

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

**ISPITIVANJE ČINILACA OD ZNAČAJA ZA RAST
RAZLIČITIH SOJEVA *Listeria monocytogenes*
U FILETIMA HLADNO DIMLJENE PASTRMKE**

Doktorska disertacija

mr Jelena Z. Kuzmanović
diplomirani veterinar

Beograd, 2013. godine

**UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE**

Jelena Z. Kuzmanović

**THE STUDY OF IMPORTANT FACTORS IN THE
GROWTH OF DIFFERENT *Listeria monocytogenes*
STRAINS IN COLD SMOKED TROUT FILLETS**

PhD Thesis

Belgrade, 2013.

MENTOR

Dr Milan Ž. Baltić, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu
Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla

ČLANOVI KOMISIJE

Dr Milan Ž. Baltić, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu
Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla

Dr Vlado Teodorović, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu
Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla

Dr Mirjana Dimitrijević, docent

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu
Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla

Dr Nataša Pavlićević, naučni saradnik

Veterinarski specijalistički institut, Subotica

Dr Milan Milijašević, naučni saradnik

Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd

Datum odbrane doktorske disertacije

.....

Ovom prilikom, uz duboko poštovanje, najiskrenije se zahvaljujem članovima Komisije, posebno svom profesoru i mentoru dr Milanu Baltiću, na korektnom i profesionalnom odnosu, nesebičnoj pomoći i nadasve ljudskom zalaganju.

Na ličnom angažovanju u toku izrade disertacije, ukazanoj mi stručnoj pomoći, kao i prijateljskoj podršci veliku zahvalnost dugujem svojim kolegama i prijateljima : dr Mirjani Dimitrijević, dr Nataši Kilibardi i mr Mariji Stojanović.

Zahvaljujem se svojim kolegama i prijateljima iz Centra za ispitivanje namirnica na stručnoj pomoći, savetima i ispoljenom razumevanju tokom izrade eksperimenta i stvaranja doktorske disertacije.

Zahvaljujem se i firmama „Tropic Ribarstvo“ iz Banja Luke i „Florida Bel“ iz Beograda, na saradnji.

Na kraju, duboko i sa ljubavlju se zahvaljujem svojoj porodici na nesebičnoj podršci, pomoći, svakodnevnom zalaganju i poverenju.

ISPITIVANJE ČINILACA OD ZNAČAJA ZA RAST RAZLIČITIH SOJEVA

Listeria monocytogenes U FILETIMA HLADNO DIMLJENE PASTRMKE

Kratak sadržaj

Osnovni princip pakovanja hrane je sledeći – izbegavanje kontaminacije, odlaganje kvara, pojedine enzimske reakcije koje pospešuju mekoću proizvoda, smanjenje gubitka na masi i osiguranje zadržavanja organoleptičkih svojstava namirnice. Savremen potrošač traži hranu visokog kvaliteta koja je zadržala senzorske karakteristike sirovine od koje je proizvedena, i da je u isto vreme bezbedna po zdravlje.

Sposobnost listerija da rastu pri temperaturi hlađenja, da su rasprostranjene u prirodi i da preživljavaju dugo vremena u nepovoljnim uslovima doprineli su saznanju da je ova bakterija sve značajniji patogen koji se prenosi hranom na ljude.

Osnovni cilj u okviru ove doktorske disertacije je bio da se ispita uticaj pakovanja i uslova čuvanja na rast različitih serotipova *Listeria monocytogenes* (različitog porekla) u laboratorijski kontaminiranim uzorcima dimljene pastrmke. Jedan od ciljeva ovog istraživanja je da se ispita uticaj pakovanja dimljene ribe (pastrmke) u vakuum i modifikovanoj atmosferi na održivost i odabrane parametre kvaliteta. Pored toga, ispitivano je i prisustvo drugih patogena (*Salmonella spp.*, koagulaza pozitivne stafilokoke, sulfitoredukujuće klostridije) kod hladno dimljene pakovane pastrmke. Izvršeno je ispitivanje promene ukupnog broja bakterija, promene broja mlečno-kiselinskih bakterija, kao i broja *Listeria monocytogenes* u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanoj atmosferi i skladištene pri temperaturi 3°C, odnosno pri 8°C.

U toku 35 dana skladištenja pri 3°C, odnosno 8°C, ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija rastao je u zavisnosti od ispitivane grupe do 14. odnosno 28. dana, da bi 35. dana bio na nivou broja bakterija nultog dana ispitivanja ili manji. Prosečan ukupan broj bakterija u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum, odnosno u modifikovanoj atmosferi bio je tokom ispitivanja manji u uzorcima koji su skladišteni pri nižim temperaturama. Način pakovanja (vakuum, modifikovana atmosfera) i skladištenje pri istim temperaturnim uslovima (3°C ili 8°C) u većini slučajeva ne utiče značajno na razlike u ukupnom broju aerobnih mezofilnih bakterija.

Promene broja četiri različita serotipa bakterije *Listeria monocytogenes* pokazuju da u toku skladištenja porast broja bakterija od nultog do 14. odnosno 28.dana skladištenja zavisi od načina pakovanja (vakuum, modifikovana atmosfera), temperaturnih uslova čuvanja uzoraka (3°C ili 8°C) i serotipa *Listeria monocytogenes*. Kod sva četiri serotipa *Listeria monocytogenes* utvrđeno je značajno smanjenje broja bakterija 35.dana skladištenja u odnosu na 28.dan skladištenja.

Broj mlečno-kiselinskih bakterija u uzorcima rastao je tokom skladištenja do 35.dana, pri temperaturama od 3°C, odnosno 8°C. Porast broja mlečno-kiselinskih bakterija bio je značajniji kod uzoraka skladištenih pri višim temperaturama i uzoraka pakovanih u modifikovanoj atmosferi.

U toku ispitivanja (nultog, 14., 28. i 35. dana) iz uzoraka dimljene pastrmke nisu izolovane *Salmonella spp.* i koagulaza pozitivne stafilokoke, a takođe nije utvrđeno ni prisustvo sulfitoredukujućih klostridija.

Osnovni hemijski sastav (sadržaj vode, proteina, masti, pepela), sadržaj soli i aw vrednost bili su karakteristični za hladno dimljenu pastrmku.

U toku skladištenja pH vrednost hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum, odnosno modifikovanu atmosferu i skladištene pri 3°C, odnosno 8°C je stalno rasla. Porast pH vrednosti bio je značajniji kod uzoraka skladištenih pri 8°C i uzoraka pakovanih u modifikovanu atmosferu.

Senzorne ocene prihvatljivosti mirisa uzoraka hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum odnosno modifikovanu atmosferu su se značajno smanjivale u toku skladištenja, što je bilo izraženije kod uzoraka skladištenih pri višim temperaturama (8°C) i uzoraka pakovanih u modifikovanu atmosferu.

Ključne reči: *L.monocytogenes*, hladno dimljena riba, vakuum, modifikovana atmosfera, temperatura skladištenja

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Higijena i tehnologija mesa

UDK broj: 637.5.034:579

The Study of Important Factors in the Growth of Different *Listeria monocytogenes* strains in Cold Smoked Trout Fillets

Summary

The main principle for food packing is the following: avoiding contamination, staleness delay, some enzyme reactions that increase softness of the product, reduce loss of mass, and to ensure the preservation of organoleptic aspects of food. The modern consumer is searching for the high quality food, which retains the sensory features and nutritional value of the raw material it was made of and also to be health safe.

The ability of listeria to grow at cooler temperatures, to be wide-spread in nature and to survive for a long time in unfavorable conditions, have all contributed to the knowledge that this bacterium is becoming an increasingly significant pathogen that is transferable to people from food.

The main objective of this PhD thesis is to explore the impact of packaging and storage conditions on the growth of various serotypes of *Listeria monocytogenes* (of different origin) in laboratory contaminated samples of smoked trout. One of the objectives of this research is to examine the impact of vacuum packing of smoked fish (trout) and modified atmosphere on maintainability and protection of quality parameters. The presence of other pathogens (*Salmonella spp.*, coagulase positive Staphylococci, sulphite-reducing Clostridia) in cold smoked packed trout was also investigated. The research was conducted regarding the change of the total number of bacteria, and the change of the number of lactic acid bacteria, as well as the number of *Listeria monocytogenes* in samples of cold smoked trout vacuum packed, under modified atmosphere and stored at the temperatures of 3°C and 8°C, respectively.

During 35 days of storage at the temperatures of 3°C and 8°C, respectively, the total number of bacteria was increasing until day 14 and day 28 subject to a group, only to be at the level of number of bacteria on day 0 or less. The average total number of bacteria in samples of cold vacuumed smoked trout, or at modified atmosphere was less during the research in samples that were stored at lower temperatures. The method of packing (vacuum or modified

atmosphere) and storage at same temperatures (3°C or 8°C) does not significantly affect the difference in the total number of bacteria in the majority of cases.

The change of the number in four different serotypes of bacteria *Listeria monocytogenes* shows that the number of bacteria from day 0 to day 14 and day 28, respectively, during the storage process depends on the packing method (vacuum, modified atmosphere), temperature conditions (3°C or 8°C) of sample storage and serotype *Listeria monocytogenes*. With all four serotypes of *Listeria monocytogenes*, the significant decrease of the number of bacteria was noticed on day 35 of storage compared to day 28 of storage.

The number of lactic acid bacteria in samples was increasing during the storage of up to day 35, at temperatures of 3°C and 8°C. The increased numbers of lactic acid bacteria was more significant with samples stored at higher temperatures and samples packed in the modified atmosphere.

During the research (days 0, 14, 28 and 35), *Salmonella spp.* and coagulase positive Staphylococci was not isolated from the samples of smoked trout, nor was the presence of sulphite-reducing Clostridium detected.

The basic chemical composition (water quantity, proteins, fat, ash) salt and aw values were typical for cold smoked trout.

During the storage process, pH values of cold smoked vacuum packed trout or modified atmosphere and stored at 3°C and 8°C, respectively was constantly increasing. The increase of pH value was more significant with samples stored at 8°C and samples packed at modified atmosphere.

The sensory evaluation of acceptability of cold smoked vacuum packed trout samples and/or at modified atmosphere considerably decreased during the storage, which was more pronounced with samples stored at higher temperatures (8°C) and samples packed at modified atmosphere.

Key words: *Listeria monocytogenes*, cold smoked fish, vacuum, modified atmosphere, storage temperature.

Scientific field : Veterinary medicine

Field of academic expertise : Meat hygiene and Technology

UDK number : 637.5.034:579

Sadržaj

I	Uvod	1
II	Pregled literature	5
1.	Uslovi savremenog pakovanja prehrambenih proizvoda	5
1.2.	Načini očuvanja namirnica: prošlost, sadašnjost, budućnost	7
1.2.1.	Glavne trenutne tehnike očuvanja namirnica	9
	• Niske temperature	10
	• Smanjenje aktivnosti vode a_w	12
	• Acidifikacija (kiseljenje)	15
	• Konzervansi	16
	• Pakovanje	20
	• Istorija pakovanja	20
	• Vakuum pakovanje i pakovanje u modifikovane atmosfere (MAP) ...	24
	• Vakuumsko pakovanje	25
	• Pakovanje u modifikovanoj atmosferi	28
	• Poreklo MAP-a	30
	• Tipovi mašina za MAP pakovanje	37
	• Aseptično pakovanje	40
	• Načini aseptičnog pakovanja	42
	• Povišena temperatura	46
1.2.2.	Nove i napredne tehnologije očuvanja hrane	48
	• Prirodni aditivi	49
	• Nove fizičke procedure	51
	• Visoki hidrostatski pritisak	51
	• Ultrazvuk, mikrotalasna i visokofrekventna energija	52
	• Električno pražnjenje visokog napona (elektroporacija)	52
	• Visok intenzitet svetlosti	53
	• Visok intenzitet impulsa magnetnog polja	54
	• Radijacija	54
1.2.3.	Sterilizacija materijala koji dolaze u kontakt sa hranom	55
1.2.4.	Aktivna ambalaža	61
1.2.5.	Pametna ili inteligentna ambalaža	64
1.2.6.	Zaključak o savremenim načinima pakovanja namirnica	66
2.	Meso, meso riba i značaj mesa	67
2.1.	Meso riba i plodovi mora	68
2.2.	Proizvodi od riba, rakova i školjkaša	74
2.2.1.	Riblje konzerve	74
2.2.2.	Riblje polutrajne konzerve	75

2.2.3. Smrznuti proizvodi od ribe	75
2.2.4. Ostali proizvodi od ribe	76
• Soljena riba	
• Dimljena riba	
• Sušena riba	
• Kobasice od ribe	
2.2.4.1. Zašto dimljena riba?	77
2.2.4.2. Tehnologija konzervisanja ribe dimljenjem	82
3. Održivost dimljene ribe pakovane u VP i MAP	86
3.1. Parametri od značaja za kvalitet dimljene ribe	87
3.2. Opšti principi za utvrđivanje roka upotrebljivosti	92
3.3. Održivost dimljene ribe pakovane u vakuumu i modifikovanoj atmosferi	99
3.4. Mikrobiološki parametri od značaja za održivost dimljene ribe	102
3.4.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	102
• Listerioza – epidemiološki aspekti	118
• Nalaz <i>Listeria monocytogenes</i> u namirnicama animalnog porekla	133
• Nalaz <i>Listeria monocytogenes</i> u ribi, proizvodima od ribe i plodovima mora	140
3.4.2. Bakterije mlečne kiseline	155
• Uticaj mlečno-kiselinskih bakterija na rast <i>L.monocytogenes</i> u proizvodima dimljene ribe	163
3.4.3. Ostali mikrobiološki kriterijumi (<i>Salmonella spp.</i> , koagulaza pozitivne stafilokoke, sulfitoredujuće klostridije)	165
• Sulfitoredujuće klostridije	165
• Koagulaza pozitivne stafilokoke	168
• <i>Salmonella spp.</i>	169
3.5. Hemijski parametri	171
3.6. Senzorna ispitivanja	172
III Cilj i zadaci rada	175
IV Materijal i metode	177
1. Materijal	177
1.1. Uzorci ribe	177
1.2. Mikroorganizmi	179
2. Metode ispitivanja	179
2.1. Mikrobiološke analize	179
2.1.1. Uzorci za mikrobiološka ispitivanja	180
2.1.2. Način veštačke kontaminacije uzoraka sa sojevima <i>L.monocytogenes</i>	180

2.1.3. Oprema	181
2.1.4. Hranljive podloge i reagensi	182
2.1.5. Metode	189
2.2. Hemijske i fizičko-hemijske analize	195
2.3. Senzorne analize	196
2.4. Statističke analize	197

V Rezultati ispitivanja 200

1. Ispitivanje promene ukupnog broja bakterija u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanoj atmosferi i skladištene pri temperaturi 3°C, odnosno pri 8°C	200
2. Ispitivanje promene broja bakterija <i>Listeria monocytogenes</i> u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanoj atmosferi i skladištene pri temperaturi 3°C, odnosno pri 8°C	205
3. Ispitivanje promene broja mlečno-kiselinskih bakterija u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanoj atmosferi i skladištene pri temperaturi 3°C, odnosno pri 8°C	210
4. Ispitivanje prisustva <i>Salmonella spp.</i> , koagulaza pozitivnih stafilokoka, i sulfitoredujućih klostridija, izolacija, identifikacija i određivanje broja bakterija u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanoj atmosferi i skladištene pri temperaturi 3°C, odnosno pri 8°C	214
5. Ispitivanje osnovnog hemijskog sastava u uzorcima hladno dimljene pastrmke	214
6. Određivanje aktivnosti vode (a_w) i ispitivanje pH vrednosti hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanoj atmosferi i skladištene pri temperaturi 3°C, odnosno pri 8°C	215
7. Rezultati senzorne ocene uzoraka hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanoj atmosferi i skladištene pri temperaturi 3°C, odnosno pri 8°C	220

VI Diskusija 222

1. Ispitivanje promene ukupnog broja bakterija u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanoj atmosferi i skladištene pri temperaturi 3°C, odnosno pri 8°C	222
2. Ispitivanje promene broja bakterija <i>Listeria monocytogenes</i> u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanoj atmosferi i skladištene pri temperaturi 3°C, odnosno pri 8°C	231
3. Ispitivanje promene broja mlečno-kiselinskih bakterija u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanoj atmosferi i skladištene pri temperaturi 3°C, odnosno pri 8°C	240
4. Ispitivanje prisustva <i>Salmonella spp.</i> , koagulaza pozitivnih stafilokoka, i sulfitoredujućih klostridija, izolacija, identifikacija i određivanje broja bakterija u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i	

modifikovanoj atmosferi i skladištene pri temperaturi 3°C, odnosno pri 8°C	247
5. Ispitivanje osnovnog hemijskog sastava u uzorcima hladno dimljene pastrmke	249
6. Određivanje aktivnosti vode (a_w) i ispitivanje pH vrednosti hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanoj atmosferi i skladištene pri temperaturi 3°C, odnosno pri 8°C	250
7. Rezultati senzorne ocene uzoraka hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanoj atmosferi i skladištene pri temperaturi 3°C, odnosno pri 8°C	257
VII Zaključci	259
VIII Spisak literature	261
Prilog	

I - UVOD

Riba čini značajan izvor animalnih proteina u ishrani stanovnika velikog dela sveta. Od godišnjeg ulova koji iznosi blizu 100 miliona tona oko 70 miliona tona, koristi se u ishrani ljudi. U ishrani ljudi koristi se i oko 40 miliona tona ribe proizvedene u agrokulturi. Od ukupne količine ribe namenjene ishrani ljudi, nešto više od jedne četvrtine koristi se kao sveža riba, dok se ostala količina ribe konzervira na različite načine (zamrzavanje, soljenje, sušenje, dimljenje, proizvodnja konzervi).

Dimljena riba je proizvod proizveden toplim ili hladnim dimljenjem ribe. Dimljena riba može da se svrsta u grupu gotovih proizvoda (ready-to-eat), a može da bude svrstana i u poluproizvode. Tehnologija konzerviranja ribe dimljenjem sadrži u sebi dva osnovna postupka: salamurenje i sušenje u pušnicama. Time riba gubi znatan deo vode i dehidrira, a delovanje dima konzervira ribu. Istovremeno, dim daje ribi specifičan ukus i boju. Konzervišući efekat kod dimljene ribe zasniva se na kombinovanom delovanju dima i soli. Inhibitorni je efekat ovih supstancija na bakterije i enzime. Dimljenje ne utiče samo na bakterije i enzime, već dovodi i do omekšavanja ribe, utiče na ukus, što sve rezultira karakterističnim mirisom i ukusom proizvoda. Na održivost dimljene ribe značajno utiče i temperatura čuvanja.

Na svetskom tržištu postoji sve veća potražnja za svežim, prirodno očuvanim i kvalitetnim prehrambenim proizvodima koji su u toku proizvodnje, što je moguće manje fizički i hemijski tretirani. Ovaj trend pred proizvođače nameće zadatak da obrate posebnu pažnju na usavršavanje metoda prerade koje produžavaju rok trajanja proizvoda, a koje isključuju veštačke aditive i konzervanse.

Nakon porasta svesti potrošača o negativnom uticaju hemijskih materija koje se dodaju u hranu radi dužeg roka upotrebe i samog kvaliteta pojedinih proizvoda, potrošači

današnjice se sve više okreću namirnicama koje su uzgojene prirodnim putem, proizvedene u skladu sa tradicionalnim spremanjem hrane, i uz to koja nosi epitet prirodne, zdrave hrane. Da bi se omogućilo korišćenje takve, prirodne hrane, a da se pri tome i prati trend dugog roka trajanja i kvaliteta namirnice (prirodni izgled, ukus i aroma), neophodno je unaprediti načine pakovanja i čuvanja hrane. Tradicionalni način pakovanja je ograničen u svojoj sposobnosti da produži rok održivosti hrane. Osnovni princip pakovanja hrane je sledeći – izbegavanje kontaminacije, odlaganje kvara, pojedine enzimske reakcije koje pospešuju mekoću proizvoda, smanjenje gubitka na masi i osiguranje zadržavanja organoleptičkih svojstava namirnice.

Hrana poseduje sklonost ka kvaru i pogoršanju u kvalitativnom smislu, tokom dužeg stajanja, zahvaljujući širokom spektru reakcija, kako fizičkih, tako i hemijskih, enzimskih i mikrobioloških. Različite varijante kvarenja namirnice koja su uzrokovana mikroorganizmima mogu se u velikoj meri sprečiti brojnim tehnikama očuvanja namirnice. Većina tih tehnika deluje tako što sprečava ili usporava rast mikroorganizama (zamrzavanje, hlađenje, sušenje, konzervisanje, vakuum pakovanje, MAP, dodavanje konzervansa, kiseljenje, fermentacije). Nasuprot tome, manji broj tehnika dovodi do deaktivacije i uništavanja mikroorganizama ili njihovog većeg broja (većinom povećanom temperaturom - pasterizacija i sterilizacija). Dopunski vid jeste tehnika ograničenja pristupa mikroorganizama u prehrambeni proizvod (aseptično pakovanje namirnice). Novije tehnike sve više uključuju proces inaktivacije (primena jonizujućeg zračenja, visok hidrostatski pritisak, ultrazvuk u kombinaciji sa toplotom i blago povišenim pritiskom, i pored toga sve više primenjivanje metoda korišćenja bakterioličkih enzima, bakteriocina i drugih prirodnih antimikrobnih sredstava.

Da bi se u proizvodu sačuvale originalne senzorske i nutritivne osobine sirovine, moraju se primeniti znatno blaži tretmani pri njenoj proizvodnji; posebno blaži postupci konzervisanja.

U ovako minimalno tretiranoj hrani po pravilu se ne postiže komercijalna sterilnost pa se, radi produženja njene trajnosti, posebna pažnja mora posvetiti na odabir ambalažnog materijala (nepropusni za gasove i vlagu) i na odabir načina pakovanja.

Pakovanje hrane u modifikovanoj atmosferi praktikuje se intenzivno u Evropi, Kanadi i SAD-u, a od nedavno i u azijskim zemljama. Za neke proizvode je pakovanje u modifikovanoj atmosferi postalo dominantan način pakovanja. Ono je sve zastupljenije kod pakovanja ribe. Potražnja ribe pakovane u modifikovanoj atmosferi je u stalnom porastu. Konzervišuće delovanje gasova primenjenih u pakovanju namirnica se zasniva na njihovoj sposobnosti da onemogućavanjem ili usporavanjem rasta i razmnožavanja mikroorganizama, utiču na zaustavljanje, odnosno usporavanje procesa razlaganja koje prouzrokuju mikroorganizmi ili fizičko-hemijski agensi koji dubinski menjaju proizvod čineći ga nepodobnim za konzumiranje.

Kod pakovanja u vakuumu, uklanjanjem vazduha u ambalaži nepropusnoj za kiseonik, stvaraju se anaerobni/mikroerofilni uslovi, povećava sadržaj CO₂ i smanjuje pH proizvoda. Kiseonik zaostao u ambalaži prelazi u ugljen dioksid zbog respiracije mesnog tkiva i bakterijske aktivnosti. Ovakvi nastali uslovi suzbijaju rast aerobnih bakterija i omogućuju rast fakultativnih anaeroba. Običnim vakuumiranjem produžuje se održivost, ali se namirnice tako isušuju. Zato je pakovanje namirnica u smeši gasova, tj. modifikovanoj atmosferi, ili MAP (*Modified Atmosphere Packaging*) vodeća tehnologija pakovanja 21.veka, koje u osnovi deluje kao vakuum pakovanje, samo što je razlika u tome što se kod vakuum pakovanja unutrašnji milje koji inhibira mikroorganizme razvija u samom pakovanju, dok se kod MAP, smeša gasova inicira, da bi se stvorili isti uslovi.

Modifikovana atmosfera podrazumeva zamenu vazduha u pakovanju sa određenom smešom gasova. Najčešća kombinacija gasova jesu ugljen dioksid, azot i kiseonik. Zastupljenost svake komponente (sadržaj gasa) je fiksna prilikom uvođenja gasa, ali ne podleže naknadnoj kontroli, tokom skladištenja, tako da se zastupljenost gasova tokom skladištenja neizbežno menja. Gasovi se kod pakovanja u modifikovanoj atmosferi

menjaju tokom vremena, zbog reakcije između komponenata u atmosferi i proizvoda i/ili zbog transmisije gasova iz pakovanja kroz filmove za pakovanje. Zato hranu pakovanu u modifikovanoj atmosferi treba posmatrati kao dinamičan sistem u kojem se stalno menja sastav gasova, odnosno odvija se difuzija gasova iz pakovanja.

Da bi se gasovi ispravno upotreбили moraju se dobro poznavati svojstva i uloge zaštitnih gasova, ali i priroda i karakteristike proizvoda koji se pakuje, kao na primer: procenat sadržaja vlažnosti, nivo lipida, boja, pH, i drugo.

Koliko će se pakovanjem u smeši gasova produžiti održivost hrane, zavisi od kvaliteta početne sirovine, higijene tokom proizvodnog procesa, izbora materijala za pakovanje, oprema za pakovanje, pravilnog izbora kao i odnosa gasova. Ipak, najbitniji od svih faktora su pre svega količina ugljen dioksida koja je rastvorena i temperatura čuvanja.

Dimljena riba se najčešće skladišti pri temperaturama od 4 do 6°C, pri čemu održivost zavisi od brojnih činilaca. Smatra se da dimljena riba može da se čuva pri +4°C najviše do 2 meseca, zavisno do vrste ribe i načina pakovanja proizvoda. Dimljena riba se posle završenog dimljenja pakuje najčešće u vakuum i modifikovanu atmosferu, čime se održivost proizvoda produžava.

III - PREGLED LITERATURE

II.1. Uslovi savremenog pakovanja prehrambenih proizvoda

Na svetskom tržištu postoji sve veća potražnja za svežim, prirodno očuvanim i kvalitetnim prehrambenim proizvodima koji su u toku proizvodnje, što je moguće manje fizički i hemijski tretirani. Ovaj trend pred proizvođače nameće zadatak da obrate posebnu pažnju na usavršavanje metoda prerade koje produžavaju rok trajanja proizvoda, a koje isključuju veštačke aditive i konzervanse.

Povećani zahtevi potrošača za proizvodima koji imaju prihvatljivu cenu i adekvatan rok trajanja, kao i sve strožiji zahtevi u odnosu na kvalitet, higijenu i bezbednost hrane koja će biti što lakša za pripremu i spremanje, dovode do toga da proizvođače hrane savremeno društvo stavlja pred zadatak konstantnog razvoja novih tehnika i metoda pakovanja hrane, a da pri tome što manje imaju negativan uticaj na zagađenje životne sredine. Novi trendovi, globalizacija tržišta, doprineli su da se poveća distribucija hrane na velike razdaljine, čime je uslovljen proizvođač da proizvodi prehrambene proizvode sa dužim rokom trajanja i sa manjim rizikom od kvara. Poslednjih decenija hrana je sve opterećenija aditivima i ostalim hemijskim materijama, koji mogu negativno da utiču na zdravlje ljudi (porast slučajeva alergija kod osoba svih uzrasta). Nakon porasta svesti potrošača o negativnom uticaju hemijskih materija koje se dodaju u hranu radi dužeg roka upotrebe i samog kvaliteta pojedinih proizvoda, potrošači današnjice se sve više okreću namirnicama koje su uzgojene prirodnim putem, proizvedene u skladu sa tradicionalnim spremanjem hrane, i uz to koja nosi epitet prirodne, zdrave hrane. Da bi se omogućilo korišćenje takve, prirodne hrane, a da se pri tome i prati trend dugog roka trajanja i kvaliteta namirnice (prirodni izgled, ukus i aroma), neophodno je unaprediti načine pakovanja i čuvanja hrane. Tradicionalni način pakovanja je ograničen u svojoj sposobnosti da produži rok održivosti hrane. Osnovni princip pakovanja hrane je sledeći

– izbegavanje kontaminacije, odlaganje kvara, pojedine enzimske reakcije koje pospešuju mekoću proizvoda, smanjenje gubitka na masi i osiguranje zadržavanja organoleptičkih svojstava namirnice (**Danielli i sar., 2008; Kerry i sar., 2006; Murcia i sar., 2003; Hill, 2003; Vermeiren i sar., 1999**).

Savremen potrošač traži hranu visokog kvaliteta koja je zadržala senzorske karakteristike sirovine od koje je proizvedena, i da je u isto vreme bezbedna po zdravlje (**Bøknæs i sar., 2002**). Da bi se u proizvodnji sačuvala originalne senzorske i nutritivne osobine sirovine, moraju se primeniti znatno blaži tretmani pri njenoj proizvodnji; posebno blaži postupci konzervisanja. Na primer, u termičkim procesima moraju se primenjivati znatno blaži režimi (niže temperature, kraće vreme), ili da se umesto standardnih termičkih postupaka primenjuju drugi postupci kao što su dielektrično zagrevanje, pulsirajuće električno polje, termička obrada u vakuumu, pulsirajuće svetlo. U novije vreme se sve više primenjuje i tehnika konzervisanja preprekama, što znači da se primenjuje serija procesnih prepreka koje prisutni mikroorganizmi ne mogu preći. Te prepreke mogu biti npr. temperatura, aktivnost vode, pH, redoks potencijal, konzervansi i sl. Što je prepreka viša, to je mikroorganizmi mogu teže savladati. Kombinacijom ovih prepreka svaki pojedinačni proces u seriji može se sprovoditi u znatno blažim uslovima nego kada se koristi sam za sebe.

U ovako minimalno tretiranoj hrani po pravilu se ne postiže komercijalna sterilnost pa se, radi produženja njene trajnosti, posebna pažnja mora posvetiti na odabir ambalažnog materijala (nepropusni za gasove i vlagu) i na odabir načina pakovanja. Dalje u tekstu će biti opisani neki od savremenih načina pakovanja namirnica koji u potpunosti zadovoljavaju kriterijume neophodne da bi se namirnica zaštitila od kvara u predviđenom roku upotrebe.

Za prehrambene proizvode najčešće primenjivani načini pakovanja su: pakovanje u modifikovanoj atmosferi, pakovanje u vakuumu i aseptično pakovanje.

Još jedna od funkcija pakovanja hrane je ta što potrošačima olakšava rukovanje namirnicama i nosi sa sobom niz pogodnosti prilikom korišćenja hrane što se odnosi na veličinu pakovanja, lakoću otvaranja i mogućnost ponovnog zatvaranja. Time se omogućava lakša manipulacija hranom (**Cutter Katherine, 2002**).

Kao što je već rečeno, i pored svih ovih predostrožnosti i kvaliteta obavljenih operacija i tehnoloških rešenja u ovim proizvodima se ne postiže komercijalna sterilnost, pa je potrebno obratiti pažnju i na uslove čuvanja - temperaturu skladištenja, relativnu vlažnost vazduha u skladištu i dr.

II.1.2. Načini očuvanja namirnica: prošlost, sadašnjost, budućnost

Hrana poseduje sklonost ka kvaru i pogoršanju u kvalitativnom smislu, tokom dužeg stajanja, zahvaljujući širokom spektru reakcija, kako fizičkih, tako i hemijskih, enzimskih i mikrobioloških. Različite varijante kvarenja namirnica koja su uzrokovana mikroorganizmima mogu se u velikoj meri sprečiti brojnim tehnikama očuvanja namirnica. Većina tih tehnika deluje tako što sprečava ili usporava rast mikroorganizama (zamrzavanje, hlađenje, sušenje, konzervisanje, vakuum pakovanje, MAP, dodavanje konzervansa, kiseljenje, fermentacije). Nasuprot tome, manji broj tehnika dovodi do deaktivacije i uništavanja mikroorganizama ili njihovog većeg broja (većinom povećanom temperaturom - pasterizacija i sterilizacija). Dopunski vid jeste tehnika ograničenja pristupa mikroorganizama u prehrambeni proizvod (aseptično pakovanje namirnica). Novije tehnike sve više uključuju proces inaktivacije (primena jonizujućeg zračenja, visok hidrostatski pritisak, ultrazvuk u kombinaciji sa toplotom i blago povišenim pritiskom, i pored toga sve više primenjivanje metoda korišćenja bakterioličkih enzima, bakteriocina i drugih prirodnih antimikrobnih sredstava (**Gould, 2000**). Glavni trend u svetu potrošača današnjice su potrebe za namirnicama koje su manje „teško“ konzervisane, kvalitetnije, prirodnije, slobodne od aditiva i hemijskih dodataka svake prirode i namene, nutricionistički zdravije, i još uvek sa visokim nivoom mikrobiološke bezbednosti.

Tabela 2.1. Osnovni principi pogoršanja kvaliteta hrane

<i>mikrobiološki</i>	<i>enzimski</i>	<i>hemijski</i>	<i>fizički</i>
Rast ili prisustvo mikroorganizama koji stvaraju toksine	Hidrolitičke reakcije potpomognute lipazama, proteazama, i dr.	Oksidativna užeglost	Gubitak na masi
Rast ili prisustvo infektivnih mikroorganizama	Užeglost izazvana lipooksigenazama	Oksidativne i reduktivne diskoloracije	Gubitak teksture
Rast mikroorganizama koji izazivaju kvar hrane	Enzimsko prebojavanje hrane	Ne-enzimsko prebojavanje	Gubitak senzornih karakteristika
		Razgradnja hranjivih sastojaka	Strukturna oštećenja nastala tokom zamrzavanja proizvoda

II.1.2.1. Glavne trenutne tehnike očuvanja namirnica

Većina tehnika očuvanja namirnica se zasniva na usporavanju ili u ređim slučajevima na potpunom inhibiranju rasta mikroorganizama (**Baranyi and Roberts, 2000**).

Tabela 2.2. Tehnike očuvanja namirnica

<i>Tehnike koje smanjuju ili sprečavaju rast mikroorganizama</i>	
Smanjenje temperature	Čuvanje u frižideru i zamrzivaču
Smanjenje aktivnosti vode a_w	Sušenje, soljenje, konzervisanje dodavanjem šećera
Smanjenje pH	Kiseljenje, fermentacija (dodavanjem sirćetne, limunske kiseline)
Dodatak konzervansa	Neorganski (sulfiti, nitriti), organski (propionat, benzoat, parabeni), bakteriocini (nizin), antimikotici (natamicin)
Uklanjanje kiseonika, Pakovanje u modifikovane atmosfere	Vakuum, MAP pakovanje
Kontrola mikrostrukture	U hrani sa emulzijom voda u ulju
<i>Tehnike koje inaktiviraju mikroorganizme</i>	
Povišena temperatura	Pasterizacija Sterilizacija
<i>Tehnike koje sprečavaju mikroorganizmima pristup namirnici</i>	
Pakovanje Aseptične metode	

Niske temperature

Jedan od važnijih načina konzervisanja hrane je rashlađivanje.

Pored sušenja to je najrasprostranjeniji način konzerviranja hrane.

Osnovni razlog uspešnosti čuvanja namirnica ovim postupkom leži u tome, da na dovoljno niskim temperaturama prestaje aktivnost mikroorganizama, koji su glavni uzrok kvarenja (truljenja) hrane. Ako je temperatura dovoljno niska, dolazi i do prestanka životne aktivnosti nekih mikroorganizama.

Hladnjača je namensko skladište poljoprivrednih proizvoda ili hrane u kome se veštački održava niska temperatura vazduha. Ova temperatura vazduha najčešće je niža od temperature okolnog vazduha.

Osnovni načini rashlađivanja su:

1. Hlađenje i
2. Zamrzavanje

U slučaju hlađenja, temperature vazduha u hladnjači su iznad 0°C, a kod zamrzavanja one su niže. Dakle podela je na bazi temperature kristalisanja (zamrzavanja) vode.

Hlađenje se, uglavnom primenjuje u slučaju kada se želi što duže očuvati sveže voće, povrće i drugi poljoprivredni proizvodi. Temperature vazduha su od 1 - 12°C. Mogući vremenski period za čuvanje namirnica je različit za različite vrste materijala. Na primer, neke vrste voća se mogu čuvati samo nekoliko dana, a neke desetak meseci. Hlađenjem se čuvaju sve voćne vrste, veliki broj različitog povrća, lekovito bilje, gljive, šumski plodovi, kao i poluproizvodi i gotovi prehrambeni proizvodi (mleko, mlečni proizvodi, voćne i povrćne kaše, kolači, sveže meso, polutrajne mesne prerađevine, poslastičarski proizvodi, majonez, kečap, margarin, itd.).

Zamrzavanje se, takođe, koristi za veliki broj različitih poljoprivrednih i prehrambenih namirnica. Temperature vazduha u komori za zamrzavanje mogu da budu nekoliko stepeni Celzijusa ispod nule pa sve do -70°C. Temperatura vazduha u komori zamrzavanja zavisi od vrste namirnice i od planiranog vremena skladištenja.

Za potrebe dužeg skladištenja poljoprivrednih i prehrambenih proizvoda primenjuje se tzv. duboko zamrzavanje, na temperaturama od -20 do -70°C. Pri veoma niskim temperaturama aktivnost mikroorganizama je najmanja ili dolazi do njihovog uginuća.

Prilikom smanjenja temperature hrane (rashlađenje hrane), brojni mikroorganizmi imaju smanjenu stopu rasta. Dve posebno bitne temperature su temperatura od 12°C koja predstavlja donju granicu za rast striktnih anaeroba (*Cl.perfringens* i proteolitičkih sojeva *Cl.botulinum*) i temperatura od 3°C, koja je donja granica za neproteolitičke sojeve *Cl.botulinum*. Do pre nekoliko godina, ova granica je važila kao temperatura na kojoj se više nisu mogli razmnožavati mikroorganizmi koji prouzrokuju trovanje hranom (**Herbert and Sutherland, 2000**). Međutim, danas poznate karakteristike biologije bakterija *Listeria monocytogenes* i *Yersinia enterocolitica*, pobijaju ovu tvrdnju. Ove bakterije mogu rasti i razmnožavati se i na temperaturama nižim od 1°C, tako da određivanje roka trajanja i roka upotrebljivosti igra sve veći značaj u utvrđivanju bezbednosti pojedinih namirnica. Mnogi mikroorganizmi kvara mogu rasti i razmnožavati se i na temperaturama nižim od 0°C, pa čak, mada sporije, i na temperaturi od -7°C. Loše čuvane zamrznute namirnice mogu vrlo sporo da se kvare dejstvom mikroorganizama, mada nisu opasni po zdravlje ljudi, sve do trenutka topljenja namirnice. U mnogim zemljama važi sledeće pravilo - na temperaturi od -18°C, ukoliko je namirnica adekvatno upakovana i čuvana, mikrobiološki rast je potpuno sprečen, osim što se u kvalitativnom pogledu mogu desiti promene uzrokovane enzimskim i hemijskim reakcijama, i fizičkim promenama.

Sa snižavanjem temperature, povećava se rastvorljivost ugljen dioksida, zbog čega je najveća antimikrobna aktivnost ovog gasa izražena pri temperaturama ispod 10°C, a optimalna je na temperaturama nižim od 5°C, odnosno na temperaturama skladištenja (**Siverstvik i sar.2002; Mullan, 2002**). Antimikrobni efekat pri niskim temperaturama, zasniva se na boljoj rastvorljivosti ugljen dioksida, kao i izraženijoj osetljivosti bakterijskih ćelija na dati gas pri niskim temperaturama. Čak 30% namirnica bi trebalo da se čuva pri temperaturama hlađenja u zemljama južne Evrope, a čak 5% hrane u severnoj Evropi (**Devlieghere i sar., 1998; Limbo i sar., 2010; Kennedy i sar., 2005**).

Smanjenje aktivnosti vode a_w

Parametar aktivnosti vode a_w se široko koristi za predviđanje i utvrđivanje stabilnosti hrane, a u korelaciji je sa rastom i razmnožavanjem mikroorganizama, kao i nizom enzimskih i fizičkih promena koje dovode do promena u kvalitativnom smislu same namirnice (**Christian, 2000**).

Vrednosti u opsegu od 1 (čista voda) do nule (bez vode) ekvivalentno je ravnoteži relativne vlažnosti vazduha (ERH) na skali od 100% do 0%.

Ljudi su koristili ovaj princip konzervisanja namirnica od pamtiveka. U praksi prihvaćeni postupci konzervisanja lako kvarljivih namirnica na ovom principu mogu da se podele u 3 grupe i to:

- sušenje, tj. odstranjivanje vode, a da namirnica ostane u čvrstom agregatnom stanju,
- koncentrisanje, tj. odstranjivanje vode u manjem stepenu u odnosu na sušenje. (proizvodi konzervisani koncentrisanjem nalaze u tečnom agregatnom stanju),
- povećanje sadržaja suve materije dodatkom određenih količina supstanci koje vezuju deo slobodne vode, odnosno smanjuju aktivnost vode.

Naravno da je moguće konzervisati namirnicu i kombinacijom ovih postupaka. Konzervisanjem namirnica na ovom principu u praksi je najčešće dovoljno da se postigne $a_w = 0,6 - 0,7$ (RRV = 60 – 70%). Neke namirnice, specifične po sastavu, mikrobiološki se ne kvare iako je brojčana vrednost aktivnosti vode i veća. Za džem je dovoljno da se postigne $a_w = 0,72$, jer istovremeno protiv osmotolerantnih kvasaca deluje i relativno visoka prirodna kiselost.

U nekim slučajevima, da bi se potisla i enzimska aktivnost, potrebno je da se aktivnost vode smanji ispod 0,6. Prema nekim shvatanjima, enzimska aktivnost ne može da se odvija tek ispod $a_w = 0,12$. Često se postizanjem aktivnosti vode ispod 0,6 narušava kvalitet namirnice usled ubrzanja neenzimatskih i drugih autooksidacionih reakcija (neki autori navode da je maksimum Majarove reakcije u području sa $a_w = 0,2-0,3$).

Od bilo kojeg načina konzervisanja koje se zasniva na principu smanjenja aktivnosti vode, sušenje ima najdužu tradiciju. Osušene namirnice su poznate od pamtiveka. To je verovatno najstariji metod konzervisanja namirnica uopšte. Konzervisanje sušenjem neki nazivaju i kseroanabiozom (od grčkog kseros = suv).

Najstariji postupci sušenja namirnica zasnivali su se na korišćenju energije Sunca i vetra. I u današnje vreme ribari zapadne Afrike ribu sole i suše na suncu. Na suncu sušeno voće poznato je vekovima unazad, a praktikuje se i danas gde klimatski uslovi to omogućuju. Toplota koja nije poticala direktno od Sunca, u Americi je počela da se koristi za sušenje 1900. godine. Danas, primenom savremenih uređaja za sušenje, u stvari se oponašaju i poboljšavaju prirodni uslovi sušenja, tj. primenjuje se toplota i strujanje vazduha. Tek negde sredinom prošlog veka, ovaj postupak konzervisanja je podignut na nivo tehnologije. Iako sušenjem može da se konzervišu bilo koja namirnica, najčešće se suši voće i povrće.

U principu, namirnice se suše tako što se voda u vidu vodene pare izdvaja iz namirnica koje se:

- zagrevaju ili
- zamrzavaju u I fazi, a zagrevaju u II fazi (**Zeuthen i sar., 2003**).

Sušenjem se odvaja voda do tog stepena da takva namirnica može godinama da bude zaštićena od kvarenja, plesnivljenja i gubitka ukusa. Pri tome ne sme da se oduzme celokupna količina vode, jer to negativno deluje na gipkost (elastičnost) i na sposobnost za ponovno upijanje vode. Većinu namirnica treba sušiti do onog sadržaja ravnotežne vlažnosti koju namirnica sadrži na 60 – 70% relativne vlažnosti vazduha. Ako je sadržaj vlage niži, a ne postoje uslovi za održavanje relativne vlažnosti koja odgovara toj ravnotežnoj vlažnosti, namirnica treba da se pakuje u ambalažu nepropustljivu za vodenu paru. Ukoliko je sadržaj vlage veći od ravnotežne vlažnosti pri datoj relativnoj vlazi vazduha, namirnica treba da se skladišti na nižim temperaturama ili površinski da se zaštićuje odgovarajućim hemijskim konzervansom (**Koprivica, 2008**).

Niska a_w vrednost namirnica omogućava blaže termičke tretmane namirnica (dovoljna je pastemizacija). Aktivnost vode se retko koristi kao jedini faktor konzervisanja namirnica zbog lošeg uticaja na senzorske osobine namirnica.

Niska a_w vrednost onemogućava razvoj bakterija. Na a_w vrednostima ispod 0,80 mogu se razvijati samo kserofilne plesni i osmofilni kvasci. Za namirnica čija je a_w vrednost ispod 0.60 može se reći da su sterilne.

Za najveći broj namirnica aktivnost vode kreće se između 0,90 i 0,98.

Aktivnost vode u hrani se smanjuje sušenjem ili dodavanjem rastvora kao što su so, šećer, ili kombinacijom ovih tretmana. Malo smanjenje aktivnosti vode (npr. oko 0.97), dovoljno je da sprečava rast nekih bitnih mikroorganizama koji prouzrokuju kvar hrane (*Pseudomonas* koji raste na visokim vrednostima a_w i namirnica mesa koja se izuzetno brzo kvare. Sušenjem mesa, smanjuje se a_w , a samim tim se i mogućnost rasta *Pseudomonas spp.* redukuje.) *S.aureus* je natolerantniji mikroorganizam koji izaziva trovanje hranom, sa niskim a_w od oko 0.86 na vazduhu, ali je zato u anaerobnim uslovima a_w 0.91. Samim tim *S.aureus* može da raste i razmnožava se i stvara enterotoksin u relativno niskim a_w vrednostima, ukoliko su pogodni ostali uslovi (temperatura i vreme skladištenja). Ispod a_w vrednosti od 0.86 raste mali broj bakterija, a posebno nema bakterija koje imaju značaj za zdravlje ljudi. Jedino mikroorganizmi kvare namirnica, kvasci i plesni mogu se sporo razmnožavati na vrednosti a_w od 0.6. Ispod vrednosti nijedan mikroorganizam više ne može da raste i razmnožava se.

Stabilizovana sušena (dehidrirana hrana) ima vrednost a_w oko 0.3, tako da su reakcije lipidne oksidacije i ostale hemijske promene minimalne.

Acidifikacija (kiseljenje)

Pod biološkim konzervisanjem najčešće se podrazumeva konzervišuće delovanje kiseline, a ređe i alkohola, proizvoda nastalih aktivnošću mikroorganizama. Pored proizvodnje poželjnih ukusa, fermentacija može kontrolisati razvoj mikroorganizama. Fermentacijom se kroz anaerobni metabolizam šećera, preko bakterija, stvara kiselina koja smanjuje pH vrednost supstrata, odnosno namirnice. Vrednost pH ispod 5,0 ograničava razvoj mikroorganizama koji izazivaju kvarenje hrane. Pošto se radi o delovanju kiseline, ona prevashodno sprečava nepoželjnu aktivnost bakterija, a pre svega, truležnih bakterija i bakterija buterne kiseline (**Šumić, 2009**).

U prehrambenoj industriji za biološko konzervisanje se najviše koriste bakterije mlečne kiseline (*Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* i *Leuconostoc*). Mlečno kiselinska fermentacija se koristi u preradi mleka, mesa, riba, povrća kao i pri izradi pekarskih proizvoda od kiselog testa. U svim ovim slučajevima praktično se dobija novi proizvod sa karakterističnim ukusom i mirisom, a proizvodi metabolizma bakterija mlečne kiseline inhibiraju delovanje nepoželjne mikroflore.

Hrana koja je ukiseljena treba da se pakuje u hermetički zatvorenu ambalažu kako bi se sprečilo kvarenje aerobnim razvojem kvasaca i plesni.

Većina kvasaca i plesni imaju sposobnost da se razmnožavaju i rastu na izuzetno niskim vrednostima pH (ispod pH 2), tako da oni predstavljaju dominantnu floru kvara zakiseljene hrane. Samo nekoliko vrsta bakterija raste na pH nižem od 3.5 (**Vereš, 2004**) (primer bakterija mlečne kiseline, koje se koriste u prehrambenoj industriji jogurta, sira i salama, gde je neophodna fermentacija).

Za bezbednost hrane važna je pH vrednost 4.5, koja predstavlja granicu, ispod koje se *Cl.botulinum* ne razmnožava.

Ispod pH vrednosti od 4.2 ostale bakterije kvara i prouzrokovajući trovanja hranom se nalaze pod kontrolom. Ipak, sporulirajuća bakterija *Alicyclobacillus acidoterrestris*

sposobna je da raste na pH 2, i samim tim može da dovede do kvara nekih namirnica koje predstavljaju namirnice sa izuzetno niskom vrednošću pH.

Preživljavanje mikroorganizama na niskim pH vrednostima je važno poznavati, bez obzira da li je onemogućeno njihovo razmnožavanje. Na primer, *E.coli* O157 poseduje kiselinsku toleranciju, i moguće je da je prouzrokovala epidemiju trovanja jabukovim nealkoholnim sirćetom u Americi.

Konzervansi

Konzervansi su jedinjenja koja prolongiraju, ili u idealnom slučaju sprečavaju, mikrobiološko kvarenje hrane. Mikrobiološki kontaminirana hrana je rezultat razvoja kvasaca, buđi i bakterija, ali i stvaranja toksina, pogotovo onih koje proizvode bakterije i buđi. Danas je konzerviranje hrane ispred pitanja ekonomskih gubitaka na hrani.

Upotreba konzervansa (tzv. hemijska konzervacija hrane) se nadopunjuje sa fizičkim metodama konzervacije (sterilizacijom i hlađenjem). Ponekad, kombinovana upotreba konzervansa i fizičkih metoda čini mogućim smanjenje bilo intenziteta primene jedne ili druge metode konzerviranja. Tipičan primer predstavlja stvaranje srednje vlažnih, delimično osušenih šljiva, koje su sorbinskim kiselinom zaštićene od razvoja buđi, pri čemu je njihov kvalitet veći nego kod potpuno osušenih proizvoda. Kombinacija fizičkih i hemijskih procesa konzervacije bilo koje vrste se naziva „konceptom prepreke”. Dodavanje konzervansa omogućava produženu zaštitu hrane od naknadnog kvarenja nakon otvaranja pakovanja ili u slučaju da pakovanje nije hermetički zatvoreno (**Bakočević, 2011**).

Postoje tri osnovna tipa konzervansa koji se koriste u hrani (**Jukes, 2012**):

- Antimikrobni konzervansi („konzervansi“ u užem smislu)
 - Antioksidansi
 - Agensi za sprečavanje tamnjenja (antibrowning agents).
-
- Antimikrobni konzervansi ili *konzervansi* (u užem smislu) se koriste za kontrolisanje i sprečavanje rasta mikroorganizama u prehrambenim proizvodima,

i na taj način ostvaruju produžavanje trajnosti brojnih prehrambenih proizvoda. Mnogi od njih se koriste i kao konzervansi u farmaceutskim i kozmetičkim proizvodima. Prema INS i E sistemu numeričkog označavanja aditiva dodeljeni su im INS i E brojevi od 200 – 290.

- Antioksidansi se koriste za sprečavanje oksidacije lipida i/ili vitamina u prehrambenim proizvodima. U sistemu numeričkog označavanja aditiva dodeljeni su im brojevi INS i E brojevi od E300-E324. Osnovna uloga je sprečavanje autooksidacije, koja se ogleda u razvoju užeglosti i neprijatnog mirisa i ukusa hrane. Prema poreklu, antioksidanti mogu biti:

- Prirodne supstance, kao vitamin C (E300) ili vitamin E (E306)

ili

- Sintetskim putem proizvedene hemijske supstance, kao što su butilhidroksianizol (BHA), E320, i butilhidroksitoluen (BHT), E321.

- Sredstva za sprečavanje tamnjenja proizvoda su hemijske supstance koje se koriste za sprečavanje enzimatskog i neenzimatskog tamnjenja prehrambenih proizvoda, naročito za sušeno voće i povrće. Najčešće korišteni aditivi iz ove kategorije su: vitamin C (E 300), limunska kiselina (E 330) i natrijum-sulfit (E 221).

Antimikrobno dejstvo konzervansa se u osnovi može objasniti sledećim fenomenima:

- 1) stupanjem u dejstvo sa genetskom mikrostrukturom protoplasta,
- 2) inhibicijom sinteze proteina,
- 3) inhibicijom enzimске aktivnosti,
- 4) oštećenjem ćelijske membrane, i
- 5) oštećenjem ćelijskog zida.

Supstance koje snižavaju vodeni aktivitet supstrata i na taj način sprečavaju rast mikroba, deluju različito. Pakovanja, omotači, ulje i pojedini gasovi koji se koriste pri pakovanju blokiraju dotok kiseonika u hranu i na taj način sprečavaju rast aerobnih mikroorganizama. Po pravilu, nijedna od ovih supstanci ne ubija mikroorganizme, već ih

u najboljem slučaju oštećuju i time sprečavaju njihovo razmnožavanje. Kada se ukloni uticaj ovih inhibitora, kontaminirani mikrobi ponovo počinju da se razmnožavaju, i proizvod se vremenom kvari. Takođe, konzervansi kao što su sirćetna i mlečna kiselina snižavaju pH hrane i na taj način inhibiraju rast pojedinih mikroorganizama, pogotovo bakterija.

Tabela 2.3. Najčešće korišćeni konzervansi

<i>konzervansi</i>	<i>Vrsta namirnice gde se najčešće primenjuju</i>
Slabe lipofilne organske kiseline i estri	
Sorbati Benzoati Estri benzoata (metil, propil) propionat	Sirevi, dresinzi, sirupi, dugotrajni biskviti Kiseli krastvaci, dresinzi Marinirani proizvodi riba Hleb, biskviti, sir
Dodaci organskih kiselina	
Mlečna, limunska, sirćetna	Majoneze, salate, dresinzi, voćni sokovi i koncentрати
Mineralno kiseli dodaci	
Fosforni, hidrohlorni	Majoneze, pića, voćni sokovi
Neorganski anjoni	
Sulfitni, metabisulfitni nitriti	Sušeno voće, vino, meso (britanske sveže kobasice) Meso
Antibiotici	
Nizin Natamicin (pimaricin)	Sirevi, konzervisana hrana Meko voće, sušeno meso
Dim	
	Meso i riba

Nijedan konzervans nije podjednako efikasan protiv svih mikroorganizama. Većina supstanci koje su danas u upotrebi efikasniji su protiv kvasaca i buđi nego protiv bakterija. Međutim, kombinacija konzervansa ponekad može proširiti spektar aktivnosti, npr. kombinovanu upotrebu supstanci koje su pojedinačno efikasne protiv buđi ili bakterija.

Pored konzervansa u užem smislu, neke supstance imaju određenu važnost kao konzervansi, iako se delimično koriste iz drugih razloga, u vidu začina: natrijum-hlorid, azot, srebro, ozon, vodonik-peroksid, hlor, etanol, saharoza...

Većina konzervansa koji se danas koriste u industriji hrane su kiseline (tabela 2.3.), kao što su slabe lipofilne organske kiseline (sorbati, benzoati, propionati) ili neorganske kiseline (sulfiti, nitriti). Svi konzervansi su mnogo efikasniji na nižim pH vrednostima. Sa mogućim izuzetkom alkil-estara p-hidroksibenzoata (parabeni), nema širokog spektra izbora antimikrobnih konzervansa koji su efektivni na pH bliskim neutralnim vrednostima. Sve proističe iz sposobnosti slabih kiselina i njihove sinergije sa vodoničnim anjonima, jer se na taj način vodonični joni unose u citoplazmu ćelija bakterija i deluju antimikrobno. Sa stanovišta praktičnog očuvanja hrane, razumno je uključiti slabu organsku kiselinu, zakiseliti proizvod toliko da su prihvatljiva organoleptička svojstva namirnice, zatim vakuum pakovanje i smanjenje a_w .

Pakovanje hrane

Istorija pakovanja hrane

Pakovanje hrane ima duboke korene u ljudskoj istoriji, kroz koju je čovek neprekidno unapređivao procese proizvodnje i prerade hrane. Kroz istoriju, ljudi su se konstantno trudili da razvijaju sredstva i načine kojim će zaštititi hranu od dejstva vremena i uticaja okoline. Načini pakovanja su se razvijali kroz vreme. Rani čovek se hranio hranom koju je sakupljao na licu mesta i nije postojala potreba za skladištenjem hrane ili njenom daljom distribucijom. Ipak, tokom vremena, čovek je naučio mnogo efikasnije da lovi, pa je time pronašao i metode da zaštiti hranu od kvarenja. U tu svrhu, prvo je počeo da koristi prirodne posude (drvene, kamene, od tikvi, listova, papirusa, školjki, kože životinja, rogova i mokraćne bešike). Veruje se da je pronalazak i upotreba ovakvih posuda za hranu, doveo do pronalaska posuda od drveta, stakla i keramike, koje su okarakterisale naredni period u ljudskoj istoriji pakovanja hrane.

Pronalasci brojnih amfora, koje datiraju od preko 8000 godine p.n.e., svedoče da su narodi Srednjeg Istoka, koristili posude kako bi zaštitili hranu od uticaja spoljne sredine. Stari Egipćani, oko 3000 godina p.n.e. su primenjivali tehnike grnčarenja, a 2500 godine p.n.e. su Feničani i Sirijci za skladištenje hrane koristili posude od stakla. Sve te nove tehnike su doprinosile povećanju održivosti namirnica, nisu štatile od štetnog uticaja insekata, glodara, vlage, vazduha, bakterija, plesni. Nešto kasnije, Egipćani su pronašli način kako da zaštite hranu u posudama od vazduha, koristeći pri tome pčelinji vosak, med, topljenu mast ili ulje kojima su oblagali hranu u posudama. Počeli su i da koriste zapušače i razne zatvarače napravljene od tkanina i drveta kojima su zatvarali otvore posuda.

U prvom i drugom veku p.n.e., Kinezi su koristili listove dudove kore, kako bi umotali hranu. Rimljani i Stari Grci su oko 600 godina p.n.e. počeli da koriste i prave plutu kao zatvarač posuda u kojima se čuvala hrana. Sledećih sedam vekova se napredovalo u proizvodnji i korišćenju posuda pravljenih od drveta, gline, papira, metala, keramike i stakla (**Cutter, 2002**).

Period nove ere doneo je sa sobom i niz novih otkrića u načinu pakovanja hrane. Oko 1200 godina n.e., proizveden je kalaisani čelični lim, koji je kasnije doveo do razvoja fabričke proizvodnje konzervi. Proces zaštite čelika od korozije kalajem, razvijen je u Bohemiji (područje centralne Evrope) sa osnovnim ciljem da se spreči rđanje šlemova. Ova tehnika je dugo bila čuvana tajna, dok se zahvaljujući Vojvodi od Saksonije nije proširila po Evropi, i stigavši u Ameriku, tehnika je pretrpela modifikacije, čelik je zamenjen gvožđem, i time poboljšan kvalitet proizvoda.

U našem narodu postoji duga tradicija i način očuvanja namirnica bez upotrebe frižidera. Svinjsko pečenje (božićna pečenica) čuva se od Božića do Đurđevdana u posudi prekriveno svinjskom mašću. Na ovaj način se, pored pečenog mesa, čuvaju i dimljene kobasice punjene u tanka svinjska creva, od Božića do žetve pšenice (***Kilibarda i sar., 2009***). Slični postupak poznat je kod Holanđana, još od sredine 18.veka, koji su pečenu govedinu, i meso lososa slagali u kalaisane posude od gvožđa, a potom ih prelivali vrelom mašću. Potvrda značaja bezbednosti pakovanja namirnica u metalne posude je dobijena početkom 19.veka, kada je parižanski kuvar i poslastičar Nicolas Appert otkrio da hrana zatvorena u staklene posude i toplotno obrađena u ključaloj vodi, može da bude održiva duži period. Godinu dana kasnije proizvode se prve limenke, čime se konzervama obezbeđuje bolja hermetičnost (***Cutter, 2002***).

Luj Paster je 1864.godine došao do zaključka da su mikroorganizmi odgovorni za kvar hrane, osetljivi na zagrevanje i sterilizaciju parom i da ih ti primenjeni temperaturni režimi mogu inaktivisati. Tokom 19.veka dolazilo se do saznanja i pronalazaka koji su sve više unapređivali postupke očuvanja hrane. Neki od tih pronalazaka su i Parkesine-ov pronalazak celuloida 1856.godine (preteča današnje plastike), pronalazak zatvarača na navoj za boce i posude, 1895.godine, kao i pronalazak voštanog papira 1890.godine.

Tokom ranih godina dvadesetog veka, inovacije u načinu pakovanja su se odnosile na čvrstinu i fleksibilnost materijala za pakovanje. Prva aluminijumska folija je napravljena početkom dvadesetog veka, a celofan nepropusan za vlagu dvadesetih godina 20.veka. 1929.godine, White je razvio metodu, kojom je omogućio stvaranje vakuuma u posudama

u kojima se drži hrana, uvođenjem kondenzovane vodene pare u prostor ispunjen gasovima, iznad sadržaja hrane upakovane u staklenu ili metalnu ambalažu (**Cornforth i Hunt, 2008**).

Drugi svetski rat je ubrzao razvoj PVC (polivinilhlorida), PVDC (polivinildienhlorida) i polietilena. Pedesetih godina prošlog veka, gume, plastika i adhezivni materijali su postali široko rasprostranjeni i dostupni. Najlon je integrisan u filmove za pakovanje, modifikovane su čelične konzerve u smislu dizajniranja različitih zatvarača, razvijaju se konzerve sa aluminijumskim legurama. Šezdesetih i sedamdesetih godina prošlog veka, najveći napredak u pakovanju hrane bio je razvoj plastičnih tegli, boca, filmova napravljenih od polivinila, polietilena, vinilena, vinilhlorida i najlona. Tih godina, proizvedeni su i jestivi omotači za hranu od sojinih proteina, hitina, celuloze, proteina mleka i skroba, prolamina iz kukuruza. Osamdesetih godina počelo se sa uvođenjem aseptičnih preduslova u proizvodnji, kao i početkom upotrebe fleksibilnih i autoklavabilnih konzervi, apsorbentna gasa, kao i polimera rezistentnih na mikro talase (**Cornforth i Hun, 2008**).

U današnje vreme koriste se različite tehnike pakovanja hrane, koje se konstantno, iz godine u godinu unapređuju i usavršavaju. Prema odredbi Evropske Unije o materijalima i predmetima koji dolaze u dodir sa hranom (Regulation 1935/2004), dopušteno je uvođenje „aktivne“ i „inteligentne“ ambalaže. Pored toga, u Evropskoj Uniji je usvojen Opšti Zakon o Hrani (**General Food Law, 2006**) kojim se daju smernice i obaveze koje imaju za cilj da se omogući praćenje proizvoda od farme do trpeze (**Pacquit i sar., 2007**), čime se dobija daleko veći broj informacija o proizvodu u svakom momentu proizvodnje i distribucije.

Pod pojmom „aktivna“ ambalaža definiše se materijal koji je konstruisan na način da otpušta aktivne komponente u hranu ili ih apsorbuje iz hrane sa ciljem produžavanja roka trajanja ili održavanja i poboljšanja uslova pakovanja. Ovoj vrsti pakovanja pripadaju sistemi pakovanja iz kojih se uklanja kiseonik, sistemi koji apsorbuju i kontrolišu vlagu, sistemi koji generišu ugljen dioksid, sistemi koji generišu etanol, sistemi koji inkorporišu

antimikrobne supstance (**Radetić i sar., 2007**). Jedan takav primer pakovanja jeste pakovanje hladno dimljene ribe u smeši gasova u kojem je umetnut sistem koji omogućuje apsorbovanje i neutraliziranje trimetilamina, čime se održivost proizvoda produžava za deset dana (**Franzetti i sar., 2001**). Aktivna ambalaža stalno menja propusnost zbog koncentracije različitih isparljivih supstanci odnosno gasova u vazдушnom prostoru pakovanja iznad samog sadržaja ili zbog dodataka antimikrobnih supstanci, antioksidanata ili drugih supstanci koje održavaju dobar kvalitet proizvoda tokom skladištenja. Takva ambalaža naziva se još i interaktivna budući da dolazi u aktivnu interakciju s hranom. Cilj aktivnog, odnosno interaktivnog pakovanja je obezbeđivanje uslova za produženom trajnošću hrane tokom skladištenja. Za aktivno pakovanje koriste se sredstva za uklanjanje kiseonika, apsorpciju ili razvijanje ugljen-dioksida, izračivanje etanola, apsorpciju etilena i apsorpciju vlage (**Cuq i sar., 1995, Nemet, 2009**).

Pod „inteligentnom“ ambalažom se podrazumeva korišćenje materijala koji dolaze u kontakt sa hranom i koji ujedno ukazuje na stanje upakovane hrane, daje informacije o svežini, odnosno kvalitetu proizvoda, a da pri tome nije neophodno otvaranje ambalaže da bi se proverio kvalitet. Inteligentna ambalaža sadrži pokazatelje vremena i temperature koji se nalaze na površini ambalaže. Postoji i mogućnost ispitivanja prisustva i kontrolisanja neželjenih mikroorganizama, pa se sve češće ovakva pakovanja nazivaju „pakovanjima koja osećaju i informišu“ (**McMillin, 2008**).

Više reči o „aktivnoj“ i „inteligentnoj“ ambalaži biće kasnije.

Vakuum pakovanje i pakovanje u modifikovane atmosfere (MAP)

Da bi se u proizvodnji sačuvala originalne senzorske i nutritivne osobine sirovine, moraju se primeniti znatno blaži tretmani pri njenoj proizvodnji, posebno blaži postupci konzervisanja. Za prehrambene proizvode najčešće primenjivani načini pakovanja su: pakovanje u modifikovanoj atmosferi, pakovanje u vakuumu i aseptično pakovanje. Pored svih predostrožnosti i kvaliteta obavljenih operacija i tehnoloških rešenja u ovim proizvodima se ne postiže komercijalna sterilnost, pa je potrebno obratiti pažnju i na uslove čuvanja (temperatura skladištenja, relativna vlažnost vazduha u skladištu, i dr.) **(Herbert i Sutherland, 2000., Olsen, 2003., Ward, 2001.)**.

Veliki broj prehrambenih proizvoda potrebno je očuvati od uticaja kiseonika tokom skladištenja, što se može provesti na tri načina: eliminisanjem vazduha iz ambalažne jedinice, zamenom zaostalog vazduha u ambalaži inertnim gasom (najčešće azotom) ili pakovanjem u modifikovanoj atmosferi (MAP).

Efikasnost vakuum i MAP pakovanja proizilaze, pre svega iz procesa uklanjanja kiseonika, sa posledičnom inhibicijom rasta strogo aerobnih mikroorganizama. Fermentativni mikroorganizmi nastavljaju da se razmnožavaju, ali oni to rade daleko sporije, a za neke vrste namirnica i sa manjim posledicama po kvalitet hrane **(Molin, 2000)**. Posebna pažnja je data mogućnosti podsticanja rasta striktno anaerobnih mikroorganizama koji dovode do trovanja hranom (*Cl.botulinum*) **(Notermans et al, 1990)**.

Tehnologija pakovanja u modifikovanoj atmosferi sastoji se u primeni gasova prilikom pakovanja različitih proizvoda u cilju održanja kvaliteta od proizvođača do potrošača.

Pakovanjem životnih namirnica u vakuum i modifikovanoj atmosferi ostvaruju se sledeće prednosti:

- povećanje veka trajanja upakovanih proizvoda,

- povećanje efikasnosti proizvodnje i distribucije i smanjenje troškova,
- povećanje prodaje proizvoda koji zadovoljavaju sve strožije zahteve potrošača za prirodnim očuvanjem kvaliteta hrane, bez aditiva i konzervanasa;
- povećanje ukupne prodaje jer se ovako upakovani proizvodi mogu ponuditi novim tržištima,
- jača ambalaža - veća fleksibilnost pakovanja i distribucije,
- bolji izgled.

Ugljen dioksid se široko koristi u MAP hrani, jer je specifičan antimikrobni efekat kojim deluje kao konzervans. Većina marketa pakuje meso u mešavinu gasa koja sadrži 70% O₂ i 30% CO₂, čime se održava meso u jarko crvenoj boji (oksimioglobin), koje potrošači vole, a CO₂ usporava rast Gram negativnih bakterija koje izazivaju kvarenje, čime se produžava dvostruko koristan vek trajanja namirnice.

Vakuumsko pakovanje

Vakuumsko pakovanje je način pakovanja koji uklanja vazduh iz pakovanja pre zavarivanja (zatvaranja). Ona može da uključi i krute i fleksibilne vrste ambalaže. Namera i cilj je da se ukloni kiseonik iz kontejnera čime će se produžiti rok trajanja namirnice, a sa fleksibilnom formom paketa i da se smanji obim sadržaja same ambalažne jedinice.

Vakuumsko okruženje smanjuje prisustvo atmosferskog kiseonika, čime se ograničava rast aerobnih bakterija i gljivica, i sprečava isparavanje isparljivih komponenti. Vakuumsko pakovanje se obično koristi za dugoročno skladištenje suve hrane, kao što su žitarice, koštunjavo voće, meso i mesne prerađevine, sir, dimljena riba, kafa, čips i dr.. Takođe, svoju namenu je našlo i u pakovanju povrća. Pakovanje mesa pod vakuumom je alternativa pakovanju svežeg mesa, pogodna za čuvanje proizvoda i do tri nedelje. Kod pakovanja vakuumom, uklanjanjem vazduha u ambalaži nepropusnoj za kiseonik, stvaraju se anaerobni/mikroaerofilni eko sistemi. Kiseonik zaostao u ambalaži prelazi u ugljen dioksid zbog respiracije mesnog tkiva i bakterijske aktivnosti. Stvoreni anaerobni

uslovi i inhibirajuće dejstvo CO₂ suzbijaju rast bakterija *Pseudomonas* i *Achromobacter* vrste i omogućuju rast fakultativnih anaeroba poput *Lactobacillus* i *Leuconostoc* vrsta (Vereš, 2004).

Pogodan ambalažni materijal u tom slučaju je poli-viniliden-hlorid (PVDC), koji osigurava nisku propustljivost kiseonika i prijanja uz sam proizvod tako da se i veliki komadi mesa mogu očuvati sveži i do 21 dan, uz minimalan gubitak vlage. Nadalje, koriste se i laminati kao što su: celofan/polietilen, poliester/polietilen ili poli-amid/polietilen niske gustine. Postoji više načina vakuum pakovanja namirnica. Jedan od načina je da se najpre sprovede eliminisanje vazduha, a zatim punjenje proizvodom i zavarivanje unutar vakuumske komore. Drugi način evakuacije vazduha može se provesti upotrebom vakuumskih dizni, kao što je slučaj kod pakerica s vertikalnim oblikovanjem vrećica. Taj tip vakuumiranja ograničen je na granulisane proizvode budući da kod praškastih proizvoda može doći do uklanjanja dela proizvoda tokom izvlačenja vazduha iz oblikovane ambalaže.

Jednkomorne vakuum mašine zahtevaju da se ceo sadržaj koji se pakuje stavi u mašinu. Uobičajeno se koristi plastična kesa za pakovanje. Kada se proizvod stavi u mašinu, poklopac se zatvara i vazduh se uklanja. Potom, toplotni pečat unutar komore zavaruje ivice plastične kese. Ovim mašinama se najčešće pakuju manje i srednje veličine pakovanja, kao i tečni sadržaji (Yam, 2009; Soroka, 2012).



Slika 2.1. Jednkomorna vakuum mašina

Dvokomorne vakuum mašine zahtevaju da se ceo sadržaj koji se pakuje stavi u kesu unutar mašine. Kad je sadržaj unutar mašine, poklopac se zatvara, vazduh sa uklanja. Ovakav vid mašina se najčešće koristi za pakovanje mesa, mesnih preradevina i sireva (tvrdih i mekih), slatkiša i čokolada.



Slika 2.2. Dvokomorna vakuum mašina

Automatska linija vakuum mašina zahteva da proizvod prolazi pokretnom trakom, automatski se postavlja na mesto gde se vrši zavarivanje pakovanja i uklanja se vazduh. Ovakav vid pakovanja koristi se kod pakovanja velikih količina proizvoda, i najčešće se koristi za pakovanja svežeg mesa (velike količine), prerađenog mesa i velikih količina kobasica i sireva.



Slika 2.3. Automatska linija vakuum mašina

Termoformirajuće vakuum pakirajuće mašine služe za pakovanje proizvoda koji se pune u termoformirane džepove. Termo-plastika koja služi za pakovanje može biti prilagođena veličini, obliku proizvoda, kao i da se uređuje boja i providnost materijala pakovanja prema potrebama proizvoda. Ovakva vrsta pakovanja se najčešće koristi za sveže i

marinirano meso, kobasice, sireve, slatkiše, čokolade, zrnevlja, musli, farmaceutske i medicinske proizvode, i dr.



Slika 2.4. Termo-forming vakuum mašina

Pakovanje u modifikovanoj atmosferi

Pakovanje životnih namirnica u modifikovanoj atmosferi (MAP) je poseban tretman već gotovih proizvoda koji štiti od oksidacije namirnica koje sadrže masti i aromatične materije, održava svežinu namirnica, obezbeđuje duži rok trajanja proizvoda bez promene boje (**Stohr i sar., 2001.**). Tehnologija pakovanja u modifikovanoj atmosferi sastoji se u primeni gasova prilikom pakovanja različitih proizvoda u cilju održanja kvaliteta od proizvođača do potrošača.

Pakovanjem životnih namirnica u modifikovanoj atmosferi ostvaruju se sledeće prednosti:

- povećanje veka trajanja upakovanih proizvoda,
- povećanje efikasnosti proizvodnje i distribucije i smanjenje troškova,
- povećanje prodaje proizvoda koji zadovoljavaju sve strožije zahteve potrošača za prirodnim očuvanjem kvaliteta hrane, bez aditiva i konzervanasa;
- povećanje ukupne prodaje jer se ovako upakovani proizvodi mogu ponuditi novim tržištima,
- jača ambalaža - veća fleksibilnost pakovanja i distribucije,
- bolji izgled.

Tabela 2.4. Razlike u procenjenom veku trajanja različitih vrsta namirnica, upakovanih u vazduhu i MAP (* - čuvanje u hladnom režimu, " - čuvanje na sobnoj temperaturi)

<i>proizvod</i>	<i>pakovanje sa vazduhom (dani)</i>	<i>MAP (dani)</i>
govedina*	4	12
svinjetina*	4	9
piletina*	6	18
kuvano meso*	7	28
riblje meso*	2	10
hleb"	7	21
kafa"	3	548 (18 meseci)

Pošto je svrha pakovanja u modifikovanoj atmosferi povećanje roka trajanja proizvoda, delovanje gasova se posmatra u pogledu njihove sposobnosti da onemogućavanjem ili usporavanjem, utiču na zaustavljanje procesa raspadanja koje prouzrokuju mikroorganizmi ili fizičko hemijski agensi koji dubinski menjaju proizvod čineći ga nepodobnim za konzumiranje (**Ahvenainen, 2000**).

Da bi se gasovi ispravno upotreбили moraju se dobro poznavati svojstva i uloge zaštitnih gasova ali i priroda i karakteristike proizvoda koji se pakuje, kao na primer: procenat sadržaja vlažnosti, nivo lipida, boja, pH itd.

Poznato je da veće koncentracije ugljen dioksida u pakovanju, uspešnije utiču na održivost ribe. Ipak, visoke koncentracije ugljen dioksida bi prilikom pakovanja ribe i ribljih proizvoda trebalo izbegavati, iz razloga što se CO₂ rastvara u soku ribljeg mesa i deformiše pakovanje. Sa snižavanjem temperature skladištenja upakovane ribe povećava se rastvorljivost ugljen dioksida, a optimalna je temperatura niža od 5°C (**Rotabakk i sar., 2008**). Antimikrobni efekat pri niskim temperaturama ne može se pripisati samo boljoj rastvorljivosti ugljen dioksida, već i izraženijoj osetljivosti bakterijskih ćelija na CO₂ pri niskim temperaturama.

Svi gasovi koji se koriste u prehrambenoj industriji nalaze se na pozitivnoj listi aditiva-gasova čiji se kvalitet proverava i ima deklaraciju po Pravilniku o kvalitetu i drugim

zahtevima za aditive i njihove mešavine za prehrambene proizvode (Sl. List SRJ, br. 32/2001).

Ovaj način pakovanja našao je svoju primenu kod skoro svih relevantnih životnih namirnica. Pored već navedenih prednosti, treba naglasiti da se proizvodi pakovani u MAP-u mnogo lakše otvaraju bez upotrebe makaza i noža.

MAP u principu ima za cilj da eliminiše ili umanja nivo kiseonika (osim u posebnim slučajevima, kao što je pakovanje crvenog mesa, ili da se spreči razvoj anaerobnih bakterija) i da poveća koncentraciju CO₂ do 20% ili više, da bi onemogućili razvoj bakterija i plesni. Ukoliko je potrebno, ravnoteža modifikovane atmosfere uspostavlja se azotom, npr. ukoliko ugljen dioksid ima tendenciju da se rastvori u proizvodu, uzrokujući tako oštećenja na pakovanju (***Bøknæs i sar., 2002.***).

MAP uglavnom zahteva mešavinu najmanje dva gasa, a optimalne proporcije variraju u zavisnosti od proizvoda. Svaki od gasova u smeši zadržava svoje osobine, na osnovu kojih je i primenjen za MAP.

Poreklo MAP-a

U principu, pakovanje hrane u modifikovane atmosfere je dobro poznat i dokazan metod očuvanja namirnice. U početku su azot i ugljen dioksid korišćeni kao pojedinačni gasovi u proizvodnji i pakovanju kafe i sira, radi bolje održivosti kvaliteta proizvoda.

Godine 1976. u saradnji sa vodećim danskim proizvođačima mesnih proizvoda, kompanije Multivac i Witt-Gasetechnik su razvile prvo pakovanje svežeg crvenog mesa u mešavini gasova. Mešavina je sadržala kiseonik, ugljeni dioksid i azot. Rok trajanja tako upakovanog mesa je iznosio 6-8 dana, a i organoleptički izgled je takođe bio zadovoljavajući, a proizvod i dalje crvene boje i svežeg izgleda.

Tokom daljih ispitivanja, u Nemačkoj je iskorišćen gas-mikser, koji je primarno proizveden za potrebe metalne industrije, modifikovan za potrebe pakovanja hrane u

MAP. Vremenom, sve je više podataka doprinelo još bržem i naprednijem razvoju ove grane proizvodnje životnih namirnica (**Martinez i sar., 2006**). U međuvremenu, Witt-Gasetechnik je postao najznačajniji proizvođač MAP mešavine gasova u Evropi.

Princip pakovanja u modifikovane atmosfere (MAP) jeste da se zameni normalna atmosfera mešavinom gasova koji će omogućiti dužu održivost kvaliteta životnih namirnica (**Hovda i sar.,2007, Hoover, 2000, Stohr i sar., 2001**). Najčešće korišćeni gasovi su azot, ugljen dioksid i kiseonik. Pored ovih, koriste se i argon, ugljen monoksid, helijum i drugi gasovi koji se definišu kao dozvoljeni za korišćenje u MAP po evropskim standardima. Korišćenje odabranih gasova zavisi od zahteva koje određena namirnica nameće pri proizvodnji i pakovanju (**Arashisar i sar., 2004, Sivertsvik i sar., 2002, Stamatis i Arkoudelos, 2006**).

Vakuum pakovanja su bila prva korišćena pakovanja modifikovane atmosfere, koja su upotrebljavana u komercijalne svrhe, i do danas se i dalje učestalo koriste i primenjuju, posebno za proizvode sveže isečenog crvenog mesa, suhomesnate proizvode, tvrde sireve i mlevenu kafu. Ova vrsta pakovanja nije pogodna za namirnice meke konzistencije i pekarske proizvode, jer dovodi do nepovratne deformacije proizvoda.

Postizanje željene atmosfere pakovanja je moguće na dva osnovna načina:

- pasivno – mehanička zamena vazduha gasom ili mešavinom gasova u okviru pakovanja (pakovanje voća i povrća)
- aktivno – korišćenjem pogodnog modifikatora ambijenta (npr. Absorbent kiseonika)

Mehanička zamena vazduha

Mehanička zamena vazduha u pakovanju može se izvršiti na dva različita načina, ispiranje gasa i kompenzacija vakuumom.

Proces ispiranja gasa predstavlja kontinuiran tok gasa koji se ubacuje u pakovanje kako bi zamenio postojeći vazduh. Na taj način se razređuje vazduh u prostoru oko namirnice

u pakovanju. Kada je većina vazduha zamenjena, pakovanje se zapečati. Najčešći nivo rezidualnog kiseonika iznosi 2-5%. Prema tome, tehnika gasnog ispiranja nije pogodna za pakovanja veoma osetljivih namirnica na kiseonik. Ispiranje sa gasom azota je učestalo u uobičajenoj industrijskoj praksi kako bi se produžio vek trajanja napitaka, sokova i voćnih sokova.

Voće i povrće nastavlja sa procesom respiracije i nakon branja, koristeći kiseonik i stvarajući ugljen dioksid i vodenu paru. Modifikovana atmosfera sa 2-5% kiseonika i 3-8% ugljen dioksida odlaže sazrevanje i omekšavanje povrća, smanjuje razgradnju hlorofila, mikrobijalni kvar i enzimsko prebojavanje.

Gasovi koji se koriste za pakovanje u modifikovane atmosfere

Prvobitno korišćeni gasovi su kiseonik, ugljen dioksid i azot. Ugljen monoksid se koristi sve manje u MAP, za razliku od sumpor dioksida i njegovog uobičajenog korišćenja.

Redukcijom kiseonika u pakovanju smanjuje reakcije oksidacije, kao što su užeglost masti u mesu, ribi, pripremljenoj i termički obrađenoj hrani, koja rezultuju neprijatnim mirisom i ukusom ili pojavom promene boje na površinama namirnica.

Azot

Azot je zbog svoje velike hemijske inertnosti izuzetno pogodan gas za pakovanje namirnica. Upravo zbog ovakvih osobina azot je danas najčešće primenjivani gas za pakovanje namirnica u modifikovanoj atmosferi i javlja se u skoro svim kombinacijama MAP-a. Pored svojih povoljnih fizičko-hemijskih osobina, azot je i veoma jeftin, što je još jedan od presudnih faktora koji daju prednost azotu u odnosu na druge gasove.

Hemijska inertnost atmosfere azota sprečava mnoge neželjene hemijske promene namirnica: oksidaciju i užeglost. Takođe, zamenom kiseonika azotom sprečava se ili znatno smanjuje i mogućnost biološkog kvara namirnica: razmnožavanje plesni, bakterija i napadi insekata.

Kao što je već pomenuto, izbor sastava modifikovane atmosfere gasova za pakovanje u mnogome zavisi od hemijskog sastava i osobina same namirnice. U namirnicama koje sadrže znatan procenat masti često se koristi čist azot. Tako je atmosfera čistog azota naročito pogodna za koštuničavo voće, termički obrađena mesa, odnosno mesne preradevine, hranu za bebe, čips, kafu. Azot zamenjuje ugljen dioksid u pakovanjima koja sadrže proizvode koji lako postaju kiselkasti, kao što su na primer krem-sirevi (**Ahvenainen, 2000**).

Ugljen dioksid

Pored azota ugljen dioksid je najčešće korišćeni gas kojim se zamenjuje kiseonik iz atmosfere pakovanja proizvoda. Lako se rastvara u tečnosti i mastima proizvoda. Usporava razvoj mikroorganizama, bakterija i pojavu plesni i na taj način povećava rok trajanja namirnica. Bakteriostatski efekat CO₂ optimalan je na temperaturama nižim od 5°C.

Ugljen dioksid je nezaobilazan zaštitni gas kod pakovanja mesa i mesnih preradevina, jer je veoma efikasan u sprečavanju razvoja *Pseudomonas pp.*, mikroorganizma koji je najčešći uzročnik kvara ohlađenog mesa. Ugljen dioksid delimično inhibira Gram-negativne, aerobne bakterije koje izazivaju kvar namirnica. Takođe, ugljen dioksid se široko primenjuje i kod pakovanja ribe i morskih plodova, gde opet ima bakteriostatsku funkciju. Da bi se sprečilo kvarenje pekarskih proizvoda usled razmnožavanja plesni koristi se atmosfera u kojoj koncentracija CO₂ u MAP-u mora biti preko 20%. Takođe, i kod pakovanja sireva razvoj plesni sprečava se ugljen dioksidom (**Ahvenainen, 2000**). Gas smanjuje respiraciju u voću i povrću.

Kiseonik

Kada pričamo o modifikovanoj atmosferi gasova za pakovanje namirnica uglavnom mislimo na atmosferu u kojoj je smanjena koncentracija kiseonika. Kiseonik je generalno nepoželjan prilikom pakovanja jer podstiče razvoj mikroflora i ima veliki reakcioni potencijal. Zbog velikog oksidacionog potencijala prisustvo kiseonika je često uzrok

neželjenih hemijskih promena namirnica, među prvima oksidacije vitamina i lipida. Ovo dovodi do gubljenja hranljive vrednosti namirnice, ali i promene boje i pojave neprijatnog mirisa namirnice što se veoma nepovoljno odražava na senzorske osobine proizvoda i njegovu privlačnost kupcu. Poznato je da je za većinu mikroorganizama uzročnika kvara namirnica neophodan kiseonik za život tako da odsustvo kiseonika iz pakovanja namirnice znatno umanjuje mogućnost njenog mikrobiološkog kvara (**Ahvenainen, 2000**).

Ipak, nije u svim slučajevima poželjno odsustvo kiseonika iz pakovanja namirnice. Recimo, prisustvo kiseonika je neophodno da bi se očuvala lepa crvena boja svežeg mesa, ili kod mlečnih proizvoda je prisustvo kiseonika neophodno da bi se omogućio razvoj mikroorganizma dodate kulture i sprečio rast nepoželjnih anaerobnih mikroorganizama.

Dakle, poželjnost kiseonika u modifikovanoj atmosferi zavisi od hemijskog sastava namirnice i funkcionalnih svojstava dodatih kultura mikroorganizama kod fermentisanih proizvoda. Kod suhomesnatih proizvoda prisustvo kiseonika je štetno i dozvoljeno je do 0,5% u MAP-u, kako ne bi došlo do promene boje i užegnuća masti. Kod posnih riba prisustvo kiseonika obezbeđuje očuvanje lepe prirodne boje, dok je u pakovanju masnih riba njegovo prisustvo nepoželjno, opet zbog problema oksidacionih promena masti (**Gimenez i sar., 2002.**). Kiseonik je zabranjen u MAP-u u pekarskoj industriji.

U nekim slučajevima tačno određena količina kiseonika daje adekvatne pozitivne rezultate:

1. održava prirodnu boju lako kvarljivih namirnica (efekat svežine proizvoda)
2. omogućava proces respiracije (posebno kod voća i povrća)
3. inhibira rast anaerobnih mikroorganizama u mesu ribe i povrću.

Potrebno je napraviti poseban osvrt na karakteristike pakovanja voća i povrća i njihovih proizvoda u modifikovanoj atmosferi, jer je u ovom slučaju primena modifikovane atmosfere znatno složenija. Složenost ove problematike sastoji se u tome što za razliku od drugih namirnica, voće i povrće „diše“ i nakon branja. Prirodna posledica „disanja“ je

smanjenje količine kiseonika i povećanje količine ugljen dioksida u zatvorenom pakovanju. Kada se koncentracija kiseonika dovoljno smanji ili koncentracija ugljen dioksida suviše naraste, stvaraju se uslovi za anaerobno disanje, čime u proizvodu nastaju nepoželjni produkti nepotpune oksidacije. Primenom modifikovane atmosfere gasova cilj je da se uspori metabolizam namirnice kako bi se produžio rok upotrebe. Posledica ove dve činjenice je složen zadatak koji se postavlja pred tehnologa. Potrebno je obezbediti disanje sirovine i ne dozvoliti anaerobno disanje. Rešenje se nalazi traženjem balansa između ova dva zahteva. Pre svega za MAP treba koristiti voće i povrće najboljeg početnog kvaliteta. Pored ovoga, temperatura i pravi izbor materijala za pakovanje su, uz izbor modifikovane atmosfere, od odlučujućeg značaja za proces skladištenja i pakovanja ovih namirnica. Pri izboru gasova za MAP, treba nastojati da koncentracija O₂ bude veća od 1%, a koncentracija CO₂ manja od 20%. Koncentracije gasova se kreću u granicama 3 – 10% O₂, 3 – 10% CO₂ i 80 – 90% N₂.

