



**УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ**  
**Технолошки факултет Нови Сад**



**ОПШТИ ХИГИЈЕНСКИ ПАРАМЕТРИ И ОДАБРАНИ  
БАКТЕРИЈСКИ ПАТОГЕНИ У ПРОИЗВОДЊИ  
ФЕРМЕНТИСАНИХ СУВИХ КОБАСИЦА У СРБИЈИ  
УЗ ИСПИТИВАЊЕ ЕФЕКТА ТЕРМИЧКИХ  
ТРЕТМАНА**

**Докторска дисертација**

Ментор  
Проф. др Синиша Марков

Кандидат:  
Мирослав Дучић

Нови Сад, 2015. година

**UNIVERZITET U NOVOM SADU**  
**TEHNOLOŠKI FAKULTET**

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

**Redni broj:**

**RBR**

**Identifikacioni broj:**

**IBR**

**Tip dokumentacije:**

Monografska dokumentacija

**TD**

**Tip zapisa:**

Tekstualni štampani materijal

**TZ**

**Vrsta rada (dipl., mag., dokt.):**

Doktorska disertacija

**Ime i prezime autora:**

Miroslav Dučić

**AU**

**Mentor (titula, ime, prezime, zvanje):**

Dr Siniša Markov, redovni profesor, Tehnološki fakultet  
Novi Sad, Univerzitet u Novom Sadu

**MN**

**Naslov rada:**

Opšti higijenski parametri i odabrani bakterijski patogeni u  
proizvodnji fermentisanih suvih kobasica u Srbiji uz  
ispitivanje efekata termičkih tretmana

**NR**

**Jezik publikacije:**

Srpski (ćirilica)

**JP**

**Jezik izvoda:**

srp. / eng.

**JI**

**Zemlja publikovanja:**

Srbija

**ZP**

**Uže geografsko područje:**

AP Vojvodina

**UGP**

**Godina:**

2015.

**GO**

**Izdavač:** autorski reprint  
**IZ**

**Mesto i adresa:** Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1  
**MA**

**Fizički opis rada:** poglavlja: 6 / stranica: 131 / tabela: 33 / slika: 12 /  
**FO** referenci: 461

**Naučna oblast:** Tehnološko inženjerstvo  
**NO**

**Naučna disciplina:** Prehrambeno inženjerstvo  
**ND**

**Predmetna odrednica, ključne reči:** fermentisane suve kobasice, Salmonella, Escherichia coli  
**PO** O157, Listeria monocytogenes, termički tretmani

**UDK** 579.84/.85:637.524(043.3)

**Čuva se:** Biblioteka Tehnološkog fakulteta Novi Sad, 21000 Bulevar  
**ČU** cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija

**Važna napomena:** Nema  
**VN**

**Izvod:** Glavni cilj doktorske disertacije bio je ispitivanje opštih  
**IZ** odlika industrijski proizvedenih, fermentisanih suvih kobasica u Srbiji i mogućnost dodatnog unapređenja njihove mikrobiološke bezbednosti. Ispitivani su mikrobiološki i fizičko-hemijski pokazatelji u industrijskom proizvodnom lancu sremske kobasice i sudžuka, tipičnih fermentisanih suvih kobasica od svinjskog i goveđeg mesa. U sremskoj kobasici praćeno je prisustvo *Salmonella* a *Escherichia coli* O157 u sudžuku. Ispitane su i promene glavnih grupa mikrobiota, pH i  $a_w$  vrednosti i hemijski sastav proizvoda. Mikrobiološka kontaminacija u početnim koracima proizvodnje bila je uglavnom visoka. Salmonela je ustanovljena u fazi pripreme nadeva u dva od tri proizvodna pogona, dok je *E. coli* O157 potvrđena u jednom uzorku usitnjenog mesa i masnog tkiva jednog proizvodnog pogona. Rezultati ispitivanja proizvodnje kobasica slični su rezultatima istraživanja u drugim zemljama. Svi uzorci gotovih sremskih kobasica bili su zadovoljavajućeg nivoa mikrobiološkog kvaliteta, dok većina uzoraka sudžuka nije bila zadovoljavajuća. Početno prisustvo alimentarnih patogena može se smatrati bezbednosnim rizikom.

Preživljavanje *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157 i *Listeria monocytogenes* tokom proizvodnje i

skladištenja inokulisane, sremske kobasice i sudžuka, praćeno je u drugoj fazi istraživanja. Smanjenje brojnosti sva tri patogena u skladu je sa literaturnim podacima i može se zaključiti da postupci uobičajeno primenjeni u industrijskoj proizvodnji sremske kobasice i sudžuka ne osiguravaju uvek, u dovoljnoj meri, mikrobiološku bezbednost proizvoda. Ispitana je i mogućnost pasterizacije u cilju redukcije navedenih patogena u kobasicama od svinjskog, odnosno, govedeg mesa, uz ocenu senzorskog kvaliteta proizvoda. Rezultati su pokazali da *Salmonella* Typhimurium i *E. coli* O157 mogu da budu uklonjene pasterizacijom gotovih fermentisanih suvih kobasica a da senzorske odlike proizvoda i dalje ostanu prihvatljive. *L. monocitogenes* se pokazala kao patogen koji je značajno otporniji na zagrevanje, u oba tipa kobasica, zbog čega su potrebna dalja istraživanja radi redukcije do prihvatljivog nivoa.

