulturom i $r = -0,981$, kobasica bez starter kulture) (Silinis, 2014). Grafički prikaz korelacione zavisnosti između ispitivanih vrsta, odnosno grupa bakterija i pH i a_w vrednosti fermentisanih kobasica užeg i šireg dijametra dat je slikama 6.1 i 6.2.



Legenda: L - broj *L. monocytogenes* (crvena); E - broj enterobakterija (plava); B - broj bakterija mlečne kiseline (žuta); pH vrednost (ljubičasta); a_w vrednost (crna); smer strelice ↓↓ - pozitivna korelaciona zavisnost; smer strelice ↓↑ - negativna korelaciona zavisnost; □ - jaka korelaciona zavisnost.

Slika 6.1 Grafički prikaz korelacione zavisnosti između ispitivanih vrsta, odnosno grupa bakterija i pH i a_w vrednosti fermentisanih kobasica užeg dijametra



Legenda: L - broj *L. monocytogenes* (crvena); E - broj enterobakterija (plava); B - broj bakterija mlečne kiseline (žuta); pH vrednost (ljubičasta); a_w vrednost (crna); ↓ ↓ - pozitivna korelaciona zavisnost; ↓ ↑ - negativna korelaciona zavisnost; —□ - jaka korelaciona zavisnost; ---□ - srednja korelaciona zavisnost.

Slika 6.2 Grafički prikaz korelacione zavisnosti između ispitivanih vrsta, odnosno grupa bakterija i pH i a_w vrednosti fermentisanih kobasica šireg dijametra

6.9 Hemijski sastav ispitivanih grupa fermentisanih kobasica

Pravilnik o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa (2019) za fermentisane suve kobasice definiše da sadržaj vode ne sme da bude veći od 35%, a sadržaj proteina ne sme da bude manji od 20%. Izuzetak su domaći kulen kod koga sadržaj proteina ne sme da bude manji od 24%, a takođe kulen i zimski salama kod kojih sadržaj proteina ne sme da bude manji od 22%. Izračunate MPR vrednosti za fermentisane kobasice su 1,75:1, za domaći kulen 1,45:1, a za kulen i zimsku salamu 1,59:1. Prema rezultatima iz ove doktorske disertacije sadržaj vode bio je daleko manji od dozvoljenog (29%), a sadržaj od proteina veći (25%), čak i od onog koji je definisan za domaći kulen (24%). Za fermentisane kobasice iz ovog ogleada MPR vrednosti bile su identične i za kobasice užeg i za kobasice šireg dijametra i kretale su se od 1,15:1 do 1,17:1. Prema Pravilniku o kvalitetu proizvoda od mesa iz 1974. godine koji je bio na snazi skoro 30 godina, hemijski parametri kvaliteta fermentisanih kobasica bili su definisani odnosom masti i proteina, pa tako sadržaj masti nije smeo da bude veći od dvostruke količine proteina. To bi iz rezultata ove doktorske disertacije značilo da sadržaj

masti ne bi smeo da bude veći od 50, a utvrđeno je da je bio 40, pa bi prema tome ove kobasice ispunjavale i uslove iz nekad važećeg Pravilnika o kvalitetu proizvoda od mesa.

O hemijskom sastavu fermentisanih suvih kobasica postoje brojni podaci, kako u udžbeničkoj literaturi, tako i u doktorskim disertacijama i publikovanim radovima koji se odnose na fermentisane suve kobasice. Sumirani pregled podataka koji se odnose na sastav fermentisanih kobasica prikazan je sažeto u doktorskoj disertaciji R. Mitrović (2016).

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu sprovedenog ispitivanja, dobijenih rezultata, kao i podataka iz aktuelne literature, može se zaključiti sledeće:

1. Broj bakterija *L. monocytogenes* u uzorcima sve tri ispitivane grupe fermentisanih kobasica užeg i šireg dijametra smanjivao se posle trećeg dana zrenja. Sedmog i četrnaestog dana zrenja kod grupa kobasica oba dijametra sa dodatom starter kulturom, utvrđeno je da je broj bakterija *L. monocytogenes* bio manji ($p < 0,05$) od broja bakterija *L. monocytogenes* u kobasicama bez starter kulture. Smanjenje broja bakterija *L. monocytogenes* bilo je izraženije ($p < 0,05$) kod uzoraka kobasica sa dodatom novom starter kulturom u odnosu na komercijalnu starter kulturu.

U uzorcima fermentisanih kobasica užeg dijametra, sa i bez dodate starter kulture, na kraju procesa zrenja (18. dan) nije utvrđeno prisustvo bakterija *L. monocytogenes*. U uzorcima fermentisanih kobasica šireg dijametra sa dodatom starter kulturom, *L. monocytogenes* nije izolovana 21. dana zrenja, a bez dodate starter kulture od 31. dana zrenja.