Ovaj problem znatno je manje izražen kod suvog voća i povrća, jer su kod ovakvog proizvoda znatno manje izraženi biološki procesi. Ipak, iz već navedenih prednosti pakovanja u modifikovanoj atmosferi ova grupa proizvoda se veoma često pakuje na ovakav način. Modifikovana atmosfera sastoji se od azota i ugljen dioksida (**Ahvenainen, 2000**).

Koštunjavo voće (kikiriki, badem, lešnik) se takođe pakuje u modifikovanoj atmosferi kako bi se zadržala svežina i sprečila pojava užegnuća usled oksidacije masti na vazduhu.

I gazirana pića (mineralne vode, sokovi) primenjuju MAP, ali na jedan indirektan način, jer samim gaziranjem tečnosti ugljen dioksidom ona bivaju upakovana u modifikovanu atmosferu i na taj način zaštićena.

Tabela 2.5. Primenjena smeša gasova za MAP za pojedine proizvode.

<i>proizvod</i>	<i>CO2</i> (%)	<i>N2</i> (%)	<i>O2</i> (%)
Crveno meso	30	-	70
Svinjska šnicla	20	30	50
Govedina	20	-	80
Meso divljači	30	70	-
Piletina	30	50	20
Tvrđi sir	20	80	-
Riba	40	30	30
Pastrmka	15	65	20
Riba list	40	30	30
Sveža testenina	50	50	-
Ispēčene rolne	70	30	-
Pica	70	30	-
Obradene rolnice mesa	30	70	-
Kuvana šunka u listovima	40	60	-
Pečena kobasica	30	70	-
Voće i povrće	5	90	5
Salate pripremljene za jelo	30	50	20

Negazirana pića (flaširane vode, voćni sokovi, ledeni čajevi) ukapavanjem samo jedne kapi tečnog azota u proizvod pre zatvaranja ambalaže postaju zaštićena od oksidacije i razvoja bakterija, a ambalaža je ukrućena i postojanija usled ekspanzije azota. To je tzv. LIN injektiranje.

Ugljen monoksid

Ugljen monoksid je vrlo efektivan u održavanju crvene boje svežeg mesa kroz proces formiranja karboksimioglobina. Ovaj gas nije bio komercijalno korišćen u ove svrhe zbog svojih svojstava (visoko toksičan gas i eksplozivan u koncentraciji od 12.5 do 74.2%), jer nije odobreno njegovo korišćenje od strane regulatornih vlasti zbog moguće opasnosti po zdravlje radnika koji rade na pakovanju namirnica. Najčešće korišćenje ovog gasa bilo je za pakovanje salata kako bi se sprečilo nepoželjno prebojavanje proizvoda.

Ugljen monoksid je pogodan protiv mnogih bakterija, kvasaca i plesni u niskim koncentracijama (1%).

Sumpor dioksid

Sumpor dioksid je anti-mikrobijalni agens u obliku nevezanog nejonizovanog molekula i najefektivniji je pri vrednostima pH ispod 4. Korišćen je radi kontrole rasta plesni i bakterija, u većini pakovanja voća meke konzistencije (posebno za grožđe) i sušenog voća. Koristan je u kontroli mikrobijalnog rasta u voćnim sokovima, vinu, pakovanjima škampa, kiselih krastavaca i nekih kobasica. Selektivan je u efektu toksičnosti. U niskim koncentracijama (25ppm) je fungicidan, a pri vrednostima koncentracije od 1-2 ppm je bakteriostatik.

Značajniji je njegov efekat protiv Gram-negativnih bakterija štapićastog oblika (*Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*), nego kod Gram-pozitivnih štapića (laktobacili).

Tipovi mašina za MAP pakovanja

Materijali koji se koriste za MAP pakovanje su od odlučujuće važnosti za kvalitet hrane i vek trajanja. Kombinacija različitih plastičnih materijala se bira tako da se postigne:

- mehanička jačina – granica za vodenu paru (da bi se sprečio gubitak težine i dehidratacije),
- gasna barijera,
- propustljivost gasa,
- osobine protiv maglenja,
- dobra zaptivenost.

Od plastičnih filmova koji se uobičajeno koriste u MAP nabrojani su sledeći: LDPE, LLDPE, HDPE, OPP, COPP, vinilski polimeri (EVA), polivinil hlorid (PVC), kao i polimeri stirena, poliamidi i poliestri.

Karakteristike film materijala su brojne, neke od njih su izuzetno bitne za sam proizvod koji se pakira i njegovu održivost. Zahteva se od većine materijala da imaju sledeće osobine:

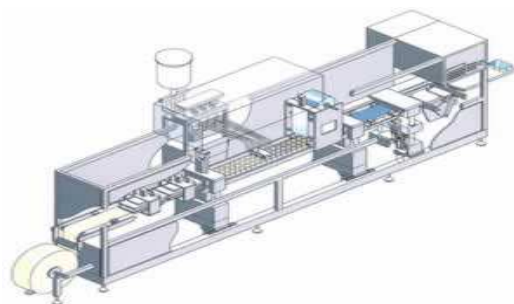
- propustljivost za atmosferske gasove (ugljen dioksid, kiseonik i azot)
- propustljivost za vodenu paru
- sposobnost dobre zaptivenosti (plombiranja)
- osobina održavanje temperature
- sposobnost promene oblika od ravnog prema ispupčenom, prilikom pakovanja namirnice
- otporno na udarce i oštećenja
- jasno vidljivo kroz pakovanje
- osobine sprečavanja magljenja na materijalu pakovanja
- prihvatljiva cena
- sposobnost sendvič-printa na površini proizvoda
- mogućnost kodiranja ili lepljenja nalepnica

Mašine za pakovanje, bez obzira na vrstu, imaju utvrđeni red operacija prilikom pakovanja:

1. pravi se paket i puni se proizvodom,
2. vazduh u paketu se zamenjuje modifikovanom atmosferom,
3. paket se zaptiva.

Prilikom zamene vazduha u paketu modifikovanom atmosferom, uobičajena praksa je da se prvo ambalažna jedinica kontinualno ispira MAP – gasom (smešom) kojim se vazduh „razblažuje“ dok se potpuno ne istisne. Tek tada se paket hermetički zatvara. Brzina pakovanja je velika jer je ovakav način razblaživanja kontinualan (**Ahvenainen, 2000**).

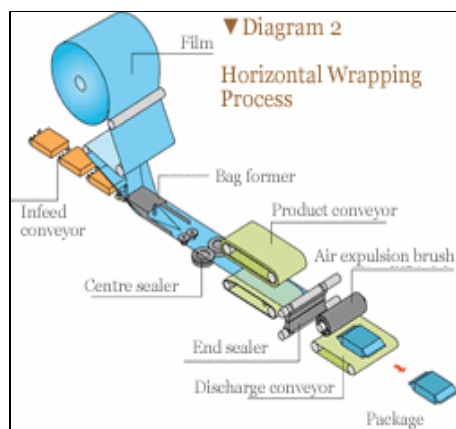
U vakuumskom procesu, vazduh se vadi iz paketa i u dobijeni vakum se injektira željena gasna smeša. Kako je ovo dvostepeni proces brzina pakovanja je manja nego kod metoda ispiranja gasom. Efikasnost ovog procesa u odnosu na količinu zaostalog kiseonika je bolja od one kod slučaja ispiranja gasom.



Slika 2.5. Termo-forming mašina za MAP pakovanja

Glavni tipovi mašina za pakovanje:

1. mašina za pakovanje sa horizontalnim tokom (horizontal flow-pack) za pekarske proizvode, pice, sir i kobasice,
2. mašina za pakovanje sa vertikalnim tokom (vertical flow-pack) za kafu, začine, šećer u prahu, kikiriki, bademe,
3. mašina sa dubokim izvlačenjem (deepdrawing machine) pogodna za viršle, meso, gotova jela
4. mašina za zaptivanje kutija, kesa u kutiji prilagođena za velike pakete mesa (piletina, viršle),
5. mašina sa vakuumskom komorom za male proizvodne kapacitete proizvoda koji imaju malu cenu.



Slika 2.6. Mašina za pakovanje sa horizontalnim tokom



Slika 2.7. Vertikalni tok mašine za pakovanje

Opis tehnološke linije za MAP pakovanje prehrambenih proizvoda

MAP gasovi: ugljen dioksid (CO_2), azot (N_2) i kiseonik (O_2) se isporučuju u vidu smeše u bocama ili se mogu pomešati na licu mesta iz boca pod pritiskom ili rezervoara pomoću gasnog mešača i to u potrebnim zapreminskim odnosima u zavisnosti od vrste proizvoda. Izbor načina snabdevanja zavisi od tipa prehrambenog proizvoda, proizvodne količine, linije pakovanja i da li će se gas koristiti još negde u proizvodnji. Ukoliko je proizvodnja relativno ograničena ili ako je pušten u rad novi proizvodni uređaj može biti vrlo preporučljivo da se isporučuju već izmešani gasovi. Kada se povećaju brzine proizvodnje i ako će se pakovati različiti produkti, može biti pogodnije i ekonomičnije da se mešanje gasova vrši na licu mesta. U tom slučaju koristi se mešač i gasovi iz boce ili cisterni (**Ahvenainen, 2000**).

Aseptično pakovanje

Aseptično punjenje je definisano kao način pakovanja koji se sastoji od sterilizacije ambalaže i punjenja ambalaže komercijalno sterilnim proizvodom u sterilnim uslovima. Aseptično pakovanje podrazumeva korišćenje ambalaže koja onemogućava

rekontaminaciju proizvoda. Ovo podrazumeva da je ambalaža izrađena od odgovarajućih materijala i da je hermetički zatvorena **(Vujković, 2007)**.

Pojam „aseptičan“ je grčkog porekla i označava osobinu da nešto nije sklono truljenju, odnosno da ne sadrži otrovne klice. U terminologiji prehrambene tehnologije ovim pojmom se ukazuje na odsustvo patogenih mikroorganizama iz proizvoda, ambalaže i okoline. Pojam „komercijalno sterilan“ definiše odsutnost mikroorganizama koji se mogu razmnožavati u hrani koja nije čuvana ili distribuirana na temperaturi hlađenja **(Vereš, 2004)**.

Danas se aseptično pakovanje koristi u dva specifična područja:

- pakovanje prethodno sterilisanih proizvoda (na primer mleka, pudinga, deserta, voćnih sokova) i
- pakovanje nesterilisanih proizvoda kako bi se izbegla infekcija mikroorganizmima (na primer kod svežih proizvoda poput fermentiranih mlečnih proizvoda).

Postoje tri glavna razloga za primenu aseptičnog pakovanja:

- omogućuje primenu ambalaže koja inače nije pogodna za sterilizaciju;
- omogućuje primenu HTST sterilizacije (high-temperature-short-time), i
- povećava trajnost proizvoda pri normalnim uslovima čuvanja.

Postoje četiri glavna kriterijuma koje mora zadovoljiti aseptični način pakovanja:

- mogućnost efikasne sterilizacije celog sistema pre upotrebe,
- mogućnost povezivanja s procesnim sistemom osiguranjem aseptičnog transfera proizvoda,
- mogućnost provođenja operacija punjenja, zatvaranja i kritičnog transfera u sterilnoj okolini,
- mogućnost adekvatnog čišćenja nakon provedenog postupka pakovanja.

Načini aseptičnog pakovanja

Aseptično pakovanje može se realizovati na nekoliko načina.

- Aseptično pakovanje u limenke

Za sterilizaciju limenki od složenih materijala, gde spiralni omot može biti načinjen od laminata koji sadrži alu-foliju, plastiku ili papir, uz dodatak metalnih poklopaca, upotrebljava se vrući vazduh pri 143°C u toku tri minute. Ovaj postupak osigurava sterilnost ambalaže od mikroorganizama kao što su kvasci, plesni i nesporogene bakterije, što ga čini primenljivim za pakovanje kiselih proizvoda poput voćnih sokova i ostalih napitaka. Za sterilizaciju takve ambalaže ne preporučuje se korišćenje pare jer ona može uzrokovati bubrenje papirnog sloja u laminatu (**Vujković, 2007**).

- Aseptično pakovanje u staklenke

Staklenke se sterilišu zasićenom parom pod pritiskom ili toplotom. Ukoliko se koristi toplota, potrebno je osigurati produženo hlađenje sa sterilnim vazduhom, pri čemu se smanjuje rizik od pucanja staklenki zbog termičkog šoka koji se javlja prilikom punjenja hladnog proizvoda.

Za aseptično pakovanje u staklenke najviše se primenjuje sterilizacija ambalaže toplotom ili vodonik peroksidom (raspršivanjem).

- Aseptično pakovanje u plastenke

Pakovanje u plastenke je jeftinija alternativa nepovratnoj staklenoj ambalaži. Koriste se plastične boce oblikovane duvanjem. Kao materijal za izradu plastičnih boca najviše se koristi polietilen i polipropilen, sa ili bez dodatka pigmenta za zaštitu od uticaja svetla. Takođe je moguće koristiti u kalupu oblikovane boce od složenih materijala, koji su karakterisani boljim barijernim svojstvima, što takođe povećava i trajnost upakovanog proizvoda.

Nakon postupka duvanja plastične boce prelaze u sterilnu komoru, s lagano povećanim pritiskom sterilnog vazduha, te se u okrenutom položaju sterilišu raspršenim vodonik-peroksidom (izvana i iznutra). Peroksid se potom uklanja evaporacijom i tokom prolaza boca kroz tunel s vrućim vazduhom, a boce se ispiraju sterilnom vodom i pune. Potom se na boce postavlja, hemijskim putem sterilisan, poklopac od plastičnog materijala.

Kod ekstrudiranih boca sterilni se uslovi postižu duvanjem sterilnim vazduhom i termozavarivanjem u uslovima koji garantuju sterilnost unutrašnjosti rezervoara. Zatvorene se boce prebacuju u sterilnu komoru (neznatno višeg pritiska), gde se spoljašnja površina sterilise sa raspršenim vodonik-peroksidom. Zatim se poklopac boca uklanja, grlo boce se adekvatno doteruje, pune se sadržajem i ponovno zatvaraju zatvaračima, sterilisanim izvan komore (**Vujković, 2007**).

Sterilizacija platenki može se sprovesti i u jednom jedinstvenom postupku gde se sprovode operacije duvanja, punjenja i zatvaranja. Sterilnost unutrašnjosti ambalaže postiže se visokom temperaturom plastičnog materijala tokom postupka ekstruzije i korišćenjem sterilnog vazduha za duvanje.

- Aseptično pakovanje u vrećice

Sistem pakovanja s vertikalnim pakericama za oblikovanje-punjenje-zatvaranje odvija se u sterilnoj komori. Ambalažni materijal prolazi kroz vodonik-peroksid (nekad se koristio etanol pri 95°C), nakon čega sledi njegovo uklanjanje, a materijal se potom suši i tretira UV zracima. Od materijala se koristi polietilen ili laminati, za proizvode s dužim vekom trajnosti.

Kod sistema vrećica dobijenih od ravnih cevastih polimernih oblika gde se poprečni šav oblikuje za formiranje vrećice, smatra se da je unutrašnjost vrećice sterilna zbog primenjene temperature u procesu ekstruzije. Tim se postupkom mogu izrađivati vrećice od monofilma ili laminata (koekstruzija). Cevasta traka koja se odmotava sa smotka, dolazi u sterilnu komoru s većim pritiskom,

vrećicama se potom oblikuje donji šav, režu se i provode do sistema za punjenje sadržajem. Nakon punjenja oblikuje se gornji šav i vrećica napušta komoru **(Vujković, 2007)**.

- Aseptično pakovanje u čašice

Čašice za pakovanje hrane najčešće se izrađuju od polistirena (PS) velike žilavosti ili polipropilena, kao i od koekstrudiranih višeslojnih materijala u cilju poboljšanja barijernih svojstava. Tipičan primer laminata je kombinacija PS (kao spoljašnji sloj); adheziv, polivinilhlorid (PVC) / polivinilidenhlorid (PVDC) kopolimer (barijerni sloj), adheziv i polietilen (PE). Primenom barijernog sloja PVC/PVDC postiže se trajnost proizvoda iznad 12 meseci.

Prethodno oblikovane čašice pomičnom trakom prelaze u sterilni tunel gde se obrađuju raspršenim (35%) vodonik-peroksidom. Nakon tri sekunde rastvor se uklanja kompresovanim vrućim vazduhom pri maksimalnoj temperaturi od 400°C, zavisno od materijala od kojeg su čašice napravljene. Unutrašnjost čašice postiže temperaturu od oko 70°C, dovoljnu za sterilizaciju površine i smanjenje zaostalog peroksida na prihvatljivu vrednost.

Materijal za hermetičko zatvaranje (najčešće aluminijumska folija s tankom prevlakom termo-plastičnog materijala) se sterilise 35% rastvorom peroksida koji se potom uklanja toplotom zračenja, vrućim sterilnim vazduhom ili prevođenjem materija preko zagrejanih valjaka. Kod nekih se sistema koristi i UV zračenje, samo ili u kombinaciji s peroksidom.

- Aseptično pakovanje u ambalažu od složenih materijala

Ovakva ambalaža se najčešće sastoji od slojeva izbeljenog i neizbeljenog kartona prevučenog, sa spoljašnje i unutrašnje strane, polietilenom, pa je ovakvo pakovanje nepropusno za tečnosti. Pored ovih materijala ovakva ambalažna jedinica sadrži i tanki sloj aluminijumske folije koja služi kao barijera za kiseonik. Svaki sloj ima odgovarajuću funkciju:

- spoljašnji sloj polietilena štiti sloj boje i omogućuje termo-zavarivanje,
 - izbeljeni karton služi kao nosač dekora i osigurava mehaničku čvrstoću ambalaže,
 - laminatni polietilen veže aluminijsku foliju na kartonsku podlogu,
 - aluminijska folija služi kao barijera prema gasovima i svetlu,
 - dva unutrašnja sloja polietilena osiguravaju barijeru prema tečnom sadržaju.
- Aseptično pakovanje u voluminozna pakovanja

Komercijalna voluminozna aseptična pakovanja obuhvataju zapremine od 10 do 1000 litara. Od ambalažnih jedinica koriste se metalne bačve ili vreće izrađene od sloja aluminijske folije ili metaliziranog filma.

Postoje dva načina aseptičkog pakovanja u ovakvu ambalažu. U prvom slučaju postupak sterilizacije i punjenja bačvi odvija u autoklavima uz korišćenje pare pri 690 kPa. Nakon uklanjanja pare za sterilizaciju odzračivanjem, uvodi se 45emper u hermetički zatvoreni autoklav kako bi se uklonio kondenzat. Sterilni proizvod se, iz tanka s neznatno većim pritiskom azota, puni u bačve, unutar autoklava pod vakuumom, pri temperaturi od oko 40°C. Hermetičko zatvaranje bačve provodi se još dok se nalazi u autoklavu.

U drugom slučaju se uvodi para u bačvu, pri 104 kPa. Ciklus odzračivanja od 80 sekundi osigurava uklanjanje vazduha, a bačva se podvrgava pritisku od 104 kPa u toku 40 sekundi. Pritisak se potom smanjuje na 10 kPa i održava tokom postupka punjenja (**Vujković, 2007**).

- Aseptično pakovanje u vrećice unutar kutije

Kod sistema pakovanja vrećice unutar kutije (bag-in-box) proizvod se puni u plastične vrećice koje se potom pakuju u odgovarajuće sekundarno pakovanje poput metalnih bačvi ili kartonskih kutija. Kod većih dimenzija punjenje se odvija nakon što je vrećica postavljena unutar bačve ili kutije.

Postoji više načina aseptičnog pakovanja u ovakvu ambalažu. Na primer, jedan od načina je da se plastična vrećica, prethodno zatvorena odgovarajućim čepom i sterilisana gama zračenjem (25 kGy) postavi ispod komore za punjenje u koju se uvodi samo završni kraj s čepom. Nakon uklanjanja čepa, u sterilnoj se sredini izvrši punjenje sadržaja i ponovno postavljanje čepa. Napunjena se vrećica potom postavlja u odgovarajuću kartonsku kutiju.

Drugi način je da se koristi komora za punjenje, pod pritiskom sterilnog vazduha pri 275°C, u koju se uvodi otvor vrećice. Otvor vrećice i poklopac se potom tretiraju baktericidnim sredstvom. Potom se poklopac uklanja, a nakon evakuacije vazduha iz vrećice provodi se punjenje sadržajem i ponovno zatvaranje vrećice. Sterilizacija se provodi parom pri 276 kPa u toku 30 minuta (**Vujković, 2007**).

Povišena temperatura

Primena toplote je najčešće korišćena metoda inaktivisanja mikroorganizama radi očuvanja namirnica. Porastom temperature preko određene – maksimalne vrednosti pogodne za njihovo razmnožavanje, dolazi do uništenja mikroorganizama. Prema tome, to je smrtonosna temperatura za određenu vrstu mikroorganizama. Jasno je da će smrtnost biti veća ako je temperatura viša. Vegetativni oblici bakterija, kvasci i plesni izloženi temperaturi od 100°C brzo se uništavaju tako da ne predstavljaju problem pri termičkom konzervisanju namirnica na ovoj temperaturi. Čak i znatno niže temperature (60 – 65°C) u trajanju 10 – 15 minuta uništavaju većinu mezofilnih vegetativnih bakterija, kvasaca i plesni. Relativno su termorezistentnije vegetativne ćelije nekih bakterija iz roda *Micrococcus*, *Streptococcus* i *Lactobacillus* (**Vereš, 2004; Šumić, 2009**).

Za uništavanje spora kvasaca i spora većine plesni dovoljna je temperatura 65 – 75°C u toku 10 minuta. Jedino su izuzetak spore plesni roda *Byssoschlamys* (*B. fulva* i *B. nivea*)

za čije je uništenje potrebno 30 minuta na temperaturi od 85°C ili 5 minuta na 95°C **(Vereš, 2004).**

Treba istaći da svi mikroorganizmi jedne populacije iste vrste, u istim spoljašnjim uslovima nisu podjednako otporni prema povišenoj temperaturi. U slučaju velikog broja mikroorganizama, usled različitog genetskog potencijala i nejednakih faza razmnožavanja, postoji verovatnoća da će se naći jedinke koje će preživeti uobičajeno delovanje letalne temperature.

Obično se smrtonosno delovanje neke povišene konstantne temperature određuje na osnovu broja uginulih ćelija u nekom konstantnom vremenu, najčešće u toku 10 minuta, i to u tačno definisanim spoljašnjim uslovima delovanja temperature. Da li će neka temperatura imati i u kojoj meri smrtonosni (letalni) efekat zavisi od:

- visine temperature,
- dužine njenog delovanja,
- vrste mikroorganizama,
- stadijuma razvoja (prema temperaturi su otporniji mikroorganizmi čije su ćelije u lag-fazi, tj. pre eksponencijalne faze razmnožavanja),
- koncentracije mikroorganizama,
- sastava okolnog medijuma (količina vode, šećera, masti, konzervansa) i
- pH vrednosti.

Vreme potrebno da bi se u potpunosti sterilisala suspenzija bakterijskih ćelija ili spora na zadatoj temperaturi predstavlja toplotno vreme smrti (thermal death time – TDT). Vrednost TDT zavisi od prirode mikroorganizama, broja njegovih ćelija i faktora koji se odnose na prirodu medijuma u kojem se odvija razvoj.

Druga mera uništavanja mikroorganizama je vreme decimalne redukcije (D vrednost). Ova vrednost je vreme izraženo u minutima koje je potrebno za uništavanje 90% ćelija na datoj temperaturi. Vrednost zavisi od prirode mikroorganizama i karakteristika medijuma.

Pasterizacija koja inaktivira vegetativne mikroorganizme, i sterilizacija kojom se uništavaju bakterijske spore, ostaju osnove svih velikih industrija hrane širom sveta. Zbog sporog prihvatanja korišćenja zračenja u industriji hrane u većini zemalja, toplota ostaje i dalje na mestu broj 1 u deaktivaciji mikroorganizama u hrani (**Pflug and Gould, 2000**). Situacija se počinje menjati razvojem novih i naprednih tehnologija, koje se sve više promovišu u industriji hrane.

II.1.2.2. Nove i napredne tehnologije očuvanja hrane

Tabela 2.6. Nove tehnike očuvanja namirnica

<i>Prirodni dodaci</i>	
Antimikrobne materije poreklom od životinja	Lizozim Laktoperoksidaza sistem Laktoferin, laktofericin
Antimikrobne materije iz biljaka Proizvodi mikroorganizama	Biljni i začinski ekstrakti Nizin Pediocin Bakteriocini i proizvodi kultura
<i>Fizički procesi</i>	
Gama zračenje i zračenje elektronskog snopa	
Elektroporacija	
Visok hidrostatski pritisak	
Kombinovano dejstvo ultrazvuka, toplote i pritiska (manotermosonikacija)	
Lasersko zračenje	
Visoko magnetno pulsno zračenje	

Prirodni aditivi

Nekoliko prirodnih aditiva su u širokoj upotrebi (tabela 2.6.). Na primer, beli lizozim iz jajeta koristi se u količinama od 100 tona godišnje da bi se sprečilo rasklijavanje vegetativnih ćelija *Cl.tyrobutyricum* iz spora u industriji sireva (**Hoover, 2000**).

Aktiviranje laktoperoksidaza sistema pokazalo se korisnim u proizvodnji mleka sa produženjem roka trajanja, u zemljama u kojima proces pasterizacije nije moguće izvesti nakon muže i gde je slabo razvijen sistem hladnog transporta.

Bakteriocin, nizin, koristi se sve više kako bi se sprečio kvar nekih sireva, kao i konzervisane hrane pod uticajem termofilnih sporulirajućih bakterija *Bacillus stearothermophilus* i *Cl.thermosaccharolyticum*. Danas je poznato i koristi se više od 40 drugih bakteriocina u industriji hrane.

Pronalazak novog prirodnog prehrambenog konzervansa – BISIN

Dr O'Saliven je otkrio, izolovao i patentirao supstancu poznatu kao Bisin. Ovaj prirodni lantibiotik (vrsta peptidnih antibiotika) može biti ključ za sprečavanje razvoja bakterija u namirnicama. Rezultati ovih istraživanja pokazuju da uz jednostavnu primenu Bisina, hrana može da ostane ispravna godinama.

Bisin je prirodni peptid koji se nalazi u tankom crevu. Proizvodi se tokom simbioze bakterija koje nastaju unutar normalne crevne flore, potpomaže varenje hrane, a značajnu ulogu ima u borbi protiv štetnih mikroorganizama. Dr O'Saliven je otkrio Bisin dok vršio istraživanja na simbiozi ovih bakterija. On je napomenuo neke izuzetne sličnosti sa drugim lantibioticima koji se koriste kao prehrambeni konzervansi.

Za pronalazak Bisina važno je poznavanje prekursora Nisina, koji se već koristi u preradi hrane kao konzervans već više od 30 godina, kako bi se sprečila kontaminacija hrane gram-pozitivnim bakterijama, *Clostridium*, *Streptococcus* i *Staphylococcus*. Shodno tome, primena Bisina imala bi za cilj razvoj gram-negativnih bakterija.

Pre pronalaska Nisina, trovanja hranom gram-pozitivnim bakterijama predstavljala su veoma ozbiljan zdravstveni problem. Veliki napredak ostvaren je u oblasti prehrambenih konzervanasa, otkrićem Nisina u bakteriji za fermentaciju sira. Sirevi, pića, meso, gotova jela tretirana Nisinom mogu potencijalno trajati nedeljama ili čak mesecima. Epidemije trovanja hranom, izazvane gram-pozitivnim bakterijama sprečene su pronalaskom i masovnom proizvodnjom Nisina. Zato su danas jedina trovanja hranom uglavnom uzrokovana gram-negativnim bakterijama, salmonelom i *E. coli*. Međutim, rast gram-negativnih bakterija je teže sprečiti, jer su zidovi njihovih ćelija složenije strukture. Nisin ne štiti protiv gram-negativnih bakterija, te se hrana i dalje kvari.

Otkriće Bisina kao prehrambenog konzervansa predstavlja revoluciju u celoj prehrambenoj industriji, kao i veliku pobedu u borbi protiv *E. coli* i salmonele. Naravno, sveže voće i povrće će se i dalje kvariti. Bisin ne pogada bakterije koje razlažu ove supstance. Međutim, meso, mlečni proizvodi, jaja i alkoholna pića tretirani Bisinom biće dugotrajno zaštićeni od truljenja i kvarenja (**Harrington, 2011**).

Predviđa se da bismo na tržištu mogli videti hranu tretiranu Bisinom najranije za godinu dana, obzirom da je Bisin veoma sličan Nisinu prema obliku i funkciji, i ne zahteva odobrenje od strane FDA (Food and Drug Administration) za proizvodnju. Jedino što sprečava Dr O'Salivena i njegov tim ka masovnoj proizvodnji Bisina su logistika proizvodnje i mehanizmi tretiranja. Zbog toga se predviđa da će biti potrebno još tri godine da se hrana tretirana Bisinom konačno pojavi na tržištu. U svakom slučaju, Bisin najavljuje novu eru u konzerviranju hrane (**Bakočević, 2011**).

Stotine biljaka, začina i drugih biljnih jedinjenja imaju antimikrobne osobine u laboratorijskim studijama (beli luk, origano, majčina dušica, žalfija, i dr.). Njihova aktivnost je često smanjena u hrani, zbog vezivanja aktivnih jedinjenja za proteine hrane ili jedinjenja masti.

Hemijska jedinjenja koja povećavaju osmotski pritisak uz smanjenje a_w ispod nivoa koji dopušta razvoj većine bakterija, se mogu koristiti kao bakteriostatici. Primeri ovakvih supstanci su so i šećer.

Mikrobiološka aktivnost praktično prestaje tek ako u namirnicama ima preko 20% soli (iako neke halofilne bakterije podnose koncentraciju čak i do 25% kuhinjske soli). To je količina soli koja je sa senzorskog aspekta neprihvatljiva. Pre upotrebe, ovakve namirnice mora da se ispiraju vodom. Iz ovih razloga nije uobičajeno da se namirnice trajno konzervišu samo dodatkom kuhinjske soli. Za trajno konzervisanje primenjuju se niže koncentracije soli u kombinaciji sa kiselinama, dimljenjem ili nekim drugim zahvatom (**Šumić, 2009**).

Patogene bakterije prestaju sa razmnožavanjem pri koncentraciji 8 – 9% NaCl, a truležne bakterije ne mogu da se razvijaju u sredini sa preko 10-12% soli. Kuhinjska so ne uništava bakterijske spore. Generalno može da se kaže da se koncentracijom soli 8-10% inhibira klijanje spora *Cl. botulinuma* tipa A; za tip E ova granica je oko 5% (**Vereš, 2004**).

Nove fizičke procedure

Očekivano je da nove fizičke procedure obezbeđuju najefikasniju alternativu dosadašnjem korišćenju toplote u procesima očuvanja hrane (**Barbosa-Canovas i sar., 1995**). Neki od ovih procedura su već u komercijalnoj upotrebi, dok su drugi još uvek pod budnim okom istraživača i u toku su razvoja.

Visoki hidrostatski pritisak

Do sada je ovaj princip dobro uspostavljen kod netermičke inaktivacije vegetativnih oblika bakterija, kvasaca i plesni u hrani, i često se naziva „pasterizacijom pritiska“.

Vegetativni oblici bakterija su generalno osetljivi na pritisak u domenu 400-600Mpa. Postoje individualne i vrstne razlike u osetljivosti različitih bakterija.

Namirnice koje se tako tretiraju su džemovi, sokovi, prelive i avokado umaci (gvakamole). Prednost kod ovakvog procesa jeste da se stanje makromolekula (proteini, polisaharidi) u hrani u velikoj meri izmeni pod uticajem pritiska, dok ima mali uticaj na male molekule hrane, čime se zadržava miris i arome.

Za sada, visoki pritisak se uglavnom koristi za očuvanje namirnica u kojima spore nisu problem (jer je pH vrednost premala da bi spore prerasle), ili koje se čuvaju ograničeno vreme na niskim temperaturama. Ograničenje proizilazi iz osobina bakterijskih spora koje su mnogo tolerantnije na dejstvo pritiska, nego vegetativne ćelije. Međutim, ustanovljeno je da se efekat postiže sinergističkim dejstvom pritiska i povišenjem temperature, za inaktivaciju spora. To se događa, sa nekim do sada nepoznatim razlogom, tako da pritisak predstavlja okidač za klijanje spora, a kada isključuju, one gube svoju sposobnost otpornosti na toplotu i pritisak, tako da kombinovanim dejstvom dva fizička procesa dolazi do deaktivacije mikroorganizama. Takođe, ustanovljeno je sinergističko dejstvo pritiska i nizina. Dejstvo pritiska se koristi u proizvodnji i nekih farmaceutskih sredstava (vakcine).

Ultrazvuk, mikrotalasna i visokofrekventna energija

Dugo je već poznato da ultrazvuk visokog intenziteta inaktivira vegetativne bakterije i redukuje toplotnu otpornost spora. Efekat ultrazvuka je povećan sa povišenjem temperature (*Sala i sar., 1995*).

Za konzervisanje u prehrambenoj industriji najviše se koriste

- frekvence od 915-2450 MHz u mikrotalasnom (UHF)
- 27,12 - 40,68 MHz u visokofrekventnom (HF) području

HF talasi imaju veću mogućnost prodiranja u materijal, ali uz slabiji intenzitet zagrevanja nego mikrotalasi koji poseduju manju moć prodiranja uz znatno veći intenzitet zagrevanja (*Mišljenović, 2008*).

Električno pražnjenje visokog napona (elektroporacija)

Elektroporacija je efikasan metod za inaktivaciju vegetativnih bakterija, kvasaca i plesni, dok su spore mnogo tolerantnije.

Ćelijska membrana je jedna od najvažnijih struktura koja kontroliše homeostatske mehanizme vegetativnih ćelija. Stoga nije iznenađujuće da elektroporacija, koja je

odgovorna za narušavanje strukture ćelijske membrane ima tako efikasna dejstva na vegetativne ćelije. Prilikom elektroporacije koristi se elektropražnjenje u trajanju od samo nekoliko mikrosekundi, ali se više puta ponavlja proces (**Zhang i sar., 1995**). Time se izbegava preterano grejanje namirnice. Za namirnice kao što su mleko i voćni sokovi, ova tehnika se može upotrebiti za pasterizaciju.

Visok intenzitet svetlosti

Laseri i nekoherentni svetlosni snop su počeli da se primenjuju radi dekontaminacije površina na kojima se obrađuje hrana, kao i za dekontaminaciju pakovanja u kojoj će se držati namirnica. Letalni efekat UV svetlosti već je dugo poznat i u upotrebi je u prehrambenoj industriji.

Potencijalni metod smanjenja mikroorganizama na površini pakovanja i hrane je korišćenje intenzivne pulsirajuće svetlosti. Pulsirajuća svetlost je energija koja se oslobađa kao kratka, brzo pulsirajuća „bela“ svetlost širokog spektra koja može da sterilizuje materijal pakovanja i smanji populaciju mikroorganizama na površini hrane. Mikroorganizmi izloženi pulsirajućoj svetlosti bivaju uništeni.

Blicevi pulsirajućeg svetla nastaju kompresovanjem električne energije u kratke impulse i korišćenjem ovih impulsa da se energizuje inertna gasna sijalica. Sijalica zatim emituje intenzivan bljesak svetlosti u trajanju od par stotina mikrosekundi. Pošto sijalica može da bljesne nekoliko puta u sekundi, samo nekoliko bljeskova je potrebno da bi se postiglo veliko uništavanje mikroorganizama. Zbog toga linija za obradu hrane može biti veoma brza.

Prskanje sa acetilnom kiselinom pre tretmana pulsirajućom svetlošću dovodi do još većeg uništavanja patogena. Istraživanja nisu otkrila da pulsirajuća svetlost dovodi do promene u pogledu hranljivosti ili osetljivosti hrane (**Marriott i Gravani, 2006**).

Visok intenzitet impulsa magnetnog polja

Izlaganjem visokom intenzitetu oscilovanja magnetnog polja ustanovljeno je da takvi impulsi imaju različite efekte na biološke sisteme. Vreme tretmana je izuzetno kratko (oko 25ms) a jačina polja se kreće od 2-100Tesla, na frekvencijama između 5-500kHz **(Mišljenović, 2008)**.

Radijacija

Kada se mikroorganizmi u hrani ozrače ubrzanim elektronima (beta zracima) ili sa X-zracima (ili gama zracima), logaritam broja preživelih je direktno proporcionalan dozi zračenja. Relativna osetljivost određene vrste mikroorganizama koja je podložna određenim uslovima je normalno izražena kao pad krive preživelih. Dobija se kriva \log_{10} onih koji su preživeli zračenje, koja je suprotna dozi zračenja i D zračenju ili D10 vrednosti koja se može uporediti sa termičkom D vrednošću. D10 vrednost se definiše količinom zračenja u radijanima (erg energije za 100 g materijala) koja je potrebna da se smanji populacija mikroorganizama za 1 log (90%). Destruktivni mehanizam zračenja nije u potpunosti razjašnjen. Smatra se da je smrt izazvana inaktivacijom ćelijskih komponenti i energijom koja je apsorbovana u ćeliji **(Šumić, 2009)**.

Budući da ozračivanjem namirnice ne dolazi do povišenja niti sniženja temperature, ova metoda poznata i pod nazivom „hladna pasterizacija“ ili „hladna sterilizacija“, omogućuje tretiranje prethodno smrznutih i konfekcioniranih namirnica **(Mišljenović, 2008)**.

Za konzerviranje namirnica dozvoljeno je upotrebljavati elektrone iz akceleratora, x-zrake i samo gama-zrake iz izotopa ^{60}Co i ^{137}Cs .

Upotreba jonizujućeg zračenja, gama zračenja i X-zračenja koristi se širom sveta, u više od 40 zemalja radi očuvanja namirnica. Dozvoljene doze se kreću do 10 kGy,

mada je nedavno Svetska Zdravstvena organizacija (WHO) potvrdila da niti korišćenje većih doza zračenja nema toksikoloških i drugih opasnosti po čoveka. Tehnologija je relativno jednostavna za primenu. Često se koristi za prevenciju od trovanja hranom putem eliminacije patogenih bakterija kao što su *Salmonella spp.* i *Campylobacter spp.* (**Patterson i sar., 2000**).

II.1.2.3. Sterilizacija materijala koji dolaze u kontakt s hranom

S obzirom na važnost početnog broja mikroorganizama na ambalaži, potrebno je preduzeti i odgovarajuće mere (tokom proizvodnje, transporta i skladištenja) kako bi njihov broj bio što niži.

U tu svrhu provode se tri glavna postupka, pojedinačno ili u kombinaciji, za sterilizaciju ambalažnih materijala: zračenje, hemijski i termički tretman (**Vereš, 2004**).

Sterilizacija ambalaže zračenjem

Sterilizacija UV-zračenjem

Ultravioletno (UV) zračenje talasnih dužina od 250 do 280 nm ima najbolje delovanje na destrukciju mikroorganizama (tzv. UV-C područje), s optimalnim delovanjem na 253,7 nm. UV-C zračenje se smatra zadovoljavajućim u sistemu aseptičnog punjenja proizvoda uz uslov da je ozračeni materijal gladak, otporan na UV zrake i bez prisutnosti čestica prašine. Takođe je važno da je intenzitet zračenja jednakolik i adekvatan za sterilizaciju unutar cele ambalažne jedinice koja može biti složenog oblika. Uopšteno, ovaj se postupak komercijalno koristi u kombinaciji s vodonik-peroksidom.

Sterilizacija IR-zračenjem.

Infracrveni (IR) zraci se konvertuju u osetljivu toplotu pri dodiru s apsorbirajućom površinom, što rezultira povećanjem toplotne površine. Kao i kod UV-zračenja i IR-

zračenje je primenljivo samo na glatke i ravne površine. IR zračenje se koristi za tretiranje unutrašnje površine aluminijumskih poklopaca prevučenih plastičnim materijalom. Zbog mogućeg mekšanja plastičnog laka, maksimalna temperatura ne sme preći vrednost od 140°C.

Sterilizacija jonizujućim zračenjem.

Sterilizacija gama zracima, kobalta 60 ili cezijuma 139 koristi se za sterilizaciju unutrašnjosti zatvorene (ali prazne) ambalaže, načinjene od materijala koji ne podnose temperaturu termičke sterilizacije, ili kod kojih se klasična sterilizacija ne može provesti zbog samog oblika ambalaže. Na taj se način može sterilisati plastična vrećica izrađena od laminata (tip vrećice unutar kartonske kutije, bag-in-box sistem), s radijacionom dozom od 25 kGy ili više, koja se pokazala delotvornom za postupak sterilizacije. Takođe je moguće primeniti niskoenergetski (100 keV) elektronski snop velike površine za sterilizaciju površine ambalaže i ambalažne jedinice (**Vujković, 2007**).

Sterilizacija ambalaže toplotom

Sterilizacija ambalaže zasićenom parom. Najpouzdaniji način sterilizacije je nesumnjivo primena vlažne toplote u obliku zasićene pare. Međutim, postoje tri glavna problema. Kako bi se postigla dovoljno visoka temperatura za sterilizaciju unutar nekoliko sekundi, para (a samim tim i ambalaža s kojom dolazi u kontakt) mora biti pod pritiskom, što zahteva upotrebu komore pod pritiskom. To je prvi problem. Drugi problem je što se vazduh, koji ulazi u komoru s ambalažom, mora ukloniti, inače će uticati na prenos toplote s pare na površinu ambalaže. Treći problem je kondenzacija pare tokom zagrevanja koja se može zadržati unutar ambalaže i uticati na razređenje sadržaja.

Uprkos navedenim nedostacima, zasićena se para pod pritiskom koristi za sterilizaciju plastične ambalaže. Tako se, na primer, neposredno nakon oblikovanja (metodom dubokog izvlačenja), plastične čašice od polistirena i poklopac podvrgavaju uticaju pare pri 165°C i 600 kPa u toku 1,4 sekunde (čašica), odnosno 1,8 sekundi (poklopac). Pri

tome se vanjska strana čašice istovremeno i hladi. Takav proces postiže redukcijsko vreme za spore *Bacillus subtilis*, od 5 do 6D.

Sterilizacija ambalaže vrućim vazduhom. Ovaj način sterilizacije ima prednosti jer se visoka temperatura može postići pri atmosferskom pritisku. Sterilizacija vrućim vazduhom, pri temperaturi od 315°C, najviše se koristila za sterilizaciju laminata papir/alu-folija/plastični materijal, pri čemu se temperatura površine od 145°C postizala za 180 sekundi. Međutim, ovaj je sistem uglavnom pogodan za kisele proizvode, pH<4,5.

Sterilizacija ambalaže vrućim vazduhom i parom. Smeša vrućeg vazduha i pare koristila se za sterilizaciju unutrašnje površine čašica i poklopaca od polipropilena, koji su termički stabilni do 160°C. Ovim se postupkom vrući vazduh uduvava u čašice mlaznicama, tako da se dno i zidovi čašice podjednako zagrevaju.

Sterilizacija ambalaže ekstruzijom. Tokom postupka ekstruzije plastičnih granula, pre oblikovanja plastike u ambalažni oblik, postižu se temperature od 180 do 230°C u toku tri minute. Kako raspodela temperature unutar ambalaže nije podjednaka, nije moguće osigurati da će sve čestice postići minimalnu temperaturu i potrebno vreme za sterilizaciju. Prema literaturnim podacima postupkom ekstruzije postiže se redukcijsko vreme mikrobnih spora od 3,4D. Zato se ovaj postupak preporučuje za sterilizaciju kiselih proizvoda s pH<4,5. Za proizvode s pH>4,5 preporučuje se, za koekstrudiranu ambalažu, dodatna sterilizacija s vodonik-peroksidom ili smešom persirćetne kiseline **(Vujković, 2007)**.

Sterilizacija ambalaže hemijskim postupcima

Sterilizacija ambalaže vodonik-peroksidom.

Letalni učinak vodonik-peroksida (H₂O₂) na mikroorganizme (uključujući i termorezistentne spore) poznat je već dugo godina. Međutim, još uvek nije poznat stvarni mehanizam smrtnosti rezistentnih spora. Budući da ni koncentrovani rastvor peroksida, pri sobnoj temperaturi, nema značajan destruktivni učinak, potrebna je minimalna

temperatura od 80°C i minimalna koncentracija od 30% da bi se postigao destruktivni učinak na većinu rezistentnih spora na ambalažnim materijalima.

Kako postoji niz nepoznanica korišćenja peroksida, teško je predvideti i učinke sterilizacije odgovarajućom kombinacijom koncentracije peroksida i temperature. Tako je, na primer, 4D redukcija postignuta tretmanom kartonske ambalaže u 20% rastvoru peroksida pri 80°C tokom 15 sekundi; smanjenjem koncentracije peroksida na 15% povećava se i potrebno vreme oko 50%, dok smanjenje temperature za 10°C povećava potrebno vreme 70%. Proizlazi da se uslovi sterilizacije ambalaže peroksidom, pre aseptičnog punjenja, uglavnom određuju iskustveno. FDA (1981) je postavila pravila po kojima prisutnost peroksida u hrani ne sme biti veća od 100 ppb (100 delova u 109) u trenutku punjenja proizvoda, te se mora smanjiti na približno 1 ppb za 24 sata. No kako se peroksid u hrani ne može precizno izmeriti zbog prisutnosti redukcionih jedinjenja koja ga brzo eliminišu, potrebno je njegovu početnu koncentraciju odrediti u ambalaži napunjenoj vodom.

Kako se postupkom sterilizacije, samo uz primenu peroksida, ne može sterilisati ambalažni materijal, razvijeno je niz metoda koje pospešuju delotvornost peroksida.

Sterilizacija ambalaže potapanjem u vodonik peroksid. Kod tog se postupka ambalažni materijal odmota sa svitka i provuče kroz 30-33% rastvor peroksida. Pri tome se koristi sredstvo za navlaživanje koje osigurava ravnomerno vlaženje površine plastičnog materijala hidrofobnog karaktera. Mehaničkim se postupkom smanji količina peroksidnog rastvora, a adherentni film se potom suši toplim vazduhom. Postupkom se postiže redukcija mikrobnih spora od 4 do 5D. Varijacijom te metode, koja uključuje mehaničko čišćenje površine ambalaže rotirajućim četkama sterilnim vazduhom pod pritiskom ili ultrazvukom, postiže se daljnja redukcija spora od 2 do 4D.

Sterilizacija ambalaže raspršivanjem vodonik peroksida. Ovim se postupkom peroksid raspršuje mlaznicama na oblikovanu ambalažu, pri čemu se, zbog hidrofobnog karaktera plastike, 30-40% unutrašnje površine prekrije kapljicama. Peroksid se potom suši toplim

vazduhom. Brzina smrtnosti zavisi od zapremine na koju se nanosi peroksid (veća zapremina zahteva duže vreme sušenja) i temperature vrućeg vazduha. Noviji postupci uključuju primenu smeše vrućeg vazduha (130°C) i gasovitog peroksida.

Sterilizacija ambalaže ispiranjem u vodonik peroksidu. Ukoliko oblikovana ambalaža ima oblik koji nije pogodan za primenu postupka sterilizacije raspršivanjem peroksida, primenjuje se postupak ispiranja u peroksidu ili u smeši peroksida i persirćetne kiseline. Nakon raspršivanja ambalaža se ocedi i potom suši vrućim vazduhom. Ovaj se postupak koristi za sterilizaciju staklene, metalne i plastične (oblikovane duvanjem) ambalaže.

Sterilizacija ambalaže peroksidom i kombinacijom UV zračenja i toplote.

Kombinacijom UV zračenja i vodonik-peroksida postiže se sinergistički učinak. Pri tome UV zračenje dovodi do raspadanja peroksida u hidroksil radikal. Ukupni letalni učinak je veći od sume učinaka peroksida i zračenja pojedinačno, dok se optimalni učinak postiže primenom relativno niske koncentracije peroksida (od 0,5 do 5%).

Tako, na primer, postoje istraživanja u kojima je kartonska ambalaža, namerno kontaminirana sporama *B.subtilis*, tretirana 1% otopinom vodonikova peroksida i potom zračena 10 sekundi UV zracima visokog intenziteta. Na taj je način postignuta redukcija od 5D kod materijala prevučenog polietilenom i 3,5D kod laminata sastava polietilen/alu-folija.

U sterilizaciji ambalaže često se koristi kombinacija UV zračenja i peroksida. Prednost takve kombinacije je korišćenje niže koncentracije peroksida (manje od 5%), u poređenju sa 30-35% kod metode u kojoj se koristi peroksid u kombinaciji s toplotom. Pri tome se značajno smanjuje i kontaminacija peroksidom, ne samo vazduha, već i ambalažne jedinice.

Sterilizacija ambalaže persirćetnom kiselinom.

Persirćetna kiselina naročito je delotvorna prema sporama aerobnih i anaerobnih bakterija. Dobija se oksidacijom sirćetne kiseline i vodonik-peroksida, pa rastvor koji sadrži persirćetnu kiselinu i vodonik-peroksid postaje delotvoran na rezistentne spore bakterija čak i pri 20°C. Tako, na primer, 1% rastvor eliminiše većinu (10^7 - 10^8) rezistentnih spora kroz pet minuta pri 20°C, dok se najotporniji među njima eliminišu za 60 minuta. Maksimalna primenjena temperatura je 40°C, a vreme sterilizacije je pet puta kraće.

Sterilizacija ambalaže etilen oksidom.

Etilen oksid je toksični gas koji može penetrirati kroz porozni materijal, pa se može koristiti za prethodnu sterilizaciju ambalažnih materijala s papirnom/kartonskom osnovom. Zbog svoje toksičnosti, složene ambalažne ploče se prethodno sterilišu, pri čemu se omogućuje uklanjanje gasa pre otpremanja ambalaže na mesto punjenja **(Vujković, 2007)**.

Provera postupka sterilizacije

Postupak sterilizacije ambalažnog materijala proverava se inokulacijom površine materijala na smotku, čašici ili poklopcu s odgovarajućom koncentracijom ispitivanog mikroorganizma. Takva se analiza provodi na komercijalnim šaržama, pri čemu se gotova ambalaža napuni odgovarajućim medijumom za rast i inkubaciju. Pri tome se uzima najmanje 100 ambalažnih jedinica. Najznačajniji faktor koji utiče na uspešnost testa je odabir odgovarajućeg organizma. Potrebno je voditi računa i o tome koji će se prehrambeni proizvod pakovati u takvu ambalažu.

II.1.2.4. Aktivna ambalaža

Prema Odredbi Evropske Unije o materijalima i predmetima koji dolaze u dodir s hranom koja je stupila na snagu 2004. godine (Regulation 1935/2004), dopušteno je uvođenje „aktivne“ i „inteligentne“ ambalaže, dok će dodatni zahtevi biti propisani specifičnim merama koje će uključivati i pozitivnu listu dopuštenih supstanci i/ili materijala.

Pod pojmom „aktivna“ ambalaža definiše se materijal koji je konstruisan na način da otpušta aktivne komponente u hranu ili ih apsorbuje iz hrane s ciljem produženja trajnosti ili održavanja ili poboljšavanja uslova pakovanja (**Cuq i sar., 1995**).

Navedeni novi tipovi ambalaže ne smeju menjati sastav ili organoleptička svojstva hrane ili rezultirati informacijama koje bi mogle zavarati potrošača. Aktivna ambalaža ne sme sadržavati supstance s namerom prikrivanja procesa kvarenja hrane.

Takva ambalaža mora sadržati informaciju o sigurnosti i ispravnoj upotrebi aktivne ambalaže. Tom odredbom su takođe utvrđeni zahtevi za označavanjem porekla i krajnjeg odredišta.

Tradicionalni način pakovanja (pasivno pakovanje), s obzirom na način distribucije i skladištenja proizvoda, ima svoja ograničenja u zaštiti proizvoda. Zahtevi za povećanjem trajnosti proizvoda, te negativan stav potrošača prema konzervansima doveli su do razvoja aktivnog pakovanja.

Aktivna ambalaža stalno menja propusnost zbog koncentracije različitih isparljivih supstanci odnosno gasova u vazdušnom prostoru pakovanja iznad samog sadržaja ili zbog dodataka antimikrobnih supstanci, antioksidanata ili drugih supstanci koje održavaju dobar kvalitet proizvoda tokom skladištenja. Takva ambalaža naziva se još i interaktivna budući da dolazi u aktivnu interakciju s hranom. Cilj aktivnog, odnosno interaktivnog pakovanja je obezbeđivanje uslova za produženom trajnošću hrane tokom skladištenja. Za aktivno pakovanje koriste se sredstva za uklanjanje kiseonika, apsorpciju ili razvijanje

ugljen-dioksida, izračivanje etanola, apsorpciju etilena i apsorpciju vlage (**Cuq i sar., 1995**).

Supstance koje vežu kiseonik

Za ovu namenu sve se više koristi metoda tzv. „generacije vrećica“, a najrašireniji su apsorbeni kiseonika. To je najčešće gvožđe prah ili jedinjenje gvožđe (II) jona koji se stavljaju u ambalažnu jedinicu u zasebnoj vrećici.

Materijal za vrećice izrazito propušta kiseonik i vodenu paru tako da sadržaj vrećice reaguje sa kiseonikom stvarajući netoksični gvožđe oksid. Ambalažu koja sadrži takve vrećice karakteriše niska propusnost kiseonika ($<20 \text{ cm}^3/\text{m}^2 \text{ dbar}$). Te uslove zadovoljava PVDC, a tim načinom pakovanja koncentracija kiseonika se smanjuje na 100 ppm i to u toku 1 do 2 dana čuvanja i kao takva se zadržava tokom celog razdoblja predviđenog za održivost proizvoda (uz uslov da nije došlo do oštećenja ambalaže). Najpoznatiji tipovi takvih vrećica su „ageless“ i „freshilizers“ koje se komercijalno proizvode u Japanu (**Cuq i sar., 1995**).

Supstance koje regulišu udeo ugljendioksida

Supstance koje regulišu udeo ugljendioksida produžavaju održivost proizvoda svojom mikrostatskom aktivnošću i smanjenjem respiracije. Koncentracija gasa se reguliše aktivnim ili pasivnim načinom. Dodatak gasa se može provesti njegovim uvođenjem u ambalažnu jedinicu, pre zatvaranja ambalaže ili razvijanjem gasa tokom skladištenja. Smanjenje CO_2 se reguliše apsorpcijom ili propustljivošću kroz ambalažni materijal. Slično kao i kod uklanjanja kiseonika, i tu je moguća primena vrećica koje sadržavaju sredstva za uklanjanje CO_2 . U tom se slučaju koristi kalcijum hidroksid koji reaguje sa ugljendioksidom (pri dovoljno visokoj relativnoj vlazi) uz nastajanje kalcijum karbonata.

Supstance koje kontrolišu udeo etilena

Etilen (C_2H_4), predstavlja prirodni biljni hormon koji ima središnju ulogu u odvijanju procesa „starenja“ čak i pri vrlo malim koncentracijama (0,1 ppm). Apsorbensi etilena pomažu odgađanje faze „starenja“ nekih vrsta voća. Etilen se može ukloniti provetravanjem, apsorpcijom pogodnim hemikalijama (na primer kalijum permanganatom ili aktivnim ugljem) ili se može uništiti ozonom (**Cuq i sar., 1995**).

Supstance koje kontrolišu udeo vlage

Promene kvaliteta proizvoda zbog vezanja vlage najočitije su kod higroskopnih proizvoda, dok kod drugih proizvoda gubitak vlage dovodi do neželjenih promena ne samo zbog gubitka kvaliteta, već i zbog ekonomskih razloga. Od supstanci koje vežu vlagu najčešće se koristi netoksični i nekorozivni silikagel (**Cuq i sar., 1995**).

Supstance koje oslobađaju pare etanola

Dokazano je da etanol inhibira rast mikroorganizama ukoliko se rasprši na površinu prehrambenog proizvoda pre pakovanja. Takođe je uočeno da je potrebno primeniti manju količinu etanola kod proizvoda sa nižom vrednošću aktivnosti vode.

Za pakovanje pekarskih proizvoda generatorima etanola najčešće se koristi lakirani PVDC, poliester folije lakirane PE ili s obe strane prevučene PVDC (50 – m) lakom.

Ispitivanja komercijalne upotrebljivosti „ethicap“ vrećica kao alternative pakovanju pod zaštitnim gasom dala su najbolje rezultate u produženju trajnosti delimično pečenih pekarskih proizvoda.

Poseban primer aktivne ambalaže je ambalaža koja sadrži antimikrobni pokazatelj koji kontroliše unutrašnjost hrane i uslove unutar ambalaže. Antimikrobna ambalaža može inhibirati rast mikroorganizama, smanjiti kontaminaciju i održati mikrobiološki kvalitet upakovanog sadržaja. Antimikrobne supstance se mogu inkorporirati u ambalažu ili se mogu naći u prevlakama ili se hemijski imobiliziraju. Aktivnost im se ogleda polaganim

otpuštanjem i penetracijom u upakovani sadržaj, izvršavajući tako svoju funkciju (**Cuq i sar., 1995**).

II.1.2.5. Pametna ili inteligentna ambalaža

Pod „inteligentnom“ se ambalažom podrazumeva materijal koji dolazi u dodir s hranom i koji ujedno ukazuje na stanje upakovane hrane te daje informaciju o svežini proizvoda.

Kod inteligentne ambalaže je prisutan spoljašnji ili unutrašnji pokazatelj pomoću kojeg se određuje kvalitet proizvoda. Tipični primeri „inteligentne“ ambalaže sadrže pokazatelje vremena i temperature koji se učvršćuju na površinu ambalaže. Na identičan način se mogu upotrebiti i pokazatelji prisutnosti kiseonika i ugljendioksida. Postoje i pokušaji upotrebe pokazatelja razvoja kvarenja proizvoda koji reaguju sa isparljivim supstancama nastalim u hemijskim, enzimskim ili mikrobnim reakcijama razgradnje (interaktivni „inteligentni“ pokazatelji).

Svrha takvih pokazatelja je promenom boje ukazivati je li došlo do promene kvaliteta pre samog početka kvarenja proizvoda. Pokazatelji temperature ukazuju (najčešće u obliku mehaničke deformacije, promene boje ili migracije boje) na toplotna opterećenja kojima je upakovani proizvod izložen u distribucionom lancu. U tom slučaju postoje dva tipa pokazatelja (**Vujković, 2007**):

- kontinualno registrovanje promene temperature (pokazatelji tipa vreme-temperatura) i
- registrovanje ekstremnih uslova tj. da li je proizvod bio izložen višim ili nižim temperaturama od kritične temperature (pokazatelji temperature).

Komercijalni pokazatelji tipa vreme-temperatura funkcionišu na osnovu hemijske difuzije, reakcija polimerizacije ili enzimatskih reakcija.

Ti su indikatori najčešće celo vreme aktivni te ih stoga treba čuvati ispod kritične temperature ili ih je potrebno fizički aktivirati. Danas se već radi na novim pokazateljima

koji se mogu sami aktivirati, što omogućuje njihovo čuvanje pri sobnim uslovima. Načelo delovanja pokazatelja kiseonika i ugljendioksida je na osnovi promene boje uzrokovane hemijskim ili enzimskim reakcijama. Najčešće dolaze u obliku etiketa ili tableta, a najveća prednost njihove primene je što pokazuju kvalitet upakovanog proizvoda. Naime, nije potrebno otvaranje ambalaže da bi se proverio kvalitet. Takođe postoji i mogućnost kontrolisanja neželjenih mikroorganizama ugradnjom ili prevlačenjem kvaterne amonijumove soli. Naime, uočeno je da bakterijske kulture ugibaju nakon 3 do 4 dana ukoliko se nanese na površinu metala, kao što je srebro, bakar ili neprerađeni nikal **(Vujković, 2007)**.

U ovoj kategoriji ambalaže posebno mesto zauzima „elektronski papir“. Reč je o tehnologiji papirnog tankog displeja, savitljivog i relativno jeftinog, koji bi mogao da se koristi umesto klasičnih nalepnica u svakoj vrsti pakovanja i ambalaže. Ova tehnologija mogla bi da u kratkom roku ambalažu potrošačkih proizvoda pretvori u digitalni medijum svetlucave grafike i teksta koji prikazuje cene, specijalne ponude sa primamljivim slikama koje trepere na minijaturnim flet ekrančićima debljine hartije, što bi bio poseban mamac za najmlade kupce.

Displej je sačinjen od polimernih fotohromnih materijala, i može da prikazuje digitalni tekst i slike zahvaljujući elektrohemijskoj reakciji i uz pomoć niskovoltnog punjenja. Kad nema strujnog punjenja, elektronsko mastilo je nevidljivo. Izvor energije čine ultratanke baterije, dok trake elektronske memorije pohranjuju slike. Trenutno problem nije u tehnologiji, već u ceni, koja dostiže i 40 dolara po komadiću od nekoliko kvadratnih centimetara.

II.1.2.6. Zaključak o savremenim načinima pakovanja prehrambenih proizvoda

Prema tržišnim pokazateljima industrija ambalaže je trenutno jedan od najbrže rastućih industrijskih sektora, posebno u prehrani, koja se u Evropi označava najvećim proizvodnim sektorom vrednim 1100 milijardi dolara. Generalno, poslovanje vezano za ambalažu iz godine u godinu postaje sve veći biznis: za 2007. godinu njegova vrednost je procenjena na 470 milijardi dolara sa prosečnom stopom rasta od 3,5 procenata godišnje. Procenjuje se da će u 2014. godini vrednost tržišta ambalaže dostići skoro 600 milijardi dolara.

Ove činjenice ukazuju na veoma brzi napredak industrije ambalaže i u tehničkom smislu. Neprekidno se pronalaze novi načini pakovanja, koji udovoljavaju sve strožijim zahtevima kupaca. Neophodno je obezbediti proizvod od kvara, ali i obezbediti i što manje izlaganje hrane nepoželjnim promenama u toku procesa proizvodnje. Ovo je moguće samo ako su sve tačke procesa veoma strogo kontrolisane, a sam proces pakovanja predstavlja jednu od kritičnih faza procesa dobijanja zdravstveno bezbednog konačnog proizvoda. Ove uslove moguće je ispuniti aseptičnim pakovanjem.

S druge strane, teži se postići što duža trajnost proizvoda bez negativnog uticaja na kvalitet, što se postiže MAP pakovanjem. Proširuju se i funkcionalne osobine ambalaže. Tako na svetskom tržištu sve veću primenu imaju inteligentna i aktivna ambalaža.

S obzirom na veličinu sredstava koja se ulažu u industriju ambalaže, možemo očekivati veoma brz dalji napredak sistema pakovanja. Sa tehnološkog stanovišta osnove smernice napretka sistema pakovanja su: postizanje što kvalitetnijeg proizvoda, odnosno što manje izmenjenog u odnosu na polaznu sirovinu, i obezbeđenje dobijanja zdravstveno bezbednog proizvoda.

II.2. Meso, meso riba i značaj mesa u ishrani ljudi

Pod mesom se podrazumevaju sirovi ili prerađeni delovi zaklane stoke: goveda, konja, svinja, ovaca, koza, živine i divljači, i riba i morski plodovi koji se upotrebljavaju za ljudsku ishranu (**Simić B.,1998, Novaković i Mirosavljev, 2005**).

Zasićujuća moć mesa je vrlo velika, ali stepen iskoristljivosti nije uvek isti. Što je više belančevina, a manje masti i fascija (opne mišića) meso se bolje vari i iskorišćava, a što je više masti i fascija ono se duže zadržava u želucu. Koliko će se meso zadržati u želucu



zavisi ne samo od vrste već i od načina pripremanja.

Tako na primer, kuvano meso mladih životinja i ptica se obično zadržava u želucu do 3 časa, a masno, soljeno i dimljeno, kao i prženo meso može ostati preko 5 sati (**Marsden, 2002**).

Meso predstavlja važan izvor biološki vrednih proteina, gvožđa (hem-gvožđa koje se bolje usvaja od strane našeg organizma), cinka, bakra i vitamina B₁₂. Svi navedeni sastojci nedostaju namirnicama biljnog porekla. Meso sadrži dosta fosfora što utiče na kombinaciju sa drugim namirnicama, tj. meso treba kombinovati sa namirnicama koje sadrže manje fosfora, kako bi se omogućila apsorpcija gvožđa i drugih mineralnih komponenti i oligoelemenata.

Meso peradi, a naročito crveno meso sadrže manje ili veće količine masti, pre svega zasićenih masti, zatim fosfolipide, holesterol, oksidacione proizvode holesterola i liposolubilne vitamine. Što je meso manje masno to sadrži više belančevina (**Trbović, 2004-05**).

Ugljeni hidrati se u mesu nalaze u vidu glikogena u neznatnim količinama, pa su bez energetskog značaja, ali utiču na kvalitet mesa u toku tzv. faze sazrevanja mesa nakon klanja.

Meso se mora podvrgavati dejstvu toplote da bi se učinilo ukusnijim i lakše svarljivim, ali u toku termičke obrade nastaju i promene koje smanjuju biološku vrednost mesa. Pri termičkoj obradi mesa dolazi do promene boje, smanjenja zapremine i težine, meso postaje kompaktno i krto. Koagulacija belančevina odigrava se na temperaturi od 60 - 63°C. Prema tome kada je temperatura postignuta i u središnjim delovima komada, naročito ako su u pitanju veliki komadi mesa, onda se može smatrati da je meso dovoljno termički obrađeno.

Energetska vrednost najviše zavisi od sadržaja masti u njemu, a zatim od sadržaja proteina. Masna mesa su kaloričnija, ali imaju manju biološku vrednost. Meso peradi bez kože ima manju energetska vrednost naročito belo meso brojlera (tovljeni pilići) i ćureće meso. Zato u ishrani treba odabrati posnija mesa kao što su meso živine i meso mladih životinja (junetina, teletina).

Zbog svog nutritivnog sastava meso u ishrani trebalo bi da bude zastupljeno 10-13% od ukupne energetske vrednosti **(Trbović, 2004-05)**.

II.2.1. Meso riba – značaj u ishrani ljudi

Riba je odličan izvor biološki vrednih proteina, liposolubilnih vitamina i minerala, ali je nedovoljno zastupljena u ishrani ljudi. Meso riba je visoke nutritivne i biološke vrednosti, lako je svarljivo.

Sastavljeno je od biološki vrednih proteina, koje karakteriše povoljan odnos esencijalnih i neesencijalnih aminokiselina. Meso ribe u mnogim zemljama predstavlja dominantan izvor proteina. Prosečan sastav proteina u mesu ribe kreće se od 12-24% ili prosečno oko 18% **(Cvrtila i Kozačinski, 2006)**. Riblji proteini se dele u 3 grupe : strukturalne (aktin, miozin, tropomiozin) 70-80% učešća, sarkoplazmatske (mioalbumin, globulini, enzimi) 25-30% učešća i vezivno-tkivne proteine (kolagen) sa oko 3% učešća **(Huss, 1995)**.

Od osnovnih sastojaka mesa ribe, najviše varira sadržaj masti koja je različita kod različitih vrsta ribe, kao i kod iste vrste riba zavisno od sezone lova, ishrane, starosti, pola

i polnog ciklusa ribe. Masti riba sadrže polinezasićene omega-6 masne kiseline i omega-3 masne kiseline. Naročito bogate ovim kiselinama su skuša, haringa, srdele, tuna, bakalar, beli amur, beli i sivi tolstolobik, jezerska pastrmka i losos. Koeficijent svarljivosti masti sveže ribe, zamrznute i dimljene ribe iznosi i do 91% (**Baltić i Tadić, 2001**).

Tabela 2.7. Esencijalne aminokiseline u proteinima različitog porekla (**Huss, 1995**)

<i>Aminokiseline</i>	<i>Riba (%)</i>	<i>Mleko (%)</i>	<i>Govedina (%)</i>	<i>Jaja (%)</i>
Lizin	8.8	8.1	9.3	6.8
Triptofan	1.0	1.6	1.1	1.9
Histidin	2.0	2.6	3.8	2.2
Fenilalanin	3.9	5.3	4.5	5.4
Leucin	8.4	10.2	8.2	8.4
Izoleucin	6.0	7.2	5.2	7.1
Treonin	4.6	4.4	4.2	5.5
Metionin-cistin	4.0	4.3	2.9	3.3
Valin	6.0	7.6	5.0	8.1

Meso ribe ima nizak sadržaj holesterola (50-75mg na 100g). Meso ribe sadrži i neznatne količine ugljenih hidrata u obliku glikogena i visok sadržaj vode (60-80% od ukupne mase) (**Šoša, 1989**). Uopšte je masnije meso ribe uz glavu, a manje masno oko repa. Količina masti u pojedinoj ribi važno je zbog kalorija koje oslobađa, ali od nje zavisi i način pripreme ribe. Masnu ribu treba kuvati ili peći na žaru, sa što manje začina, jer se polinezasićene masne kiseline na taj način najviše sačuvaju u svom prirodnom obliku.

Energetska vrednost mesa ribe zavisi od količine masti. Sadržaj masti različitih vrsta riba se kreće od 0.5 do 22% (**Tarr, 1954**). Izvršena je podela riba na: posne ribe (sa manje od 5% masti) – oslić, zubatac, iverak, škarpina, smuđ, grgeč, štika, pastrmka; polumasne ribe (sa 5-10% masti) – srdela, bakalar, inćun, ugor, cipal, sitna bela riba, beli amur, deverika, tolstolobik, jesetra, klen; masne ribe (sa više od 10% masti) – skuša, papalina, haringa, losos, tuna, som, šaran) (**Baltić i Teodorović, 1997**). Postoje i tzv. visokomasne vrste riba (tovljeni šaran, jegulja, kečiga) koje gomilaju mast u potkožnom masnom tkivu (**Lambaša i sar., 2005**).

Ribe su odličan izvor mineralnih materija i to najviše fosfora, kalijuma, kalcijuma, natrijuma, a morske ribe i joda (čak 100 puta veća količina joda nego u mesu sisara) koji je potreban za sintezu hormona štitne žlezde. Zbog visokog sadržaja fosfora, meso ribe se preporučuje u ishrani ljudi pri pojačanom psihofizičkom naporu i osobama koje se bave intelektualnim radom (**Lambaša i sar., 2005**). Meso riba sadrži više neorganskih materija nego meso sisara. Količina neorganskih materija je između 1.0-1.5%. Riba je značajan izvor i selena, koji je neophodan u aktivnosti mnogih enzima, održavanju funkcije imunog sistema, reprodukciji, metabolizmu vitamina E i regulisanju rada tireoidne žlezde.

Tabela 2.8. Sadržaj minerala u ribljem mesu (**Huss, 1988**)

<i>Element</i>	<i>Prosečna vrednost (mg/100g)</i>	<i>Raspon vrednosti (mg/100g)</i>
Natrijum	72	30-134
Kalijum	278	19-502
Kalcijum	79	19-881
Magnezijum	38	4.5-452
Fosfor	190	68-550

Od hidrosolubilnih vitamina u mesu riba su prisutni: vitamin B₁, B₂, niacin, pantotenska kiselina, a od liposolubilnih vitamin A, vitamin D, vitamin E i vitamin K. Koncentrat vitamina A i D je riblje ulje, koje se dobija iz jetri morskih riba hladnog mora. Količina vitamina grupe B je slična količini ove grupe vitamina u govedem mesu. Vitamin E je u velikoj količini prisutan u nekim vrstama riba kao što je pastrmka.

Meso ribe je svarljivije od mesa stoke za klanje jer mišićno tkivo je sastavljeno od nežnih mišićnih vlakana. Mišići ribe sadrže manje vezivnog tkiva od mišića stoke za klanje, pa se samim tim meso ribe brže i lakše resorbuje i ima visok koeficijent svarljivosti koji je uslovljen malom količinom kolagena i neznatnom količinom elastina. Zato se meso riba lako i brzo kulinaro priprema, a varenje u digestivnom traktu traje 2 do 3,5 sata, za razliku od mesa kopnenih životinja čije varenje traje od 3,5 do 5 časova. Iz tog razloga po konzumiranju ribe veoma brzo se javlja osećaj gladi. Brzim varenjem mesa riba i ribljih proizvoda digestivni trakt se manje opterećuje, troši se manje energije i digestivnih

sokova, a sve to ima pozitivan uticaj na organizam. Zbog toga se preporučuje i kao dijetalna hrana. Sem toga, brzim varenjem ribljeg mesa i iskorišćavanjem sastojaka smanjuje se mogućnost delovanja truležne mikroflore debelog creva i stvaranje jedinjenja koji toksično deluju na organe i tkiva organizma (**Trbović, 2004-05**).

Sa nutricionističkog stanovišta riba je jedna od vodećih namirnica u ishrani. Može se preporučiti u ishrani u najosetljivijim razdobljima ljudskog života. To su, u prvom redu, doba odojčeta i ranog detinjstva, kada se organizam psihički i fizički najintenzivnije razvija. Ribu treba uvrstiti u ishranu radnika i u ishranu sportista. U poodmaklom životnom dobu, tokom starosti, riba je nezaobilazna namirnica i gotovo nema alternative u nekoj drugoj namirnici. Od sveže, zamrznute ili dimljene ribe resorbuje se oko 95% proteina (**Baltić i Teodorović, 1997**).

Tabela 2.9. Značaj mesa ribe – sadržaj hranljivih materija kod pojedinih kategorija mesa (**Ćirković, 2002.**)

<i>Vrsta mesa</i>	<i>Voda (%)</i>	<i>Proteini (%)</i>	<i>Meati (%)</i>	<i>Energetska vrednost (KJ)</i>
Šaran	79.27	17.63	1.93	355
Pastrmka	76.3	19-20	0.8	351
Svinjsko meso	56.8	17-19	25.3	1238
Goveđe meso	74.3	20	3.5	485
Piletina	74.6	21.5	2.5	460
Jagnjetina	66.4	19.7	12.7	812

Ujedno je riba kao namirnica veoma pogodna u ishrani osoba koje žele smanjiti telesnu težinu, a takođe se preporučuje i u ishrani i dijetoterapiji različitih bolesnika (bolesti jetre i srca, maligne bolesti, loša apsorpcija hrane ili loša probava).

Pržena riba manje je svarljiva od ribe kuvane na pari ili pečene na žaru, a osim toga prženjem se smanjuju nutritivne vrednosti ribe. Uz to, u ulju za vreme prženja na visokim temperaturama mogu nastati toksične supstance (**Verbanac D., 2002**).

Zbog svog nutritivnog sastava i dobre svarljivosti preporučuje se korišćenje ribe najmanje 2 puta nedeljno (kao prevencija nastanku kardiovaskularnih bolesti), a optimalno bi bilo 3 puta nedeljno (posebno kod osoba sa kardiovaskularnim bolestima).

Riba se stavlja u promet prema poreklu, pečaturi i kvalitetu. Prema poreklu riba se stavlja u promet kao morska i slatkovodna.

Tabela 2.10. Hemijski sastav pojedinih morskih riba (*Šoša, 1989; Anon, 2006*)

<i>Hranljive materije</i>	<i>Jedinica mere</i>	<i>bakalar</i>	<i>sardina</i>	<i>tuna</i>
Energetska vrednost	kcal	105	208	184
Voda (%)	g	79.8-85.1	66.8-78.1	59.0-72.0
Mast(%)	g	0.1-0.9	0.9-17.2	4.0-16.0
Proteini(%)	g	13.4-19.0	15.4-17.6	21.0-27.0
Kalijum	mg	244	397	323
Fosfor	mg	138	490	326
Kalcijum	mg	14	382	10
Magnezijum	mg	42	39	64
Gvožđe	mg	0.49	2.92	1.31
Natrijum	mg	78	505	50
Mangan	mg	0.02	0.108	0.02
Cink	mg	0.58	1.31	0.77
Bakar	mg	0.036	0.186	0.11
Selen	mcg	37.6	52.7	46.8
Vitamin C	mg	1	-	-
Vitamin B1	mg	0.088	0.08	0.278
Vitamin B2	mg	0.079	0.227	0.306
Pantotenska kiselina	mg	0.18	0.64	1.37
Vitamin B6	mg	0.283	0.167	0.525
Vitamin B12	mcg	1.05	8.94	10.88
Vitamin A	IU	47	108	2520
Vitamin E	mg	0.81	2.04	-
Vitamin K	mcg	0.1	2.6	-
Vitamin D	IU	46	193	-

Tabela 2.11. Hemijski sastav pojedinih slatkovodnih riba (Cvrtila i Kozačinski, 2006)

Hranljive materije	Jedinica mere	šaran	som	smuč
energetska vrednost	kcal	125	175	91
voda	g	75.8	72.1	78.4
proteini	g	18	15.3	19.2
masti	g	4.8	11.3	0.73
minerali	g	1.17	0.98	1.22
natrijum	mg	46	280	81
kalijum	mg	306	340	237
kalcijum	mg	52	44	27
fosfor	mg	216	216	194
magnezijum	mg	30	27	18
gvožđe	mg	1.1	1.44	1.4
cink	mg	-	0.86	-
jod	µg	1.7	-	-
fluor	µg	32	-	-
hrom	µg	-	-	-
bakar	mg	0.5	0.1	26
selen	µg	137	38	8
vitamin E	mg	0.5	2	-
vitamin B1	mg	0.06	0.07	0.16
Vitamin B2	mg	0.05	0.13	0.25
Vitamin B6	mg	0.15	0.19	-
vitamin B12	mg	1.53	1.9	-
Vitamin K	µg	-	-	-
Vitamin C	mg	1	-	1
n-3 masne kiseline	mg	622	519	8

Morska riba se prema vrsti stavlja u promet kao:

- Sitna plava riba (inćun, papalina, igla, plavica, skuša, srdela, šarun)
- Krupna plava riba (sabijan, lampuga, lica, luc, palamida, tuna)
- Bela riba (rumenac, bukva, garun, kovač, oslić, škarpina, zubatac)
- Landovina (drhtulja, golub, kostelj, mačka, pas mekuš, raža)

- Mešana morska riba – mešavine sitne plave ribe, bele ribe, landovine, glavonožaca i sitnih rakova koji u pogledu pečature ne ispunjavaju uslove propisane pravilnikom za te vrste riba, odnosno glavonožaca i rakova.
- Glavonošci ili mekušci spadaju u morske plodove i to su: hobotnice, lignje, lignjići, sipa, sipica, oktopodi sa po osam krakova
- Rakovi (morski rakovi - hlap, jastog, rakovica, kozice, škampi i slatkovodni rakovi), školjkaši, morski ježevi i morski krastavci.

Slatkovodna riba se prema poreklu stavlja u promet kao:

- Slatkovodne ribe iz ribnjaka (kalifornijska pastrmka, šaran - goli, veleljuskavi i ljuskavi, beli amur, beli i sivi tolstolobik, som, smuđ, štika, karaš, američki somić i ostala bela riba)
- Slatkovodne ribe iz otvorenih voda (pastrmka, jesetra, jegulja, smuđ, som, šaran, štika, beli amur, beli i sivi tolstolobik, deverika, mrena, itd.).

II.2.2. Proizvodi od riba, rakova i školjkaša

Proizvodima od ribe, prema Pravilniku o kvalitetu i drugim zahtevima za ribe, rakove, školjkaše, morske ježeve, morske krastavce, žabe, kornjače, puževe i njihove proizvode (Anon, 2003b), smatraju se: riblje konzerve; riblje polutrajne konzerve; smrznuti proizvodi od ribe; ostali proizvodi od ribe.

II.2.2.1. Riblje konzerve

Riblje konzerve su proizvodi od ribe dobijeni preradom pojedinih vrsta ribe po odgovarajućem tehnološkom postupku. Konzerve se termički obrađuju u hermetički zatvorenim sudovima ili omotačima. Termička obrada konzervi se obavlja na temperaturi iznad 100°C i pri uslovima koji obezbeđuju sterilnost proizvoda, pri čuvanju na sobnoj temperaturi.

Pri proizvodnji ribljih konzervi kao naliv može se koristiti: ulje, sos dobijen od dodataka, salamura sa kuhinjskom solju (NaCl), vino.

Konzerve od slatkovodne ribe stavljaju se u promet kao konzerve od ukljeva, konzerve od dimljenog šarana, konzerve od dimljenog tolstolobika, konzerve od dimljene slatkovodne bele ribe, konzerve od slatkovodne bele ribe sa povrćem, voćem, pečurkama ili žitaricama i riblje paštete od slatkovodne ribe.

II.2.2.2. Riblje polutrajne konzerve

Polutrajne konzerve od morske ribe stavljaju se u promet kao marinade i proizvodi od slane ribe. Marinade su slano-kiseli nepasterizovani proizvodi proizvedeni prema određenom tehnološkom postupku, sa dodatkom povrća ili bez njega, zaliveni salamuram, sirćetnom kiselinom, sosom ili uljem.

Proizvodi od slane ribe stavljaju se u promet kao: pruženi fileti, smotani fileti, očišćena sardela u ulju, sosu ili salamuri, delimično očišćena sardela i delimično očišćen incun u ulju, sosu ili salamuri i sardelna pasta.

Kavijar je polutrajna konzerva proizvedena preradom riba iz porodice *Acipenseridae* (jesetra, moruna, pastruga i kečiga). Riblja ikra je proizvod proizveden od ikre slatkovodne ribe, kao i od ikre morske ribe.

II.2.2.3. Smrznuti proizvodi od ribe

Pod smrznutim proizvodima od ribe podrazumevaju se proizvodi od ribe, komada ribe i usitnjenog mesa ribe, koji se pre smrzavanja mogu podvrći usitnjavanju, mešanju, formiranju, termičkoj obradi, oblaganju i sl., a zatim smrznuti i uskladištiti na temperaturi ne višoj od -18 C. Smrznuti proizvodi od ribe stavljaju se u promet kao panirana riba, smrznuta riba i ostali smrznuti proizvodi od ribe.

II.2.2.4. Ostali proizvodi od ribe

Soljena riba - prema poreklu, soljena riba stavlja se u promet kao soljena morska riba i soljena slatkovodna riba. Soljena morska riba je proizvod dobijen soljenjem sardele, inćuna, skuša, haringe i drugih vrsta riba.

Soljena slatkovodna riba je proizvod dobijen soljenjem slatkovodne ribe. Prema količini soli, soljena slatkovodna riba stavlja se u promet kao jako soljena slatkovodna riba ako sadrži više od 14% soli u odnosu na neto masu ribe. Prema vrsti ribe, soljena slatkovodna riba stavlja se u promet kao soljeni šaran, soljeni smuđ, soljena štika, soljena slatkovodna bela riba, soljena moruna, soljena jesetra, soljeni som i druge soljene krupne ili okrugle slatkovodne ribe.

Dimljena riba - dimljena riba je proizvod proizveden toplim ili hladnim dimljenjem ribe. Ovaj postupak koristi se u preradi ribe, a naročito u proizvodnji dimljenog lososa, haringe, skuše, iverka, jegulje, pastrmke, bakalara, lista, šarana, deverike, ukljeve, tolstolobika, amura, smuđa i drugih vrsta ribe. Među ovim pobrojanim vrstama ribe, najpopularniji i najčešći je hladno dimljeni losos.

Dimljena riba stavlja se u promet kao hladno dimljena riba i toplo dimljena riba. Pored hladno dimljenog lososa, najpoznatiji proizvodi hladnog dimljenja su i dimljena haringa sa glavom i utrobom („Kippered herring“) i fileti tonida. U našoj zemlji i bližem susedstvu najčešće korišćena i poznata je dimljena pastrmka (**Baltić i sar., 2006**). Od toplo dimljenih proizvoda najpoznatiji su toplo dimljena haringa (Buckling), toplo dimljena papalina (Sprrott), toplo dimljena jegula, toplo dimljeni šaran i toplo dimljeni tolstolobik.

Hladno dimljena riba koja se stavlja u promet mora ispunjavati sledeće zahteve:

1) da ima miris i ukus svojstven slatkovodnoj dimljenoj ribi, s tim da neposredno posle dimljenja može imati neznatan miris i ukus mulja; bez tragova plesni, užeglog i drugog neprijatnog mirisa i ukusa.

2) da meso ima boju dimljene ribe i da je suvo i čvrste konzistencije.

3) da ne sadrži više od 14% soli.

Sušena riba - Sušena riba je proizvod dobijen sušenjem mesnatih vrsta ribe na vazduhu, uz upotrebu soli ili bez nje.

Prema vrsti ribe od koje je proizvedena, sušena riba stavlja se u promet kao sušeni bakalar i ostala sušena riba.

Gotova jela - Gotova jela od ribe se proizvode od mesa različitih vrsta ribe i proizvoda od ribe, drugih namirnica, dodataka i aditiva.

Kobasice od ribe - Kobasice od ribe se proizvode od različitih vrsta morske i slatkovodne ribe, čistog mesa pernate živine, mašinski otkošćenog mesa pernate živine ili mesa krupne stoke za klanje, biljne ili životinjske masti i masnog tkiva, dodataka i aditiva. Ukupna količina upotrebljenog mesa i masnog tkiva pernate živine ili mesa i masnog tkiva krupne stoke za klanje, ne sme biti veća od 40% u odnosu na neto masu količinu mesa ribe. Kobasice od ribe stavlja se u promet kao: sveže kobasice, barene kobasice, kuvane kobasice.

II.2.2.4.1. Zašto dimljena riba?

Savremenim načinom života promenjen je i način ishrane. Umesto masnoća koje su bile potrebne zbog napornog rada i kretanja, današnjem čoveku, zbog smanjene potrebe za hranom prevashodna ishrana su proteini. Dimljena riba je izuzetno bogata proteinima. Tradicionalnim načinom dimljenja nutritivna vrednost ribe ostaje potpuno sačuvana. Samo jedna porcija dimljene ribe svakodnevno podmiruje skoro celodnevnu potrebu organizma za proteinima, gvoždem, kalcijumom i vitaminom D. Konzumiranje dimljene ribe se preporučuje osobama koje žive i rade u uslovima stresa, a takođe deci, trudnicama i osobama u starosti. Zbog svog nutritivnog sastava i dobre svarljivosti preporučuje se

konzumiranje dimljene ribe 2 puta nedeljno (kao prevencija nastanku kardiovaskularnih bolesti), a optimalno bi bilo 3 puta nedeljno.



Dimljenje, kao jedan od najstarijih postupaka konzervisanja mesa, pa i mesa ribe, potiče još iz praistorijskih vremena, iako se danas postupak dimljenja ribe u razvijenim zemljama primenjuje pre svega, da bi se poboljšale same senzorne karakteristike ribe (**Foucat i sar., 2008; Vasiliadou i sar., 2005**). Jedna teorija upućuje na to da je dimljenje postupak koji je korišćen još pre postupka sušenja mesa, jer dim vatre koji se pre svega koristio za zagrevanje ribe i njeno aromatiziranje, ujedno je i sušio ribu, koja je visila okačena u prvim ljudskim skloništima i nastambama (pećine). Grci i Stari Rimljani su takođe uživali u dimljenoj ribi. Vrhunac potrošnje dimljena riba dostiže tokom Srednjeg veka. U Srednjem veku, veliki broj ribljih proizvoda je bio usoljen i dimljen, jer je takav proizvod bio dugo održiv i u uslovima bez hlađenja. Međutim, ovakav način pripreme rezultirao je često proizvodima koji su imali grubu teksturu, sličnu donu cipela (**Kilibarda, 2009**). I nativni Amerikanci gajili su veliko poštovanje prema dimljenoj ribi.