**Datum prihvatanja teme od strane Senata:** 10.10.2014.

**DP**

**Datum odbrane:**

**DO**

**Članovi komisije:**

**KO**

Dr Sava Bunčić, redovni profesor u penziji, Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu, predsednik

Dr Siniša Markov, redovni profesor, Tehnološki fakultet u Novom Sadu, mentor

Dr Natalija Džinić, vanredni profesor, Tehnološki fakultet u Novom Sadu, član

Dr Dragoljub Cvetković, vanredni profesor, Tehnološki fakultet u Novom Sadu, član

Dr Bojan Blagojević, docent, Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu, član

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF TECHNOLOGY**

**KEY WORD DOCUMENTATION**

**Accession number:**

**ANO**

**Identification number:**

**INO**

**Document type:**

Monograph documentation

**DT**

**Type of record:**

Textual printed material

**TR**

**Contents code:**

Doctoral dissertation

**CC**

**Author:**

Miroslav Dučić

**AU**

**Mentor:**

Siniša Markov, PhD, full profesor

**MN**

**Title:**

General hygienic parameters and selected bacterial pathogens during production of Serbian dry fermented sausages and investigation of the effects of heat treatment

**TI**

**Language of text:**

Serbian (cyrillic)

**LT**

**Language of abstract:**

Serbian / English

**LA**

**Country of publication:**

Serbia

**CP**

**Locality of publication:**

Vojvodina

**LP**

**Publication year:** 2015  
**PY**

**Publisher:** Author's reprint  
**PU**

**Publication place:** Novi Sad, Bulevar cara Lazara 1  
**PP**

**Physical description:** Number of chapters (6) / pages 131 / tables (33) /  
**PD** figures/graphs (12) / references (461)

**Scientific field:**  
**SF**

**Scientific discipline:** Food engineering  
**SD**

**Subject, key words** dry fermented sausages, *Salmonella*, *Escherichia coli* O157,  
**SKW** *Listeria monocytogenes*, heat treatment

**UC** 579.84/.85:637.524(043.3)

**Holding data:** Library, Faculty of Technology Novi Sad  
**HD**

**Note:** None  
**N**

**Abstract:**  
**AB** The main aim of this doctoral thesis was to investigate the general characteristics of industrially-produced Serbian dry fermented sausages and the possibility of further improving their microbiological safety. Microbiological and physico-chemical indicators were studied along the industrial production chains producing Sremska and Sudzuk sausage, typical of dry, fermented sausage prepared from pork or beef, respectively. The occurrences of *Salmonella* in pork sausages, and of *Escherichia coli* O157 in beef sausages were determined. Changes in the main groups of microbiota, pH,  $a_w$  values and the chemical composition of the products were evaluated. Microbiological contamination in the initial stages of production was generally high. *Salmonella* was confirmed from the batter-preparation phase in two of three production lines, while *E. coli* O157 was confirmed in one sample of meat and fatty tissue from one production line. The results of this investigation of sausage production were similar to results obtained in other countries. All samples of finished pork

sausage were of acceptable microbiological quality, while the majority of beef sausage samples were not microbiologically acceptable. The initial presence of foodborne pathogens can be considered a food safety risk.

The survival of *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes* during production and storage of inoculated pork and beef sausages was determined in the second phase of the investigation. All three pathogens declined in numbers in accordance with data from the literature, and it can be concluded that normal measures for pork and beef sausage preparation in industrial production do not always ensure, to a suitable level, the microbiological safety of the products. The possibility of pasteurising finished pork and beef sausages, with the aim of reducing *Salmonella* Typhimurium and *E. coli* O157, respectively, was investigated, and at the same time, sensory evaluation of product quality was performed. The results showed that pasteurisation eliminated *Salmonella* Typhimurium and *E. coli* O157 from finished dry fermented sausages, while sensory qualities of the products remained acceptable. *L. monocytogenes* proved to be a significantly more heat-resistant pathogen in both types of sausage, and therefore, further research is required to determine how to reduce numbers of this pathogen to acceptable levels.

**Accepted on Scientific Board on:** 10.10.2014.

**AS**

**Defended:**

**DE**

**Thesis Defend Board:**

**DB**

Dr Sava Bunčić, Full Professor, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, president

Dr Siniša Markov, Full Professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad, mentor

Dr Natalija Džinić, Associate Professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad, member

Dr Dragoljub Cvetković, Associate Professor, Faculty of Technology, University of Novi Sad, member

member: Dr Bojan Blagojević, Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Novi Sad, member

## САДРЖАЈ

<b>1.</b>	<b>УВОД</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ</b>	<b>3</b>
<b>2.1.</b>	<b>Ферментисане кобасице</b>	<b>3</b>
<b>2.2.</b>	<b>Основне фазе производње</b>	<b>7</b>
2.2.1.	Избор и припрема сировина	7
2.2.1.2.	Месо	7
2.2.1.3.	Масно ткиво	10
2.2.1.4.	Кухињска со	13
2.2.1.5.	Нитрити и нитрати	14
2.2.1.6.	Шећери	17
2.2.1.7.	Глуконо делта лактон	18
2.2.1.8.	Аскорбинска киселина	19
2.2.1.9.	Зачини	20
2.2.2.	Уситњавање и пуњење	21
2.2.3.	Ферментација	23
2.2.4.	Сушење	27
2.2.5.	Нарезивање и паковање	28
2.2.6.	Стартер културе	29
<b>2.3</b>	<b>Биолошке опасности ферментисаних сувих кобасица и болести проузроковане храном</b>	<b>30</b>
2.3.1.	<i>Salmonella enterica</i> subspecies <i>enterica</i>	30
2.3.2.	<i>Escherichia coli</i> O157	35
2.3.3.	<i>Listeria monocytogenes</i>	40
<b>2.4</b>	<b>Контрола микробиолошке безбедности ферментисаних сувих кобасица</b>	<b>43</b>
2.4.1.	Микробиолошки индикатори	43
2.4.2.	Менаџмент микробиолошке безбедности ферментисаних сувих кобасица	49
2.4.2.1.	Предусловни програми	52
2.4.2.2.	НАССР систем	50
<b>2.5</b>	<b>Третмани за унапређење микробиолошке безбедности ферментисаних сувих кобасица</b>	<b>54</b>
2.5.1.	Топлотна обрада	63
<b>3.</b>	<b>МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b>	<b>66</b>
<b>3.1.</b>	<b>Материјал и методе 1. фазе истраживања</b>	<b>66</b>
3.1.1.	Материјал	66
3.1.2.	Методе микробиолошке и физичко-хемијске анализе	68
3.1.2.1.	Припрема разређења	68