2. Broj enterobakterija u uzorcima fermentisanih kobasica užeg dijametra, sa i bez dodate starter kulture smanjivao se od trećeg dana zrenja, a kod fermentisanih kobasica šireg dijametra od sedmog dana zrenja. U uzorcima kobasica užeg dijametra sa dodatom starter kulturom 14. dana zrenja broj enterobakterija bio je manji ($p < 0,05$) od broja bakterija u uzorcima kobasica bez starter kultura. Kod uzoraka fermentisanih kobasica šireg dijametra sa dodatom starter kulturom, već od trećeg dana zrenja broj enterobakterija bio je manji ($p < 0,05$) od broja enterobakterija u kobasicama bez dodate starter kulture.

Prisustvo enterobakterija nije utvrđeno u uzorcima kobasica užeg dijametra na kraju procesa zrenja (18. dan), a u uzorcima kobasica šireg dijametra 31. dana zrenja.

3. Tokom svih dana ispitivanja broj bakterija mlečne kiseline (BMK) u fermentisanim kobasicama užeg, odnosno šireg dijametra bio je veći ($p < 0,05$) od broja BMK u kobasicama bez dodate starter kulture. Broj BMK rastao je kod kobasica užeg dijametra do 14. dana, a zatim je opadao do 18. dana, dok je kod fermentisanih kobasica šireg dijametra rastao do 31. dana, a zatim opadao do 41. dana zrenja.

4. Ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija u fermentisanim kobasicama užeg, odnosno šireg dijametra rastao je do 14., odnosno 31. dana zrenja, a zatim je do kraja zrenja opadao. Između ukupnog broja aerobnih mezofilnih bakterija u uzorcima fermentisanih kobasica oba dijametra tokom svih dana ispitivanja nije utvrđena razlika ($p > 0,05$).

5. Između pH vrednosti fermentisanih kobasica oba dijametra nultog i trećeg dana zrenja nije utvrđena razlika ($p > 0,05$). Od sedmog dana, pa do kraja procesa zrenja u fermentisanim kobasicama oba dijametra pH vrednost kobasica sa dodatkom starter kulturom bila je manja ($p < 0,05$) od pH vrednosti fermentisanih kobasica bez dodate starter kulture.

6. U toku zrenja svih ispitivanih grupa fermentisanih kobasica a_w vrednost se snižavala, a razlike između a_w vrednosti kobasica užeg, odnosno šireg dijametra nisu utvrđene ($p > 0,05$).

7. Pozitivna korelaciona zavisnost ($p < 0,05$) utvrđena je između broja bakterija *L. monocytogenes* i broja enterobakterija kod fermentisanih kobasica oba dijametra, dok je između broja *L. monocytogenes* i broja BMK, odnosno broja BMK i enterobakterija ustanovljena negativna korelaciona zavisnost ($p < 0,05$).

8. Između pH vrednosti kobasica oba dijametra i broja *L. monocytogenes*, odnosno broja enterobakterija, utvrđena je pozitivna korelaciona zavisnost ($p < 0,05$), dok je odnos pH vrednosti i broja BMK ukazao na negativnu korelacionu zavisnost ($p < 0,05$).

9. Pozitivna korelaciona zavisnost ($p < 0,05$) utvrđena je između a_w vrednosti i broja bakterija *L. monocytogenes*, odnosno broja enterobakterija, kod fermentisanih kobasica oba dijametra. Odnos između a_w vrednosti i broja BMK u fermentisanim kobasicama oba dijametra ukazao je na negativnu korelacionu zavisnost ($p < 0,05$).

10. Između ispitivanih hemijskih parametara kvaliteta fermentisanih kobasica oba dijametra, sa i bez dodatih starter kultura, nisu utvrđene razlike ($p > 0,05$).

8. SPISAK LITERATURE

1. Aggarwal, M., & Mondal, A. K. (2008). *Debaryomyces hansenii*: An Osmotolerant i Halotolerant Yeast. In T. Satyanarayana & G. Kunze (Eds.), *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, pp. 65-84. Netherlis: Springer.
2. Al-Zeyara, S. A., Jarvis, B., & Mackey, B. M. (2011). The inhibitory effect of natural microflora of food on growth of *Listeria monocytogenes* in enrichment broths. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 98-105.
3. Albano H, Oliveira M, Aroso R, Cubero N, Hogg T, Teixeira P (2007). Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from “Alheiras” (traditional Portuguese fermented sausages): in situ assays. *Meat Sci.* 76:796-800.
4. 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(1), 138-146.
5. Annous BA, Becker LA, Bayles DO, Labeda DP i Wilkinson BJ, 1997. Critical role of anteiso-C-15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Applied i Environmental Microbiology*, 63, 3887–3894.
6. Anon., 2008, Potentially hazardous foods, NSW Food Authority, 17-27.
7. Aymerich T, Artigas MG, Garriga M, Monfort JM, Hugas M (2000). Effect of sausage ingredients i additives on the production of enterocin A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of in vitro production i anti-listerial effect in dry fermented sausages. *J. Appl. Microbiol.* 88:686-694.
8. Barbosa dos Reis-Teixeira F, Farias Alves V i Pereira de Martinis E, 2017. Growth, viability i architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48, 587–591.
9. Ben Hammou, F., Skali, S. N., Idaomar, M., & Abrini, J. (2010). Combinations of nisin with salt (NaCl) to control *Listeria monocytogenes* on sheep natural sausage casings stored at 6°C. *African Journal of Biotechnology*, 9, 1190-1195.
10. Benkerroum, N., Daoudi, A., Hamraoui, T., Ghalfi, H., Thiry, C., Duroy, M., & Thonart, P. (2005). Lyophilized preparations of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* as potential protective adjuncts to control