Eskimi koji koriste mnogo ribe bogate omega 3 masnim kiselinama u svojoj ishrani imaju snižen LDL - štetan holesterol i povećan HDL - dobar holesterol. Nekoliko velikih kliničkih studija je potvrdilo da ishrana ribom smanjuje nivo ukupnog holesterola i triglicerida u krvi. U populaciji Eskima nije do sada zabeležen slučaj srčanih ili moždanih problema izazvanih ishranom baš zbog njihove prevashodne ishrane bogate ribom.



Potrošnja dimljene ribe zabeležila je značajan porast u poslednjoj deceniji na tržištu mnogih evropskih zemalja (**Cardinal i sar, 2001**). Taj porast potrošnje, uslovljen je značajnim povećanjem uzgoja riba, a pre svega lososa (Atlantic salmon) u akvakulturi. Proizvodnjom lososa u akvakulturi znatno se povećala količina ove ribe na tržištu, pa samim tim i količina ove ribe za preradu, odnosno dimljenje. Proizvodnja dimljenog lososa je počela dvadesetih godina prošlog veka u manjim količinama koje su bile u skladu sa luksuznim imidžom ovog proizvoda. Međutim, krajem dvadesetog veka, blizu 40-50% uzgojenog lososa u Evropi konzumira se kao hladno dimljeni proizvod (**Birkeland i sar., 2004; Røra i sar., 1999; Einen i Skrede, 1998**). Zato se danas može reći da je od nekad, ekskluzivnog proizvoda namenjenog malom broju potrošača, postao sve dostupniji većem broju konzumenata (**Foucat i sar., 2008**).

Dimljenje, kao postupak konzervisanja hrane, za neke vrste riba ima veliki značaj jer se na taj način, tržištu može ponuditi dodatni asortiman određene vrste ribe, u slučajevima kada je konzumiranje sveže ribe limitirani, bilo zbog prekomernog izlova ili zbog visokog sezonskog ulova (**Gómez-Guillén i sar., 2006**).

Učešće dimljene ribe u ukupnoj ponudi ribe i proizvoda od ribe u svetu je u stalnom porastu. U periodu od 2004. do 2005. godine u ukupnoj ponudi, na svetskom tržištu, dimljene ribe bilo je 11.6%, a u Francuskoj oko 20%. Podaci o obimu proizvodnje dimljene ribe se vode posebno za salmonidne vrste riba i haringu, kao vrste sa najdužom tradicijom dimljenja, dok se podaci o obimu proizvodnje za ostale vrste dimljene ribe vode zajedno (**Kilibarda i sar, 2009**). Ukupno prosečna proizvodnja dimljene ribe za period od 2003. do 2005. godine bila je 810 798 tona. U ukupnoj proizvodnji dimljene ribe učešće salmonidnih vrsta bilo je 10.82%, haringe 4.64% i ostalih vrsta dimljene ribe 84.54%. Najveći proizvođač dimljenih salmonidnih vrsta je Francuska sa 27.14% od ukupne proizvodnje, a zatim slede Nemačka, Danska i Velika Britanija. Kanada je najveći svetski proizvođač dimljene haringe sa 27.82% od ukupne svetske proizvodnje. Od ostalih vrsta dimljenih riba najveću proizvodnju ima Kina sa 39.15% od svetske proizvodnje, a potom slede Tajland, Poljska, Filipini, Indonezija (**Popović i sar., 2008**;

Kilibarda, 2010). U zemljama trećeg sveta se čak 70% ukupno izlovljene ribe konzerviše dimljenjem (**Goktepe i Moody, 1998**).

U Srbiji obim proizvodnje dimljene ribe je vrlo mali obzirom na broj objekata koji se bave preradom ribe i njihovih preradnih kapaciteta, tako da je proizvedena dimljena riba u našoj zemlji namenjena uglavnom specijalizovanim ribljim restoranima (**Kilibarda, 2010**).



Današnji proizvodi od mesa su slabo dimljeni, tek toliko da dim da mesu poželjne senzorne karakteristike (karakterističan miris i ukus, atraktivan izgled), zbog kojih se potrošači i opredeljuju za ovu vrstu namirnica (**Cardinal i sar., 2006**). Proizvod od dimljene ribe sadrži od 2-4% soli, a prema postojećim američkim HACCP regulativama, procenat soli u hladno dimljenoj ribi trebalo bi da bude 2.5%, dok za ribu pakovanu u vakuumu ili modifikovanoj atmosferi sadržaj soli ne bi smeo biti ispod 3.5% (**Ward, 2001**). U hladno dimljenoj ribi procenat vode se kreće između 60-70%, a ta količina vode zavisi od količine masti (može biti i do 13.5%). Proteina u dimljenoj ribi ima oko 25.7%, a mineralnih materija oko 1.5%. Energetska vrednost dimljene pastrmke je oko 966 kJ, a pH je od 5.8 do 6.3 (**Røra i sar., 1999; Baltić i Teodorović, 1997**).

Dimljena riba je bogata proteinima i Omega 3 masnim kiselinama. Omega-3 masne kiseline su esencijalne masne kiseline. Esencijalne znači da organizam ne može da ih sintetise, već se moraju uneti hranom. Omega 3 masne kiseline se nalaze u masnoj morskoj ribi, kao što je losos, skuša, bakalar. Nutricionisti preporučuju unos ribe bar 3

puta nedeljno, naročito bogate Omega 3 masnim kiselinama. Omega3 masne kiseline utiču na smanjenje srčanih oboljenja i holesterola.

II.2.2.4.2. Tehnologija konzervisanja ribe dimljenjem

Tehnologijom konzervisanja ribe dimljenjem, meso ribe gubi znatan deo vode i dehidrira, a delovanje dima konzervira ribu. Istovremeno, dim daje ribi specifičan ukus i boju. Zato se može reći da dimljenje ribe ima dvojaku funkciju, pored toga što deluje konzervišuće, dimljenje utiče i na senzorne karakteristike proizvoda.

Dim koji se koristi za dimljenje mesa ribe nastaje nepotpunim sagorevanjem drveta. Za dimljenje se uglavnom upotrebljava bukovo drvo ili kombinacija bukovog i hrastovog. Pored toga može se koristiti i drvo graba, cera, jasena i oraha. Crnogorično drvo nije preporučljivo zbog velikih količina smole. Dim je mešavina vazduha, vodene pare, ugljen dioksida, ugljen monoksida i najmanje nekoliko stotina različitih organskih komponenti prisutnih u aerosolu u različitim koncentracijama koje mogu biti u gasnoj fazi, ili dispergovane u vidu kapljica ili partikula u vidu prašine (**Baltić i sar., 2006**). Dim čine četiri glavne klase jedinjenja: kisela jedinjenja, fenolne komponente, karbonilna jedinjenja i policiklična aromatična hidrokarbonilna jedinjenja (**Guillén i sar., 2006; Shahidi, 1998**).

Prirodno suvo drvo sadrži oko 20% vode i 80% suve materije. Suvu materiju drveta čine celuloza, hemiceluloza i lignin. Broj jedinjenja koji nastaje sagorevanjem celuloze je velik. Sagorevanjem celuloze i hemiceluloze nastaju karbonilne i kisele frakcije dima, a sagorevanjem lignina nastaju fenolne komponente dima.

Postoje dva osnovna načina dimljenja ribe, u zavisnosti od temperature koja se postiže u pušnicama (**Anon, 2013**):

- 1) hladno dimljenje (dimljenje na niskim temperaturama od 20-30°C, najčešće 28–32°C)
- 2) toplo dimljenje (dimljenje na visokim temperaturama od 70-130°C, najčešće 70–80°C).

Pojedini autori navode da postoje tri vrste dimljenja: hladno (12-25°C), toplo (25-45°C) i vruće dimljenje (40-100°C) (**Stolyhwo i Sikorski, 2005**). Hladno dimljenje kojim se dobija proizvod nežnije strukture karakteristično je za Francusku, dok se toplo dimljenje, na temperaturama iznad 60°C, praktikuje u Nemačkoj, Poljskoj i zemljama Severne Evrope (**Duffes, 1999**).

Hladno dimljenje zahteva da se riba prvo usoli, i to jakim, tvrdim soljenjem, suvim i mokrim postupkom. Riba se tada može jesti i sirova. Suvo soljenje se izvodi tako da ribu obilno treba posoliti i držati 1-1,5 sat. Mokro soljenje, salamurenje izvodi se na taj način da se napravi 5-8% rastvor soli u vodi, a potom meso ribe ogrezne 12 sati. Salamura se koristi samo jednom. Može se napraviti zasićen rastvor soli (27-33%), pri čemu se riba drži u tom rastvoru 2 sata. Nakon soljenja sledi dimljenje.

Riblje meso se hladno dimi dva do tri dana.

Ako je riba masnija, treba je jače usoliti i držati duže u salamuri (12 sati u 20% rastvoru kuhinjske soli), a zatim je preseći na uzdužne polovine i hladno dimiti 5-6 dana.

Kod toplog dimljenja, za razliku od hladnog, uzima se samo sveža riba, tj. neobrađena. To znači da se može koristiti i duboko zamrznuta riba, koja pri tom neće izgubiti ništa od svog ukusa.

I kod toplog dimljenja ribu treba usoliti. Obično se stavlja u 10% slani rastvor, odnosno salamuru, a trajanje usoljavanja zavisi od veličine i vrste ribe. U svakom slučaju ono traje do jedan sat.

Prema vrstama ribe razlikuju se dve metode toplog dimljenja:

- toplo-suvo dimljenje (za pastrmke, šarane, bele ribe)
- toplo-mokro dimljenje (za jegulje, masne ribe)

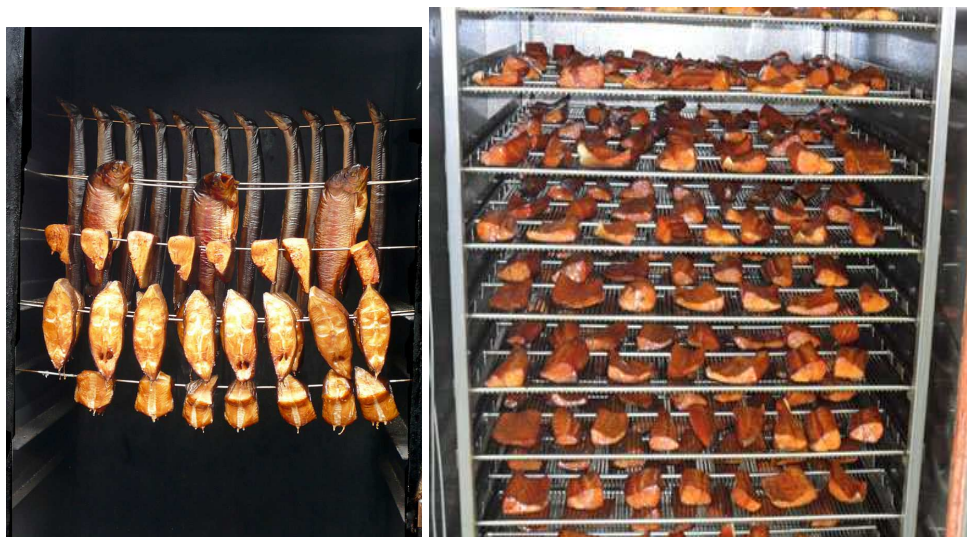
Kod toplo-suvog dimljenja riba se okači u hladnu peć. Vrata peći i otvor za provetravanje treba da su otvoreni, a vatra u početku slaba, od 60-70°C. Postepenim zagrevanjem riba se donekle suši. Taj period treba da traje oko 30 minuta. Ukoliko bi se peć prebrzo zagrejala, stvorila bi se vodena para i ribe bi omekšale i čak popadale.

Posle perioda sušenja zatvaraju se vrata od peći, a temperatura treba da počne da raste. Ako se peć loži drvima, treba ložiti manjim komadima i postepeno, kako riba ne bi izgubila masnoću.

Najviša temperatura u ribi treba da dostigne 115°C i taj period treba da traje oko 15 minuta kako bi se uništili mikroorganizmi. Temperatura se zatim postepeno spušta na 60°C, tako da vreme do potpunog gotovljenja ribe traje 45 minuta. Ovaj završni period dimljenja treba strogo kontrolisati.

Na kraju se primenjuje i „bojenje” ribe. Naime, za vreme dimljenja riba dobije svetlo žutu boju. Da bi boja bila jača, zlatno žuta, drvo koje je skoro izgorelo prekrije se pepelom, što pojačava dimljenje. Posle toga ribu treba ostaviti još 45 minuta u peći.

Ukupno vreme toplo-suvog dimljenja je, dakle, 120 minuta kod pastrmke težine oko 300 grama koja je smeštena u peć u nizu od dva reda koji vise jedan iznad drugog.



Toplo-mokro dimljenje koristi se za konzerviranje jegulja i ostalih masnih riba (som ili veći šaran, preko 3 kg). Kod ovakvog načina dimljenja, pre nego što se okače ribe, peć treba dobro zagrejati. Temperatura zavisi od veličine i količine masne ribe, ali ne sme biti niža od 90°C. Pre stavljanja u peć ribu treba potopiti u mlaku vodu, da bi im koža ostala glatka i da ne bi popucala. Mokru ribu treba brzo okačiti u peć kako bi se očuvala toplota peći. Vrata treba zatvoriti, ali otvor za provetravanje ostaje otvoren. Temperaturu treba

održavati na 90°C oko 30 minuta. Tada je riba skoro gotova. Za to vreme češće ubacivati u peć sitna drva da bi se održala toplota.

Posle ovog perioda vatra se pospe pepelom, a otvor za provetravanje zatvori. Masna riba ostaje unutra dok ne dobije zlatno žutu boju, a i temperatura se ne spusti na 60°C.

Ceo ovaj proces traje od 90-120 minuta, ukoliko su komadi ribe od 300 do 500 grama. Vatru na kraju ugasi peskom, a nikako vodom, da se ne bi stvorila vodena para.

Kad se završi proces dimljenja, ribe se moraju odmah hladiti. Hlađenje ne treba da je preterano naglo jer bi riba tako izgubila miris dimljenja. Preporučuje se da ribe ostanu okačene u peći pri otvorenim vratima i otvoru za provetravanje, ali ne zadugo, a mogu i odmah da se izvade i okače na promajno mesto.



Dimljenje se može obavljati u klasičnim (tradicionalnim) ili automatskim (modernim) pušnicama.

Tradicionalni način dimljenja podrazumeva dimljenje usoljene, eviscerirane, filetirane ili cele ribe koje se odvija na otvorenom ložištu smeštenom u pušnici ili izvan nje. Dim koji nastaje sagorevanjem drveta u ložištima, nalazi se direktno ispod riba ili fileta koje mogu biti okačene ili položene na mreže. U ovakvim uslovima, naročito zbog prisustva kiseonika, teško je kontrolisati temperaturu dimljenja. Nemogućnost da se obezbedi optimalna temperatura pirolize drveta kao i neprečišćavanje dobijenog dima, nose sa

sobom rizik da se u gotovom proizvodu nađu štetna jedinjenja u većim koncentracijama **(Baltić i sar., 2006).**

U modernim industrijskim objektima, sagorevanje drveta i nastanak dima se vrši u komori (generatoru) koja je odvojena od komore (pušnice), mesta gde se vrši dimljenje mesa. U tim uslovima može se kontrolisati temperatura sagorevanja drveta, vlažnost vazduha, brzina cirkulacije vazduha, količina i kvalitet dima **(Dimitriadou i sar., 2008).** Pored toga, dim se na putu od generatora do pušnice može prečišćavati korišćenjem različitih tehnika, a najjednostavniji je hlađenjem dima **(Martinez i sar., 2007).** Dim se može hladiti prolaskom kroz tzv. „vodenu zavesu“ ili prevođenjem preko hladnjaka. Elektrostatička filtracija je takođe postupak kojim se dim prečišćava, ali se ovim postupkom pored štetnih materija dima (oko 70%), mogu odstraniti i neke materije korisne za proces dimljenja **(Baltić i sar., 2006).**

II.3. Održivost dimljene ribe pakovane u VP i MAP

Dimljenje, kao način konzervisanja mesa ribe ima dvojak u ulogu: deluje konzervišuće i utiče na senzorne karakteristike proizvoda. Efekat konzervisanja dimljenjem se zasniva na delovanju toplote i komponenti dima na mikroorganizme i promenama na osnovnim sastojcima u mesu koje nastaju delovanjem dima. Dimljenjem se, pored toga, smanjuje količina vode u mesu ribe, čime se održivost krajnjeg proizvoda produžava. I temperature koje se koriste tokom hladnog dimljenja ribe su najčešće dovoljne da deluju konzervišuće na samo meso ribe **(Leroi i sar., 2000; Gudbjornsdottir i sar., 2010).**

Dimljenje utiče povoljno na održivost mesa zato što veliki broj komponenata dima – organske kiseline i alkoholi, aldehidi i ketoni, posebno fenoli, imaju bakteriostatsku i fungistatsku aktivnost prema nekim vrstama bakterija i gljivica. Bakteriostatska aktivnost dima, zavisi od vrste drveta koje se koristi za dimljenje **(Sikorski i Kolodziejska, 2002; Leroi i Joffraud, 2000).** Fenolna frakcija dima ima pored antimikrobne aktivnosti i

antioksidativnu aktivnost, a prisustvo fenolnih frakcija zavisi od temperature dimljenja, vrste drveta i količine prisutnog vazduha u pušnici (**Bower i Hietala, 2010; Sérot i Lafficher, 2003**). Od najznačajnijih antioksidativnih frakcija izdvajaju se posebno pirogalol, resorcinol, 4-metilgvajakol, 4-vinilgvajakol, 4-trans-propenilsiringol, gvajakol, siringol. Aldehidi i ketoni dima se deponuju na površini mesa i tako stvaraju specifičnu antiseptičnu barijeru koja sprečava prodor mikroorganizama u unutrašnjost proizvoda i time dovedu do kvara namirnice (**Stolyhwo i sar., 2006**).

Dimljenjem mesa ribe utiče se na promenu u mikroflori proizvoda, smanjuje se broj Gram negativnih bakterija u korist Gram pozitivnih, što je posledica veće osetljivosti Gram negativnih bakterija na antimikrobno dejstvo komponenata dima. Vegetativne forme bakterija su mnogo osetljivije na dejstvo dima od bakterijskih spora i kvasaca koji su relativno otporni (**Sikorski i Kolodziejska, 2002; Lyhs, 2002**). Međutim, antimikrobno dejstvo dima u dimljenim proizvodima, ograničeno je uglavnom na površinu proizvoda, jer njihova koncentracija opada prema unutrašnjosti, a i vremenom sastojci dima isparavaju. Iz ovih razloga se opravdano smatra da dimljenje nije postupak kojim bi se pouzdano mogle inhibirati patogene bakterije (salmonele, *Cl. botulinum*). Fenolna jedinjenja dima nemaju inhibitorni efekat na rast *Listeria monocytogenes*, za razliku od formaldehida. Čak, i dim indirektno pomaže rast anaerobnih vrsta bakterija, jer otežava prodiranje kiseonika u dublje slojeve mesa. Čest je slučaj da se u dimljenim proizvodima stvara povoljna sredina za rast mikroaerofilnih laktobacila (**Niedziela i sar., 1998**).

II. 3.1. Parametri od značaja za kvalitet dimljene ribe

Velik je broj činilaca koji utiču na kvalitet dimljene ribe, a pre svega se odnose na izbor sirovine (uticaj ishrane ribe na kvalitet mesa i gotovog proizvoda, uslovi sredine tzv. ambijentalni uslovi, genetski faktori, pol i polna zrelost ribe, životni ciklus ribe, itd.) (**Hovda i sar., 2008**).

Izučavanje uticaja činilaca od značaja za kvalitet ribe, a koji su vezani za proizvodni proces su vrlo česti. Literaturni podaci odnose se, najčešće, na uticaj mikrobiološke

kontaminacije sirovine, uticaj klanja i obrade pastrmke, salamurenja (način soljenja, sadržaj soli) i dimljenja (dužina dimljenja, temperatura dimljenja) i načina pakovanja i čuvanja gotovog proizvoda (**Sikorski i Kolodziejska, 2002**). Posebna pažnja posvećena je održivosti dimljene ribe čiji se kao glavni indikatori u literaturi spominju i prate: bakteriološki status, fizička i hemijska svojstva i senzorne osobine (**Ibrahim i sar. 2008; Cardinal i sar., 2004; Røra i sar., 1999**).

Standardni kvalitet u proizvodnji dimljene ribe nije jednostavno održati i zavisi od brojnih činitelja vezanih kako za gajenje ribe, tako i za sam proizvodni proces (**Haugen i sar., 2006; Birkeland i sar., 2004**). Proces proizvodnje dimljene ribe može da se podeli u nekoliko faza :

- klanje i primarna obrada ribe
- soljenje i odsoljavanje
- sušenje i dimljenje
- pakovanje i čuvanje gotovih proizvoda (**Baltić i sar., 2006**).

Izbor sirovine

Za kvalitet dimljene ribe neophodan je izbor početne sirovine, koja mora da bude higijenski ispravna, neškodljiva po zdravlje potrošača, ispitanog bakteriološkog statusa, i adekvatnih hemijskih i fizičko-hemijskih osobina.

Izuzetno važan uslov je da sirovina bude mikrobiološki ispravna. Kontaminacija sirovine ribe bakterijama je česta, i može biti direktna (mikroorganizmi potiču iz zagađene sredine) ili indirektna (kontaminacija nastaje usred manipulacije ribom od izlova preko transporta i čuvanja ribe do početka proizvodnog procesa (**Baltić i sar., 2006; Karabasil i sar., 2005**)).

Neadekvatan izbor sirovine, nepažljiva manipulacija sirovinom u toku primarne obrade i nekorektna i nehigijenska proizvodnja mogu usloviti, sa jedne strane kontaminaciju sirovine nepatogenim mikroorganizmima koji smanjuju kvalitet gotovog proizvoda, ali sa druge strane, što je značajnije sa aspekta zdravlja potrošača, pojavu patogenih mikroorganizama u gotovom proizvodu, što je

ujedno i najznačajniji aspekt bezbednosti hrane. Patogeni mikroorganizmi u dimljenim proizvodima od ribe mogu da se podele na :

- svojstvene patogene bakterije (one koje potiču iz vodene sredine): *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio spp.*, *Clostridium botulinum* tip E;
- ne-svojstvene patogene bakterije (one koje su u mesu ribe dospеле kao posledica naknadne kontaminacije u toku procesa proizvodnje, a čiji su rezervoari ljudi i životinje) : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* (**Dimitrijević, 2007; Huss i sar., 1995**).

Pored mikrobiološkog statusa sirovine ribe, na kvalitet gotovog proizvoda utiču i sadržaj masti i masa ribe. Sadržaj masti i njen kvalitet utiču na energetske i hranjivu vrednost gotovog proizvoda, i na senzorne osobine, na miris, ukus, teksturu, boju i prihvatljivost od strane potrošača (**Robb i sar, 2002**). Povećanjem sadržaja masti raste i mekoća mesa, a ukupan miris i ukus fileta izraženiji su kod masnijih fileta dimljene ribe, što pokazuje da je najveći broj komponenata dima koji su nosioci ukusa i mirisa u mesu dimljene ribe rastvorljivi u mastima (**Røra i sar., 1999**).

Obrada ribe

Primarna obrada ribe uključuje različite operacije koje podrazumevaju omamljivanje ribe, iskrvarenje ribe, odsecanje glave i škrga, skidanje krljušti i sluzi, evisceraciju unutrašnjih organa i pranje ribe. Za kvalitet gotovog proizvoda neophodno je da se proizvodnja zasniva na detaljnim i temeljnim načelima obrade sa poštovanjem higijenskih uslova rada i pribora sa kojima riba dolazi u dodir.

Omamljivanje se najčešće obavlja električnom strujom. Električno omamljivanje se smatra humanijim postupkom omamljivanja, ali i poželjnijim jer je na osnovu mnogih ispitivanja ustanovljeno da ima najmanje nepoželjnog uticaja na kvalitet mesa ribe i bakteriološki status sirovine (**Giuffrida i sar., 2007**). Iskrvarenje ribe treba da se obavi brzo i dobro, pošto krv koja se zadrži u

mesu ribe predstavlja pogodnu sredinu za razmnožavanje bakterija (**Baltić i Teodorović, 1997**). Jedan od negativnih faktora adekvatnog iskrvarenja jeste stres, jer stres prouzrokuje porast zapremine krvi u mišićima, usporavajući razmenu krvi sa krvnim sistemom, i ubrzava koagulaciju, čime dodatno otežava iskrvarenje (**Olsen i sar., 2006; Aske i sar., 2001**). Kao i procedura iskrvarenja, tako i proces evisceracije (egzenteracije) unutrašnjih organa treba što brže obaviti jer može doprineti ubrzanom kvaru mesa. Digestivni trakt sadrži brojne mikroorganizme i enzime koji mogu dovesti do kvara. Muskulatura riba je po izlovu sterilna i zato pri egzenteraciji treba izbegavati zarezivanje muskulature, jer svako oštećenje mišića može da izazove kontaminaciju mesa. Ukupan broj bakterija na koži ribe nakon izlova je različit i vrednosti se kreću od $10^2 - 10^7/\text{cm}^2$ kože, a ukupan broj bakterija na škragama i u digestivnom traktu se kreće oko $10^3 - 10^9/\text{g}$ (**Shewan, 1962; Liston, 1980**). Takođe, prilikom egzenteracije treba paziti da ne dođe do oštećenja žučne kese i razlivanja žuči, jer meso može da poprimi gorak ukus (**Baltić i Teodorović, 1997**). Najveći broj mikroorganizama sa površine kože se otklanja pranjem ribe. Pranje se obavlja odmah nakon evisceracije, uz stalan protok vode.

Najvažnija promena koja nastaje posle uginuća ribe je rigor mortis, pojava ukočenosti mišića. Brzina nastajanja rigor mortis-a riba je različita, kao i dužina trajanja ove pojave. Nastanak, trajanje i prestanak rigor mortis-a zavise od temperature, dužine delovanja, oblika, vrste, fizičkog stanja ribe, količine rezervi glikogena u mišićima, uticaja stresnih faktora pred klanje ribe. Na višim temperaturama rigor mortis nastaje brže i jače je izražen, pa je i meso povećane žilavosti i sa značajnijim otpuštanjem vode. Kada se razgrade izvori glikogena u tkivu, povećava se pH, prestaje rigor mortis, što čini mišićno tkivo opuštenim, ali bez elastičnosti koju je muskulatura pre ukočenosti imala (**Baltić i Teodorović, 1997**). Na samom početku rigor mortis-a, meso ribe je neutralne do blago kisele reakcije (pH 6.5-6.9), što ne odgovara razvoju i razmnožavanju mikroorganizama. U tom stadijumu dolazi do denaturacije proteina koji delimično gube sposobnost vezivanja vode (**Huss, 1995**). Iz ovog razloga se u

procesu proizvodnje teži da se taj stadijum produži, nižim temperaturama, čime se inhibira aktivnost enzima koji učestvuju u razgradnji glikogena, a time se i smanjuje proces razgradnje mesa i nastanak kvara (**Šoša, 1989**).

Zamrzavanje ribe

Zamrzavanje predstavlja način konzervisanja i čuvanja proizvoda na niskim temperaturama.

Korišćenje zamrznute sirovine u proizvodnji dimljene ribe, ne umanjuje kvalitet gotovog proizvoda, a pored toga ima i pozitivan efekat na ekonomsko poslovanje proizvođača (**Kilibarda, 2006**).

Kada su u pitanju senzorne karakteristike dimljenog proizvoda, ispitivanja pokazuju da kada se kao početna sirovina za proizvodnju ribe koristi zamrznuta riba, gotov proizvod ima slaniji ukus. So bolje prodire u meso ribe koje je prethodno bilo zamrznuto, usled promena strukture ćelija u toku zamrzavanja (**Kilibarda, 2006; Cardinal i sar., 2001**).

Soljenje ribe

Soljenje ribe je vrlo važna faza u procesu dimljenja ribe. Ljudi su koristili ovaj princip konzervisanja namirnica od pamtiveka.

Soljenjem, meso dobija potrebnu količinu soli i specifičan ukus i delimično se denaturišu proteini, čime meso dobija izvesnu čvrstoću. Soljenje ima konzervišući efekat, s obzirom da se soljenjem namirnica smanjuje aktivnost vode a_w (količina vode dostupna mikororganizmima) (**Leroi i sar., 2000**). Ispod a_w vrednosti od 0.86 raste mali broj bakterija, a posebno nema bakterija koje imaju značaj za zdravlje ljudi. Jedino mikroorganizmi kvara namirnica, kvasci i plesni mogu se sporo razmnožavati na vrednosti a_w od 0.6.

Soljenje se ne završava uspostavljanjem ravnoteže koncentracije, već traje sve dok se ne postigne željeni stepen slanooće, poželjan ukus, konzistencija i miris (**Baltić i Teodorović, 1997**).

Koriste se tri vrste soljenja: vlažno soljenje, suvo soljenje i suvo soljenje u sopstvenoj salamuri.

Nakon soljenja riba se odsoljava. Odsoljavanje se vrši potapanjem u vodu, ili pranjem pod vodom koja otiče ili tuširanjem. Postupak odsoljavanja se mora obaviti što brže, jer svako zadržavanje vode u mesu smanjuje kvalitet proizvoda. Posle odsoljavanja riba se suši u struji toplog vazduha, čime se prevashodno suši površina ribe. Osušena površina ribe bolje upija dim, sprečava taloženje čađi i gara i sprečava pucanje kože. Na ovaj način se dobija glatka, čvrsta kožica koja daje poželjan izgled dimljenoj ribi (*Doe i sar., 1998*).

Procesi dimljenja i pakovanje ribe detaljnije su opisani u prethodnim poglavljima.

II. 3.2. Opšti principi za utvrđivanje roka trajanja

Bezbednost hrane se postiže primenom sveobuhvatnog, integrisanog na naučnim osnovama zasnovanog sistema tokom kojeg se identifikuju sve potencijalne opasnosti u hrani i primenjuju postupci za sprečavanje, eliminaciju ili smanjenje, na prihvatljiv nivo, opasnosti značajnih za bezbednost hrane.

Rok upotrebe predstavlja period vremena tokom kojeg proizvod ostaje bezbedan i zadovoljava specifikaciju kvaliteta pod očekivanim uslovima skladištenja, prometa i upotrebe.

Tokom roka upotrebe hrana treba da:

- ✓ Bude bezbedna kada se konzumira;
- ✓ Zadržava izgled, miris, teksturu i ukus;
- ✓ Odgovara nutritivnoj vrednosti navedenoj u deklaraciji.

Utvrđivanju roka upotrebe odgovoran i obavezan je svaki subjekt koji proizvodi, pakuje i stavlja hranu u promet.

Prema Pravilniku o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa (Sl. Glasnik RS 72/10), utvrđivanje roka upotrebljivosti

treba da se uradi za svaku hranu, a naročito za hranu spremnu za konzumiranje koja podržava rast *L. monocytogenes*.

Faktori koji utiču na rok upotrebe proizvoda su sledeći:

- Razmnožavanje mikroorganizama;
- Kvar koji nije izazvan mikroorganizmima:
 - Primanje ili gubitak vlage;
 - Hemijske promene;
 - Promene nastale uticajem svetla;
 - Promena temperature;
 - Fizičko oštećenje i,
 - drugi faktori (glodari i insekti; primanje mirisa od drugih proizvoda).

Metode koje se koriste za utvrđivanje roka upotrebe podeljene su na direktne i indirektno metode.

- ☐ Direktne metode:
 - ✓ Čuvanje proizvoda u predviđenim uslovima skladištenja i prometa duže od predviđenog roka upotrebe.
 - ✓ Provera proizvoda u definisanim intervalima u cilju utvrđivanja pojave kvara.
- ☐ Indirektno metode:
 - ✓ Inkubacija proizvoda pri temperaturama višim od preporučenih za stavljanje proizvoda u promet;
 - ✓ Matematički modeli za predviđanje rasta mikroorganizama;
 - ✓ Durability study, Challenge test.

Faktori koji utiču na preživljavanje i razmnožavanje mikroorganizama u namirnicama animalnog porekla su sledeći:

- Unutrašnji faktori: hranljive materije, pH vrednost, aktivnost vode a_w , antimikrobne supstance, antimikrobna struktura
- Spoljašnji faktori: relativna vlažnost vazduha, temperatura, koncentracija u gasovima
- Procesni faktori: toplotna obrada, pakovanje i dr.

U Pravilniku 72/10 predviđeno je da se za utvrđivanje roka upotrebe koriste:

- Podaci o fizičkim i hemijskim karakteristikama proizvoda, kao što su: pH vrednost, a_w , sadržaj soli, koncentracija konzervansa i način pakovanja, uslovi skladištenja i prerade, mogućnosti pojave kontaminacije i predviđeni rok upotrebe.
- Podaci iz literature i naučnih istraživanja o preživljavanju i razmnožavanju mikroorganizama u hrani. Istorijski podaci koje subjekt tokom vremena prikuplja u okviru svog plana samokontrole kao što su: podaci o nalazu određenog mikroorganizma u sirovinama i na površinama u objektu za proizvodnju hrane; podaci o praćenju kritičnih kontrolnih tačaka; podaci o prisustvu ili broju određenog mikroorganizma u postojećoj hrani na početku i na kraju roka upotrebe.

Tabela 2.12. Vrednosti pH pri kojima se razmnožavaju određene patogene bakterije u hrani

Vrednosti pH pri kojima se razmnožavaju određene patogene bakterije u hrani			
Mikroorganizam	Minimum	Optimum	Maksimum
<i>Clostridium perfringens</i>	5.5 - 5.8	7.2	8.0 - 9.0
<i>Vibrio vulnificus</i>	5.0	7.8	10.2
<i>Bacillus cereus</i>	4.9	6.0 - 7.0	8.8
<i>Campylobacter</i> spp.	4.9	6.5 - 7.5	9.0
<i>Shigella</i> spp.	4.9		9.3
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4.8	7.8 - 8.6	11.0
<i>Clostridium botulinum</i> - toksin	4.6		8.5
<i>Clostridium botulinum</i> - rast	4.6		8.5
<i>Staphylococcus aureus</i> - rast	4.0	6.0 - 7.0	10.0
<i>Staphylococcus aureus</i> - toksin	4.5	7.0 - 8.0	9.6
Enterohemoragična <i>Escherichia coli</i>	4.4	6.0 - 7.0	9.0
<i>Listeria monocytogenes</i>	4.39	7.0	9.4
<i>Salmonella</i> spp.	4.2 ¹	7.0 - 7.5	9.5
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4.2	7.2	9.6

Tabela 2.13. Vrednosti a_w pri kojima se razmnožavaju neke patogene bakterije u hrani

Približne vrednosti a_w za rast nekih patogenih bakterija u hrani (FDA 1986)			
Mikroorganizam	Minimum	Optimum	Maximum
<i>Campylobacter</i> spp.	0.98	0.99	
<i>Clostridium botulinum</i> type E*	0.97		
<i>Shigella</i> spp.	0.97		
<i>Yersinia enterocolitica</i>	0.97		
<i>Vibrio vulnificus</i>	0.96	0.98	0.99
Enterohemoragična <i>Escherichia coli</i>	0.95	0.99	
<i>Salmonella</i> spp.	0.94	0.99	>0.99
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.94	0.98	0.99
<i>Bacillus cereus</i>	0.93		
<i>Clostridium botulinum</i> tip A & B**	0.93		
<i>Clostridium perfringens</i>	0.943	0.95-0.96	0.97
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.92		
<i>Staphylococcus aureus</i> - rast	0.83	0.98	0.99
<i>Staphylococcus aureus</i> - toksin	0.88	0.98	0.99

- i kada je potrebno
 - Matematički modeli za predviđanje rasta mikroorganizama. Matematički modeli za predviđanje se normalno razvijaju pod pretpostavkom da je preživljavanje i razmnožavanje mikroorganizama uvek isto. Podaci koji se unose u matematičke modele su iz eksperimenata izvedenih u laboratorijskim uslovima. Modeli treba da budu validovani u odnosu na podatke o preživljavanju i razmnožavanju mikroorganizama u određenoj hrani. Matematički modeli za predviđanje su korisni kada je rok upotrebe već određen, a potom je proizvođač uradio manje korekcije u sastavu proizvoda, koje mogu imati uticaja na bezbednost i rok upotrebe (na primer: da li će se *L. monocytogenes* razmnožavati u kuvanoj šunki ako se koncentracija soli smanji sa 5% na 3%?).
 - Challenge test - određivanje potencijala rasta (δ)
Challenge test predstavlja laboratorijski test zasnovan na razmnožavanju bakterija u hrani koja je eksperimentalno kontaminirana i skladištena pod očekivanim uslovima od proizvodnje do konzumiranja.

Potencijal rasta bakterija može se koristiti:

- za ocenu da li hrana podržava rast *L. monocytogenes*;
- da se postavi koncentracija *L. monocytogenes* na kraju roka upotrebe u odnosu na koncentraciju u objektu.
- da se postavi koncentracija u proizvodnji prema granici 100 cfu/g na kraju roka upotrebe.

Potencijal rasta se izračunava prema formuli:

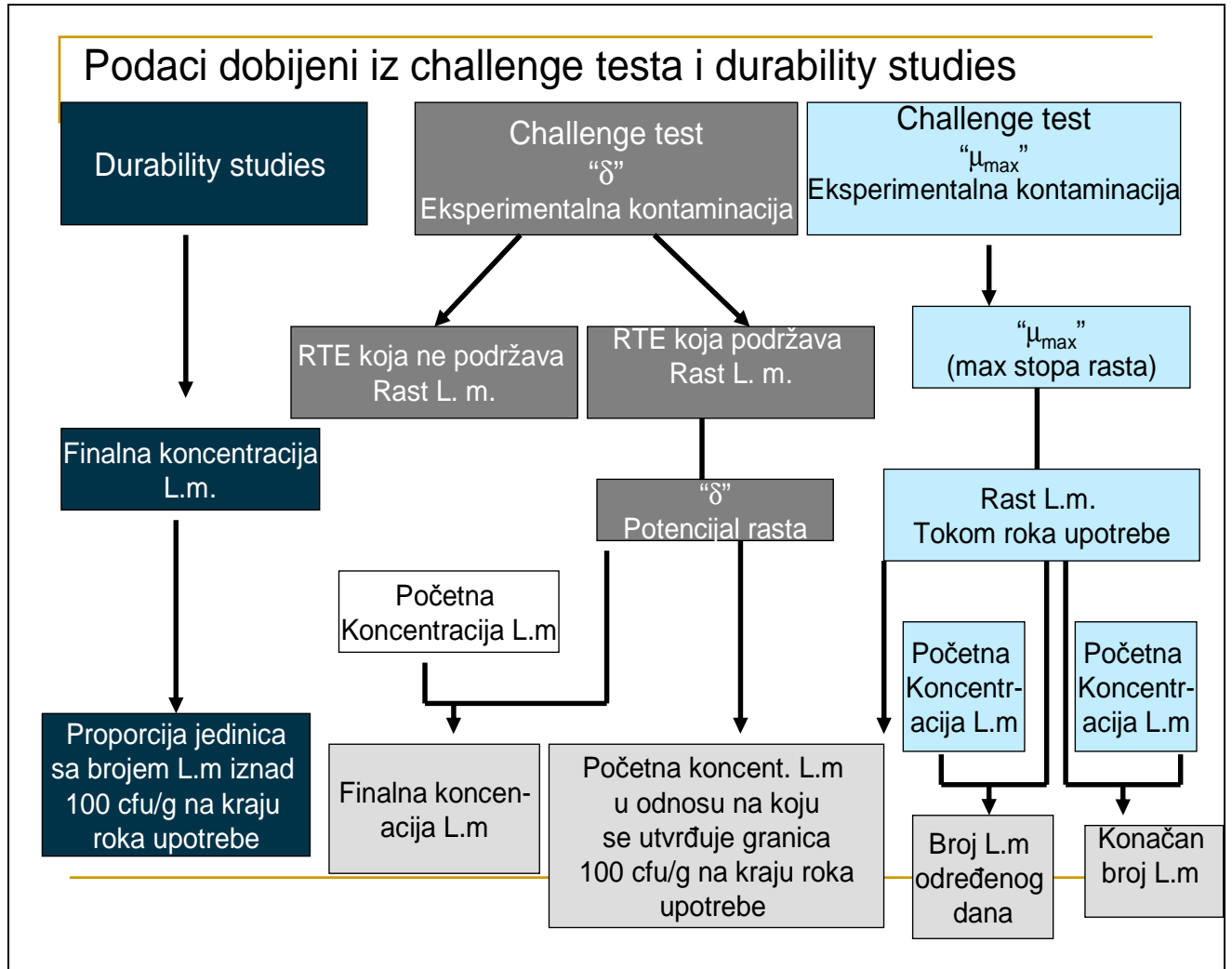
$$\delta = ([L. m] \text{ na kraju ispitivanja}) - ([L. m] \text{ na početku ispitivanja})$$

Ako nema raspoloživih podataka, ispitivane jedinice uzorka se skladište prema uslovima navedenim u tehničkim propisima.

- Challenge test –određivanje stope maksimalnog rasta (μ_{max})
Challenge test predstavlja laboratorijski test zasnovan na razmnožavanju bakterija u hrani koja je eksperimentalno kontaminirana i skladištena pri referentnoj temperaturi. Može se smatrati dnevnom stopom rasta bakterija. Primenom matematičkog modela moguće je da se odredi μ_{max} pri bilo kojoj temperaturi.

- Durability studije
Durability test predstavlja laboratorijski test zasnovan na rastu *Listeria monocytogenes* u hrani koja je prirodno kontaminirana i skladištenoj pri očekivanim uslovima. Različiti stadijumi *Durability study* su:
 - uzorkovanje (metodom slučajnog izbora uzima se **n** uzoraka iz proizvodne partije.
 - skladištenje (u predviđenim uslovima temperature skladištenja i roka upotrebe.
 - mikrobiološka ispitivanja;
 - izračunavanje (svi rezultati se objedinjuju, pri čemu rezultat predstavlja proporcija jedinica koje prekoračuju 100cfu/g na kraju roka upotrebe (Anon, 2008; Katić, 2012)

Tabela 2.14. Određivanje roka upotrebljivosti - šema primene podataka iz Durability i Challenge testova



II. 3.3. Održivost dimljene ribe pakovane u vakuumu i modifikovanoj atmosferi

Hladno dimljena riba je proizvod koji se može konzumirati bez prethodne termičke obrade i pripreme, odmah nakon završenog procesa proizvodnje. Zato se za ovakvu vrstu namirnica kaže da spada u grupu RTE hrane (engl. Ready to Eat – hrana spremna odmah za konzumiranje). Kada se hladno dimljena riba vakuumira, produžava se održivost ovog proizvoda, na period od mesec dana čuvanja pri temperaturi od +4°C. Ipak, vremenski period održivosti gotovog proizvoda je teško odrediti, i on zavisi od različitih proizvođača, koji sami određuju rok upotrebe proizvoda. Održivost dimljene ribe varira od jedne do šest nedelja (**Ibrahim i sar., 2008**), od dve nedelje do dva meseca (**Olafsdottir i sar., 2005**), od tri do šest nedelja pri temperature čuvanja od +5°C (**Ward, 2001**). Tako na francuskom tržištu, vakuumirana, hladno dimljena riba ima održivost 21-30 dana, a karakteriše je nizak sadržaj soli (4-5% u vodenoj fazi) i nizak sadržaj fenola (ispod 0.05ppm). U Nemačkoj, Danskoj i Velikoj Britaniji hladno dimljena riba ima održivost 14 dana, a u Italiji 60 dana, što zavisi od primenjenog režima proizvodnje (**Leroi i sar., 2000; Cardinal i sar., 2004**). Na našem tržištu hladno dimljena riba ima održivost od 21 do 25 dana.

Veliki broj činioca utiče na kvalitet i održivost proizvoda. Dva najvažnija parametra koja definišu održivost su količina soli u proizvodu i količina komponenata dima koja poseduju antimikrobna svojstva, kao i aktivnost enzima u samom tkivu (**Lakshmanan i sar., 2005**).

Održivost proizvoda zavisi od:

- inicijalne kontaminacije
- uslova proizvodnje
- načina rukovanja sa proizvodom nakon proizvodnog procesa
- temperature skladištenja
- načina pakovanja

Zaustavljanje rasta bakterija zavisi od:

- sadržaja soli u vodenoj fazi proizvoda
- temperature

- vlažnosti
- gustine dima
- trajanja dimljenja
- koncentracije aktivnih materija u dimu
- temperature čuvanja
- načina pakovanja gotovog proizvoda (**Caglak i sar., 2008; Stamatis i Arkoudelos, 2007; Siverstvik i sar., 2002**).

Kvar ribe i proizvoda od ribe se može definisati kao bilo koja promena u mesu ribe koja proizvod čini neupotrebljivim i neprihvatljivim za ljudsku upotrebu. Kvar ribe rezultat je tri procesa, razlaganja tkiva (dejstvo enzima iz mesa ribe tzv. autoliza ćelija), rasta mikroorganizama i oksidativnih reakcija u kojima nastaju ispraljiva jedinjenja male molekuleske mase. Riba je vrlo kvarljiva, iz više razloga. Meso ribe ima visoku a_w vrednost, neutralan pH i prisustvo autolitičkih enzima. Najčešći uzrok kvara ribljeg mesa su mikroorganizmi, a u ređim slučajevima posledica autolitičkih enzima. Autooksidacija i enzimski hidroliza su hemijske reakcije koje mogu dovesti do promena na mastima, čime nastaju neprijatni mirisi i ukus (**Arashisar i sar., 2004; Siverstvik i sar., 2002**).

Pakovanjem dimljene ribe u smešu gasova može se kontrolisati nastanak i razvoj mehanizama kvara pod uticajem mikroorganizama i oksidativnih reakcija, ali ovaj način pakovanja nema uticaja na autolizu, koja nastaje delovanjem sopstvenih enzima (tabela 15).

Tabela 2.15. Promene u mesu upakovanom u smeši gasova (**Sanjeev i Ramesh, 2006**)

enzimski kvar	ne utiču
mikrobiološki kvar	povećanje CO ₂ smanjuje stopu rasta aerobnih psihotrofa, penetrirajući u membrane i smanjujući intraćelijski pH
oksidacija masti	smanjen sadržaj kiseonika, smanjuje oksidaciju masti
oksidacija mioglobina	povećan sadržaj CO ₂ , pospešuje formiranje metmioglobina i tamnjenje mesa

Neadekvatan izbor sirovine, nepažljiva manipulacija sirovinom u toku primarne obrade i nekorektna i nehigijenska proizvodnja mogu da uslove pojavu patogenih mikroorganizama u gotovom proizvodu. Ribe i proizvodi riba mogu da budu prenosioci različitih bolesti. Patogeni u ribi mogu da potiču iz okoline (vodene sredine), ili mogu biti poreklom od životinja/ljudi.

Tabela 2.16. Bakterijski patogeni u hladno dimljenom lososu (*Huss i sar., 1995*)

mikroorganizam		prirodno prisutni u			sposobni da se razmnožavaju u proizvodu (3-5% SVF*)		stepen zabrinutosti
		živa riba	okruženje	gotov proizvod	pri 5°C	temperature >10°C	
svojeviti patogeni	<i>Cl.botulinum</i> ne-prot.tip B, E, F	+	+	+	-	(+)	nizak
	<i>Cl.botulinum</i> prot.tip A, B	(+)	+	+	-	+	nizak
	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	+	+	+	+	visok
	patogene <i>Vibrio</i> vrste	+	+	+	-	+	nizak
	<i>A.hydrophila</i>	+	+	+	(+)	+	nejasan
	<i>P.shigelloides</i>	+	+	+	-	(+)	nizak
nesvojeviti patogeni	<i>Salmonella</i>	-	-	-	-	+	nizak
	<i>E.coli</i>	-	-	-	-	(+)	nizak
	<i>S.aureus</i>	-	-	-	-	(+)	nizak

II.3.4. Mikrobiološki parametri od značaja za održivost dimljene ribe

II.3.4.1. *Listeria monocytogenes*

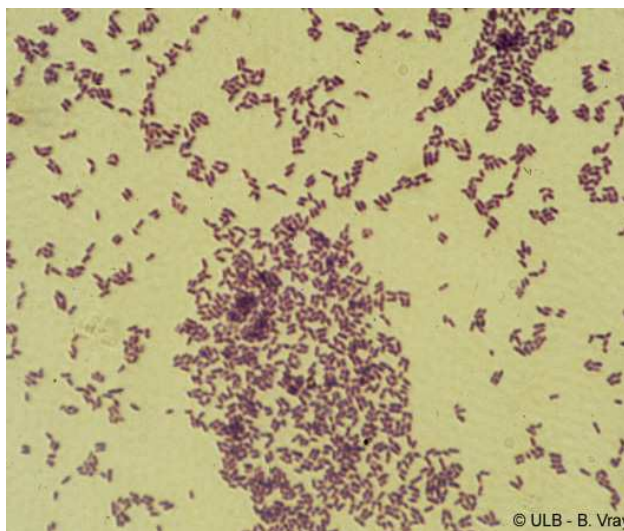
Taksonomija

Prema priručniku po Bergey-u (IX izdanje, 2000. godina), rod *Listeria* sastoji se od sedam definisanih vrsta:

- *L. monocytogenes*
- *L. innocua*
- *L. ivanovii*
- *L. seeligeri*
- *L. welshimeri*
- *L. grayi*
- *L. murrayi*

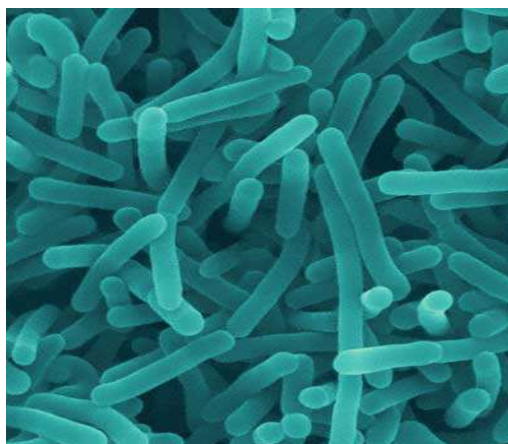
Morfologija , izgled kolonija i metabolizam

Bakterije iz ovog roda su Gram pozitivni, kratki, asporogeni štapići, katalaza pozitivni, oksidaza negativni i fakultativno anaerobni uzročnici.



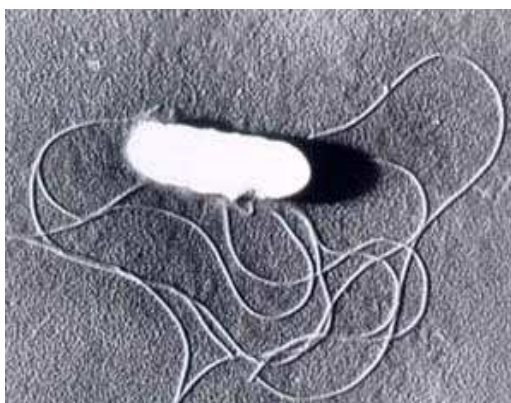
Slika 2.8. Mikroskopski preparat *L.monocytogenes*:
asporogeni štapići – bojenje po Gramu

Pravilni su kratki štapići, veličine 0.4-0.5 x 0.5-2 μm , sa zaobljenim krajevima, ponekad skoro kokoidnog oblika. Mogu se videti kao pojedinačne ćelije ili u kratkim lancima, u obliku slova V, ređe u dužim filamentima (obično u starijim kulturama dužine 6-20 μm). Ne stvaraju kapsule, ni spore. Mikroorganizam je Gram pozitivan, ali u starijim kulturama neke ćelije se ne boje.



Slika 2.9. Izgled ćelija bakterije *Listeria monocytogenes* (elektronska mikroskopija)

Pokretljivi su na temperaturi od 20-25°C, zahvaljujući posedovanju peritriho raspoređenih flagela kojih obično imaju od 2-5. U visećoj kapi pokazuju tipično „tumbling“ kretanje.



Slika 2.10. Izgled *Listeria monocytogenes* sa peritriho raspoređenim flagelama

Aerobi su i fakultativni anaerobi. Optimalna temperatura rasta im je između 30-37°C , dok su im temperaturne granice od 1 - 45°C. Ne preživljavaju zagrevanje na temperaturi od 60°C 30 minuta. Optimalan rast listerija je pri neutralnom ili slabo alkalnom pH. Obično rastu u rasponu pH od 6 do 9 (ne rastu pri pH nižem od 5.5) .

Katalaza su pozitivni, dok je reakcija oksidaze negativna. Katalaza negativnu reakciju mogu da daju ukoliko rastu u medijumima koji sadrže niske koncentracije mesa ili kvašćevog ekstrakta. Friedman i Alm (1962) su pokazali da se katalaza aktivnost smanjuje u podlogama koje sadrže više od 10% glukoze.

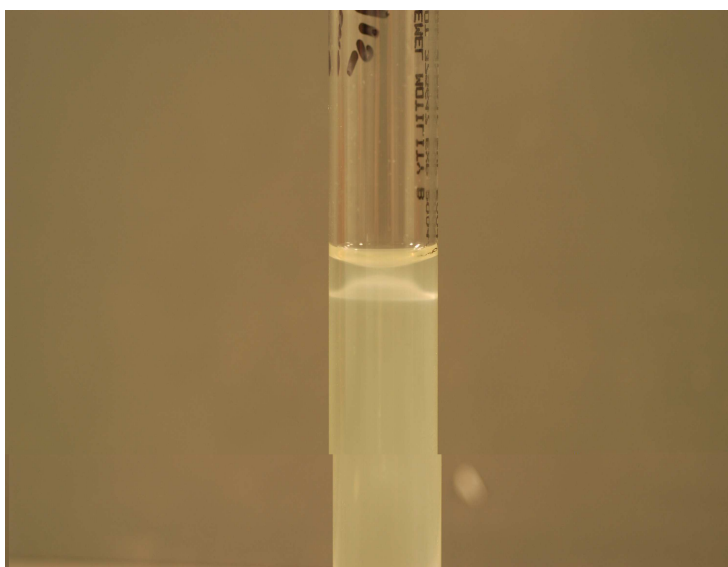
Stvaraju citochrome, a fermentacijom glukoze stvaraju većinom L(+) mlečnu kiselinu. Metabolišu i mnoge druge šećere uz stvaranje kiseline, ali ne i gasa. Reakcije sa metil-crvenim i Voges-Proskauer su pozitivne. Ne stvaraju indol i ne koriste egzogeni citrat. Hidrolizuju eskulin i natrijum hipurat. Ne hidrolizuju ureu, želatin, kazein i mleko. Zahtevaju organske faktore rasta, a stimulativni faktor za listerije je gvožđe (Sword, 1966; Trivett i Meyer, 1971).

Bakterije ovog roda stvaraju alkalnu fosfatazu i beta-D-galaktozidazu, dok većina poseduje slabu aktivnost dezoksiribonukleaze i ribonukleaze. Neke vrste stvaraju lecitinazu, tributirinazu su negativne, ne stvaraju H₂S i nitrate ne redukuju do nitrita.

Karakteristika *L. monocytogenes* je stvaranje kiseline iz L-ramnoze i alfa-metil-D-manozida, ali ne iz D-manitola i D-ksiloze (Seeliger, 1961; Ralovich, 1984; Seeliger i Jones, 1986). Sve listerije stvaraju kiseline nakon 48h od glukoze, manoze, salicina, eskulina, celobioze, fruktoze i amigdalina. Nakon duže inkubacije stvaraju kiseline i od maltoze (za 4 dana), dekstrina (za 8 dana), glicerola (za 10 dana). Weltzer i sar. (1968) su ustanovili da *L. monocytogenes* serotip 4b, koji je najčešći kod ljudi, stvara kiselinu od inozitola.

Različite vrste listerija stvaraju nekoliko formi kolonija. Kod svežih izolata najčešća je „S“ forma (sa uzdignutim ivicama i ulegnutim centrom), koja nekada u toku daljeg

kultivisanja može da pređe u oblik sličan „R“ formi. Hrapava „R“ forma karakterističnog je izgleda sa neravnim ivicama i hrapavom površinom. Utvrđene su i „L“ forme (granulisane, izgleda prženog jajeta) kod *L. monocytogenes* kada se kultiviše u medijumima koji sadrže penicilin ili glicin (Gray i Killinger, 1966; Seeliger, 1961).



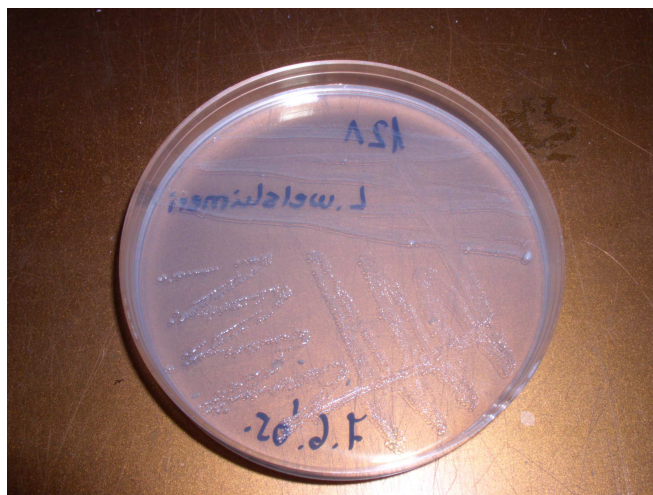
Slika 2.11. Test pokretljivosti

L. monocytogenes dobro raste na većini običnih hranljivih podloga. Kolonije na hranljivom agaru su prečnika 0.5 – 1.5 mm, okrugle, slabo ispupčene i prozirne. Na normalnom osvetljenju kolonije su plavkasto-sive, a sa osvetljenjem pod uglom od 45° blještavo plave. Rast *L. monocytogenes* je bolji na podlogama koje sadrže glukozu i na takvim podlogama kolonije imaju nakiseo, buterni miris.

U polutečnom agaru za ispitivanje pokretljivosti, zasejanom ubodom i inkubiranom na temperaturi od 25°C raste tipično u obliku kišobrana, pri čemu je kišobran 3-5 mm ispod površine agara, a rast duž uboda se zapaža u vidu drške.

Sve vrste rastu u medijumima koji sadrže 10% NaCl, a neke mogu da prežive i ostanu vitalne i pri 16% NaCl pri pH 6.0, dok samo pojedini sojevi mogu da tolerišu koncentraciju od 20% soli. Mogu da rastu u prisustvu 0.025% talijum acetata; 3.75%

kalijum tiocijanata; 0.01% 2,3,5-3-feniltetrazolium hlorida; 0.04% kalijum telurita, ali ne i u prisustvu 0.02 % natrijum azida i kalijum cijanida. Mogu da rastu i na 10% i 40% žučnom agaru, pri čemu je bolji rast u višoj koncentraciji žuči (Wetzler i sar., 1968).



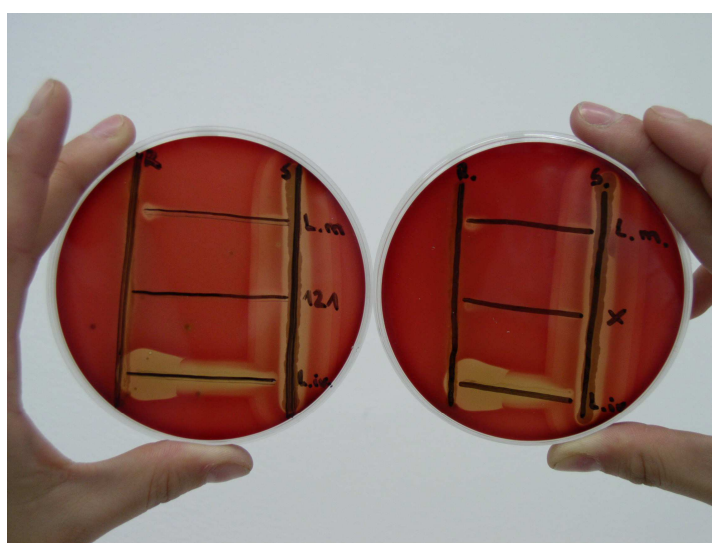
Slika 2.12. Izgled kolonija *Listeria monocytogenes* na hranljivom agaru, sa karakterističnim plavkastim odsjajem pod osvetljenjem pod uglom od 45°



Slika 2.13. Izgled kolonija *Listeria monocytogenes* na hranljivom agaru

Na krvnom agaru stvara beta-hemolizu. Zone koje stvara *L. monocytogenes* su uske i često se ne pružaju iza ivice kolonije i mogu se detektovati jedino odvajanjem kolonije ezom sa površine agara. *L. ivanovii* stvara široke ili multipne zone hemolize. *Listeria monocytogenes* stvara beta-hemolizu na krvnom agaru čija je zona slabija nego kod *L.*

Ivanovii, ali je izraženija nego kod *L. seeligeri*. Hemoliza ovčjih eritrocita se pojačava CAMP fenomenom, pri čemu se koristi beta-hemolitični *Staphylococcus aureus* i *Rhodococcus equi*. Sumnjive hemolitične vrste *Listeria* i *Staphylococcus aureus* se zasejavaju pod pravim uglom jedna u odnosu na drugu na krvni agar sa 5% ovčije krvi. Nakon inkubacije na temperaturi od 37°C 24-48 h, hemolitične vrste *L. monocytogenes* i *L. seeligeri* daju pojačanu hemolizu u zoni nepotpune hemolize *Staphylococcus aureus*, ali ne i sa *Rhodococcus equi*. Kada je *L. ivanovii* u pitanju, imamo obrnutu situaciju: pojačava se CAMP fenomen sa *Rhodococcus equi*, ali ne i sa *Staphylococcus aureus*.



Slika 2.14. Izgled CAMP testa

Listeria monocytogenes stvara različite specifične supstancije: hemolitični toksin hemolizin, listeriolizine, lipolitični toksin (fosfolipaza), ekstracelularno hemoragični toksin, lizocim, pirogene supstancije, i svi doprinose patogenim svojstvima listerija. Opširnije o ovim materijama biće objašnjeno u odeljku pod nazivom „Karakteristike virulencije *Listeria monocytogenes*”.

Pored toga stvaraju i bakteriocine poznate kao monocini ili listeriocini, što su dokazali još 1962. godine Hamon i Peron.



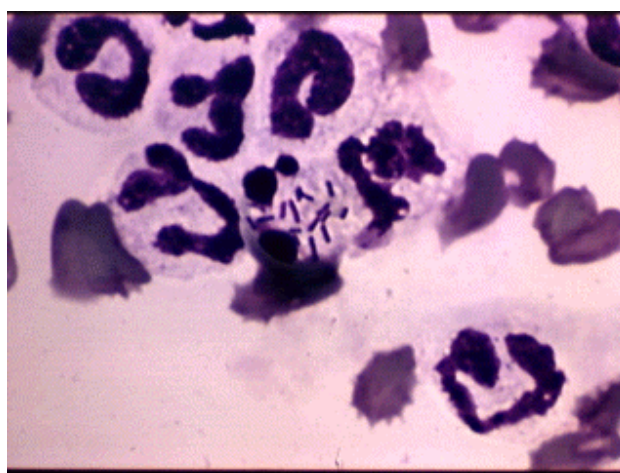
Slika 2.15. Bakterijska ćelija – *Listeria spp.*

Bakteriocini su ekstracelularno oslobođeni peptidi ili proteinski molekuli stvoreni od strane određenih bakterija, koji poseduju baktericidna (destruktivna) svojstva prema nekim vrstama bakterija, najčešće srodnim sa vrstama proizvođača bakteriocina (Tagg i sar., 1976.)

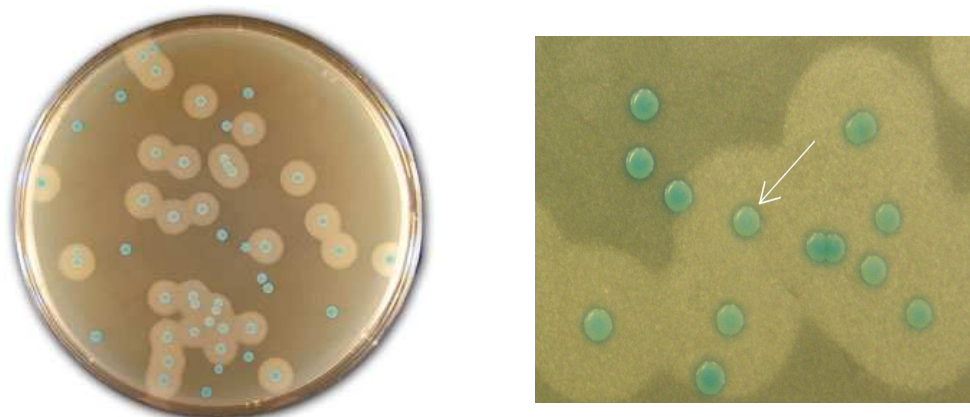
To su ribozomalno stvoreni prekursori polipeptida ili proteini, koji deluju antimikrobno na širok spektar blisko srodnih bakterija (**Jack i sar., 1995**). Nalaze se samostalno ili mogu da budu vezani sa lipopolisaharidima ćelijskog zida.

Listeriocini ili monocini deluju antibiotski na stafilokoke, bacile i druge srodne gram-pozitivne bakterije, ali ne deluju na gram-negativne bakterije. Monocini se mogu uporediti sa piocinima, kolicinima i proteocinima.

Utvrđeno je da oko 76% sojeva proizvodi monocine, pri čemu unutar serotipa 4b – 94% , a unutar soja 1/2a – 67.2% .



Slika 2.16. Mikroskopski preparat – nalaz listerija u ćelijama domaćina



Slika 2.17. Rast *Listeria monocytogenes* na podlozi OAA agara

Karakteristike pojedinih vrsta u okviru roda *Listeria*

Diferencijalne karakteristike pojedinih vrsta u okviru roda *Listeria* date su u sledećoj tabeli:

Tabela 2.17. Karakteristike pojedinih vrsta u okviru roda *Listeria*

<i>Karakteristike/ Vrste</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria seeligeri</i>	<i>Listeria welshimeri</i>	<i>Listeria grayi</i>	<i>Listeria murrayi</i>
β-hemoliza	+	+	-	+	-	-	
CAMP test (<i>Staphylococcus aureus</i>)	+	-	-	+	-	-	-
CAMP test (<i>Rhodococcus equi</i>)	-	+	-	-	-	-	-
Stvaranje kiseline od:							
- manitola	-	-	-	-	-	+	+
- α-metil-D-manozida	+	-	+	-	+	ND	ND
- L-ramnoze	+	-	d	-	d	-	d
- hidrolizom skroba	-	-	-	ND	ND	+	+
- D-ksiloze	-	+	-	+	+	-	-
Hidroliza hipurata	+	+	+	ND	ND	-	-
Redukcija nitrita	-	-	-	ND	ND	-	+
Patogenost za miša	+	+	-	-	-	-	-
Referentna vrsta	ATCC 15313 NCTC 7973 ^b	SLCC 2379; ATCC 19119	SLCC 3379; ATCC 3309; NCTC 11288	CIP 100100; SLCC 3954; Weiss 1120	CIP 8149; SLCC 5334; Welshimer V8		

Legenda: + 90% ili više je pozitivno

- 90% ili više je negativno

d 11-89% pozitivno

ND nije determinisano a - nekoliko je vrsta negativno b - referentna vrsta ATCC 15313 nije β-hemolitična, pa je predložena vrsta NCTC 7973 c - obično široka zona hemolize ili više zona

Serotipovi *Listeria spp.*

Listeria spp. poseduju 15 somatskih [O] i 5 flagelarnih [H] antigena. Kombinacijom svih antigena omogućava se definisanje 16 serovarijeteta *L.monocytogenes* i srodnih vrsta (**Seeliger i Jones, 1986; Rocourt, 1999**):

1/2 a, 1/2 b, 1/2 c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e, 5, 6a, 6b i 7 (tabela 2.18).

Tabela 2.18. Serotipovi *Listeria spp.*

<i>Serotipovi Listeria spp.</i>	
<i>Listeria</i> vrste	Serotipovi
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b 4c, 4d, 4e, „7“
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	4ab, 6a, 6b, N
<i>L. welshimeri</i>	6a, 6b
<i>L. seeligeri</i>	1/2b, 4c, 4d, 6b, N

N - nedefinisano

Dugo se smatralo da su serovarijeteti 1/2 a, 1/2 b, 1/2 c i 4b odgovorni za listeriozu kod životinja i ljudi, pa su ih i označavali kao markere za ovu bolest. Međutim, danas se saznanje izmenilo, pošto je ustanovljeno da sojeve vrsta *L.seeligeri* i *L.welshimeri* često karakteriše prisustvo ovih antigenih osobina. Svi sojevi *L.ivanovii* pripadaju serotipu 5, tako da serotipizacija u tom slučaju predstavlja i kriterijum identifikacije. Sojevi serogrupe 6 pripadaju nepatogenim vrstama *L.innocua*, *L.welshimeri* i *L.seeligeri*. Ustanovljeno je takođe da se *L.grayi* i *L.murrayi* antigeno potpuno razlikuju od svih drugih listerija, ali su međusobno istih osobina.

Tokom ispitivanja listerioze kod životinja i ljudi, ustanovljeno je da serotip 1/2a *Listeria monocytogenes* dominira u Evropi, a serotip 4b u Americi. To pravilo je važno sve do

uvoza inficiranih činčila iz SAD u Nemačku, nakon čega je serotip 4b postao dominantan u zapadnoevropskim zemljama. Interesantan je i podatak da je serogrupa 1/2 češća u namirnicama, a da su listerioze ljudi daleko češće uzrokovane serovarom 4b.

Virulentnost različitih serotipova

Uprkos obilju *Listeria monocytogenes* u okruženju, relativno mali broj ljudi se ozbiljno razboli. To je, svakako, rezultat efikasnog imunog sistema većine zdravih osoba. Ipak, analize pokazuju da većina prisutnih listerija u našem okruženju nije virulentna ili su slabo virulentne. Samo nekoliko serotipova je odgovorno za pojavu ozbiljne bolesti listerioze.

Ispitivanjem *Listeria monocytogenes* izolovanih od 1363 pacijenta, ustanovljeno je najčešće prisustvo serovarijeteta 4b (u 64% slučajeva), dok su ostali serotipovi bili zastupljeni 1/2a u 15%, 1/2b u 10% i 1/2c u 4% slučajeva. Serovar 4b je najčešće bio prisutan u slučajevima listerioze kod trudnica, a 1/2b kod listerioze ostalih (**Mclauchin, 1990**). Kod ispitivanja skotnih miševa, nije ustanovljena značajna razlika infektivnosti serotipova 1/2a i 1/2b na skotnim ženjkama miševa u odnosu na 4b (**Lammerding i sar., 1992**).

U drugim eksperimentima, nekoliko serovarijeteta *Listeria monocytogenes* koje pripadaju serogrubi 4 poređeno je na osnovu virulencije za miševе i sposobnosti stvaranja virulentnih faktora. Sojevi 4b, 4ab i 1/2a su se pokazali najvirulentnijima za miševе, a niska virulentnost sojeva 4a, 4c, 4d i 4e u vezi je sa niskom produktivnošću virulentnih faktora i ActA proteina. Neki sojevi stvaraju i vrlo niske količine listeriolizina O i internalina (**Sokolović i sar., 1996**).

Analizom varijacija u sojevima listerija korišćenjem RAPD metode (Random Amplification of Polymorphic DNA), utvrđeno je da su samo pojedini genotipovi *Listeria monocytogenes* zajednički svim izolatima koji su prouzrokovali listeriozu ljudi u Japanu (**Inoue i sar., 2001**). Pregledom DNA sekvenci nekih virulentnih gena, ukazano je da

postoje tri evolutivne linije *Listeria monocytogenes* (**Rasmussen i sar., 1995; Wiedmann i sar., 1997**). Svi ispitani sojevi koji su izolovani u slučajevima epidemija kod ljudi i neki sporadični slučajevi humane listerioze pripadaju liniji I, a izolati koji nisu humani su deo linije III (**Wiedmann i sar., 1997**). Ovom tehnikom, od 117 izolata *L. monocytogenes* iz dimljene ribe i proizvoda koji se obrađuju dimom, 37% je pripadalo liniji I. Korišćenjem citotoksičnih testova 17% izolata je pokazivalo avirulentnost ili vrlo slabu virulentnost (**Norton i sar., 2001**).

Sojevi *Listeria monocytogenes* pronađeni tokom izbijanja listerioza, pregledani su i PCR fingerprinting metodom. Razlike koje su utvrđene ukazuju na vezu između njihovih DNA sekvenci i sposobnosti ekspresije različitih faktora virulencije (**Franciosa i sar., 2001**).

Svi dobijeni rezultati ukazuju na činjenicu da sve *Listeria monocytogenes* koje su izolovane iz hrane ili okruženja ne predstavljaju podjednaku opasnost po zdravlje ljudi. Ipak, danas ne postoji jednostavan način diferentovanja serotipova koji su rizični. Pored toga, i mnogi faktori sredine mogu da utiču na pojačanje ili slabljenje virulentnosti serotipova *Listeria monocytogenes*. *Listeria monocytogenes* izložena umereno kiselim uslovima sredine razvija toleranciju na kiselinu i postaje sposobnija za invadiranje i proliferaciju u kulturama ćelija, od bakterija koje nisu stekle takav tip tolerancije (**Conte i sar., 2000**).

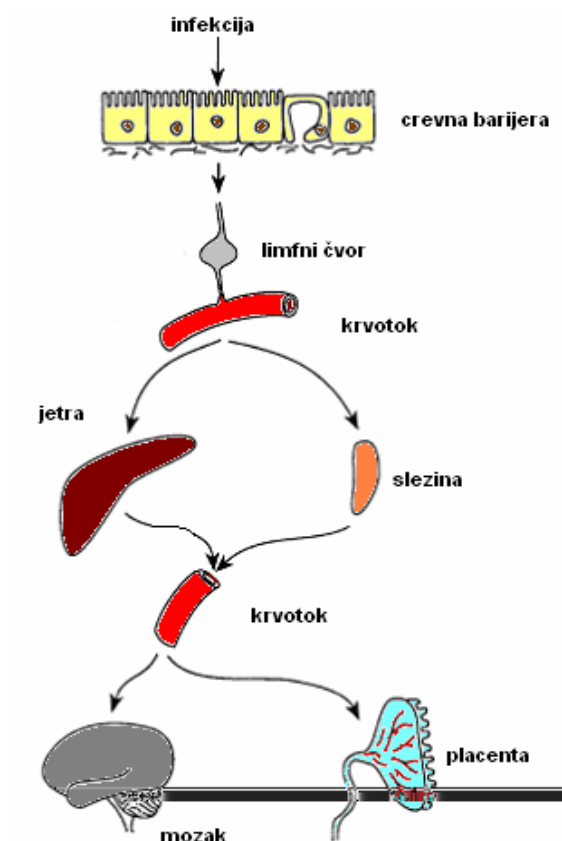
Invazija i širenje *Listeria monocytogenes*

Razlog što *Listeria monocytogenes* uzrokuje tako tešku bolest leži u njenoj sposobnosti da indukuje sopstvenu fagocitozu („ukrcavanje u ćelije domaćina“), koristeći se tim ćelijama da bi se razmnožavale i direktno transportovale u druge ćelije.

Kako *Listeria monocytogenes* uđe u ćeliju domaćina, širi se telom, zaštićena od mnogih odbrambenih mehanizama organizma, uključujući antitela i komplement.

Listerije koje se unesu u organizam preko hrane, ulaze u enterocite ili M ćelije, smeštene blizu Pajerovih ploča, i tada započinje njihova deoba u fagocitnim ćelijama koje su smeštene u sloju ispod enterocita. Bakterije se tada transportuju u makrofagima, iz creva u krv ili limfu, do jetre i slezine, gde ih većina strada pod dejstvom neutrofila smeštenih uz Kupferove ćelije jetre.

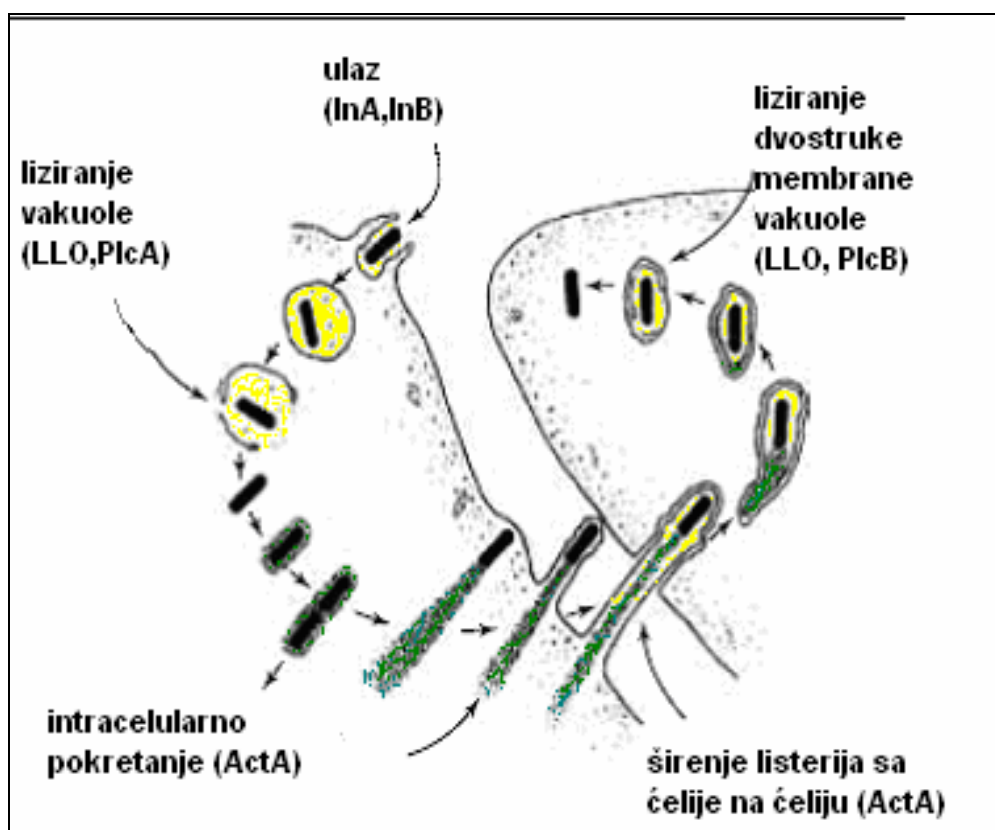
Crtež 2.1. Prikaz stadijuma infekcije *in vivo*



Ukoliko je domaćinov T-ćelijski imuni odgovor neadekvatan, listerije se mogu razmnožavati u hepatocitima i makrofagima, i potom nošene krvlju, mogu da dođu do raznih organa, posebno do mozga i/ili materice, gde prolaze kroz krvno-moždanu barijeru i placentalnu barijeru. Tokom svake od ovih faza invazije i širenja *Listeria monocytogenes* po organizmu, stvara se veliki broj različitih virulentnih faktora:

- Internalini (InA, InB) - površinski protein listerija koji omogućava penetraciju *Listeria monocytogenes* u nefagocitne ćelije (epitelijalne ćelije, hepatociti)
- Površinski protein p104 - uloga u adheziji bakterije za intestinalne ćelije
- Listeriolizin O (LLO) - bakterijski toksin, neophodan za liziranje vakuolarne membrane fagocita i na taj način obezbeđuje listerijama bekstvo u citoplazmu ćelije domaćina.

Crtež 2.2. Proces ćelijske infekcije *Listeria monocytogenes*



- ActA protein - površinski protein, indukuje polimerizaciju globularnih aktinskih molekula, da bi se formirali polarizovani aktinski filamenti do ćelijske membrane, stvorili *listeriopodi* (ispupčenja membrana spolja) (**Moors i sar., 1999**) kojima se listerije prenose na susedne ćelije bez aktiviranja ćelijskog imuniteta

- Fosfolipaza (PlcA, PlcB) - uloga u invaziji i širenju *Listeria monocytogenes* (iz primarne vakuole pomaže PI-PLC, dok je PC-PLC aktivna tokom širenja bakterije iz ćelije u ćeliju).
- Metaloproteaza
- Clp proteaze i ATPaze
- Protein p60

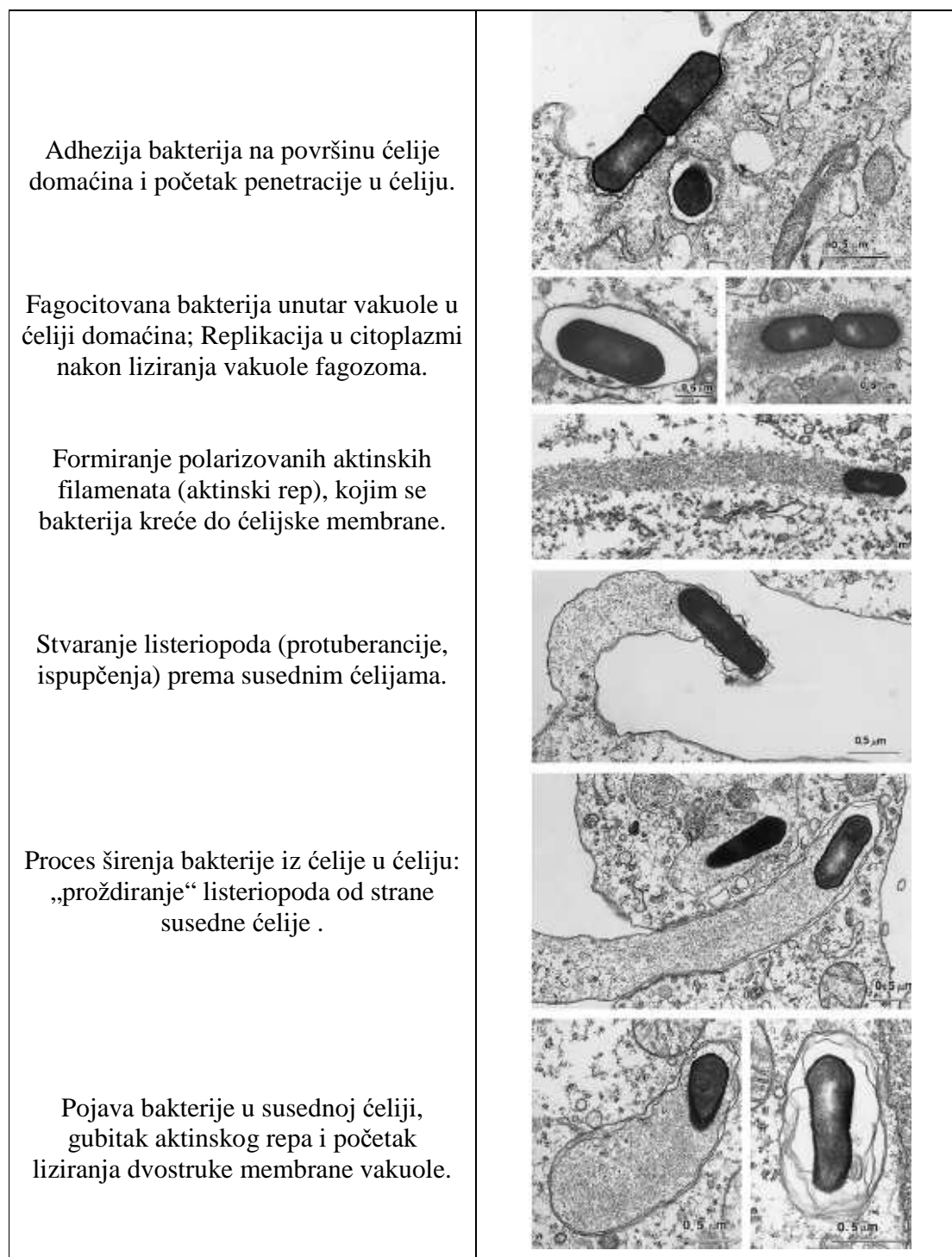
Geni koji kodiraju većinu ovih faktora, nalaze se zajedno na hromozomu i regulisani su pomoću *prfA* gena (**Cossart i Lecuit, 1998; Kuhn i Goebel, 1999; Renzoni i sar., 1999**).

Infekcija centralnog nervnog sistema predstavlja jednu od najozbiljnijih manifestacija listerioze. *Listeria monocytogenes* može da uzrokuje meningitis, često udružen sa oduzetošću, ili romboencefalitis (**Southwick i Purich, 1996**). Da bi došlo do infekcije centralnog nervnog sistema, listerije moraju da prođu krvno-moždanu barijeru, koja je bitna za održavanje biohemijske homeostaze u mozgu i kičmenoj moždini.

Bakterije imaju sposobnost kretanja duž aksona nervnih ćelija u oba pravca, tako da je moguća njihova diseminacija sa periferije do centralnog nervnog sistema duž senzornih nerava. *Listeria monocytogenes* se može kretati duž senzornih nerava pomoću internalin B-zavisne reakcije (**Dons i sar., 1999; Jin i sar., 2001**).

Makrofagi u kojima se nalaze listerije cirkulišu telom. U placenti, listerije iz makrofaga mogu da inficiraju endotelijalne ćelije, a potom i fetus, dovodeći do preranog rađanja ili smrti. Novorođenčad se mogu inficirati i tokom pasaže kroz porođajni kanal, uz razvoj sepsa i meningitisa nakon nekoliko dana. Iako amnijska tečnost koja okružuje fetus, ubija ili sprečava razvoj mnogih bakterija, na bakteriju *Listeria monocytogenes* nema takav efekat (**Altieri i sar., 1999**).

Postojanje razlika nastalih kod listerioze gravidnih ženki miševa zavisi od toga kada je nastupila infekcija. Ukoliko je infekcija nastala u ranom graviditetu (od oplodjenja do 14.dana), velika je verovatnoća da će doći do abortusa ili uginuća od encefalitisa, za razliku od toga češća je pojava oboljenja listerioze ukoliko nastupi infekcija kasnije u graviditetu.



Slika 2.18. Proces infekcije ćelije *Listeria monocytogenes* po stadijumima

Kod ljudi, listerioza se češće javlja kada je infekcija nastupila u trećem trimestru graviditeta, nego tokom prvih 6 meseci (**Smith, 1999**). Nažalost, bakteriološke analize se često ne izvode kod spontanih abortusa, tako da se ne zna pravo stanje koliko su često abortusi nastali usled infekcija izazvanih listerijama.

LISTERIOZA – Epidemiološki aspekti

Listeria monocytogenes predstavlja ubikvitarnu bakteriju, što znači da je veoma rasprostranjena u životnoj sredini. Zbog toga postoji mogućnost da se nađe u organizmu životinja i ljudi, kako onih obolelih od listerioze, tako i kod potpuno zdravih jedinki; ali i da se hrana može kontaminirati tokom proizvodnje i skladištenja, pa na taj način da postane izvorom zaraze za ljude i životinje.

Listeria monocytogenes je patogena za ljude i veliki broj životinjskih vrsta. Infekcije listerijama javljaju se najčešće sporadično, mada se može manifestovati i kao epidemija.

***Listeria monocytogenes* u domaćih životinja**

Listerioza životinja poznata je više decenija. Mnoge životinjske vrste su prijemčive za listerije.