3.1.2.2.	Одређивање укупног броја аероба (ACC)	68
3.1.2.3.	Одређивање броја Enterobacteriaceae (EBC)	68
3.1.2.4.	Одређивање броја <i>E. coli</i> (ECC)	68
3.1.2.5.	Одређивање броја млечнокиселинских бактерија (LAB)	68
3.1.2.6.	Изражавање резултата одређивања броја појединих група микроорганизама	69
3.1.2.7.	Откривање <i>Escherichia coli</i> O157 у суцуку	69
3.1.2.8.	Откривање <i>Salmonella</i> у сремској кобасици	69
3.1.2.9.	Физичко-хемијске и хемијске анализе	69
<b>3.2.</b>	<b>Материјал и методе 2. фазе истраживања</b>	<b>70</b>
3.2.1.	Припрема лабораторијских кобасица	70
3.2.2.	Припрема инокулума бактеријских патогена	71
3.2.3.	Термички третман кобасица	72
3.2.4.	Методе 2. фазе истраживања	73
3.2.4.1.	Микробиолошке методе	73
3.2.4.2.	Физичко-хемијске методе	74
3.2.4.3.	Одређивање D и Z вредности	74
3.2.4.4.	Сензорна анализа	74
3.2.4.5.	Статистичка анализа	74
<b>4.</b>	<b>РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА</b>	<b>75</b>
<b>4.1.</b>	<b>Одабрани микробиолошки и физичко-хемијски параметри индустријске производње ферментисаних сувих кобасица у Србији</b>	<b>75</b>
4.1.1.	Резултати испитивања комерцијално произведених сремских кобасица	75
4.1.2.	Резултати испитивања комерцијално произведених суцук кобасица	80
4.1.3.	Дискусија резултата за комерцијално произведене ферментисане суве кобасице	84
<b>4.2.</b>	<b>Преживљавање сојева <i>Salmonella</i> Typhimurium, <i>Escherichia coli</i> O157 и <i>Listeria monocytogenes</i> током поступка производње сувих ферментисаних кобасица и њихове накнадне пастеризације</b>	<b>91</b>
4.2.1.	Основни микробиолошки параметри неинокулисаних кобасица	91
4.2.2.	Микробиолошки параметри патогена инокулисаних у кобасице	93
4.2.3.	Термички третмани готових ферментисаних кобасица	96
4.2.3.1.	Време децималне редуције (D вредност) и релативна терморезистеност микроорганизама (Z вредност)	99
4.2.4.	Сензорна анализа термички третираних кобасица	102
<b>5.</b>	<b>ЗАКЉУЧАК</b>	<b>106</b>
<b>6.</b>	<b>ЛИТЕРАТУРА</b>	<b>108</b>

## 1. УВОД

Ферментисане суве кобасице су производи од меса који не захтевају топлотну обраду пре употребе, односно, спадају у категорију намирница спремних за јело. Велики број врста у оквиру наведене категорије хране последица је особености сировина, разлика у саставу и производним поступцима зависно од поднебља и обичаја производње у различитим подручјима. Потрошња ферментисаних производа од меса последњих деценија је у порасту у читавом свету, при чему су европске земље и даље највећи произвођачи и потрошачи. Са порастом обима производње и трговине повећава се и опасност од могућег нарушавања здравствене исправности и одрживости наведених производа. Одрживост ферментисаних сувих кобасица заснива се на биохемијским и физичко-хемијским променама током ферментације и сушења, односно, дејству више чинилаца који, сви заједно, скупом препрека онемогућавају или значајно отежавају умножавање узрочника квара и евентуално присутних алиментарних патогена. Из наведених разлога ферментисане суве кобасице произведене уобичајеним поступцима индустријске производње сматране су безбедним по јавно здравље и до недавно није постојала јасно дефинисана потреба за увођењем додатних мера заштите.

Познато је, међутим, да ферментисане кобасице понекад садрже бактеријске алиментарне патогене пореклом из меса, масног ткива, зачина и окружења, који могу да угрозе здравље потрошача и изазову економске штете. У прилог томе је чињеница да су у последњих двадесет година ферментисане суве кобасице изазвале више епидемија болести проузрокованих храном, при чему се салмонеле из свињског, вероцитотоксична *Escherichia coli* из говеђег меса и *Listeria monocytogenes* из производног окружења издвајају као водеће микробиолошке опасности. На основу новијих микробиолошких и епидемиолошких истраживања увиђа се да уобичајени поступци производње могу значајно да умање број патогених микроорганизама али да не могу да осигурају њихово потпуно одсуство у крајњим производима. Услед наведеног, поједине државе, као на пример, САД, Канада и Аустралија донеле су прописе о увођењу додатних и/или строжијих мера у поступку производње и складиштења ради осигурања микробиолошке безбедност датих производа.

Примена строжијих безбедносних критеријума у производњи и промету ферментисаних сувих кобасица подстакла је истраживања о начинима постизања жељених нивоа редукције. Међу различитим могућностима и приступима опште је мишљење да је за изражен ниво редукције алиментарних патогена најуспешнија употреба повишене температуре, самостално или у склопу са другим антимикробним поступцима али уз могуће непожељне промене сензоричких одлика производа.

У досадашњим истраживањима о присуству најважнијих алиментарних патогена у индустријски произведеним ферментисаним кобасицама у Србији обухваћено је само испитивање *L. monocytogenes* у готовим производима и *E. coli* серотип O157 у обресцима, уситњеном месу и надеву кобасица од говеђег меса. Изузев радова о преживљавању *L. monocytogenes*, у литератури нема научних података о нивоу спонтане редукције *E. coli* O157 и *Salmonella* током производње и складиштења инокулисане сремске кобасице и суџука, типичних представника ферментисаних кобасица од свињског и говеђег меса у Србији. Потребно је, такође, напоменути да у

домаћој литератури нема података када је у питању испитивање топлотне отпорности *Salmonella*, *E. coli* O157 и *L. monocytogenes* загревањем готових инокулисаних ферментисаних сувих кобасица, док на међународном нивоу постоји свега неколико студија из дате области.

Услед наведеног, циљ прве фазе истраживања у оквиру докторске дисертације био је да се испитају услови и особености индустријске производње, као и микробиолошки статус типичних традиционалних ферментисаних сувих кобасица од свињског и говеђег меса у Србији. Резултати из прве фазе послужили су у виду основе за другу фазу истраживања, у оквиру које су испитани топлотни третмани, као додатна мера безбедности, у условима који опонашају индустријски начин производње. Истовремено је праћен и ниво преживљавања *Salmonella* Typhimurium, *E. coli* O157 и *L. monocytogenes* током производње и складиштења инокулисаних производа.