- Listeria monocytogenes* in dry-fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology*, 98(1), 56-63.
11. Borucki MK, Peppin JD, White D, Loge F & Call DR, 2003. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied i Environmental Microbiology*, 69, 7336–7342.
 12. Bošković, M., Tadić, V., Đorđević, J., Glišić, M., Lakićević, B., Dimitrijević, M., Baltić, M.Ž. (2017). Effect of starter cultures on survival of *Listeria monocytogenes* in Čajna sausage. In IOP Conf. Series: Earth i Environmental Science, 85 (2017): International 59th Meat Industry Conference, October 1th-4th 2017, Zlatibor, Serbia (pp. 012074). doi :10.1088/1755-1315/85/1/012074
 13. Bunčić S, Sheryl MA, Rocourt J, Dimitrijevic M (2001). Can food-related environmental factors induce different behaviour in two key serovars, 4b i 1/2a, of *Listeria monocytogenes*?. *Int. J. Food Microbiol.* 65:201-212.
 14. Burgess CM, Gianotti A, Gruzdev N, Holah J, Knochel S, Lehner A, Margas E, Esser SS, Sela S i Tresse O., (2016). The response of foodborne pathogens to osmotic i desiccation stresses in the food chain. *International Journal of Food Microbiology*, 221, 37–53.
 15. Cabedo, L., Picart i Barrot L., & Teixidó & Canelles, A. (2008). Prevalence of *Listeriamonocytogenes* and *Salmonella* in ready-to-eat food in Catalonia, Spain. *Journal of Food Protection*, 71(4), 855-859.
 16. Carpentier B. & Cerf O., (2011). Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment i premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 1–8.
 17. Chikindas M. i Montville T.J, (2002). Multi-method assessment of commercial nisin preparations. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 29:228-232.
 18. Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., & Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: Safe natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 1-20.
 19. Cocolin, L., Urso, R., Rantsiou, K., & Comi, G. (2005). Identification, sequencing i characterization of lactic acid bacteria genes responsible for bacteriocin production. *Tehnologija mesa*, 46, 162-172.

20. Colak H., Hampikyan H., Ulusoy B., Bingol E.B., (2015), Presence of *Listeria monocytogenes* in Turkish style fermented sausage, Food Control 18 (2007) 30-32
21. Colton, T., (1974), Regression and correlation. Statistics in medicine, Little Brown and Company, New York, NY.189, 218.
22. Comi, U., Iacumin, K. R., Cattaneo, C. C., & Cocolin, L. (2005). Characterization of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. Meat Science, 69(3), 381-392.
23. Cosansu S, Geomaras I, Ayhan K, Sofos JN (2010). Control of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* and its antimicrobial substance in a dry fermented sausage sucuk and in turkey breast. J. Food Nutr. Res. 49: 206-214
24. Cotter PD, O'Reilly K i Hill C., (2001). Role of the glutamate decarboxylase acid resistance system in the survival of *Listeria monocytogenes* LO28 in low pH foods. Journal of Food Protection, 64, 1362–1368.
25. Cruz, J. i Barreiro, D. (2001). Situacion actual de la industria carnica en Espana. Eurocarne 95, 23-31.
26. Çon AH, Gökalp HY, Kaya M (2001). Antagonistic effect on *Listeria monocytogenesi* L. innocua of a bacteriocin-like metabolite produced by lactic acid bacteria isolated from sucuk. Meat Sci. 59: 437-441
27. Dalton CB, Austin CC, Sobel J, Hayes PS, Bibb WF, Graves LM, Swaminathan B, Proctor ME & Griffin PM, (1997). An outbreak of gastroenteritis i fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. New England Journal of Medicine, 336, 100–105.
28. Decision No 1082/2013/EU of the EU Parliament and of the Council of 22 October 2013 on serious cross-border threats to health
29. Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, P. (2006). Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension. International Dairy Journal, 16, 1058-1071.
30. Delgado A, Brito D, Peres C, Arroyo-López FN, Garrido-Fernández A (2005). Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature & NaCl concentration. Food Microbiol. 22:721-726.