Sa gledišta veterinarsko-sanitarne kontrole mesa, posebno je važna mogućnost dijagnostike listerioze kod životinja pre klanja, distribucija *Listeria monocytogenes* u tkiva i organe inficiranih životinja i zastupljenost zdravih kliconoša kod pojedinih vrsta životinja.

Zanimljivo je da je prva identifikacija *Listeria monocytogenes*, izolovane kod obolelih životinja, bila povezana sa kontaminiranom hranom. Kasnije su oboljenja goveda i ovaca, izazvana listerijama jasno ukazivala na loše obrađenu hranu, kao izvor infekcije (silaža).

U prirodnim uslovima zaraza se prenosi ekskrementima, pobačenim plodovima, placentom i urinom, a kod ovaca iscetkom iz nosa, urinom, mlekom, iscetkom iz genitalnih organa. Poznato je i mehaničko prenošenje, koitusom, ukoliko se listerije kod krava nalaze u vaginalnoj i cervikalnoj sluzi. Pored toga, dokazano je inficiranje i kontaktom, u prirodnim uslovima.

Listerioza preživara

Najčešće glavne forme listerioze kod goveda, ovaca i koza su encefalitis, abortus i septikemija (Seeliger, 1961).

Oboljenje se u početku ispoljava opštim simptomima – povišena telesna temperatura, inapetencija, apatija; da bi se ubrzo javili nervni simptomi. U goveda se encefalitis uočava kao unilateralna ili bilateralna facijalna paraliza, koja zahvata uši, očne kapke i usne. Pored ovih simptoma, mogu da se jave i slepilo, ataksija i manježno kretanje, uzdignuta glava, škripanje zubima, ukočenost žvakaće muskulature i razdražljivost. Kod odraslih goveda bolest traje 4-10 dana i sporadična je. Nakon ovih simptoma nastupa koma, koja traje 1-2 dana i bolest se, najčešće, završava uginućem životinje. Kod ovaca traje 2-4 dana, retko do 10 dana. Obolela ovca stoji odvojeno od stada, često joj zalogaj viri iz usta, glavu drži savijenu u stranu, ili zabačenu, nekad se kreće u krug.

Encefalitis preživara izazvan listerijama se može potvrditi patohistološkim nalazom i izolacijom uzročnika iz mozga.

Česta forma listerioze preživara je abortus u kasnijoj fazi graviditeta. Ukoliko nastane infekcija gravidnih životinja, izostaju nervni simptomi, a listerije dijaplacentarno prolaze do fetusa, u kome uzrokuju septikemiju i uginuće, sa pretećim pobačajem. Kod goveda je abortus najčešće sporadičan, a kod ovaca je obično uključeno više životinja. Nakon infekcije placente, fetus, obično, uquine za oko 5 dana. Abortus je retko praćen teškim sistemskim oboljenjem, često je i bez simptoma. Životinja može da izlučuje *Listeria monocytogenes* mlekom, bez znakova mastitisa. Ukoliko je infekcija nastupila tokom kasnog graviditeta, fetus može biti rođen živ, ili može da uquine ubrzo nakon rođenja. Ne

postoje dokazi o tome da listerije imaju produženi efekat na matericu i sledeći graviditet iste životinje.

Dijagnoza abortusa izazvanog listerijama se zasniva na izolaciji uzročnika iz organa fetusa.

Kod mlađih preživara, listerioza može da ima septikemični ili visceralni oblik, sa fokalnom nekrozom jetre. Javlja se, najčešće tokom nekoliko prvih nedelja života, pa se smatra i produžetkom intrauterine infekcije. Moguće je da nastane i kao posledica umbilikalne infekcije. Kod teladi se javlja sporadično, dok je kod jagnjadi najčešće u vidu epizootija.

Kao forma listerioze, može se javiti i dijareja kod ovaca. Ona nastaje ishranom nekvalitetnom silažom, nakon 1-2 dana, a može da se završi i kao septikemija sa letalnim ishodom.

Pojava keratokonjunktivitisa goveda i ovaca, izazvana je istovremenom infekcijom listerijama i nekim drugim uzročnicima: *Moraxella bovis*, *Neisseria catharalis*, *Mycoplasma*, virus infektivnog bovinog rinotraheita (IBR).

Mastitis uzrokovan sa *Listeria monocytogenes* može da bude akutan ili hroničan, ponekad i supkliničkog toka. Mogu da budu zahvaćene jedna ili više četvrti. Listerije se mlekom mogu izlučivati čak do tri godine.

Listerioza konja

Bolest je retko zabeležena kod odraslih konja. Kod novorođenčadi i ždrebadi, može da nastane septikemija i paraliza. Kod odraslih konja javlja se u vidu abortusa i encefalitisa.

Listerioza svinja

Listerioza svinja se javlja retko, i obično se pojavljuje u vidu septikemije, meningoencefalitisa i abortusa. Septikemija nastaje u toku prvih nedelja života, sa

znacima zapaljenja pluća ili enteritisom, kada se mogu javiti lezije na jetri (multipla fokalna nekroza) i slezini. Meningoencefalitis se javlja kod starijih svinja, sa znacima ataksije, ukočenosti vrata, drhtanja usta pri uzimanju hrane, manježnim kretanjem, parezom zadnjeg dela tela ili paralizom. Bolest obično traje do 4 dana .

Listerioza živine

Kod živine, od listerioze najčešće oboljevaju pilići i ćurke, a znatno ređe guske i patke. Mortalitet kod pilića može dostići i 40%. Najčešće se javlja forma septikemije, a patomorfološkim pregledom ustanovljena je masivna degeneracija miokarda i fokalna nekroza jetre, slezine i pluća. Ipak, smatra se da listerioza kod pilića ima sekundarnu ulogu i da do pojave bolesti dolazi usled zajedničkog dejstva sa salmonelama, kokcidijama ili virusnim bolestima živine (atipična kuga, limfomatoza).

Nalaz *Listeria monocytogenes* kod zdravih životinja

Listeria monocytogenes predstavlja bakteriju koja se pored bolesnih životinja, može naći i kod zdravih životinja, što predstavlja problem kliconoštva. Kod zdravih životinja listerije se, najčešće nalaze u fecesu. Brackett (1988) ističe da pored domaćih, rezervoare listerija predstavljaju skoro sve vrste životinja, uključujući i glodare, vodozemce, ribe, insekte i kućne ljubimce. Broj kliconoša varira unutar iste životinjske vrste.

Prema istraživanjima, kliconoštvo kod goveda je česta pojava, tako da je pronađeno od 0.8 do 15% listerija u fecesu goveda u Holandiji (Dijkstra, 1986), 27.6% kod goveda u Mađarskoj (Ralovich, 1987), 51% u Danskoj (Skovgaard i Morgen, 1988), 16% (Hofer, 1983) i 19% (**Bunčić, 1991**) u Jugoslaviji.

Kod ovaca je pronađeno 27.2% *Listeria monocytogenes* u fecesu (Rodriguez i sar., 1984), a prema Ralovich-u taj procenat iznosi 14%. Ralovich ističe da su pronađene listerije pored fecesa i u nosu (19.2%) i vagini (2.2%).

Prisustvo *Listeria monocytogenes* u fecesu zdravih svinja zabeleženo je u 1.7% slučajeva u Danskoj, dok je u Mađarskoj ustanovljeno čak 25.6% (Ralovich, 1984). U našoj zemlji je **Bunčić (1991)** utvrdio prisustvo listerija u 3% slučajeva, a na tonzilama čak 45%.

Brackett (1988) smatra da su ptice i živina, među životinjama, najčešće kliconoše bakterije *Listeria monocytogenes*. Skovgaard i Morgen (1988) su ustanovili prisustvo ove bakterije u fecesu 33% zdrave živine.

Listerioza ljudi

Campylobacter, *Salmonella*, *Yersinia*, patogena *Escherichia coli* i *Listeria* predstavljaju najznačajnije bakterije koje dovode do oboljenja usled konzumiranja hrane (engl. food-borne disease) (**Schlundt, 2002**).

Iako je *Listeria monocytogenes* poznata kao animalni patogen više od 70 godina (Murray i sar., 1926), kao značajan patogen koji se unosi hranom priznata je tek u zadnjih dvadesetak godina.

Od kako je *Listeria* ustanovljena kao bakterija koja može da izazove oboljenje listeriozu, putem hrane (**Schlech i sar., 1983**), sve više se povećava interes i potreba za kontrolom ovog mikroorganizma u najraznovrsnijim namirnicama.

Prvi slučaj incidenta listerioze 1929. godine izneo je Nyfeldt, da bi tek 1981. godine, nakon ispitivanja tri značajna slučaja epidemije listerioze: izazvane kupus-salatom (**Schlech i sar., 1983**), punomasnim i delimično obranim mlekom (2% mlečne masti) (**Fleming i sar., 1985**) i mekim meksičkim sirom (**Linnan i sar., 1988**), *Listeria monocytogenes* bila smatrana uzročnikom bolesti čiji je glavni izvor oboljenja hrana i kao takva jedan od bitnih prenosioca zaraze među ljudima (**Schuchat i sar., 1992; Pinner i sar., 1992**).

Tabela 2.19. Procena pojave oboljenja izazvanih hranom, sa epidemiološkog stanovišta
(*FoodNet data for 1997, CDC, 1998*).

<i>patogen</i>	<i>oboleli na 1 000 000 stanovnika</i>
<i>Vibrio</i>	3
<i>Listeria</i>	5
<i>Yersinia</i>	10
<i>E.coli O157:H7</i>	28
<i>Shigella</i>	85
<i>Salmonella</i>	124
<i>Campylobacter</i>	217
svi bakterijski patogeni	472

Izbijanje epidemije u Kaliforniji tokom 1985. godine, kada su obolele 142 osobe, od kojih je 48 završilo smrtnim ishodom, bio je poslednji udarac da bi se *Listeria monocytogenes* prihvatila kao izuzetno značajan patogen (*ICMSF, 1996*).

Listerioza predstavlja generalizovanu infekciju koja nastaje nakon oralne ingestije uzročnog agensa (*Finlay, 2001*).

Miettinen i sar. (1999) su ustanovili povezanost febrilnog gastroenteritisa kod pacijenata koji su konzumirali vakuum pakovanu hladno dimljenu pastrmku, koja je sadržavala visok nivo kontaminacije *L.monocytogenes*. Pacijenti su konzumirali proizvod sedamnaestog dana nakon vakuum pakovanja, a temperatura prostora gde je čuvan proizvod je bila 4.6°C, a pri vrhu 11.6°C. Uzorci su imali 1.9×10^5 cfu/g *L.monocytogenes*.

Povrće, mesni i mlečni proizvodi i morska hrana mogu da budu kontaminirani sa *Listeria spp.*, i kao takvi se smatraju jednim od glavnih izvora za pojavu listerioze, a nedavno je zabeleženo još nekoliko slučajeva izbijanja listerioze korišćenjem mesnih proizvoda (**Rorvik i sar., 2000**).

Pored toga, listerije imaju jedinstvenu mogućnost razmnožavanja na temperaturi od 4°C u hrani čuvanoj u frižiderima (**Hof i sar., 1994**). *Listeria monocytogenes* u hrani se razmnožava u širokom rasponu pH, temperature i relativno niskoj aktivnosti vode. Pri 4°C generacijsko vreme *L. monocytogenes* iznosi 12-36 časova. Kada se hrana čuva duže vreme, pri temperaturi frižidera, broj *L. monocytogenes* se može uvećati i do 10⁶/g. Halotolerantna je i preživljava 100 dana u koncentracijama soli od 30.5% pri temperaturi od 4°C. Ova osobina listerija omogućava njeno preživljavanje u nekim vrstama sireva i drugim proizvodima od mleka.

Ukoliko je pojava humane listerioze niska (2-15 na milion), letalni odnos (broj letalnih ishoda/broj slučajeva listerioze) iznosi više od 20% (**Cabanes i sar., 2002**). U SAD je zabeleženo 2500 slučajeva listerioze svake godine, što bi značilo da se može očekivati i do 500 smrtnih ishoda uzrokovanih listeriozom (**Mead i sar., 1999**). Epidemija listerioze pokazuje globalno povećanje u Evropi i Severnoj Americi od 1980-tih godina; ipak, nije jasno da li je to povećanje realno, ili je nastalo kao rezultat boljeg poznavanja materije i adekvatnije kontrole namirnica, u odnosu na prethodne decenije.

Postoji nekoliko načina prenosa listerija: infekcija sa majke na fetus u uterusu ili prilikom rođenja, sa deteta na dete, sa životinja na čoveka, i najvažniji način-transmisija hranom (**McLauchlin, 1993; Rocourt, 1996**).

Termin „alimentarna listerioza“ se koristi za pojavu listerioze kod ljudi, nastalu preko hrane i najčešće je povezana sa nedovoljnim znanjem o patogenim bakterijama koje se mogu preneti hranom i izazvati oboljenja.

Najaktuelniji uzročnici bolesti hrane koji se putem hrane mogu preneti na ljude su *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* i *E.coli* 0157:H7.

Sa skoro 8000 slučajeva u SAD i 2000 smrtnih ishoda godišnje, meningitisi izazvani bakterijama predstavljaju značajan izvor morbiditeta i mortaliteta. Osnovni uzročnici su *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, grupa B streptokoka i *Haemophilus*

influenzae. Kod pacijenata sa oslabljenim imunim sistemom, takođe bitan patogen je i *Listeria monocytogenes*.

U tabeli broj 2.20. se može videti procentualna zastupljenost uzročnika bakterijskog meningitisa, po starosnim kategorijama.

Tabela 2.20. Procentualna zastupljenost uzročnika bakterijskih meningitisa po starosnim kategorijama

Starosna kategorija	Mikroorganizam	Približna učestalost
Novorođenčad	<i>Streptokoke grupe B</i>	68%
	<i>L.monocytogenes</i>	22%
	<i>S.pneumoniae</i>	10%
1 – 23 meseca	<i>S.pneumoniae</i>	45%
	<i>N.meningitidis</i>	30%
	<i>Streptokoke grupe B</i>	20%
2 – 18 godina	<i>N.meningitidis</i>	58%
	<i>S.pneumoniae</i>	30%
	<i>H.influenzae</i>	5%
19 – 59 godina	<i>S.pneumoniae</i>	60%
	<i>N.meningitidis</i>	20%
	<i>H.influenzae</i>	10%
60 godina i više	<i>S.pneumoniae</i>	70%
	<i>L.monocytogenes</i>	20%
	<i>H.influenzae</i>	5%

Ozbiljne infekcije listerijama manifestuju se septikemijom i meningitisom, a mogu da se završe i letalno. Izuzetno rizične kategorije za listeriozu su novorođenčad, stare osobe i osobe sa oslabljenim imunitetom i trudnice. Infekcije zdravih osoba su retke.

Mortalitet kod ozbiljnih, nelečenih listerioza je velik i može da iznosi i do 25%.

Ralovich (1987) ističe da je za humanu listeriozu karakterističan i neravnomeran raspored broja obolelih po starosnim kategorijama. Prosečan broj, izračunat za različite zemlje, obolelih osoba do 31 dana života (bebe) iznosi 40.3%, a od 70 – 79 godina 20.7%. Po tome, listerioza se najčešće javlja kod novorođenčadi i starijih ljudi. Isti autor iznosi da prosečan mortalitet, izračunat za nekoliko evropskih zemalja kod humane listerioze, iznosi 30.6% (varijacije od 16% do 44.6%).

Zabeležen je veći broj izbijanja listerioze tokom proteklih dvadesetak godina na području Evrope i Severne Amerike: salata od kupusa (**Schlech i sar., 1983**); meki sir spravljen od svežeg i pasterizovanog mleka (**Linnan i sar., 1988; Bula i sar., 1995**); jetrena pašteta (**McLauchlin i sar., 1991**); svinjski jezik u želeu (**Jacquet i sar., 1995**); pastrmka (**Ericsson i sar., 1997; Miettinen i sar., 1999**); dimljene školjke (**Brett i sar., 1998**) i frankfurkteri (**CDC, 1999**).

U brojnim epidemijama je sir bio čest izvor *Listeria monocytogenes*. Patogeni agens može da bude prisutan u mleku ili se nalazi u proizvodima od mleka kao posledica sekundarne kontaminacije. **Eilertz i sar. (1993)** su utvrdili listeriozu koza na farmama gde se proizvodio sir. Pozitivan nalaz *Listeria monocytogenes* je bio i u siru tih pozitivnih koza na listeriozu, ali i kod koza koje nisu bile pozitivne na prisustvo listerija u tkivima i mleku.

Ustanovljen je šitrok opseg godišnje pojave listerioze u Evropi, od 0.1 – 11.3 na milion stanovnika (**Notermans, 1998; FAO, 1999**). Procenjuje se da oboljenje može fluktuirati od 2-10 slučajeva na milion stanovnika, sa stopom smrtnosti od 20-30%.

Ispitivanjem u Danskoj je ustanovljeno da je konzumacija nepasterizovanog mleka faktor rizika za pojavu sporadičnih slučajeva listerioze (**Jensen i sar., 1994**).

Tabela 2.21. Registrovane epidemije *L.monocytogenes* uzrokovane hranom

Godina	Epidemija		
	Mesto izbijanja	Broj obolelih/broj smrtnih slučajeva	Izvor infekcije
1960	Nemačka	Oko 81	Nepoznat
1966	Nemačka	279	Mlečni proizvodi
1979	USA, Boston	23	Povrće
1981	Kanada	41 / 18	Kupus salata
1983	USA, Boston	49 / 14	Pasterizovano mleko
1983 – 1987	Švajcarska	122 / 34	Meki sirevi
1985	USA, Los Angeles	142 / 48	Meki sirevi
1986 – 1987	USA, Filadelfija	36	Povrće
1987 – 1989	Velika Britanija	366	Pašteta
1988	Oklahoma	1	Ćureće viršle
1989-1990	Danska	27	tvrdi sir
1989	USA	10	Rakovi
1990	Australija	11	Procesirano meso ili pate
1992-1993	Francuska	279 / 85	Svinjski jezik u aspiku
1993	Francuska	38 / 1	Svinjsko meso, konzervisano
1993	Italija	18	Salata od pirinča
1994	USA	48	Čokoladno mleko
1994-1995	Švedska	8	pastrmka
1995	Francuska	20	Sir od sirovog mleka
1997	Finska	5	Pastrmka
1997	Italija	1566	Salata od tune i kukuruza
1998	USA	Oko 100 / 4	Hot-dog
1999-2000	Francuska	10 / 3	Svinjsko meso, konzervisano
1999-2000	Francuska	32 / 5	Svinjski jezici u želeu
2000	USA	29 / 4	Deli ćureće meso
2000	Novi Zeland	7	RTE meso
2000	Novi Zeland	21	RTE meso
2000-2001	USA	12	Meksički sir
2001	USA	16	Ćuretina

U SAD je registrovana epidemija listerioza sa više od 211 slučajeva, od kojih se 67 završilo letalno (**Gahan i sar., 1991**), dok je znatno više bilo sporadično slučajeva (**Pinner i sar., 1992; Scuchat i sar., 1992**).

Tham i sar. (2000) su opisali epidemiju u Švedskoj, koja je trajala od avgusta 1994. do juna 1995., pri čemu je obolelo 9 pacijenata. 3 pacijenta su bila novorođenčad. Dva pacijenta su umrla. Ustanovljeno je da su svi pacijenti konzumirali vakuum pakovanu pastrmku i lososa, iz kojih je kasnije izolovana *L.monocytogenes*, serotipa 4b.

Većina slučajeva listerioze, gde je bila uključena morska hrana nisu izazivali velike epidemije (manje od 10 slučajeva po epidemiji). Iako su industrijski razvijene zemlje prijavljivale ovo oboljenje, niske stope pojave bolesti u Africi, Aziji i Latinskoj Americi ne mora da znače da je to tačan epidemiološki uvid stanja ovih zemalja (**Destro, 2000**), pa se pretpostavlja da razlike u podacima mogu da potiču usled klimatskih razlika (**Ababouch, 2000**). **FAO (1999)** napominje da razlog niske pojave oboljenja u nerazvijenim zemljama može da bude posledica kombinacija faktora kao što su način i navike u ishrani, osetljivost individua ili nepouzdana testovi izolacije i identifikacije listerija.

Za bakteriju *Listeria monocytogenes* je poznato da ne samo što može da uzrokuje listeriozu, već i da može predisponirati pojavi drugih oboljenja, kao sekundarnih infekcija. **Farber i Peterkin (1991)** ukazuju da i zdrave jedinke mogu da budu nosioci listerija.

Čak 6% ljudi nosi u intestinalnom traktu bakteriju *Listeria monocytogenes*, bez pojave oboljenja. Visoko rizična hrana može da dovede samo do manjeg broja sporadičnih slučajeva.

Ustanovljeno je da leukemija, AIDS i transplantacija bubrega znatno povećavaju rizik na prijemčivost listerija.

Paul i sar.(1994) su istraživali epidemiologiju, kliničke znake i posledice 84 slučaja u četiri bolnice u Sidneju, u periodu od 1983. do 1992. godine. Njihovi nalazi su u podudarnosti sa drugim izveštajima i ustanovljeno je da je listerioza primarno bolest starijih, imunodeficitarnih osoba, trudnica i novorođenčadi. Skoro jedna četvrtina slučajeva su bili pacijenti već hospitalizovani, pa je dokazano da *Listeria monocytogenes* može da bude značajan patogeni agens koji se po bolnicama javlja kod imunodeficitarnih pacijenata. Umrlo je 18 pacijenata od direktnih posledica listerioze, dok je još 9 podleglo posledicama od osnovnih, prvobitnih bolesti, tokom boravka u bolnici.

Od januara 1990. do decembra 1999. godine dijagnostikovano je 153 slučaja listerioze koja nisu nastala perinatalno. Tokom tog desetogodišnjeg ispitivanja, ustanovljen je procenat od 21.5% osoba koji su pacijenti sa cirozom jetre, od kojih je kod 39.4% postojao pozitivan rezultat na prisustvo *Listeria monocytogenes* u ascitesu. Nije ustanovljena sezonska pravilnost. Od 13 pacijanata koji su oboleli od listerioze, 9 je imalo jedan ili više predisponirajućih faktora, pored ciroze jetre: 4 sa diabetes mellitus-om, 2 sa hepatokarcinomom, 1 sa karcinomom pluća, 1 sa hroničnom obstruktivnom plućnom bolešću i 1 HIV-seropozitivan (**Nolla-Salas i sar., 2002**).

U Velikoj Britaniji su ustanovljena tri slučaja meningitisa izazvanog sa *Listeria monocytogenes*, koji se javio u periodu od 4 do 90 meseci nakon transplantacije koštane srži, pri čemu pacijenti nisu dobijali antibiotike u profilaktičke svrhe (**Long i sar., 1993**). Opisani su i slučajevi pojave listerija u transplantiranim organima: listeria-hepatitis u transplantiranoj jetri (**Bourgeois i sar., 1993**).

Francuski istraživači utvrdili su visoko rizične grupe pacijenata: primaoci transplantiranih organa (200 slučajeva / 100 000 primaoca organa); pacijenti oboleli od tumora (13 slučajeva / 100 000 pacijenata); i osobe starije od 65 godina bez utvrđenih bolesti (1.4 slučajeva / 100 000 osoba) (**Rebiere i Goulet, 1993**).

Dvogodišnje ispitivanje sprovedeno u Atlanti ukazuje na pojavu listerioze kod osoba inficiranih HIV-om (52 slučaja / 100 000 pacijenata) i kod osoba obolelih od AIDS-a (115 slučajeva / 100 000 pacijenata) (**Jurado i sar., 1993**).

Prema ovim rezultatima može da se zaključi koje kategorije osoba sa imuno-deficijacijama su najrizičnije (tabela 2.22):

Tabela 2.22. Imunodeficientne osobe i rizik za pojavu listerioze

<i>Kategorije pacijenata sa oslabljenim imunitetom</i>	<i>Broj slučajeva listerioze / 100 000 ispitanika</i>
Primaoci transplantiranih organa	200
Osobe obolele od AIDS-a	115
Osobe inficirane HIV virusom	52
Pacijenti oboleli od tumora	13
Starije osobe (preko 65 godina)	1.4

Listerioza ljudi – klinička slika

Najčešća klinička manifestacija listerioze ljudi je meningitis, praćen ponekad septikemijom.

Karakteristika listerioze je da dužina inkubacionog perioda, od konzumacije namirnice kontaminirane sa *Listeria monocytogenes* do ispoljavanja kliničkih simptoma, znatno može da varira. Inkubacija može da traje kraće od 24 časa, a može da iznosi i nekoliko dana (2-4 dana), pa čak i nekoliko nedelja.

Infekcija se obično manifestuje od srednjeg patološkog stanja sličnog gripu do infekcija krvi i mozga.

Kod odraslih osoba, *Listeria monocytogenes* pokazuje tropizam za centralni nervni sistem, kada se najčešće javljaju meningealne i/ili moždano-parenhimatozne infekcije. Simptomi gastroenteritisa (povraćanje i dijareja) mogu se pojaviti i nekoliko dana pre nego što se dijagnostikuje bolest (**Goulet i sar., 1995**).

Fokalne infekcije, kao što su endokarditis, septični artritis, osteomijelitis i peritonitis su vrlo retke i obično prethode septikemiji.

Listerioza u trudnoći se pojavljuje, najčešće u trećem trimestru. Infekcija majke može proteći asimptomatski ili sa blagim simptomima sličnim gripu, uključujući groznicu, mialgiju i glavobolju. Infekcija centralnog nervnog sistema je vrlo retka kod trudnih žena. Međutim, posledice mogu da budu vrlo ozbiljne po dete, uključujući spontani abortus, fetalnu smrt, prevremeno rođenje, različite vidove neonatalnih septikemija i meningitise **(Frederiksen i Samuelsson, 1992)**.

Infekcije trudnica u ranom stadijumu graviditeta obično vode spontanom abortusu. Ukoliko trudnoća prođe bez posledica, deca se rađaju živa, ali ubrzo mogu da obole od meningitisa koji je često fatalan. Kod listerioze novorođenčadi se mogu javiti i papularne lezije kože. Slične promene na koži su ustanovljene kod veterinaru koji je radio sa zaraženim životinjama.

Listerioza trudnica je obično asimptomatska, ili vrlo blaga, iako je stopa smrtnosti kod inficiranih fetusa i prevremeno rođenih oko 50%.

Utvrđena je rasprostranjenost fekalnog prenosa listerija u svakom tromesečju trudnoće, pri čemu je ispitivano 147 trudnica **(Gray i sar. 1993)**. Četiri uzorka su bila pozitivna na prisustvo *Listeria monocytogenes*. Uzorci su uzimani tokom 12-e, 26-e, 28-e i 36-e nedelje graviditeta. Dva izolata su pripadala serotipu 4b, a dva 1/2c. Dve trudnice su obolele u 38. gestacionoj nedelji, a njihova novorođenčad su imala razvoj bez komplikacija i nije ustanovljeno prisustvo listerija kod beba, u placenti, pupčanoj krvi, maternalnom serumu i peripartalnom maternalnom fecesu.

Ustanovljeno je da je privremeni fekalni prenos listerije prisutan kod najmanje jedne od 20 trudnica bez štetnog efekta.

Marth (1988) je izvršio podelu formi listerioza i definisao glavne karakteristike listerioze ljudi. Sistematizacija formi kliničkih slika listerioze prikazana je tabelarno (tabela 2.23). Letalitet se kreće oko 20 – 30% kako za sporadične, tako i za slučajevne epidemije **(Jones i sar., 1994 ; Goulet i sar., 1995)**.

Letalitet kod osoba sa oslabljenim imunitetom, starijih osoba i pacijenata sa infekcijama centralnog nervnog sistema je znatno viši i iznosi 38 – 45% **(Skogberg i sar., 1992 ; Bula i sar., 1995)**.

Epidemiologija listerioze ljudi

Epidemiološki aspekt listerioze, rasprostranjenost *Listeria monocytogenes* u životnoj sredini, hrani, otkrivanje izvora zaraze i način prenošenja na ljude i životinje, obrađivan je u mnogobrojnim studijama.

Tabela 2.23. Forme listerioze ljudi

Karakteristike listerioze ljudi Oblik listerioze	Glavni simptomi
<i>Listerioza trudnica</i>	Groznica, bolovi u glavi i leđima, diskoloracija urina (moguća infekcija fetusa)
<i>Listerioza novorođenčadi</i>	Otežano disanje, srčana slabost, cijanoza, povraćanje, konvulzije
<i>Menigitis i meningoencefalitis</i> (primarno kod novorođenčadi i osoba iznad 50 godina)	Novorođenčad - ubrzano disanje, groznica, anoreksija, konvulzije, podrhtavanje mišića Odrasli – glavobolja, ukočenost vrata, nauzeja, povraćanje, fotofobija, somnolentnost, konvulzije, delirijum
<i>Kutana listerioza</i> (veterinari i farmeri)	Čvorići po koži veličine od čiodine glave do zrna graška, sa zagojenim centrom
<i>Septikemična listerioza sa faringitisom i mononukleozom</i> (češće kod odraslih nego kod dece)	Groznica, jak faringitis, leukocitoza i mononukleozna
<i>Okuloglandularna listerioza</i>	Konjunktivitis (ponekad praćen meningi-tisom ili septikemijom)
<i>Granulomatosis septica i pneumonična listerioza</i>	Septikemija, pneumonija
<i>Cervikoglandularna listerioza</i>	Cervikalna i submandibularna limfadenopatija

Cox (1989) je saznanja o epidemiologiji listerioze ljudi svrstao u 11 karakteristika :

1. Bolest je retka, ali je mikroorganizam veoma čest u životnoj sredini;
2. Epidemije su retke – bolest se najčešće dešava u vidu sporadičnih slučajeva;
3. Bolest je povezana sa konzumiranjem hrane;
4. Listerioza može biti "nosocomially" stečena;

5. Bolest se dešava kod predisponiranih osoba i mortalitet iznosi oko 30%;
6. *Listeria monocytogenes* se može nositi bez posledica različito dugo pre nastupanja simptoma;
7. *Listeria monocytogenes* se može nositi bez posledica čak i od strane osetljivih osoba;
8. Incidencija listerioze pokazuje pikove tokom leta i zime;
9. Incidencija listerioze je u porastu u nekim zemljama;
10. Dijareja, nauzeja i povraćanje se ponekad javljaju pre nastupanja listerioze;
11. Epidemije mogu da obuhvate različite serotipove.

Nalaz *Listeria monocytogenes* u namirnicama animalnog porekla

Sposobnost listerija da raste pri temperaturi hlađenja, da je rasprostranjena u prirodi i da preživljava dugo vremena u nepovoljnim uslovima doprineli su saznanju da je ova bakterija sve značajniji patogen koji se prenosi hranom na ljude.

Listeria monocytogenes se pojavljuje kao kontaminant mnogih vrsta namirnica, kako animalnog, tako i biljnog porekla.

Prisustvo listerija u hrani može da bude različitog porekla: kontakt sa kontaminiranim drugim namirnicama ili površinama, postprocesna kontaminacija u proizvodnoj okolini, ili kontaminacija usled manipulacije hranom, ili tokom skladištenja namirnica.

Izvori kontaminacije mleka su raznovrsni. Krave izlučuju listerije mlekom nakon pobačaja ili za vreme infekcije vimena koja je praćena mastitisom. Kontaminacija mleka moguća je i iz fekalnog izvora. Pored mleka, kao izvori kontaminacije mlečnih proizvoda sa *Listeria monocytogenes* može da bude i oprema za preradu mleka. U mlekaru se listerije mogu uneti preko odeće i obuće radnika, vazduha, glodara i ptica. Pored toga, u pogone za preradu mleka, listerije se mogu uneti sirovim materijalom i ingredijencijama, kao što su kazein, kiseli gruš i poluzreli sirevi.

Izvori listerija za kontaminaciju mesa u klanici mogu biti limfni čvorovi.

U objektima za čuvanje i preradu hrane važan izvor kontaminacije mogu da budu vlažan vazduh i vlažne površine na zidovima i aparatima.

Listeria monocytogenes je relativno otporna u procesima zrenja mesa. Izolovana je iz mnogih mesnih proizvoda i prerađevina: iz kobasica, suvog mesa, dimljenih proizvoda, salama, narezaka, narezaka dimljenog mesa, frankfurktera, kuvanih salamurenih kobasica, narezaka kuvane šunke, brzofermentovanih kobasica, vakuum-pakovanih proizvoda.

Mayrhofer i sar. (2004) su ispitivali prisustvo *Listeria monocytogenes* u različitim vrstama mesa (tabela 2.24.) i ustanovili su sledeće: od 90 uzoraka svinjskog mesa, 20 je bilo pozitivno (22%). U goveđem mesu je bilo 12% pozitivno (11 pozitivnih nalaza od 91 uzoraka), u mlevenom mesu su izolovana 3 slučaja (23%), dok je kod ispitanih 89 uzoraka pilećeg mesa pozitivno na prisustvo listerija bilo 23 (26%), a kod ćurećeg mesa od 21 uzorka, 3 su bila kontaminirana ovim patogenom (14%).

Autori su ispitivali i rezistenciju izolovanih *Listeria monocytogenes* na antibiotike i ustanovili osetljivost na sledeće: tetraciklin, penicilin, gentamicin, vankomicin, kotrimoksazol, eritromicin, hloramfenikol i streptomycin.

Tabela 2.24. Prisustvo *Listeria monocytogenes* u mesu različitog porekla (**Mayrhofer i sar., 2004**)

<i>Vrsta mesa</i>	<i>Broj pregledanih uzoraka</i>	<i>Broj pozitivnih uzoraka</i>	<i>Procentualna zastupljenost</i>
Svinjsko meso	90	20	22%
Goveđe meso	91	11	12%
Mleveno meso	13	3	23%
Pileće meso	89	23	26%
Ćureće meso	21	3	14%

Tabela 2.25. pokazuje ispitivanje koje su sproveli **Mena i sar. (2004)**. Ispitano je 1035 uzoraka raznovrsnih životnih namirnica, čime je pokazana osobina ubikvitarnosti *Listeria monocytogenes*. Iz priložene tabele može da se zaključi koji su proizvodi najizloženiji kontaminaciji listerijama: sveža piletina (60%), sveže meso (17.7%), sirovo mleko (16.7%), sveža riba (12%), brašno (18.5%) i zamrznuto povrće (12.9%). Navedeno prisustvo *Listeria monocytogenes* u ovim uzorcima ne može da se smatra konačnim, pošto ove namirnice podležu daljoj obradi, koja najčešće obuhvata termičko tretiranje, čime je omogućena eliminacija ovog patogenog mikroorganizma (**Nørrung, 2000**).

I delikatesni proizvodi mogu da sadrže *Listeria monocytogenes*. Tako je izolovan ovaj mikroorganizam iz šunke (25%), španske specijalne kobasice (3.7%), krvavice (11.1%), i pršuta (2.3%).

Listeria monocytogenes može da se izoluje iz svežeg i pasterizovanog mleka, krema, butera i sladoleda. Ova bakterija je sposobna da preživi zrenje mnogih različitih sireva i može se naći i u srednje kiselim mlečnim proizvodima i kotaž sirevima. U objektima za proizvodnju sireva sa crvenom mažom, značajan izvor kontaminacije može da bude voda za mažu i mašine za mazanje u odeljenju za zrenje.

Sposobna je da preživi u kuvanim jajima, ali i u zamrznutim jajima.

Biljke i biljni proizvodi mogu da budu kontaminirani sa *Listeria monocytogenes*. Veruje se da je najčešći način kontaminacije biljaka uslovljen lancem: biljke - stočna hrana (posebno silaža) - digestivni trakt životinja – feces – stajnjak - biljke. Različite salate od kupusa, paradajza i rotkvica predstavljaju najčešći izvor zaraze za ljude.

Izvršena je podela životnih namirnica na grupe visokog rizika i rizične namirnice koje bi trebalo izbegavati kako bi se zaštitili od moguće infekcije.

Tabela 2.25. Pojava *Listeria monocytogenes* u raznovrsnim životnim namirnicama
(Mena i sar., 2004)

Vrsta namirnice	Broj uzoraka	Broj pozitivnih uzoraka na prisustvo <i>Listeria monocytogenes</i>	Procentualna zastupljenost
Zamrznuti cvetovi karfiola	106	18	17%
Zamrznuti brokoli	37	6	16.2%
Zamrznuto povrće-mešano	37	0	-
Zamrznute zelene paprike	31	7	22.6%
Zamrznuti pasulj	27	4	14.8%
Zamrznute crvene papričice	33	0	-
Sirovo mleko	6	1	16.7%
Pasterizovano mleko	28	0	-
Sir od pasterizovanog mleka	371	6	1.6%
Sveži sir	50	2	4%
Sveža piletina	15	9	60%
Sveže (crveno) meso	17	3	17.7%
Šunka	4	1	25%
Pršut	44	1	2.3%
Španska kobasica	27	1	3.7%
Dimljena kobasica	48	0	-
Krvavica	9	1	11.1%
Sveža riba	25	3	12%
Školjke	8	0	-
Brašno	27	5	18.5%
Kolači, torte	73	3	4.1%
Sušeno voće (lešnjaci, kikiriki, kajsije, bademi)	12	1	8.3%
Ukupno	1035	72	7%

Listerija se najbolje razvija na namirnicama:

- koje nisu adekvatno termički obrađene;
- koje su dugo vremena provele u skladištu;
- koje su proizvedene na mestu na kojem principi higijenskog rukovanja hranom nisu sprovedeni;
- kuvano-hladni "spremni za jelo" obroci (ready to eat, engl. skrać. RTE).

U grupu rizičnih namirnica koje su komercijalno pripremljene spadaju:

- Pašteta;
- Kuvana, narezana piletina (koja se koristi za pileće sendviče);
- Mesni proizvodi (svinjska kobasica, šunka i ostale prerađevine);
- Meki sirevi (brie, camembert, feta, rikota, domaći sveži beli sir);
- Gotova ili pakovana salata (kupus salata);
- Hladna dimljena ili sveža riba (dimljeni losos, kamenice, suši)
- Točeni sladoled i gusti milk-shake.

Harvey i Gilmour (1993) su odredili zastupljenost listerija vrsta u 513 uzoraka hrane proizvedene u Severnoj Irskoj i ustanovili njihovu zastupljenost od 35.5%, pri čemu je udeo *Listeria monocytogenes* iznosio 18.3%. Kontaminacija je bila vezana za postupak kojim je hrana proizvedena.

U jednom ispitivanju je pregledano 549 uzorka svežeg, smrznutog, „Ready to eat“ mesa iz maloprodaje, ribe i proizvoda od živine u okrugu Dublin (**Sheridan i sar., 1994**). U kuvanom, upakovanom mesu listerije nisu nadjene, ali su izolovane iz 21% uzoraka kuvanog prodavanog kao neupakovano, što ukazuje na postprocesnu kontaminaciju. *Listeria spp.* je najčešće izolovana iz govedih pljeskavica (97%) i ribljih ćevapčića (95%), pri čemu je od toga 61 izolat bio *L.monocytogenes*, 210 *L.innocua* i 40 izolata drugih vrsta listerija.

Uzorci svežeg mesa, uključujući piletinu, govedinu i ovčetinu, pregledani su sa istim ciljem. U govedini je izolovano 10% *L.innocua*, dok su piletina i ovčetina bile bez ove bakterije (**Baek i sar., 2000**).

U toku perioda od 12 meseci, sakupljeno je i pregledano 2050 uzoraka na prisustvo patogenih bakterija. Od 1750 uzoraka mlevene junetine, 61 uzorak (3.5%) je bio pozitivan na prisustvo enterohemoragične *E.coli* (EHEC), 20 (1.1%) na *E.coli* O157. *Salmonella* je bila prisutna u 67 (3.8%), dok je 18 uzoraka (3.5%) bilo pozitivno na prisustvo *L.monocytogenes*. U 200 uzoraka povrća, 12 (6%) je imalo EHEC, 3 (1.5%)

E.coli O157, 14 (6%) *Salmonella spp.*, a ni jedan nije sadržavao bakteriju listeriju. Od pečuraka, 4 (4%) je bilo pozitivno na EHEC, ali ni jedan na *E.coli* O157; 5(5%) je imalo *Salmonella spp.*, a samo jedan uzorak (1%) je bio kontaminiran sa *Listeria monocytogenes* (**Samadpour i sar., 2006**).

Ispitivanjem 209 uzoraka iz lanaca marketa tokom 3 meseca, ustanovljeno je čak 17 (8.1%) pozitivnih nalaza *Listeria monocytogenes* u sečenim, slajsovanim proizvodima od mesa (šunke, salame, slanina, pršuta)(tabela 2.26) (**Apostolos i sar., 2006**).

Tabela 2.26. Prisustvo *Listeria monocytogenes* i drugih vrsta roda listerija u proizvodima od mesa koji su sečeni i slajsovani (**Apostolos i sar., 2006**).

<i>proizvođač</i>	<i>proizvod</i>	<i>L.monocytogenes</i> (cfu/g)	<i>ostale vrste</i> <i>listerija</i>	<i>koncentracija</i> <i>ostalih vrsta</i> <i>listerija</i> (cfu/g)
X	slanina	<10	<i>L.welshimeri</i>	<10
S	šunka	<10	<i>L.welshimeri</i>	<10
S	slanina	10	<i>L.welshimeri</i> , <i>L.innocua</i>	<10
E	slanina	<10	<i>L.welshimeri</i>	<10
E	slanina	10		70
E	slanina	<10	<i>L.welshimeri</i>	<10
E	slanina	<10	<i>L.welshimeri</i>	60
E	slanina	<10		<10
E	slanina	<10		<10
E	slanina	<10		<10
E	slanina	<10		<10
P	salama	<10	<i>L.welshimeri</i>	<10
P	salama	<10	<i>L.innocua</i>	<10
I	šunka	<10		<10
Z	slanina	<10	<i>L.innocua</i>	690
C	slanina	<10	<i>L.innocua</i>	<10
R	salama	<10	<i>L.welshimeri</i>	<10

Od mlečnih proizvoda koji su pregledani, jedino je sirovo mleko sadržavalo 2.9% *L.innocua*. Pojava *Listeria monocytogenes* u sirovim uzorcima mleka se kreće od 0.94% do 15% (**Baek i sar., 2000; Uraz i Yucel, 1999**).

Jay i sar. (2005) navode da je ispitivanjem sirovog mleka u tankovima sa 260 farmi u Škotskoj, u 25 uzoraka od ukupno 160 ispitanih, dokazan ovaj mikroorganizam. U Holandiji u toku 1988.godine od 5779 maloprodajnih uzoraka hrane, u 3% uzoraka je dokazana ova bakterija. Najmanje prisustvo *Listeria monocytogenes* bilo je u sladoledu, u kome je listerija dokazama u samo 0.2% uzoraka od 649 ispitanih, dok je najveće prisustvo uočeno u svežem mesu sa 7.5% od 416 uzoraka koji su bili pozitivni. U Holandiji je od 929 uzoraka mekih sireva, koji su bili proizvedeni od svežeg mleka, u 4.6% uzoraka dokazana *Listeria monocytogenes*. U Engleskoj i Velsu ovaj organizam nađen je u 4% od 56959 gotovih jela (**Popović i sar., 2008**).

Tokom perioda od 1997. do 2000.godine je pregledano 181 mali pogon za proizvodnju sira u Austriji. Pregledano je 2615 uzoraka. Od 181 pogona, čak 50 (27.6%) je bilo kontaminirano sa *Listeria monocytogenes*. Nakon izolacije listerija, izvršena je serotipizacija gel elektroforezom. 27.3% izolata je bilo 4b serotipa (**Wagner i sar., 2006**).

Biljke i plodova voća i povrća koji se koriste kao salata ili se konzumiraju u svežem stanju takođe imaju značajnu ulogu u širenju ovog patogena, od njegovog prirodnog staništa do životinja, gotovih proizvoda i ljudi. Ispitivanjem 120 uzoraka svežeg voća i povrća u radu **Popovića i Nikšića (2007)**, najveće prisustvo *Listeria monocytogenes* bilo je u krompiru (13.3%), šargarepi (6.66%) i spanaću (10%). Osim toga, i sirovi sok od jabuke je bio oidentifikovan kao izvor kontaminacije ovom bakterijom u SAD, što je dovelo do oboljenja i smrti određenog broja potrošača.

U istraživanjima **Sado i sar. (1998)** bila su detektovana tri izolata *Listeria monocytogenes* u nepatserizovanom soku od jabuke (pH 3.75). I u radu **Conwaya i sar. (2000)** utvrđeno je da *Listeria monocytogenes* može da opstane i raste na sveže sečenoj jabuci, kao i u

jabukovom soku. **Beuchat i sar. (1998)** zapažaju da listerija na površini jabuka pokazuje veću rezistenciju prema hlornom tretmanu nego *E.coli* O157:H7 i salmonela. Zato se ovaj organizam može posmatrati i kao potencijalna pretnja za bezbednost soka od jabuke. Iz tih razloga, od nedavno Food and Drug Administration (FDA) zahteva povećanu bezbednost sokova od voća i povrća, koja podrazumeva da je proizvođač obavezan da primeni postupak obrade koji postiže smanjenje broja najrezistentnijih patogena za 5log, u poređenju sa brojem organizama koji mogu biti prisutni u neprerađenom soku (**FDA, 2001**).

U periodu od 1990. – 2001. godine, od prijavljenih 56 slučajeva alimentarne listerioze ljudi 19 je bilo prouzrokovano morskom hranom, gde su dominirali dimljeni proizvodi od ribe (**ANZFA, 2002**).

Nalaz *Listeria monocytogenes* u ribi, proizvodima od ribe i plodovima mora

Listeria spp. je ubikvitaran mikroorganizam, široko rasprostranjen u okruženju (**Jones i Seeliger, 1992**). *Listeria monocytogenes* je izolovana iz vode reka i rečnog sedimenta (**Colburn i sar., 1990**), kanala i jezera (Dijkstra, 1982), morske vode i obala (**Colburn i sar., 1990**). Iz tih razloga, može da se očekuje da se ovaj mikroorganizam može naći i u vodenim organizmima (**Karunasagar i Karunasagar, 2000**).

Podaci prikupljeni tokom poslednjih 10 godina, ukazali su na postojanje grupa namirnica koje se smatraju različito rizičnim za pojavu listerioze (**Rocourt i sar., 2000**).

U visoko rizične namirnice u okviru vrsta ribe, proizvoda od ribe i plodova mora spadaju sledeće:

- Mekušci, uključujući sveže i zamrznute školjke, rakove, ostrige, u ljušturama ili očišćene;
- Sveža riba (koja se konzumira bez termičke obrade);

- Riblji proizvodi u lakom pakovanju-rastvor NaCl u vodenom rastvoru (NaCl<6%) (soljena, marinirana, fermentirana, hladno dimljena i riba u sopstvenom soku);
- Srednje termička obrada ribljih proizvoda i rakova (pasterizacija, kuvanje, toplo dimljenje, uključujući i pred-kuvanje i panirane proizvode).

U namirnice ribljeg porekla niskog rizika nalaze se:

- Polukonzervirane ribe (NaCl>6%, ili pH<5 , konzervansi-benzoati, sorbati, NO₂),
- soljene i/ili marinirane ribe, kavijar i fermentovane ribe;
- Termički proces (sterilizovane, upakovane u zapečaćene ambalažne jedinice);
- Sušene ribe, sušeno-soljene i sušeno-dimljene ribe;
- Sveže/zamrznute ribe i rakovice.

Zabeležen je i veći broj epidemija uzrokovanih prisustvom listerija u hrani kao što su meso ribe, proizvodi od ribe i morski plodovi. Na osnovu tabele 2.27. mogu da se vide pojave oboljenja izazvanih listerijom. Od prijavljenih 25 slučajeva, čak dve osobe su podlegle bolesti sa fatalnim ishodom. Od serotipova *Listeria monocytogenes* dominirali su 4b, 1/2b i 1/2a.

Pregled proizvoda od ribe na prisustvo *Listeria monocytogenes* izvršio je **Embarek (1994)**, kada je ustanovljeno da širom sveta prisutnost listerija iznosi 4-12%, zavisno od temperature sredine. Pojava *Listeria monocytogenes* u tropskim ribama i plodovima mora je niska i iznosi od 0-2% (**Davies i sar., 2001**). Pored *Listeria monocytogenes* izolovane su i druge vrste listerija, a većinom je otkrivena *Listeria ivanovii*.

Tabela 2.27. Glavne dokumentovane listerioze uzrokovane konzumacijom hrane kao što je riba, proizvodi od ribe i plodovi mora

<i>Država</i>	<i>Godina</i>	<i>Broj slučajeva</i>	<i>Klinička forma</i>	<i>Broj fatalnih ishoda</i>	<i>Vrsta hrane</i>	<i>Serotip</i>
SAD	1989	2	-	-	Škampi	4b
Italija	1989	1	1	-	Riba	4b
Australija	1991	2	2	-	Dimljene školjke	-
Novi Zeland	1992	4	-	-	Dimljene školjke	1/2b
Kanada	1996	2	2	-	Imitacija mesa krabe	1/2b
Švedska	1994/95	6-9	6	2	Pastrmka u sopstvenom soku	4b
Finska	-	5	5	-	Hladno dimljena pastrmka	1/2a

Sakupljeno je 100 uzoraka hrane od proizvoda mora (ribe, lignje, mekušci i školjke) uz argentinske obale Atlantika i pregledano na prisustvo *Listeria spp.* Pronađeni izolati su pregledani biohemijskim testovima, serotipizacijom, fagotipizacijom i pregledom DNK pomoću elektroforeze korišćenjem makrorestriksijskih enzima. Pojava *Listeria spp.* iznosila je 12%. Od 12 izolovanih vrsta, 3 su pripadale *Listeria monocytogenes* i pronađene su kod različitih vrsta mekušaca. Ostalih 9 izolovanih listerija pripadale su vrsti *Listeria innocua* iz ribe, lignji i školjki. Sve tri izolovane *Listeria monocytogenes* pripadaju serovarijetetu 4b. Od *L.innocua*, 8 pripadaju serotipu 6a, a jedna 6b (**Laciar i Centorbi, 2002**).

Tabela 2.28. Prikaz vrsta proizvoda od riba koji su se nalazili u prometu u evropskim zemljama tokom 1998-1999, a iz kojih je izolovana *Listeria monocytogenes*:

<i>Datum</i>	<i>Vrsta proizvoda</i>	<i>Zemlja porekla</i>
29.1.1998.	Oslić	Nemačka
29.1.1998.	Losos i Oslić	Nemačka
23.2.1998.	Dimljena riba u ulju	Nemačka
11.3.1998.	Dimljeni losos u filetima	Danska
9.4.1998.	Zamrznuti fileti lista	Kina
9.4.1998.	Dimljeni losos	Norveška
9.4.1998.	Dimljeni losos i štika	Nemačka
11.6.1998.	Dimljeni losos	Škotska
29.1.1999.	Losos	Danska
29.1.1999.	Dimljena riba	Nemačka
29.1.1999.	Losos	Nemačka
5.2.1999.	Dimljeni losos	Danska
5.2.1999.	Dimljeni losos i losos	Nemačka/Danska
12.2.1999.	Oslić	Nemačka
12.2.1999.	Dimljeni losos	Nemačka
29.3.1999.	Dimljeni losos	Danska

L. innocua pronađena je u 30.8% , dok je *Listeria monocytogenes* u 1.3% uzoraka sveže sirove ribe. Ostale vrste iz roda *Listeria* nisu izolovane. *Listeria monocytogenes* je izolovana iz 4.2% svežih mekušaca (serovarijetet 1), a 2.9% iz sveže ribe list (serovarijetet 4) (**Inoue i sar., 2000**). Uzorci dimljene ribe nisu sadržavali *Listeria spp.* (**Dhanashree i sar., 2003**).

Na osnovu tabele 2.29. može da se vidi zastupljenost pojedinih vrsta u okviru roda *Listeria*, u hrani koju predstavljaju plodovi mora.

Tabela 2.29. Zastupljenost vrsta u okviru roda *Listeria* u hrani – plodovima mora (ribe, mekušci, školjke, rakovi) (*Dhanashree i sar., 2003*)

Uzorci	Broj testiranih uzoraka	Broj pozitivnih nalaza <i>Listeria</i> spp.			
		<i>L.innocua</i>		<i>L.monocytogenes</i>	
Oslić	10	5	50%	-	-
Skuše	14	1	7.1%	-	-
Rakovi	14	11	78.6%	-	-
Croakers riba (fam. <i>Sciaenidae</i>)	11	6	54.5%	-	-
Pomfret riba (fam. <i>Bramidae</i>)	12	2	16.7%	-	-
Sveži škampi	11	1	9.1%	-	-
Sušeni škampi	27	3	11.1%	-	-
Sardine	15	5	33.3%	-	-
Sveža riba list	35	13	37.1%	1	2.9%
Sušena riba list	15	-	-	-	-
Mekušci	24	1	4.2%	1	4.2%
Dimljena tuna	22	-	-	-	-
ukupno	210	48	22.9%	2	0.95%

Hladno dimljeni losos i pastrmka dominiraju na tržištu dimljene ribe. Ready-to-eat (RTE) morska hrana, uključujući hladno dimljenu ribu i druge proizvode često su povezani sa brojnim epidemijama izazvanim *L.monocytogenes* (*Farber i sar., 2000, Brett i sar., 1998, Ericsson i sar., 1997*). Ovi proizvodi od ribe mogu prirodno biti kontaminirani niskim brojem listerija, pa su okarakterisani kao potencijalno kontaminirani sa *Listeria monocytogenes*. Iz ovog razloga ova vrsta namirnica predstavlja ozbiljnu opasnost za osobe sa oslabljenim imunitetom, starije osobe, trudnice, malu decu. Čuvanje ovih proizvoda u nedovoljno ohlađenim rashladnim uređajima, gde temperatura skladištenja pogoduje slabom rastu ove bakterije predstavljaju najveći rizik za potencijalnu infekciju potrošača. Istraživanja su ukazala na prisustvo *Listeria monocytogenes* u različitoj hrani, ali je najveća pažnja usmerena na meso i mlečne proizvode, jer su epidemije najčešće povezane sa tom vrstom namirnica (*Dillon i Patel, 1992*).

Tabela 2.30. Nalaz *Listeria monocytogenes* kod dimljene ribe

<i>uzorak</i>	<i>poreklo</i>	<i>broj uzoraka</i>	<i>broj i procenat pozitivnih uzoraka</i>	<i>referenca</i>
dimljeni losos	Australija	59	11 (18%)	Arnold i sar., 1995.
hladno dimljeni losos	Italija	165	31 (18%)	Cortesi i sar., 1997
hladno dimljeni losos	Kanada	12	0	Dillon i sar., 1992
hladno dimljeni losos	USA	61	48 (78%)	Eklund i sar., 1995
dimljena riba	/	1210	164(13%)	Eliot i sar., 2000
hladno dimljeni losos	Kanada	32	10 (31%)	Farber, 1991
pakovani hladno dimljeni losos	Novi Zeland	13	10 (76%)	Fletcher i sar., 1994
hladno dimljena riba	UK	58	2 (3%)	Fuchs i sar., 1994.
hladno dimljeni losos	Australija	285	1 (<1%)	Garland, 1995.
dimljeni losos	Island	8	0	Hartemnik i sar., 1991.
hladno dimljena riba (više od 50% lososa)	USA	291	51 (17%)	Heinitz i sar., 1998
finfish	Novi Zeland	25	8 (32%)	Hudson i sar, 1992.
hladno dimljeni losos	uvoz u Švajcarsku	388	39 (10%)	Jemmi, 1993.
hladno dimljeni losos	Danska	380	142(37%)	Jørgensen i sar., 1998.
dimljeni losos/pastrmka	Švedska	344	49 (14%)	Linquist i sar., 2000.
hladno dimljeni losos	Švedska	13	2 (15%)	Lončarević i sar., 1996.
vakuum pakovani hladno dimljeni losos	Norveška	65	7 (10%)	Rørvik i sar., 1995.
vakuum pakovani RTE dimljeni losos	Norveška	33	3 (9%)	Rørvik i sar., 1997.
vakuum pakovani sečeni hladno dimljeni losos	Danska	1028	110(10%)	Rørvik i sar., 1997.

Postoje različiti podaci o učestalosti nalaza i nivoima kontaminacije listerijama u hladno dimljenoj ribi. Učestalost nalaza *L.monocytogenes* kod uzoraka dimljenog lososa iznosi

od 10-60% (**Heintz i Johnson, 1998; Rørvick, 2000**), a prema drugim autorima, u dimljenoj i kuvanoj ribi 36%, odnosno 78% (**Colburn i sar., 1990, FAO, 1999**). Nivo kontaminacije je najčešće oko 100 cfu/g.

Dillon i sar. (1994) su ispitali uzorke dimljenih ribljih proizvoda sa tržišta u Newfoundlendu na prisustvo listerija. Od 116 hladno dimljenih proizvoda 7 je bilo kontaminirano listerijom, a od 142 toplo dimljenih 26, sa ukupnim stepenom izolacije od 16.7%. Bakalar je imao najveći stepen kontaminacije od 46.7%, pri čemu je 18 izolata bilo *L.innocua*, a 13 *L. welshimeri* i 12 *Listeria monocytogenes*. Stepen izolacije je bio najveći u periodu od oktobra do aprila.

Iako je na tržištu Indije ustanovljeno prisustvo listerija u mesu i hrani od plodova mora *Listeria monocytogenes* nije detektovana u tropskim ribama (**Kamat i sar., 1994**). Ustanovljeno je da su *L.innocua* i *L.murrayi* najvažnije vrste u proizvodima od mesa, dok *L.grayi* i *L.seeligeri* dominiraju u ribi. Ispitivanje koje su izvršili **Karunasagar i Karunasagar (2000)** ukazuje na prisustvo *Listeria monocytogenes* u tropskoj ribi i to: 2% u termički obrađenoj ribi, 17.2% u zamrznutim mekušcima, 12.1% u zamrznutim jestivim školjkama, 1.5% u svežim, sirovim mekušcima i 4% u svežim sirovim jestivim školjkama (tabela 2.31.).

Tabela 2.31. Zastupljenost *Listeria spp.* i *Listeria monocytogenes* u tropskim ribama i proizvodima od ribe (**Karunasagar i Karunasagar, 2000**)

<i>Riba/Proizvod</i>	<i>Listeria spp.-procentualna zastupljenost (%)</i>	<i>Listeria monocytogenes-procentualna zastupljenost (%)</i>
<i>Sveža riba</i>	35.7	-
<i>Sušena riba</i>	-	-
<i>Riba i škampi</i>	10.5	-
<i>Riba (term. obrada)</i>	14.8	2
<i>Zamrznuta riba i školjke</i>	-	-
<i>Mekušci (zamrznuti)</i>	72.4	17.2
<i>Školjke (zamrznuti)</i>	44.4	12.1
<i>Dimljene školjke</i>	-	-
<i>Sveži mekušci</i>	35	1.5
<i>Sveže školjke</i>	12	4
<i>Dimljena tuna</i>	-	-

Brza hrana "spremna za jelo" (RTE, engl.skrac. od ready to eat food), čija je osnova riba i proizvodi mora, može biti kontaminirana bakterijom *Listeria monocytogenes*, kao i druge vrste namirnica. Prema ispitivanju (**Farber, 2000**) u Kanadi, tokom perioda 1996-1997 i 1998-1999 godine, pojava listerija u RTE - hrani, odnosno plodovima mora iznosila je 0.88% za prvi, i 0.3% za drugi period. Prema tabeli 19., može da se vidi koja vrsta proizvoda je sadržavala ovu patogenu bakteriju u toku dva ispitivana razdoblja.

Tabela 2.32. *Listeria monocytogenes* u brznoj morskoj hrani (RTE seafood) tokom perioda 1996-1997 i 1998-1999. godine (**Farber, 2000**)

Vrsta proizvoda	Period ispitivanja	
	1996-1997	1998-1999
<i>Lignje</i>	27	19
<i>Dimljeni fileti lososa</i>	48	38
<i>Pašteta od dimljenog lososa</i>	2	3
<i>Dimljeni losos</i>	5	2
<i>Sušeni losos</i>	-	1
<i>Dimljena pastrmka</i>	1	2
<i>Dimljena haringa</i>	3	-
<i>Dimljena skuša</i>	13	11
<i>Škampi</i>	8	5
<i>Salata od škampa</i>	1	0
<i>Salata morskih plodova</i>	1	1
<i>Morski rak</i>	33	37
<i>Jastog</i>	-	1
<i>Jonah kraba</i>	8	2
<i>Kraba stena</i>	32	25
<i>Snežna kraba</i>	1	-
<i>Salata od krabe</i>	-	1
<i>Školjke (Jakobova kapica)</i>	1	-
<i>Panirane školjke</i>	0	1
<i>Burger od školjki</i>	5	-
<i>Panirani bakalar</i>	2	-
<i>Riblje kuglice</i>	2	-
<i>Školjke</i>	1	-
<i>Morski pas</i>	0	1
<i>Dimljena jegulja</i>	2	-
Ukupno	196	150

FDA je dala podatke da je *Listeria monocytogenes* prisutna kod dimljene ribe u opsegu od 0 – 56%. Incidencija je veća kod hladno dimljene ribe u odnosu na toplo dimljenu ribu.

Tabela 2.33. Nalaz *L.monocytogenes* u ribljim proizvodima u Evropu (FDA, 2003)

<i>uzorak</i>	<i>ukupan broj</i>	<i>broj pozitivnih</i>	<i>% pozitivnih</i>	<i>zemlja</i>	<i>referenca</i>
Termički NE-tretirani proizvodi					
Hladno dimljena riba	1000	59	6%	Danska	Fonnesbech i sar., 2001.
	420	153	36%	Danska	Jørgesen i Huss, 1998.
	82	3	4%	Finska	Pelttari, 1990.
	62	9	14%	Finska	Lyhs i sar., 1998.
	30	5	17%	Finska	Johansson i sar., 1999.
	50	7	14%	Finska	Keto i Rahkio, 1998.
	232	10	4%	Finska	Hatakka i sar., 2001.
	356	46	13%	Finska	Hatakka i sar., 2002.
	32	13	41%	Francuska	Dauphin i sar., 2001.
	65	7	11%	Norveška	Rørvik i sar., 1995.
	26	3	12%	Švedska	Lončarević i sar., 1996.
	16	1	6%	Švajcarska	Jemmi i Keusch, 1994.
	814	114	14%	Švajcarska	Jemmi i sar., 2002.
	Gravad riba	176	51	29%	Danska
Konzervirana riba	30	2	7%	Finska	Pelttari, 1990.
	32	16	50%	Finska	Johansson i sar., 1999.
	43	14	32%	Finska	Lyhs i sar., 1998.
	29	9	31%	Finska	Keto i Rahkio, 1998.
	82	5	6%	Finska	Hatakka i sar., 2001.
	58	12	21%	Švedska	Lončarević i sar., 1996.
Marinirana riba	282	62	22%	Danska	Nørnung i sar., 1999.
	335	35	11%	Danska	Nørnung i sar., 1999.
	125	48	38%	Švajcarska	Jemmi i sar., 2002.
Termički tretirani proizvodi					
Toplo dimljena riba	14	1	7%	Finska	Pelttari, 1990.
	95	1	1%	Finska	Lyhs i sar., 1998.
	12	0	/	Finska	Keto i Rahkio, 1998.
	48	1	2%	Finska	Johansson i sar., 1999.
	66	1	2%	Švedska	Lončarević i sar., 1996.
	33	0	/	Švajcarska	Jemmi i Keusch, 1994.
	471	57	12%	Švajcarska	Jemmi i sar., 2002.
Ostali proizvodi	124	11	8%	Danska	Jørgesen i Huss, 1998.
	122	9	7%	UK	Nichols i sar., 1998.

Faktori koji utiču na preživljavanje i rast *Listeria monocytogenes* u namirnicama animalnog porekla - ribi i proizvodima od ribe

Listeria monocytogenes može da preživi i raste na niskim temperaturama ($>0^{\circ}\text{C}$), u širokom rasponu pH (4.5-9.5) i u koncentraciji iznad 10% NaCl (**US, FDA, 1998**). Parametri konzervacije proizvoda od ribe koji ih čuvaju u lakim pakovanjima, nalaze se unutar opsega tih limita. Limitirajući rast *Listeria monocytogenes* zabeležen je kod prirodno kontaminiranog hladno-dimljenog lososa (**Jørgensen i Huss, 1998; Dalgaard i Jørgensen, 1998**).

Mikroorganizmi u vakuum-pakovanju hladno-dimljenog lososa sadržavali su mlečno-kiselinske bakterije. Anti-listerijska aktivnost ovih mikroorganizama već je dobro poznata. Pored mlečno-kiselinskih bakterija, izolovana je i bakterija *Carnobacterium piscicola*, za koju je utvrđeno da u količini od 2×10^6 cfu/g snažno suprimira rast *L.monocytogenes* (**Nilsson i sar., 1999**).

U ispitivanju inhibicije rasta *Listeria monocytogenes* u hrani od plodova mora, dejstvom modifikovane atmosfere, utvrđeno je da je potrebno 100% CO₂ da bi efektivno inhibirao rast listerija u pakovanjima (**Lyver i sar., 1998**). **Nilsson i sar. (1997)** su ustanovili da vrednost od 70% CO₂ nema mogućnost potpune inhibicije rasta *Listeria monocytogenes* u hladno dimljenom lososu.

Upotrebom kombinacije ugljen-dioksida i nizina u pakovanjima postignuta je odgovarajuća efikasnost (**Nilsson i sar., 1997**).

Hladno dimljenje ima efekta na rast i razmnožavanje *Listeria monocytogenes*. Listerije su pronađene u dva uzorka nakon dimljenja i čuvanja tokom nedelju dana. Ustanovljeno je da bakterije listerija koje su bile oštećene tokom procesa dimljenja, su uspele da se obnove tokom perioda skladištenja (**Rorvik, 2000**).

Listeria monocytogenes je bila eliminisana nakon procesa dimljenja 20 minuta na temperaturi od 65°C , i nije bila prisutna tokom čuvanja 20 dana (**Poyski i sar., 1997**).

Letalna temperatura za listerije je 67.2°C, a viša temperatura se postiže nakon sušenja površine fileta ribe.

Tabela 2.34. Prisustvo *Listera monocytogenes* pre i nakon dimljenja u prirodno kontaminiranim filetima lososa, pod različitim uslovima dimljenja (**Aase i Rørvik, 1997**)

<i>Proces</i>	<i>Vreme (h)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Broj uzoraka</i>	<i>Prisustvo Listeria monocytogenes pre dimljenja</i>	<i>Prisustvo Listeria monocytogenes posle dimljenja</i>
A	3	20	25	6	0
B	10	19	65	52	6
C	4	20	30	24	9
C	7	20	30	21	4
D	6	22	50	5	0

U eksperimentalno kontaminiranim filetima lososa i pastrmke, nivoi *Listeria monocytogenes* su bili znatno viši na 8-10°C, nego na 4°C, tokom 20 dana skladištenja (**Niedziela i sar.,1998**).

Listeria monocytogenes sporije raste u prirodno kontaminiranim uzorcima nego u testiranjima sa kontaminiranim uzorcima (**Dalgaard i Jorgensen, 1998**).

Na rast *Listeria monocytogenes* u filetima hladno dimljenih lososa utiču temperatura čuvanja proizvoda, vodena faza soli i sastav fenolnih jedinjenja i njihova koncentracija (tabela 2.35) (**Cornu i sar., 2006**).

Najkritičnija tačka u procesu dimljenja fileta ribe je potapanje u rastvor i recirkulisanje rastvora dima i soli kroz uzorke fileta. Samim tim, dokazano je da su sami uzorci ribe retko osnovni izvor kontaminacije, i da je kontaminacija učestalo uzrokovana procesiranjem fileta tokom dimljenja (**Rorvik, 2000**).

Potpuna inhibicija rasta *Listeria monocytogenes* utvrđena je kod hladno-dimljenog lososa i kavijara sa 2% natrijum-laktata. Za razliku od toga, sprej aplikacija od 0.03g/kg

natrijum-laktata ili limunske kiseline, nije imala zadovoljavajući efekat u kontroli rasta *Listeria monocytogenes* u mesu repova jastoga (**Pelroy i sar, 1994; Dorsa i sar., 1993**).

Najefektivniji antimikrobni rastvori za paštetu dimljene ribe sadržali su 0.25% natrijum diacetata, ili 2.4% natrijum laktata i 0.125% natrijum diacetata. Ti rastvori su u stanju da inhibiraju rast listerija tokom 3 nedelje skladištenja. Za površinsku aplikaciju na filetima, najefektivniji je bio tretman sa rastvorom 2.4% natrijum laktata i 0.125% natrijum diacetata, čime je sprečen rast tokom 4 nedelje (**Hudaa Neetoo i sar., 2008**).

U tabeli 2.35. date su fizičko-hemijske karakteristike fileta hladno dimljenog lososa.

Tabela 2.35. Fizičko-hemijske karakteristike fileta hladno dimljenog lososa (**Cornu i sar., 2006**).

<i>Ispitivanje</i>	<i>pH</i>	<i>Koncentracija soli (g/100g)</i>	<i>WPS (vodena faza soli)</i>	<i>Koncentracija vode</i>	<i>Koncentracija fenola (mg/100g)</i>
40 uzoraka	6.02 [5.8–6.24]	2.85 [1.6-4.1]	4.62 [2.74–7.12]	61.3 [53.1–68.7]	0.99 [0.55–1.65]
Prethodno ispitivanje (Leroi et al, 2001; Espe et al 2004)	6.20 [6.09–6.30]	3.13 [2.21-4.29]	5.18 [3.76-7.19]	60.5 [57.3-68.0]	0.55 [0.27-1.08]
Pojedinačna ispitivanja					
A	6.20	2.70	4.82	56.3	2.00
B	6.20	3.90	6.20	62.9	0.51
C	6.20	1.40	2.31	60.9	0.97
D	6.20	3.70	6.82	54.4	1.45
E	6.10	3.20	5.73	56.1	0.51

*vrednosti prve prikazane predstavljaju srednju vrednost, dok u uglastim zagradama je raspon vrednosti merenja svih uzoraka

Bakterija *Listeria monocytogenes* je inokulisana po površini fileta svežeg lososa koji je potapan u rastvor soli i dima, u procesu proizvodnje dimljenog lososa. Vršeno je ispitivanje na prisustvo listerija i brojanje *Listeria monocytogenes*, kao i određivanje

ukupnog broja mezofilnih bakterija (**Porsby i sar., 2002**). Ustanovljeno je da procesi potapanja u rastvor soli i dima, kao i proces sušenja fileta lososa u laboratorijskim uslovima, koji su imitirali uslove industrijske proizvodnje, dovode do određene inhibicije rasta *Listeria monocytogenes*. Koncentracija sastojaka fenola je osnova za prevenciju rasta listerija (ustanovljeno je u laboratorijskim uslovima da čak minimalna koncentracija fenolnih jedinjenja od 20ppm je neophodna radi ostvarivanja tog efekta) (**Membre i sar., 1997; Thurette i sar., 1998**). Soljenje fileta ribe dodatno je dovelo do pojačane osetljivosti listerija u procesu hladnog dimljenja. To je primećeno kada je utvrđeno da je najobimnija redukcija listerija bila pri najvišoj koncentraciji soli, bez obzira na nisku koncentraciju fenolnih jedinjenja (**Cardinal i sar., 2004; Cornu i sar., 2006; Hwang 2007**). Ovim radom je utvrđeno da je broj *Listeria monocytogenes*, kao i ukupan broj bakterija redukovan tokom procesa proizvodnje hladno dimljenih fileta lososa, kombinovanim dejstvom rastvora soli, dima, fenolnih jedinjenja, sušenja.

Ispitivanjem kombinovanog efekta pakovanja sa modifikovanim atmosferama i nizinom na rast *Listeria monocytogenes* i *Pseudomonas fragii*, ustanovljeno je da oba mikroorganizma inhibiraju ovi uslovi, pri čemu su inhibitorni efekti veći pri temperaturi od 4°C, nego pri temperaturi od 20°C (**Fang i Lin, 1994**).

Nizin značajno inhibira rast *Listeria monocytogenes* na površini dimljenog mesa lososa. Urađeno je ispitivanje dejstva plastičnih sloj-filmova sa nizinom u vakuum pakovanju fileta dimljenog lososa (**Neetoo i sar., 2008**). Ispitivano je dejstvo nizina, u korelaciji sa temperaturom čuvanja proizvoda i nivoom inokulacije bakterije u meso ribe. Na temperaturi od 4°C (nizak i visok nivo inokulacije) i od 10°C (nizak nivo kontaminacije) ustanovljeno je da je procenat inaktivacije ili inhibicije rasta listerija u direktnoj proporciji sa koncentracijom nizina. Čuvanje proizvoda na 4°C pokazuje sporiji rast listerija nego na 10°C, bez obzira na nivo inokulacije i koncentraciju nizina.

Kombinacijom 1000 IU/g nizina i 0.3% limunske kiseline može da utiče na rast *Listeria monocytogenes* i broj aerobnih kolonija tokom 6 dana. Smanjenje broja listerija se ogleda

u vrednosti 1.5log. Ova kombinacija može biti vrlo korisna, posebno ukoliko se uz primenu ovakve vrste pakovanja održava adekvatna higijenska praksa u objektima, čime će se već u startu smanjiti potencijal nalaza i razmnožavanja listerija (**Al-Holy i sar., 2006**).

Ispitivani su efekti soli i fenolskog dima na rast *Listeria monocytogenes* u hladno-dimljenom lososu, kroz fizičko-hemijske analize (**Cornu i sar., 2006**). Fenolna koncentracija od 1.25 mg/100ml bujona deluje inhibitory na rast *Listeria monocytogenes*. Međutim, sadejstvom drugih faktora (temperatura, koncentracija soli, pH) taj efekat može biti pojačan ili da potpuno izostane. Tako, *Listeria monocytogenes* na temperaturi od 5°C, može da raste i u koncentraciji od 10.75mg/100ml, dok u sredini sa još jednim ekstraktom dima ne raste u koncentraciji od 2.3mg/100ml bujona.

Farber i sar. (1994) utvrdili su prisustvo *Listeria spp.* u različitim tipovima pašteta na tržištu. Utvrđeno da listerije preživljavaju, ali ne rastu na temperaturi od 4°C u veštački inokulisanim pašetama. Ustanovljeno je da mikrobiološku stabilnost pašteta zajedno čuvaju pH, aktivnost vode (aw) i temperatura.

Podatak koji iznose **Seeliger i Jones (1986)** da *Listeria monocytogenes* u bujonu ne preživljava delovanje temperature od 60°C tokom 30 minuta, ukazuje da je ova bakterija relativno neotporna prema termičkoj obradi.

Preživljavanje i rast *Listeria monocytogenes* u toploj pilećoj supi tokom hlađenja i skladištenja, ispitivali su **Huang i sar. (1993)**. Nakon inokulacije tople supe listerijom u različitom broju i naknadnim hlađenjem, utvrđen je najveći porast ($>10^8$ cfu) 4-6 dana nakon inokulacije. Produženim skladištenjem nije dolazilo do promena, što ukazuje na značaj brzog hlađenja tople hrane.

Ogled o mogućnosti uništavanja *Listeria monocytogenes* u mikrotalasnoj peći sprovedli su isti naučnici. Površina isečenih ribljih fileta je inokulisana mešanom kulturom *Listeria monocytogenes* i *Aeromonas hydrophilia*. Nepokriveni i fileti pokriveni polivinilskim filmom su tretirani na temperaturama od 55°C, 60°C i 70°C. *Listeria monocytogenes* je

bila otpornija na date temperaturne tretmane od *Aeromonas hydrophilia*, iako je kuvanje pokrivenih fileta pri 70°C dovelo do značajnije redukcije u populacijama oba mikroorganizma (za 6 log₁₀). Populacija *Listeria monocytogenes* je redukovana za oko 4 log₁₀ u pokrivenim filetima i za oko 2 log₁₀ u nepokrivenim.

Četiri izolata *Listeria monocytogenes* izolovanih iz humanog uzorka, hrane i okruženja, zasebno odvojeni, ispitivani su u bujonu sa sledećim uslovima: pH 6, temperatura od 8°C i u atmosferi sa 100% N₂, 40%CO₂ : 60%N₂ i 100% CO₂. Ispitivana je mogućnost opstanka listerija u kiseloj sredini, sa proteolitičkim enzimima i uz soli žučne kiseline. Uopšteno, listerije su bile rezistentnije u kiseloj sredini nego u sredini sa dodatkom soli žučne kiseline. Atmosfera sa 100%CO₂ i 40%CO₂ : 60%N₂ imaju veći uticaj na rast listerija, posebno u kombinaciji sa dejstvom žučnih soli (**King i sar., 2003**).

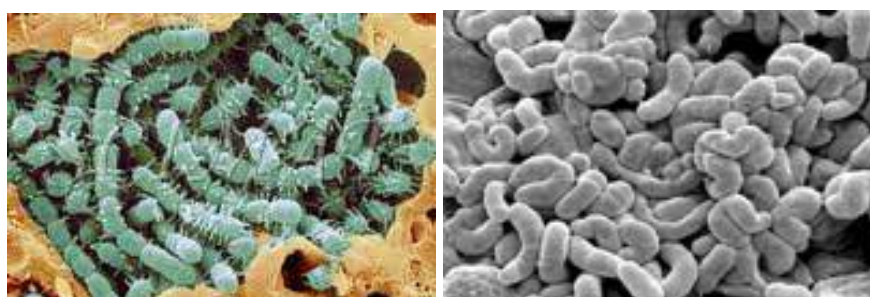
Dillon i Patel (1994) su inokulisali površinu bakalara sa *Listeria monocytogenes*, hladno dimili, vakuum pakovali i skladištili pri temperaturi od 4°C tokom 3 nedelje i pri temperaturi od -20°C tokom 3 meseca. Tokom dimljenja i skladištenja vršeno je uzorkovanje i utvrđivanje prisustva i broja *Listeria monocytogenes*. Tokom dimljenja nalaz je bio istog nivoa, a pri skladištenju na temperaturi od 4°C se povećavao, dok je na temperaturi od -20°C opadao.

Listeria monocytogenes je prilično otporna čak i na uticaj zamrzavanja. Utvrđen je nepromenjen broj listerija u mesu inokulisanom sa 10⁵/g nakon držanja tokom 6 meseci pri temperaturi od -18°C. Tokom procesa zamrzavanja 82% ćelija *Listeria monocytogenes* bude oštećeno, ali ne i ubijeno.

Ustanovljena je sposobnost *Listeria monocytogenes* da koriste karnitin kao osmoprotektant, i tako postanu rezistentne na kiselinski stres. Od 30 izolovanih *L. monocytogenes*, 15 su humanog porekla, a 15 su poreklom iz mesa. Kada su izložene 2 sata kiselinskom stresu (pH 2.5), samo su dva izolata listerije, oba iz mesa, pokazala značajnu redukciju u broju. Kiselinsko-senzitivne listerije nisu pronađene u pregledanim kliničkim izolatima, čime je utvrđena važnost rezistencije na kiselinski stres tih sojeva u procesu infekcije (**Dykes i Moorhead, 2000**).

II.3.4.2. Bakterije mlečne kiseline (MKB)

Bakterije mlečne kiseline predstavljaju široku grupu mikroorganizama koji imaju slične genotipske i fenotipske osobine. To su Gram pozitivni mikroorganizmi, nepokretni i asporogeni, kiselinsko tolerantni. Mogu biti štapićastog oblika ili u formi koka. Ova grupa bakterija se nalazi u prirodi prilikom raspadanja biljaka, ali i u mlečnim proizvodima.



Slika 2.19. Bakterije mlečne kiseline

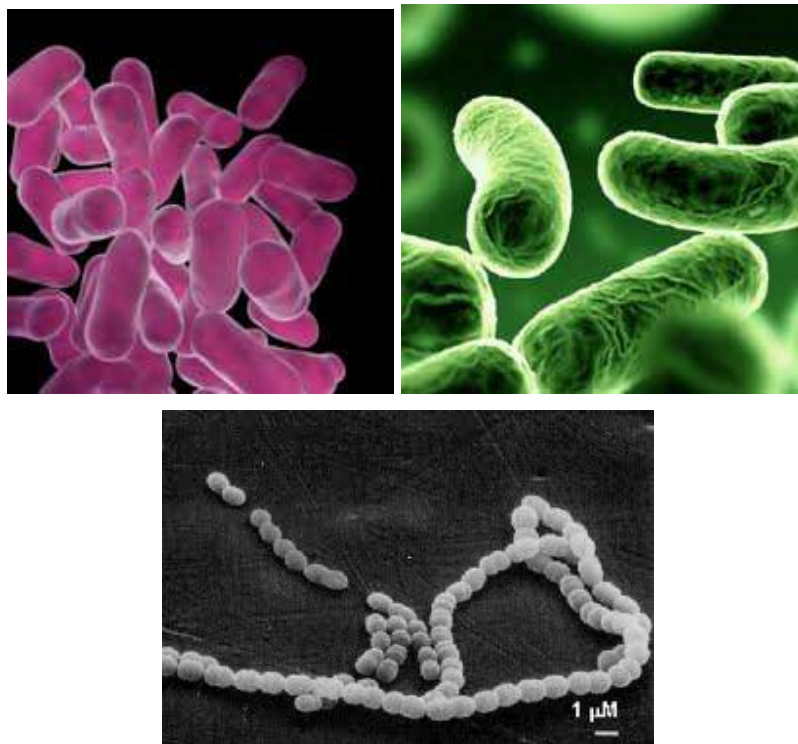
Ove bakterije imaju zajedničku osobinu da iz laktoze stvaraju mlečnu kiselinu. Zavisno od toga da li je mlečna kiselina jedini proizvod fermentacije, sve mikroorganizme ove grupe delimo na homofermentativne i heterofermentativne (pored mlečne kiseline stvaraju i ugljen dioksid, propionsku kiselinu, sirćetnu kiselinu...).

Mlečna kiselina snižava pH sredine i na taj način sprečava razvoj nepoželjnih i patogenih mikroorganizama. Mlečna kiselina je prijatnog ukusa, povoljno utiče na varenje (lučenje želudačnih sokova) i odstranjivanje toksičnih materija iz organizma.

Bakterije mlečne kiseline svojim ekstracelularnim enzimima, proteinazama razgrađuju proteine mleka (kazein). Ove bakterije imaju složene nutritivne zahteve i podloge na kojima se gaje treba da sadrže veliku količinu ugljenih hidrata.

Mogu da stvaraju baktericidna, antimikrobna jedinjenja koja inhibiraju rast truležnih i patogenih bakterija (*Salminen i sar., 2004*).

Industrijski značaj bakterija mlečne kiseline može se ogledati i u prisutnom sigurnosnom statusu, jer su ove bakterije sveprisutne u hrani, a izuzetan je i njihov doprinos na stanje mikroflore digestivnog trakta konzumenata. **(Ljungh i Wadstrom, 2009).**



Slika 2.20. Bakterije mlečne kiseline

Zbog svoje dominantnosti tokom fermentacije i tradicije duge upotrebe, bakterije mlečne kiseline su označene kao „zdravstveno bezbedna mikroflora“. Biološku zaštitu MKB kao prirodno prisutna i/ili selekcionisana i namerno dodata mikroflora, ostvaruju kroz produkciju nespecifičnih (mlečna, sirćetna i druge organske kiseline, H₂O₂, diacetil, itd.) i specifičnih metabolita, bakteriocina **(Obradović, 2002-2003).**

Bakteriocini su ekstracelularno oslobođeni peptidi ili proteinski molekuli, stvoreni od strane nekih MKB, koji poseduju izvesna baktericidna svojstva u odnosu na određene vrste mikroorganizama, obično srodne bakterijama proizvođačima. Produkcijom bakteriocina od strane MKB, omogućeno je da na selektivan, kompetitivan način deluje

na okolnu mikrofloru koja može sadržavati bilo bakterije kvara, bilo patogene mikroorganizme (**Holzappel i Wood, 1998**).

Rodovi koji čine grupu mlečno kiselinskih bakterija su (**Ljungh i Wadstrom, 2009**):

- *Lactobacillus*,
- *Leuconostoc*,
- *Pediococcus*,
- *Lactococcus*,
- *Streptococcus*,
- *Aerococcus*,
- *Carnobacterium*,
- *Enterococcus*,
- *Oenococcus*,
- *Sporolactobacillus*,
- *Teragenococcus*,
- *Vagococcus*
- *Weisella*.

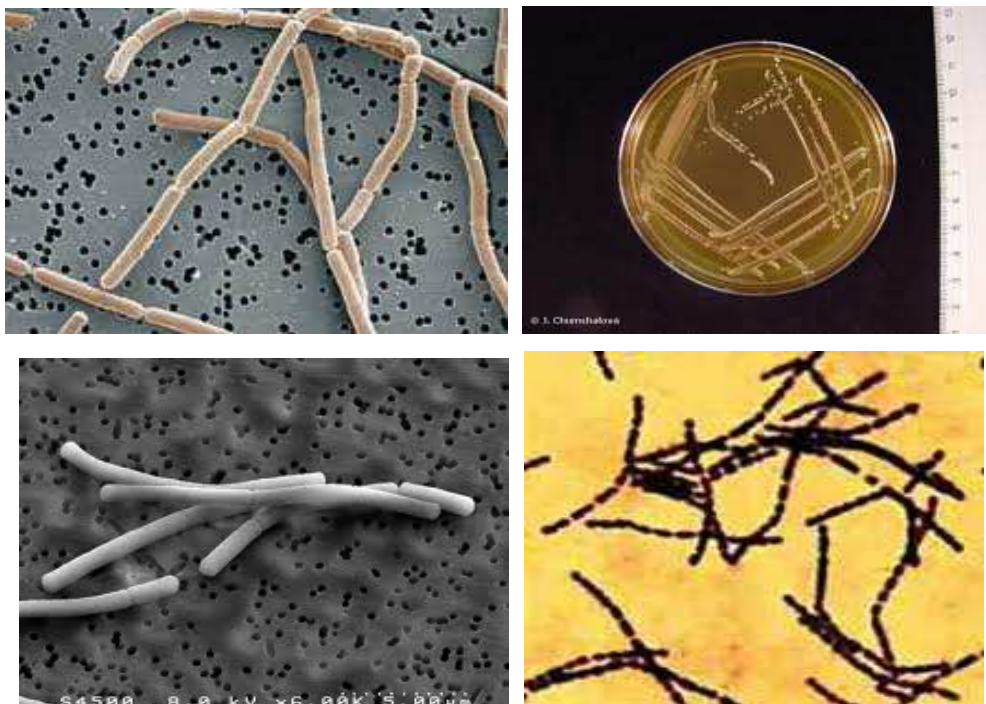
Lactobacillus delbruckii spp. bulgaricus

Štapićasta homofermentativna vrsta bakterija mlečne kiseline koja je prvi put izolovana iz bugarskog kiselog mleka. Stvara D (-) mlečnu kiselinu i acet-aldehid, koji daje aromu. To su štapići veličine 0.8 – 4 µm koji se sa starošću izdužuju. Asporogeni, fakultativno anaerobni, katalaza negativni, nepokretni, javljaju se pojedinačno, u parovima ili kraćim lancima.

Optimalna temperatura rasta je 40-45°C, moguć je rast i na višim temperaturama (52-55°C), dok ne rastu na temperaturi od 15°C.

Koristi se za proizvodnju jogurta i kiselog mleka, ulazeći u sastav startera. Može da stvara bakteriocin bulgaricin, koji deluje inhibitorno na rast nekih Gram pozitivnih i

negativnih bakterija. Neki sojevi stvaraju i H₂O₂, koji inhibira većinu patogenih bakterija i neke psihrofilne mikroorganizme.