Свеобухватно, резултати испитивања технолошких и микробиолошких параметара употпуниће базу података о општем хигијенском стању и присуству најважнијих бактеријских патогена, када је у питању индустријска производња ферментисаних сувих кобасица у нашој земљи. С друге стране, подаци добијени у експерименталном делу, применом пастеризације готових кобасица, инокулисаних са *Salmonella* Typhimurium, *E. coli* O157 и *L. monocytogenes*, послужиће изучавању топлотне отпорности наведених патогена у реалним условима, с обзиром на чињеницу да се топлотна отпорност микроорганизама значајно разликује зависно од средине у којој се налазе. У практичном смислу, осим успешности елиминације патогена, узеће се у обзир и резултати сензорне анализе топлотно обрађених производа како би се што више приближили могућности примене у индустрији.

## 2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

### 2.1 ФЕРМЕНТИСАНЕ КОБАСИЦЕ

Месо спада у основне животне намирнице, потребне за правилан развој и здравље човека. Садржи бројне хранљиве састојке међу којима су нарочито значајни есенцијалне аминокиселине, витамини Б групе, гвожђе и цинк. Исхрана којом се редовно уносе умерене количине меса, заједно са довољно хране биљног порекла утиче суштински повољно на здравље људског тела у краткорочном и дугорочном смислу (Higgs и Mulvihill, 2002). Због високог садржаја воде и комплексног, доминатно протеинско-угљенохидратног састава месо истовремено спада у микробиолошки лако кварљиве намирнице. Све особине које га чине хранљивим супстратом налазе се у скоро оптималном односу потребном за размножавање бактерија узročника квара, као и бројних патогених врста (Hammes, Haller и Ganzle, 2008). Један од најстаријих начина којима је човек успео да продужи одрживости меса је потупак сушења и ферментације.

**Ферментација меса** представља превођење свежег, сировог меса у производе који се одликују дужом одрживошћу и пожељним сензорним особинама. Промене су последица дејства микроорганизама из спољашње средине и протео и липолитичких ензима из самог меса. Њиховим дејством производ постаје микробиолошки безбеднији и значајно другачији у погледу боје, текстуре, укуса и мириса у односу на сировине од којих потиче (Demeyer, Toldra, 2004; Rantsiou и Cocolin, 2006). Услови који омогућавају ферментацију меса доводе до умножавања пожељних микроорганизама и њиховог преовлађивања у укупној биомаси производа, као и до постепеног и уравнотеженог дејства ензима из мишићног и масног ткива (Hutkins, 2006; Toldra, 2002). Природа сировина и начин производње основне су групе чинилаца који утичу на ферментацију и тиме на особине крајњег производа (Hammes, Haller и Ganzle, 2008). Услед постојања бројних чинилаца везаних за природу сировина и начин производње постоји велика разноврсност ферментисаних производа од меса, при чему се сви могу сврстати у две основне групе: ферментисане кобасице и сувомеснате ферментисане производе (Vuković, 2012; Toldra, 2002).

1. Ферментисане кобасице су производи добијени од мешавине уситњеног меса, чврстог масног ткива и додатака која се пуни у омотаче и подвргава поступку ферментације и сушења, са или без димљења. Најважнији додаци су кухињска со, соли за саламурење, зачини, шећери, адитиви и стартер културе (Vuković, 2012; Legoу и сар., 2006; Campbell-Platt, 1995).
2. Сувомеснати ферментисани производи су производи од различитих врста меса у већим комадима са припадајућим костима, поткожним масним ткивом и кожом или без њих, који се конзервишу поступцима сољења, саламурења и сушења при чему производи сазревају и тиме добијају препознатљиву боју, арому, конзистенцију и текстуру и постају одрживи. Могу им се додати кухињска со, адитиви, шећери и зачини (Vuković, 2012), а нормативним актима појединих држава регулисано је које материје сме да садржи такав производ, што је код нас утврђено Правилником о квалитету уситњеног меса, полупроизвода од меса и производа од меса (у даљем тексту Правилник о квалитету меса; Службени гласник РС, 31/2012).

У даљем излагању, због фокуса истраживања у оквиру докторске дисертације, тежиште прегледа литературе биће усмерено на област производње и безбедности ферментисаних кобасица.

**Кратак историјски преглед.** Сматра се да производња ферментисаних кобасица потиче са подручја умерено топле климе, где нема великих количина падавина, што омогућава постепено сушење производа током благих зима (Toldra, 2002; Zeuthen, 1995). Јасни докази не постоје али се према наводима из Хомерове Илијаде претпоставља да су на Блиском истоку и приобаљу Средоземног мора, још у другом миленијуму пре нове ере били познати начини очувања меса слични данашњем поступку производње ферментисаних кобасица (Smith, 1987; Leistner, 1986). Познато је, такође, да се у истом временском раздобљу у Кини производила кобасица од козијег и јагњећег меса, под називом *lup-cheong*, у коју се, поред соли, додавала и већа количина шећера ради продужења одрживости производа (Demeyer, 2006; Leistner, 1986). Старогрчки писац Епихарм (550-460 п.н.е.) назвао је своју комедију „Кобасица” (*orya*) док се исти производ помиње и у Атиневом делу „*Deipnosophists*“, из 228. године нове ере, у ком се описују начини припреме различитих врста јела. Први јасан податак о ферментисаним кобасицама налази се у спису из 1730. године, у којем се помиње италијанска салама. Сматра се да сам назив потиче од античког града Саламис, на Кипру (Vacus, 1984) али се наводе и друге претпоставке (Zeuthen, 1995). Први запис о међународном промету забележен је 1769. године и односи се на извоз немачких кобасица у различите европске земље (Radetić, 1997).

Последњих деценија присутан је пораст потрошње наведене категорије производа на светском нивоу, при чему је Европа и даље главни произвођач и потрошач ферментисаних кобасица (Vignolo и сар., 2010). У оквиру Европске заједнице највећи потрошачи су Немачка и медитеранске земље, од којих само Шпанија произведе више од 190 000 тона на годишњем нивоу (Cabesa и сар., 2009).