31. Di Pinto, A., Novello, L., Montemurro, F., Bonerba, E., & Tantillo, G. (2010). Occurrence of *Listeriamonocytogenes* in ready-to-eat foods from supermarkets in Southern Italy. *New Microbiologica*, 33(3), 249-52.
32. Dimitrijević, M., Anderson, R. C., Karabasil, N., Pavličević, N., Jovanović, S., Nedeljković-Trailović, J., Teodorović, V., Marković, M. & Dojčinović, S. (2011). Environmental prevalence and persistence of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked trout processing plant. *Acta Veterinaria*, 61(4), 429-442.
33. Directive 2003/99/EC of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003 on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents.
34. Dowe MJ, Jackson ED, Mori JG i Bell CR, (1997). *Listeria monocytogenes* survival in soil & incidence in agricultural soils. *Journal of Food Protection*, 60, 1201–1207.
35. Drosinon, M. M., Xiraphi, G. M., & Gaitis, J. M. (2005). Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Science*, 69(2), 307-317.
36. Dučić, M., Klisara, N., Markov, S., Blagojevic, B., Vidakovic, A., & Buncic. S. (2016). The fate i pasteurization-based inactivation of *Escherichia coli* O157, *Salmonella* Typhimurium i *Listeria monocytogenes* in dry, fermented sausages. *Food Control*, 59, 400-406.
37. Dykes G, (1995). Bacteriocins: ecological i evolutionary significance. *Trends in Ecology i Evolution*, Volume 10, Issue 5, May 1995, Pages 186-189.
38. EFSA (European Food Safety Authority), 2013. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010-2011 part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. *EFSA Journal* 2013;11(6):3241, 75 pp.
39. EFSA 2018. EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R, Ferniez Escamez PS, Girones R, Herman L, Koutsoumanis K, Nørrung B, Robertson L, Ru G, Sanaa M, Simmons M, Skiamis P, Snary E, Speybroeck N, Ter Kuile B, Threlfall J, Wahlström H, Takkinen J, Wagner M, Arcella D, Da Silva Felicio MT, Georgiadis M, Messens W i Lindqvist R, Scientific Opinion on the *Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods i the risk for human health in the EU. *EFSA Journal* 2018;16(1):5134, 173 pp.

40. EFSA i ECDC (European Food Safety Authority i European Centre for Disease Prevention i Control), 2015. The European Union summary report on trends i sources of zoonoses, zoonotic agents i food-borne outbreaks in 2013. EFSA Journal 2015;13(1):3991, 162 pp.
41. Endrikat S, Gallagher D, Pouillot R, Quesenberry HH, Labarre D, Schroeder CM i Kause J, (2010). A comparative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in prepackaged versus retail-sliced deli meat. Journal of Food Protection, 73, 612–619.
42. Fagerlund A, Langsrud S, Schirmer BCT, Moretro T i Heir E, (2016). Genome analysis of *Listeria monocytogenes* sequence type 8 strains persisting in salmon i poultry processing environments i comparison with related strains. PLoS ONE, 11, e0151117.
43. FDA i FSIS (Food i Drug Administration of the US Department of Health i Human Services i Food Safety i Inspection Service of the US Department of Agriculture), (2003). Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. FDA, 572 pp.
44. FSIS (Food Safety i Inspection Service of the US Department of Agriculture), (2010). FSIS comparative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meat i poultry deli meats. 60 pp.
45. Gallagher D, Ebel ED, Gallagher O, LaBarre D, Williams MS, Golden NJ, Pouillot R, Dearfield KL i Kause J, (2013). Characterizing uncertainty when evaluating risk management metrics: risk assessment modeling of *Listeria monocytogenes* contamination in ready-to-eat deli meats. International Journal of Food Microbiology, 162, 266–275.
46. Gálvez A, Abriouel H, López RL, Omar NB (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. Int. J. Food Microbiol. 120:51-70.
47. Gao, Y., Li, D., & Liu, X. (2014). Bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* C2 as starter culture in fermented sausages. Food Control, 35, 1-6.
48. Garner D i Kathariou S, (2016). Fresh produce-associated listeriosis outbreaks, sources of concern, teachable moments, i insights. Journal of Food Protection, 79, 337–344.