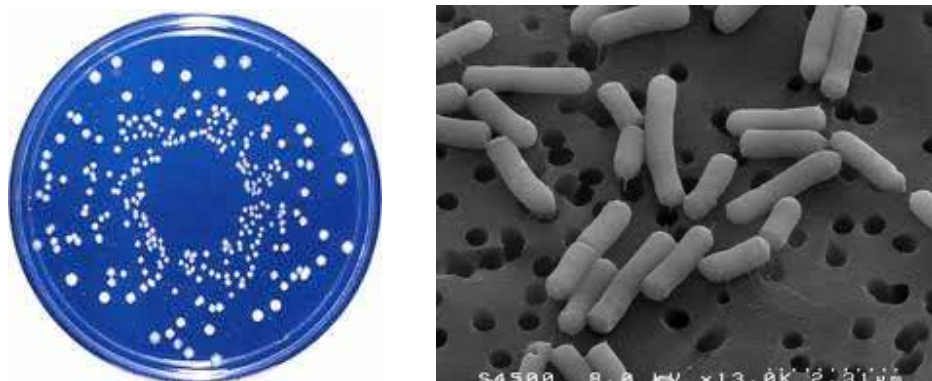


Slika 2.21. *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*

Lactobacillus casei

Homofermentativna vrsta, koja se u mleku javlja u obliku kratkih kokoidnih štapića u lancima. Optimum za rast je 30° C, a opseg je između 10 – 40° C.

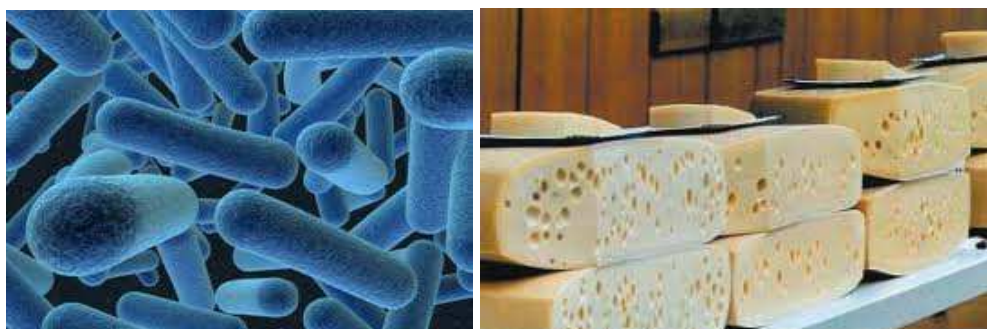
Stvara manje mlečne kiseline (1.5%) od *Lb.delbrueckii* spp. *bulgaricus*, i to stvara L(+) formu mlečne kiseline. U enzimskom sistemu ove bakterije se nalaze i aminopeptidaze i proteinaze, zbog čega se koristi u proizvodnji sireva i pavlake.



Slika 2.22. *Lactobacillus casei*

Lactobacillus helveticus

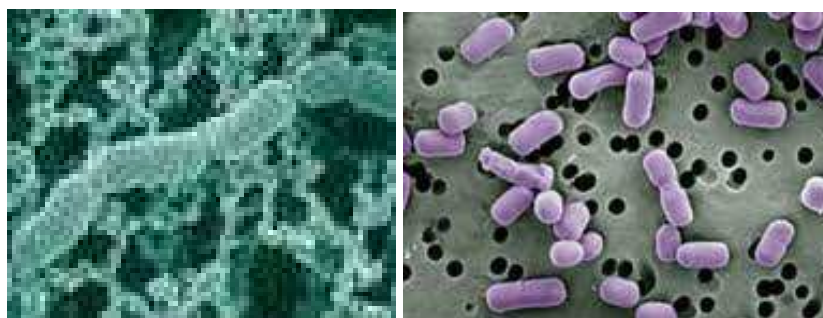
Homofermentativna vrsta kojoj je optimalna temperatura rasta 40-45°C Stvara D,L mlečnu kiselinu (2-3%). Ima jak fermentativni i umereno proteolitički sistem. Koristi se u proizvodnji ementalera gde sa drugim bakterijama utiče na specifičan ukus ovog proizvoda. Za razliku od drugim laktobacilusa, transformiše galaktozu.



Slika 2.23. *Lactobacillus helveticus*

Lactobacillus sake

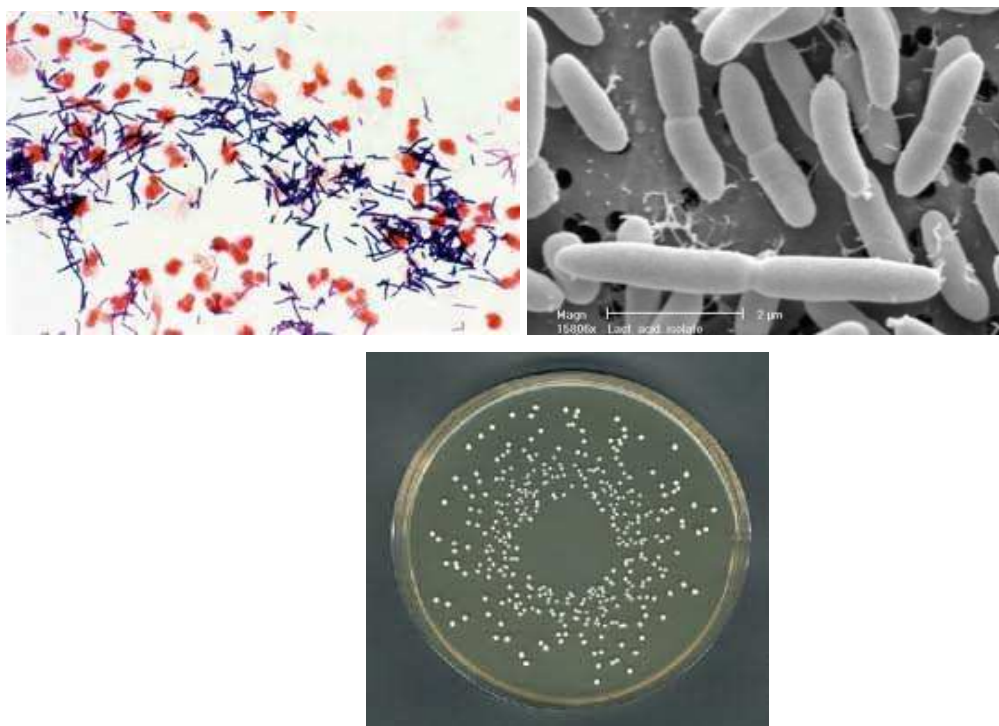
Atipičan, kratki štapić. Najrasprostranjeniji je laktobacilus u mesu. Stvara D, L mlečnu kiselinu, podnosi veće koncentracije soli. Neki sojevi sintetišu bakteriocine. Koristi se kao čista kultura za proizvodnju kobasica.



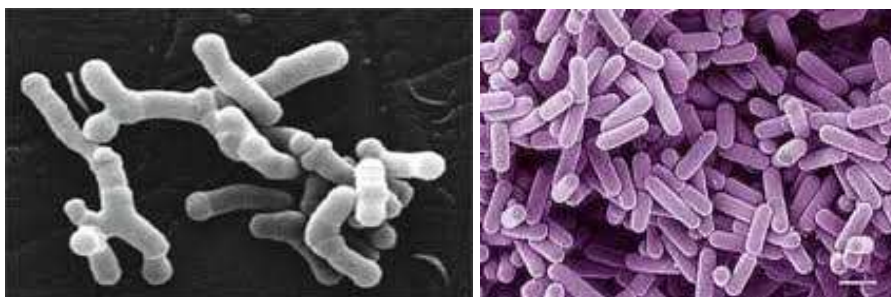
Slika 2.24. *Lactobacillus sake*

Lactobacillus acidophilus

Homofermentativna vrsta koja je najčešće prisutna u intestinalnoj flori odojčadi. U mleku se slabo razvija i javlja se u formi dužih i kraćih štapića. Optimum za razviće je 37°C. Stvara antibiotski aktivnu supstancu acidophilin ili acidolin. Stvara D, L mlečnu kiselinu (1.8%). Ne podnosi veće koncentracije soli. Koristi se u proizvodnji acidofilnog mleka, nefermentisanih mlečnih napitaka, a ulazi u sastav i startera za proizvodnju fermentisanih napitaka sa terapeutskim dejstvom.



Slika 2.25. *Lactobacillus acidophilus*



Slika 2.26. *Bifidobacterium bifidum*

Pored štapićastih oblika bakterija mlečne kiseline, u ovoj grupi se nalaze i koke i mikroorganizmi okruglastog oblika:

Lactococcus lactis spp. *lactis*

Lactococcus lactis spp. *cremoris*

Lactococcus lactis spp. *lactis* biovar *diacetylactis*

Enterococcus faecalis

Pediococcus spp.

Leuconostoc

Streptococcus salivarius spp. *thermophilus*

Pri pakovanju hrane u vakuumu se stvara mikroaerofilna sredina, a delimično se nakuplja i ugljen dioksid, čime se inhibira rast aerobnih Gram negativnih bakterija i postiže se bolja održivost mesa (**Socol i Oettere, 2003; Jouffraud i sar., 2006**). U takvim uslovima razvija se mikroflora u kojoj dominiraju mlečno kiseline bakterije, a u manjem broju prisutne su i *Brochetrix thermosphacta*, *Enterobacteriaceae*, druge Gram negativne bakterije, mikrokoke i kvasci (**Leroi i sar., 1998; Lyhs i sar., 1998**).

Lyhs (2002) ističe da su u vakuum pakovanoj hladno dimljenoj ribi, u mikroflori koja dovodi do kvara uglavnom zastupljene dominantne laktobacilus vrste, čiji se broj u momentu kvara kreće od 10^6 do 10^8 CFU/g i da su to uglavnom *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* i *Carnobacterium*.

Prema **Olafsdottir-u i sar. (2005)** glavni i odgovorni krivci za nastanak kvara hladno dimljene ribe iz familije *Salmonidae* su mikroorganizmi iz familije *Enterobacteriaceae* čije je prisustvo u proizvodu uslovljeno higijenskim uslovima i samoj unutrašnjoj flori objekta za preradu i dimljenje proizvoda. Prema njihovom stanovištu, laktobacili nisu tipični izazivači kvara hladno dimljenih proizvoda od ribe, ali kada se nađu u većem broju u proizvodu, mogu da utiču na senzorne odlike, time što stvaranjem isparljivih komponenti dovode do promena u mirisu ribe.

Patsias i sar. (2006) smatraju da se kvar koji nastaje, ukoliko nastaje pod uticajem laktobacila, odvija manje ofanzivno, nego što je to slučaj prilikom nastanka kvara, prouzrokovanog rastom aerobne mikroflore.

Zaključuje se da su *Lactobacillus spp.* najznačajnija i najzastupljenija mikroflora odgovorna za održivost, senzorne osobine hladno dimljenih, vakuumiranih proizvoda od ribe. Za razliku od vakuum pakovanih proizvoda, dimljeni proizvodi od ribe pakovani u modifikovanim atmosferama imaju drugačije uslove sredine za razvoj mikroorganizama (**Siverstvik i sar., 2002**). Mikroorganizmi koji inače razvijaju kvar mesa u aerobnim uslovima, u MAP-u su inhibirani ugljen dioksidom. Zato je dominantna mikroflora ona koja je rezistentna na ugljen dioksid. Gram negativne bakterije su mnogo osetljivije na delovanje CO₂, pa su najviše inhibirani mikroorganizmi *Pseudomonas spp.*, *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter spp.*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella spp.* i psihotrofne bakterije. Najrezistentnije su bakterije *Clostridium spp.*

Uticaj mlečno-kiselinskih bakterija na rast listerija u proizvodima fileta dimljene ribe

Studija o prisustvu *Listeria monocytogenes* u neupakovanim šniclama u prometu u Nemačkoj, ustanovila je nizak nivo prirodne kontaminacije i odsustvo rasta posle jedne nedelje skladištenja na temperaturi od 2-4°C (**Schmidt i sar., 1993**). Zaključeno je da je rast *Listeria monocytogenes* inhibiran mlečno-kiselinskim bakterijama u hladnim šniclama.

Pet vrsta bakterija mlečne kiseline sa sposobnošću stvaranja bakteriocina: *Enterococcus faecium* ET05, *Lactobacillus curvatus* ET06, *L.curvatus* ET30, *L.delbrueckii* ET32 i *Pediococcus acidilactici* ET34, inokulisano je po površini fileta lososa, zajedno sa kulturom *Listeria innocua* 2030c. Fileti lososa su potom prošli proces obrade dimljenja (6 sati potopljeni u rastvor soli, 6 sati sušenja, 2 sata dimljenja). Gotov proizvod je zatim vakuum pakovan i čuvan na temperaturi frižidera od 5°C. Rezultati istraživanja su pokazali da vrsta *E.faecium* ET05 poseduje najbolja biokonzervišuća svojstva za kontrolu *L.innocua* u namirnicama dimljenog lososa koji je vakuum pakovan (**Tome i sar.,2008**). Dobre osobine su pokazale i vrste bakterija *L.curvatus* ET30 i *L.delbrueckii* T32, ali u manjoj meri nego *E. faecium*. *L.curvatus* ET06 i *P.acidilactici* ET34 posedovali su bakteriostatske osobine, kako u in vitro uslovima, tako i nakon inokulacije u filete lososa.

U drugom ispitivanju korišćeni su sojevi bakterija *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* i *Carnobacterium piscicola*, koji su inokulisani u meso hladno dimljenog lososa, uz dodavanje i bakterije *Listeria innocua*. Fileti u vakuum pakovani i čuvani tokom 30 dana na temperaturi od 4°C. Sve dodate kulture mlečno-kiselinskih bakterija su pokazale bakteriostatski ili baktericidni efekat na rast *L.innocua*. *Lactobacillus casei* je bakteriostatik kada se inokuliše u koncentraciji 6log CFU/g, ali je baktericidnog dejstva pri 8log cfu/g, redukujući broj *Listeria innocua* do 3.3log CFU g. *Lactobacillus plantarum* i *C.piscicola* pojedinačno inokulisani u koncentraciji 6log CFU/g, redukuju broj *Listeria innocua* do 2.8, odnosno 2.7log CFU/g sledno. U ispitivanju zajedničkog

efekta bolji efekat su pokazali *Lactobacillus casei-Lactobacillus plantarum* u koncentraciji 6log cfu/g, nego kombinacija sojeva *Lactobacillus casei-C.piscicola*. Kombinacija *L.casei-C.piscicola* je imala slabiji efekat nego pojedinačno *C.piscicola* **(Vescovo i sar., 2006)**.

Prirodna mikroflora hladno dimljenog ribljeg mesa pred kraj roka upotrebe predstavlja bakterije mlečne kiseline. Vakuum pakovani fileti dimljene ribe čuvani su na temperaturi frižidera od 5°C, i potom su ispitivane hemijske i mikrobiološke karakteristike. Koncentracija soli u vodenoj fazi je iznosila 4.12-4.99% (srednje vrednosti oko 4.50±0.28%). Srednja vrednost pH izmerena je 5.99±0.10, i relativno se sporo menjala ta vrednost tokom čuvanja proizvoda, a pred kraj roka upotrebe dostigla je vrednost od 6.01±0.14. Aktivnost vode (a_w) je bila 0.95±0.01.

Tokom čuvanja fileta u vakuum pakovanjima na 5°C, ukupni broj mlečno-kiselinskih bakterija se povećao, pri čemu su dominirale bakterije iz roda *Lactobacillus*. Inicijalni nivo *Lactobacillus spp.* iznosio je $10^2 - 10^3$ CFU/g, da bi se tokom vremena čuvanja povećao do 10^5-10^7 CFU/g. Broj *Enterobacteriaceae* je inicijalno bio nizak (10^2 i 10^3 CFU/g), ali je tokom 5 nedelja čuvanja na temperaturi frižidera u vakuum pakovanju povećan i dostigao je 10^5 CFU/g. Ni u jednom uzorku nije se pojavila niti dokazala *Listeria monocytogenes*.

Ukupan broj mezofilnih bakterija se povećao sa nivoa $10^2 - 10^4$ cfu/g do nivoa 10^5-10^7 CFU/g.

41% mlečno-kiselinskih bakterija je pokazao inhibitorni kapacitet protiv *Listeria innocua*. Većina sojeva nije posedovala bakteriocinogeno dejstvo, ali su dokazali povoljna konzervišuća svojstva u namirnicama dimljene ribe koja je vakuum pakovana. **(Tome i sar., 2006)**.

II.3.4.3. Ostali mikrobiološki parametri (*Salmonella spp.*, koagulaza pozitivne stafilokoke, sulfitoredujuće klostridije)

Neadekvatan izbor sirovine, nepažljiva manipulacija sirovinom u toku primarne obrade i nekorektna i ne higijenska proizvodnja mogu usloviti pojavu patogenih mikroorganizama u gotovom proizvodu. Patogeni u ribi mogu poticati iz okoline ili biti poreklom od životinja/ljudi. Poznavajući karakteristike hladno dimljenih proizvoda od ribe, zna se da je to lako kvarljiva namirnica. Iz tog razloga izuzetno je značajna kontrola higijene opreme i objekata, redovne zdravstvene kontrole ljudi koji rade u proizvodnji hrane, poznavanje tehnološkog procesa proizvodnje dimljene ribe, poštovanje hladnog lanca u toku proizvodnje, transporta, čuvanja i prodaje proizvoda. Nastanak botulizma, listerioze i salmoneloze izazvane konzumiranjem dimljenih proizvoda od ribe poznat je preko 30 godina (*Jittinandana i sar., 2002*).

Sulfitoredujuće klostridije

Klostridije su Gram pozitivne, štapičaste bakterije veličine 3-8 µm. Spadaju u obligatno anaerobne bakterije sa pojedinim aerotolerantnim predstavnicima, koje u nepovoljnim uslovima mogu da grade spore. Životna sredina klostridija je zemljište i crevni sistem čoveka i životinja. Najvećim delom ove bakterije su bezopasni saprofiti, međutim izvesne vrste mogu da pod određenim uslovima dovedu do vrlo teških oboljenja kao što su gasna gangrena, tetanus, botulizam i pseudomembranozni kolitis.

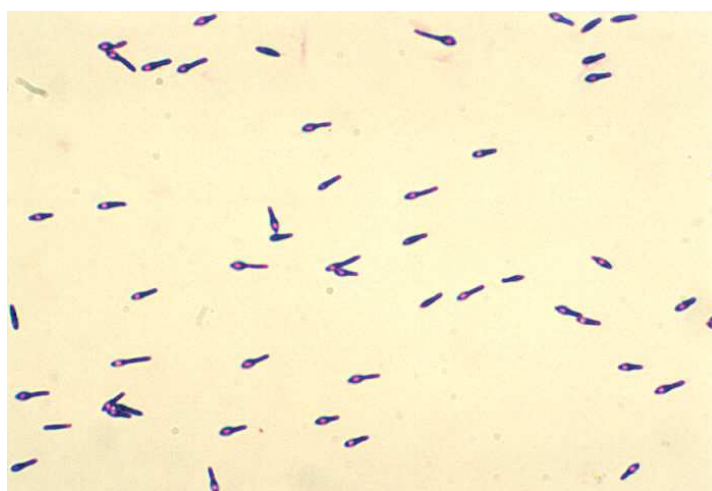
Bakterije koje pripadaju rodu *Clostridium* izazivaju kako egzogene, tako i endogene anaerobne infekcije i/ili intoksikacije. Sve bolesti izazvane klostridijama su posredovane toksinima i/ili enzimima koje ove bakterije stvaraju. Najčešće manifestacije kolonizacije klostridijama kod ljudi su blaga, kratkotrajna trovanja hranom i slučajna kontaminacija rane. Teške bolesti uzrokovane klostridijama, kao što su gasna gangrena (*myonecrosis*), tetanus i botulizam, relativno su retke, ali mogu da budu smrtonosne.

Iako je otkriveno gotovo 100 vrsta iz roda *Clostridium*, samo 25 do 30 uobičajeno uzrokuju bolest kod ljudi ili životinja.

Najpoznatije, najznačajnije i najopasnije vrste su:

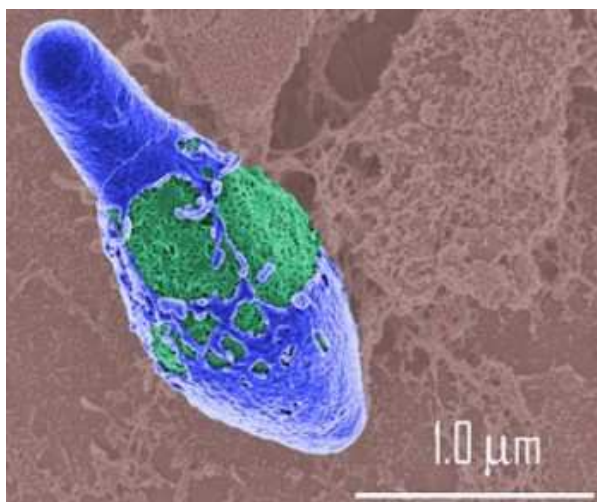
- *Clostridium perfringens*, glavni izazivač gasne gangrene

- *Clostridium novyi*, može izazvati gasnu gangrenu
- *Clostridium septicum*, može izazvati gasnu gangrenu i sepsu
- *Clostridium histolyticum*, takođe jedan od izazivača gasne gangrene
- *Clostridium tetani*, toksin ove bakterije izaziva tetanus
- *Clostridium botulinum*, toksin ove bakterije je najjači poznati otrov i izaziva botulizam
- *Clostridium difficile*, izaziva pseudomembranozni kolitis



Slika 2.27. *Clostridium botulinum* (mikroskopski preparat)

Botulizam je intoksikacija toksinom bakterije *Clostridium botulinum*. Botulinusni toksin je najjači poznati otrov, 0.1 µg može ubiti čoveka. Postoji više tipova ovog toksina (A-G), gde tipovi A, B i E izazivaju intoksikaciju kod ljudi. Toksin je metaloproteaza, koja razlaže proteine koji učestvuju u procesu oslobađanja nekih neurotransmitera na motornim neuronima. Kao posledica se javljaju pareze pojedinih mišića. Najčešće nastaje usled konzumiranja pokvarenih namirnica, posebno konzervi, gde usled anaerobnih uslova ove bakterije proizvode ovaj toksin. Otrovi se reapsorbuju u gastrointestinalnom traktu i putem krvi dospeva do nervnih ćelija gde ostvaruje dejstvo. Nakon nekoliko sati ili dana javljaju se simptomi intoksikacije: oboleli vide duplo, problemi sa gutanjem, govorom, opstipacija, sluzokoža (npr. usne duplje) je suva. Smrtnost je značajna, ako se na vreme ne otkrije i najčešće je izazvana paralizom respiratornih mišića.



Slika 2.28. *Clostridium leptum*

Prisustvo bakterije *Clostridium botulinum* tip E je jedna od najvećih opasnosti u industriji ribe, a posebno se taj rizik povećava kod hladno dimljenih proizvoda od ribe upakovanih u smeši gasova koje sadrže samo ugljen dioksid i azot, čime postoje anaerobni uslovi sredine, pogodni za razmnožavanje ovog patogena (**Heinitz i Johnson, 1998**). U anaerobnim uslovima se postiže inhibicija rasta aerobnih bakterija, čime je smanjena kompeticija. *C.botulinum* nesmetano raste i stvara toksin tokom produženog perioda skladištenja pri temperaturama frižidera.

Pored toga, hladno dimljeni proizvodi od ribe se čuvaju u hladnom lancu, a to pogoduje bakteriji botulizma, jer *C.botulinum* može da raste i produkuje toksin pri 3.3°C, a prema nekim podacima može da raste i na nižim temperaturama (2°C) (**Kimura i sar., 2001**). Hladno dimljeni proizvodi od ribe su RTE (ready-to-eat) proizvodi, ne zahtevaju termičku obradu, čime se još dodatno povećava rizik (**Siverstvik i sar., 2002**). Poseban problem predstavlja i to što rast patogenih sojeva *C.botulinum* i stvaranje toksina ne dovodi do organoleptičkih promena koje i ukazale da namirnica nije upotrebljiva za ishranu.

Danas pojedini autori smatraju da rast anaeroba ne zavisi od uvođenja, niti od isključivanja kiseonika iz smeše gasova (**Dufresne i sar., 2000; Gibson i sar., 2000**). Oni su dokazali da samo kada se poveća količina soli i smanji nivo pH u proizvodu u

kombinaciji sa smešom gasova koji sadrži 100% CO₂, umanjuje se rizik od rasta *C.botulinum* na temperaturama hlađenja. US National Academy of Science, kao i autori **Sanjeev i Ramesh (2006)** preporučuju upotrebu kalijum sorbata, natrijum hlorida i zračenje, čime se inhibira rast *C.botulinum* u hladno dimljenim proizvodima od ribe pakovanim u MAP. Kreiranjem bezbednosnih standarda za dimljene proizvode od ribe pakovane u MAP, kako bi se smanjila opasnost od rasta patogenih anaeroba, preporučeno je da se ispoštuju sledeće norme (**Sanjeev i Ramesh, 2006**):

- a_w vrednost treba da bude ispod 0.92
- pH proizvoda ispod 4.5
- dodavanje natrijum nitrita (u količina dozvoljenim regulativama)
- temperatura skladištenja ispod 3°C.

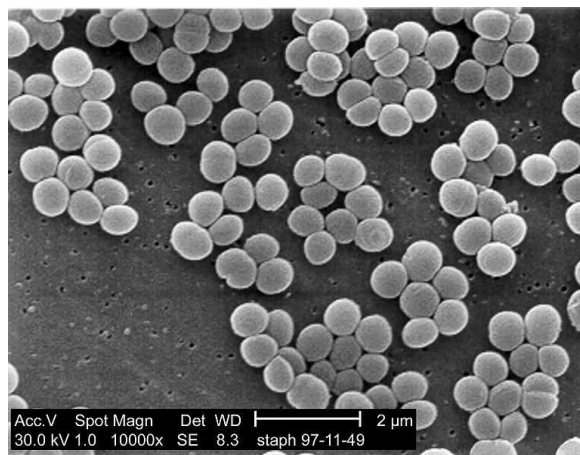
Koagulaza pozitivne stafilokoke

Stafilokoke su Gram pozitivne bakterije loptastog oblika (koke), koje su grupisane u vidu grozdova ili jata. Postoji tridesetak vrsta stafilokoka, od koji su najpoznatije

- *Staphylococcus aureus*
- *Staphylococcus epidermidis* i
- *Staphylococcus saprophyticus*.

Stafilokoke spadaju u grupu mikrokoka. To su male bakterije, prečnika 1 μm, loptastog oblika. Stafilocoke su nepokretne i proizvode katalazu, enzim koji razlaže vodonik peroksid. Postoji preko 30 vrsta stafilokoka pri čemu su gore pomenute vrste patogene za čoveka. Zapravo epidermalni i saprofitni stafilocok su deo normalne bakterijske flore i samo kod pacijenata sa oslabljenim imunitetom mogu izazvati infekciju (čest su uzročnik bolničkih infekcija). *Staphylococcus aureus* je patogena bakterija, koja sekretuje razne toksine: alfa toksin, enterotoksine, ekfolijatin, leukocidin, toksin koji izaziva toksični šok sindrom, ali može i direktnim prodorom u organizam da izazove razne infekcije. Enterotoksini stafilokoka su čest uzrok

intoksikacija putem hrane, jer su stabilni na toploti (kuvanjem hrane 15-30 minuta na 100°C se ne razgrađuju).

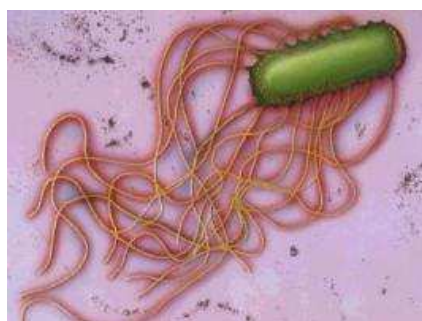


Slika 2.29. SEM mikrografija grozdastih kolonija *S. aureus*

Sojevi *S.aureus* se mogu naći u vakuum pakovanim dimljenim proizvodima od ribe jer tolerišu nisku a_w vrednost i visoku koncentraciju soli, a raste između 6 i 50°C (**Kilibarda, 2010**).

Salmonela

Salmonella je rod štapićastih Gram negativnih bakterija koji može prouzrokovati tifoidnu groznicu, paratifoidnu groznicu i trovanje hrane.



Slika 2.30. *Salmonella* spp.

Salmonele razlažu veliki broj ugljenih hidrata uz stvaranje kiseline i gasa. Ne razgrađuju laktozu, saharozu i ureju, a proizvode H_2S . Salmonele dobro rastu i razmnožavaju se na velikom broju podloga, a samim tim mogu se razvijati i u velikom broju namirnica različitog sastava. Salmonele se razmnožavaju u temperaturnom intervalu od 5 do 47°C. Temperature iznad 60°C uništavaju ih za nekoliko minuta. Optimalne vrednosti pH za salmonele su u intervalu 6,5-7,5, a mogu se razmnožavati i pri vrednostima od 4,5-9,0. Mogu preživeti u namirnicama u kojima je aktivnost vode $a_w \geq 0,94$. Salmonele su osetljive prema hloru, hlornim jedinjenjima i hloramfenikolu, a otporne su prema dejstvu sulfonamida i benzil-penicilina. Neki aditivi, konzervansi, začini i starter kulture, sami ili sinergistički sa drugim parametrima (pH, a_w , temperatura) usporavaju ili zaustavljaju razmnožavanje salmonela. U rastvoru kuhinjske soli salmonele mogu preživeti nekoliko meseci, a u prašini preko 80 dana. Salmonele mogu biti prisutne u rekama, otpadnim vodama, kanalizaciji i drugim vodama i đubrivima.

Salmonele sintetišu endotoksin, koji je po svom sastavu glicido-lipido-polipeptidni kompleks. Retko sintetišu egzotoksin. Do nedavno je vladalo mišljenje da nisu sve salmonele patogene za ljude. Međutim, iskustva su pokazala da su praktično sve salmonele štetne za čoveka. Salmoneloza je oboljenje želudačno-crevnog trakta ljudi i životinja. Salmoneloze su primarno bolesti domaćih životinja, koje se na čoveka prenose konzumiranjem hrane animalnog porekla, kontaminirane salmonelom i njenim toksinom.

Salmonela vrste su utvrđene u pet od 156 testiranih slučajeva u dimljenoj ribi pakovanoj u vakuumu, a zabeležen je nastanak infekcije sa *Salmonella paratyphi* B nakon konzumacije dimljene ribe u Nemačkoj (**Heinitz i Johnson, 1998**). *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolica*, *Aeromonas* rastu slabije u MAP pakovanjima, u odnosu na vakuum pakovanja pastrmke i bakalara.

Visoke koncentracije ugljen dioksida u pakovanju imaju inhibitorni efekat na rast *S.aureus*, *Salmonella spp.*, *E.coli* i *Yersinia enterocolitica* (**Sanjeev i Ramesh, 2006**).

II.3.5. Hemijski parametri

Praćenje hemijskih parametara kvaliteta ribe ima veći broj prednosti. U odnosu na mikrobiološke parametre, rezultati o hemijskim parametrima kvaliteta mogu da se dobiju u kraćem vremenskom periodu, dok u odnosu na praćenje senzornih karakteristika kvaliteta, hemijskim se metodama isključuje subjektivnost analitičara u proceni rezultata. Ispitivanjem osnovnog hemijskog sastava proizvoda utvrđuju se vrednosti sadržaja vode, soli, masti, proteina i pH vrednost.

Prvi period skladištenja proizvoda od ribe karakterišu promene koje uzrokuju gubitak svežine, dok kraj skladištenja karakteriše nastanak kvara (**Ruiz-Capillas i Moral, 2005**). Glavni uzročnici kvara mesa su saprofitne bakterije, pri čemu nastaju procesi proteolize, lipolize i razlaganje ugljenih hidrata (glikogen) u mesu. Proteolizom su prvenstveno zahvaćene belančevine vezivnog tkiva, pa tek onda i proteini mišićnog tkiva. Razlog tome što je pH vezivnog tkiva gotovo optimalan za aktivnost mikroflore (7.0-7.2), što u vezivnom tkivu ima dosta vode i rastresitije je strukture. Pod uticajem bakterijskih proteaza makromolekuli miofibrilarnih i sarkoplazmatskih belančevina mesa se razlažu na polipeptide, prvo više, a potom niže, i najzad na oligopeptide i slobodne aminokiseline. Pojava neprijatnog mirisa počinje tek u drugoj fazi proteolize kada nastaje razlaganje aminokiselina. Razlaganjem aminokiselina nastaju amonijak, amini i diamini (fenil-etilamin, tiramin, triptamin, histamin), fenol, indol, krezol, skatol, masne kiseline (mravlja, sirćetna, propionska, buterna i dr.), putrescin, kadaverin, merkaptan, H₂S. H₂S, indol i skatol su uzročnici neprijatnog mirisa ukvarenog mesa. Razlaganje proteina izazivaju proteinaze i peptidaze mikrokoke, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Bacillus*, kvasci i plesni.

Promene masnog tkiva u mesu mogu dovesti do kvara mesa i promene organoleptičkih svojstava. Uzorci koji dovode do kvara masnog tkiva su brojni, a najznačajniji su: kiseonik iz vazduha, mikroorganizmi (laktobacili, mikrokoke, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, kvasci i plesni), enzimi masnog tkiva (lipaza). Oksidativne promene masti dovode do stvaranja peroksida, a potom aldehida i ketona, koji mastima daju neprijatan užegli miris i ukus.

Razlaganje ugljenih hidrata u mesu (glikogena) se odigrava putem fosforilirajuće hidrolize, gde preko pirogroždane kiseline nastaje CO₂ (ukoliko ima kiseonika). Ako kiseonika nema dovoljno, proces se završava stvaranjem mlečne kiseline i etanola. Pod uticajem bakterijskih fermentata može doći do stvaranja i drugih organskih kiselina (mravlja, propionska, buterna i dr.) i do pojave metana.

Od fizičko-hemijskih metoda za dokaz kvara mesa se najčešće koristi pH. Tokom vremena nakon klanja, pod dejstvom glikolitskih fermentata glikogen se pretvara u mlečnu kiselinu, koja pomera pH u kiselom smeru (glikolitska faza zrenja). Nakon toga počinje druga faza zrenja mesa, u kojoj proteolitski fermenti mesa dovode do stvaranja baznih jedinjenja, čime se i pH kreće u obrnutom smeru. Po završetku ove faze, meso počinje da se kvvari, jer se u njemu počinju javljati i krajnji raspadni proizvodi belančevinskih molekula koji još više podižu pH.

II.3.6. Senzorna ispitivanja

Senzorne karakteristike kao što su izgled, tekstura, boja, miris i ukus mesa ribe se ocenjuju ljudskim čulima i upravo se ti parametri prate za monitoring kvaliteta hladno dimljenih proizvoda od ribe (**Olafsdottir i sar., 2005**).

Senzorna analiza je standardan i najprihvatljiviji način ocene kvaliteta ribe. Ova vrsta analize ima svoje prednosti i mane. Senzornom analizom je moguće ocenjivati više parametara od jednom, analizu je moguće napisati, čime može predstavljati deo deklaracije, ali i objektivan dokaz. Nedostatak senzornih analiza je u tome što je to subjektivna metoda, koja zavisi od individualnih ocena, ličnih stavova, kao i poteškoća prilikom opisivanja proizvoda (**Perera i sar., 2010**).

Primarni značaj se poklanja mirisu, kao parametru kvaliteta hladno dimljene ribe (**Jonsdottir i sar., 2008**). Hemijskom analizom se najčešće ne mogu utvrditi specifičnosti

mirisa i ukusa, pa je analiza profila mirisa i ukusa namirnice najsluženija metoda senzorne analize (**Baltić i sar., 2000**). Razlog nastanka nepoželjnih mirisa kao senzornih indikatora kvara jesu isparljive materije koje najčešće stvaraju bakterije (trimetilamin, isparljiva sumporna jedinjenja, aldehidi, ketoni, estri, hipoksantin) (**Olafsdottir i sar., 2005**). Trimetilamin je odgovoran za tipičan oštar miris (miris na ribu) koji se javlja u mesu ribe kao indikator kvara. Pozitivna korelacija utvrđena je između količine ukupne isparljive azotne supstance i trimetilamina, ukupnog broja bakterija i mirisa na amin, ukusa na amin, gorkog ukusa i mekane konzistencije (**Cardinal i sar., 2004**).

Dalgaard (1995) je utvrdio da za razliku od čuvanja ribe na vazduhu, nepoželjni mirisi koji prate kvar ribe u vakuumu ili smeši gasova ne sadrže sulfidne komponente. Pored posledice bakterijskog delovanja na pojavu nepoželjnog mirisa i ukusa, postoji i dejstvo autolitičkih enzima, pošto se hladnim dimljenjem ne prelazi temperatura od 28°C, pa tako ne dolazi i do inaktivacije enzima (**Hansen i sar., 1996**).

U promeni strukture mesa (tekstura, konzistencija) najvažniju ulogu imaju autolitički procesi (**Lund i Nielsen, 2001**).

Torrieri i sar. (2006) ističu da u mesu hladno dimljene ribe pakovane u MAP, kao posledica rastvaranja ugljen dioksida u tkivima, dolazi do acidifikacije i snižavanja pH vrednosti mesa, čime dolazi i do promena u teksturi.

Jedan od bitnih parametara za određivanje kvaliteta izgleda mesa dimljene ribe je i boja (**Espe i sar., 2004**). Gubitak boje u velikoj meri smanjuje cenu ovog proizvoda na tržištu (**Lakshmanan i sar., 2005**). Iz tog razloga je vrlo bitno da se dimljena riba pakuje u ambalažu koja će omogućiti kupcu da vidi proizvod, što se prevashodno postiže pakovanjem u smešu gasova (**Fuentes i sar., 2010**).

Na boju dimljene ribe utiču vrsta i količina pigmenta koje riba prima tokom uzgoja putem ishrane i procesni parametri u toku proizvodnje (**Cardinal i sar., 2004**).

Ujednačena crvena boja losos pastrmke ukazuje na visok kvalitet proizvoda, a pigmentacija je uslovljena keto-karotenoidima i kantaksantinom. Visoke koncentracije

CO₂ mogu da dovedu do diskoloracije mesa, gubitka pigmenta (**Barnett i sar., 1982**). Promene pH vrednosti u mesu ribe mogu izazvati promene u boji. **Cardinal i sar. (2004)** su utvrdili postojanje korelacije između teksture i izraženosti boje. Uzorci tvrde strukture imali su izraženiju narandžastu boju, a mekaniji ružičastu boju.. I način soljenja utiče na izraženost boje. Vlažno soljeni uzorci hladno dimljene ribe imaju jače izraženu boju.

III - CILJ I ZADACI RADA

Povećani zahtevi potrošača za proizvodima koji imaju prihvatljivu cenu i adekvatan rok trajanja, kao i sve strožiji zahtevi u odnosu na kvalitet, higijenu i bezbednost hrane koja će biti što lakša za pripremu i spremanje, dovode do toga da proizvođače hrane savremeno društvo stavlja pred zadatak konstantnog razvoja novih tehnika i metoda pakovanja hrane, a da pri tome što manje imaju negativan uticaj na zagađenje životne sredine. Osnovni princip pakovanja hrane je sledeći – izbegavanje kontaminacije, odlaganje kvara, pojedine enzimske reakcije koje pospešuju mekoću proizvoda, smanjenje gubitka na masi i osiguranje zadržavanja organoleptičkih svojstava namirnice. Savremen potrošač traži hranu visokog kvaliteta koja je zadržala senzorske karakteristike sirovine od koje je proizvedena, i da je u isto vreme bezbedna po zdravlje.

Sposobnost listerija da rastu pri temperaturi hlađenja, da su rasprostranjene u prirodi i da preživljavaju dugo vremena u nepovoljnim uslovima doprineli su saznanju da je ova bakterija sve značajniji patogen koji se prenosi hranom na ljude. Od kako je *Listeria* ustanovljena kao bakterija koja može da izazove oboljenje listeriozu, sve više se povećava interes i potreba za kontrolom ovog mikroorganizma u najraznovrsnijim namirnicama.

Osnovni cilj u okviru ove doktorske disertacije je bio da se ispita uticaj pakovanja i uslova čuvanja na rast različitih serotipova *Listeria monocytogenes* (različitog porekla) u laboratorijski kontaminiranim uzorcima dimljene pastrmke. Jedan od ciljeva ovog istraživanja je da se ispita uticaj pakovanja dimljene ribe (pastrmke) u vakuum i modifikovanoj atmosferi na održivost i odabrane parametre kvaliteta.

Pored toga, ispitivano je i prisustvo drugih patogena kod hladno dimljene pakovane pastrmke.

Shodno ciljevima rada, zadaci ove doktorske disertacije bili su:

1. Ispitivanje promene ukupnog broja bakterija u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanu atmosferu i skladištene pri temperaturi 3°C odnosno pri 8°C.
2. Ispitivanje promene broja bakterija četiri različita serotipa *Listeria monocytogenes* u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanu atmosferu i skladištene pri temperaturi 3°C odnosno pri 8°C;
3. Ispitivanje promene broja mlečno-kiselinskih bakterija u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanu atmosferu i skladištene pri temperaturi 3°C odnosno pri 8°C;
4. Izolacija i identifikacija *Salmonella spp.*, izolacija, identifikacija i određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka, kao i određivanje broja sulfitoredujućih klostridija hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanu atmosferu i skladištene pri temperaturi 3°C odnosno pri 8°C;
5. Ispitivanje osnovnog hemijskog sastava (sadržaj vode, masti, proteina i pepela) i sadržaja soli hladno dimljene pastrmke;
6. Određivanje aktivnosti vode (a_w) i ispitivanje pH vrednosti hladno dimljene pastrmke hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanu atmosferu i skladištene pri temperaturi 3°C odnosno pri 8°C;
7. Ispitivanje prihvatljivosti mirisa hladno dimljene pastrmke hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanu atmosferu i skladištene pri temperaturi 3°C odnosno pri 8°C;

IV - MATERIJAL I METODE

4.1. Materijal

4.1.1. Uzorci ribe

Za eksperiment su korišteni fileti hladno dimljene losos pastrmke (*Oncorhynchus mykiss*) koji su proizvedeni u objektu za obradu i preradu ribe. Lososova pastrmka je slatkovodna riba, mase od oko 1 kg, čije meso ima crvenu boju poput lososa, zahvaljujući obogaćenju ishrani karotinoidima.



Slika 4.1. Lososova pastrmka (lat. *Oncorhynchus mykiss*, engl. rainbow trout)

Pastrmka potiče iz ribnjaka Bočac, vlasništvo firme „Tropic“, Banja Luka iz Republike Srpske, gde je gajena. Nakon određenog perioda uzgoja, riba je živa transportovana od ribnjaka do pogona, u specijalizovanim vozilima sa tečnim kiseonikom u kontrolisanim uslovima temperature. Posle transporta, riba je prihvaćena u bazene pogona za obradu i preradu ribe, sa svim neophodnim uslovima sredine. Veterinarski inspektor je obavio zdravstveni i higijenski nadzor ribe u prihvatnim bazenima. Za vreme boravka u prihvatnim bazenima, riba nije hranjena.

Izlovljena iz bazena, riba je klana na mestu izlova, bez prethodnog omamljivanja, pri

čemu se klanje obavlja zasecanjem vrata (iza škržnih lukova), u ventralnom delu, nožem. Nakon toga je usledilo pranje tela, i evisceracija unutrašnjih organa mašinskim putem. Odsecanje glave i skidanje peraja je urađeno ručno. Nakon toga, odstranjuje se kičma, rezom koji ide paralelno uz kičmeni stub, čime se dobijaju leva i desna polovina.

Nakon ove obrade, fileti ribe su ispirani i potapani u burad za salamurenje, postupkom koji se naziva vlažno soljenje sa koncentracijom soli od 9%. Pastrmka je salamurena 24 sata. Temperatura prostorije je bila 4°C.

Nakon 24-satnog vlažnog soljenja, riba je izvađena iz salamure i stavljena na ceđenje, položena na rešetke u komore za dimljenje tokom jednog sata, pri temperaturi od 20°C. Dimljenje je trajalo 8 sati, pri temperaturi od 28°C, u automatizovanim pušnicama. Za proces dimljenja je korišćena piljevina bukovine.

Nakon završenog postupka dimljenja, pastrmka je hlađena na temperaturu od 2°C, tokom 10 sati. Tako ohlađena, riba je slajsovana (postupak narezivanja tankih fileta pomoću mašine slajserice) na tanke filete debljine do 0.5cm. Prilikom slajsovanja, skidana je i koža sa površine ribe, kao i provera postojanja zaostalih kostiju rebara u filetima. Fileti su, potom pakovani, a pakovanja su iznosila oko 75g.

Po završenom procesu proizvodnje, upakovani proizvodi su podeljeni u 4 grupe, koje će, svaka zasebno biti veštački kontaminirane različitim sojevima *Listeria monocytogenes*. Potom je svaka grupa podeljena u dve podgrupe, i to jedna za vakuum pakovanje, a druga za pakovanje u modifikovanoj atmosferi, a svaka od tih podgrupa je ponovo podeljena na one koje će se čuvati tokom celog ciklusa ispitivanja na adekvatnim temperaturama (3°C) i na one koje će se skladištiti na neadekvatnim temperaturama skladištenja (8°C).

4.1.2. Mikroorganizmi

U ispitivanju su korišćena 4 soja bakterije *Listeria monocytogenes*, čije je poreklo različito.

oznake sojeva korišćenih u ispitivanju	serotip	soj	poreklo
A	4b	referentni soj ATCC 19115	Microbiologics, liofilizovani mikroorganizmi
B	4b	izolovani soj prilikom PTS testiranja, referentni soj NCTC 11994.	Food Microbiology Proficiency Testing Trial, Eurofins Norsk Matanalyse PT001
C	4b	izolovani soj tokom magistarskog rada	dimljena haringa
D	1/2a	izolovani soj tokom magistrskog rada	dimljeni losos

4.2. Metode

Za ispitivanje su korišćene:

- mikrobiološke metode
- fizičke i fizičko-hemijske analize
- senzorne analize

4.2.1. Mikrobiološke analize

Mikrobiološke analize su obuhvatale ispitivanje broja aerobnih kolonija (ukupan broj bakterija), određivanje broja *Listeria monocytogenes*, broja mlečno kiselinskih bakterija, određivanje prisustva *Salmonella* vrsta, sulfitoredukujućih klostridija i koagulaza pozitivnih stafilokoka.

4.2.1.1. Uzorci za mikrobiološka ispitivanja

Za ispitivanje promena u vakuum pakovanju i pakovanju modifikovane atmosfere uzimani su uzorci fileta dimljene pastrmke koji su veštački kontaminirani sa različitim sojevima *Listeria monocytogenes*.

Za ispitivanje ukupnog broja bakterija, određivanje broja *Listeria monocytogenes*, broja mlečno kiselinskih bakterija, sulfitoredujućih klostridija i koagulaza pozitivnih stafilokoka u filetima hladno dimljene pastrmke, od nultog, 14., 28. do 35. dana čuvanja, uzimani su uzorci u količini od 10g, sterilnim skalpelom i hirurškom pincetom i stavljeni u sterilne stomaher kese.

Za ispitivanje prisustva salmonela uzimani su uzorci u količini od 25g, sterilnim skalpelom i hirurškom pincetom i stavljeni u sterilne stomaher kese.

4.2.1.2. Način veštačke kontaminacije uzoraka sa sojevima *Listeria monocytogenes*

Pojedinačni sojevi *Listeria monocytogenes* su adekvatno čuvani i pravovremeno presejavani na hranljive podloge. Tokom čuvanja su redovno proveravane njihove morfološke i biohemijske karakteristike. Pred početak ispitivanja sojevi su presejani na površine TSEY agara, i tokom 24-36h kultivisani na temperaturi od 37°C. Kultivisani sojevi su tako bili spremni za dalje korišćenje u eksperimentu. Najbolje izolovane kolonije su pikirane i suspendovane u 9ml fiziološkog rastvora sa dodatkom peptona, i inkubirane tokom 1h na 37°C.

Korišćeni uzorci sveže proizvedene hladno dimljene pastrmke su skladišteni adekvatno na temperaturi zamrzivača (-18°C) do trenutka početka eksperimenta, a potom su otapani na temperaturi frižidera tokom noći (2-4°C). Fileti hladno dimljene pastrmke su aseptično usitnjeni i homogenizovani čime je dobijena pastozna forma iste homogenosti. Adekvatno razređenje koktela soja *Listeria monocytogenes* je dodavano postupno tokom homogenizacije i mešanja uzorka sa ciljem ostvarivanja inicijalnog nivoa od 10⁶. Nakon toga je odmeravano po 40g pastoznog uzorka i pakovano u vakuum i pakovanja sa modifikovanom atmosferom (30% CO₂ + 60% N₂). Uzorci su raspoređeni na skladištenje i čuvanje u frižiderima na različitim temperaturama: 3°C i 8°C. Ispitivanja su vršena 14., 28. i 35. dana od dana pakovanja.

Doktorska disertacija

*Ispitivanje činilaca od značaja za rast različitih sojeva
Listeria monocytogenes u filetima hladno dimljene pastrmke*

4.2.1.3. Oprema

- Laboratorijski pribor:
 - Erlenmajer boce
 - pipete od 1 do 10 ml, graduisane na 0.5 i 0.1 ml
 - automatska pipeta Eppendorf 100-1000
 - nastavci za automatsku pipetu
 - epruvete
 - Petrijeve ploče
 - menzure
 - tarionik i tučkovi
 - eze, stakleni štapići
 - mikroskopske pločice i pokrovne ljustice
 - makaze i pincete
 - dispenzeta
 - papirna vata
- Aparati i instrumenti
 - aparat za suhu sterilizaciju
 - autoklav
 - laminarna komora
 - termostati- podešeni na temperature $25^{\circ}\text{C} \pm 1$; $30^{\circ}\text{C} \pm 1$; $35^{\circ}\text{C} \pm 1$;
 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
 - vodeno kupatilo ($47 \pm 2^{\circ}\text{C}$)
 - pH metar
 - homogenizator- magnetna mešalica , sterilne vrećice
 - destilacioni aparat
 - plamenici
 - vaga
 - mikroskop
 - frižider
 - UV lampa
 - inkubator za anaerobne i mikroaerofilne uslove

4.2.1.4. Hranljive podloge i reagensi

❖ **Agar za određivanje broja aerobnih kolonija (ukupan broj)**

APHA, Standard Plate Count Agar (Oxoid, cat.No CM0463):

Sastav: g/l	
Kvašćev ekstrakt	2.5
pankreatski digest kazeina	5.0
glukoza	1.0
agar	15.0
Voda	1000ml

Suspendovati 23.5g podloge u 1 litri destilovane vode. Polako mešati dok se potpuno ne rastvori. Ostaviti 15 minuta i potom pažljivo zagrijati do ključanja da se potpuno rastvori. Podesiti pH tako da posle sterilizacije iznosi $7,3 \pm 0,2$ pri 25°C . Sterilisati u autoklavu 15 min na 121°C . Nakon hlađenja na 50°C sterilno razliti u Petri ploče.

❖ **Puferisana peptonska voda**

Sastav: g/l	
Pepton	10
NaCl	5
Na_3PO_4	9
KH_2PO_4	1,5
Voda	1000ml

Suspendovati 37g medijuma u 1 litri destilovane vode. Polako mešati dok se potpuno ne rastvori. Razliti u epruvete ili erlenmajere. Sterilisati u autoklavu 15 min na 121°C .

❖ **Rappaport-Vassiliadis bujon**

RSV bujon (Liofilchem, cat.No 610175) :

Sastav:g/l	
Tripton	4.5
Na Cl	7.2.
KH_2PO_4	1.44
MgCl_2 anhidrovana	13.3
Malachite green oxalate	0.036

Voda 1000ml

Rastvoriti 26,5g dehidrovane podloge u 1l destilovane vode. Polako otopiti do potpune homogenizacije. Razliti u epruvete ili erlenmajere i sterilisati u autoklavu na 115°C 15 min.

❖ **MKTTn bujon**

Muller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin bujon (Oxoid, cat.No CM1048) :

Sastav : g/l	
Mesni ekstrakt	4.3g
Enzimatski digest kazeina	8.6g
NaCl	2.6g
Kalcijum karbonat	38.7g
Natrijum tiosulfat	30.5g
Goveđa žuč	4.78
Brilijant zeleno	0.0096g
Voda	1000ml

Suspendovati komponente u vodi (89.5g po litri dest.vode), zagrevati ako je potrebno. Rashladiti podlogu na temperaturu oko 45°C. Neposredno pred korišćenje dodati 20ml jodino-jodidnog rastvora, napravljenog tako što se 25g kalijum jodida rastvori u 10ml vode, uz dodatak i 20g jodina, i potom sve zajedno rastvori sa 100ml sterilne vode. Potom se doda i Novobiocin suplement, rekonstituisan direktno sa 250ml podloge. Dobro promešati i aspetično razliti u sterilne erlenmajere ili epruvete.

❖ **XLD**

Ksiloza lizin dezoksiholat agar (Oxoid, cat.No C0469) :

Sastav:g/l	
Ekstrakt kvasca	3,0g
L-lizin HCl	5,0g
Ksiloza	3,75g
Laktoza	7,5g
Sukroza	7,5g
Natrijum dezoksi holat	1,0g
NaCl	5,0g
Natrijum tiosulfat	6,8g
Gvožđe amonijum citrat	0,8g
Fenol crveno	0,08g
Agar	12,5 g
Voda	1000ml

Doktorska disertacija

*Ispitivanje činilaca od značaja za rast različitih sojeva
Listeria monocytogenes u filetima hladno dimljene pastrmke*

Suspendovati komponente u vodi (53g po litri dest.vode), zagrevati ako je potrebno. Podesiti pH, tako da posle sterilizacije bude $7,4 \pm 0,2$ na 25°C . Sterilisati u autoklavu 15 min na 121°C . Rashladiti podlogu na temperaturu između 44°C i 47°C . Razliti po 15 ml podloge u sterilne Petrijeve ploče i ostaviti da se stvrdne i da se ohladi površina.

❖ **Selenit bujon**

Selenit bujon (Liofilchem, cat.No 610145)

Sastav: g/l

Tripton	5
Natrijum selenit	4
Natrijum fosfat	10
laktoza	4
destilovana voda	1000

Suspendovati 23g podloge u 1 litri destilovane vode. Polako mešati dok se potpuno ne rastvori. Proveriti pH tako da iznosi $7,0 \pm 0,2$ pri 25°C

Ne autoklavirati.

❖ **TSI agar**

TROSTRUKI ŠEĆER GVOŽĐE agar

Sastav: g/l

Kazeinski pepton	10
Mesni pepton	10
NaCl	5
Mesni ekstrakt	3
Ekstrakt kvasca	3
Laktoza	10
Saharoza	10
Glukoza	1
Amonijum-gvožđe III citrat	0.5
Natrijum tiosulfat	0.5
Fenol crveno	0.024
Agar agar	12
destilovana voda	1000

Suspendovati 65g podloge u 1 litri destilovane vode. Polako mešati dok se potpuno ne rastvori. Ostaviti 15 minuta i potom pažljivo zagrejati do ključanja da

se potpuno rastvori. Podesiti pH tako da posle sterilizacije iznosi $7,4 \pm 0,2$ pri 25°C . Sterilisati u autoklavu 15 min na 121°C .

❖ **BAIRD PARKER agar**

BP agar (Liofilchem, cat.No 610004)

Sastav: g/l	
Tripton	10,0
Goveđi ekstrakt	5,0
Ekstrakt kvasca	1,0
Glicin	12,0
Natrijum piruvat	10,0
Litijum hlorid	5,0
Agar	17,0
Voda	1000ml

pH pripremljene podloge treba da je $7,2 \pm 0,2$ na 25°C

Priprema podloge:

Rastvoriti 50,0g podloge u 1 l destilovane ili dejonizovane podloge. Polako zagrevati do ključanja, sve do potpunog rastvaranja. Sterilisati u autoklavu 15 min na 121°C . Rashladiti do temperature od 50°C .

Dodati sterilnu žumančanu emulziju sa teluritom (50ml po 1 litru podloge) i razliti po 15 ml podloge u sterilne Petrijeve ploče i ostaviti da se stvrdne i da se ohladi površina.

Sterilna žumančana emulzija sa teluritom*

Sastav	
Žumance	25,0ml
Sterilni fiziološki rastvor	25,0ml
Kalijum telurit	0,1g

❖ **GVOŽĐE SULFITNI agar**

Iron Sulfite agar (Liofilchem, cat.No 611401)

Sastav: g/l	
Tripton	10,0g
Natrijum sulfat	0,5g
Gvožđe citrat	0,5g
Agar	15 g
Voda	1000ml

Suspendovati komponente u vodi (26 g po litri dest.vode), zagrevati ako je potrebno. Podesiti pH , tako da posle sterilizacije bude $7,1\pm 0,2$ na 25°C . Sterilisati u autoklavu 15 min na 121°C . Rashladite podlogu na temperaturu između 44°C i 47°C . Razliti po 15 ml podloge u sterilne Petrijeve ploče i ostaviti da se stvrdne i da se ohladi površina, ili razliti u epruvete odgovarajuće veličine koje će se čuvati u frižideru za dalju upotrebu.

❖ **HALF FRASER bujon**

HF bujon (Biokar Diagnostics, cat.No BK133HA)

Sastav : g/l

Polipepton	10g
Ekstrakt kvasca	5g
Mesni ekstrakt	5g
NaCl	20g
Na_2HPO_4	9,60g
KH_2PO_4	1,35g
Eskulin	1g
Litijum hlorid	3g
Destilovana voda	1000

Suspendovati 55g dehidriranog medijuma u 1 l destilovane vode. Komponente pažljivo rastvoriti da se ne stvaraju mehurići. Razliti po 225 ml u posude po Erlenmajeru. Podesiti pH na $7,2\pm 0,2$. Sterilisati 15 min na 121°C . Nakon sterilizacije ohladiti na 25°C i dodati aseptično Half Fraser suplement.

Half fraser suplement

Nalidiksinska kiselina	5mg
Akriflavin hidrohlorid	6,25mg
Feriamonijum citrat	250mg

Pakovanje suplementa rastvoriti aseptično sa 5 ml rastvora etanola i sterilne destilovane vode 1:1. Dodati u 225 ml Half Fraser bujona.

❖ **FRASER BUJON**

F bujon (Biokar Diagnostics, cat.No BK133HA)

Sastav : g/l	
Polypepton	10g
Ekstrakt kvasca	5g
Mesni ekstrakt	5g
NaCl	20g
Na ₂ HPO ₄	9,60g
KH ₂ PO ₄	1,35g
Eskulin	1g
Litijum hlorid	3g
Voda	1000ml

Suspendovati 55g dehidriranog medijuma u 1 l destilovane vode. Komponente pažljivo rastvoriti da se ne stvaraju mehurići. Razliti po 10ml u epruvete. Podesiti pH na 7,2±0.2. Sterilisati 15 min na 121°C. Nakon sterilizacije ohladiti na 25°C i dodati aseptično selektivni suplement.

Fraser selektivni suplement

Nalidixic acid	10mg
Acriflavin (hydrochloride)	12,5mg
Feric ammonium citrate	250,0mg

Pakovanje suplementa rastvoriti aseptično sa 5 ml rastvora etanola i sterilne destilovane vode 1:1. Dodati 0,1 ml u 10 ml Fraser bujona pripremljenog na 25°C.

❖ **CHROMOCULT Listeria selektivni agar**

Ottaviani Agosti Listeria selektivni agar (Merck, cat.No 1.00427.0500)

Sastav: g/l	
Mesni ekstrakt	18,0g
Pepton od kazeina	6.0g
Ekstrakt kvasca	10.0
Glukoza	2.0 g
Natrijum piruvat	2.0g
Magnezijum glicerofosfat	1.0g
Magnezijum sulfat	0.50g
Natrijum hlorid	5.0g
DiNatrijum hidrogenfosfat	2.5g
Litijum hlorid	10.0g
5-bromo-4-hloro-3-indolil-β-D-glukopiranozid	0.05g
Agar	13.0g
Voda	1000ml

Rastvoriti 35g dehidrirane baze podloge u 476 ml sterilne destilovane ili dejonizovane vode (prvo rastvoriti izmerenu količinu u 300 ml vode, i potom dodavati ostalih 176 ml dok je podloga u vodenom kupatilu koje ključa). Lagano mešati dok se baza potpuno ne rastvori.

Postepeno hladiti do temperature 48-50°C.

Dodati ceo sadržaj selektivnog saplementa (A-87a), i homogenizovati.

Saplement za obogaćenje (A-87b) treba zagrejati na temperaturu od 48-50°C i dodati u prethodno napravljenu mešavinu podloge.

Podesiti pH, ako je potrebno, na $7,2 \pm 0,2$

Razliti podlogu u Petri ploče. Gotova podloga ima homogen izgled, lagano zamućena i žućkaste boje. Tako razlivena podloga se mogu čuvati 4 nedelje (na temperaturi od 2-8°C, zaštićeno od isušivanja i svetlosti).

Suplement 1 (A-87a) Chromocult Listeria agar - selektivni suplement

- 2ml sterilne destilovane vode pomešati sa 2 ml alkohola i dodati u liofilizovani sadržaj bočice.
- Promešati pažljivo da se ne stvaraju mehurići.
- Aseptično dodati rekonstituisan suplement u agar bazu pripremljenu i ohlađenu na 48-50°C.
- Promešati
- Dodati suplement 2
-

Suplement 2 (A-87b) Chromocult Listeria agar - suplement za obogaćenje

- Saplement za obogaćenje (A-87b) treba zagrejati na temperaturu od 48-50 °C i dodati u prethodno napravljenu mešavinu podloge
- Dobro promešati, pažljivo da se ne stvaraju mehurići

❖ **MRS podloga**

Gelose MRS agar (Biokar Diagnostics, cat.No BK089HA)

Sastav: g/l	
Polipepton	10,0g
Ekstrakt mesa	10.0g
Ekstrakt kvasca	5.0
Glukoza	2.0 g
Tween 80	1.08g
Dikalijum fosfat	2.0g
Natrijum acetat	5.0g
Amonijum citrat	2.0g
Magnezijum sulfat	0.2g
Mangan sulfat	0.05g
Agar	15.0g
Voda	1000ml

Suspendovati komponente u vodi (70.3 g po litru dest.vode), zagrevati ako je potrebno. Podesiti pH, tako da posle sterilizacije bude $5.7\pm 0,1$ na 25°C . Sterilisati u autoklavu 15 min na 121°C .

Rashladiti podlogu na temperaturu između 44°C i 47°C .

Razliti po 15 ml podloge u sterilne Petrijeve ploče i ostaviti da se stvrdne i da se ohladi površina.

4.2.1.5. Metode

❖ **Određivanje broja aerobnih kolonija (ukupan broj mikroorganizama) EN ISO 4833:2008**

Mikrobiološko ispitivanje je rađeno u skladu sa propisanom metodom po International Standard ISO 4833:2008 „Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za određivanje broja mikroorganizama – Tehnika brojanja kolonija na 30°C “

Uzorak za ispitivanje se priprema u skladu sa odgovarajućim delom standarda ISO 6887. Uzmu se dve sterilne Petrijeve ploče, i pomoću sterilne pipete se u svaku ploču prenese po 1ml početne suspenzije (10^{-1}) uzorka za ispitivanje. Po potrebi, postupak se ponavlja i sa sledećim razblaženjima, pomoću druge sterilne pipete za svako

decimalno razblaženje. Potom se u svaku Petrijevu ploču nalije oko 12-15ml agara za ukupan broj, na temperaturi od 44-47°C. Inokulat se pažljivo izmeša sa podlogom okretanjem Petrijeve ploče i omogući se da se smeša očvrstne tako što se Petrijeve ploče ostave na hladnoj horizontalnoj površini. Pripremljene ploče se okrenu i stave u inkubator na 30°C tokom 72 sata ± 3h. Nakon utvrđenog perioda inkubacije, izbroje se kolonije na pločama i izračunava vrednost ukupnog broja aerobnih kolonija.

❖ **Izolovanje i identifikacija *Salmonella* spp. SRPS EN ISO 6579:2008**

Mikrobiološko ispitivanje je rađeno u skladu sa propisanom metodom po International Standard ISO 6579:2008 „Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za otkrivanje *Salmonella* spp.“

Uzorak za ispitivanje se priprema u skladu sa odgovarajućim delom standarda ISO 6887. Pufervisana peptonska voda služi kao primarno neselektivno obogaćenje, i kao početna suspenzija se inkubira na 37°C tokom 18 sata ± 2h. Potom se prenese 0.1ml primarne suspenzije u epruvetu koja sadrži 10ml RVS bujona i 1ml primarne suspenzije u epruvetu koja sadrži 10ml MKTTn bujona. Inokulisani RVS bujon se inkubira na 41.5°C tokom 24 sata ± 3h, a MKTTn bujon na 37°C tokom 24 sata ± 3h. Posle inkubacije od 24 sata ± 3h, korišćenjem kulture dobijene u RVS bujonu i MKTTn bujonu, inokuliše se pomoću eze površina selektivne podloge za izolaciju XLD agar. Inokulisane ploče XLD agara se inkubiraju na 37°C tokom 24 sata ± 3h. Posle inkubacije pregledaju se ploče radi prisustva tipičnih salmonela kolonija (kolonije sa crnim središtem i svetle prozirne zone crvenkaste boje). Nakon utvrđenih sumnjivih kolonija, pikiraju se karakteristične, i vrši se dalje potvrđivanje, biohemijskim testovima i serološkom konfirmacijom i utvrđivanjem serotipa.

❖ **Izolovanje, identifikacija i određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka SRPS EN ISO 6888-1:2009**

Mikrobiološko ispitivanje je rađeno u skladu sa propisanom metodom po International Standard ISO 6888-1:2009 „Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za određivanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka (*Staphylococcus aureus* i druge vrste)“.

Uzorak za ispitivanje se priprema u skladu sa odgovarajućim delom standarda ISO 6887. Pomoću sterilne pipete, prenese se na svaku od dve ploče sa Baird Parker agarom 0.1ml početne suspenzije (10^{-1}) uzorka za ispitivanje. Po potrebi, postupak se ponavlja i sa sledećim razblaženjima, pomoću druge sterilne pipete za svako decimalno razblaženje. Pomoću pribora za nanošenje (L štapići) pažljivo se nanese inokulat što je brže moguće preko površine sa agarom. Ploče se poklope i ostave da se suše oko 15 minuta na temperaturi laboratorije. Ploče se potom okrenu i inkubiraju na 37°C tokom 48 sata \pm 2h. Tokom proteklih prvih 24 sata inkubacije, ploče se pregledaju, obeleže karakteristične izrasle kolonije, pa se inkubacija nastavlja tokom sledećih 24 sata. Tipične kolonije su crne ili sive, svetlucave i konveksne, prečnika od 1-1.5mm, okružene zonom prosvetljenja. Potvrđivanje se vrši koagulaza testom, kada se aseptičnim putem doda 0.1ml kulture (dobijene tako što se ubodnom ezom uzmu karakteristične kolonije i prenesu u epruvetu sa BHI bujonom, i inkubira na 37°C tokom 24 sata \pm 2h) u 0.3ml plazme kunića u sterilnim epruvetama, a potom se prati grušanje plazme tokom 24 sata (koagulisavanje nastaje najčešće tokom 4-6 sati). Smatra se da je koagulaza test pozitivan ako zapremina ugruška zauzima više od polovine prvobitne zapremine tečnosti. Sledi izračunavanje broja koagulaza pozitivnih stafilokoka.

❖ **Određivanje broja sulfitoreduksijskih klostridija ISO 15213:2003**

Mikrobiološko ispitivanje je rađeno u skladu sa propisanom metodom po International Standard ISO 15213:2003 „Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions“

Uzorak za ispitivanje se priprema u skladu sa odgovarajućim delom standarda ISO 6887. Pripremljena razređenja u epruvetama se termički tretiraju da bi se uništili vegetativni oblici bakterija (prokuvavanjem par minuta ili temperiranjem na 75°C 20 minuta). Uzeti dve sterilne Petrijeve ploče i sipati po 1ml odgovarajućeg razređenja. Svaku Petrijevu ploču naliti sa gvožđe sulfitnim agarom koji je temperature oko $44-46^{\circ}\text{C}$. Dobro izmešati. Ostaviti da se podloga učvrsti 15 minuta. Nakon toga naliti još 5-10ml iste podloge preko i ostaviti da agar očvrstne. Inkubirati u anaerobnim

uslovima na 37°C tokom 24-48h. Posle 24-48 sati, broje se crne kolonije, pri čemu se biraju Petrijeve ploče koje sadrže manje od 150 tipičnih i 300 izraslih kolonija. Nakon toga se vrši identifikacija karakterističnih kolonija biohemijskim testovima.

❖ **Izolovanje i identifikacija *Listeria monocytogenes* SRPS EN ISO 11290-1:2009**

Mikrobiološko ispitivanje je rađeno u skladu sa propisanom metodom po International Standard ISO 11290-1 (1996) „Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*“, a sam postupak se sastojao u sledećem:

Uzorak u količini od 25 g je homogenizovan sa 225 ml half Fraser bujona u sterilnoj vrećici za stomaher u toku 30 sekundi. Homogenat je inkubiran na temperaturi od 30°C u toku 24 časa. Nakon inkubacije je vršeno zasejavanje po 0.1 ml u 10 ml Fraser bujona koji je nakon toga inkubiran na temperaturi od 35-37 °C u toku 48 + 2 sata. Iz half Fraser bujona je vršeno zasejavanje na čvrste podloge OAA i Oxford agar koje su inkubirane na temperaturi od 30°C i 35-37°C, 24-48 sati;

Iz Fraser bujona je nakon inkubacije, takođe vršeno presejavanje ezom na hranljive podloge razlivenne u Petrijeve ploče OAA i Oxford agara, koje su zatim inkubirane na temperaturi od 30°C i temperaturi od 35-37°C, 24-48 sati;

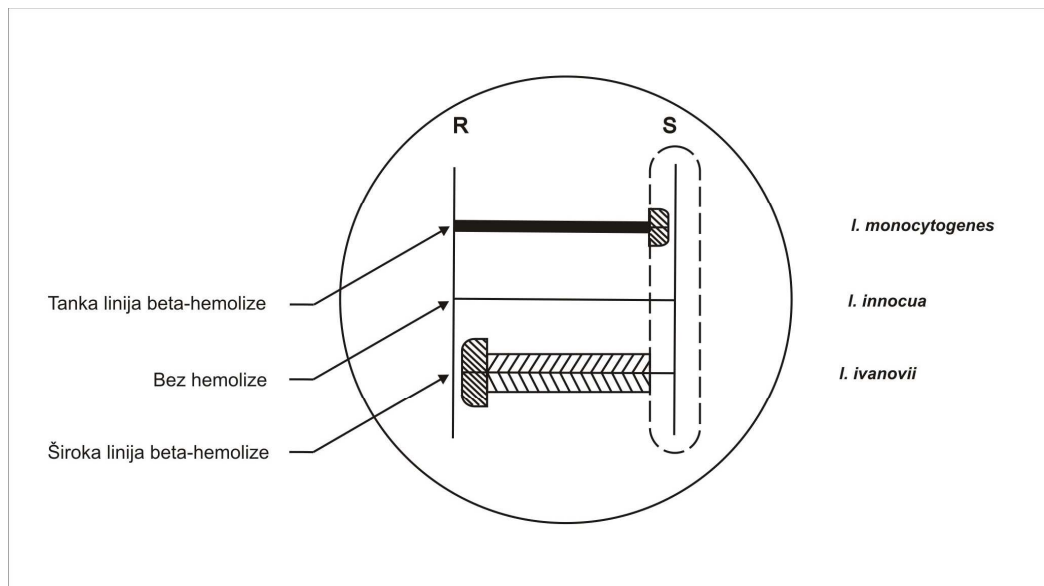
Karakteristične kolonije izrasle na OAA agaru – nakon inkubacije od 24 časa su veoma sitne (1.5 – 2 mm), plavičasto-zelenkaste, poseduju zonu prosvetljenja, a nakon inkubacije od 48 časova kolonije su veće. Karakteristične kolonije na Oxford agaru – nakon inkubacije od 24 sata: kolonije su male (1 mm), sivkaste, okružene crnim, a nakon 48 sati su tamnije, sa zelenkastim odsjajem, nešto veće (oko 2 mm) i sa crnim haloom i centralnim ulegnućem unutar kolonije. Karakteristične kolonije izrasle na OAA i Oxford agaru su ezom presejavane na TSEYA agar i inkubirane na temperaturi od 35-37°C, 18-24 časa. Izrasle kolonije na neselektivnom agaru (hranljivi agar, TSEYA) su konveksne, veličine 1-2 mm, bezbojne i neprozirne, nepravilnih ivica. Karakteristične kolonije su pikirane i presejavane na običan hranljivi i na krvni agar za izvođenje katalaza testa i pripremu preparata za bojenje po Gramu. Krvni agar se inkubira u termostatu na temperaturi od 37°C u toku 24 časa

da bi se dobila čista kultura i da bi se videla eventualna hemoliza. Test za ispitivanje prisustva enzima katalaze rađen je sa čistom kulturom kolonija izraslih na hranljivom agaru. Pojava mehurića odmah predstavlja pozitivan test, odnosno prisustvo enzima katalaze. Takođe je ispitivana i reakcija oksidaze koja je za ovu bakteriju negativna.

Na mikroskopskom preparatu obojenom po Gramu, listerije su se videli kao g+ tanki, kratki štapići, blago zaobljenih krajeva. Sa krvnog agara zasejavani su bujoni za fermentaciju ugljenih hidrata (ramnoza, metilmano-piranozid) i inkubirani su nekoliko dana na temperaturi od 37°C. Zasejavana je i podloga koja je inkubirana 24 časa na 25°C (na sobnoj temperaturi) za ispitivanje pokretljivosti listerija.

Gram-pozitivne, katalaza pozitivne, oksidaza negativne kolonije koje su rasle u obliku kišobrana u podlozi za pokretljivost (na temperaturi od 25°C), smatrane su karakterističnim za *Listeria spp.*

Diferencijacija vrsta *Listeria* se obavlja na osnovu ispitivanja (CAMP fenomen sa beta-hemolitičkim sojem *Staphylococcus aureus* i sa *Rhodococcus equi*) i prema tablicama za fermentaciju ugljenih hidrata ili pomoću API Listeria testa.



Crtež 4.1. CAMP fenomen *L.monocytogenes*, *L.innocua* i *L.ivanovii* sa *Rhodococcus equi* (R) i *Staphylococcus aureus* (S)

Definitivna identifikacija je obavljena primenom serološkog testa brze aglutinacije na mikroskopskoj pločici sa poli-O-antiserumom.

❖ **Brojanje *Listeria monocytogenes* ISO 11290-2:2010**

Mikrobiološko ispitivanje je rađeno u skladu sa propisanom metodom po International Standard ISO 11290-2:2010 „Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*, part 2: Enumeration method“

Uzorak za ispitivanje se priprema u skladu sa odgovarajućim delom standarda ISO 6887. Za pripremu inicijalne suspenzije koristi se puferisana peptonska voda ili half Fraser bujon bez dodavanja selektivnih sredstava. Potrebno je ostaviti inicijalnu suspenziju da stoji $1h \pm 5$ minuta na temperaturi 20 ± 2 °C. Potom se sterilnom pipetom zasejava 0.1ml osnovnog razređenja po površini dve ploče OAA agara. Ponoviti proceduru koristeći decimalna razređenja, po potrebi. Lagano raširiti inokulum po površini agara, što je pre moguće, bez dodirivanja rubova staklenim ili L štapićem. Ostaviti zasejane podloge zatvorene 15 minuta na sobnoj temperaturi, kako bi se inokulum apsorbavao u agar i tek tada preokrenuti ploče. Inkubirati na 37°C tokom 24h. Nakon inkubacije od 24 sata, pregledati ploče i karakteristične kolonije za *Listeria monocytogenes* prebrojati. Brojanje kolonija se savetuje na pločama koje sadrže manje od 150 kolonija sumnjivih na listeriju. Nakon prebrojavanja karakterističnih kolonija, pikirati po pet sumnjivih i izvršiti testove identifikacije i diferencijacije prema opisanoj metodi ISO 11290-1:2009.

❖ **Određivanje broja karakterističnih mlečno-kiselinskih bakterija ISO 5214:1998, ISO 13721:1995**

Mikrobiološko ispitivanje je rađeno u skladu sa propisanim metodama po International Standard ISO 5214:1998 „Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – Colony count technique at 30°C“ i International Standard ISO 13721:1995 „Meat and

meat products – Enumeration of lactic acid bacteria – Colony count technique at 30°C“.

Uzorak za ispitivanje se priprema u skladu sa odgovarajućim delom standarda ISO 6887. Sterilnom pipetom se prenese po 1ml od svakog razblaženja u dve pripremljene Petrijeve ploče. Zatim se u Petrijeve ploče nalije po 15ml MRS agara, temperature od 45°C. Odmah posle nalivanja inokulat se pažljivo izmeša sa podlogom rotiranjem Petrijevih ploča. Kada agar očvrstne, ploče se okrenu i inkubiraju u mikroaerofilnim uslovima na temperaturi od 30°C 24-48h. Posle utvrđenog perioda inkubacije, izbroje se kolonije koje pokazuju osobine laktobacilusa (svetle kolonije, veličine 1.5-2mm, kiselkastog mirisa).

4.2.2. Hemijske i fizičko-hemijske analize

Uzorci za ispitivanje hemijskog sastava uzimani su iz originalnog pakovanja, počev od nultog dana ispitivanja, pa tokom celog ciklusa ispitivanja, 14., 28. i 35. dana ispitivanja.

Ispitivanje se sastojalo u određivanju hemijskih osnovnih parametara na početku ispitivanja: voda, so, mast, a_w , so u vodenoj fazi, pH, proteini, pri čemu su korišćeni sledeći postupci:

- ispitivanje vode – određivanjem gubitka mase pri sušenju homogenizovanog uzorka pri $105\pm 1^\circ\text{C}$ do konstantne mase (JUS ISO 1442)
- ispitivanje sadržaja soli – metodom po Volhard-u (JUS ISO 1841-1)
- određivanje sadržaja soli u vodenoj fazi (SVF) – izračunat je na osnovu ukupnog sadržaja soli u mesu ribe i sadržaja vode, na osnovu formule:

$$\text{SVF} = \frac{\% \text{ soli} \times 100}{\% \text{ soli} + \% \text{ vode}}$$

- određivanje sadržaja masti – metodom po Soxlet-u, ekstrakcijom masti iz osušenog uzorka petrol etrom, destilacijom i sušenjem pri $105\pm 1^{\circ}\text{C}$ do konstantne mase (JUS ISO 1443)
- ispitivanje sadržaja proteina – metodom po Kjeldahl-u (JUS ISO 937)
- određivanje pH vrednosti – pomoću aparata pH metra
- određivanje aktivnosti vode a_w – na osnovu sadržaja soli u vodenoj fazi, prema formuli (Gimenéz i Dalgaard, 2004.):

$$a_w = 1 - 0.0052471 \times \text{SVF} - 0.00012206 \times \text{SVF}^2$$

Ispitivanje pH vrednosti hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanoj atmosferi i skladištene pri temperaturi 3°C , odnosno pri 8°C vršeno je tokom celog ciklusa ispitivanja.

4.2.3. Senzorne analize

4.2.3.1. Uzorci sa senzorno ispitivanje

Senzornim ispitivanjem ocenjivani su uzorci hladno dimljenih fileta pakovanih u vakuum pakovanju i u modifikovanoj atmosferi, čuvanih u adekvatnoj i neadekvatnoj sredini (temperature frižidera 3C i 8C), tokom nultog, 14., 28. i 35. dana ciklusa ispitivanja.

4.2.3.2. Ocenjivači

U senzornoj oceni su učestvovali obučeni i izabrani ocenjivači, čije su metode i način ocenjivanja akreditovani prema ISO 8586-1:1993 i ISO 8586-2:2008.

4.2.3.3. Senzorna ocena

Granica prihvatljivosti i održivosti uzoraka hladno dimljene pastrmke je određena nastankom kvara proizvoda, pojavom neprijatnog mirisa, kao i promenom teksture mesa (omekšavanje).

Senzorna analiza se odnosila se na ocenu izraženosti mirisa hladno dimljenih fileta pastrmke pakovanih u vakuum i modifikovanu atmosferu i skladištenih pri 3° i 8°C.

Senzornu ocenu mirisa hladno dimljene ribe vršili su obučeni ocenjivači (šest ocenjivača) na skali sa pet tačaka (1-5) pri čemu je ocena 5 označavala najbolju prihvatljivost odnosno odsustvo mana mirisa. Ocena 2,5 je granična i svi uzorci sa manjom ocenom od 2,5 smatrani su kao neprihvatljivi, odnosno imali su jasno izražene mane mirisa.

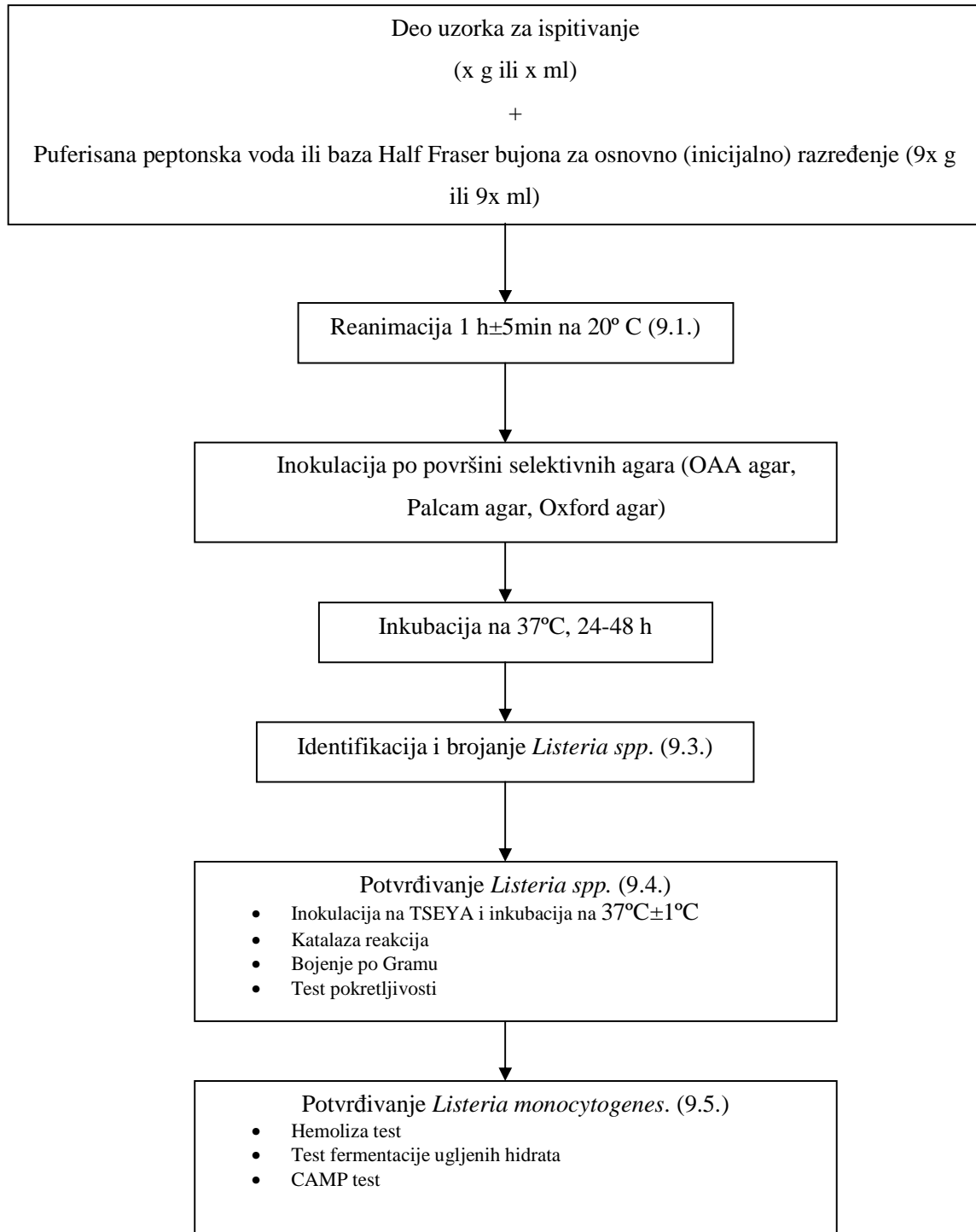
4.2.4. Statističke analize

Sva ispitivanja uključivala su dovoljan broj ponavljanja (minimum šest ponavljanja) za statističku obradu podataka. Rezultati su statistički obrađeni (srednje vrednosti, mere varijacije, t-test, analiza varijanse) pomoću programa Microsoft Office Excel 2007.

Tabela 4.1. Plan eksperimentalnog dela rada (ispitivanje promena u vakuum pakovanju i pakovanju MAP-a prilikom veštačke kontaminacije sa *Listeria monocytogenes*):

Temperatura čuvanja uzoraka u rashladnoj komori na 3 i 8°C (uslovno i neuslovno čuvanje)					
Ciklus ispitivanja	SIROVINA	0.dan	14.dan	28.dan	35.dan
Broj uzoraka	svaki uzorak čini po 5 jedinica				
Mikrobiološka ispitivanja	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Listeria monocytogenes</i> – određivanje broja ISO 11290-2:2010 ▪ <i>Listeria monocytogenes</i> – otkrivanje prisustva bakterija ISO 11290-1: 2009 ▪ Aerobne mezofilne bakterije – određivanje broja EN ISO 4833:2008 ▪ <i>Lactobacillus spp.</i> – određivanje broja ISO 15214:1998, ISO 13721:1995 ▪ <i>Salmonella</i> – otkrivanje prisustva bakterija ISO 6579:2008 ▪ Koagulaza pozitivne stafilokoke – određivanje prisustva i broja ISO 6888-1,2:2009 ▪ Sulfitoredukujuće klostridije – određivanje broja ISO 15213:2003 				
Senzorno ocenjivanje	<ul style="list-style-type: none"> ▪ intenzitet boje ▪ intenzitet mirisa na dim ▪ ukupna ocen prihvatljivosti 				
Fizičko-hemijska analiza		<ul style="list-style-type: none"> • sadržaj vode • sadržaj soli • SVF • a_w vrednost • sadržaj masti • sadržaj prot. • pH vrednost 	<ul style="list-style-type: none"> • pH vrednost 		

Dijagram 4.1. Šematski prikaz postupka određivanja broja bakterija *Listeria monocytogenes*



V - Rezultati ispitivanja

V.1. Ispitivanje promene ukupnog broja bakterija u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanoj atmosferi i skladištene pri temperaturi 3°C, odnosno pri 8°C

Ukupan broj bakterija u veštački kontaminiranim uzorcima I, II, III i IV grupe sa četiri različita soja *Listeria monocytogenes* (četiri grupe uzoraka-svaka grupa drugi soj) bio je od $6,67 \pm 0,17$ log CFU/g (prva grupa) do $6,82 \pm 0,22$ log CFU/g (treća grupa). Nisu utvrđene statistički značajne razlike između prosečnih vrednosti ukupnog broja bakterija u uzorcima poređenih grupa uzoraka dimljene pastrmke (tabela 5.1).