**Подела ферментисаних кобасица.** Дуга традиција производње на коју су утицали навике и обичаји различитих људских заједница, као и сложеност састава и самог поступка производње довели су до велике разноврсности наведених производа (Talon, Leroy и Lebert, 2007; Hammes, Haller и Ganzle, 2008). Тако се у Немачкој производи чак 330 типова ферментисаних производа од меса (Adams и Moss, 2008). Само богатство производа условило је и постојање подела по различитим основама. Вишеструки критеријуми узимају у обзир садржај воде, састав производа по питању меса и осталих састојака, однос сировина, степен уситњености, промер и врсту омотача, као и технолошку обраду током ферментације и сушења (Hammes, Haller и Ganzle, 2008; Incze, 2004; Lucke, 2000). У литератури се, такође, наводи подела према присуству или одсуству раста плесни по површини производа, као и да ли се примењује поступак димљења, што је, углавном, случај у земљама хладније климе (Lucke, 2000).

Најважнији критеријум поделе ферментисаних кобасица је садржај воде, с обзиром на то да осим цене утиче и на микробиолошку безбедност производа (Toldra, 2002; Lucke, 2000). Према Правилнику о квалитету меса, ферментисане суве кобасице су зрели производи који садрже до 35% влаге, док су полусуве ферментисани делимично суви, а кобасице за мазање, само краткотрајно ферментисани производи (табела 2.1). Поред укупног садржаја воде могу се одређивати и други параметри везани за воду, као што је активност воде (*water activity* -  $a_w$  вредност), губитак масе, као и однос воде и беланчевина (*MPR-moisture protein ratio*). Активност воде -  $a_w$  представља јединицу којом се исказује удео воде која је у датој средини слободна и тиме на располагању микроорганизмима и пружа потпунији увид у микробиолошку

безбедност намирница у односу на друге методе одређивања садржаја воде (Rockland и Nishi, 1980). С тим у вези, наведени аутори указују да  $a_w$  вредност, у односу на укупан садржај воде, ближе описује физичке, хемијске и биолошке особине хране, као и других природних производа. У микробиологији хране  $a_w$  вредност је уведена 1953. године и данас представља један од основних начина контроле микробиолошке безбедности намирница. Дефинише се као однос између равнотежног притиска водене паре узорка и притиска засићене водене паре, при сталној температури средине (Vuković, 2012). На основу наведене физичке величине, ферментисане кобасице се деле на: 1. суве са  $a_w$  испод 0,9; 2. полусуве са  $a_w$  0,9-0,95 и 3. ферментисане кобасице за мазање чија  $a_w$  износи 0,94-0,96, односно, код којих током производње не долази до губитка влаге или пак у врло малим количинама (Lücke, 2000).

Поступком производње суве ферментисане кобасице изгубе 25% до 30% од почетне масе, док је у случају полусувих кобасица губитак мањи и креће се, просечно, од 18% до 20%, због чега је садржај воде у датој категорији производа виши и износи 40% - 50%, од целокупне материје. Током производног поступка ферментисане кобасице за мазање изгубе до 10% у односу на почетну масу, тако да је садржај воде у њима, углавном, нешто виши у односу на полусуве ферментисане кобасице (Lücke, 2014; Getty и Cervený, 2010; FAO, 2007; Incze, 2007).

**Табела 2.1** Подела ферментисаних кобасица према Правилнику о квалитету уситњеног меса, полупроизвода од меса и производа од меса (Сл. гласник Р. Србије, бр. 31/12)

Група	Подгрупа	Назив/врсте
Ферментисане кобасице <sup>1</sup>	Ферментисане суве кобасице	Кулен
		Зимска салама
		Сремска кобасица
		Суџук
		Његушка кобасица
		Чајна кобасица
		Сродни производи*
	Ферментисане полусуве кобасице	Панонска кобасица
		Пеперони
		Сродни производи*
	Ферментисане кобасице за мазање	Чајни намаз
		Сродни производи*

<sup>1</sup> Производи од меса који се производе и стављају у промет без топлотне обраде  
\* Назив одређује произвођач

У САД се класификација ферментисаних производа од меса поставља на основу односа воде и беланчевина (USDA, 2005). Према наведеном критеријуму производи код којих је однос 1,9:1 или мањи могу да буду означени као суве ферментисане кобасице. Изузетак су ђеновска и миланска салама, код којих је MPR већи и износи 2,3:1 (табела 2.2). Такође, према дефиницији Америчког института за месо (1982) суве ферментисане кобасице представљају уситњене или самлевене производе од меса чија рН вредност је 5,3 или нижа и настаје захваљујући метаболичкој активности бактерија.

Током поступка сушења исти производи морају да изгубе 20-30% влаге како би се постигао наведени однос између воде и беланчевина.

Према истом критеријуму (USDA, 2005), полусуве кобасице су производи са већим садржајем воде, чији MPR се креће од 2,3:1 до 3,7:1, односно, који изгубе до 15% влаге током ферментације, накнадне топлотне обраде и делимичног сушења (USDA, 2003). Услов је, такође, да рН вредност полусувих кобасица буде 5,3 или нижа што се остварује ферментацијом помогнутом стартер културама или додавањем ацидуланата, док се у појединим случајевима могу применити и оба средства заједно.

**Табела 2.2.** Однос воде и беланчевина (moisture protein ratio - MPR) у појединим производима од меса америчког тржишта (преузето и модификовано од USDA/FSIS; 2005)

Производ од меса	Однос воде и беланчевина
<i>Jerky</i>	0,75:1
<i>Pepperoni</i>	1,6:1
<i>Dry Sausage</i>	1,9:1
<i>Italian Salami</i>	1,9:1
<i>Kippered Beef</i>	2,03:1
<i>Dried Meat</i>	2,04:1
<i>Chipped Beef</i>	2,04:1
<i>Genoa Salami</i>	2,3:1
<i>Thuringer</i>	3,7:1

Услед ниске рН вредности полусуве кобасице се одликују изражено киселим укусом, док им је конзистенција мекша него код сувих кобасица али је погодна за нарезивање (Incze, 2004; Rust, 2007; Vuković, 2012). Полусуве кобасице се чувају, углавном, на температурама до 10 °C али могу да буду одрживе и на собној температури, уколико је MPR 3,1:1 или мањи а истовремено рН вредност 5,0 или нижа (Hunt и Boyle, 2007).