49. Gihi M i Chikindas ML, (2007). *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. International Journal of Food Microbiology, 113, 1–15.
50. Gombas DE, Chen YH, Clavero RS i Scott VN, (2003). Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Journal of Food Protection, 66, 559–569.
51. Goulet V, Hebert M, Hedberg C, Laurent E, Vaillant V, De Valk H i Desenclos JC, (2012). Incidence of listeriosis i related mortality among groups at risk of acquiring listeriosis. Clinical Infectious Diseases, 54, 652–660.
52. Heinz G. i Hautzinger P. (2007), Meat processing technology for small to medium scale producers, FAO of UN Regional office for Asia i Pacific, RAP Publication 2007/20., Bangkok.
53. Holck, A. L., Liland, K. H., Drømtorp, S. M., Carlehög, M., & McLeod, A. (2017). Comparison of UV-C and Pulsed UV Light Treatments for Reduction of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* on Eggs. Journal of food protection, 81(1), 6-16.
54. Hugas, M., B. Neumeyer, F. Pages, M. Garriga, W. P. Hammes (1997). Comparison of bacteriocin-producing lactobacilli on *Listeria* growth in fermented sausages. Fleischwirtschaft International 5, 31-33.
55. Incze, K. 1986. Technologie und Mikrobiologie der ungarischen Salami. Fleischwirtsch 66:1305–1311.
56. Janković, V., Mitrović, R., Lakićević, B., Velebit, B., & Baltić, T. (2017). *Listeria monocytogenes* presence during fermentation, drying and storage of Petrovská klobása sausage. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 85, No. 1, p. 012051). IOP Publishing.
57. Karabasil, N., Boskovic, T., Tomasevic, I., Vasilev, D., Dimitrijevic, M., Katanic, N., & Antic, D. (2018). Production of Traditional Meat Products in Small and Micro Establishments in Serbia: Current Status and Future Perspectives. Acta Veterinaria-Beograd, 68(4), 373-390.
58. Keto-Timonen R, Tolvanen R, Lunden J i Korkeala H, (2007). An 8-year surveillance of the diversity i persistence of *Listeria monocytogenes* in a chilled food processing plant analyzed by amplified fragment length polymorphism. Journal of Food Protection, 70, 1866–1873.

59. Komprda T, Smelá D, Pechová P, Kalhotka L, Stencl J. i Klejdus B, (2004). Effect of starter culture, spice mix i storage time i temperature on biogenic amine content of dry fermented sausages. *Meat Science* 67:607–616.
60. Konisky J, (1982). Colicins i Other Bacteriocins With Established Mode of action. *Ann. Rev. Microbiology*, 36:125-44.
61. Kouakou P, Ghalfi H, Destain J, Dubois-Dalphin R, Evrard P, Thonart P (2009). Effects of curing sodium nitrite additive i natural meat fat on growth control of *Listeria monocytogenes* by the bacteriocinproducing *Lactobacillus curvatus* strain CWBI-B28. *Food Microbiol.* 26:623-628.
62. Kuenne C, Billion A, Abu Mraheil M, Strittmatter A, Daniel R, Goesmann A, Barbuddhe S, Hain T i Chakraborty T, (2013). Reassessment of the *Listeria monocytogenes* pan-genome reveals dynamic integration hotspots i mobile genetic elements as major components of the accessory genome. *BMC Genomics*, 14, 47.
63. Lahti, E., T. Johansson, T. Honkanen-Buzalski, P. Hill, E. Nurmi, (2001). Survival i detection of *Escherichia coli* O157:H7 i *Listeria monocytogenes* during the manufacture of dry sausage using two different starter cultures. *Food Microbiol.* 18, 75-85.
64. Lee M. and Styliadis S. (1996), A survey of pH and water activity levels in processed alams and sausages in Metro Toronto, *Jurnal of Food Protection*, vol. 59, no. 9, 1996, pg. 1007-1011
65. Leistner F. (1992). The essentials of producing stable i safe raw fermented sausages. In *New Technologies for Meat i Meat Products*, J.M. Smulders, F. Toldri, J. Flores i M. Prieto (eds.). Audet, Nijmegen, The Netherlis.
66. Leistner L. (1986). Allgemeines über Rohschinken. *Fleischwirtsch* 66:496–510.
67. Leroy, F., & De Vuyst, L. (1999). The presence of Salt i a Curing Agent Reduces Bacteriocin Production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a Potential Starter Culture for Sausage Fermentation. *Applied i Environmental Microbiology*, 65(12), 5350-5356.
68. Leroy, F., Verluyten, J., & de Vuyst, L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 106(3), 270-285.