Tabela 5.1. Ukupan broj bakterija hladno dimljene pastrmke nultog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X_{\min}	X_{\max}	C_v (%)
I, II, III, IV	6,67	0,17	0,07	6,50	6,95	2,49

Ispitivanje vakuumiranih pakovanja uzoraka dimljene pastrmke čuvanim pri temperaturi od 3°C

Četrnaestog dana ispitivanja kod vakuumiranih pakovanja uzoraka dimljene pastrmke čuvanim pri temperaturi od 3°C ukupan broj bakterija izražen kao log CFU/g bio je od $6,64 \pm 0,13$ (IV grupa) do $7,15 \pm 0,06$ (I grupa). Statistički značajno manji ($p \leq 0,01$) ukupan broj bakterija utvrđen je kod uzoraka IV grupe u odnosu na ostale grupe. Statistički značajno veći ukupan broj bakterija ($p \leq 0,01$) utvrđen je kod uzoraka prve grupe u odnosu na treću grupu, kao i u odnosu na drugu grupu, ali sa statističkom

značajnošću od $p \leq 0,05$. Između prosečnog ukupnog broja bakterija druge i treće grupe nije utvrđena statistički značajna razlika.

Posle 28. dana skladištenja, kod vakuumiranih uzoraka dimljene pastrmke skladištenih pri 3°C ukupan broj bakterija izražen kao log CFU/g bio je od $7,02 \pm 0,13$ (prva grupa) do $7,84 \pm 0,09$ (druga grupa). Ukupan broj bakterija bio je kod uzoraka druge grupe statistički značajno veći ($p \leq 0,01$) od ukupnog broja bakterija ostalih ispitivanih grupa.

Na kraju eksperimenta, odnosno 35.dana ispitivanja ukupan broj bakterija kod vakuumiranih uzoraka dimljene pastrmke skladištenih pri 3°C bio je od $6,63 \pm 0,23$ log CFU/g (druga grupa) do $7,13 \pm 0,04$ log CFU/g (prva grupa). Statistički značajno manji ($p \leq 0,01$) ukupan broj bakterija bio je kod uzoraka druge grupe u odnosu na ostale poredene grupe. Između prosečnih vrednosti ukupnog broja bakterija ostalih poređenih grupa (prve, treće, četvrte) nije utvrđena statistički značajna razlika (tabela 5.2).

Tabela 5.2. Ukupan broj bakterija hladno dimljene pastrmke pakovane pakovane u vakuum skladištene pri 3°C (log CFU/g)

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	$7,15^{aAB} \pm 0,06$	$7,02^A \pm 0,13$	$7,13^A \pm 0,04$
II	$6,99^{aC} \pm 0,06$	$7,84^{ABC} \pm 0,09$	$6,63^{ABC} \pm 0,23$
III	$6,85^{AD} \pm 0,09$	$7,08^B \pm 0,06$	$7,11^B \pm 0,02$
IV	$6,64^{BCD} \pm 0,13$	$7,08^C \pm 0,09$	$6,97^C \pm 0,06$

Ispitivanje vakuumiranih pakovanja uzoraka dimljene pastrmke čuvanim pri temperaturi od 8°C

Prilikom ispitivanja uzoraka koji su skladišteni na 8°C, posle 14. dana skladištenja prosečan ukupan broj bakterija izražen kao log CFU/g bio je od 6,92±0,08 (druga grupa) do 7,18±0,01 (prva grupa). Statistički značajne razlike utvrđene su između prosečnih vrednosti ukupnog broja bakterija druge grupe i uzoraka ostalih grupa ($p \leq 0,01$), između prve i treće grupe ($p \leq 0,05$) i treće i četvrte grupe ($p \leq 0,05$).

Dvadeset i osmog dana ispitivanja kod uzoraka dimljene pastrmke ukupan broj bakterija bio je od 6,85±0,07 (prva grupa) do 7,28±0,02 log CFU/g (treća grupa). Statistički značajne razlike utvrđene su između prve i druge grupe uzoraka ($p \leq 0,05$), prve i treće, kao i prve i četvrte grupe uzoraka, odnosno druge i treće grupe ($p \leq 0,01$). Na kraju eksperimenta ukupan broj bakterija izražen kao log CFU/g u uzorcima dimljene vakuumirane pastrmke skladištene pri 8°C bio je od 6,84±0,03 (druga grupa) do 7,26 ± 0.03 (treća grupa). Ukupan broj bakterija u uzorcima dimljene pastrmke druge grupe bio je statistički značajno veći ($p \leq 0,01$) u odnosu na ostale poredene grupe uzoraka. Utvrđena je statistički značajna razlika između ukupnog broja bakterija uzoraka dimljene pastrmke prve i treće grupe ($p \leq 0,01$) i treće i četvrte grupe ($p \leq 0,05$) (tabela 5.3).

Tabela 5.3. Ukupan broj bakterija hladno dimljene pastrmke pakovane pakovane u vakuum skladištene pri 8°C (log CFU/g)

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	7,18 ^{Aa} ± 0.01	6,85 ^{aAB} ± 0.07	7,03 ^{AB} ± 0.12
II	6,92 ^{ABC} ± 0.08	7,03 ^{aC} ± 0.18	6,84 ^{ACD} ± 0.03
III	7,09 ^{aBb} ± 0.05	7,28 ^{AC} ± 0.02	7,26 ^{BCa} ± 0.03
IV	7,17 ^{Cb} ± 0.02	7,17 ^B ± 0.05	7,14 ^{Da} ± 0.03

Ispitivanje uzoraka dimljene pastrmke pakovane u MAP čuvanim pri temperaturi od 3°C

Prosečan ukupan broj bakterija četrnaestog dana kod uzoraka dimljene pastrmke pakovane u MAP a skladištene pri 3°C bio je od 6,36±0,09 log CFU/g (četvrta grupa) do 7,07±0,06 log CFU/g (druga grupa). Između prosečnih vrednosti ukupnog broja bakterija sve četiri ispitivane grupe uzoraka utvrđena je statistički značajna razlika ($p \leq 0,01$).

Posle 28.dana skladištenja uzoraka dimljene pastrmke pakovane u MAP ukupan broj bakterija izražen kao log CFU/g bio je od 6,85±0,07 do 7,28±0,02. Statistički značajna razlika ($p \leq 0,01$) utvrđena je između prosečnog ukupnog broja uzoraka prve i treće grupe, prve i četvrte, kao i između prve i druge grupe, ali sa statističkom značajnošću $p \leq 0,05$. Utvrđena je statistički značajna razlika ($p \leq 0,01$) između prosečnog broja bakterija druge i treće grupe uzoraka.

Na kraju ogleda 35.dana ispitivanja ukupan broj bakterija izražen kao log CFU/g u uzorcima dimljene pastrmke pakovane u MAP i skladištene pri 3°C bio je od 6,63±0,07 (četvrta grupa) do 7,07±0,13 (prva grupa). Prosečan ukupan broj bakterija četvrte grupe uzoraka bio je statistički značajno manji u odnosu na ostale tri grupe. Između prosečnih vrednosti ukupnog broja bakterija prve, druge i treće grupe uzoraka nije utvrđena statistički značajna razlika (tabela 5.4).

Tabela 5.4. Ukupan broj bakterija hladno dimljene pastrmke pakovane pakovane u MAP skladištene pri 3°C (log CFU/g)

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	6,73 ^{ABC} ± 0.07	7,08 ^{Aa} ± 0.15	7,07 ^A ± 0.13
II	7,07 ^{AD} ± 0.06	7,64 ^{ABC} ± 0.15	7,06 ^B ± 0.03
III	6,69 ^{BDE} ± 0.05	6,07 ^{Bb} ± 0.05	6,96 ^C ± 0.05
IV	6,36 ^{CE} ± 0.09	6,86 ^{aCb} ± 0.06	6,63 ^{ABC} ± 0.07

Ispitivanje uzoraka dimljene pastrmke pakovane u MAP čuvanim pri temperaturi od 8°C

Kod uzoraka dimljene pastrmke pakovane u MAP i skladištene pri 8°C 14. dana ukupan broj bakterija izražen kod log CFU/g bio je od 6,86±0,05 (četvrta grupa) do 7,05±0,04 (prva grupa), a razlike između prosečnih vrednosti ukupnog broja bakterija sve četiri grupe bile su statistički značajne ($p \leq 0,01$ i $p \leq 0,05$).

Dvadeset i osmog dana skladištenja kod uzoraka pastrmke pakovanih u MAP i skladištenih pri 8°C ukupan broj bakterija bio je od 6,68±0,46 log CFU/g do 7,20±0,04 log CFU/g (četvrta i prva grupa). Nije utvrđena statistički značajna razlika između ukupnog broja bakterija uzoraka prve i treće grupe, dok je u ostalim slučajevima razlika bila statistički značajna ($p \leq 0,01$, $p \leq 0,05$). Slični rezultati zapaženi su na kraju ispitivanja tj. 35. dana (tabela 5.5).

Tabela 5.5. Ukupan broj bakterija hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 8°C (log CFU/g)

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	7,05 ^{ABC} ± 0.04	7,20 ± 0.04	7,09 ^{Aa} ± 0.12
II	7,37 ^{AD} ± 0.02	6,89 ± 0.05	7,93 ^{ABC} ± 0.01
III	6,93 ^{BDa} ± 0.03	7,18 ± 0.05	7,10 ^{Bb} ± 0.04
IV	6,86 ^{Ca} ± 0.05	6,68 ± 0.46	6,97 ^{aCb} ± 0.05

U prilogu su date posebno tabele sa statističkim proračunima za sve parametre po danima ispitivanja.

V.2. Ispitivanje promene broja bakterija *Listeria monocytogenes* u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanoj atmosferi i skladištene pri temperaturi 3°C, odnosno pri 8°C

U tabeli broj 5.6. date su vrednosti broja *Listeria monocytogenes* u I, II, III i IV grupi sa četiri različita soja *Listeria monocytogenes*.

Tabela 5.6. Broj *L. monocytogenes* hladno dimljene pastrmke nultog dana ispitivanja (logCFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X_{\min}	X_{\max}	C_v (%)
I	6,03 ^{AaB}	0,22	0,09	6,85	7,45	3,08
II	6,55 ^A	0,05	0,02	7,49	7,62	0,69
III	6,38 ^a	0,24	0,09	6,94	7,58	3,31
IV	6,54 ^B	0,09	0,04	7,40	7,65	1,22

Na početku ispitivanja, odnosno nultog dana broj *L. monocytogenes* izražen kao log CFU/g bio je od 6,03±0,22 do 6,55±0,05. Utvrđeno je da je kod prve grupe uzoraka prosečan broj *L. monocytogenes* bio statistički značajno manji ($p < 0,05$, $p < 0,01$) od prosečnog broja ove bakterije u uzorcima druge, treće, odnosno četvrte grupe (tabela 5. 6).

Ispitivanje vakuumiranih pakovanja uzoraka dimljene pastrmke čuvanim pri temperaturi od 3°C

Posle 14 dana skladištenja pri 3°C dimljene pastrmke pakovane u vakuum broj bakterija *L. monocytogenes* u ispitivanim uzorcima bio je od 6,60±1,09 do 7,47±0,08 log CFU/g. Prosečan broj *L. monocytogenes* uzoraka treće grupe bio je statistički značajno veći ($p < 0,01$) od prosečnog broja bakterija uzoraka ostalih grupa (tabela 5.7.). U većini slučajeva poređenja i između ostalih grupa uzoraka dimljene pastrmke pakovane u vakuum i skladištene pri 3°C utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,05$, $p < 0,01$). Dvadeset i osmog dana skladištenja dimljene pastrmke pakovane u vakuum broj *L. monocytogenes* izražen kao log CFU/g bio je statistički značajno

manji ($p < 0,01$) kod uzoraka prve grupe ($6,77 \pm 0,05$) od prosečnog broja *L. monocytogenes* ostalih poređenih grupa. Prosečan broj *L. monocytogenes* kod uzoraka druge i četvrte grupe nije se statistički značajno razlikovao, a bio je $8,01 \pm 0,08$ (druga grupa) i $7,97 \pm 0,10$ (četvrta grupa). Kod ovih grupa uzoraka prosečan broj *L. monocytogenes* bio je statistički značajno veći ($p < 0,01$) od prosečnog broja $7,81 \pm 0,06$ log CFU/g bakterija *L. monocytogenes*, uzoraka treće grupe (tabela 5.7.).

Na kraju ispitivanja, odnosno 35. dana skladištenja uzoraka dimljene pastrmke pakovane u vakuum i skladištene pri 3°C , prosečan broj *L. monocytogenes* ($6,63 \pm 0,06$ log CFU/g) bio je i dalje statistički značajno manji ($p < 0,01$) kod prve grupe uzoraka. Razlika između broja bakterija *L. monocytogenes* ostale tri poređene grupe uzoraka bile su u većini slučajeva statistički značajne ($p < 0,05$, $p < 0,01$).

Tabela 5.7. Broj *L.monocytogenes* hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu skladištene pri 3°C (log CFU/g)

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm \text{Sd}$	$\bar{X} \pm \text{Sd}$	$\bar{X} \pm \text{Sd}$
I	$6,87^{\text{A}} \pm 0,07$	$6,77^{\text{ABC}} \pm 0,05$	$6,63^{\text{ABC}} \pm 0,06$
II	$6,60^{\text{B}} \pm 1,09$	$8,01^{\text{AD}} \pm 0,08$	$7,37^{\text{Aa}} \pm 0,10$
III	$7,18^{\text{AB}} \pm 0,03$	$7,81^{\text{BDE}} \pm 0,06$	$7,45^{\text{BD}} \pm 0,07$
IV	$7,47 \pm 0,08$	$7,97^{\text{CE}} \pm 0,10$	$7,11^{\text{CaD}} \pm 0,22$

Ispitivanje vakuumiranih pakovanja uzoraka dimljene pastrmke čuvanim pri temperaturi od 8°C

Broj bakterija *L. monocytogenes* kod vakuumiranih uzoraka dimljene pastrmke skladištene pri 8°C 14. dana skladištenja bio je od 6,80±0,06 (druga grupa) do 7,42±0,04 log CFU/g (treća grupa) (tabela 11). Statistički značajno manji (p<0,01) broj bakterija *L.monocytogenes* (6.80±0.06 log CFU/g) utvrđen je kod uzoraka prve grupe, dok su se prosečni brojevi bakterija između ostalih poređenih grupa uzoraka u većini slučajeva statistički značajno razlikovali (p<0,01; p<0,05).

Dvadeset i osmog dana skladištenja uzoraka vakuumirane dimljene pastrmke pri 8°C prosečan broj bakterija *L.monocytogenes* bio je od 6,75±0,14 (prva grupa) do 7,56±0,19 log CFU/g (treća grupa) (tabela 5.8.). Nije utvrđena statistički značajna razlika između broja bakterija *L.monocytogenes* uzoraka druge i četvrte grupe, dok je u svim ostalim slučajevima poređenja razlika bila statistički značajna (p<0,01).

35. dana dobijeni su slični rezultati. Broj bakterija *L. monocytogenes* izražen kao log CFU/g bio je od 6,79±0,12 do 7,35±0,14 (tabela 5.8). Nije utvrđena statistički značajna razlika između broja bakterija uzoraka druge i četvrte grupe, dok je u svim ostalim slučajevima poređenja razlika bila statistički značajna (p<0,01, p<0,05).

Tabela 5.8. Broj *L.monocytogenes* hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu skladištene pri 8°C (log CFU/g)

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	6,80 ^{ABC} ± 0.06	6,75 ^{ABC} ± 0.14	6,79 ^{ABC} ± 0.12
II	7,20 ^{AD} ± 0.12	7,18 ^{AD} ± 0.11	7,10 ^{Aa} ± 0.12
III	7,42 ^{BDa} ± 0.04	7,56 ^{BDE} ± 0.19	7,35 ^{Bab} ± 0.14
IV	7,25 ^{Ca} ± 0.10	7,05 ^{CE} ± 0.11	7,10 ^{Cb} ± 0.13

Ispitivanje uzoraka dimljene pastrmke pakovane u MAP čuvanim pri temperaturi od 3°C

Kod uzoraka dimljene pastrmke pakovane MAP atmosferu i skladištene pri 3°C 14.dana je broj bakterija *L. monocytogenes* izražen kao log CFU/g bio od 7,01±0,07 (prva grupa) do 8,88±0,06 (druga grupa) (tabela 5.9.). Između broja bakterija uzoraka druge i treće grupe nije utvrđena statistički značajna razlika, dok je između ostalih prosečnih vrednosti broja bakterija *L.monocytogenes* kod ispitivanih grupa razlika bila statistički značajna (p<0,01).

Dvadeset i osmog dana ispitivanja statistički značajno (p<0,01) manji broj bakterija *L.monocytogenes* utvrđen je kod prve grupe uzoraka u odnosu na ostale ispitivane grupe. Između ostalih poređenih grupa (druge, treće i četvrte) nisu utvrđene statistički značajne razlike u prosečnom broju bakterija (tabela 5.9.).

Poslednjeg dana skladištenja uzoraka prve grupe dimljene pastrmke pakovane u MAP i skladištene pri 3°C (6,97±0,06 log CFU/g) bio je statistički značajno manji (p<0,01) od broja bakterija ostalih grupa uzorka. Utvrđena je i statistički značajna razlika (p<0,05) između broja bakterija uzoraka treće (7,37±0,05 log CFU/g) i četvrte grupe (7,53±0,13 log CFU/g).

Tabela 5.9. Broj *L.monocytogenes* hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 3°C (log CFU/g)

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	7,01 ^{ABC} ± 0.07	7,07 ^{ABC} ± 0.05	6,97 ^{ABC} ± 0.06
II	8,08 ^{AD} ± 0.06	8,11 ^A ± 0.06	7,48 ^A ± 0.06
III	8,07 ^{BE} ± 0.12	8,09 ^B ± 0.07	7,37 ^{Ba} ± 0.05
IV	7,58 ^{CDE} ± 0.04	8,10 ^C ± 0.06	7,53 ^{Ca} ± 0.13

Ispitivanje uzoraka dimljene pastrmke pakovane u MAP čuvanim pri temperaturi od 8°C

Kod uzoraka dimljene pastrmke pakovane u MAP-u 14. dana skladištenja pri 8°C broj bakterija *L.monocytogenes* izražen kao log CFU/g bio je statistički značajno manji ($p < 0,01$) kod uzoraka prve grupe ($6,79 \pm 0,07$) u poređenju sa ostalim grupama uzoraka (tabela 5.10.). Nije utvrđena statistički značajna razlika između broja bakterija *L.monocytogenes* druge ($7,65 \pm 0,06$ log CFU/g) i četvrte grupe uzoraka ($7,60 \pm 0,08$ log CFU/g). U ostalim slučajevima poređenja razlika je bila statistički značajna ($p < 0,01$). Dvadeset i osmog dana skladištenja pri 8°C kod prve grupe uzoraka broj bakterija *L.monocytogenes* ($7,01 \pm 0,04$) izražen kao log CFU/g bio je statistički značajno ($p < 0,01$) manji od broja bakterija ostalih poređenih grupa ($8,07 \pm 0,06$ - četvrta grupa do $9,11 \pm 0,06$ - druga grupa).

Gotovo identični rezultati dobijeni su poslednjeg, 35. dana ispitivanja, s tim što je broj bakterija bio manji (tabela 5.10.).

Tabela 5.10. Broj *L.monocytogenes* hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 8°C (log CFU/g)

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	$6,79^{ABC} \pm 0,07$	$7,01^{ABC} \pm 0,04$	$7,01^{ABC} \pm 0,07$
II	$7,65^{AD} \pm 0,06$	$8,11^A \pm 0,06$	$7,80^A \pm 0,20$
III	$7,47^{BDE} \pm 0,05$	$8,09^B \pm 0,04$	$7,73^B \pm 0,27$
IV	$7,60^{CE} \pm 0,08$	$8,07^C \pm 0,06$	$7,48^C \pm 0,21$

U prilogu su date posebno tabele sa statističkim proračunima za sve parametre po danima ispitivanja.

V.3. Ispitivanje promene broja mlečno-kiselinskih bakterija u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanoj atmosferi i skladištene pri temperaturi 3°C, odnosno pri 8°C

Ukupan broj mlečno-kiselinskih bakterija (MKB) na početku ispitivanja u uzorcima hladno dimljene pastrmke bio je od $1,35 \pm 0,12$ (prva grupa) do $1,42 \pm 0,13$ log CFU/g (treća grupa) i nije se statistički značajno razlikovao.

Ispitivanje uzoraka dimljene pastrmke pakovane u vakuumu čuvanim pri temperaturi od 3°C

Posle 14. dana skladištenja pri 3°C dimljene vakuumirane pastrmke broj MKB izražen kao log CFU/g bio je od $3,13 \pm 0,22$ (prva grupa) do $3,75 \pm 0,10$ (treća grupa). Utvrđeno je da je kod druge grupe uzoraka broj MKB bio statistički značajno manji ($p < 0,01$) od broja MKB ostalih ispitivanih grupa uzoraka. Statistički značajna razlika ($p < 0,01$) utvrđena je i između prve i treće grupe uzoraka, dok u ostalim slučajevima nije bilo statistički značajnih razlika (tabela 5.11.).

Dvadeset i osmog dana skladištenja broj MKB kod uzoraka vakuumirane hladno dimljene pastrmke skladištene pri 3°C izražen kao log CFU/g bio je od $2,72 \pm 0,7$ (druga grupa) do $3,26 \pm 0,21$ (treća grupa). Utvrđeno je da je broj MKB bio statistički značajno veći ($p < 0,01$) u uzorcima treće i četvrte grupe u odnosu na broj MKB u uzorcima prve i druge grupe.

Na kraju skladištenja 35.dana broj MKB ($3,80 \pm 0,14$ log CFU/g) uzoraka druge grupe bio je statistički značajno manji ($p < 0,01$, $p < 0,05$) od broja MKB u uzorcima ostalih ispitivanih grupa.

Tabela 5.11. Broj bakterija mlečne kiseline hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu skladištene pri 3°C (log CFU/g)

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	$3,45^{AB} \pm 0,08$	$2,84^{AB} \pm 0,12$	$4,01^a \pm 0,13$
II	$3,13^{ACD} \pm 0,22$	$2,72^{CD} \pm 0,07$	$3,80^{aAB} \pm 0,14$
III	$3,75^{BC} \pm 0,10$	$3,26^{AC} \pm 0,21$	$4,20^A \pm 0,10$
IV	$3,64^D \pm 0,12$	$3,11^{BD} \pm 0,11$	$4,06^B \pm 0,13$

Ispitivanje uzoraka dimljene pastrmke pakovane u vakuumu čuvanim pri temperaturi od 8°C

Prosečan broj MKB u uzorcima vakuumirane dimljene pastrmke skladištene pri 8°C 14. dana ispitivanja izražen kao log CFU/g bio je od $5,18 \pm 0,07$ (četvrta grupa) do $5,80 \pm 0,08$ (druga grupa). Statistički značajno manji $p < 0,01$ broj MKB utvrđen je kod uzoraka dimljene pastrmke četvrte grupe ($5,18 \pm 0,07$ log CFU/g) u odnosu na ostale ispitivane grupe uzoraka. Nije utvrđena statistički značajna razlika između prosečnog broja MKB uzoraka prve i treće grupe uzoraka dimljene pastrmke, dok je u ostalim slučajevima poređenja razlika bila statistički značajna ($p < 0,01$, $p < 0,05$).

Slični rezultati dobijeni su i posle 28. dana skladištenja pri 8°C vakuumirane dimljene pastrmke. Prosečan broj MKB izražen kao log CFU/g bio je od $5,04 \pm 0,07$ (četvrta grupa) do $6,23 \pm 0,06$ (druga grupa). Statistički značajno manji ($p < 0,01$) broj MKB utvrđen je kod uzoraka dimljene pastrmke četvrte grupe ($5,04 \pm 0,07$ log CFU/g) u odnosu na ostale ispitivane grupe uzoraka. Utvrđena je i statistički značajna razlika ($p < 0,01$) između prosečnog broja MKB uzoraka druge ($6,23 \pm 0,06$ log CFU/g) i treće grupe ($5,63 \pm 0,12$ log CFU/g).

I posle 35. dana skladištenja pri 8°C vakuumirane dimljene pastrmke prosečan broj MKB bio je dalje statistički značajno ($p < 0,01$) manji kod uzoraka četvrte grupe ($6,03 \pm 0,016$ log CFU/g), a najveći kod uzoraka druge grupe ($6,71 \pm 0,14$ log CFU/g) (tabela 5.12.).

Tabela 5.12. Broj bakterija mlečne kiseline hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu skladištene pri 8°C (log CFU/g)

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	$5,49^{AB} \pm 0,19$	$5,94^A \pm 0,44$	$6,31^{AB} \pm 0,09$
II	$5,80^{AaC} \pm 0,08$	$6,23^{BC} \pm 0,06$	$6,71^{ACD} \pm 0,14$
III	$5,55^{aD} \pm 0,19$	$5,63^{BD} \pm 0,12$	$6,33^{CE} \pm 0,12$
IV	$5,18^{BCD} \pm 0,07$	$5,04^{ACD} \pm 0,07$	$6,03^{BDE} \pm 0,16$

Ispitivanje uzoraka dimljene pastrmke pakovane u MAP čuvanim pri temperaturi od 3°C

Ukupan broj MKB u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP i skladištene pri 3°C 14.dana ispitivanja izražen kao log CFU/g bio je od 4,39±0,07 (treća grupa) do 4,63±0,11 (četvrta grupa). Utvrđena je statistički značajna razlika (p<0,01), između uzoraka prve i treće grupe, uzoraka treće i četvrte grupe, kao i između uzoraka druge i četvrte grupe, ali sa statističkom značajnošću od p<0,05 (tabela 5.13.).

Posle 28.dana skladištenja prosečan MKB u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP i skladištene pri 3°C bio je od 4,26±0,13 (prva grupa) do 4,41±0,07 log CFU/g (četvrta grupa). Nije utvrđena statistički značajna razlika između prosečnog broja MKB poređenih grupa uzoraka.

Na kraju ispitivanja, odnosno 35. dana prosečan ukupan broj MKB kod uzoraka hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP izražen kao log CFU/g bio je od 5,06±0,14 (prva grupa) do 5,76±0,17 (treća grupa). Statistički značajna razlika nije utvrđena između broja MKB uzoraka druge i četvrte grupe, dok je u svim ostalim slučajevima poređenja razlika bila statistički značajna (p<0,01) (tabela 5.13.).

Tabela 5.13. Broj bakterija mlečne kiseline hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 3°C (log CFU/g)

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	4,59 ^A ± 0.06	4,26 ± 0.13	5,06 ^{ABC} ± 0.14
II	4,46 ^a ± 0.11	4,36 ± 0.08	5,40 ^{AD} ± 0.14
III	4,39 ^{AB} ± 0.07	4,28 ± 0.09	5,76 ^{BDE} ± 0.17
IV	4,63 ^{aB} ± 0.11	4,41 ± 0.07	5,47 ^{CE} ± 0.09

Ispitivanje uzoraka dimljene pastrmke pakovane u MAP čuvanim pri temperaturi od 8°C

U uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 8°C 14. dana prosečan ukupan broj MKB bio je od 4,89±0,10 (četvrta grupa) do 5,44±0,20 log CFU/g (treća grupa). Statistički značajna razlika (p<0,05) utvrđena je između prosečnog broja MKB uzoraka prve i druge grupe, prve i treće grupe, druge i četvrte grupe, kao i treće i četvrte grupe (tabela 5.14.).

Posle 28. dana skladištenja pri 8°C uzoraka hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP izražen kao log CFU/g bio je od 5,60±0,30 (druga grupa) do 5,88±0,37 (prva grupa). Razlika između prosečnog broja MKB poređenih grupa uzoraka nisu bile statistički značajne.

Na kraju ispitivanja 35. dana kod ove grupe uzoraka prosečan ukupan broj MKB bio je od 6,48±0,20 (četvrta grupa) do 6,80±0,10 log CFU/g (treća grupa). Razlika između prosečnih brojeva MKB poređenih grupa uzoraka nisu bile statistički značajne (tabela 5.14.).

Tabela 5.14. Broj bakterija mlečne kiseline hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 8°C (log CFU/g)

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	5,04 ^{AB} ± 0.10	5,88± 0.37	6,60± 0.30
II	5,37 ^{AC} ± 0.13	5,60± 0.30	6,56± 0.33
III	5,44 ^{BD} ± 0.20	5,69± 0.11	6,80± 0.10
IV	4,99 ^{CD} ± 0.10	5,78± 0.10	6,48± 0.20

U prilogu su date posebno tabele sa statističkim proračunima za sve parametre po danima ispitivanja.

V. 4. Ispitivanje prisustva *Salmonella spp.*, koagulaza pozitivnih stafilocoka, i sulfitoredujućih klostridija, izolacija, identifikacija i određivanje broja bakterija u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanoj atmosferi i skladištene pri temperaturi 3°C, odnosno pri 8°C

Nultog, kao i 14., 28. i 35. dana ispitivanja u uzorcima (po šest u svakom terminu i iz svake grupe) hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum, odnosno MAP i skladištene pri temperaturama 3°C, odnosno 8°C nije utvrđeno prisustvo *Salmonella spp.*, koagulaza pozitivnih stafilocoka, kao ni prisustvo sulfitoredujućih klostridija.

V.5. Ispitivanje osnovnog hemijskog sastava u uzorcima hladno dimljene pastrmke

Ispitivanjem osnovnog hemijskog sastava utvrđeno je da hladno dimljena pastrmka sadrži (tabela 5.15.) 68,82±1,36% vode, 21,10±0,09% proteina, 6,03±0,54% masti, 3,62±0,06% pepela, a da je sadržaj soli 2,26±0,06%.

Tabela 5.15. Hemijski sastav hladno dimljene pastrmke

Soj	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X_{\min}	X_{\max}	C_v (%)
Proteini	21,10	0,09	0,039	20,94	21,21	0,45
Mast	6,03	0,54	0,221	5,53	6,57	8,97
Voda	68,82	1,36	0,554	66,20	69,77	1,97
Pepeo	3,62	0,06	0,024	3,54	3,70	1,63
NaCl	2,61	0,06	0,026	2,53	2,70	2,41

Iz dobijenih vrednosti hemijskog sastava možemo sada da izračunamo i odredimo vrednost sadržaja soli u vodenoj fazi (SVF) – koji se izračunava na osnovu ukupnog sadržaja soli u mesu ribe i sadržaja vode, na osnovu formule:

$$SVF = \frac{\% \text{ soli} \times 100}{\% \text{ soli} + \% \text{ vode}}$$

Vrednost SVF naših uzoraka iznosi 3.18%.

V.6. Određivanje aktivnosti vode (a_w) i ispitivanje pH vrednosti hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanoj atmosferi i skladištene pri temperaturi 3°C, odnosno pri 8°C

Određivanje aktivnosti vode a_w izvršeno je na osnovu sadržaja soli u vodenoj fazi, a prema formuli (Gimenéz i Dalgaard, 2004.):

$$a_w = 1 - 0.0052471 \times \text{SVF} - 0.00012206 \times \text{SVF}^2$$

Rezultati pH i a_w vrednosti su dati u sledećoj tabeli (5.16.).

Tabela 5.16. Rezultati pH i a_w vrednosti

parametar	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X_{\min}	X_{\max}	C_v (%)
pH	6,20	0,01	0,004	6,18	6,21	0,17
a_w	0.980	0.001	0.0001	0.979	0.981	0.23

Utvrđeno je da se a_w vrednost u uzorcima prve, druge, treće i četvrte grupe ($0,981 \pm 0,001$; $0,980 \pm 0,001$; $0,979 \pm 0,002$; $0,979 \pm 0,002$) nije međusobno statistički značajno razlikovala.

Tabela 5.17. Rezultati a_w vrednosti

a_w	\bar{X}	Sd
I grupa	0,981	0,001
II grupa	0.980	0.001
III grupa	0,979	0,002
IV grupa	0,979	0,002

Na početku ispitivanja pH vrednost ispitivanih uzoraka hladno dimljene pastrmke bila je od $6,19 \pm 0,02$ do $6,21 \pm 0,01$. Na početku ispitivanja nisu utvrđene statistički značajne razlike između pH vrednosti ispitivanih uzoraka.

Ispitivanje uzoraka dimljene pastrmke pakovane u vakuumu čuvanim pri temperaturi od 3°C

U uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i skladištene pri 3°C, 14. dana ispitivanja pH vrednosti bile su od 6,21±0,02 do 6,22±0,02 i nisu se statistički značajno razlikovale.

Posle 28 dana skladištenja pH vrednosti u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum skladištene pri 3°C bile su od 6,23±0,03 (prva grupa) do 6,16±0,01 (druga grupa). Utvrđeno je da je pH vrednost uzoraka druge grupe bila statistički značajno veća (p<0,01) u odnosu na ostale poređene grupe.

Na kraju ispitivanja kod ovih grupa uzoraka pH vrednost bila je od 6,18±0,01 (četvrta grupa) do 6,25±0,05 (prva grupa).

Utvrđena je statistički značajna razlika (p<0,01) između pH vrednost uzoraka prve i treće grupe i uzoraka prve i četvrte grupe, kao i između uzoraka druge i treće grupe ali sa statističkom značajnošću od p<0,05.

Tabela 5.18. Vrednost pH hladno dimljene pastrmke u vakuumu skladištene pri 3°C

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	6,22 ± 0.02	6,23 ^A ± 0.03	6,25 ^{AB} ± 0.05
II	6,22 ± 0.02	6,16 ^{ABC} ± 0.01	6,23 ^a ± 0.03
III	6,21 ± 0.01	6,22 ^B ± 0.02	6,18 ^{Aa} ± 0.01
IV	6,21 ± 0.02	6,21 ^C ± 0.03	6,18 ^B ± 0.01

Ispitivanje uzoraka dimljene pastrmke pakovane u vakuumu čuvanim pri temperaturi od 8°C

U uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i skladištenih pri 8°C, 14. dana ispitivanja, pH vrednost bila je od 6,22±0,01 (treća grupa) do 6,24±0,04 (prva grupa). Nisu utvrđene statistički značajne razlike između navedenih prosečnih vrednosti pH.

Posle 28. dana skladištenja pH vrednost ovih grupa uzoraka bila je od 6,23±0,01 (prva grupa) do 6,27±0,06 (druga grupa), a posle 35. dana od 6,23±0,02 (treća grupa) do 6,28±0,07 (prva grupa). Razlika između poređenih pH vrednosti nisu bile statistički značajne ni posle 28. kao ni posle 35. dana.

Tabela 5.19. Vrednost pH hladno dimljene pastrmke u vakuumu skladištene pri 8°C

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	6,24 ± 0.04	6,23 ± 0.01	6,28 ± 0.07
II	6,23 ± 0.02	6,27 ± 0.06	6,24 ± 0.01
III	6,22 ± 0.01	6,26 ± 0.01	6,23 ± 0.02
IV	6,23 ± 0.02	6,26 ± 0.02	6,25 ± 0.01

Ispitivanje uzoraka dimljene pastrmke pakovane u MAP čuvanim pri temperaturi od 3°C

U uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP a skladištene pri 3°C 14. dana ispitivanja pH vrednosti od 6,21±0,01 (treća grupa) do 6,24±0,01 (prva grupa). Statistički značajne razlike nisu utvrđene između pH vrednosti prve i druge grupe kao i treće i četvrte grupe, dok su u ostalim slučajevima poređenja razlike bile statistički značajne ($p < 0,01$). Posle 28. dana skladištenja pH vrednost kod ovih grupa uzoraka bila je od 6,25±0,01 (treća grupa) do 6,36±0,06 (druga grupa). Utvrđena je statistički značajna razlika ($p < 0,01$) pH vrednosti između prve i druge grupe i druge i treće grupe, kao i između treće i četvrte grupe ali sa statističkom značajnošću od $p < 0,05$.

Na kraju ispitivanja, odnosno 35. dana kod uzoraka hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP i skladištene pri 3°C, pH vrednosti bile su od 6,23±0,01 (treća grupa) do 6,28±0,03 (prva grupa). Utvrđene su statistički značajne razlike (p<0,01) između pH vrednosti prve i treće grupe uzoraka, i treće i četvrte grupe uzoraka, kao i između prve i druge grupe uzoraka ali sa statističkom značajnošću od p<0,05.

Tabela 5.20. Vrednost pH hladno dimljene pastrmke u MAP skladištene pri 3°C

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	6,24 ^A ± 0.01	6,26 ^A ± 0.02	6,28 ^{aA} ± 0.03
II	6,24 ^B ± 0.01	6,36 ^{AB} ± 0.06	6,25 ^a ± 0.01
III	6,21 ^A ± 0.01	6,25 ^{Ba} ± 0.01	6,23 ^{AB} ± 0.01
IV	6,22 ^B ± 0.02	6,31 ^a ± 0.01	6,28 ^B ± 0.01

Ispitivanje uzoraka dimljene pastrmke pakovane u MAP čuvanim pri temperaturi od 8°C

Kod uzoraka hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP i skladištene pri 8°C, pH vrednosti bile su od 6,22±0,02 (četvrta grupa) do 6,25±0,03 (prva grupa). Prosečna pH vrednost uzoraka prve grupe bila je statistički značajno veća (p<0,05) od prosečnih vrednosti pH druge, odnosno četvrte grupe. U ostalim slučajevima poređenja razlika između prosečnih pH vrednosti poređenih grupa uzoraka nisu bile statistički značajne. Posle 28. dana skladištenja kod ove grupe uzoraka pH vrednosti su bile od 6,20±0,03 (druga grupa) do 6,27±0,01 (četvrta grupa). Između ove dve grupe uzoraka razlika pH vrednosti je bila statistički značajna (p<0,05). U ostalim slučajevima između poređenih pH vrednosti grupa uzoraka nije bila utvrđena statistički značajna razlika.

Na kraju ispitivanja pH vrednosti uzoraka hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP i skladištene pri 8°C, bile su od 6,20±0,01 (treća grupa) do 6,46±0,17 (druga grupa). Utvrđena je statistički značajna razlika (p<0,01) između pH vrednosti druge i

treće grupe i druge i četvrte grupe, kao i između prve i druge grupe ali sa statističkom značajnošću od $p < 0,05$.

Tabela 5.21. Vrednost pH hladno dimljene pastrmke u MAP skladištene pri 8°C

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	$6,25^{ab} \pm 0.03$	$6,26 \pm 0.07$	$6,30^a \pm 0.06$
II	$6,22^a \pm 0.01$	$6,20^a \pm 0.03$	$6,46^{aAB} \pm 0.17$
III	$6,23 \pm 0.01$	$6,22 \pm 0.01$	$6,20^A \pm 0.01$
IV	$6,22^b \pm 0.02$	$6,27^a \pm 0.01$	$6,22^B \pm 0.01$

U prilogu su date posebno tabele sa statističkim proračunima za sve parametre po danima ispitivanja.

V.7. Rezultati senzorne ocene uzoraka hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanoj atmosferi i skladištene pri temperaturi 3°C, odnosno pri 8°C

Senzornim ispitivanjem ocenjivani su uzorci hladno dimljenih fileta pakovanih u vakuum pakovanju i u modifikovanoj atmosferi, čuvanih u adekvatnoj i neadekvatnoj sredini (temperature frižidera 3C i 8C), tokom nultog, 14., 28. i 35. dana ciklusa ispitivanja.

Nultog dana ispitivanja nisu utvrđene razlike između prosečnih senzornih ocena mirisa hladno dimljene ribe.

U tabeli 5.22. prikazana je statistička značajnost razlike između prosečnih senzornih ocena mirisa hladno dimljene ribe u toku skladištenja pri različitim temperaturama. Utvrđene su statistički značajne razlike ($p \leq 0,01$, $p \leq 0,05$) kod uzoraka vakuumiranih i pakovanih u MAP i skladištenih pri temperaturama 3 °C i 8 °C.

Tabela 5.22. Statistička značajnost rezlike između prosečnih senzornih ocena mirisa hladno dimljene pastrmke u toku skladištenja pri različitim temperaturama

Dani skladištenja	Vakuum		MAP	
	3 °C	8 °C	3 °C	8 °C
0	4,93±0,07	4,95±0,06	4,96±0,04	4,95±0,07
14	4,27A±0,13	3,90A±0,14	4,10A±0,15	4,45A±0,10
28	3,45B±0,09	3,11B±0,10	3,39a±0,12	3,05a±0,21
35	3,20C±0,17	2,61C±0,11	3,05B±0,12	2,60B±0,25

Napomena: ista slova A-A, B-B... $p \leq 0,01$: a-a $p \leq 0,05$

Senzorne ocene mirisa hladno dimljene pastrmke na početku ispitivanja bile su od 4,93±0,07 (druga grupa) do 4,96±0,04 (četvrta grupa) i nisu se međusobno statistički značajno razlikovale.

Posle 14 dana skladištenja senzorne ocene mirisa kretale su se u zavisnosti od načina pakovanja i temperatura skladištenja od 3,90±0,25 (MAP, 8°C, četvrta grupa) do 4,27±0,13 (vakuum, 3°C, prva grupa).

Dvadeset i osmog dana skladištenja senzorne ocene mirisa bile su od $3,00 \pm 0,21$ (MAP, 8°C , četvrta grupa) do $3,45 \pm 0,14$ (vakuum, 3°C , prva grupa), a 35. dana od $2,60 \pm 0,25$ (MAP, 8°C , četvrta grupa) do $3,20 \pm 0,17$ (vakuum, 3°C , prva grupa).

U tabeli 5.23. prikazana je statistička značajnost razlike između prosečnih senzornih ocena mirisa hladno dimljene ribe u toku skladištenja u različitim pakovanjima.

Tabela 5.23. Statistička značajnost razlike između prosečnih senzornih ocena mirisa hladno dimljene ribe u toku skladištenja u različitim pakovanjima

Dani skladištenja	3°C		8°C	
	Vakuum	MAP	Vakuum	MAP
0	$4,93 \pm 0,07$	$4,96 \pm 0,04$	$4,95 \pm 0,06$	$4,95 \pm 0,07$
14	$4,27 \pm 0,13$	$4,10 \pm 0,15$	$3,90 \pm 0,14$	$4,45 \pm 0,10$
28	$3,45 \pm 0,09$	$3,39 \pm 0,12$	$3,11 \pm 0,10$	$3,05 \pm 0,21$
35	$3,20 \pm 0,17$	$3,05 \pm 0,12$	$2,61 \pm 0,11$	$2,60 \pm 0,25$

Samo pri temperaturi od 8°C 14. dana skladištenja utvrđena je statistički značajna razlika ($p \leq 0,01$) između prosečne ocene uzoraka pakovanih u vakuum ($3,90 \pm 0,14$) i uzoraka pakovanih u MAP ($4,45 \pm 0,10$).

Prosečne senzorne ocene mirisa uzoraka hladno dimljene pastrmke različitih pakovanja (vakuum, MAP), pri različitim temperaturama (3°C i 8°C) bile su u većini slučajeva statistički značajno različite ($p < 0,01$; $p < 0,05$) u istim danima poređenja (0., 14., 28. i 35. dana).

VI - Diskusija

V.1. Ispitivanje promene ukupnog broja bakterija u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanoj atmosferi i skladištene pri temperaturi 3°C, odnosno pri 8°C

U velikom broju zemalja EU ne postoje zakonske regulative koje ograničavaju dozvoljen broj aerobnih kolonija (ukupan broj bakterija) u vakuum pakovanim proizvodima od dimljene ribe. Vrednosti ukupnog broja bakterija mogu da dostignu i do $10^7 - 10^8$ log CFU/g uzorka. Međutim, te vrednosti ne moraju obavezno da budu pokazatelj kvara, tako da parametar ukupnog broja bakterija nije ni adekvatan pokazatelj kvaliteta i održivosti hladno dimljenih proizvoda od ribe (*Truelstrop i sar., 1995*).

Vrednosti ukupnog broja bakterija u vakuum pakovanim hladno dimljenim proizvodima od ribe ne ukazuju na specifične mikroorganizme kvara, kao ni na patogene mikroorganizme, smatra se da ovaj parametar nije u korelaciji sa pojavom prvih znakova kvara mesa.

Parametri koji su vezani za proces proizvodnje, uslove čuvanja i pakovanja namirnica su direktno vezani za promenu broja određenih grupa mikroorganizama, a samim tim i za stvaranje specifične mikroflore u određenim proizvodima hladno dimljene ribe (*Siverstvik i sar., 2002*).

U ovom ispitivanju, cilj nam je bio da utvrdimo način na koji se menjaju vrednosti ukupnog broja bakterija u hladno dimljenim proizvodima od ribe, i to, skladištenim u adekvatnim i neadekvatnim uslovima temperature (3°C i 8°C), u vakuum i pakovanjima sa modifikovanom atmosferom, kao i da utvrdimo da li postoji korelacija između promene vrednosti ukupnog broja bakterija sa pojavom kvara datih uzoraka.

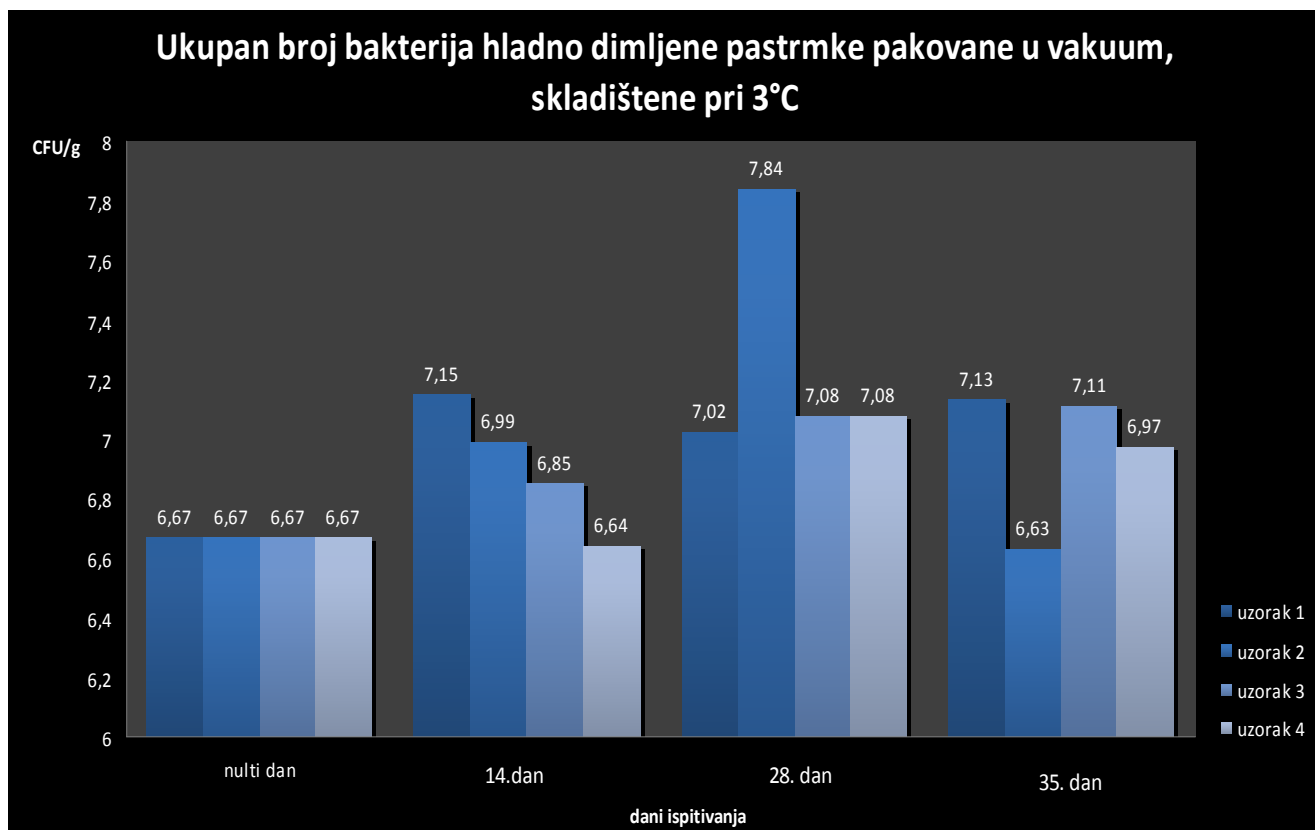
Na početku ispitivanja vrednosti ukupnog broja bakterija u kontaminiranim uzorcima sa četiri različita soja *Listeria monocytogenes* bio je od $6,67 \pm 0,17$ log cfu/g do $6,82 \pm 0,22$

log cfu/g. Nisu utvrđene statistički značajne razlike između prosečnih vrednosti ukupnog broja bakterija u uzorcima poređenih grupa uzoraka dimljene pastrmke.

Ispitivanje vakuumiranih pakovanja uzoraka dimljene pastrmke čuvanim pri temperaturi od 3°C

Kod uzoraka dimljene pastrmke pakovanih u vakuum prosečan ukupan broj bakterija rastao je od nultog do 14.dana, zatim se do 28.dana smanjio da bi 35.dana bio približan nivou od 14.dana. Ukupan broj bakterija kod uzoraka druge grupe rastao je do 28.dana, a zatim se smanjio da bi 35.dana bio manji nego nultog dana. Treću grupu uzoraka karakteriše slabiji porast ukupnog broja bakterija u toku ispitivanja. Kod uzoraka četvrte grupe ukupan broj bakterija rastao neznatno od nultog do 14.dana, a zatim znatnije do 28.dana da bi se zatim smanjio 35.dana (grafikon 6.1.).

Grafikon 6.1. Ukupan broj bakterija u uzorcima koji su pakovani u vakuum i skladišteni pri 3°C



Na kraju eksperimenta, odnosno 35.dana ispitivanja ukupan broj bakterija kod vakuumiranih uzoraka dimljene pastrmke skladištenih pri 3°C bio je od $6,63 \pm 0,23$ log CFU/g do $7,13 \pm 0,04$ log CFU/g. Statistički značajno manji ($p \leq 0,01$) ukupan broj bakterija bio je kod uzoraka druge grupe u odnosu na ostale poređene grupe. Između prosečnih vrednosti ukupnog broja bakterija ostalih poređenih grupa (prve, treće, četvrte) nije utvrđena statistički značajna razlika.

Rezultati istraživanja ukupnog broja bakterija u vakuum pakovanoj hladno dimljenoj pastrmki kretao se od 3.5 log CFU/g na početku skladištenja, a nakon 35. dana je dostigao vrednosti od oko 7 log CFU/g (**Leroi i sar., 1998**), što je slično rezultatima u našem ispitivanju.

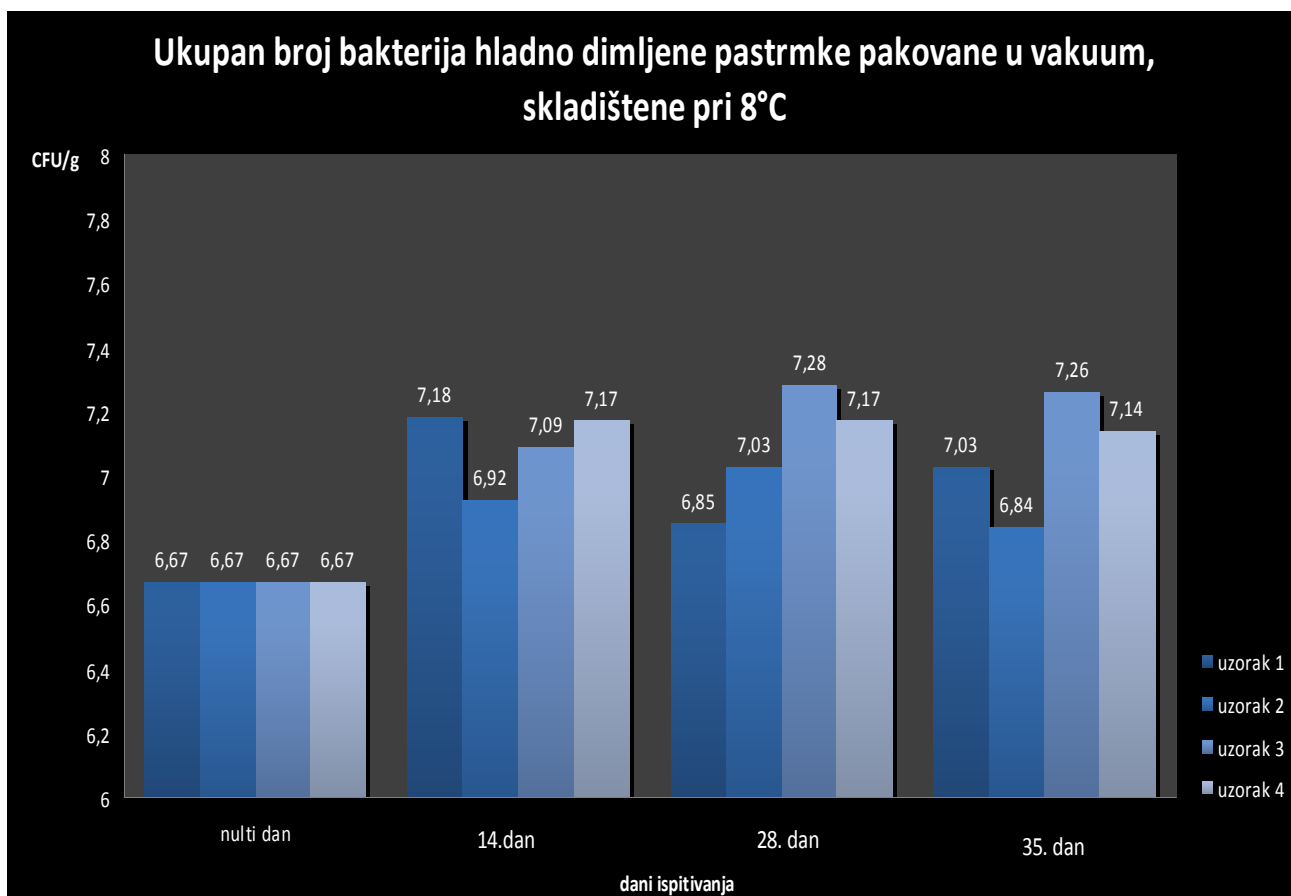
Dondero i sar. (2004) su u toku ispitivanja promene ukupnog broja bakterija u vakuum pakovanim hladno dimljenim uzorcima lososa čuvanim na 4°C dobili vrednosti za dati parametar koji je na kraju skladištenja od 40 dana iznosio oko 8.5 log CFU/g, što je za 1 log više od broja bakterija, utvrđenog u našim ispitivanjima.

Ispitivanje vakuumiranih pakovanja uzoraka dimljene pastrmke čuvanim pri temperaturi od 8°C

U toku skladištenja uzoraka dimljene pastrmke prve grupe pakovane u vakuum i skladištenih pri 8°C ukupan broj bakterija rastao je do 14.dana zatim se smanjio do 28. dana da bi se do 35. dana zadržao na istom nivou. Kod uzoraka druge grupe ukupan broj bakterija je rastao do 28. dana, a zatim se smanjio do 35. dana, a kod uzoraka treće i četvrte grupe značajni rast je bio do 14.dana, a zatim se broj bakterija nije značajnije povećavao (grafikon 6.2.).

Na kraju eksperimenta ukupan broj bakterija izražen kao log cfu/g u uzorcima dimljene vakuumirane pastrmke skladištene pri 8°C bio je od $6,84 \pm 0,03$ do $7,26 \pm 0,03$. Ukupan broj bakterija u uzorcima dimljene pastrmke druge grupe bio je statistički značajno veći ($p \leq 0,01$) u odnosu na ostale poređene grupe uzoraka. Utvrđena je statistički značajna razlika između ukupnog broja bakterija uzoraka dimljene pastrmke prve i treće grupe ($p \leq 0,01$) i treće i četvrte grupe ($p \leq 0,05$).

Grafikon 6.2. Ukupan broj bakterija u uzorcima koji su pakovani u vakuum i skladišteni pri 8°C



Prosečan ukupan broj bakterija u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum bio je tokom ispitivanja manji u uzorcima koji su skladišteni pri nižim temperaturama.

Prema **Anon (1998a)** ukupan broj bakterija u ribi ne bi smeo da prelazi 7 log CFU/g. Ukupan broj bakterija u ovom ispitivanju je dostigao graničnu vrednost 35.dana ispitivanja kod uzoraka pakovanih na temperaturi 3°C, dok je kod uzoraka pakovanih u neadekvatnim uslovima, odnosno pri 8°C ta vrednost premašena već 14. - 28.dana skladištenja.

Olafsdottir i sar. (2005) su utvrdili da se u momentu kvara, vrednost ukupnog broja bakterija hladno dimljenih proizvoda od ribe pakovanih u vakuumu kreće između 10^7 i 10^8 CFU/g. Isti naučnici su utvrdili dobru korelaciju između senzornih ocena prihvatljivosti i ukupnog broja bakterija, a slične rezultate su dobili i **Dondero i sar. (2004)** i **Haugen i sar. (2006)**.

Održivost proizvoda zavisi od:

- inicijalne kontaminacije
- uslova proizvodnje
- načina rukovanja sa proizvodom nakon proizvodnog procesa
- temperature skladištenja
- načina pakovanja

Zaustavljanje rasta bakterija zavisi od:

- sadržaja soli u vodenoj fazi proizvoda
- temperature
- vlažnosti
- gustine dima
- trajanja dimljenja
- koncentracije aktivnih materija u dimu
- temperature čuvanja
- načina pakovanja gotovog proizvoda (**Caglak i sar., 2008; Stamatis i Arkoudelos, 2007, Siverstvik i sar., 2002**).

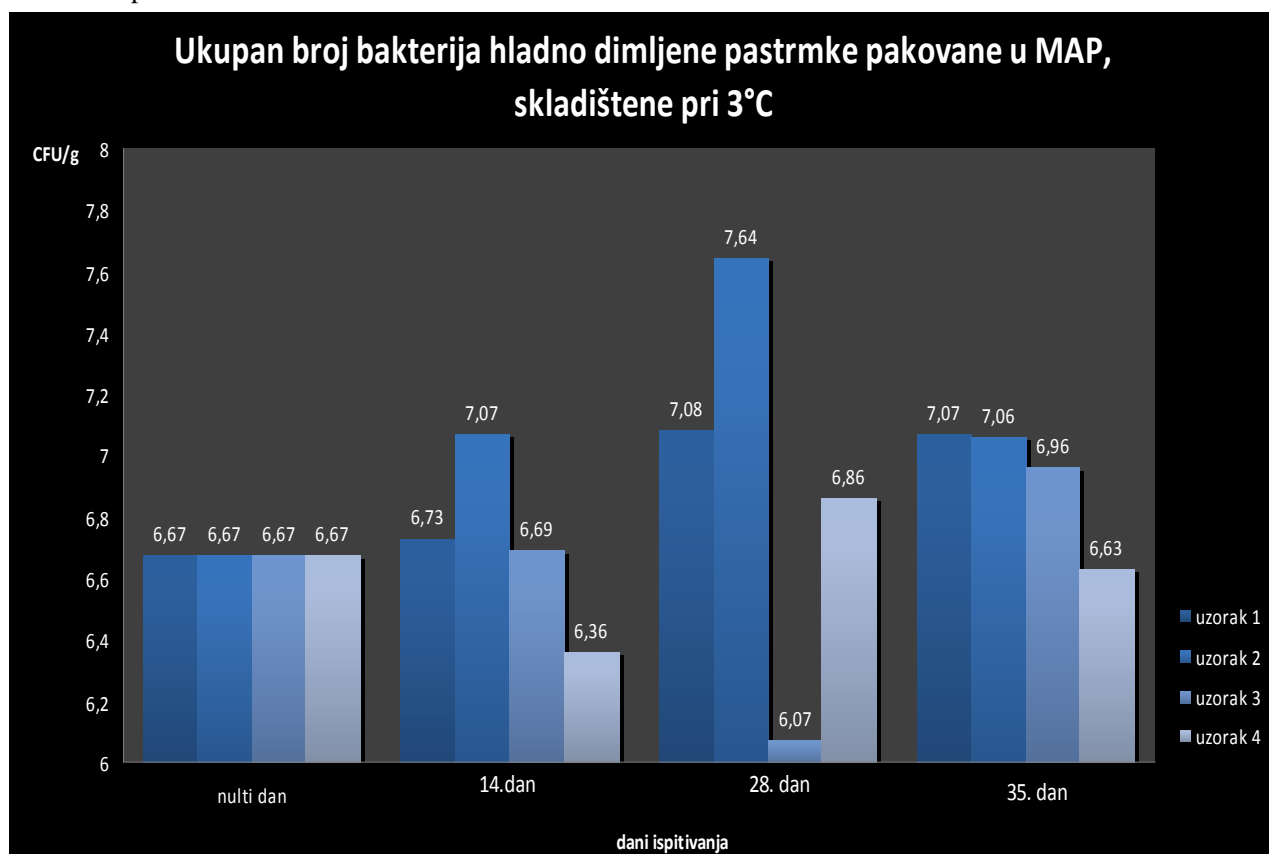
Kada se hladno dimljena riba vakuumira, produžava se održivost ovog proizvoda, na period od mesec dana pri temperaturi čuvanja od $+4^{\circ}\text{C}$. Ipak, vremenski period održivosti gotovog proizvoda je teško odrediti, i on zavisi od različitih proizvođača, koji sami određuju rok upotrebe proizvoda. Održivost dimljene ribe varira od jedne do šest nedelja (**Ibrahim i sar., 2008**), od dve nedelje do dva meseca (**Olafsdottir i sar., 2005**), od tri do šest nedelja pri temperaturi čuvanja od $+5^{\circ}\text{C}$ (**Ward, 2001**). Tako na francuskom tržištu, vakuumirana, hladno dimljena riba ima održivost 21-30 dana, a karakteriše je nizak sadržaj soli (4-5% u vodenoj fazi) i nizak sadržaj fenola (ispod 0.05ppm). U Nemačkoj,

Danskoj i Velikoj Britaniji hladno dimljena riba ima održivost 14 dana, a u Italiji 60 dana, što zavisi od primenjenog režima proizvodnje (*Leroi i sar., 2000; Cardinal i sar., 2004*). Na našem tržištu hladno dimljena riba ima održivost od 21 do 25 dana.

Ispitivanje uzoraka dimljene pastrmke pakovane u MAP čuvanim pri temperaturi od 3°C

Ukupan broj bakterija kod uzoraka prve grupe dimljene pastrmke skladištene pri 3°C a pakovanih u MAP rastao je od nultog dana do 28.dana, a nije se menjao do 35.dana. Kod uzoraka druge grupe ukupan broj bakterija rastao je do 28.dana, a znatno se smanjio 35.dana ispitivanja. Slični rezultati dobijeni su i za treću grupu uzoraka. Četvrtu grupu uzoraka karakteriše povećanje ukupnog broja bakterija do 28.dana i smanjenje do 35.dana.

Grafikon 6.3. Ukupan broj bakterija u uzorcima koji su pakovani u modifikovanoj atmosferi i skladišteni pri 3°C



Na kraju ogleada 35.dana ispitivanja ukupan broj bakterija izražen kao log CFU/g u uzorcima dimljene pastrmke pakovane u MAP i skladištene pri 3°C bio je od 6,63±0,07 do 7,07±0,13 log CFU/g. Prosečan ukupan broj bakterija četvrte grupe uzoraka bio je statistički značajno manji u odnosu na ostale tri grupe. Između prosečnih vrednosti ukupnog broja bakterija prve, druge i treće grupe uzoraka nije utvrđena statistički značajna razlika.

Ibrahim i sar. (2008) su utvrdili da je između vrednosti ukupnog broja bakterija dimljenog cipala pakovanog u vakuumu i smeši gasova (60% CO₂, 35% N₂, 5% O₂) postojala razlika, u smislu da je taj broj bio viši kod vakuum pakovanih proizvoda. Slične rezultate su dobili i **Bugueño i sar. (2003)**.

Sa druge strane, **Muratore i Licciardello (2005)** u svojim ispitivanjima dimljene sabljjarke dobili su drugačije rezultate. Ovi naučnici su pratili promene ukupnog broja bakterija u hladno dimljenoj sabljarki pakovanoj u vakuumu i smeši gasova (5% O₂, 45% CO₂, 50% N₂) i skladištenoj na 4°C. Ustanovili su da su proizvodi pakovani u vakuumu bili održljiviji (42 dana) od istih pakovanih u MAP-u (12 dana). Kao parametar održivosti za procenu granice prihvatljivosti, bazirali su svoje ocene na ukupnoj prihvatljivosti proizvoda. U momentu isključivanja uzoraka dimljene sabljjarke pakovane u MAP-u (12.dan) vrednosti ukupnog broja bakterija bile 5.6 log CFU/g, a u trenutku isključivanja uzoraka pakovanih u vakuumu (42.dan) vrednosti su bile 6.9 log CFU/g. Ovi podaci upućuju na zaključak da se ukupan broj bakterija nije pokazao kao dobar indikator pojave kvara, kao i da razlog nastanka kvara ne moraju biti uvek mikroorganizmi, već i autolitička aktivnost enzima u mesu ribe (**Özden i Erkan, 2006; Siverstvik i sar., 2002**).

Lyhs i sar. (2004) su zapazili u svojim istraživanjima sveže pastrmke pakovane u smeši gasova da ukupan broj bakterija nije dobar pokazatelj kvaliteta pakovane ribe u smeši gasova, s obzirom da u momentu pojave prvih znakova kvara, ukupan broj bakterija u ribi nije prelazio 10⁷ log CFU/g.

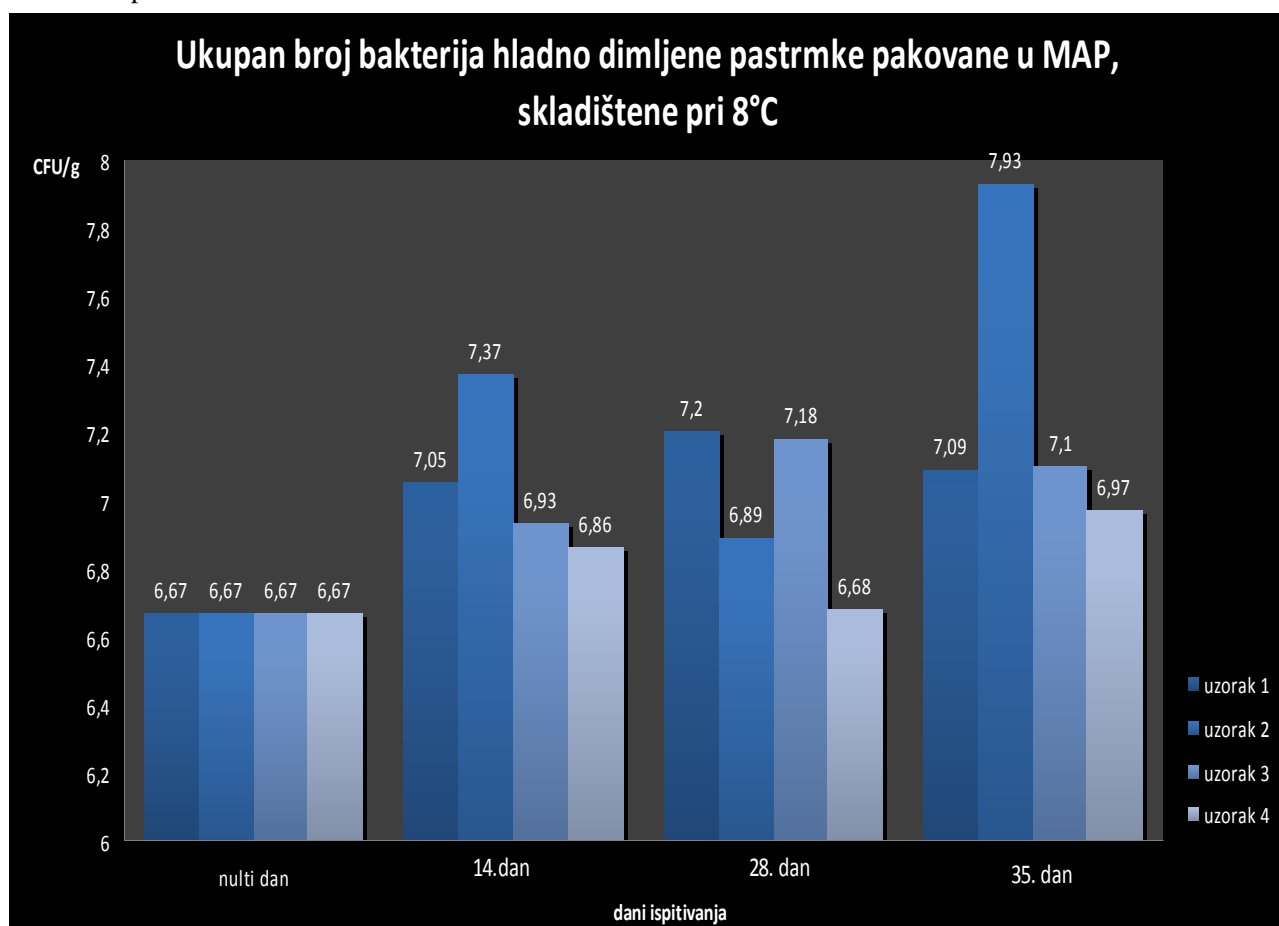
U našem ispitivanju nije utvrđena statistički značajna razlika u vrednostima ukupnog broja bakterija na kraju skladištenja (35.dana) između uzoraka hladno dimljene pastrmke

pakovane u vakuumu ($6,63 \pm 0,23$ do $7,13 \pm 0,04$ log CFU/g) i u smeši gasova ($6,63 \pm 0,07$ do $7,07 \pm 0,13$ log CFU/g) i skladištene u adekvatnim uslovima, odnosno pri 3°C.

Ispitivanje uzoraka dimljene pastrmke pakovane u MAP čuvanim pri temperaturi od 8°C

Kod uzoraka prve grupe dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 8°C ukupan broj bakterija je rastao od nultog do 28.dana da bi smanjio 35.dana. Slični rezultati dobijeni su i za uzorke treće i četvrte grupe. Kod druge grupe uzoraka ukupan broj bakterija je rastao od nultog do 14.dana, zatim se smanjo 28.dana i zadržao na istom nivou do 35.dana.

Grafikon 6.4. Ukupan broj bakterija u uzorcima koji su pakovani u modifikovanoj atmosferi i skladišteni pri 3°C



Dvadeset osmog dana skladištenja kod uzoraka pastrmke pakovanih u MAP i skladištenih pri 8°C ukupan broj bakterija bio je od $6,68 \pm 0,46$ log CFU/g do $7,20 \pm 0,04$ log CFU/g. Nije utvrđena statistički značajna razlika između ukupnog broja bakterija uzoraka prve i treće grupe, dok je u ostalim slučajevima razlika bila statistički značajna ($p \leq 0,01$, $p \leq 0,05$). Slični rezultati zapaženi su na kraju ispitivanja tj. 35. dana skladištenja, kada su vrednosti ukupnog broja bakterija bile od $6,97 \pm 0,05$ do $7,93 \pm 0,01$ log CFU/g.

U ovom ispitivanju je ustanovljeno da je prosečan ukupan broj bakterija u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum, odnosno u modifikovanoj atmosferi bio je tokom ispitivanja manji u uzorcima koji su skladišteni pri nižim temperaturama (3°C). Način pakovanja (vakuum, modifikovana atmosfera) i skladištenje pri istim temperaturnim uslovima (3°C ili 8°C) u većini slučajeva ne utiče značajno na razlike u ukupnom broju aerobnih mezofilnih bakterija.

Papkovsky (2006) je došao do zaključka zašto su proizvodi pakovani u modifikovanoj atmosferi imali kraću održivost u odnosu na one pakovane u vakuumu. Prema ovom naučniku, gasovi u modifikovanoj atmosferi se tokom skladištenja menjaju, i to tako što se količina CO₂ smanjivala, a količina kiseonika povećavala, čime je pospešen rast mikroorganizama pakovanim u smeši gasova u odnosu na one pakovane u vakuumu. Papkovsky tvrdi da je hrana pakovana u modifikovanoj atmosferi dinamičan sistem u kojem se stalno menja sastav gasova, uz konstantnu difuziju gasova iz pakovanja.

Özogul i sar. (2004) su utvrdili slabu korelaciju između senzorne prihvatljivosti uzoraka sveže sardine pakovane u smeši gasova, vakuumu i vazduhu, i ukupnog broja bakterija, s obzirom da su vrednosti ukupnog broja bakterija dostigle svoju maskimalnu vrednost, a senzorno su uzorci bili još uvek prihvatljivi. Slične rezultate dobili su i **Lyhs i sar. (2007)**.

V.2. Ispitivanje promene broja bakterija *Listeria monocytogenes* u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanoj atmosferi i skladištene pri temperaturi 3°C, odnosno pri 8°C

Sposobnost listerija da raste pri temperaturi hlađenja, da je rasprostranjena u prirodi i da preživljava dugo vremena u nepovoljnim uslovima doprineli su saznanju da je ova bakterija sve značajniji patogen koji se prenosi hranom na ljude.

Široka rasprostranjenost *L.monocytogenes* u prirodi (zemljištu, vodi, vegetaciji, stočnoj hrani, silaži) je razlog postojanja velike verovatnoće kontaminacije sirove hrane biljnog i životinjskog porekla ovom bakterijom. Stoga, ozbiljno zabrinjava mogućnost da se namirnice animalnog porekla mogu kontaminirati tokom procesa proizvodnje i skladištenja i na taj način postati izvorom zaraze za ljude. Tokom proizvodnje hladno dimljene ribe, meso ribe može biti kontaminirano sojevima poreklom iz vodene sredine, proizvodne sredine, kao i od radnika u proizvodnim pogonima.

Hladno dimljeni losos i pastrmka dominiraju na tržištu dimljene ribe. Ready-to-eat (RTE) morska hrana, uključujući hladno dimljenu ribu i druge proizvode često su povezani sa brojnim epidemijama izazvanim *L.monocytogenes* (**Farber i sar., 2000, Brett i sar., 1998, Ericsson i sar, 1997**). Ovi proizvodi od ribe mogu prirodno biti kontaminirani niskim brojem listerija, pa su okarakterisani kao potencijalno kontaminirani sa *Listeria monocytogenes*. Iz ovog razloga ova vrsta namirnica predstavlja ozbiljnu opasnost za osobe sa oslabljenim imunitetom, starije osobe, trudnice, malu decu. Čuvanje ovih proizvoda u nedovoljno ohlađenim rashladnim uređajima, gde je temperatura skladištenja pogoduje slabom rastu ove bakterije predstavlja najveći rizik za potencijalnu infekciju potrošača.

Jedan od zadataka, u okviru ovog rada, bio je da se utvrdi nalaz *L.monocytogenes* u sirovini od koje će se praviti gotov proizvod hladno dimljene pastrmke, kao i da se utvrdi postoji li kontaminacija gotovog proizvoda. Pošto je utvrđeno da su i sirovina i gotov proizvod bez prisustva patogene listerije, urađena je veštačka kontaminacija sa 4 različita soja *Listeria monocytogenes*, različitog porekla (tabela podpoglavlja 4.1.2, u poglavlju *Materijal i metode ispitivanja*).

Nakon napravljenog gotovog proizvoda, upakovani uzorci hladno dimljene pastrmke u vakuum pakovanjima i pakovanjima sa modifikovanom atmosferom su skladišteni na temperaturi frižidera od 3°C (uslovno čuvanje) i 8°C (neuslovno čuvanje), i ispitivani tokom 14., 28. i 35.dana.

Na početku ispitivanja, odnosno nultog dana broj *L. monocytogenes* izražen kao log CFU/g bio je od $6,03 \pm 0,22$ do $6,55 \pm 0,05$. Utvrđeno je da je kod prve grupe uzoraka prosečan broj *L. monocytogenes* bio statistički značajno manji ($p < 0,05$, $p < 0,01$) od prosečnog broja ove bakterije u uzorcima druge, treće, odnosno četvrte grupe.

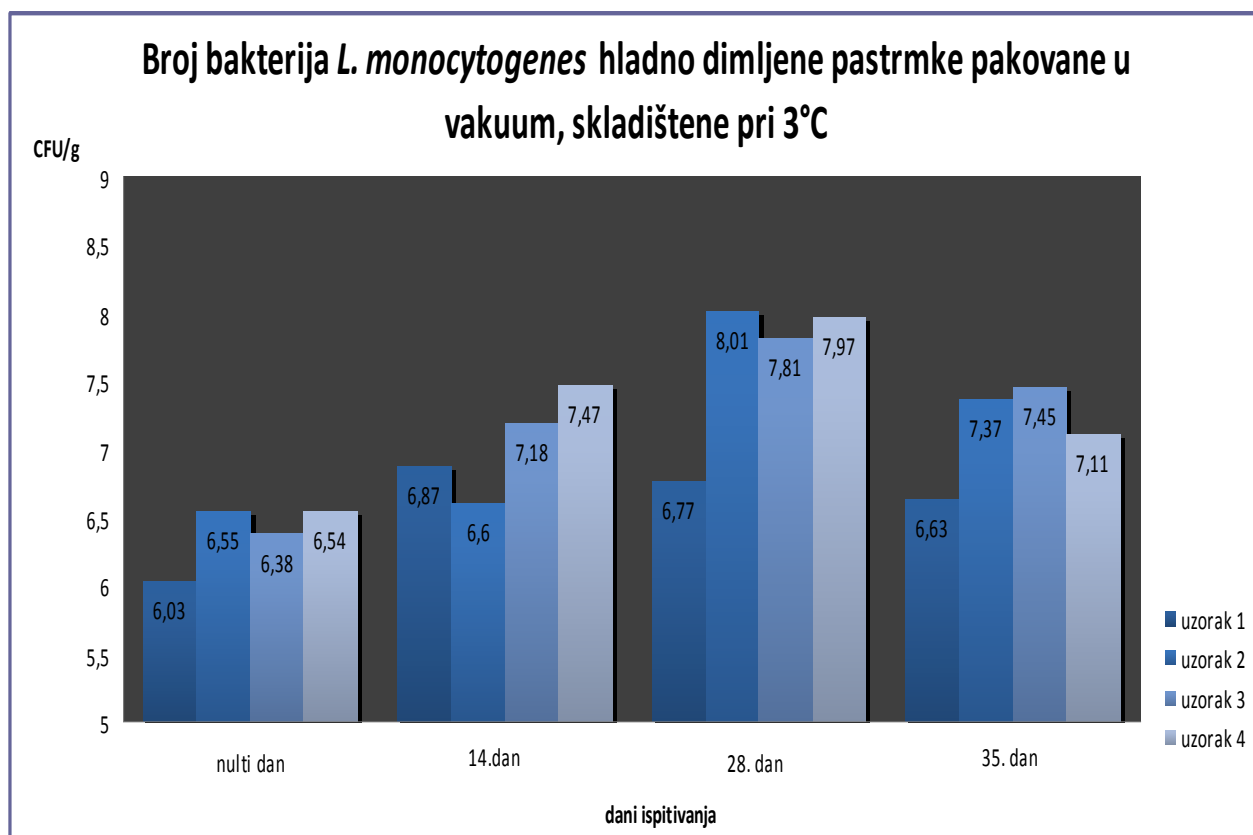
Ispitivanje vakuumiranih pakovanja uzoraka dimljene pastrmke čuvanim pri temperaturi od 3°C

Kod prve grupe uzoraka dimljene pastrmke skladištene pri 3°C broj bakterija *L.monocytogenes* je rastao od nultog do 14.dana, a zatim do 35.dana opadao, a kod uzoraka druge, odnosno, četvrte grupe broj bakterija *L.monocytogenes* je rastao do 28.dana, da bi se 35.dana smanjio.

Na kraju ispitivanja, odnosno 35. dana skladištenja uzoraka dimljene pastrmke pakovane u vakuum i skladištene pri 3°C, prosečan broj *L. monocytogenes* ($6,63 \pm 0,06$ log CFU/g) bio je i dalje statistički značajno manji ($p < 0,01$) kod prve grupe uzoraka. Razlika između broja bakterija *L. monocytogenes* ostale tri poredene grupe uzoraka bile su u većini slučajeva statistički značajne ($p < 0,05$, $p < 0,01$).

Promena broja bakterija *L. monocytogenes* uzoraka dimljene pastrmke pakovane u vakuum u toku skladištenja pri 3°C prikazana je sledećim grafikonom (grafikon 6.5.).

Grafikon 6.5. Broj *Listeria monocytogenes* u uzorcima koji su pakovani u vakuum i skladišteni pri 3°C



Lappi i sar. (2004) nisu ustanovili ni jedan uzorak sa <100 CFU/g *L.monocytogenes* posle 28 dana skladištenja pri 4°C u namerno kontaminiranim uzorcima dimljene pastrmke. Zaključci koje su izneli govore o tome da temperatura adekvatnog skladištenja ipak limitira rast ove patogene bakterije tokom skladištenja.

Vrednosti dobijene u našim ispitivanjima se razlikuju pošto je početna inicijalna doza veštačke kontaminacije bila znatno veća. Naše vrednosti, početnog dana ispitivanja su se kretale oko 6 – 6.5 log CFU/g.

Najblažu promenu vrednosti broja listerija imao je soj I grupe (referentni soj ATCC 19115, serotipa 4b).

Listeria monocytogenes sporije raste u prirodno kontaminiranim uzorcima nego u testiranjima sa kontaminiranim uzorcima (**Dalgaard i Jorgensen, 1998**).

Dillon i Patel (1994) su inokulisali površinu bakalara sa *Listeria monocytogenes*, hladno dimili, vakuum pakovali i skladištili pri temperaturi od 4°C tokom 3 nedelje i pri temperaturi od -20°C tokom 3 meseca. Tokom dimljenja i skladištenja vršeno je uzorkovanje i utvrđivanje prisustva i broja *Listeria monocytogenes*. Tokom dimljenja nalaz je bio istog nivoa, a pri skladištenju na temperaturi od 4°C se povećavao, dok je na temperaturi od -20°C opadao.

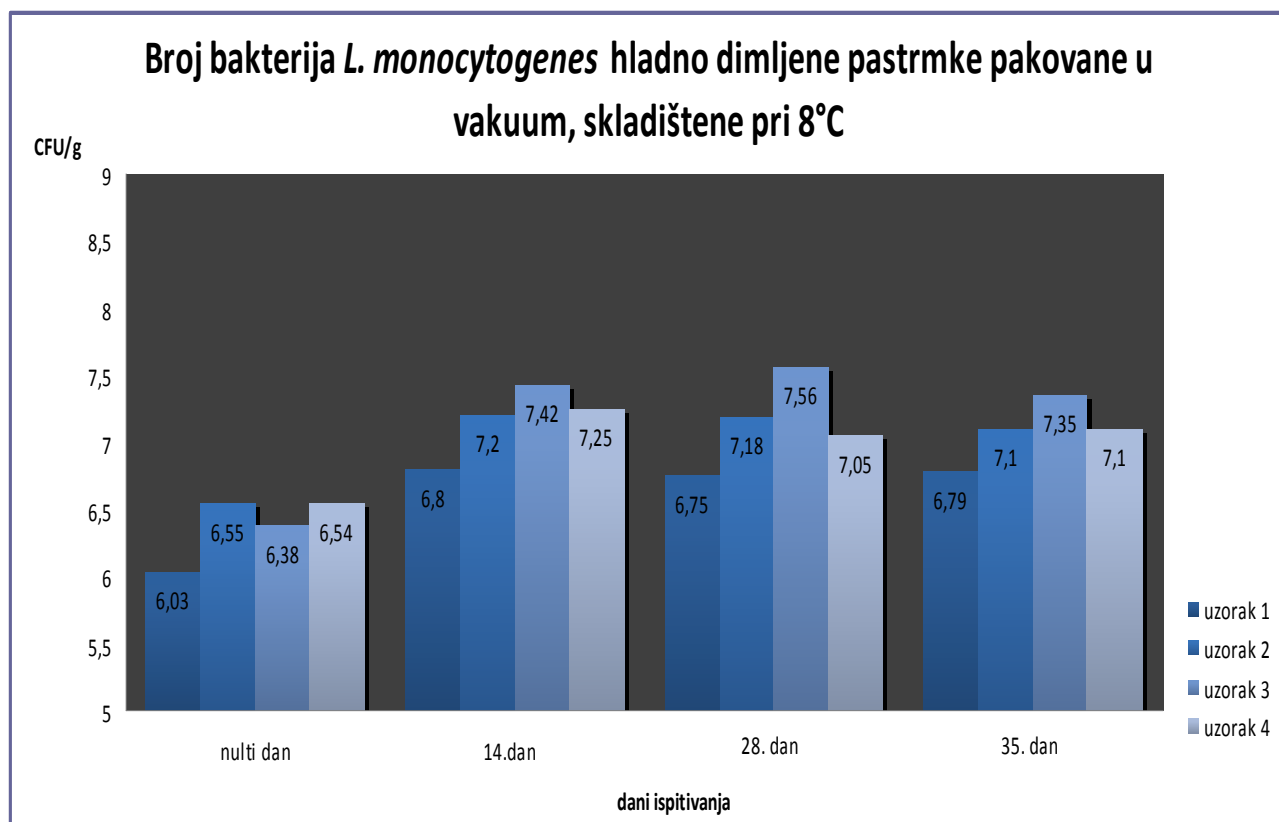
Ispitivanje vakuumiranih pakovanja uzoraka dimljene pastrmke čuvanim pri temperaturi od 8°C

Porast broja bakterija *L.monocytogenes* kod prve i druge grupe uzoraka dimljene pastrmke skladištenih pri 8°C, a pakovane u vakuumu, zabeležen je od nultog do 14.dana, a zatim se taj broj smanjio 28. dana, odnosno 35.dana. Kod uzoraka treće i četvrte grupe bakterija zapažen je porast od nultog do 28.dana i smanjenje do 35. dana.

Na kraju ispitivanja, 35. dana dobijeni su sledeći rezultati: broj bakterija *L. monocytogenes* izražen kao log CFU/g bio je od 6,79±0,12 do 7,35±0,14. Nije utvrđena statistički značajna razlika između broja bakterija uzoraka druge i četvrte grupe, dok je u svim ostalim slučajevima poređenja razlika bila statistički značajna (p<0,01, p<0,05).

Promena broja bakterija *L. monocytogenes* uzoraka dimljene pastrmke pakovane u vakuum u toku skladištenja pri 8°C prikazana je grafikonom 6.6.

Grafikon 6.6. Broj *Listeria monocytogenes* u uzorcima koji su pakovani u vakuum i skladišteni pri 8°C



Sva četiri uzorka sa različitim sojevima *L. monocytogenes* pokazale su sličan, gotovo identičan princip porasta broja listerija tokom perioda skladištenja pri temperaturi od 8°C.

U našim ispitivanjima utvrđena je razlika u dinamici rasta bakterija *Listeria monocytogenes* u uzorcima skladištenim pri 3°C i onim skladištenim u neadekvatnim uslovima, odnosno pri 8°C. U toku skladištenja pri adekvatnim uslovima temperature, vrednosti broja listerija su na kraju ispitivanja bile manje (prosečan broj *L. monocytogenes* iznosi $6,63 \pm 0,06$ log CFU/g), za razliku od uzoraka skladištenih na 8°C gde su vrednosti broja listerija bile oko $7,10 \pm 0,12$ log CFU/g.

Prema literaturnim podacima, nešto viši nalazi *L. monocytogenes* tokom dužeg skladištenja, pri višoj temperaturi, u skladu su sa do sada publikovanim radovima o uticaju skladištenja na preživljavanje i rast ove patogene bakterije u namirnicama. **Rørvik (2000)**

je prijavio višu stopu rasta pri temperaturama skladištenja od 8 - 10°C, nego pri 4°C. Slične rezultate ispitivanja dobili su i **Cortes i sar. (1997)** koji su utvrdili da se rast *Listeria monocytogenes* može javiti i kod vakuum pakovanog dimljenog lososa ukoliko je produženo skladištenje pri višim, neadekvatnim temperaturama.