У литератури се наводи и условно географска подела на медитерански и северни производни тип ферментисаних кобасица. Медитерански тип се прави, углавном, од свињског меса и одликује се благом киселошћу ( $\text{pH} \geq 5,3$ ), са дугачким током производње на нижим температурама, без јасне раздвојености ферментације и сушења. Северни тип кобасица, поред свињског, често садржи и говеђе месо, при чему производња, не траје дуже од 3 недеље. Одликују се изражено киселим укусом ( $\text{pH} \leq 5$ ), што се остварује применом виших температура током ферментације и употребом стартер култура или ацидуланата, уз јасну одвојеност ферментације и сушења (Aumerich и сар., 2003; Holck и сар., 2011; Talon, Leroy и Lebert 2007).

## 2.2 ОСНОВНЕ ФАЗЕ ПРОИЗВОДЊЕ

Према Hutkins-у (2006), производња ферментисаних кобасица се може, у најширем смислу, поделити на следеће фазе: 1. прва фаза је припрема производа и обухвата наредне кораке; избор и припрему сировина, мешање надева и пуњење у омотаче. У другој фази кобасице се подвргавају условима неопходним за ферментацију.

У трећој фази, након ферментације, кроз један или више процеса образује се специфичан укус, текстура и одрживост производа (слика 2.1). Због тежишта теме докторске дисертације у даљем тексту пажња ће бити усмерена, првенствено, на технологију производње ферментисаних сувих кобасица.



Слика 2.1. Основни кораци у производњи ферментисаних кобасица (Hutkins, 2006)

## 2.2.1 Избор и прирема сировина

### 2.2.1.1. Месо (мишићно ткиво)

Месо је основна сировина у производњи ферментисаних кобасица. Квалитет производа зависи, пре свега, од врсте, количине и квалитета меса и масног ткива који улазе у састав надева (Radetić, 1997). Познато је да ферментисане кобасице могу да се праве од меса различитих врста сисара и птица. Према нашим прописима, тј. Правилнику о квалитету меса дозвољена је производња од меса прве и друге категорије пореклом од домаћих папкара и копитара, меса живине прве категорије, као и од меса дивљачи. У литератури се наводе и примери успешне производње од меса индијског бивола, ноја, кенгура и различитих врста јелена. У већини случајева најчешће се користи свињско месо и свињско масно ткиво, осим у заједницама у којима је употреба наведених сировина забрањена из религиозних разлога или је у питању висока цена



меса поменуте врсте животиња (Feiner, 2006). У земљама са претежно муслиманским живљем за производњу се углавном користи говедина, самостално или са овчијим или козијим месом (Vural и Ozvural, 2007). Насупрот томе, употреба овчијег и козјег меса у другим срединама нема већи значај, услед снажног и препознатљивог мириса, који често изазива одбојност код потрошача (Ruiz, 2007). Када су у питању мешане ферментисане кобасице, свињском месу се најчешће додаје говеђе месо (10-20%) ради боље сједињености надева и бржег одавања влаге током сушења. Поред тога, због већег садржаја миоглобина, постиже се и јача обојеност производа (Toldra, 2002). У Европи и Северној Америци говеђе месо се чешће употребљава за производњу полусувих ферментисаних кобасица (Vignolo, Fontana и Fadda, 2010). Последњих година пилеће месо има све већу примену у Северној Америци али и у другим деловима света, док је у земљама Блиског истока у употреби и месо од камила (American Meat Institute, 2014; Santchurn и Collignan, 2007; FSIS, 2001; Gulf Cooperation Council, 2008). У погледу квалитета сировина, Hutkins (2006) наглашава да је месо плећки, потколеница и подлактица најпогодније за производњу кобасица услед најбољег сједињавања масе надева. С друге стране, рН вредност меса различитих делова трупа се међусобно разликује и наведена појава је уочљива када се кобасице израђују од само једног типа обрезака као, на пример, од плећки које имају вишу рН вредност од меса потколеница (Barbuti и Parolari, 2002). Према Rust-у (2007), месо потколеница и подлактица треба избегавати због већег садржаја везивног ткива, које неповољно утиче на конзистенцију полусувих ферментисаних производа. Исти аутор напомиње да се због одговарајуће протканости везивним ткивом може употребљавати и месо у пределу образа али да често садржи већи број микроорганизама, што представља опасност по микробиолошку безбедност производа. Други аутори не наводе значајније разлике у погледу квалитета меса појединих делова трупа и напомињу да се за производњу ферментисаних кобасица могу користити и обресци са buttova, трбушног зида, вратног дела и образина (Demeyer и Toldra, 2004). Када је у питању производња пилећих ферментисаних кобасица Feiner (2006) напомиње да је најбоље користити месо карабатака. У табели 2.3 наведен је просечан састав мишића сисара.

**Табела 2.3.** Просечан састав мишића сисара (Wang, 2006)

Основни састојци	Садржај (%)
Вода	75,0
Беланчевине	19,0
Масти	2,5
Шећери	1,2
Небеланчевинасти азотни састојци	1,65
Неоргански састојци	0,65
Витамини и друге материје	у траговима

За производњу ферментисаних кобасица употребљава се месо здравих, чистих и нестресираних животиња, које треба да буде хигијенски исправно, односно да садржи мали број непожељних микроорганизама (Essien, 2003; Lucke, 2000). У том погледу, укупан број аеробних мезофила у месу намењеном изради ферментисаних кобасица треба да је мањи од  $10^5$  CFU/g, најбоље између  $10^2$  и  $10^3$ , док ниво припадника породице *Enterobacteriaceae* не сме да буде виши од  $10^4$  по граму меса (Feiner, 2006).

Нарочиту пажњу треба посветити главним бактеријским патогенима везаним за ферментисане кобасице као што су врсте рода *Salmonella*, ентерохеморагични патотипови врсте *Escherichia coli* (ЕНЕС) а пре свега серотип O157:H7 (у даљем тексту ЕНЕС O157), *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*. Пажњу треба посветити, такође и паразитима, вирусу авијарне инфлуенце, приону бовине спонгиоформне енцефалопатије (BSE) као и присуству хемијских резидуа (Nørrung и Bunčić 2008; Porto-Fett и сар. 2008; Vignolo, Fontana и Fadda, 2010; Skandamis и Nychas 2007; FSIS, 2001).