69. Lianou, A., & Sofos, J. N. (2007). A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. *Journal of Food Protection*, 70, 2172-2198.
70. Linke K, Ruckerl I, Brugger K, Karpiskova R, Walli J, Muri-Klinger S, Tichy A, Wagner M i Stessl B, (2014). Reservoirs of *Listeria* species in three environmental ecosystems. *Applied & Environmental Microbiology*, 80, 5583–5592.
71. Lücke F.K. (1998). Fermented sausages. Ch. 14 in: *Microbiology of Fermented Foods*, vol. 2, 2nd Ed. BJB Wood, ed. New York: Blackie Academic & Professional, pp. 441–483.
72. Lücke, F. K. (2000). Utilisation of microbes to process i preserve meat. *Meat Science*, 56, 105-115.
73. Lungu B, Ricke SC i Johnson MG, (2009). Growth, survival, proliferation & pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: A review. *Anaerobe*, 15, 7–17.
74. Maldonado A, Ruiz-Barba JL, Jimenez-Diaz, R (2004). Production of plantaricin NC8 by *Lactobacillus plantarum* NC8 is induced in the presence of different types of gram-positive bacteria. *Arch. Microbiol.* 181:8-16.
75. Martín, B., Perich, A., Gómez, D., Yangüela, J., Rodríguez, A., Garriga, M., & Aymerich, T. (2014). Diversity and distribution of *Listeria monocytogenes* in meat processing plants. *Food microbiology*, 44, 119-127.
76. Martinez, R. C. R. & De Martinis, E. C. P. (2005). Evaluation of bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* 1 against *Listeria monocytogenes* 1/2a growth and haemolytic activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36, 83-87.
77. Meloni, D., Galluzzo, P., Mureddu, A., Piras, F., Griffiths, M., & Mazzette, R. (2009). *Listeria monocytogenes* in RTE foods marketed in Italy: prevalence and automated EcoRI ribotyping of the isolates. *International journal of food microbiology*, 129(2), 166-173.
78. Meloni, D., Consolati, S. G., Mazza, R., Mureddu, A., Fois, F., Piras, F., & Mazzette, R. (2014). Presence and molecular characterization of the major serovars of *Listeria monocytogenes* in ten Sardinian fermented sausage processing plants. *Meat science*, 97(4), 443-450.

79. Meloni, D. (2015). Presence of *Listeria monocytogenes* in Mediterranean-style dry fermented sausages. *Foods*, 4(1), 34-50.
80. Minor-Pérez H, Ponce-Alquicira E, Guerrero-Lagarreta I, Regalado-González C, González-Saravia, AF (2005). Effect of extrinsic parameters on the production of a bacteriocin by *Lactobacillus buchneri*, isolated from Mexican raw sausages. *Int. J. Food Prop.* 8:69-78.
81. Mitrović R., (2016), Ispitivanje mogućnosti inaktivacije *Yersinia enterocolitica* u fermentisanim kobasicama, Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, Beograd, 1-153.
82. Moura A, Criscuolo A, Pouseele H, Maury MM, Leclercq A, Tarr C, Bjorkman JT, Dallman T, Reimer A, Enouf V, Larssonneur E, Carleton H, Bracq-Dieye H, Katz LS, Jones L, Touchon M, Tourdjman M, Walker M, Stroika S, Cantinelli T, Chenal-Francois V, Kucerova Z, Rocha EPC, Nadon C, Grant K, Nielsen EM, Pot B, Gerner-Smidt P, Lecuit M i Brisse S, (2017). Whole genome-based population biology & epidemiological surveillance of *Listeria monocytogenes*. *Nature Microbiology*, 2, 16185.
83. Møretrø T i Langsrud S, (2004). *Listeria monocytogenes*: biofilm formation & persistence in food-processing environments. *Biofilms*, 1, 107–121.
84. Nes I. i Holo H., (2000). Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Peptide Science*, vol. 55, Issue 1, pg. 50-61.
85. Neysens P, Messens W, De Vuyst L (2003). Effect of sodium chloride on growth i bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471. *Int. J. Food Microbiol.* 88:29-39.
86. Nightingale KK, Schukken YH, Nightingale CR, Fortes ED, Ho AJ, Her Z, Grohn YT, McDonough PL i Wiedmann M, (2004). Ecology i transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants i in the farm environment. *Applied & Environmental Microbiology*, 70, 4458–4467.
87. Novelli, E., Dal Santo, L., Balzan, S., Cardazzo, B., Spolaor, D., Lombardi, A., & Fasolato, L. (2017). Analysis of process factors of dry fermented salami to control *Listeria monocytogenes*. *Italian journal of food safety*, 6(1).

88. O'Driscoll B, Gahan CGM i Hill C, (1996). Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: Isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Applied & Environmental Microbiology*, 62, 1693–1698.
89. O' Sullivan, L., Ross, R., P., Hill, C., (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety & quality. *Biochemie* 84, 593-604;
90. Ooi ST i Lorber B, (2005). Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clinical Infectious Diseases*, 40, 1327–1332.
91. Orsi RH, den Bakker HC & Wiedmann M, (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, i phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*, 301, 79–96.
92. Orsi RH & Wiedmann M, (2016). Characteristics & distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 100, 5273–5287.
93. Pederson C.S. (1979). *Microbiology of Food Fermentation*, 2nd ed. Westport, Connecticut: The AVI Publishing Company Inc, p. 212.
94. Pérez-Ibarreche, M., Castellano, P., Leclercq, A., & Vignolo, G. (2016). Control of *Listeria monocytogenes* biofilms on industrial surfaces by the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* CRL1862. *FEMS Microbiology Letters*, 363(12), fnw118
95. Pidcock, K., Heard, G. M., & Henriksson, A. (2002). Application of nontraditional meat starter cultures in production of Hungarian salami. *International Journal of Microbiology*, 76, 75-81.
96. Pradhan AK, Ivanek R, Grohn YT, Bukowski R i Wiedmann M, (2011). Comparison of public health impact of *Listeria monocytogenes* product-to-product i environment-to-product contamination of deli meats at retail. *Journal of Food Protection*, 74, 1860–1868.
97. Pragati, H. (2007). Effect of a mixed Starter Culture of *Lactobacillus sakei* and *Micrococcus varians* M483 on microbial changes of minced chevon at refrigerated storage. *Intas Polivet*, 8(1), 191-193.
98. Pravilnik o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa, Sl. glasnik RS 50/2019.
99. Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa, Sl. glasnik RS br. 72/10.