Čuvanje proizvoda na 4°C pokazuje sporiji rast listerija nego na 10°C, bez obzira na nivo inokulacije i koncentraciju nizina (**Neetoo i sar., 2008**).

U eksperimentalno kontaminiranim filetima lososa i pastrmke, nivoi *Listeria monocytogenes* su bili znatno viši na 8-10°C, nego na 4°C, tokom 20 dana skladištenja (**Niedziela i sar., 1998**).

Ispitivanje uzoraka dimljene pastrmke pakovane u MAP čuvanim pri temperaturi od 3°C i 8°C

Promena broja bakterija *L. monocytogenes* uzoraka dimljene pastrmke pakovane u MAP u toku skladištenja pri 3°C prikazana je grafikonom broj 6.7., a pakovane u MAP u toku skladištenja pri temperaturi od 8°C prikazana je grafikonom broj 6.8.

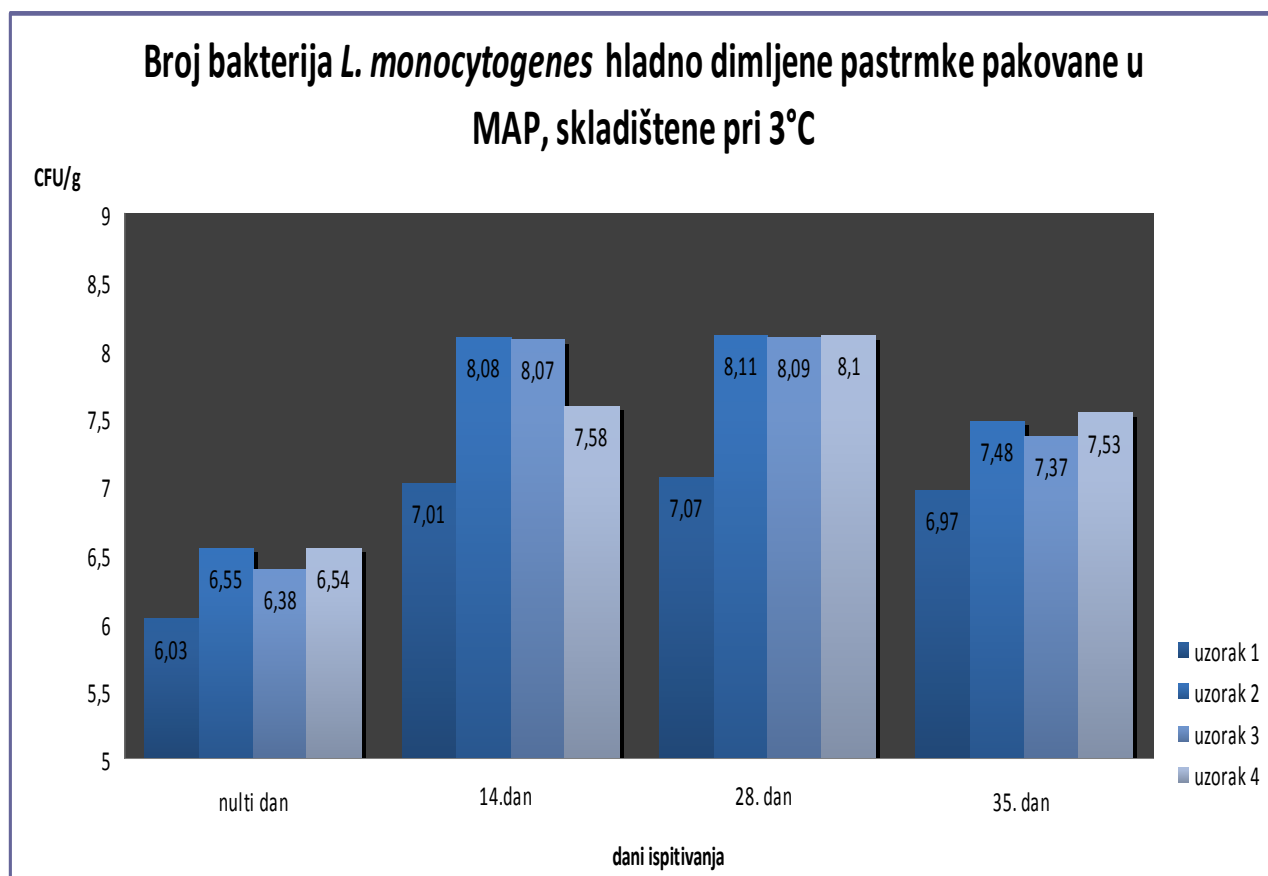
Poslednjeg dana skladištenja uzoraka prve grupe dimljene pastrmke pakovane u MAP i skladištene pri 3°C ($6,97 \pm 0,06$ log CFU/g) bio je statistički značajno manji ($p < 0,01$) od broja bakterija ostalih grupa uzoraka. Utvrđena je i statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između broja bakterija uzoraka treće ($7,37 \pm 0,05$ log CFU/g) i četvrte grupe ($7,53 \pm 0,13$ log CFU/g).

Prilikom ispitivanja uzoraka pakovanih u MAP i skladištenih na temperaturama od 8°C, utvrđeno je da 28. dana skladištenja pri 8°C kod prve grupe uzoraka broj bakterija *L.monocytogenes* ($7,01 \pm 0,04$) izražen kao log CFU/g bio je statistički značajno ($p < 0,01$) manji od broja bakterija ostalih poređenih grupa ($8,07 \pm 0,06$ do $9,11 \pm 0,06$).

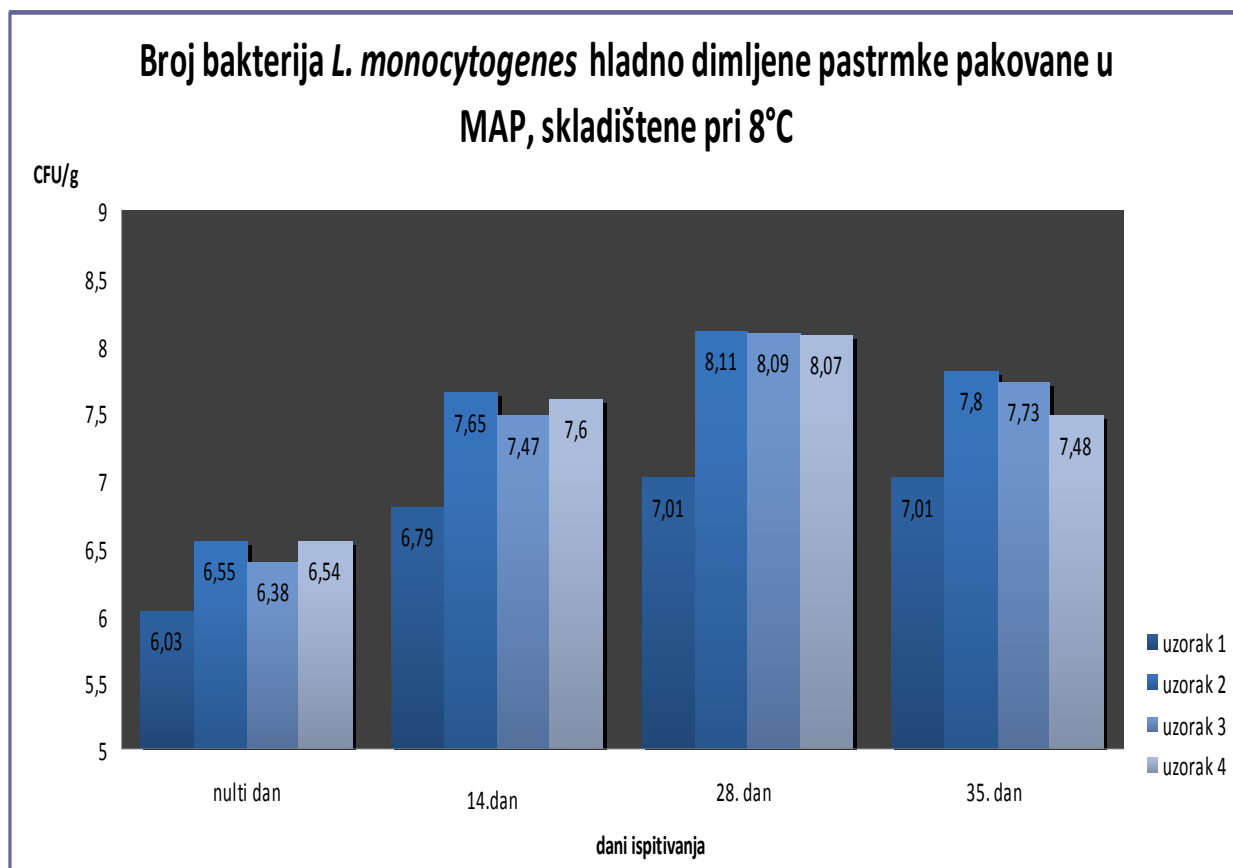
Gotovo identični rezultati dobijeni su poslednjeg, 35. dana ispitivanja, s tim što je broj bakterija bio manji (od $7,48 \pm 0,21$ do $7,80 \pm 0,20$ log CFU/g)

U uzorcima I grupe pakovanim u modifikovanoj atmosferi, broj listerija je značajno porastao tokom 14 dana čuvanja, održana je vrednost i tokom 28. dana ispitivanja i potom je 35. dana značajno opala. Za razliku od uzoraka prve grupe, uzorci druge grupe su pokazali da je broj listerija postepeno rastao tokom čuvanja, svoj maksimum je dostigao u ispitivanju 28 dana, pri čemu su svi uzorci, i oni čuvani na 3°C i oni na 8°C imali identičnu dinamiku rasta. U uzorcima treće i četvrte grupe najveći porast broja listerija je bio tokom ispitivanja 28. dana., a svi uzorci čuvani i na 3°C i na 8°C, su imali sličnu dinamiku rasta.

Grafikon 6.7. Broj *Listeria monocytogenes* u uzorcima koji su pakovani u modifikovanoj atmosferi i skladišteni pri 3°C



Grafikon 6.8. Broj *Listeria monocytogenes* u uzorcima koji su pakovani u modifikovanoj atmosferi i skladišteni pri 8°C



U ispitivanju inhibicije rasta *Listeria monocytogenes* u hrani od plodova mora, dejstvom modifikovane atmosfere, utvrđeno je da je potrebno 100% CO₂ da bi efektivno inhibirao rast listerija u pakovanjima (Lyver i sar., 1998). Nilsson i sar. (1997) su ustanovili da vrednost od 70% CO₂ nema mogućnost potpune inhibicije rasta *Listeria monocytogenes* u hladno dimljenom lososu.

Upotrebom kombinacije ugljen-dioksida i nizina u pakovanjima postignuta je odgovarajuća efikasnost (Nilsson i sar., 1997).

Niedziela i sar.(1998) su ustanovili da su u eksperimentalno kontaminiranim filetima lososa i pastrmke, nivoi *Listeria monocytogenes* bili znatno viši na 8-10°C, nego na 4°C, tokom 20 dana skladištenja.

Ispitivanjem kombinovanog efekta pakovanja sa modifikovanim atmosferama i nizinom na rast *Listeria monocytogenes* i *Pseudomonas fragii*, ustanovljeno je da oba mikroorganizma inhibiraju ovi uslovi, pri čemu su inhibitorni efekti veći pri temperaturi od 4°C, nego pri temperaturi od 20°C (**Fang i Lin, 1994**).

Na osnovu rezultata ispitivanja, kao i na poređenje sa podacima iz literature možemo da ustanovimo da promene broja četiri različita serotipa bakterije *Listeria monocytogenes* pokazuju u toku skladištenja porast broja bakterija od nultog do 14. odnosno 28.dana skladištenja i da te vrednosti zavise od načina pakovanja (vakuum, modifikovana atmosfera), temperaturnih uslova čuvanja uzoraka (3°C ili 8°C) i serotipa *Listeria monocytogenes*. Pokazalo se da najmanje vrednosti rasta broja *L.monocytogenes* ima I grupa (referentni soj ATCC 19115, serotip 4b).

Kod sva četiri serotipa *Listeria monocytogenes* utvrđeno je značajno smanjenje broja bakterija 35.dana skladištenja u odnosu na 28.dan skladištenja.

V.3. Ispitivanje promene broja mlečno-kiselinskih bakterija u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanoj atmosferi i skladištene pri temperaturi 3°C, odnosno pri 8°C

Bakterije mlečne kiseline predstavljaju široku grupu mikroorganizama koji imaju slične genotipske i fenotipske osobine. To su Gram pozitivni mikroorganizmi, nepokretni i asporogeni, kiselinsko tolerantni.

Pri pakovanju hrane u vakuumu se stvara mikroaerofilna sredina, a delimično se nakuplja i ugljen dioksid, čime se inhibira rast aerobnih Gram negativnih bakterija i postiže se bolja održivost mesa (**Socol i Oetterer, 2003; Jouffraud i sar., 2006**). U takvim uslovima razvija se mikroflora u kojoj dominiraju mlečno kiselinske bakterije, a u manjem broju prisutne su i *Brochotrix thermosphacta*, *Enterobacteriaceae*, druge Gram negativne bakterije, mikrokoke i kvasci (**Leroi i sar., 1998; Lyhs i sar., 1998**).

Gonzales i sar. (2002) su utvrdili ispitivanjem bakteriološkog sastava vakuumiranih dimljenih proizvoda od ribe najzastupljeniju grupu mikroorganizama koju su činile *Lactobacillus spp.*, a najčešće izolovane i identifikovane vrste bile su *L.sakei*, *L.curvatus*, *L.plantarum*, *L.delbrueckii*, *L.casei*, *L.alimentarius*, *L.homohiochii*, *L.coryneformis*. Pored Gonzalesa i sar., istu tvrdnju su dokazali u svojim ispitivanjima i **Lyhs i sar. (1999)**, **Joffraud i sar. (2001)** i **Leroi i sar. (1998)**, a kažu da su laktobacili dominantna mikroflora u hladno dimljenim proizvodima od ribe pakovane u vakuumu.

Prema **Olafsdottir-u i sar. (2005)** glavni i odgovorni krivci za nastanak kvara hladno dimljene ribe iz familije *Salmonidae* su mikroorganizmi iz familije *Enterobacteriaceae*, a čije je prisustvo u proizvodu uslovljeno higijenskim uslovima i samoj unutrašnjoj flori objekta za preradu i dimljenje proizvoda. Prema njihovom stanovištu, laktobacili nisu tipični izazivači kvara hladno dimljenih proizvoda od ribe, ali kada se nađu u većem broju u proizvodu, mogu da utiču na senzorne odlike, time što stvaranjem isparljivih komponenti dovode do promena u mirisu ribe.

U ovom ispitivanju, ukupan broj mlečno-kiselinskih bakterija (MKB) na početku ispitivanja u uzorcima hladno dimljene pastrmke bio je od $1,35 \pm 0,12$ do $1,42 \pm 0,13$ log CFU/g i nije se statistički značajno razlikovao.

Ispitivanje vakuumiranih pakovanja uzoraka dimljene pastrmke čuvanim pri temperaturi od 3°C i 8°C

U uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovanim u vakuum i skladištenim pri 3°C ukupan broj MKB je stalno rastao tako da je 35. dana bio u zavisnosti od grupe uzoraka od $3,80 \pm 0,14$ do $4,20 \pm 0,10$ log CFU/g.

Kod istog načina pakovanja, ali kod uzoraka skladištenih pri 8°C ukupan broj MKB je takođe rastao da bi 35. dana u zavisnosti od grupe uzoraka bio od $6,03 \pm 0,16$ do $6,71 \pm 0,1$ log CFU/g, što je značajno veće u odnosu na uzorke koji su skladišteni pri 3°C.

Lyhs (2002) i **Stohr i sar. (2001)** smatraju da su u vakuum pakovanoj hladno dimljenoj ribi, u mikroflori koja dovodi do kvara uglavnom zastupljene laktobacilus vrste, čiji se broj u momentu kvara kreće od 10^6 do 10^8 log CFU/g.

Leroi i sar. (1998) su utvrdili tokom svojih ispitivanja da se ukupan broj laktobacila u hladno dimljenom lososu kretao od 1 log CFU/g na početku skladištenja, a na kraju ispitivanja 35. dana je dostigao vrednost oko 7 log CFU/g.

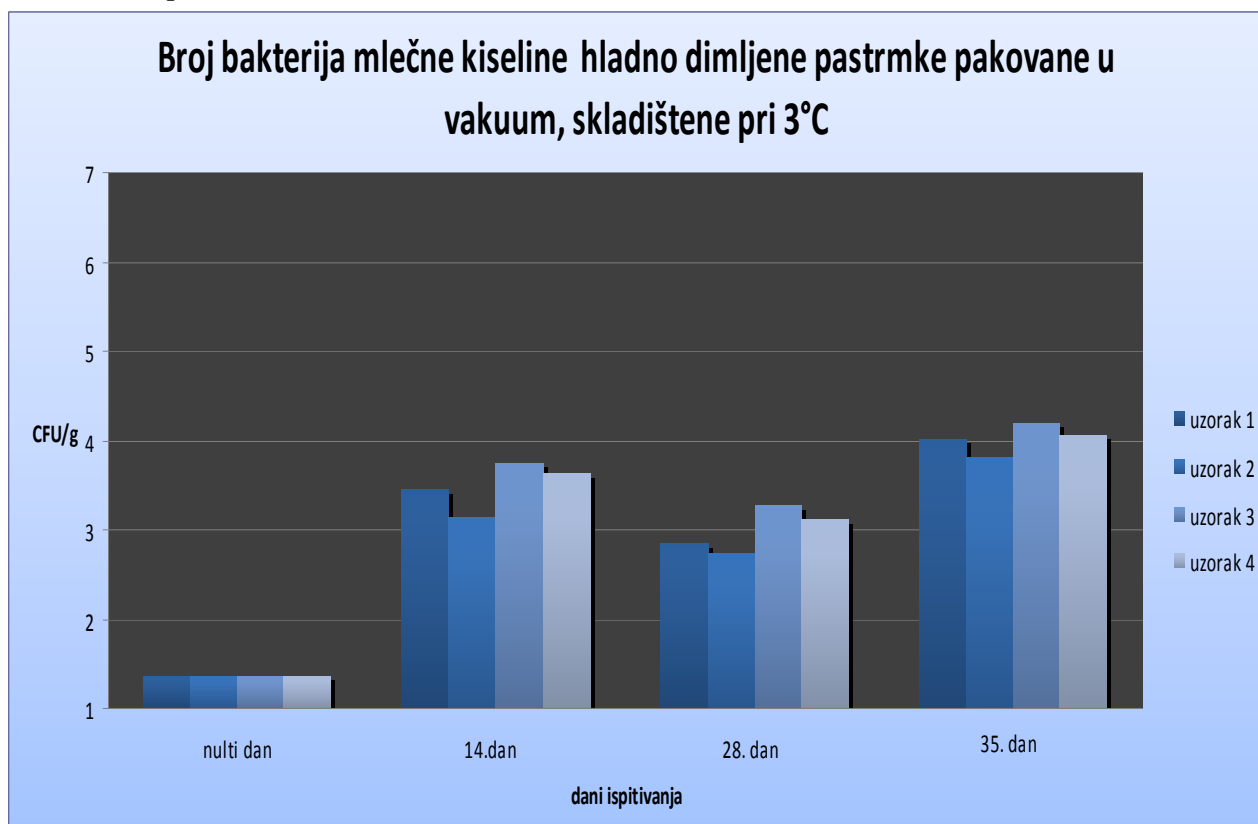
Dondero i sar. (2004) su utvrdili da je ukupan broj laktobacila u vakuum pakovanom hladno dimljenom lososu nakon 35 dana skladištenja pri 4°C bio oko 8 log CFU/g.

U ovom radu, vrednosti MKB su bile mnogo niže u uzorcima pakovanim u vakuumu i skladištenim pri adekvatnim temperaturama, nego vrednosti prema podacima iz literature. Vrednosti MKB u uzorcima čuvanim na neadekvatnim temperaturama su bile slične vrednostima datim u pregledu literature (**Lyhs, 2002; Stohr i sar., 2001**).

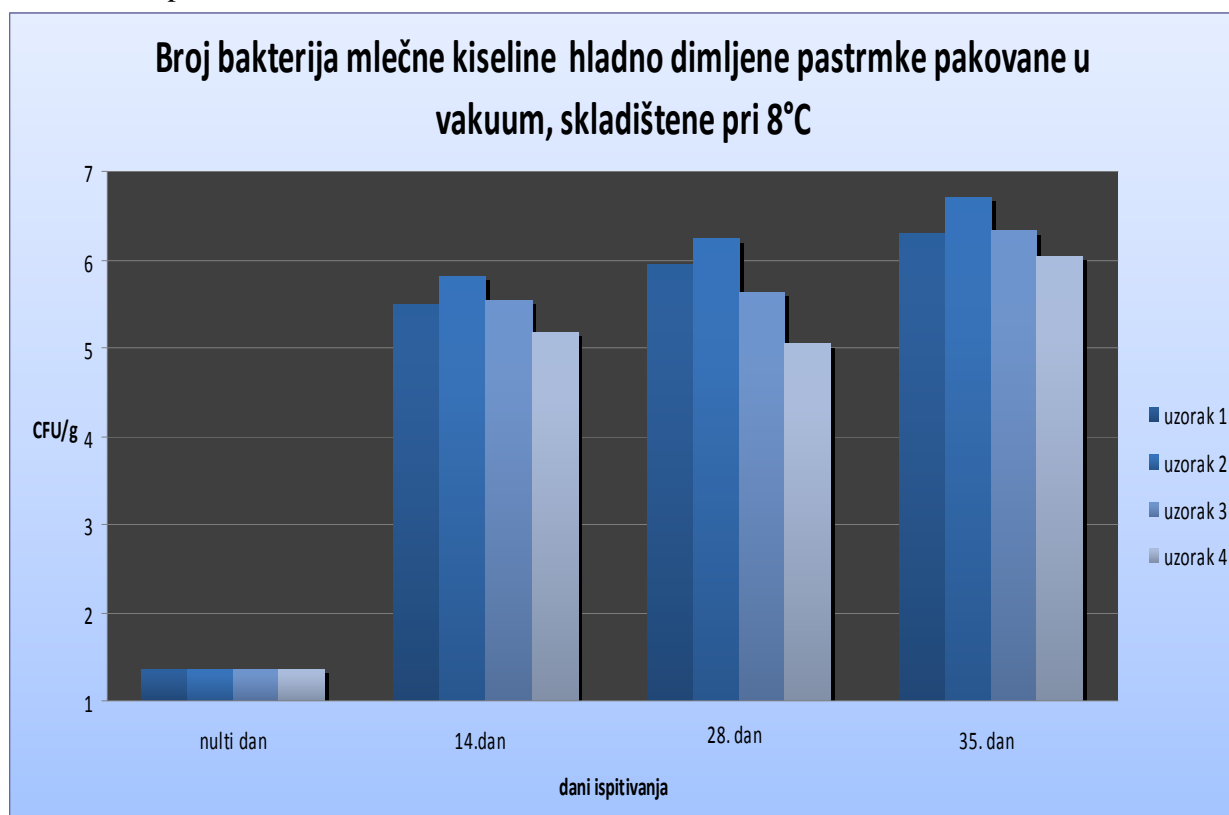
Razlog za dobijanje neujednačenih podataka i rezultata, tokom pregleda literature, tako i upoređujući sa dobijenim vrednostima u ovom ispitivanju jeste problem nepostojanja standarda za kvalitet vakuumirane hladno dimljene ribe, čime se ukupan broj laktobacila ne uzima kao pouzdan pokazatelj kvaliteta hladno dimljenih proizvoda od ribe pakovanih u vakuumu, tako i u smeši gasova. **Paludan-Müller i sar.(1998)** su zaključili da kvar hladno dimljenih proizvoda od ribe pakovanih u vakuumu i smeši gasova nije nastao kao posledica aktivnosti laktobacila, već usled autolitičke aktivnosti enzima. Često postoji nalaz broja laktobacila $10^7 - 10^8$ CFU/g mesa ribe i nekoliko nedelja pre pojave prvih znakova kvara.

Promene broja mlečno-kiselinskih bakterija u uzorcima dimljene pastrmke čuvanim pri temperaturi od 3°C i 8°C date su u sledećim grafikonima (grafikon 6.9. i 6.10.):

Grafikon 6.9. Broj bakterija mlečne kiseline u uzorcima pakovanim u vakuum i skladištenim pri 3°C



Grafikon 6.10. Broj bakterija mlečne kiseline u uzorcima pakovanim u vakuum i skladištenim pri 8°C



Prema ispitivanjima **Tome i sar. (2006)**, ukupan broj MKB se povećao sa nivoa $10^2 - 10^4$ CFU/g do nivoa $10^5 - 10^7$ CFU/g. 41% mlečno-kiselinskih bakterija je pokazao inhibitorni kapacitet protiv *Listeria innocua*. Većina sojeva nije posedovala bakteriocinogeno dejstvo, ali su dokazali povoljna konzervišuća svojstva u namirnicama dimljene ribe koja je vakuum pakovana.

U drugom ispitivanju korišćeni su sojevi bakterija *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* i *Carnobacterium piscicola*, koji su inokulisani u meso hladno dimljenog lososa, uz dodavanje i bakterije *Listeria innocua*. Fileti u vakuum pakovani i čuvani tokom 30 dana na temperaturi od 4°C. Sve dodate kulture mlečno-kiselinskih bakterija su pokazale bakteriostatski ili baktericidni efekat na rast *L.innocua*.

Razlog smanjenja broja listerija, u našem ispitivanju, od 28.dana prema 35.danu skladištenja možemo da potražimo i u povećanju broja mlečno-kiselinske mikroflora u uzorcima koji su vakuum pakovani. Zaključujemo je da je rast *Listeria monocytogenes* inhibiran mlečno-kiselinskim bakterijama, odnosno stvaranjem bakteriocina mlečno-kiselinskih bakterija.

Ispitivanje uzoraka dimljene pastrmke pakovane u MAP čuvanim pri temperaturi od 3°C i 8°C

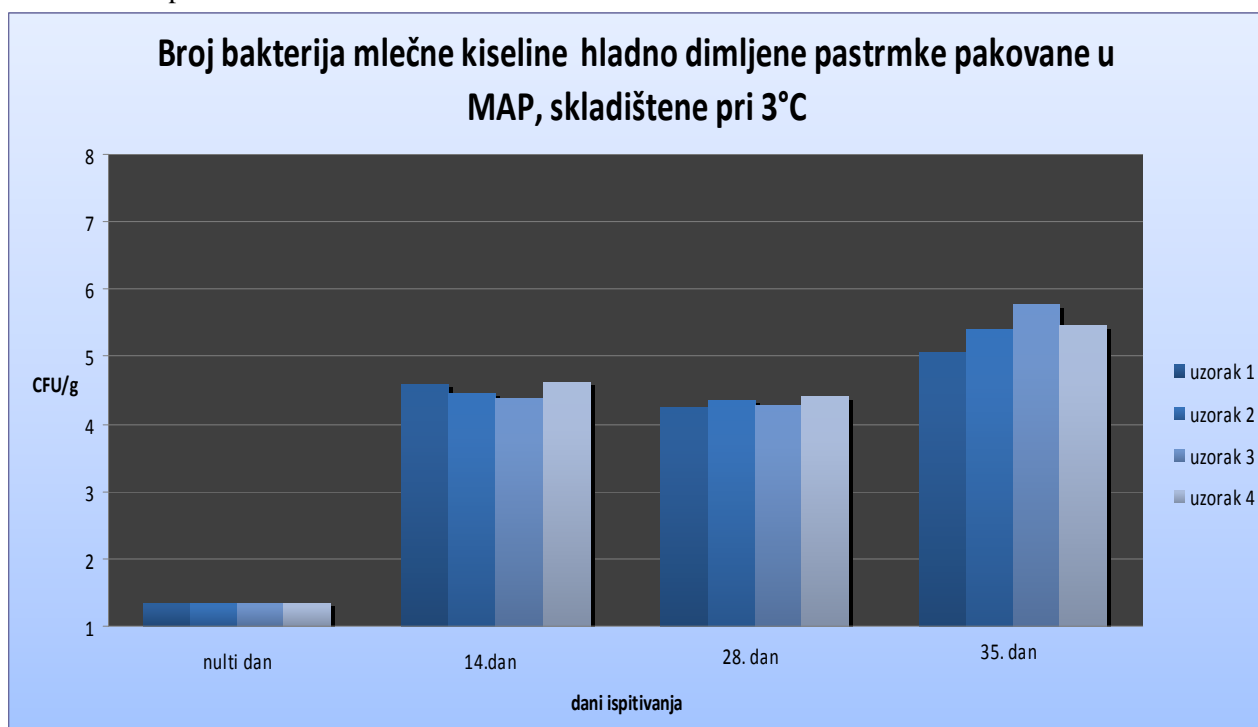
Kada je u pitanju dominantna mikroflora hladno dimljenih proizvoda od ribe pakovanih u smeši gasova, sastav zavisi od smeše gasova koji su se koristili prilikom pakovanja. Dominantna mikroflora u hladno dimljenim proizvodima od ribe upakovanim u modifikovanu atmosferu je ona koja je rezistentna na CO₂ (**Siverstvik i sar., 2002**). Gram negativne bakterije su mnogo osetljivije na dejstvo ugljen dioksida, pa su ujedno i najviše inhibirani mikroorganizmi. U proizvodima od ribe upakovanim u smeši gasova bakterija *Photobacterium phosphoreum* je rezistentna na delovanje ugljen dioksida, i najčešće je odgovorna za nastanak kvara (**Hovda i sar., 2007**). Gram pozitivne bakterije, kao što su mlečno-kiselinske bakterije (*Lactobacillus spp.*, *Brochotrix thermosphacta*, *Leuconostoc spp.*) nisu osetljive na dejstvo CO₂, pa u proizvodima od ribe pakovanim u smeši gasova postaju dominantna mikroflora i imaju manji potencijal da izazovu kvar (**Limbo i sar., 2010; McMillin, 2008, Siverstvik i sar., 2003**).

U uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP, a skladištene pri 3°C broj MKB je rastao i 35. dana bio je u zavisnosti od ispitivane grupe uzoraka od 5,06±0,14 do 5,76±0,17 log CFU/g.

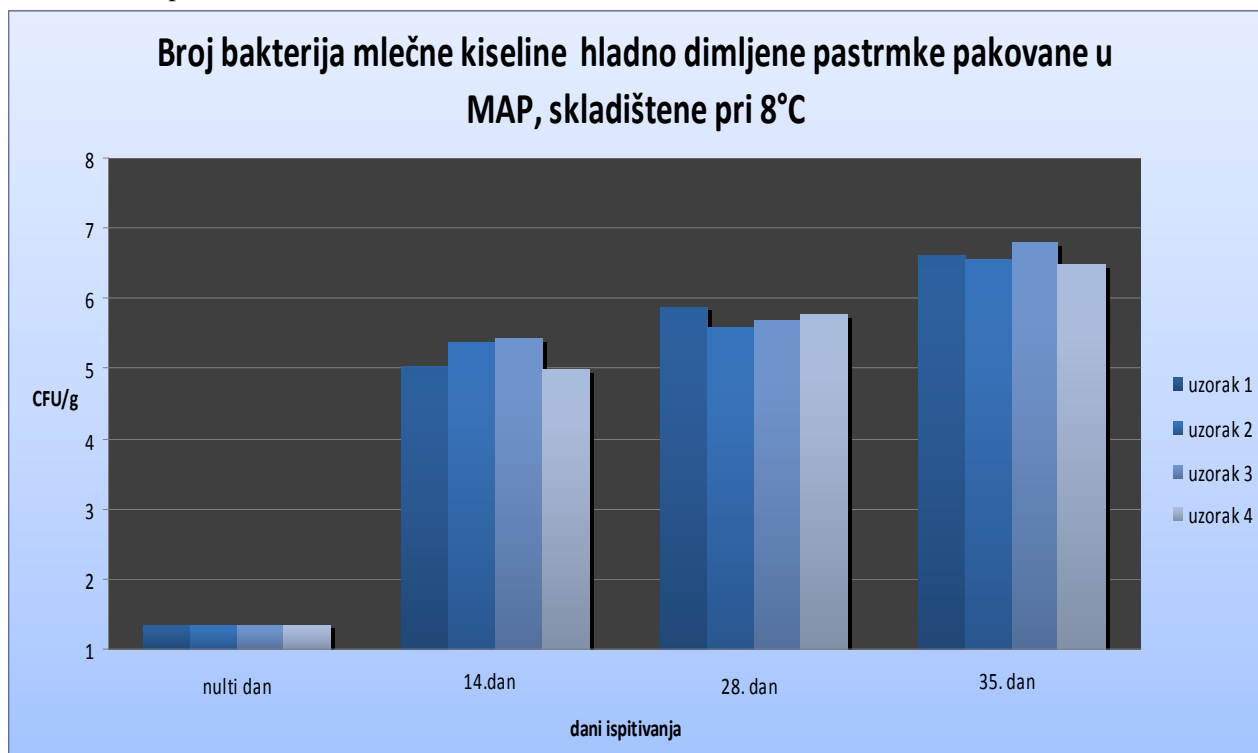
Kod istog načina pakovanja, ali kod uzoraka skladištenih pri 8°C na kraju ispitivanja broj MKB u zavisnosti od grupe bio je od 6,56±0,33 do 6,80±0,10 log CFU/g, što je značajno više u odnosu na uzorke skladištene pri 3°C.

Promene broja mlečno-kiselinskih bakterija u uzorcima dimljene pastrmke čuvanim pri temperaturi od 3°C i 8°C date su u sledećim grafikonima (grafikoni 6.11. i 6.12.):

Grafikon 6.11. Broj bakterija mlečne kiseline u uzorcima pakovanim u modifikovanoj atmosferi i skladištenim pri 3°C



Grafikon 6.12. Broj bakterija mlečne kiseline u uzorcima pakovanim u modifikovanoj atmosferi i skladištenim pri 8°C



Kao što se može ustanoviti na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja porast broja mlečno-kiselinskih bakterija bio je značajniji kod uzoraka skladištenih pri višim temperaturama (8°C) i uzoraka pakovanih u modifikovanoj atmosferi, u odnosu na uzorke koji su bili pakovani u vakuumu.

Do sličnih zaključaka su došli i **Debevere i Boskou (1996)** koji su zapazili da je evidentno veći broj laktobacila utvrđen u uzorcima pakovanim u smeši gasova, u odnosu na one uzorke pakovane u vakuumu. **Masniyom i sar. (2002)** su utvrdili da je u uzorcima pakovanim u atmosferi bogatoj CO₂, došlo do značajnijeg rasta laktobacila u odnosu na uzorke čuvane na vazduhu. Ovi naučnici navode da je rast laktobacila uslovljen povećanom produkcijom mlečne kiseline u atmosferi bogatoj CO₂, a mlečna kiselina je i produkt metaboličke aktivnosti laktobacila.

Ugljen dioksid je inhibitorno delovao na neke grupe mikroorganizama, posebno na enterobakterije, što je dovelo do toga da bakterije mlečne kiseline nesmetano rastu i dostignu veći broj u uzorcima koji su pakovani i smeši gasova. Za razliku od vakuum pakovanih uzoraka, gde je inhibicija drugih mikroorganizama bila slabija, pa je i sama mikroflora mlečno-kiselinskih bakterija bila u manjoj meri zastupljena.

Do sličnih zaključaka došli su i **Arkoudelos i sar. (2007)** u toku ispitivanja jegulje pakovane u vazduhu, vakuumu i smeši gasova.

Zaključuje se da su *Lactobacillus spp.* najznačajnija i najzastupljenija mikroflora odgovorna za održivost, senzorne osobine hladno dimljenih, vakuumiranih proizvoda od ribe. Za razliku od vakuum pakovanih proizvoda, dimljeni proizvodi od ribe pakovani u modifikovanim atmosferama imaju drugačije uslove sredine za razvoj mikroorganizama (**Siverstvik i sar., 2002**). Mikroorganizmi koji inače razvijaju kvar mesa u aerobnim uslovima, u MAP-u su inhibirani ugljen dioksidom. Zato je dominantna mikroflora ona koja je rezistentna na ugljen dioksid. Prirodna mikroflora hladno dimljenog ribljeg mesa pred kraj roka upotrebe jesu bakterije mlečne kiseline (**Vescovo i sar., 2006**).

V. 4. Ispitivanje prisustva *Salmonella spp.*, koagulaza pozitivnih stafilokoka, i sulfitoredujućih klostridija, izolacija, identifikacija i određivanje broja bakterija u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanoj atmosferi i skladištene pri temperaturi 3°C, odnosno pri 8°C

Neadekvatan izbor sirovine, nepažljiva manipulacija sirovinom u toku primarne obrade i nekorektna i nehigijenska proizvodnja mogu usloviti pojavu patogenih mikroorganizama u gotovom proizvodu. Patogeni u ribi mogu poticati iz okoline ili biti poreklom od životinja/ljudi.

Patogeni mikroorganizmi u dimljenim proizvodima od ribe mogu da se podele na :

- svojstvene patogene bakterije (one koje potiču iz vodene sredine): *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio spp...*, *Clostridium botulinum* tip E;
- ne-svojstvene patogene bakterije (one koje su u meso ribe dospеле kao posledica naknadne kontaminacije u toku procesa proizvodnje, a čiji su rezervoari ljudi i životinje) : *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* (**Dimitrijević, 2007; Huss i sar., 1995**).

Poznavajući karakteristike hladno dimljenih proizvoda od ribe, zna se da je to lako kvarljiva namirnica. Iz tog razloga izuzetno je značajna kontrola higijene opreme i objekata, redovne zdravstvene kontrole ljudi koji rade u proizvodnji hrane, poznavanje tehnološkog procesa proizvodnje dimljene ribe, poštovanje hladnog lanca u toku proizvodnje, transporta, čuvanja i prodaje proizvoda (**Jittinandana i sar., 2002**).

Analiza opasnosti bakterijske etiologije u hladno dimljenim proizvodima od ribe prikazana je u sledećoj tabeli:

Tabela 6.1. Bakterijski patogeni u hladno dimljenom lososu (Huss i sar., 1995)

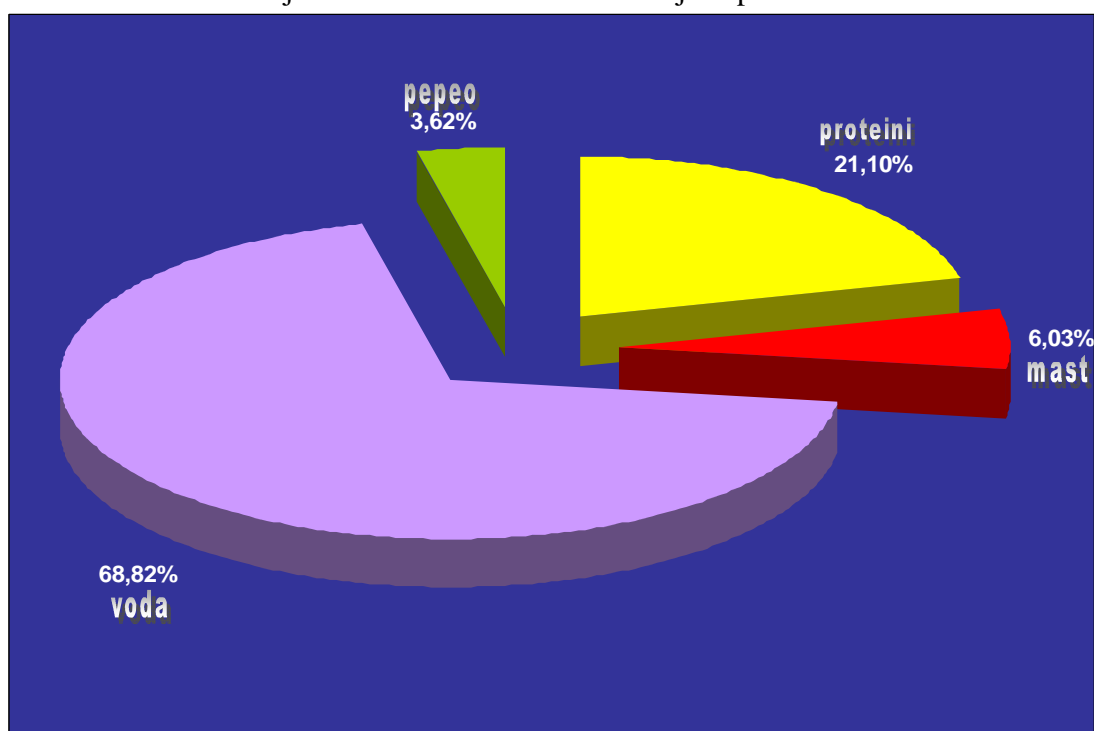
mikroorganizam		prirodno prisutni u			sposobni da se razmnožavaju u proizvodu (3-5% SVF*)		stepen zabrinutosti
		živa riba	okruženje	gotov proizvod	pri 5°C	temperature >10°C	
svojtveni patogeni	<i>Cl.botulinum</i> ne-prot.tip B, E, F	+	+	+	-	(+)	nizak
	<i>Cl.botulinum</i> prot.tip A, B	(+)	+	+	-	+	nizak
	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	+	+	+	+	visok
	patogene <i>Vibrio</i> vrste	+	+	+	-	+	nizak
	<i>A.hydrophila</i>	+	+	+	(+)	+	nejasan
	<i>P.shigelloides</i>	+	+	+	-	(+)	nizak
nesvojtveni patogeni	<i>Salmonella</i>	-	-	-	-	+	nizak
	<i>E.coli</i>	-	-	-	-	(+)	nizak
	<i>S.aureus</i>	-	-	-	-	(+)	nizak

Tokom ispitivanja uzoraka u ovom radu ustanovljeno je: nultog, 14., 28. i 35. dana ispitivanja u uzorcima (po šest u svakom terminu i iz svake grupe) hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum, odnosno MAP i skladištene pri temperaturama 3°C, odnosno 8°C nije utvrđeno prisustvo *Salmonella spp.*, koagulaza pozitivnih stafilokoka, kao ni prisustvo sulfitoredujućih klostridija. Time je dokazano da je obrada i manipulacija ribom od sirovine pa do gotovog proizvoda protekla adekvatno uz poštovanje dobre higijenske i dobre proizvođačke prakse.

V.5. Ispitivanje osnovnog hemijskog sastava u uzorcima hladno dimljene pastrmke

Ispitivanjem osnovnog hemijskog sastava utvrđeno je da hladno dimljena pastrmka sadrži (tabela 5.15., u poglavlju *Rezultati ispitivanja*) 68,82±1,36% vode, 21,10±0,09% proteina, 6,03±0,54% masti, 3,62±0,06% pepela, a da je sadržaj soli 2,26±0,06%.

Grafikon 6.13. Hemijski sastav uzoraka hladno dimljene pastrmke



Prema podacima iz literature proizvod od dimljene ribe sadrži od 2-4% soli, a prema postojećim američkim HACCP regulativama, procenat soli u hladno dimljenoj ribi trebalo bi da bude 2.5% (**Ward, 2001**). U hladno dimljenoj ribi procenat vode se kreće između 60-70%, a ta količina vode zavisi od količine masti (može biti i do 13.5%). Proteina u dimljenoj ribi ima oko 25.7%, a mineralnih materija oko 1.5%. Energetska vrednost dimljene pastrmke je oko 966 kJ, a pH je od 5.8 do 6.3 (**Røra i sar., 1999; Baltić i Teodorović, 1997**).

Ispitivani osnovni hemijski sastav bio je u karakterističan za hladno dimljenu pastrmku.

Izračunata vrednost sadržaja soli u vodenoj fazi (SVF) naših uzoraka iznosi 3.18%.

Sadržaj soli u vodenoj fazi (SVF) predstavlja procenat soli u vodenoj fazi proizvoda **(SNIC, 1998)**.

Prema podacima iz literature, vrednost SVF naših uzoraka je prihvatljiva i zadovoljavajuća **(An Association of Food and Drug Officials, 1991, 1997)**. U modelu izračunavanja SVF (<http://foodsafety.unl.edu/ARMY/fish-wps/index.html>), mini-malna količina soli u ribi je 2.13%, maksimalna količina vode u uzorcima dimljene ribe je 73.1%. Pošto je količina dodatih nitrita u vrednostima do 100ppm, minimalni SVF za uzorke dimljene pastrmke treba da bude 3%. Stoga, izračunata vrednost SVF naših uzoraka je adekvatna i prihvatljiva.

V.6. Određivanje aktivnosti vode (a_w) i ispitivanje pH vrednosti hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i modifikovanu atmosferu i skladištene pri temperaturi 3°C odnosno pri 8°C

Aktivnost vode (voda koja je dostupna mikroorganizmima) predstavlja značajan faktor održivosti namirnica. Vrednost aktivnosti vode (a_w) utiče na mogućnost preživljavanja i razmnožavanja mikroorganizama u namirnicama animalnog porekla. Prema tabeli 12., a_w vrednost od 0.98 predstavlja optimum za rast i razmnožavanje većine patogenih mikroorganizama koji dovode do trovanja hranom (*Salmonella spp.*, *Vibrio spp.*, *Clostridium spp.*, *S.aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Shigella spp.*, *Yersinia enterocolitica*) **(Katić, 2012)**. Snižavanjem a_w vrednosti, usporava se razmnožavanje bakterija i ograničava njihova mikrobiološka aktivnost, i ispod određene vrednosti ono potpuno prestaje, ali vrlo retko dolazi do smrti bakterijskih ćelija **(Koprivica, 2008)**.

U ovom ispitivanju utvrđene su a_w vrednosti u uzorcima prve, druge, treće i četvrte grupe: $0,981 \pm 0,001$; $0,980 \pm 0,001$; $0,979 \pm 0,002$; $0,979 \pm 0,002$ (tabela 5.17., u poglavlju *Rezultati ispitivanja*). Izračunate vrednosti se nisu međusobno statistički značajno razlikovale.

Kako je optimalna a_w vrednost za rast većine mikroorganizama u opsegu od 0.98 do 0.99, kolika je utvrđena i u uzorcima hladno dimljenih fileta pastrmke pakovane u vakuumu i u modifikovanoj atmosferi, koji su bili predmet istraživanja u okviru ovog rada, možemo smatrati da su ovi uzorci izuzetno pogodna sredina za rast i razmnožavanje mikroorganizama, a da a_w vrednost ne predstavlja ograničavajući faktor za rast mikroorganizama u datim ispitanim uzorcima.

Rezultati pH i a_w vrednosti su dati u sledećoj tabeli (tabela 6.2.):

Tabela 6.2. Rezultati pH i a_w vrednosti

parametar	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X_{\min}	X_{\max}	C_v (%)
pH	6,20	0,01	0,004	6,18	6,21	0,17
a_w	0.980	0.001	0.0001	0.979	0.981	0.23

Prema literaturnim podacima period skladištenja proizvoda od ribe karakterišu promene koje uzrokuju gubitak svežine, dok kraj skladištenja karakteriše nastanak kvara (**Ruiz-Capillas i Moral, 2005**). Glavni uzročnici kvara mesa su saprofitne bakterije, pri čemu nastaju procesi proteolize, lipolize i razlaganje ugljenih hidrata (glikogen) u mesu.

Od fizičko-hemijskih metoda za dokaz kvara mesa se najčešće koristi pH. Tokom vremena nakon klanja, pod dejstvom glikolitskih fermenta glikogen se pretvara u mlečnu kiselinu, koja pomera pH u kiselom smeru (glikolitska faza zrenja). Nakon toga počinje druga faza zrenja mesa, u kojoj proteolitski fermenti mesa dovode do stvaranja baznih jedinjenja, čime se i pH kreće u obrnutom smeru. Po završetku ove faze, meso počinje da se kvvari, jer se u njemu počinju javljati i krajnji raspadni proizvodi belančevinskih molekula koji još više podižu pH.

U proizvodima hladno dimljene pastrmke usled mikrobiološke aktivnosti, posebno mlečno-kiselinskih bakterija, stvaraju se sirćetna kiselina i druge organske kiseline (**Truelstrup i sar., 1996**). Nastali produkti razgradnje su kisela jedinjenja, čime se pH mesa tokom skladištenja snižava u vakuumu i pakovanjima gde laktobacili čine dominantu mikrofloru. Međutim, pH može i da raste ako su u mesu u većem broju prisutni mikroorganizmi čiji su produkti razgradnje, koji se nagomilavaju, bazna jedinjenja (amonijak, dimetilamin, trimetilamin) (**Stohr i sar., 2001**).

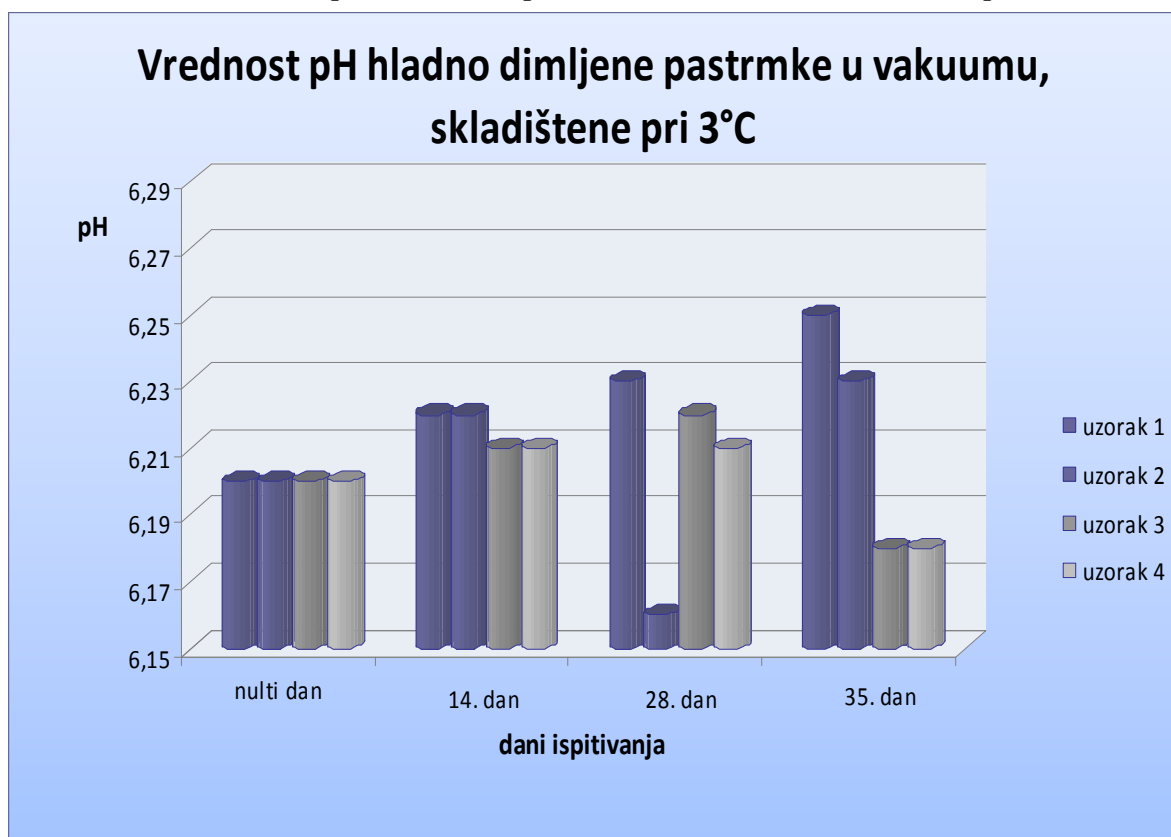
Na početku ispitivanja pH vrednost ispitivanih uzoraka hladno dimljene pastrmke bila je od $6,19 \pm 0,02$ do $6,21 \pm 0,01$. Na početku ispitivanja nisu utvrđene statistički značajne razlike između pH vrednosti ispitivanih uzoraka. Prema literaturnim podacima pH vrednost dimljene pastrmke kreće se od 5.8 do 6.3 (**Røra i sar., 1999; Baltić i Teodorović, 1997**), tako da su ispitane vrednosti pH uzoraka bile karakteristične za hladno dimljenu pastrmku.

Prema podacima iz literature, prilikom pakovanja ribe i proizvoda od ribe u smeši gasova koja sadrži ugljen dioksid, dolazi do smanjenja pH vrednosti, sa jedne strane kao posledica rastvorljivosti ugljen dioksida u tkivima, gde nastaje ugljena kiselina koja posledično dovodi do snižavanja pH, ali i zbog antimikrobne aktivnosti CO₂, koja dovodi do inhibicije rasta mikroorganizama usled čije bi mikrobiološke aktivnosti došlo do nakupljanja baznih komponenti koji bi inače nastajali mikrobiološkom razgradnjom (**Goulas i Kontominas, 2007; Kilibarda, 2010**).

Tokom ispitivanja u uzorcima je primećen blagi porast pH vrednosti koja je bila u stalnom porastu, sve do 35.dana skladištenja i ispitivanja, što je u skladu i sa rezultatima koja su sproveli **Chen i Xiong (2008)** i **Stamatis i Arkoudelos (2007)**. Ovaj porast pH vrednosti može da se pripiše metaboličkoj aktivnosti mikroflore uzoraka koji su bili aktivniji u uzorcima čuvanim u neadekvatnom režimu temperature (8°C), i u filetima pakovanim u smeši gasova.

U ovom ispitivanju, na kraju perioda skladištenja (35.dan) i čuvanja uzoraka hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu pri temperaturi od 3°C, pH vrednosti bile su od 6,23±0,03 do 6,25±0,05.

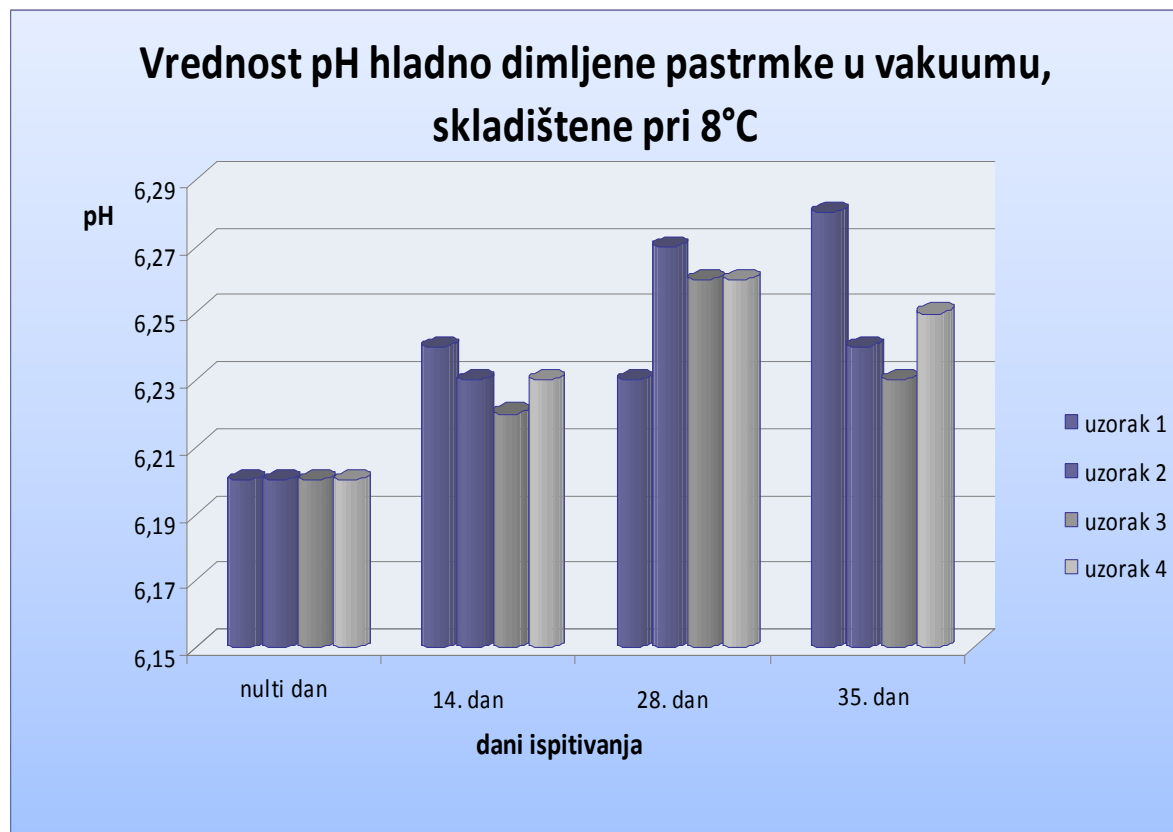
Grafikon 6.14. Vrednosti pH u uzorcima pakovanim u vakuum i skladištenim pri 3°C



Na kraju ispitivanja (35.dan) grupe uzoraka hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu pri temperaturi od 8°C pH vrednost bila je od 6,23±0,02 do 6,28±0,07.

Poređenjem porasta pH u uzorcima u vakuum pakovanim proizvodima primećeno je da je pH u uzorcima koji su skladišteni na temperaturi od 8°C imali više vrednosti pH.

Grafikon 6.15. Vrednosti pH u uzorcima pakovanim u vakuum i skladištenim pri 8°C

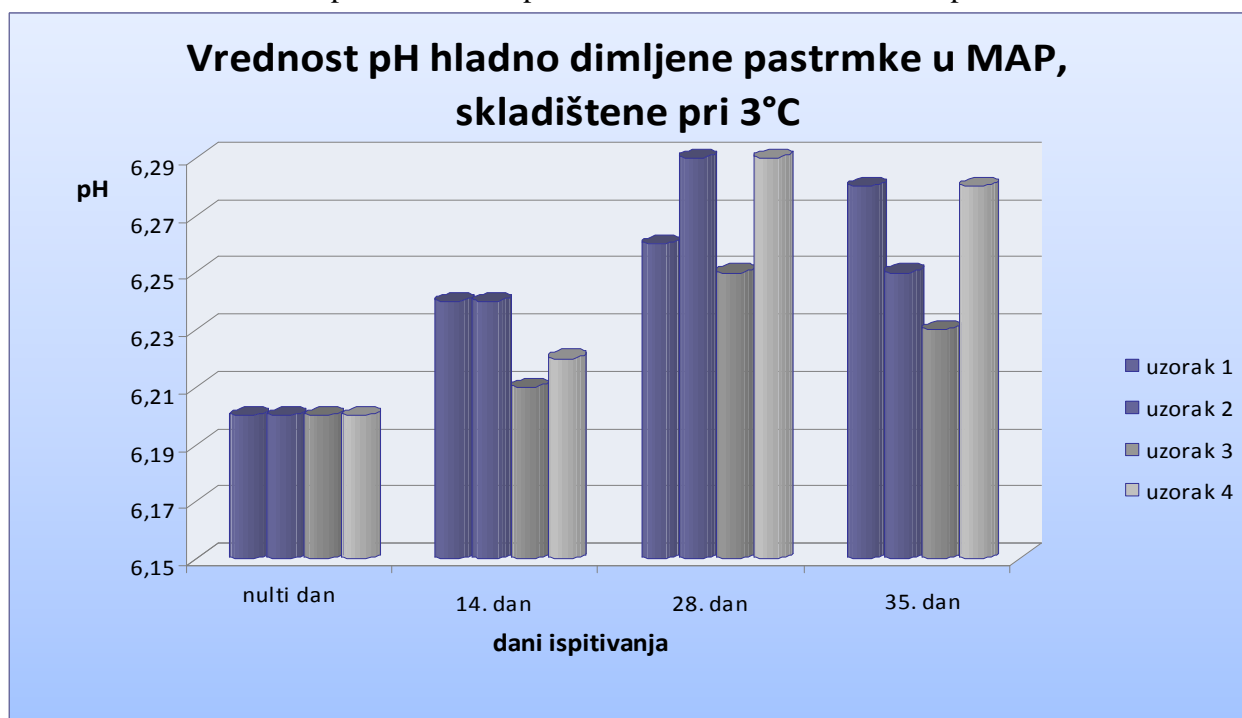


Goulas i Kontominas (2007) su dokazali da nakupljanje visoko isparljivih baza (amonijak, trimetilamin, dimetilamin) predstavlja posledicu mikrobiološke aktivnosti. Relativno stabilne pH vrednosti u toku skladištenja hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i čuvane na 3°C, ustanovili su i **Bogueño i sar. (2003)**.

U uzorcima pakovanim u modifikovanoj atmosferi, pH vrednost je u uzorcima koji su skladišteni na 8°C brže rasla od onih čuvanih na 3°C.

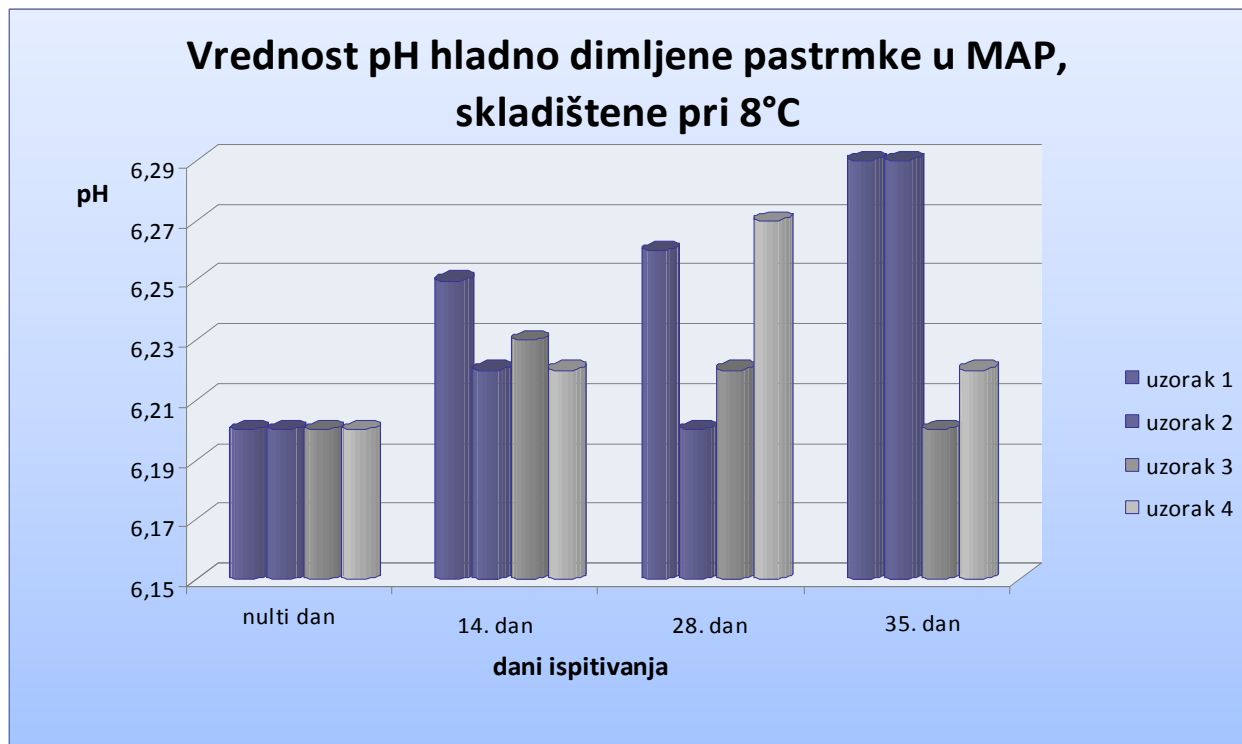
U ovom ispitivanju, na kraju perioda skladištenja (35.dan) i čuvanja uzoraka hladno dimljene pastrmke pakovane u pakovanjima modifikovane atmosfere pri temperaturi od 3°C, pH vrednosti bile su od 6,23±0,01 do 6,28±0,03.

Grafikon 6.16. Vrednosti pH u uzorcima pakovanim u MAP i skladištenim pri 3°C



Na kraju ispitivanja (35.dan) grupe uzoraka hladno dimljene pastrmke pakovane u modifikovanoj atmosferi pri temperaturi od 8°C pH vrednost bila je od 6,30±0,06 do 6,46±0,17.

Grafikon 6.17. Vrednosti pH u uzorcima pakovanim u MAP i skladištenim pri 8°C



Sankar i sar. (2008) tokom svojih ispitivanja su ustanovili da u mesu riba dolazi do blagog rasta pH vrednosti u svim grupama uzoraka koje su bile pakovane u različitim smešama gasova.

Do sličnih rezultata i zaključaka došli su i drugi naučnici (**Ruiz-Capillas i Moral, 2005; Erkan i sar., 2006**) koji su ispitivali održivost mesa ribe i proizvoda od ribe pakovanih u smeši gasova.

V.7. Senzorne ocene prihvatljivosti mirisa hladno dimljene pastrmke

Senzorne karakteristike kao što su izgled, tekstura, boja, miris i ukus mesa ribe se ocenjuju ljudskim čulima i upravo se ti parametri prate za monitoring kvaliteta hladno dimljenih proizvoda od ribe **(Olafsdottir i sar., 2005)**.

Primarni značaj se poklanja mirisu, kao parametru kvaliteta hladno dimljene ribe **(Jonsdottir i sar., 2008)**. Hemijskom analizom se najčešće ne mogu utvrditi specifičnosti mirisa i ukusa, pa je analiza profila mirisa i ukusa namirnice najsloženija metoda senzorne analize **(Baltić i sar., 2000)**.

Razlog nastanka nepoželjnih mirisa kao senzornih indikatora kvara jesu isparljive materije koje najčešće stvaraju bakterije (trimetilamin, isparljiva sumporna jedinjenja, aldehidi, ketoni, estri, hipoksantin) **(Olafsdottir i sar., 2005)**. Trimetilamin je odgovoran za tipičan oštar miris (miris na ribu) koji se javlja u mesu ribe kao indikator kvara. Pozitivna korelacija utvrđena je između količine ukupne isparljive azotne supstance i trimetilamina, ukupnog broja bakterija i mirisa na amin, ukusa na amin, gorkog ukusa i mekane konzistencije **(Cardinal i sar., 2004)**.

Iz tabela 5.22. i 5.23. (u poglavlju *Rezultati ispitivanja*) se vidi da se prosečne ocene mirisa hladno dimljene ribe u toku skladištenja pri različitim temperaturama smanjuju.

Nultog dana ispitivanja nisu utvrđene razlike između prosečnih senzornih ocena mirisa hladno dimljene ribe. Senzorne ocene mirisa hladno dimljene pastrmke na početku ispitivanja bile su od $4,93 \pm 0,07$ do $4,96 \pm 0,04$ i nisu se međusobno statistički značajno razlikovale (ocena 5 označava uzorak bez mana mirisa, a ocena ispod 2,5 uzorak neprihvatljivog mirisa).

Tako je kod vakuumiranih uzoraka skladištenih pri 3°C prosečna ocena nultog dana ispitivanja bila $4,93 \pm 0,07$, a 35. dana $3,20 \pm 0,17$, dok je pri 8°C prosečna ocena nultog dana ispitivanja bila $4,95 \pm 0,06$, a 35. dana $2,61 \pm 0,11$. Slični rezultati dobijeni su i kod uzoraka pakovanih u modifikovanu atmosferu.

Iz prosečnih ocena uzoraka pakovanih u vakuum odnosno MAP, a skladištenih pri 8°C može se zaključiti da su pojedinačne ocene ocenjivača u pojedinim slučajevima bile manje od 2,50, što se smatra granicom prihvatljivosti.

Leroi i sar. (1998) i **Trulestrup i sar. (1998)** su takođe utvrdili, ispitivanjem uzoraka hladno dimljene vakuumirane pastrmke da tokom skladištenja izraženost mirisa i ukusa na dim opada, postaje neutralnija i blaža, a da ukupna procena prihvatljivosti mirisa opada. **Dondero i sar. (2004)** su opisali i pojasnili razlog nastanka neprijatnih mirisa.

Prosečne senzorne ocene mirisa uzoraka hladno dimljene pastrmke različitih pakovanja (vakuum, MAP), pri različitim temperaturama (3°C i 8°C) bile su u većini slučajeva statistički značajno različite ($p < 0.01$; $p < 0.05$) u istim danima poređenja (0., 14., 28. i 35. dana).

Takođe, utvrđene su i statistički značajne razlike ($p < 0.01$; $p < 0.05$) između prosečnih senzornih ocena mirisa hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum, odnosno MAP i skladištene pri temperaturama od 3°C, odnosno 8°C u različitim danima ispitivanja.

Senzorne ocene prihvatljivosti mirisa uzoraka hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum odnosno modifikovanu atmosferu su se značajno smanjivale u toku skladištenja, što je bilo izraženije kod uzoraka skladištenih pri višim temperaturama (8°C) i uzoraka pakovanih u modifikovanu atmosferu.

VIII - Zaključci

1. U toku 35 dana skladištenja pri 3°C, odnosno 8°C uzoraka hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum, odnosno u modifikovanoj atmosferi, ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija rastao je u zavisnosti od ispitivane grupe do 14. odnosno 28. dana, da bi 35.dana bio na nivou broja bakterija nultog dana ispitivanja ili manji.
Prosečan ukupan broj bakterija u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum, odnosno u modifikovanoj atmosferi bio je tokom ispitivanja manji u uzorcima koji su skladišteni pri nižim temperaturama.
Način pakovanja (vakuum, modifikovana atmosfera) i skladištenje pri istim temperaturnim uslovima (3°C ili 8°C) u većini slučajeva ne utiče značajno na razlike u ukupnom broju aerobnih mezofilnih bakterija.
2. Promene broja četiri različita serotipa bakterije *Listeria monocytogenes* pokazuju da u toku skladištenja porast broja bakterija od nultog do 14. odnosno 28.dana skladištenja zavisi od načina pakovanja (vakuum, modifikovana atmosfera), temperaturnih uslova čuvanja uzoraka (3°C ili 8°C) i serotipa *Listeria monocytogenes*.
Kod sva četiri serotipa *Listeria monocytogenes* utvrđeno je značajno smanjenje broja bakterija 35.dana skladištenja u odnosu na 28.dan skladištenja.
3. Broj mlečno-kiselinskih bakterija u uzorcima hladno dimljene pastrmke pakovanih u vakuum, odnosno modifikovanu atmosferu rastao je tokom skladištenja do 35.dana, pri temperaturama od 3°C, odnosno 8°C. Porast broja mlečno-kiselinskih bakterija bio je značajniji kod uzoraka skladištenih pri višim temperaturama i uzoraka pakovanih u modifikovanoj atmosferi.

4. U toku ispitivanja (nultog, 14., 28. i 35. dana) iz uzoraka dimljene pastrmke nisu izolovane *Salmonella spp.* i koagulaza pozitivne stafilokoke, a takođe nije utvrđeno ni prisustvo sulfitoredujućih klostridija.
5. Osnovni hemijski sastav (sadržaj vode, proteina, masti, pepela), sadržaj soli i aw vrednost bili su karakteristični za hladno dimljenu pastrmku.
6. U toku skladištenja pH vrednost hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum, odnosno modifikovanu atmosferu i skladištene pri 3°C, odnosno 8°C je stalno rasla. Porast pH vrednosti bio je značajniji kod uzoraka skladištenih pri 8°C i uzoraka pakovanih u modifikovanu atmosferu.
7. Senzorne ocene prihvatljivosti mirisa uzoraka hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum odnosno modifikovanu atmosferu su se značajno smanjivale u toku skladištenja, što je bilo izraženije kod uzoraka skladištenih pri višim temperaturama (8°C) i uzoraka pakovanih u modifikovanu atmosferu.

VIII SPISAK LITERATURE

1. Aase B., Rørvik, L.M. (1997). *L.monocytogenes* og kaldrøyking. *Næringsmiddelindustrien*, 50-54.
2. Ababouch, L. (2000). Potential of Listeria hazard in African fishery products and possible control measures. *International Journal of Food Microbiology* 62(3): 211-215.
3. Allerberger F., (2003). *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology, *FEMS, Immunol Med Microbiol* 35: 183-189
4. Al-Holy, M., Al-Qadiri, H., Lin, M., Rasco, B. (2006). Inhibition of *Listeria innocua* in hummus by a combination of nisin and citric acid, *Journal of Food Protection*, Vol. 69, No 6, 1322-1327.
5. Altieri C., Maruotti G., Natale C., Massa S. (1999). In vitro survival of *Listeria monocytogenes* in human amniotic fluid, *Zentralbl Hyg Umweltmed* 202: 377-382
6. Altimira J., Prats N., Lopez S., Domingo M., Briones V., Dominguez L., Marco A. (2000). Effect of selenium deficiency on the development of central nervous system lesions in murine listeriosis, *J Comp Pathol* 123:104-109
7. *An Association of Food and Drug Officials* (1991, revised 1997). Cured, Salted, and Smoked Fish Establishments Good Manufacturing Practices.
8. Anon (2013). http://en.wikipedia.org/wiki/Smoked_fish
9. Anon (2008). Technical Guidance Document On shelf – life studies for *Listeria monocytogenes* in ready –to-eat foods. EU Community reference laboratory for *Listeria monocytogenes*. Working document, Version 2-November 2008.
10. Anon (2006). European Commission, 2006. Regulation (EC) No 1831/2006 of 19 december 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal of the European Community* L364, 5.
11. Anon (2005). Official Journal of the European Union COMMISSION REGULATION (EC) No 2074/2005 of 5 december 2005.
12. Anon (2003a). Nutritional aspects of fish, Bord Iascaigh Mhara/Irish Sea Fisheries Board P.O. Box No.12, Crofton Road, Dun Laoghaire, Co. Dublin, www.bim.ie
13. Anon (2003b). Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za ribe, rakova, školjkaše, morske ježeve, morske krastavce, žabe, kornjače, puževe i njihove proizvode, *Sl.list SRJ, br 6/2003 i Sl.list SCG, br.56/2003 i 4/2004*.
14. Anon (1999). Pravilnik o kvalitetu i drugim zahtevima za ribe, rakove, školjkaše, morske ježeve, morske krastavce, žabe, kornjače, puževe i njihove proizvode, *Sl.list SRJ, br.6/2003 i Sl.list SCG br.56/2003 i 4/2004*.

15. Anon (1999). Federal Agriculture Organization, www.fao.org
16. Anon (1998a). ICMFS – International Commission of Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in Foods 6. *Microbial Ecology of Food Commodities*. Blackie Academic and Professional, Baltimore.
17. Anon (1998b). Food and Drug Administration. *Fish and Fisheries Products Hazards & Controls Guide*. 2nd ed. Washington D.C. : FDA, Office of Seafood. 276p.
18. Anon (1979). Recommended International Code of Practice for Smoked Fish, *Codex Alimentarius*, Vol.9, CAC/RCP25.
19. ANZFA – *The Australian New Zealand Food Authority*. (2002). Draft microbiological risk assessment; *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon, April, 2002.
20. Apostolos, S.A., Koutsoumanis, K. (2006). Prevalence and concentration of *Listeria monocytogenes* in sliced ready-to-eat meat products in the Hellenic Retail Market. *Journal of Food Protection*, Vol. 69. No 4, 938-942.
21. Arnold R, Konig W. (1998). Interleukin-8 release from human neutrophils after phagocytosis of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica*, *J Med Microbiol* 47: 55-62
22. Arashisar, Ş., Hisar, O., Kaya, M., Yanik, T. (2004). Effect of modified atmosphere and vacuum packaging on microbiological and chemical properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *International Journal of Food Microbiology* 97, 209-214.
23. Arkoudelos, J., Stamatis, N., Samaras, F. (2007). Quality attributes of farmed eel (*Anguilla anguilla*) stored under air, vacuum and modified atmosphere packaging at 0°C. *Food Microbiology*, 24, 728-735.
24. Aske, I., Midling, K. Ø. (2001). Slaughtering of Atlantic halibut (*Hippoglossus*), Effects on Quality and storage capacity. In: Kestin, S.C., Warriss, P.D. (Eds.), *Farmed Fish Quality*. Blackwell. Oxford, UK, p.381
25. Baek S.Y., Lim S.Y., Lee D.H., Min K.H. (2000). Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* from domestic and imported foods in Korea, *J Food Prot* 63: 186-189.
26. Baker M., Brett M., Short P., Calder L., Thointon T. (1993). Listeriosis and mussels, *Communicable Dis NZ* 93: 13-14.
27. Bakočević, I. (2011). Konzervansi, uvod i klasifikacija. www.tehnologijahrane.com
28. Baltić, Ž.M., Kilibarda, N., Gopčević, K., Dimitrijević, M., Sando, D. (2006). Činioci od značaja za kvalitet dimljene ribe, *Zbornik kratkih sadržaja, 12. Savjetovanje veterinaru Republike Srpske, Teslić*.
29. Baltić, Ž.M., Kilibarda, N., Bjelajac, B., Karabasil, N., Teodorović, V., Dimitrijević, M. (2006). Policiklična aromatična hidrokarbonilna jedinjenja u dimljenim proizvodima od mesa, *Zbornik apstrakta, I Međunarodni kongres „Ekologija, zdravlje, rad, sport“ Banja Luka*.
30. Baltić, Ž.M., Tadić, R. (2001). Proizvodnja i potrošnja mesa riba u svetu i kod nas, *Tehnologija mesa*, 42, 5-6, 345-357.

31. Baltić, Ž.M., Teodorović, V. (1997). Higijena mesa riba, rakova i školjki, udžbenik, Veterinarski fakultet, Beograd
32. Baranyi, J., Roberts, T.A. (2000). Principles and application of predictive modeling of the effects of the preservative factors of microorganisms, In:Lund, B.M., Beird-Parker, A.C., Gould, G.W. *The Microbiological Safety and Quality of Foods*, Gaithersburg, MD:Aspen , 2000; 342-58.
33. Barbosa-Canovas, G.V., Pothakamury, U.R., Swanson, B.G. (1995). State of the art technologies for the sterilization of foods by non-thermal processes: physical methods, In: Barbosa-Canovas, G.V., Welte-Chanes, J., *Food preservation by moisture control: Fundamental s and Applications*, Lancaster, PA, Technomic: 493-532.
34. Barnett, H.J., Stone, F.E., Roberts, G.C., Hunter, P.J., Nelson, R.W., Kwok, J. (1982). A study in the use of a high concentration of CO₂ in a modified atmosphere to preserve fresh salmon. *Marine Fisheries Review*, 44, 7-11.
35. Beauregard K.E., Lee K.D., Collier R.J., Swanson J.A. (1997). pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes* , *J Exp Med* 186: 1159-1163.
36. Beuchat, L.R., Nail, B.V., Adler, B.B., Clavero, MR.S. (1998). Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes and lettuce. *J.Food Prot.* 61, 1305-1311.
37. Beumer R.R., Hazeleger W.C. (2003). *Listeria monocytogenes*: diagnostic problems. *FEMS, Immunol Med Microbiol* 35: 191-197.
38. Birkeland, S., Røra, A.M.B., Skara, T., Bjerkgeng, B. (2004). Effects of cold smoking procedures and raw material characteristics on product yield and quality parameters of cold smoked Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fillets. *Food Research International*, 37, 273-286.
39. Bourgeois N., Jacobs F., Travares M.L. (1993). *Listeria monocytogenes* hepatitis in a liver transplant recipient: a case report and review of the literature, *J.Hepatol* 18: 284-289 .
40. Boerlin P., Piffaretti J.C. (1991). Typing of human, animal, food and environmental isolates of *Listeria monocytogenes* by multilocus enzyme electrophoresis, *Appl Envirom Microbiol* 57: 1642-1629.
41. Boerlin P., Rocourt J., Grimont F., Grimont P.A.D., Jacquet C., Piffaretti J.C. (1992). *Listeria ivanovii* subsp. *Londoniensis* subsp.nov, *Int J Syst Bacteriol* 42: 69-73.
42. Bower, C., Hietala, K. (2010). Stabilizing Smoked Salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) Tissue after Extraction of Oil. *Journal of Foos Science*, Vol, 75, No 3.
43. Braun L., Ohayon H., Cossart P. (1998). The InlB protein of *Listeria monocytogenes* in sufficient to promote entry into mammalian cells, *Mol Microbiol* 27: 1077-1087.
44. Bremer P.J., Fletcher G.C., Osborne C. (2003). *Listeria monocytogenes* in seafood, *Food Research Limited, New Zealand Institute for crop and Food research limited*

45. Brett M.S.Y., Short P., McLauchlin J. (1998). A small outbreak of listeriosis associated with smoked mussels, *Int J Food Microbiol* 43: 223-229.
46. Bugueño, G., Esrache, I., Martinez-Navarrete, N., Camacho, M., Chiralt, A. (2003). Influence of storage conditions on some physical and chemical properties of smoked salmon (*Salmo salar*) processed by vacuum impregnation techniques. *Food Chemistry*, 81, 85-90.
47. Bula C., Bille J., Glauser M.P. (1995). An epidemic of food-borne listeriosis in Western Switzerland. Description of 57 cases involving adults, *Clin Infect Dis* 20: 66-72.
48. Bunčić S. (1991). The incidence of *Listeria monocytogenes* in slaughtered animals, in meat, and in meat products in Yugoslavia, *Int J Food Microbiol* 12: 173-180.
49. Bunčić S., Avery S.M., Rogers A.R. (1996). Listeriolysin O production and pathogenicity of non-growing *Listeria monocytogenes* stored at refrigeration temperature, *Int J Food Microbiol* 31: 133-147.
50. Bøknæs, N., Jensen, K.N., Guldager, H.S., Østerberg, C., Nielsen, J., Dalgaard, P. (2002). Thawed chilled Barents cod fillets in modified atmosphere packaging-manufacturing practice. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 35, 436-443.
51. Cabanes D., Dehoux P., Dussurget O., Frangeul L., Cossart P. (2002). Surface proteins and the pathogenic potential of *Listeria monocytogenes*, *Trends Microbiol* 10: 238-245
52. Caglak, E., Cakli, S., Kilinc, B. (2008). Microbiological, chemical and sensory packaging. *European Food Research Technology*, 226: 1293-1299.
53. Cardinal, M., Cornet, J., Serot, T., Baron, R. (2006). Effect of the smoking process on odour characteristics of smoked herring (*Clupea harengus*) and relationships with phenolic compound content, *Food Chemistry*, 96, 137-146.
54. Cardinal, M., Gunnlaugsdottir, H., Bjornevik, M., Ouisse A., Vallet, J.L., Leroi, F. (2004). Sensory characteristics of cold-smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) from European market and relationships with chemical, physical and microbiological measurements, *Food Research International*, 37, 181-193.
55. Cardinal, M., Knockaert, C., Torrissen, O. Sigurgisladottir, S., Mørkøre, T., Thomassen, M., Vallet, J.L. (2001). Relation of smoking parameters to the yield, colour and sensory changes of seabass (*Lateolabrax japonicus*) under partial freezing and refrigerated storage. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 46, 682-686.
56. CDC (1999). Update: Multistate outbreak of Listeriosis in the United States 1998-1999, *Morb Mort Wkly Rep* 47: 1117-1118.
57. Chen, G., Xiong, Y.L. (2008). Shelf life enhancement of precooked red claw crayfish (*Cherax qudricarinatus*) tails by modified atmosphere packaging nad related technologies. *Trends in Food Science & Technology*, Vol 5, 345-352.

58. Christian, J.H.B. (2000). Drying and reduction in water activity, In:Lund, B.M., Beird-Parker, A.C., Gould, G.W. *The Microbiological Safety and Quality of Foods, Gaithersburg, MD:Aspen* , 2000;146-74.
59. Colburn, K.G., Kaysner, C.A., Abeyta, C., Wekeel, M. (1990). *Listeria* species in a California Coast Estuarine Environment. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (7): 2007-2011.
60. Conlan J.W., North R.J. (1992). Roles of *Listeria monocytogenes* virulence factors in survival: virulence factors distinct from listeriolysin are needed for the organism to survive an early neutrophil-mediated host defense mechanism, *Infect Immun* 60: 951-957.
61. Conte M.P., Longhi C., Polidoro M., Petrone G., Seganti L., Valenti P. (2000). Modulation of actA gene expression in *Listeria monocytogenes* by iron, *J Med Microbiol* 49: 681-683
62. Conte M.P., Petrone G., A.M. di Biase, Ammendolia M.G., Superi F., Seganti L. (2000). Acid tolerance in *Listeria monocytogenes* influences invasiveness of enterocyte-like cells and macrophage-like cells, *Microbiol Patholog* 29: 137-144
63. Conway, W.S., Leverentz, B., Saftner, R.A., Janisiewicz, W.J., Sams, C.E., Leblance E. (2000). Survival and growth of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut apple slices and its interaction with *Glomerella cingulata* and *Penicillium expansum*. *Plant.Dis.* 84, 177-181.
64. Cornforth, D., Hunt, M. (2008). Low-Oxygen Packaging of Fresh Meat with Carbon Monoxide. Meat Quality, Microbiology and Food Safety. *The American Meat Science Association. White paper series*, No 2.
65. Cornu M., Beaufort A., Rudelle S., Laloux L., Bergis H., Miconnet N., Serot T., Delignette-Muller M.L. (2006). Effect of temperature, water-phase salt and phenolic contents on *Listeria monocytogenes* growth rates on cold-smoked salmon and evaluation of secondary models, *Int J of Food Microbiology* 106, 159-168.
66. Cortes, M.L., Sarli, T., Santoro, A., Murru, N., Pepe, T. (1997). Distribution and behaviour of *Listeria monocytogenes* in three lots of naturally contaminated vacuum packed salmon stored at 2 and 10°C. *Journal of Food Microbiology*, 37: 209-214.
67. Cossart P., Lecuit M. (1998). Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling, *EMBO J* 17: 3797-3806
68. Cossart P., Vicente M.F., Menguard J., Baquero F., Perez-Diaz J.C., Berche P. (1989). Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation, *Infect Immun* 57: 3629-3636
69. Crnčević, V. (1980). Ambalaža za životne namirnice, Privredni pregled, Beograd.
70. Cuq, B., Gontard, N., Guilbert, S. (1995). Edible films and coatings as active layers, in Rooney, M.L.: *Active Food Packaging, Blackie Academic & Professional*.

71. Curaković, M., Gvozdrenović, J., Lazić, V. Umnoženi delovi predavanja iz knjige „Ambalaža i Pakovanje“ (u štampi).
72. Curaković, M., Vujković, I., Gvozdrenović, J. (1984). Kontrola ambalažnih materijala i ambalaže, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
73. Cutter, C.N. (2002). Microbial control by packaging: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(2):151-161.
74. Cvrtila, Ž., Kozačinski, L. (2006). Kemijski sastav mesa riba, *Meso*, Vol VII, br.6, 365-370
75. Czuprynski C.J., Haak-Frendscho M. (1997). Non specific resistance mechanisms to listeriosis: implications for experimental and naturally occurring infection, *Immunol Rev* 158: 47-56
76. Czuprynski C.J. (1994). Host defense against *Listeria monocytogenes*: implications for food safety, *Food Microbiology* 11: 131-147
77. Ćirković, M., Jovanović, B., Maletin, S. (2002). Ribarstvo, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad
78. Danielli, D., Gontard, N., Spyropoulos, D., Zondervan-van den Beuken, E., Tobback, P. (2008). Active and intelligent food packaging: legal aspects and safety concerns. *Review in Trends in Food Science & Technology*, 19, S99-S108.
79. Dalgaard P., Jorgensen, L.V. (1998). Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold-smoked salmon. *Int. J. Food Microbiology* 40.,105-115
80. Dalton C.B., Austin C.C., Sobel J., Hayes P.S., Bibb W.B., Graves L.M., Swaminathan B., Proctor M.E., Griffin P.M. (1997). An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk, *N Engl J Med* 336: 100-105
81. Davies A.R., Capell C., Jehanno D., Nychas J.E.G., Kirby R.M. (2001). Incidence of foodborne pathogens on European fish, *Food Control* 12: 67-71
82. Dauphin G., Ragimbeau C., Malle P. (2001). Use of PFGE typing for tracing contamination with *Listeria monocytogenes* in coldsmoked salmon processing plants, *International Journal of Food Microbiology* 64: 51– 61
83. de Pablo M.A., Puertollano M.A., Galvez A., Ortega E., Gaforio J.J., Alvarez de Cienfuegos G. (2000). Determination of natural resistance of mice fed dietary lipids to experimental infection induced by *Listeria monocytogenes*, *FEMS Immunol Med Microbiol* 27: 127-133
84. Decatur A.L., Portnoy D.A. (2000). A PEST-like sequence in listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity, *Science* 290: 992-995
85. Destro, M.T. (2000). Incidence and significance of *Listeria* in Fish and Fish products from Latin America. *Journal of Food Protection* 62 (3): 1919-196.