Лимфни чворови и крвни угрушци треба да буду одстрањени из меса јер често садрже микроорганизме у великом броју и могу да угрозе ферментацију и микробиолошку безбедност производа (Feiner, 2006). Поред тога, видљиве промене на месу, као што су крвни угрушци, сушењем постају још уочљивије чиме се умањује сензорни квалитет производа (FSIS, 2014). Месо намењено производњи ферментисаних кобасица треба да буде очишћено од међумишићног масног и грубог везивног ткива. Међумишићно масно ткиво садржи више незасићених масних киселина, услед чега има нижу тачку топљења. Приликом уситњавања честице меса се замашћују, што отежава образовање боје и одавање влаге током ферментације и сушења. С друге стране, грубо везивно ткиво током сушења постаје тврдо и неповољно утиче на сензорна својства производа (Vesković-Moračanin и сар., 2011.)

Узраст животиња је битан чинилац квалитета меса намењеног за производњу ферментисаних кобасица. Препоручује се месо зрелих животиња пошто садржи више миоглобина и мање воде, услед чега има јаче изражену црвену боју и чвршће је конзистенције. Нарочито погодним сматра се месо добро ухрањених али не сувише масних крмача и зрелих бикова, као и месо од мршавијих крава (Вуковић, 2012; Mayoal и сар., 1999; Радетић, 1997).

Садржај меса у сувим и полусувим кобасицама се креће од 70 до 90%, док је у кобасицама за мазање, ради постизања мекше конзистенције, нижи и износи 50-70%. За производњу ферментисаних кобасица може да се користи охлађено (-1 до +2 °C), намрзнуто (до -12 °C) или замрзнуто (до -18 °C) месо (Vuković, 2012). Сврха коришћења меса ниске температуре је да се спречи топљење масти и замашћивања честица меса током поступка уситњавања, како не би дошло до поремећаја сушења у каснијој фази производње. Поред тога, ниским производним температурама се успорава или зауставља рад ткивних ензима и умножавање микробиота (Feiner, 2006; Fellows, 2000). Пре поступка замрзавања охлађено месо (<7 °C) се сече у одговарајуће комаде (обреске) са којих је претходно одстрањено масно и грубо везивно ткиво (Luske, 2000). У погледу квалитета меса најпогоднија брзина замрзавања је од 2-5 cm/h до -7 °C, која се постиже при температурама ваздуха од -40 до -65 °C (Petrović и сар., 1993). Током складиштења, код замрзнутог меса може доћи до појаве мане у виду хладних опекотина. Услед исушивања површинског слоја промењена места добијају сунђераст, непожељан изглед који се код јаче изражене појаве задржава и након одмрзавања. Последице су губитак масе, умањен квалитет прераде и нарушена сензорна својства промењених делова меса. Мана се јавља код неумотаних или неодговарајуће умотаних комада меса изложених ниској влажности и јаком струјању ваздуха или код неодговарајућег одржавања температуре током складиштења (James, 2002, Ranken, 2000). Поступком замрзавања се највећим делом заустављају биохемијски процеси у месу чиме се постиже његова дуготрајна одрживост. Упркос томе, успорена оксидација масти, као и ензимска разградња масти и беланчевина и даље постоји, услед чега дуготрајно складиштење неповољно утиче на укус, мирис и текстуру производа (Fellows, 2000). Из наведеног разлога препоручује се да говеђе месо након замрзавања

не треба складиштити на  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  дуже од 6 месеци, док свињско месо, при истој температури, не треба да се складишти дуже од три месеца (Prändl и сар., 1988).

За успешан почетак ферментације пожељно је да рН меса буде у границама од 5,5 до 5,8 (Luske, 2000). Код тако одзрелог меса, ниске рН вредности, смањен је водени омотач беланчевина и повећан удео слободне воде што доводи до проширења међућелијског простора мишићних ћелија. Услед наведене појаве соли боље продиру у месо а олакшан је и поступак сушења (Vuković, 2012). Употреба технолошки мање пожељних категорија меса није препоручљива јер може да доведе до поремећаја поступка ферментације и сушења и умањеног квалитета крајњег производа. Због тога треба избегавати бледо мекано водњикаво (БМВ) месо, с обзиром на то да се добија слабија обојеност и конзистенција ферментисаних кобасица. Код наведене категорије меса изражена је денатурација беланчевина као последица наглог пада рН вредности у још увек топлим мишићима (Monin, 2004; Ranken, 2000). Постоји и мишљење да се употребом БМВ меса може убрзати поступак сушења (Townsend и сар. 1980; Nonkavaara, 1988), односно, да се може искористити његова изражена ексудативност. У том случају постоји опасност од настанка појаве сувог руба или прстена услед сувише брзог исушивања површинског слоја кобасице изазваног јаким умрежавањем беланчевина што онемогућава даљу дифузију воде из дубљих слојева током фазе сушења (Ruiz, 2007). Као компромисно решење Wirth (1985) предлаже да се БМВ месо може употребљавати али тако да чини највише 30% укупног садржаја надева. Тамно чврсто суво (ТЧС) месо је друга технолошки непожељна категорија која се, најчешће, јавља код младих бикова као последица стреса током утовара, превоза и за време боравка у сточним депоима, непосредно пре клања. Развија се у споро реагујућим мишићима, који имају виши садржај миоглобина и мале залихе гликогена. Одликује се вишом рН вредношћу ( $>6$ ) и слабијим одавањем воде, чиме се продужава поступак сушења што погодује настанку квара и преживљавању, евентуално, присутних патогена. Образовање пожељне боје крајњег производа је, такође, отежано с обзиром на неодговарајуће услове за стварање пигмента саламурења. Због наведених мана већина аутора препоручује избегавање дате категорије меса (Feiner, 2006; Toldra, 2002; Monin, 2004). Ruiz (2007), међутим, сматра да употреба ТЧС меса не представља ману, барем када је у питању микробиолошка безбедност, под условом да се ферментација одвија уз употребу стартер култура.

У производњи ферментисаних кобасица месо, као основна сировина, може делимично да буде замењено другим, јефтинијим, изворима беланчевина. У ту сврху, најчешће се као замена користи изолат сојиних беланчевина у количини од 5 до 30% од укупно предвиђеног садржаја меса (Feiner, 2006).