100. Pravilnik o izmeni i dopuni Pravilnika o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa, Sl. glasnik RS br. 62/18).
101. Pravilnik o kvalitetu proizvoda od mesa, Sl. list SFRJ 29/74.
102. Radetić P. (1997), Sirove kobasice, monografija, Izdavač: autor.
103. Rašeta, M., Vesković-Moračanin, S., Borović, B., Karan, D., Vranić, D., Trbović, D., & Lilić, S. (2010). Mikroklimatski uslovi tokom zrenja kobasica proizvedenih na tradicionalan način. *Tehnologija mesa*, 51(1), 45-51.
104. Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs
105. Reij MW, Den Aantrekker ED i ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Force, (2004). Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 1–11.
106. Rubio, R., Bover-Cid, S., Martin, B., Garriga, M., & Aymerich, T. (2013). Assessment of safe enterococci as bioprotective cultures in low-acid fermented sausages combined with high hydrostatic pressure. *Food microbiology*, 33(2), 158-165.
107. Samapundo, S., Ampofo-Asiama, J., Anthierens, T., Xhaferi, R., Van Bree, I., Szczepaniak, S., Goemaere, O., Steen, L., Dhooge, M., Paelinck, H., Dewettinck, K., & Devlieghere, F. (2010). Influence of NaCl reduction i replacement on the growth of *Lactobacillus sakei* in broth, cooked ham i white sauce. *International Journal of Food Microbiology*, 143(1), 9-16.
108. Shephard S. (2000). *Pickled Potted & Canned*. London, U.K.: Headline Book Publishing.
109. Silins, I. (2014). The effects of pH, aw, i lactic acid bacteria on *Listeria monocytogenes* in fermented sausages. Retrieved from http://lufb.llu.lv/conference/foodbalt/2014/FoodBalt_Proceedings_2014-55-60.pdf
110. Skandamis, P., & Nychas, G. J. E. (2007). Pathogens: risks and control. *Handbook of fermented meat and poultry*, 389-412.
111. Swaminathan, B., & Gerner-Smidt, P. (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and infection*, 9(10), 1236-1243.
112. Škaljac, S., Petrović, L., Tasić, T., Ikonić, P., Jokanović, M., Tomović, V., & Škrbić, B. (2014). Influence of smoking in traditional and industrial conditions on

- polycyclic aromatic hydrocarbons content in dry fermented sausages (Petrovská klobása) from Serbia. *Food Control*, 40, 12-18.
113. Tagg et al, (1976). Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Bacteriological reviews* 40(3):722-56.
114. Talon R, Leroy S, Lebert I, Giammarinaro P, Chacornac J-P, Latorre-Moratalla M, Vidal-Carou C, Zanardi E, Conter M, Lebecque A (2008). Safety improvement ipreservation of typical sensory qualities of traditional dry fermented sausages using autochthonous starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 126:227-234.
115. Tasara T. i Stephan R, (2006). Cold stress tolerance of *Listeria monocytogenes*: a review of molecular adaptive mechanisms i food safety implications. *Journal of Food Protection*, 69, 1473–1484.
116. Terra, N. N., Sossela de Freitas, R. J., & Cichoski, Aj. (2007). *Staphylococcus xylosus* during processing i storage of cured, matured i fermented pork shoulder. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(4), 2026-2031.
117. Thévenot, D., M. L. Delignette-Muller, S. Christieans, C. Vernozy-Rozi, (2005a). Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants & their products. *Int. J. Food Microbiol.* 102, 85-94.
118. Thévenot, D., M. L. Delignette-Muller, S. Christieans, C. Vernozy-Rozi, (2005b). Fate of *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated French sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 101, 189-200.
119. Toldra F. (2002). *Dry-cured Meat Products*, Food&Nutrition Press, Inc., Trumbull, Connecticut 0611 USA
120. Toldra F. (2007). *Hibook of Fermented Meat i Poultry*, Blackwell Publishing, Iowa USA
121. Tolvanen, R., Hellström, S., Elsser, D., Morgenstern, H., Björkroth, J., & Korkeala, H. (2008). Survival of *Listeria monocytogenes* strains in a dry sausage model. *Journal of Food Protection*, 71(8), 1550-1555.
122. Työppönen S, Petäjä E, Mattila-Siholm T. (2003), Bioprotectives i probiotics for dry sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 83:233-244.
123. Vazquez-Boli JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, Gonzalez-Zorn B, Wehli J i Kreft J, (2001). *Listeria* pathogenesis & molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 584–640.