86. Devlieghere, F., Debevere, J., Van Impe, J. (1998). Concentration of carbon dioxide in the water-phase as a parameter to model the effect of a modified atmosphere on microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 105-113.
87. Dhanashree B., Otta S.K., Karunasagar I., Goebel W. (2003). Incidence of *Listeria spp.* in clinical and food samples in Mangalore, India, *Food Microbiology* 20: 447-453
88. Dillon, R.M., Patel, T.R. (1992). *Listeria* in seafood: A review. *Journal of Food Protection* 55 (12): 1009-1015.
89. Dillon, R.M., Patel, T.R., Ratnam, S. (1994). Occurrence of *Listeria* in hot and cold smoked seafood products. *Int. J. Food Microbiology*, 22: 73-77.
90. Dimitriadou, D., Zotos, A., Petridis, D., Taylor, A.K.D.I. (2008). Improvement in the Production of Smoked Trout Fillets (*Salmo Gairdnerii*) Steamed with Liquid Smoke. *Food Science and Technology International*, 14; 67-77.
91. Dimitrijević, M. (2007). Ispitivanje puteva kontaminacije i preživljavanja različitih sojeva *Listeria monocytogenes* u dimljenom mesu riba, Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu.
92. Dramsi S., Biswas I., Maguin E., Braun L., Mastroeni P., Cossart P. (1995). Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of inlB, a surface protein of the internalin multigene family, *Mol Microbiol* 16: 251-261
93. Drevets D.A. (1998). *Listeria monocytogenes* virulence factors that stimulate endothelial cells, *Infect Immunol* 66: 232-238
94. Doe, P.E., Sikorski, Z., Haard, N., Olley, J., Sun Pan, B. (1998). Basic Principals. In P.E.Doe, Fish drying and processing, Production and quality (pp.13-46) Lancaster: Tachnomic Publishing Co.
95. Dondero, M., Cisternas, F., Carvajal, L., Simpson, R. (2004). Changes in quality of vacuum packed cold smoked salmon (*Salmo salar*) as a function of storage temperature. *Food Chemistry* 87, 543-550.
96. Doyle M.E. (2001). Virulence Characteristic of *Listeria monocytogenes*, *Food Research Institute*, FRI Briefings, medoyle@facstaff.wisc.edu
97. Duffes, F. (1999). Improving the control of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon. Review. *Trends in Food Science & Technology*, 10, 211-216.
98. Dufresne, I., Smith, J.P., Liu, J.N., Tarte, I., Blanchfield, B., Austin, J.W. (2000). Effect of films of different oxygen transmission rate on toxin production by *Clostridium botulinum* type E in vacuum packaged cold and hot-smoked trout fillers. *Journal of Food Safety*, 20:251-68.
99. Eilertz I., Danielsson-Tham M.-L., Hammarberg K.-E. (1993). Isolation of *Listeria monocytogenes* from goat chesse associated with a case of listeriosis in goat, *Acta Vet Scand* 34: 145-149
100. Einen, O., Skrede, G. (1998). Quality characteristics in raw and smoked fillets of Atlantic salmon, *Salmo salar*, fed high-energy diets. *Aquaculture Nutrition*, 4: 99-108.

101. Eklund M.W., Poysky F.R., Paranjpye R.N., Lashbrook L.C., Peterson M.E., Pelroy G.A. (1995). Incidence and sources of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked fishery products and processing plants, *Journal of Food Protection* 58: 208-502
102. Embarek P.K.B. (1994). Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review, *Int J Food Microbiology* 23: 17-34
103. Ericsson H., Eklow A., Danielsson-Tham M.L., Lončarević S., Mentzing L.O., Persson L., Unnerstad H., Tham W. (1997). An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout, *J Clin Microbiol* 35: 2904-2907
104. Erkan, N., Özden, Alakavuk, D.Ü., Yildirim, Ş. Y., İnuğur, M. (2006). Spoilage and shelf life of sardines (*Sardina pilchardus*) packed in modified atmosphere. *European Food Research Technology*, 222: 667-673.
105. Espe, M., Kiessling, A., Lunestat, B., Torrissen, O., Røra, A.B. (2004). Quality of cold smoked salmon collected in one French hypermarket during a period of 1 year, *Lebensm. – Wiss. U.-Technol.*, 37, 627-638.
106. FAO (1999). FAO Fisheries Report. No604. Report of the FAO Expert Consultation on the Trade impact of *Listeria* in Fish Products. FAO Fish Utilisation and Marketing Service; FAO Food Quality and Standard Service. Amhest, MA, USA, 34p.
107. Farber J.M. (2000). Present situation in Canada regarding *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat seafood production, *Int J Food Microbiology* 62: 247-251
108. Fang, T.J., Lin, L.W. (1994). Growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fragi* on cooked pork ina modified atmosphere packaging/nisin combination system. *J.Food Protect.* 57:479-485.
109. Fang, T.J., Lin, L.W. (1994). Inactivation of *Listeria monocytogenes* on raw pork treated with modified atmosphere packaging and nisin. *J.Food Drug Anal.* 2: 189-200.
110. FDA-CFSAN (2003). Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods, Bacteriological Analytical Manual, chapter 10
111. FDA – Food and Drug Administration (2001). FDA publishes final rule to increase safety of fruit and vegetable juices. HHS News Jan. 18, 2001. <http://vm.cfsan.fda.gov/~lrd/hhsjuic4.html>
112. Finlay BB, 2001, Cracking Listeria's password, *Science* 292: 1665-1667
113. <http://foodsafety.unl.edu/ARMY/fish-wps/index.html> Water Phase Salt
114. Foucat, L., Ofstad, R., Renou, J.P. (2008). How is the first meat affected by technological processes? Graham A Webb (ed.) *Modern Magnetic Resonance*, 967-971.
115. Franciosa G., Tartaro S., Wedell-Neergaard C., Aureli P. (2001). Characterization of *Listeria monocytogenes* strains involved in invasive and noninvasive listeriosis outbreaks by PCR-based fingerprinting techniques, *Appl Environ Microbiol* 67: 1793-1799

116. Franzetti, L., Martinoli, S., Piegiovalli, L., Galli, A. (2001). Influence of active packaging on the shelf-life of minimally processed fish products in a modified atmosphere. *Packaging Technology and Science*, 14, 267-274.
117. Frederiksen B., Samuelsson S. (1992). Foeto-maternal listeriosis in Denmark 1981-1988, *J Infect* 24: 277-287
118. Fuentes, A., Fernandez-Segovia, I., Barat, J.M., Serra, J.A. (2010). Physicochemical characterization of some smoked and marinated fish products. *Journal of Food Processing and Preservation*, 34, 83-103.
119. Gahan, C.G.M., Collins, J.K., (1991). Listeriosis: biology and implications for the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 2:89-93.
120. Gahan C.G., Hill C. (1999). The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*, *Int J Food Microbiology* 50: 93-100
121. Gaillard J.L., Berche P., Frehel C., Gouin E., Cossart P. (1991). Entry of *Listeria monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci, *Cell* 65: 1127-1141
122. Gaillot O., Pellegrini E., Bregenholt S., Nair S., Berche P. (2000). The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*, *Mol Microbiol* 35: 1286-1294
123. Galdiero E., D'Isanto M., Aliberti F. (1997). Effect of saline concentration, pH and growth temperature on the invasive capacity of *Listeria monocytogenes*, *Res Microbiol* 148: 305-313
124. Geornaras I., A.von Holy. (2001). Antimicrobial susceptibilities of isolates of *Staphylococcus aureus*, *Listeria* species and *Salmonella* serotypes associated with poultry processing, *Int J Food Microbiol* 70: 29-35
125. Gibson, A.M., Ellis-Brownlee, R.-C.L., Cahill, M.E., Szabo, E.A., Fletcher, G.C., Bremer, P.J. (2000). The effect of 100% CO₂ on the growth of nonproteolytic *Clostridium botulium* at chill temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 54, 39-48.
126. Gilbert D.N., Moellering R.C., Sande M.A. (2001). The Snaford Guide to Antimicrobial Therapy 2001, *Antimicrobial Inc, Hyde Park, VT*
127. Gimenez, B., Dalgaard, P. (2004). Modelling and predicting the simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and spoilage microorganisms in cold smoked salmon, *Journal of Applied Microbiology*, 96, 96-109.
128. Gimenez, B., Roncales, P., Beltran, J. A. (2002). Modified atmosphere packaging of filleted rainbow trout. *Journal of Science of Food and Agriculture* 82: 1154-1159.
129. Giuffrida, A., Pennisi, L., Ziino, G., Fortino, L., Valvo, G., Marino, S., Panebianco, A. (2007). Influence of Slaughtering method on some aspects of quality of Gilthead and smoked rainbow trout. *Veterinary Research Communications*, 31, 437-446.
130. Goktepe, I., Moody, M.W. (1998). Effect of modified atmosphere packaging on the quality of smoked catfish. *Journal of Muscle Food*, 9, 375-389.

131. Gombas D.E., Chen Y., Clavero R.S., Scott V.N. (2003). Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods, *Journal of Food Protection* 66: 559-569
132. Gómez-Guillén, C., Gómez-Estaca, J., Gimenez, B., Montero, P. (2009). Alternative fish species for cold smoking process. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1525-1535.
133. González-Rodríguez, M.N., Sanz, J., Santos, J., Otero, A., García-López, M.L.(2002). Numbers and types of microorganisms in vacuum packed cold smoked freshwater fish in retail level, *International Journal of Food Microbiology*, 77, 161-168.
134. Goulas, A.E., Kontominas, M.G. (2007). Effect of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on the shelf life of refrigerated chub mackerel (*Scomber japonicas*): biochemical and sensory attributes . *European Food Research Technology*, 224: 543-553.
135. Gould, G.W., Lund, B.M., Baird-Parker, A.C. (2000). The Microbiological Safety and Quality of Foods, Gaithersburg, MD:Aspen.
136. Gregory J. (2000). An outbreak of ciguatera fish poisoning in Victoria, *Communicable Diseases Intelligence* 34: 344-346
137. Greiffenberg L., Goebel W., Kim K.S., Weiglein E., Bubert A., Engelbrecht F., Stins M., Kuhn M. (1998). Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells, *Infect Immun* 66: 5260-5267
138. Gudbjornsdottir, B., Jonsson, A., Hafsteinsson, H., Heinz, V. (2010). Effect of high pressure processing on *Listeria spp.* and on the textural and microstructural properties of cold smoked salmon. *Food Science and Technology*, 43, 366-374.
139. Guillén, M.D., Errecalde, M.C., Salméron, J., Casas, C. (2006). Headspace volatile components of smoked swordfish (*Xiphias gladius*) and cod (*Gadus morhua*) detected by means of solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 94, 151-156.
140. Guleria I., Pollard J.W. (2000). The trophoblast is a component of the innate immune system during pregnancy, *Nat Med* 6: 589-593
141. Hackney C.R., Dicharry A. (1988). Seafood-borne bacterial pathogens of marine origin, *Food Technology (March)*: 104-109
142. Hansen L.T., Gill, T., Røntved, S.D., Huss, H.H. (1996). Importance of autolysis and microbiological activity of quality of cold-smoked salmon. *Food Research International* 29, 181-188.
143. Harrington, R. (2011). Breakthrough natural preservative kills foodborne bacteria – research [On-line]available:<http://www.foodproductiondaily.com/Quality-Safety/Breakthrough-natural-preservative-kills-foodborne-bacteria-research>
144. Harvey N.P. (1995). Ciguatera fish poisoning outbreak in Brisbane, *Communicable Diseases Intelligence* 19: 666–668.

145. Haugen, J.E., Chanie, E., Westad, F, Jonsdottir, R., Bazzo, S., Labreche, S., Marcq, P., Lundby, F., Olafsdottir, G. (2006). Rapid control of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) quality by electric nose: Correlation with classical evaluation methods. *Sensors and Actuators B*, 116, 72-77.
146. Health Canada (2004). Policy on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat-foods, Food Directorate - Health Products and Food Branch- Health Canada pp. 1-19
147. Heintz M.L., Johnson J.M. (1998). The incidence of *Listeria* spp., *Salmonella* spp. and *Clostridium botulinum* in smoked fish and shellfish, *J Food Prot* 61: 318-323
148. Herbert, R.A., Sutherland, J.P. (2000). Chill storage, In:Lund, B.M., Beird-Parker, A.C., Gould, G.W. *The Microbiological Safety and Quality of Foods*, Gaithersburg, MD:Aspen , 2000; 101-21.
149. Hill, D.S. (2003). Present trends in food technology, Chapter 1 in *Pests of Stored Foodstuffs and Their Control* Kluwer Academic Publishers.
150. Holzapfel, W.H., Wood, B.J.B. (eds.). (1998). *The genera of lactic acid bacteria* (1st ed.). London Blackie Academic & Professional. [ISBN 0-7514-0215-X](#).
151. Hof H., Nichterlein T., Kretschmar M. (2000). When are *Listeria* in foods a health risk? *Trend Food Sci Technol* 5:185-190.
152. Hoffman A, Gall KL, Norton DM, Wiedmann M, 2003, *Listeria monocytogenes* contamination patterns for the smoked fish processing environment and for raw fish, *Journal of Food Protection* 66: 52-60
153. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams T.W. (2000). *Listeria*, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams and Wilkins Baltimore, MD, USA, Vol 9: 565-570
154. Hoover, D.G. (2000). Microorganisms and their products in preservation of foods, In:Lund, B.M., Beird-Parker, A.C., Gould, G.W. *The Microbiological Safety and Quality of Foods*, Gaithersburg, MD:Aspen , 2000; 251-76.
155. Hovda, M.B., Lunestad, B.T., Sivertsvik, M., Rosnes, J.T. (2007). Characterisation of the bacterial flora of modified atmosphere packaged farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*) by PCR-DGGE of conserved 16S rRNA gene regions. *International Journal of Food Microbiology* 117, 68-75.
156. Huang S., Stins M.F., Kim K.S. (2000). Bacterial penetration across the blood-brain barrier during the development of neonatal meningitis, *Microbes Infect* 2: 1237-1244
157. Huda Neetoo, Mu Ye, Haiqiang C. (2008). Potential antimicrobials to control *Listeria monocytogenes* in vacuum packaged cold-smoked salmon pate and filets, *Int. J. Of Food Microbiology* 123, 220-227.
158. Huss H.H., Jorgensen L.V., Vogel B.F. (2000). Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods, *International Journal of Food Microbiol* 62: 267-274
159. Huss H.H. (1995). Assurance of seafood quality, FAO Fisheries, Technical Paper No. 334, Rome: FAO

160. Huss HH. (1997). Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood, *Food Control* 8: 91-98
161. Ibrahim, S.M., Nassar, A.G., El-Badry, N. (2008). Effect of Modified Atmosphere Packaging and Vacuum Packaging Methods on Some Quality Aspects of Smoked Muller (*Mugil cephalus*). *Global Veterinaria*, 2(6):296-300.
162. ICMSF (1996). Microorganisms in foods 5, Characteristics of Microbial Pathogens *L. monocytogenes*, Blackie Academic and Professional, London, 141-182
163. Ingianni A., Floris M., Palomba P., Madeddu M.A., Quartuccio M., Pompei R. (2001). Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in foods, by a combination of PCR and DNA probe, *Mol Cell Probes* 15: 275-280.
164. Inoue S., Nakama A., Arai Y., Kokubo Y., Maruyama T., Saito A., Yoshida T., Terao M., Yamamoto S., Kumagai S. (2000). Prevalence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in retail foods in Japan, *Int J Food Microbiol* 59: 73-77
165. Inoue S., Katagiri K., Terao M., Maruyama T. (2001). RAPD- and actA gene-typing of *Listeria monocytogenes* isolates of human listeriosis, the intestinal contents of cows and beef, *Microbiol Immunol* 45: 127-133
166. Jack R.W., Tagg J.R., Ray B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive Bacteria. *Microbiol Rev* 59: 171-200.
167. Jawetz E., Melnick J.L., Adelberg A.E. (1998). *Listeria monocytogenes*, *Medical microbiology*, vol. 20: 189-190
168. Jemmi T., Keusch A. (1994). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in freshwater fish farms and fish-smoking plants, *Food Microbiology* 11: 309-316
169. Jensen A., Frederiksen W., Garner-Smith P. (1994). Risk factors for listeriosis in Denmark, 1989-1990 *Scand J Infect Dis* 26: 171-178
170. Jeyasekaran G., Karunasagar I., Karunasagar I. (1996). Incidence of *Listeria* spp. in tropical fish, *Int J Food Microbiol* 31: 333-340
171. Jin Y., Dons L., Kristensson K., Rottenberg M.E. (2001). Neural route of cerebral *Listeria monocytogenes* murine infection: role of immune response mechanisms in controlling bacterial neuroinvasion, *Infect Immun* 69: 1093-1100.
172. Jittinandana, S., Kenney, P.B., Slider, S.D., Kiser, R.A. (2002). Effect of brine food science, Vol. 67, No 6, 2095-2099.
173. Joffraud, J.J., Cardinal M., Cornet, J., Chasles, J.S., Leon, S., Gigout, F., Leroi, F. (2006). Effect of bacterial interactions on the spoilage of cold-smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 175-184.
174. Joffraud, J.J., Leroi F., Roy, C., Berdaque, J.L. (2001). Characterization of volatile compounds produced by bacteria isolated from the spoilage flora of cold smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*, 66, 175-184.

175. Johansson T., Rantala L., Palmu L., Honkanen-Buzalski T. (1999). Occurrence and typing of *Listeria monocytogenes* strains in retail vacuum-packed fish products and in a production plant, *International Journal of Food Microbiology* 47: 111-119
176. Jones D., Seeliger H.P.R. (1992). The genus *Listeria*, In: Ballows A., H.G.Truper, M. Dworkin, W. Harder, K.H.Schleifer (Eds.), 2nd edition. The Prokaryotes-A Handbook On the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications, Vol.II. Springer-Verlag, New York, pp.1595-1616
177. Jones E.M., McCulloch S.Y., Reeve D.S., MacGowan A.P. (1994). A 10 year survey of the epidemiology and clinical aspects of listeriosis in a provincial English city. *J Infect* 29: 91-103
178. Jónsdóttir, R., Ólafsdóttir, G., Chanie, E., Haugen, J.E. (2008). Volatile compounds suitable for rapid detection as quality indicators of cold smoked salmon (*Salmo salar*). *Food Chemistry*, 109, 335-349.
179. Jørgensen L.V., Huss H.H. (1998). Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood, *Int J Food Microbiology* 42: 127-131
180. Jurado R.L., Farley M.M., Pereira E., Harvey R.C., Schuchat A., Wenger J.D., Stephens D.S. (1993). Increased risk of meningitis and bacteremia due to *Listeria monocytogenes* in patients with human immunodeficiency virus infection, *Clin Infect Dis* 17: 224-227
181. Jukes, D. (2012). Food Additives in European Union. [On-line] UK: available <http://www.reading.ac.uk/foodlaw/additive.htm>
182. Karabasil, N., Dimitrijević, M., Teodorović, V., Kilibarda, N., Baltić, Ž.M. (2005). Najčešće bakterijske kontaminacije mesa riba. Zbornik predavanja, II Međunarodna konferencija „Ribarstvo“, Poljoprivredni fakultet, Beograd.
183. Karunasagar I., Karunasagar In. (2000). *Listeria* in tropical fish and fishery products, *Int J Food Microbiol* 62: 177-181
184. Katić, V. (2012). Opšti principi za utvrđivanje roka trajanja. Autorizovana predavanja, Fakultet veterinarske medicine, Beograd.
185. Kayal S., Lilienbaum A., Poyart C., Memet A., Israel A., Berche P. (1999). Listeryolisin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappa B and upregulation of adhesion molecules and chemokines, *Mol Microbiol* 31: 1709-1722
186. Kennedy, J., Jackson, V., Blair, I.S., McDowell, D.A., Cowan, C., Bolton, D.J. (2005). Food safety knowledge of consumers and the microbiological and temperature status of their refrigerators. *Journal of Food Protection*, 68, 1421-1430.
187. Kerry, J.P., O Grady, M.N., Hogan, S.A. (2006). Past, current and potential utilization of active and intelligent packaging systems for meat and muscle – based products: A review. *Meat Science*, 74,113-130.

188. *Kilibarda, N.* (2010). Upporedno ispitivanje odabranih parametara kvaliteta u toku skladištenja hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu i modifikovanoj atmosferi. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Beograd.
189. *Kilibarda, N., Baltić, Ž.M., Glamočlija, N.* (2009). Pakovanje hrane nekad i sad. *Veterinarski informator*, br.34/35.
190. *Kilibarda, N., Baltić, Ž.M., Dimitrijević, M., Karabasil, N., Teodorović, V.* (2009). Dimljena riba – proizvodnja i kvalitet. IV Međunarodna konferencija „Ribarstvo“ 27-29 maj, 2009. Poljoprivredni fakultet Beograd. Zbornik predavanja, str.296-306.
191. *Kilibarda, N.* (2006). Magistarska teza: Uticaj zamrzavanja na odabrane parameter kvaliteta dimljene pastrmke. Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu.
192. *Kim D., Reilly A., Lawrence D.A.* (2001). Relationships between IFN gamma, IL-6, corticosterone, and *Listeria monocytogenes* pathogenesis in BALB/c mice, *Cell Immunol* 207: 13-18
193. *Kimura, B., Kawasaki, S., Nakano, Fujii, T.* (2001). Rapid, Quantitative PCR monitoring of growth of *Clostridium botulinum* type E in modified atmosphere packaged fish, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67, No 1, 206-216.
194. *Klink M., Rudnicka W.* (1995). *Listeria monocytogenes* infection in pregnant mice: abnormalities in the function of non-adherent accessory light density dendritic cells, *FEMS Immunol Med Microbiol* 12: 143-152
195. *Klontz K.C., Adler W.H., Potter M.* (1997). Age-dependent resistance factors in the pathogenesis of foodborne infectious disease, *Aging-Clinical & Experimental Research* 9: 320-326
196. *Koprivica, G.* (2008). Aktivnost vode i konzervisanje namirnica. www.tehnologijahrane.com
197. *Kuhn M., Pfeuffer T., Greiffenberg L., Goebel W.* (1999). Host cell signal transduction during *Listeria monocytogenes* infection, *Arch Biochem Biophys* 372: 166-172
198. *Kuhn M., Goebel W.* (1999). Pathogenesis of *Listeria monocytogenes* , p.97-130. In Ryser E.T. and Marth E.H. (eds.), *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, New York
199. *Laciar A.L., O.N.P. de Centorbi* (2002). *Listeria* species in seafood: isolation and characterization of *Listeria spp.* from seafood in San Luis, Argentina, *Food Microbiology* 19: 645-651
200. *Lakshmanan, R., Miskin, D., Piggot, J.R.* (2005). Quality of vacuum packed cold smoked salmon during refrigerated storage as affected by high-pressure processing. *Journal of the American Dietetic Association*, Vol. 108, No. 7, 1125-1130.
201. *Lambaša, B.Ž., Gaćina, N., Radić, T.* (2005). Tehnologija hrane. Visoka škola za turistički menadžment, Šibenik.

202. Lappi, V.R., Ho, A., Gall, K., Wiedmann, M. (2004). Prevalence and growth of *Listeria* on naturally contaminated smoked salmon over 28 days of storage at 4 degrees C. *J. Food Prot.* 67 (5):1022-1026.
203. Leroi, F., Jouffraud, J., Chevalier, F. (2000). Effect of salt and smoke on the microbiological quality of cold smoked salmon during storage at 5C as estimated by the factorial design method. *Journal of Food Protection*, Vol. 63, No 4, 578-588.
204. Leroi, F., Jouffraud, J. (2000). Salt and smoke simultaneously affect chemical and sensory quality of cold smoked salmon during 5°C storage predicted using factorial design. *Journal of Food Protection*, 63(9), 1222-1227.
205. Leroi, F., Joffraud, J., Chevalier, F., Cardinal, M. (1998). Study of the microbial ecology of cold smoked salmon during storage at 8°C. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 111-121.
206. Limbo, S., Torri, L., Sinelli, N., Franzetti, L., Casiraghi, E. (2012). Evaluation and predictive modeling of shelf life of minced beef stored in high-oxygen modified atmosphere packaging at different temperatures. *Meat Science*, 84, 129-136.
207. Limbo, S., Torri, L., Sinelli, N., Franzetti, L., Casiraghi, E. (2010). Evaluation and predictive modeling of shelf life of minced beef stored in high oxygen modified atmosphere packaging at different temperatures. *Meat Science*, 84:129-136.
208. Lindquist R., Westoo A. (2000). Quantitative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in smoked or gravad salmon and rainbow trout in Sweden, *International Journal of Food Microbiology* 58: 181-196
209. Liston, J. (1980). Microbiology in fishery science. In: Conell, J.J. (ed.) *Advances in fishery science and technology*, Fishing News Books Ltd., Farnham, England, 138-157.
210. Lopez S., Marco A.J., Prats N., Czuprynski C.J. (2000). Critical role of neutrophils in eliminating *Listeria monocytogenes* from the central nervous system during experimental murine listeriosis, *Infect Immun* 68: 4789-4791
211. Lund, K.E., Nielsen, H.H. (2001). Proteolysis in salmon (*Salmo salar*) during cold storage; effects of storage time and smoking process. *Journal of Food Biochemistry*, 25, 379-395.
212. Lyhs, U., Lahtinen, J., Schelvis-Smit, R. (2007). Microbiological quality of maatjes herring stored in air and under modified atmosphere at 4°C and 10°C. *Food Microbiology*, 24:508-516.
213. Lyhs, U. (2002). Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products, Academic dissertation, Faculty of Veterinary Medicine, Universitet of Helsinki.
214. Lyhs, L., Björkroth, J., Korkeala, H. (1999). Characterisation of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum packaged, cold smoked rainbow trout using ribotyping. *International Journal of Food Microbiology*, 52: 77-84.
215. Lyhs, L., Björkroth, J., Hyytia, E., Korkeala, H. (1998). The spoilage flora of vacuum-packaged, sodium nitrite or potassium nitrate treated, cold-smoked rainbow trout stored at 4°C or 8°C. *International Journal of Food Microbiology*, 45, 135-142.

216. Lyver A., Smith J.P., Tarte J., Farber J.M., Nattress F.M. (1998). Challenge studies with *Listeria monocytogenes* in value-added seafood products stored under modified atmospheres, *Food Microbiology* 15: 379-389
217. Ljungh A, Wadstrom T (2009). *Lactobacillus Molecular Biology: From Genomics to Probiotics*. Caister Academic Press. [ISBN 978-1-904455-41-7](#).
218. Marriott, N. G., Gravani, R. B. (2006). Principles of Food Sanitation, Springer, USA.
219. Marsden K. (2002). Kombiniranje hrane, Leo komerc, Zagreb.
220. Martinez, O., Salmeron, J., Guillén, M.D., Casas, C. (2007). Sensorial and physicochemical characteristics of salmon (*Salmo salar*) treated by different smoking processes during storage. *Food Science and Technology International*, 13 : 477-484.
221. Martinez, L., Djenane, D., Cilla, I., Beltran, J.A., Roncales, P. (2006). Effect of varying oxygen concentrations on the shelf life of fresh pork sausages packaged in modified atmosphere. *Food Chemistry*, 94, 219-225.
222. Masniyom, P., Benjakul, S., Visessanguan, W.(2002). Shelf life extension of refrigerated seabass slices under modified atmosphere packaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 873-880.
223. Mayrhofer S., Paulsen P., Smulders J.M., Hilbert F. (2004). Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry, *Int J Food Microbiology* 97:23-29
224. Masuda T., Iwaya M., Miura H., Kokubo Y., Marumaya T. (1992). Occurrence of *Listeria* species in fresh seafood, *J Food Hyg Soc Japan* 33: 599-602
225. Marco A.J., Altimira J., Prats N., Lopez S., Dominguez L., Domingo M., Briones V. (1997). Penetration of *Listeria monocytogenes* in mice infected by the oral route, *Microb Pathog* 23:255-263
226. Marquis H., Doshi V., Portnoy D.A. (1995). The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells, *Infect Immun* 63: 4531-4534
227. McKay D.B., Lu C.Y. (1991). Listeriolysin as a virulence factor in *Listeria monocytogenes* infection of neonatal mice and murine decidual tissue, *Infect Immun* 59: 4286-4290
228. McLaughlin J. (1993). Listeriosis and *Listeria monocytogenes*, *Environ Policy Pract* 3:201-214
229. McLaughlin J., Mitchell R.T., Smerdon W.J., Jewell K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological assessment of foods, *Int J Food Microbiology* 92:15-33
230. McMillin, K.W. (2008). Where is MAP going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Science*, 80, 43-65.

231. Mena C., Almeida G., Carneiro L., Teixeira P., Hogg T., Gibbs P.A. (2004). Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiology* 21: 213-216
232. Miettinen M.K., Siitonen A., Neiskanen P., Haajanen H., Bjorkroth K.J., Korneala H.J. (1999). Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout, *J Clin Microbiol* 37:2358- 2360
233. Miettinen H., Wirtanen G. (2005). Prevalence and location of *Listeria monocytogenes* in farmed rainbow trout, *International J of Food Microbiology* 104: 135-143
234. Mišljenović, N. (2008). Primena zračenja kao metod konzervisanja namirnica. www.tehnologijahrane.com
235. Molin, G. (2000). Modified atmospheres, In:Lund, B.M., Beird-Parker, A.C., Gould, G.W. *The Microbiological Safety and Quality of Foods*, Gaithersburg, MD:Aspen , 2000; 214-34.
236. Monfort P., Minet J., Rocourt J., Piclet G., Cormier M. (1998). Incidence of *Listeria spp.* in Breton live shellfish, *Lett Appl Microbiol* 26: 205-208
237. Moors MA, Levitt B, Youngman P, Portnoy DA, 1999, Expression of listeriolysin O and ActA by intracellular and extracellular *Listeria monocytogenes*, *Infect Immun* 67:131-139
238. Mullan, W.M.A. (2002). Science and technology of modified atmosphere packaging. [On-line] UK: Available <http://www.dairyscience.info/index.php/packaging-/117-modified-atmosphere-packaging.html>
239. Muratore, G., Licciardello, F. (2005). Effect of vacuum and modified atmosphere packaging on the shelf life of liquid smoked Swordfish (*Xiphias gladius*) slices. *Journal of Food Science*, Vol.70, Nr. 5, 359-363.
240. Murcia, M.A., Martinez-Tome, Nicolas, M.C., Vera, A.M. (2003). Extending the shelf-life and proximate composition stability of ready to eat foods in vacuum or modified atmosphere packaging. *Food Microbiology*, 20, 671-679.
241. Nair S., Milohanic E, Berche P. (2000). ClpC ATPase is required for cell adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes*, *Infect Immun* 68: 7061-7068
242. Nakamura H., Hatanaka M., Ochi K., Nagao M., Ogasawara J., Hase A., Kitase T., Haruki K., Nishikawa Y. (2004). *Listeria monocytogenes* isolated from cold-smoked fish products in Osaka City, Japan, *Int J Food Microbiology* 94: 323-328
243. Neetoo, H., Chen H., Ye M., Joerger R.D., Hicks D.T., Hoover D.G. (2008). Use of nisin-coated plastic films to control *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged cold-smoked salmon, *Int J of Food Microbiology* 12,2 8-15.
244. Nemet, N. (2009). Ambalaža za pakovanje hrane. www.tehnologijahrane.com

245. Niedziela J.C., MacRae, M, Ogden, I.D., Nesvadba, P. (1998). Control of *Listeria monocytogenes* in salmon, antimicrobial effect of salting, smoking, and specific smoke compounds. *Food Sci. Techn. Lebensmittelwissenschaft Technol.* 31, 155-161.
246. Nilsson L., Huss H.H., Gram L. (1997). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon by nisin and carbondioxide atmosphere, *Int J Food Microbiol* 38:217-227
247. Nilsson L., Huss H.H., Gram L. (1999). Growth control of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora, *J Food Prot* 62:336-342
248. Nichterlein T., Domann E., Kretschmar M., Bauer M. (1996). Subinhibitory concentrations of β -lactams and other cell-wall antibiotics inhibit listeriolysin production by *Listeria monocytogenes*, *Int J Antimicrobial Agents* 7:75-81
249. Norton D.M., Scarlett J.M., Horton K., Sue D., Thimothe J., Boor K.J., Wiedmann D. (2001). Characterization and pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* isolates from the smoked fish industry, *Appl Environ Microbiol* 67: 646-653
250. Norton D.M., McCamey A., Gall K.L., Scarlett M., Boor K.J., Wiedmann M. (2001). Molecular studies on the ecology of *Listeria monocytogenes* in the smoked fish Industry, *Applied and Environmental Microbiology* 67: 198-205
251. Nørnung B. (2000). Microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in foods under special consideration of risk assessment approaches, *Int J Food Microbiol* 62:217-221
252. Notermans S., Hoornstra E. (2000). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in fish products: some general principles, mechanism of infection and the use of performance standards to control human exposure, *International Journal of Food Microbiology* 62: 223-229
253. Notermans, S., Dufrenne, J., Lund, B.M. (1990). Botulism risk of refrigerated precessed foods od extended durability. *J Food Protect* 53:1020-24.
254. Novaković B., Mirosavljev M. (2005). Higijena ishrane, Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet.
255. Obradović D., Tehnološka mikrobiologija, 2002-2003.
256. Olafsdottir, G., Chanie, E., Westad, F., Jonsdottir, R., Thalmann, C.R., Bazzo, S., Labreche, S., Marcq, P., Lundby, F., Haugen, J.E. (2005). Prediction of microbial and sensory quality of cold smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) by electric nose. *Journal of Food Science*, Vol. 70, No 9, 563-7-574.
257. Olsen, S.H., Sorensen, N.k., Stormo, S.K., Elvevoll, E.O. (2006). Effects of slaughter methods on blood spotting and residual blood in fillets of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 268, 462-469.
258. Olsen, S. O. (2003). Understanding the relationship between age and seafood consumption: The mediating role of attitude, health involvement and convenience. *Food Quality and Preference*, 14, 199–209.

259. Özden, Ö., Erkan, E. (2006). Effect of different packing methods on the shelf life of marinated rainbow trout. *Archiv für Lebensmittelhygiene*, 57, 69-75.
260. Özogul, F., Polat, A., Özogul, Y. (2004). The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*, 99, 574-578.
261. Pacquit, A., Frisby, J., Diamond, D., Tong Lau, K., Farrell, A., Quilty, B. (2007). Development of a smart packaging for the monitoring of fish spoilage. *Food Chemistry*, 102, 466-470.
262. Paludan-Müller, C., Dalgaard, P., Huss, H.H., Gram, L. (1998). Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum and modified atmosphere packed cold smoked salmon stored at 5°C. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 155-166.
263. Pandiripally V.K., Westbrook D.G., Sunki G.R., Bhunia A.K. (1999). Surface protein p104 is involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells, *Mol Microbiol* 28: 81-93
264. Papkovsky, D.B. (2006). Sensors for food safety and security. Baldini et al (eds). Chapter 24, *Optical Chemical Sensors*, Springer, 501-514.
265. Parida S.K., Domann E., Rohde M., Muller S., Darji A., Hain T., Wehland J., Chakraborty T. (1998). Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells, *Mol Microbiol* 28: 81-93
266. Patsias, A., Chouliara, I., Badeka, A., Savvaidis, I.N., Kontominas, M.G. (2006). Shelf-life of a chilled precooked chicken product stored in air and under modified atmospheres: microbiological, chemical, sensory attributes. *Food Microbiology*, 23, 423-429.
267. Patterson, M., Loaharanu, P. (2000). Food irradiation, In: Lund, B.M., Beird-Parker, A.C., Gould, G.W. *The Microbiological Safety and Quality of Foods*, Gaithersburg, MD: Aspen, 2000;65-1002.
268. Pawsey K.R. (2002). Case studies in food microbiology for food safety and quality. *Royal Society of Chemistry*, chapter 11 : 258-306
269. Pelroy G.A., Peterson M.E., Holland P.J., Eklund M.W. (1994). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-process (smoked) salmon by sodium lactate, *J Food Prot* 57: 108-113
270. Perera, A., Pardo, A., Barrettinod, D., Hierlermann, A., Marcob, S. (2010). Evaluation of fish spoilage by means of a single metal oxide sensor under temperature modulation. *Sensors and Actuators B*, 146, 477-482.
271. Pflug, I.J., Gould, G.W. (2000). Heat treatment, In: Lund, B.M., Beird-Parker, A.C., Gould, G.W. *The Microbiological Safety and Quality of Foods*, Gaithersburg, MD: Aspen, 2000;36-64.

272. Popović, Lj., Kilibarda, N., Dimitrijević, M., Dokmanović, M., Baltić, M.Ž. (2008). Obim i struktura proizvodnje dimljene ribe u svetu na početku 21.veka. 20.Savetovanje veterinarata Srbije, Zlatibor, 2008. Zbornik radova i kratkih sadržaja, 104-105.
273. Popović, G., Đurđević Milošević, D. (2008). Prisustvo bakterija *Listeria monocytogenes* u namirnicama i prateći rizik za zdravlje potrošača. Zbornik naučnih radova, Vol. 14 br. 3-4.
274. Pinner, R.W., Schuchat, A, Swaminathan, B., Hayes, P.S., Deaver, K.A., Weaver R.E., Plikaytis, B.D., Reeves,M., Broome, C.V., Wenger, J.D. (1992). Role of foods in sporadic listeriosis. II Microbiologic and epidemiologic investigation. JAMA 267: 2046-2050.
275. Porsby C.H., Vogel B.F., Mohr M., Gram L. (2002). Influence of processing steps in cold-smoked salmon production on survival and growth of persistent and presumed non-persistent *Listeria monocytogenes*, *Int Journal of Food Microbiology* 122, 287-295.
276. Radetić, P., Milijašević, M., Jovanović, J., Velebit, B. (2007). Pakovanje svežeg mesa u modifikovanoj atmosferi – trend koji traje. *Tehnologija mesa*, Vol. 48, No 1-2, str. 99-108.
277. Renzoni A., Cossart P., Dramsi S. (1999). PrfA- the transcriptional activator of virulence genes, is upregulated during interaction of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells and in eukaryotic cell extracts, *Mol Microbiol* 34: 552-561
278. Rocourt J, Jacquet Ch, Reilly A. (2000). Epidemiology of human listeriosis and seafoods, *Int J Food Microbiology* 62: 197-209
279. Rocourt, J. (1999). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*. Phylogenetic position, taxonomy and identification. In: Ryser E.T. and E.H. Marth (eds.) *Listeria, listeriosis and food safety*, 2ed. Marcel Dekker, Inc. New York, USA, p. 1-20.
280. Røra, A.M., Kvale, A., Mørkøre, Rørvik, Kjell-Arne, Steinen, S.H., Thomassen, M.S. (1999). Process yield, colour and sensory quality of smoked Atlantic salmon (*Salmo salar*) in relation to raw material characteristics. *Food Research International*, 31, 601-609.
281. Rørvik L., Aase B., Alvestad T., Caugant D. (2000). Molecular epidemiological survey of *Listeria monocytogenes* in seafood and seafood-processing plants, *Appl Environ Microbiol* 66 (11): 4779-4789
282. Rørvik L. (2000). *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry, *Int J of Food Microbiology* 62, 183-190
283. Rørvik L.M., Skjerve E., Knudsen B.R., Yndestad M. (1997). Risk factors for contamination of smoked salmon with *Listeria monocytogenes* during processing, *International Journal of Food Microbiology* 37: 215-219
284. Rose F., Zeller S.A., Chakraborty T., Domann E., Machleidt T., Kronke M., Seeger W., Grimminger F., Sibeliuss U. (2001). Human endothelial cell activation and mediator release in response to *Listeria monocytogenes* virulence factors, *Infect Immunol* 69: 897-905

285. Rotabakk, B.T., Wyller, J., Lekang, O.I., Sivertsvik, M. (2008). A mathematical method for determining equilibrium gas composition in modified atmosphere packaging and soluble gas stabilization systems for non respiring foods. *Journal of Food Engineering* 85, 479–90.
286. Rouquette C., C. de Chastellier, Nair S., Berche P. (1998). The ClpC ATPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages, *Mol Microbiol* 27: 1235-1245
287. Ruiz-Capillas, C., Moral, A. (2005). Sensory and biochemical aspects of quality of whole bigeye tuna (*Thunnus obesus*) during bulk storage in controlled atmospheres. *Food Chemistry*, 89, 347-354
288. Sado P.N., Jinneman, K.C., Hubsy G.J., Sorg S.M., Omiecinski C.J. (1998). Identification of *Listeria monocytogenes* from unpasteurized apple juice using rapid test kits. *J Food Prot.* 61, 1199-1202.
289. Sala F.J., Burgos, J., Condon, S., Lopez, P., Raso, J. (1995). Effect of heat and ultrasound on microorganisms and enzymes. In: Gould, G.W., *New Methods of Food Preservation*, Glasgow: 176-204.
290. Salminen S., von Wright A., Ouwehand A.C. (eds.). (2004). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects* (3rd ed.). New York: Marcel Dekker, Inc.. [ISBN 0-8247-5332-1](#)
291. Samadpour, M., Barbour, M.W., Ngyen, T, Cao, T.-M., Buck, F., Depavia, G.A., Mazengia, E., Yang, P., Alfi, D, Lopes, M, Stopforth, J.D. (2006). Incidence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *E.coli* O157, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in retail fresh ground beef, sprouts and mushrooms., *Journal of Food Protection* Vol. 69, No2, 441-443.
292. Sanjeev K., Ramesh M.N. (2006). Low oxygen and Inert gas Processing of Foods. *Critical Review in Food Scinece and Nutrition*, 46, 381-392.
293. Schlundt J. (2002). New directions in food-borne disease prevention, *Int J of Food Microbiology* 78: 3-17
294. Schuchat A., Deaver K.A., Wenger J.D., Plikaytis B.D., Mascola L., Pinner R.W., Reingold A.L., Broome C.V. (1992). Role of foods in sporadic listeriosis. I Case control study of dietary risk factors. *JAMA* 267: 2041-2045.
295. Scotter S.L., Langton S., Lombard B., Schulten S., Nagelkerke N., P.H. In't Veld, Rollier P., Lahellec C. (2001). Validation of ISO method 11290 part 1 – detection of *Listeria monocytogenes* in foods, *Int J Food Microbiol* 64: 295-306
296. Seaman M.S., Wang C.R., Forman J. (2000). MHC class Ib-restricted CTL provide protection against primary and secondary *Listeria monocytogenes* infection, *J Immunol* 165: 5192-5201
297. Seeliger H.P.R., Jones, D. (1986). *Listeria*. Bergey s Manual of Systematic Bacteriology , Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA, Vol 2: 1235-1245.
298. Sérot T., Baron R., Knockaert C., Vallet J.L. (2004). Effects of smoking process on the contents of 10 mayor phenolic compounds in smoked fillets of hering (*Clupea harengus*). *Food Chemistry*, 85, 111-120.

299. Shahidi F. (1998). Flavour of Meat, Meat products and Seafoods. *Blackie academic & Professional*, 342-353
300. Shewan J.M. (1962). The bacteriology of fresh and spoiling fish and some related chemical changes. In: J.Hawthorn & J.Muil Leitch (eds.). *Recent advances in food science*, 1, 167-193.
301. Sibelius U., Schulz E.C., Rose F., Hattar K., Jacobs T., Weiss S., Seeger W., Grimminger F. (1999). Role of *Listeria monocytogenes* exotoxins listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C in activation of human neutrophils, *Infect Immun* 67: 1125-1130
302. Sikorski Z.E., Kolodziejska I. (2002). Microbial risk in mild hot smoking of fish. *Critical review in Food Science and Nutrition*, 42(1), 35-51
303. Simić B. (1998). Medicinska dijetetika, Nauka, Beograd.
304. Siverstvik, M., Rosnes, T.J., Kleiberg, G.H. (2003). Effect of modified atmosphere packaging and superchilled storage on the microbial and sfillets, *Food Microbiology and Safety*, Vol. 68, Nr 4, 1467-1472.
305. Sivertsvik M., Jeksrud W.K., Rosnes J.T. (2002). A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products – significance of microbial growth, activities and safety. *International Journal of Food Science Technology* 37, 107-127.
306. Smith J.L. (1998). Foodborne illness in the elderly, *J Food Prot* 61: 1229-1239
307. Smith J.L. (1999). Foodborne infections during pregnancy, *J Food Prot* 62: 818-829
308. SNIC, Seafood Network Information Center (1998) Water Phase Salt
<http://seafood.ucdavis.edu/haccp/compendium/terms.html>
309. Soccol M.C.H., Oetterer M. (2003). Use of Modified Atmosphere in Seafood Preservation. *Brazilian archives of biology and technology*, Vol. 46, n 4: pp. 569-580.
310. Sokolovic Z., Schuller S., Bohne J., Baur A., Rdest U., Nichterlein T., Goebel W. (1996). Differences in virulence and in expression of PrfA and PrfA-regulated virulence genes of *Listeria monocytogenes* strains belonging to serogroup 4, *Infect Immun* 64: 4008-4019
311. Soroka W. (2012). [Illustrated Glossary of Packaging Terminology](#) (Second ed.). Institute of Packaging Professionals.
312. Southwick F.S., Purich D.L. (1996). Intracellular pathogenesis of listeriosis, *N Engl J Med* 334: 770-776
313. Stamatis N., Arkoudelos J. (2007). Quality assessment of *Scomber Colias japonicus* under modified atmosphere and vacuum packaging. *Food Control*, 18, 292-300

314. *Stamatis N., Arkoudelos J. (2006). Effect of modified atmosphere and vacuum packaging on microbial, chemical and sensory quality indicators of fresh, filleted *Sardina pilchardus* at 3°C. Journal of the Science of Food and Agriculture*
315. *Stohr V., Joffraud J.J., Cardinal M., Leroi F. (2001). Spoilage potential and sensory profile associated with bacteria isolated from cold-smoked salmon. Food Research International 34(9),797–806.*
316. *Stolyhwo A., Kolodziejska I., Sikorski Y.E. (2006). Long chain polyunsaturated fatty acid in smoked Atlantic mackerel and Baltic sprats. Food Chemistry, 94, p 585-595*
317. *Stolyhwo A., Sikorski E.Z. (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish – a critical review. Food Chemistry, 91, 303-311*
318. *Sumner J., Ross T. (2002). A semi-quantitative seafood risk assessment. International Journal of Food Microbiology 77: 55-59*
319. *Šoša B. (1989). Higijena i tehnologija prerade morske ribe. Školska knjiga, Zagreb*
320. *Šumić, Z. (2008). Uslovi savremenog pakovanja prehrambenih proizvoda. www.tehnologijahrane.com*
321. *Šumić, Z. (2009). Sprečavanje rasta mikroorganizama. www.tehnologijahrane.com*
322. *Tarr H.L.A. (1954). Microbiological deterioration of fish post mortem, its detection and control. Bacteriol Rev, 18(1): 1-15*
323. *Tham W., Ericsson H., Loncarevic S., Unnerstad H., Danielsson-Tham M.L. (2000). Lessons from an outbreak of listeriosis related to vacuum-packed gravad and cold smoked fish. International Journal of Food Microbiology 62: 173-175*
324. *Tome E., Teixeira P., Gibbs P.A. (2006). Anti-listerial inhibitory lactic acid bacteria isolated from commercial cold smoked salmon, Food Microbiology 23, 399-405.*
325. *Tome E., Gibbs P.A., Teixeira P.C. (2008). Growth control of *Listeria innocua* 2030c on vacuum-packaged cold-smoked salmon by lactic acid bacteria, Int J of Food Microbiology 121, 285-294*
326. *Torrieri E., Cavella S., Villani F., Massi P. (2006). Influence of modified atmosphere on the chilled shelf life of gutted farmed bass (*Dicentrarchus labrax*). Journal of Food Engineering, 77, 1078 – 1086*
327. *Trbović B. Autorizovana predavanja II (predmet: Obrada namirnica i priprema dijeta), Beograd, šk. god. 2004-05*
328. *Truelstrup, H., Gill T., Røntved, S.D., Huss, H.H. (1996). Importance of autolysis and microbiological activity of quality of cold smoked salmon. Food Research International, 29, 181-188.*

329. Truelstrup, H., Gill, T., Huss, H.H. (1995). Effects of salt and storage temperature on chemical, microbiological and sensory changes in cold smoked salmon. *Food Reserach International* , 28, 123-130.
330. Uraz G., Yuçel N. (1999). The isolation of certain pathogenic microorganisms from raw milk, *Cent Enr J Public Health* 7: 145-148
331. US FDA (1998). Fish and Fishery Products, Hazard and Control Guide, <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/haccp-2.html>
332. Vasiliadou S., Ambrosiadis I., Varelytis K., Fletouris D., Gavrilidou I. (2005). Effect of smoking on quality parameters of farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and sensory attributes of the smoked product. *European Food Research Technology*, 2217:232-236.
333. Vaz-Velho M., Duarte G., Gibbs P. (1998). Note, Occurrence of *Listeria spp.* in salmon-trout (*Onchorhynchus mykiss*) and salmon (*Salmo salar*), *Food Science and Technology International* 4: 121-125
334. Vogel B.F., Huss H.H., Ojeniyi B., Ahrens P., Gram L. (2001). Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing Plants detected by DNA-based typing methods, *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2586-2595
335. Verbanac D. (2002). O prehrani: što, kada i zašto jesti, Školska knjiga, Zagreb.
336. Vereš M., Galić K., Vujković I. (2007). Ambalaža za pakiranje namirnica, Tectus, Zagreb:498.
337. Vereš M. (2004), [Principi konzervisanja namirnica](#), Poljoprivredni fakultet, Beograd
338. Vermeiren L., Devlieghere F. van Beest, M. de Kruijff N., Debevere J. (1999). Developments in the active packaging of foods. *Review in Trends in Food Science & Technology*, 10, 77-86
339. Vescovo M., Scolari G., Zacconi C. (2006). Inhibition of *Listeria innocua* growth by antimicrobial-producing lactic acid cultures in vacuum-packed cold-smoked salmon, *Food Microbiology* 23, 689-693.
340. Vujković I., Galić K., Vereš M. (2007). Ambalaža za pakiranje namirnica. Tectus, Zagreb
341. Vujković I. (1997). Polimerna i kombinovana ambalaža, Poli, Novi Sad:255.
342. Weagant S., Sado P., Colburn K., Torkelson J., Stanley F., Krane M., Shields S., Thayer C. (1988). The incidence of *Listeria* species in frozen seafood products, *J Food Prot* 51 (8): 655-657
343. Yam K. L. (2009). "Encyclopedia of Packaging Technology", John Wiley & Sons, [ISBN 978-0-470-08704-6](#)
344. Yoshikai Y. (1999). The interaction of intestinal epithelial cells and intraepithelial lymphocytes in host defense, *Immunologic Res* 20: 219-235
345. Zeuthen P., Bogh-Sorensen L. (2003): Food preservation techniques, Cambridge Press, England

Spisak literature

346. Zhang Q., Qin B.L., Barbosa-Canovas G.V., Swanson B.G. (1995). Inactivation of *E.coli* for food pasteurization by high strength pulsed electric fields, *J Food Proc Pres* 19:103-18.
347. Wagner M., Eliskases-Lechner F., Rieck P., Hein I., Allerberger F. (2006). Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from 50 small-scale Austrian cheese factories. *Journal of Food Prot.* Vol. 69, No 6, 1297-1303.
348. Ward D.R. (2001). Processing parameters needed to control pathogens in cold-smoked fish. *Journal of Food Science*, Vol.66, No 7, Supplement to volume

Prilog

Tabele rezultata ispitivanja sa statističkom obradom podataka

Tabela 1. Hemijski sastav hladno dimljene pastrmke

Soj	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X_{\min}	X_{\max}	C_v (%)
Proteini	21,10	0,09	0,039	20,94	21,21	0,45
Mast	6,03	0,54	0,221	5,53	6,57	8,97
Voda	68,82	1,36	0,554	66,20	69,77	1,97
Pepeo	3,62	0,06	0,024	3,54	3,70	1,63
NaCl	2,61	0,06	0,026	2,53	2,70	2,41

Tabela 2. Vrednosti pH i aw hladno dimljene pastrmke

pH	6,20	0,01	0,004	6,18	6,21	0,17
aw	0,980	0,001	0,0001	0,979	0,981	0,23

Tabela 3. Ukupan broj bakterija hladno dimljene pastrmke nultog dana ispitivanja (log CFU/g)

\bar{X}	Mere varijacije				
	Sd	Se	X_{\min}	X_{\max}	C_v (%)
6,67	0,17	0,07	6,50	6,95	2,49

Tabela 4. Broj *L. monocytogenes* hladno dimljene pastrmke nultog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X_{\min}	X_{\max}	C_v (%)
I	7,03 ^{AaB}	0,22	0,09	6,85	7,45	3,08
II	7,55 ^A	0,05	0,02	7,49	7,62	0,69
III	7,38 ^a	0,24	0,09	6,94	7,58	3,31
IV	7,54 ^B	0,09	0,04	7,40	7,65	1,22

Tabela 5. Broj bakterija mlečne kiseline hladno dimljene pastrmke nultog dana ispitivanja (log CFU/g)

\bar{X}	Mere varijacije				
	Sd	Se	X_{\min}	X_{\max}	C_v (%)
1,35	0,12	0,05	1,21	1,50	8,90

Ukupan broj bakterija

Tabela 6. Ukupan broj bakterija hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum i skladištene pri 3°C (log CFU/g) 14., 28. i 35. dana

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	7,15 ^{aAB} ± 0.06	7,02 ^A ± 0.13	7,13 ^A ± 0.04
II	6,99 ^{aC} ± 0.06	7,84 ^{ABC} ± 0.09	6,63 ^{ABC} ± 0.23
III	6,85 ^{AD} ± 0.09	7,08 ^B ± 0.06	7,11 ^B ± 0.02
IV	6,64 ^{BCD} ± 0.13	7,08 ^C ± 0.09	6,97 ^C ± 0.06

Tabela 6a. Ukupan broj bakterija hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum skladištene pri 3 °C četrnaestog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	8,15 ^{aAB}	0,06	0,03	8,05	8,23	0,77
II	7,99 ^{aC}	0,06	0,02	7,90	8,05	0,76
III	7,85 ^{AD}	0,09	0,03	7,74	7,99	1,11
IV	7,64 ^{BCD}	0,13	0,05	7,45	7,83	1,76

Tabela 6b. Ukupan broj bakterija hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum skladištene pri 3 °C dvadesetmog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	8,02 ^A	0,13	0,05	7,82	8,19	1,63
II	8,84 ^{ABC}	0,09	0,04	8,74	8,95	1,03
III	8,08 ^B	0,06	0,02	8,00	8,16	0,73
IV	8,08 ^C	0,09	0,04	7,95	8,20	1,16

Tabela 6c. Ukupan broj bakterija hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum skladištene pri 3 °C tridesetpetog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	8,13 ^A	0,04	0,02	8,07	8,19	0,53
II	7,63 ^{ABC}	0,23	0,09	7,30	7,93	3,03
III	8,11 ^B	0,02	0,01	8,08	8,14	0,27
IV	7,97 ^C	0,06	0,03	7,88	8,05	0,78

Tabela 7. Ukupan broj bakterija hladno dimljene pastrmke pakovane pakovane u vakuum skladištene pri 8°C (log CFU/g) 14., 28. i 35. dana

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	$7,18^{Aa} \pm 0,01$	$6,85^{aAB} \pm 0,07$	$7,03^{AB} \pm 0,12$
II	$6,92^{ABC} \pm 0,08$	$7,03^{aC} \pm 0,18$	$6,84^{ACD} \pm 0,03$
III	$7,09^{aBb} \pm 0,05$	$7,28^{AC} \pm 0,02$	$7,26^{BCa} \pm 0,03$
IV	$7,17^{Cb} \pm 0,02$	$7,17^B \pm 0,05$	$7,14^{Da} \pm 0,03$

Tabela 7a. Ukupan broj bakterija hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum skladištene pri 8 °C četrnaestog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X_{\min}	X_{\max}	C_v (%)
I	$8,18^{Aa}$	0,01	0,01	8,16	8,20	0,17
II	$7,92^{ABC}$	0,08	0,03	7,80	8,16	1,06
III	$8,09^{aBb}$	0,05	0,02	8,01	8,14	0,62
IV	$8,17^{Cb}$	0,02	0,01	8,14	8,20	0,25

Tabela 7b. Ukupan broj bakterija hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum skladištene pri 8 °C dvadesetmog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X_{\min}	X_{\max}	C_v (%)
I	$7,85^{aAB}$	0,07	0,03	7,76	7,95	0,89
II	$8,03^{aC}$	0,18	0,07	7,73	8,22	2,25
III	$8,28^{AC}$	0,02	0,01	8,26	8,32	0,28
IV	$8,17^B$	0,05	0,02	8,10	8,24	0,60

Tabela 7c. Ukupan broj bakterija hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuum skladištene pri 8 °C tridesetpetog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X_{\min}	X_{\max}	C_v (%)
I	$8,03^{AB}$	0,12	0,05	7,85	8,18	1,45
II	$7,84^{ACD}$	0,03	0,01	7,80	7,88	0,36
III	$8,26^{BCa}$	0,03	0,01	8,20	8,30	0,42
IV	$8,14^{Da}$	0,03	0,01	8,10	8,18	0,34

Tabela 8. Ukupan broj bakterija hladno dimljene pastrmke pakovane pakovane u MAP skladištene pri 3°C (log CFU/g) 14., 28. i 35. dana

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	6,73 ^{ABC} ± 0.07	7,08 ^{Aa} ± 0.15	7,07 ^A ± 0.13
II	7,07 ^{AD} ± 0.06	7,64 ^{ABC} ± 0.15	7,06 ^B ± 0.03
III	6,69 ^{BDE} ± 0.05	6,07 ^{Bb} ± 0.05	6,96 ^C ± 0.05
IV	6,36 ^{CE} ± 0.09	6,86 ^{aCb} ± 0.06	6,63 ^{ABC} ± 0.07

Tabela 8.a. Ukupan broj bakterija hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 3 °C četrnaestog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	7,73 ^{ABC}	0,07	0,03	7,66	7,86	0,93
II	8,07 ^{AD}	0,06	0,02	7,98	8,15	0,73
III	7,69 ^{BDE}	0,05	0,02	7,63	7,76	0,60
IV	7,36 ^{CE}	0,09	0,04	7,25	7,50	1,21

Tabela 8.b. Ukupan broj bakterija hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 3 °C dvadesetosmog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	8,08 ^{Aa}	0,15	0,06	7,87	8,29	1,88
II	8,64 ^{ABC}	0,15	0,06	8,44	8,86	1,70
III	8,07 ^{Bb}	0,05	0,02	8,00	8,14	0,64
IV	7,86 ^{aCb}	0,06	0,02	7,78	7,94	0,73

Tabela 8.c. Ukupan broj bakterija hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 3 °C tridesetpetog ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	8,07 ^A	0,13	0,05	7,88	8,23	1,64
II	8,06 ^B	0,03	0,01	8,02	8,10	0,35
III	7,96 ^C	0,05	0,02	7,90	8,02	0,58
IV	7,63 ^{ABC}	0,07	0,03	7,56	7,75	0,86

Tabela 9. Ukupan broj bakterija hladno dimljene pastrmke pakovane pakovane u MAP skladištene pri 8°C (log CFU/g) 14., 28. i 35. dana

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	7,05 ^{ABC} ± 0.04	7,20 ± 0.04	7,09 ^{Aa} ± 0.12
II	7,37 ^{AD} ± 0.02	6,89 ± 0.05	7,93 ^{ABC} ± 0.01
III	6,93 ^{BDa} ± 0.03	7,18 ± 0.05	7,10 ^{Bb} ± 0.04
IV	6,86 ^{Ca} ± 0.05	6,68 ± 0.46	6,97 ^{aCb} ± 0.05

Tabela 9.a. Ukupan broj bakterija hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 8 °C četrnaestog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	8,05 ^{ABC}	0,04	0,02	7,99	8,10	0,48
II	8,37 ^{AD}	0,02	0,01	8,34	8,40	0,26
III	7,93 ^{BDa}	0,03	0,01	7,88	7,96	0,39
IV	7,86 ^{Ca}	0,05	0,02	7,78	7,92	0,63

Tabela 9.b. Ukupan broj bakterija hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 8 °C dvadesetosmog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	8,20	0,04	0,02	8,15	8,26	0,46
II	7,89	0,50	0,21	7,19	8,41	6,42
III	8,18	0,05	0,02	8,10	8,24	0,59
IV	7,68	0,46	0,19	7,08	8,05	5,99

Tabela 9.c. Ukupan broj bakterija hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 8 °C tridesetpetog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	8,09 ^{Aa}	0,12	0,05	7,95	8,26	1,46
II	8,93 ^{ABC}	0,01	0,01	8,91	8,95	0,16
III	8,10 ^{Bb}	0,04	0,02	8,04	8,14	0,46
IV	7,97 ^{aCb}	0,05	0,02	7,90	8,05	0,65

*Listeria monocytogenes***Tabela 10.** Broj *L.monocytogenes* hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu skladištene pri 3°C (log CFU/g) 14., 28. i 35. dana

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	6,87 ^A ± 0.07	6,77 ^{ABC} ± 0.05	6,63 ^{ABC} ± 0.06
II	6,60 ^B ± 1.09	8,01 ^{AD} ± 0.08	7,37 ^{Aa} ± 0.10
III	7,18 ^{AB} ± 0.03	7,81 ^{BDE} ± 0.06	7,45 ^{BD} ± 0.07
IV	7,47 ± 0.08	7,97 ^{CE} ± 0.10	7,11 ^{CaD} ± 0.22

Tabela 10.a. Broj *L. monocytogenes* hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu skladištene pri 3 °C četrnaestog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	7,87 ^A	0,07	0,03	7,80	7,99	0,86
II	7,60 ^B	1,09	0,45	6,59	8,69	14,43
III	9,18 ^{AB}	0,03	0,01	9,15	9,23	0,35
IV	8,47	0,08	0,03	8,35	8,58	1,00

Tabela 10.b. Broj *L. monocytogenes* hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu skladištene pri 3 °C dvadesetmog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	7,77 ^{ABC}	0,05	0,02	7,70	7,84	0,64
II	9,01 ^{AD}	0,08	0,03	8,88	9,13	0,90
III	8,81 ^{BDE}	0,06	0,02	8,73	8,89	0,63
IV	8,97 ^{CE}	0,10	0,04	8,85	9,12	1,13

Tabela 10.c. Broj *L. monocytogenes* hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu skladištene pri 3 °C tridesetpetog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	7,63 ^{ABC}	0,06	0,02	7,52	7,70	0,78
II	8,37 ^{Aa}	0,10	0,04	8,23	8,51	1,23
III	8,45 ^{BD}	0,07	0,03	8,36	8,54	0,79
IV	8,11 ^{CaD}	0,22	0,09	7,85	8,42	2,68

Tabela 11. Broj *L.monocytogenes* hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu skladištene pri 8°C (log CFU/g) 14., 28. i 35. dana

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	6,80 ^{ABC} ± 0.06	6,75 ^{ABC} ± 0.14	6,79 ^{ABC} ± 0.12
II	7,20 ^{AD} ± 0.12	7,18 ^{AD} ± 0.11	7,10 ^{Aa} ± 0.12
III	7,42 ^{BDa} ± 0.04	7,56 ^{BDE} ± 0.19	7,35 ^{Bab} ± 0.14
IV	7,25 ^{Ca} ± 0.10	7,05 ^{CE} ± 0.11	7,10 ^{Cb} ± 0.13

Tabela 11.a. Broj *L. monocytogenes* hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu skladištene pri 8 °C četrnaestog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	7,80 ^{ABC}	0,06	0,02	7,70	7,86	0,77
II	8,20 ^{AD}	0,12	0,05	8,02	8,34	1,49
III	8,42 ^{BDa}	0,04	0,02	8,36	8,49	0,51
IV	8,25 ^{Ca}	0,10	0,04	8,11	8,41	1,25

Tabela 11.b. Broj *L. monocytogenes* hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu skladištene pri 8 °C dvadesetmog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	7,75 ^{ABC}	0,14	0,06	7,50	7,90	1,83
II	8,18 ^{AD}	0,11	0,05	7,99	8,30	1,40
III	8,56 ^{BDE}	0,19	0,08	8,32	8,83	2,21
IV	8,05 ^{CE}	0,11	0,05	7,90	8,18	1,42

Tabela 11.c. Broj *L. monocytogenes* hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu skladištene pri 8 °C tridesetpetog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	7,79 ^{ABC}	0,12	0,05	7,69	8,03	1,59
II	8,10 ^{Aa}	0,12	0,05	7,94	8,27	1,46
III	8,35 ^{Bab}	0,14	0,06	8,15	8,54	1,63
IV	8,10 ^{Cb}	0,13	0,05	7,90	8,30	1,61

Tabela 12. Broj *L.monocytogenes* hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 3°C (log CFU/g) 14., 28. i 35. dana

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	7,01 ^{ABC} ± 0.07	7,07 ^{ABC} ± 0.05	6,97 ^{ABC} ± 0.06
II	8,08 ^{AD} ± 0.06	8,11 ^A ± 0.06	7,48 ^A ± 0.06
III	8,07 ^{BE} ± 0.12	8,09 ^B ± 0.07	7,37 ^{Ba} ± 0.05
IV	7,58 ^{CDE} ± 0.04	8,10 ^C ± 0.06	7,53 ^{Ca} ± 0.13

Tabela 12.a. Broj *L. monocytogenes* hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 3 °C četrnaestog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	8,01 ^{ABC}	0,07	0,03	7,90	8,08	0,81
II	9,08 ^{AD}	0,06	0,03	8,99	9,18	0,69
III	9,07 ^{BE}	0,12	0,05	8,90	9,21	1,34
IV	8,58 ^{CDE}	0,04	0,02	8,52	8,65	0,52

Tabela 12.b. Broj *L. monocytogenes* hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 3 °C dvadesetmog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	8,07 ^{ABC}	0,05	0,02	8,00	8,15	0,64
II	9,11 ^A	0,06	0,03	9,03	9,21	0,68
III	9,09 ^B	0,07	0,03	9,00	9,18	0,78
IV	9,10 ^C	0,06	0,02	9,02	9,18	0,61

Tabela 12.c. Broj *L. monocytogenes* hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 3 °C tridesetpetog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	7,97 ^{ABC}	0,06	0,03	7,88	8,04	0,77
II	8,48 ^A	0,06	0,03	8,40	8,56	0,74
III	8,37 ^{Ba}	0,05	0,02	8,30	8,43	0,55
IV	8,53 ^{Ca}	0,13	0,05	8,36	8,72	1,49

Tabela 13. Broj *L.monocytogenes* hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 8°C (log CFU/g) 14., 28. i 35. dana

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	6,79 ^{ABC} ± 0.07	7,01 ^{ABC} ± 0.04	7,01 ^{ABC} ± 0.07
II	7,65 ^{AD} ± 0.06	8,11 ^A ± 0.06	7,80 ^A ± 0.20
III	7,47 ^{BDE} ± 0.05	8,09 ^B ± 0.04	7,73 ^B ± 0.27
IV	7,60 ^{CE} ± 0.08	8,07 ^C ± 0.06	7,48 ^C ± 0.21

Tabela 13.a. Broj *L. monocytogenes* hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 8 °C četrnaestog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	7,79 ^{ABC}	0,07	0,03	7,70	7,90	0,95
II	8,65 ^{AD}	0,06	0,03	8,58	8,73	0,71
III	8,47 ^{BDE}	0,05	0,02	8,41	8,54	0,53
IV	8,60 ^{CE}	0,08	0,03	8,50	8,70	0,88

Tabela 13.b. Broj *L. monocytogenes* hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 8 °C dvadesetmog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	8,01 ^{ABC}	0,04	0,01	7,95	8,05	0,44
II	9,11 ^A	0,06	0,03	9,00	9,18	0,69
III	9,09 ^B	0,04	0,02	9,02	9,14	0,45
IV	9,07 ^C	0,06	0,02	9,00	9,15	0,61

Tabela 13.c. Broj *L. monocytogenes* hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 8 °C tridesetpetog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	8,01 ^{ABC}	0,07	0,03	7,90	8,10	0,89
II	8,80 ^A	0,20	0,08	8,55	9,07	2,31
III	8,73 ^B	0,27	0,11	8,45	9,12	3,13
IV	8,48 ^C	0,21	0,09	8,10	8,71	2,46

Bakterije mlečne kiseline

Tabela 14. Broj bakterija mlečne kiseline hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu skladištene pri 3°C (log CFU/g) 14., 28. i 35. dana

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	3,45 ^{AB} ± 0.08	2,84 ^{AB} ± 0.12	4,01 ^a ± 0.13
II	3,13 ^{ACD} ± 0.22	2,72 ^{CD} ± 0.07	3,80 ^{aAB} ± 0.14
III	3,75 ^{BC} ± 0.10	3,26 ^{AC} ± 0.21	4,20 ^A ± 0.10
IV	3,64 ^D ± 0.12	3,11 ^{BD} ± 0.11	4,06 ^B ± 0.13

Tabela 14.a. Broj bakterija mlečne kiseline hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu skladištene pri 3 °C četrnaestog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	3,45 ^{AB}	0,08	0,03	3,36	3,58	2,32
II	3,13 ^{ACD}	0,22	0,09	2,88	3,51	7,16
III	3,75 ^{BC}	0,10	0,04	3,60	3,89	2,59
IV	3,64 ^D	0,12	0,05	3,50	3,80	3,28

Tabela 14.b. Broj bakterija mlečne kiseline hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu skladištene pri 3 °C dvadesetmog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	2,84 ^{AB}	0,12	0,05	2,70	3,00	4,05
II	2,72 ^{CD}	0,07	0,03	2,65	2,85	2,56
III	3,26 ^{AC}	0,21	0,08	2,99	3,55	6,29
IV	3,11 ^{BD}	0,11	0,05	2,95	3,25	3,66

Tabela 14.c. Broj bakterija mlečne kiseline hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu skladištene pri 3 °C tridesetpetog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	4,01 ^a	0,13	0,05	3,81	4,18	3,25
II	3,80 ^{aAB}	0,14	0,06	3,64	3,99	3,62
III	4,20 ^A	0,10	0,04	4,02	4,30	2,37
IV	4,06 ^B	0,13	0,05	3,92	4,25	3,11

Tabela 15. Broj bakterija mlečne kiseline hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu skladištene pri 8°C (log CFU/g) 14., 28. i 35. dana

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	5,49 ^{AB} ± 0.19	5,94 ^A ± 0.44	6,31 ^{AB} ± 0.09
II	5,80 ^{AaC} ± 0.08	6,23 ^{BC} ± 0.06	6,71 ^{ACD} ± 0.14
III	5,55 ^{aD} ± 0.19	5,63 ^{BD} ± 0.12	6,33 ^{CE} ± 0.12
IV	5,18 ^{BCD} ± 0.07	5,04 ^{ACD} ± 0.07	6,03 ^{BDE} ± 0.16

Tabela 15.a. Broj bakterija mlečne kiseline hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu skladištene pri 8 °C četrnaestog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	5,49 ^{AB}	0,19	0,08	5,27	5,81	3,51
II	5,80 ^{AaC}	0,08	0,03	5,70	5,90	1,39
III	5,55 ^{aD}	0,19	0,08	5,28	5,81	3,40
IV	5,18 ^{BCD}	0,07	0,03	5,10	5,28	1,36

Tabela 15.b. Broj bakterija mlečne kiseline hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu skladištene pri 8 °C dvadesetosmog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	5,94 ^A	0,44	0,18	5,62	6,80	7,46
II	6,23 ^{BC}	0,06	0,02	6,13	6,30	0,98
III	5,63 ^{BD}	0,12	0,05	5,50	5,80	2,11
IV	5,04 ^{ACD}	0,07	0,03	4,94	5,14	1,36

Tabela 15.c. Broj bakterija mlečne kiseline hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu skladištene pri 8 °C tridesetpetog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	6,31 ^{AB}	0,09	0,04	6,18	6,42	1,45
II	6,71 ^{ACD}	0,14	0,06	6,51	6,88	2,12
III	6,33 ^{CE}	0,12	0,05	6,18	6,50	1,85
IV	6,03 ^{BDE}	0,16	0,06	5,80	6,24	2,58

Tabela 16. Broj bakterija mlečne kiseline hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 3°C (log CFU/g) 14., 28. i 35. dana

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	4,59 ^A ± 0.06	4,26 ± 0.13	5,06 ^{ABC} ± 0.14
II	4,46 ^a ± 0.11	4,36 ± 0.08	5,40 ^{AD} ± 0.14
III	4,39 ^{AB} ± 0.07	4,28 ± 0.09	5,76 ^{BDE} ± 0.17
IV	4,63 ^{ab} ± 0.11	4,41 ± 0.07	5,47 ^{CE} ± 0.09

Tabela 16.a. Broj bakterija mlečne kiseline hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 3 °C četrnaestog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	4,59 ^A	0,06	0,02	4,50	4,67	1,23
II	4,46 ^a	0,11	0,05	4,36	4,64	2,54
III	4,39 ^{AB}	0,07	0,03	4,28	4,49	1,63
IV	4,63 ^{ab}	0,11	0,05	4,50	4,80	2,43

Tabela 16.b. Broj bakterija mlečne kiseline hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 3 °C dvadesetosmog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	4,26	0,13	0,05	4,06	4,44	3,05
II	4,36	0,08	0,03	4,24	4,45	1,82
III	4,28	0,09	0,04	4,15	4,40	2,20
IV	4,41	0,07	0,03	4,30	4,50	1,49

Tabela 16.c. Broj bakterija mlečne kiseline hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 3 °C tridesetpetog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	5,06 ^{ABC}	0,14	0,06	4,90	5,22	2,69
II	5,40 ^{AD}	0,14	0,06	5,28	5,62	2,53
III	5,76 ^{BDE}	0,17	0,07	5,48	5,92	2,97
IV	5,47 ^{CE}	0,09	0,03	5,39	5,61	1,56

Tabela 17. Broj bakterija mlečne kiseline hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 8°C (log CFU/g) 14., 28. i 35. dana

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	5,04 ^{AB} ± 0.10	5,88 ± 0.37	6,60 ± 0.30
II	5,37 ^{AC} ± 0.13	5,60 ± 0.30	6,56 ± 0.33
III	5,44 ^{BD} ± 0.20	5,69 ± 0.11	6,80 ± 0.10
IV	4,99 ^{CD} ± 0.10	5,78 ± 0.10	6,48 ± 0.20

Tabela 17.a. Broj bakterija mlečne kiseline hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 8 °C četrnaestog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	5,04 ^{AB}	0,10	0,04	4,90	5,19	2,00
II	5,37 ^{AC}	0,13	0,05	5,24	5,57	2,36
III	5,44 ^{BD}	0,20	0,08	5,20	5,68	3,65
IV	4,99 ^{CD}	0,10	0,04	4,81	5,10	1,99

Tabela 17.b. Broj bakterija mlečne kiseline hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 8 °C dvadesetosmog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	5,88	0,37	0,15	5,50	6,52	6,38
II	5,60	0,30	0,12	5,20	6,00	5,42
III	5,69	0,11	0,05	5,54	5,85	1,99
IV	5,78	0,10	0,04	5,65	5,90	1,66

Tabela 17.c. Broj bakterija mlečne kiseline hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 8 °C tridesetpetog dana ispitivanja (log CFU/g)

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	6,60	0,30	0,12	6,25	6,97	4,48
II	6,56	0,33	0,14	5,90	6,80	5,08
III	6,80	0,10	0,04	6,69	6,94	1,44
IV	6,48	0,20	0,08	6,20	6,74	3,04

pH vrednost**Tabela 18.** Vrednost pH hladno dimljene pastrmke u vakuumu skladištene pri 3°C 14., 28. i 35 dana

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	6,22 ± 0.02	6,23 ^A ± 0.03	6,25 ^{AB} ± 0.05
II	6,22 ± 0.02	6,16 ^{ABC} ± 0.01	6,23 ^a ± 0.03
III	6,21 ± 0.01	6,22 ^B ± 0.02	6,18 ^{Aa} ± 0.01
IV	6,21 ± 0.02	6,21 ^C ± 0.03	6,18 ^B ± 0.01

Tabela 18.a. Vrednost pH hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu skladištene pri 3°C četrnaestog dana ispitivanja

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	6,22	0,02	0,006	6,20	6,24	0,24
II	6,22	0,02	0,008	6,20	6,26	0,34
III	6,21	0,01	0,006	6,19	6,23	0,23
IV	6,21	0,02	0,008	6,19	6,24	0,30

Tabela 18.b. Vrednost pH hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu skladištene pri 3°C dvadesetosmog dana ispitivanja

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	6,23 ^A	0,03	0,01	6,20	6,28	0,45
II	6,16 ^{ABC}	0,01	0,01	6,14	6,18	0,24
III	6,22 ^B	0,02	0,01	6,19	6,24	0,30
IV	6,21 ^C	0,03	0,01	6,18	6,25	0,43

Tabela 18.c. Vrednost pH hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu skladištene pri 3°C tridesetpetog dana ispitivanja

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	6,25 ^{AB}	0,05	0,021	6,19	6,34	0,84
II	6,23 ^a	0,03	0,013	6,19	6,27	0,52
III	6,18 ^{Aa}	0,01	0,004	6,16	6,19	0,17
IV	6,18 ^B	0,01	0,004	6,17	6,20	0,17

Tabela 19. Vrednost pH hladno dimljene pastrmke u vakuumu skladištene pri 8°C 14., 28. i 35 dana

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	6,24 ± 0.04	6,23 ± 0.01	6,28 ± 0.07
II	6,23 ± 0.02	6,27 ± 0.06	6,24 ± 0.01
III	6,22 ± 0.01	6,26 ± 0.01	6,23 ± 0.02
IV	6,23 ± 0.02	6,26 ± 0.02	6,25 ± 0.01

Tabela 19.a. Vrednost pH hladno dimljene pastrmke u vakuumu skladištene pri 8°C četrnaestog dana ispitivanja

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X_{\min}	X_{\max}	C_v (%)
I	6,24	0,04	0,02	6,20	6,30	0,61
II	6,23	0,02	0,01	6,20	6,26	0,35
III	6,22	0,01	0,01	6,20	6,23	0,17
IV	6,23	0,02	0,01	6,20	6,25	0,30

Tabela 19.b. Vrednost pH hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu skladištene pri 8°C dvadesetosmog dana ispitivanja

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X_{\min}	X_{\max}	C_v (%)
I	6,23	0,01	0,006	6,21	6,25	0,24
II	6,27	0,06	0,026	6,19	6,36	1,03
III	6,26	0,01	0,006	6,24	6,28	0,24
IV	6,26	0,02	0,009	6,24	6,30	0,38

Tabela 19.c. Vrednost pH hladno dimljene pastrmke pakovane u vakuumu skladištene pri 8°C tridesetpetog dana ispitivanja

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X_{\min}	X_{\max}	C_v (%)
I	6,28	0,07	0,027	6,22	6,37	1,05
II	6,24	0,01	0,004	6,23	6,25	0,14
III	6,23	0,02	0,007	6,20	6,25	0,29
IV	6,25	0,01	0,006	6,23	6,27	0,22

Tabela 20. Vrednost pH hladno dimljene pastrmke u MAP skladištene pri 3°C 14., 28. i 35 dana

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	$6,24^A \pm 0.01$	$6,26^A \pm 0.02$	$6,28^{aA} \pm 0.03$
II	$6,24^B \pm 0.01$	$6,36^{AB} \pm 0.06$	$6,25^a \pm 0.01$
III	$6,21^A \pm 0.01$	$6,25^{Ba} \pm 0.01$	$6,23^{AB} \pm 0.01$
IV	$6,22^B \pm 0.02$	$6,31^a \pm 0.01$	$6,28^B \pm 0.01$

Tabela 20.a. Vrednost pH hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 3°C četrnaestog dana ispitivanja

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X_{\min}	X_{\max}	C_v (%)
I	$6,24^A$	0,01	0,004	6,22	6,25	0,17
II	$6,24^B$	0,01	0,004	6,22	6,25	0,17
III	$6,21^A$	0,01	0,004	6,19	6,22	0,17
IV	$6,22^B$	0,02	0,008	6,20	6,25	0,33

Tabela 20.b. Vrednost pH hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 3°C dvadesetmog dana ispitivanja

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X_{\min}	X_{\max}	C_v (%)
I	$6,26^A$	0,02	0,007	6,24	6,28	0,26
II	$6,36^{AB}$	0,06	0,026	6,28	6,46	0,99
III	$6,25^{Ba}$	0,01	0,004	6,23	6,26	0,17
IV	$6,31^a$	0,01	0,006	6,29	6,33	0,22

Tabela 20.c. Vrednost pH hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 3°C tridesetpetog dana ispitivanja

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X_{\min}	X_{\max}	C_v (%)
I	$6,28^{aA}$	0,03	0,012	6,25	6,33	0,47
II	$6,25^a$	0,01	0,006	6,23	6,33	0,24
III	$6,23^{AB}$	0,01	0,004	6,21	6,33	0,17
IV	$6,28^B$	0,01	0,004	6,26	6,33	0,17

Tabela 21. Vrednost pH hladno dimljene pastrmke u MAP skladištene pri 8°C 14., 28. i 35 dana

Grupa	Dani ispitivanja		
	14.dan	28.dan	35.dan
	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$	$\bar{X} \pm Sd$
I	6,25 ^{ab} ± 0.03	6,26 ± 0.07	6,30 ^a ± 0.06
II	6,22 ^a ± 0.01	6,20 ^a ± 0.03	6,46 ^{aAB} ± 0.17
III	6,23 ± 0.01	6,22 ± 0.01	6,20 ^A ± 0.01
IV	6,22 ^b ± 0.02	6,27 ^a ± 0.01	6,22 ^B ± 0.01

Tabela 21.a. Vrednost pH hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 8°C četrnaestog dana ispitivanja

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	6,25 ^{ab}	0,03	0,01	6,21	6,28	0,45
II	6,22 ^a	0,01	0,005	6,20	6,23	0,19
III	6,23	0,01	0,004	6,21	6,24	0,17
IV	6,22 ^b	0,02	0,007	6,20	6,24	0,26

Tabela 21.b. Vrednost pH hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 8°C dvadesetosmog dana ispitivanja

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	6,26	0,07	0,03	6,15	6,32	1,09
II	6,20 ^a	0,03	0,01	6,16	6,24	0,55
III	6,22	0,01	0,004	6,20	6,23	0,17
IV	6,27 ^a	0,01	0,01	6,25	6,29	0,22

Tabela 21.c. Vrednost pH hladno dimljene pastrmke pakovane u MAP skladištene pri 8°C tridesetpetog dana ispitivanja

Grupa	\bar{X}	Mere varijacije				
		Sd	Se	X _{min}	X _{max}	C _v (%)
I	6,30 ^a	0,06	0,024	6,22	6,37	0,92
II	6,46 ^{aAB}	0,17	0,068	6,30	6,77	2,57
III	6,20 ^A	0,01	0,004	6,18	6,21	0,17
IV	6,22 ^B	0,01	0,006	6,20	6,24	0,22

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Јелена З. Кузмановић _____

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Испитивање чинилаца од значаја за раст различитих сојева

Listeria monocytogenes у филетима хладно димљене пастрмке

- 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, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена З. Кузмановић

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада Испитивање чинилаца од значаја за раст различитих сојева
Listeria monocytogenes у филетима хладно димљене
пастрмке

Ментор проф. др Милан Ж. Балтић

Потписани _____

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, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Испитивање чинилаца од значаја за раст различитих сојева

Listeria monocytogenes у филетима хладно димљене пастрмке

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без 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.

Biografija

Jelena Z. Kuzmanović, rođ. Randelović, rođena je 7. marta 1979. godine u Osijeku. Osnovnu školu započela je u Puli, a završila u Beogradu 1993. godine, i potom opštu X beogradsku gimnaziju „Mihajlo Pupin“ godine 1997 sa odličnim uspehom.

Fakultet veterinarske medicine je upisala 1997.godine kao redovan student (1997/98 – 2002/03).

Tokom studiranja bila je nagrađivana više puta :

- Nagrada za studenta generacije završne godine FVM (2003)
- Nagrada za najboljeg studenta V godine FVM sa prosečnom ocenom 10.0 (2001)
- Nagrada i stipendija Fonda Kraljevskog Doma Karađorđević (2001/02), kao jedan od najboljih studenata u Srbiji
- Nagrada i stipendija Kraljevske Norveške Ambasade u Beogradu (2001), Nagrada za izuzetne akademske rezultate u programu pod nazivom „Za generaciju koja obećava više“.

Osnovne studije završila je 2003. godine sa prosečnom ocenom 9.24.

Iste godine je upisala i poslediplomske studije (magistarske studije) na smeru veterinarska preventiva, i tokom dve godine studija (2003/04 – 2004/05) položila sve ispite sa prosečnom ocenom 9.92. Akademsko zvanje magistar veterinarskih nauka, iz oblasti Opšte mikrobiologije, odbranila je 2007.godine sa magistarskom tezom pod naslovom „Ispitivanje prisustva *Listeria* vrsta u ribama, proizvodima od riba i morskim plodovima“ na katedri Opšte mikrobiologije, prof.dr Ružice Ašanin, Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu.

Jelena je zaposlena kao analitičar u mikrobiološkom ispitivanju namirnica životinjskog i biljnog porekla, dijetetskih proizvoda i dečije hrane, u odeljenju mikrobiologije Centra za ispitivanje namirnica d.o.o. Na poslu mikrobiologa radi od 2004.godine, i na tom poslu stekla je adekvatna praktična i saznanja primenjene nauke.

Objavila je rad pod nazivom „*Presence of the Listeria spp. In fish samples, fish products and sea products*“, sa koautorima Ašanin Ružica, Baltić M., Mišić D., Dimitrijević M., Stojanović M. i Ašanin N., u časopisu „Acta Veterinaria“, Vol.61, No 2-3, 2011. godine. Iste godine objavljen je rad pod nazivom: „*Isolation of Cronobacter sakazakii from different herbal teas*“, Marija M. Stojanović, Vera Katić, Jelena Kuzmanović, vol.68 (No 10), p.837 (2011) u časopisu Vojnosanitetski pregled (Military Medical and Pharmaceutical Journal of Serbia). Očekuje se i skora objava rada „*Serotyping of Listeria monocytogenes and susceptibility testing of Listeria to antibiotics and chemotherapeutics*“, u časopisu Veterinarski Glasnik.