124. Vermeiren, D., & Debevere, A. (2004). Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 96(2), 149-164.
125. Villani F, Casaburi A, Pennacchia C, Filosa L, Russo F, Ercolini D (2007). Microbial ecology of the soppressata of Vallo di Diano, a traditional dry fermented sausage from southern Italy, & in vitro & in situ selection of autochthonous starter cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:5453-5463.
126. Vodič za primenu mikrobioloških kriterijuma za hranu, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Republike Srbije, 2011.
127. Vuković I. (2006). *Osnove tehnologije mesa*, treće izdanje, VKS, Beograd
128. Vuković, I., Vasilev, D., Saičić, S., & Ivanković, S. (2012). Ispitivanje važnijih promena u toku zrenja tradicionalne fermentisane kobasice lemeški kulen. *Tehnologija mesa*, 53(2), 140-147.
129. Yang R, Ray B (1994). Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiol.* 11:281-291.
130. Zdolec, N., Kozačinski, L., Hadžiosmanović, M., Cvrtila, Ž., & Filipović, I. (2007). Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth in dry fermented sausages. *Veterinarski arhiv*, 77(6), 507-514.
131. Zdolec, N., Hadžiosmanović, M., Kozačinski, L., & Filipović, I. (2005). Utjecaj bakteriocina na mikrobiološku kakvoću fermentiranih kobasica. *Meso: prvi hrvatski časopis o mesu*, 7(3), 43-47.

BIOGRAFIJA

Vukašin I. Tadić rođen je 06.05.1983. godine u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju završio je u Beogradu. Školske 2002/2003 upisao je prvu godinu studija na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. 2010. godine diplomirao je sa prosečnom ocenom 8,34. Školske 2012/2013 upisao je doktorske akademske studije na istom fakultetu.

Od 2010. godine zaposlen je na poslovima tehnološkog projektovanja objekata za proizvodnju hrane i implementacije i kontrole sistema za upravljanje bezbednošću i kvalitetom hrane, u preduzeću "Biovet Consulting" d.o.o. iz Beograda.

Kao koautor objavio je radove: Djordjević J., Pećanac B., Todorović M., Dokmanović M., Glamočlija N., Tadić V., Baltić M. 2015. Fermented sausage casings, *Procedia Food Science* 5, 69 – 72 i Bošković, M., Tadić, V., Đorđević, J., Glišić, M., Lakićević, B., Dimitrijević, M., Baltić, M.Ž. 2017. Effect of starter cultures on survival of *Listeria monocytogenes* in Čajna sausage. In IOP Conf. Series: Earth i Environmental Science, 85 (2017): International 59th Meat Industry Conference, October 1th-4th 2017, Zlatibor, Serbia (pp. 012074). doi :10.1088/1755-1315/85/1/012074.

Kao autor objavio je rad: V. Tadić, J. Djordjević, M. Bošković, M. Baltić, B. Lakićević, D. Vasilev, M. Dimitrijević, 2018. Two different starter cultures as potential inhibitors of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages, *Fleischwirtschaft* (2018), vol. 98 br. 6, str. 93-99.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Вукашин И. Тадић

број уписа 2011/5013

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

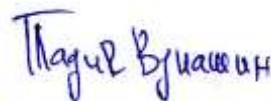
Стартер културе као потенцијални инхибитори *Listeria monocytogenes* у

ферментисаним кобасицама

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

Потпис докторанда

У Београду, 16.10.2019.



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора _____ Вукашин И. Тадић _____

Број уписа _____ 2011/5013 _____

Студијски програм _____ Докторске академске студије _____

Наслов рада _____ Стартер културе као потенцијални инхибитори *Listeria*
monocytogenes у ферментисаним кобасицама _____

Ментор _____ Проф. др Мирјана Димитријевић _____

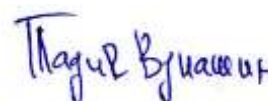
Потписани _____ Вукашин И. Тадић _____

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда



У Београду, _____ 16.10.2019. _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Стартер културе као потенцијални инхибитори *Listeria monocytogenes* у ферментисаним кобасицама

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

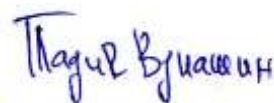
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда



У Београду, _____ 16.10.2019. _____

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.