### **2.2.1.2 Масно ткиво**

Маст суштински утиче на сочност, укус и текстуру ферментисаних кобасица. Извор је енергије и витамина растворљивих у мастима (А, Д, Е, К), као и есенцијалних масних киселина које учествују у изградњи мембрана ћелија (Moloney, 2002; Higgs и Mulvihill, 2002). У производњи ферментисаних кобасица најчешће се користи масно ткиво свиња због пожељних сензорних карактеристика. У технолошком погледу, говеђе масно ткиво је чвршће, теже се топи и мање је подложно квару, односно, настанку ужеглости производа. Упркос наведеним предностима ређе се употребљава, у односу на свињско масно ткиво, што се објашњава слабијим сензорним својствима (Feiner, 2006). У земљама у којима се због религиозних убеђења избегава свињетина, употреба

говеђег лоја је уобичајена али се још пожељнијим сматра масно ткиво маснорепих раса оваца (Vural и Ozvural, 2007; Soyer, Ertas и Uzumcuogly, 2005).

Када су у питању ферментисане кобасице које се подвргавају сушењу препоручује се употреба чврстих делова и поткожног масног ткива врата, гребена и леђа и то од старијих товљених свиња, чија се маст теже топи приликом уситњавања и зрења (Вуковић, 2012; Радетић, 1997). Чврсто масно ткиво наведених делова тела има значајан удео везивно ткивних влакана и повољан однос засићених и незасићених масних киселина, услед чега је зрнасте грађе и омогућава неометано одавање влаге, односно, не доводи до замашћивања честица мяса и повољно утиче на конзистенцију производа. С друге стране, поткожно масно ткиво плећки, ногу и главе садржи више незасићених масних киселина, због чега је на нижим температурама мекше и лакше се топи и, услед тога је погодније за производњу ферментисаних кобасица за мазање (Feiner, 2006; Ranken, 2000). Уколико се, пак, употребљава говеђе масно ткиво, најпогоднији су делови око бубрега (Luske, 2000). За производњу пилећих кобасица препоручује се употреба поткожног масног ткива пошто садржи више везивно ткивних елемената, у односу на трбушно масно ткиво, што даје већу чврстину и боље изражену зрнасту грађу производа (Santchurn и Collignan, 2007).

Када је у питању технолошки квалитет, чврстоћа масног ткива у температурном опсегу производње и употребе кобасица зависи, првенствено, од односа засићених и незасићених масних киселина. Супротно томе, на температури тела домаћих животиња ( $\geq 37$  °C) већи део масти се налази у течном стању и тада чврстоћа масног ткива више зависи од заступљености и чврстине везивноткивних елемената, чији удео је супротно сразмеран уделу засићених масних киселина. Општа физиолошка појава је, међутим, да се са старошћу животиња у масном ткиву повећава удео и засићених масних киселина и везивноткивних елемената (Bothma и сар., 2014; Ranken, 2000).

Ниво мононезасићених и посебно полинезасићених масних киселина (са две или више двоструких веза између угљеникових атома) у саставу масти управо је сразмеран температури топљења масти. Сматра се да је разлог просторна закривљеност на местима двоструких веза између угљеникових атома, што доводи до слабије повезаности међу молекулима масти и ниже тачке топљења (Smith, Smith & Lunt, 2004). Из наведеног разлога у производњи сувих и полусувих ферментисаних кобасица препоручује се употреба масти са мање од 12% полинезасићених масних киселина, како би се избегле могуће мане у текстури, укусу и боји производа (Stiebing, 1994). С тим у вези, Hugo и Roodt (2007) сматрају да свињско масно ткиво које садржи више од 41% засићених масних киселина има пожељан ниво чврстоће. Ниво чврстоће се разликује према подручју тела са ког масно ткиво потиче. Масно ткиво телесних шупљина је, углавном, чвршће и има вишу тачку топљења у односу на поткожно масно ткиво. Разлике у саставу постоје и међу слојевима истог комада масног ткива. У поткожном масном ткиву разликује се три или више слојева при чему слој најближи кожи садржи највише незасићених масних киселина (Vuković, 2012; Feiner, 2006; Keeton и Eddy, 2004). Температура топљења масних киселина утиче и на боју производа. Чврсто, неотопљено, масно ткиво одликује се пожељно белом бојом, док лако топљиво масно ткиво има тамно сиву боју што је, претпоставља се, последица веће прозачности претежно течне средине кроз коју просијавају капиларни судови и везивноткивни елементи (Zhou и сар., 1993). Поред тога, већи садржај моно и полинезасићених масних киселина даје сјајан, уљаст изглед сечене површине производа, као и изражено мекану текстуру, што у већини случајева, када су у питању ферментисане кобасице, изазива одбојност код потрошача (Townsend и сар., 1980; Ruiz и сар., 1998).

Садржај масног ткива у надеву сувих и полусувих ферментисаних кобасица се креће од 10-30%, док је у кобасицама за мазање 30-50%. Већи садржај масти успорава одавање влаге и чини поступак сушења дужим, док изразито смањен садржај доводи до веома брзог сушења и слабијих сензорних својстава крајњег производа (Ruiz, 2007; Paradimas и Bloukas, 1999). У производњи ферментисаних кобасица може се користити намрзнуто (-12 °C) или замрзнуто (-18 °C) масно ткиво. Због опасности од оксидације, замрзнуто масно ткиво не треба да се чува дуже од 3 месеца, односно, треба да се користи у што свежијем стању (Vuković, 2012; Toldra, 2002). Оксидација масти представља један од главних узрока квара и неупотребљивости производа од меса. Одликује се сложеним процесом разградње, пре свега, незасићених масних киселина, при чему настају различита једињења чијим накупљањем долази до настанка квара или ужеглости производа (Honikel, 2009). Уколико се оксидација одвија у присуству молекулског кисеоника, појава се назива аутооксидација и представља аутокаталитички процес који се одвија ланчано и са убрзањем. Оксидација масти се убрзава у присуству прооксиданата, у које спадају кухињска со и метали (гвожђе, бакар, кобалт). Јони метала подстичу пренос електрона, односно, редокс реакције и тиме убрзавају стварање слободних радикала који започињу ланчану реакцију оксидације (Shahidi и Zhong, 2010). Штетне последице оксидације су нарушавање боје, мириса и укуса производа, умањивање његове хранљиве вредности, као и накупљање једињења потенцијално токсичних по здравље људи (Ladikos и Lougovois, 1990). Међу различитим производима нарочито неповољан утицај имају алдехиди на основу чијег садржаја се утврђује свежина, односно, ниво узнапредовалости наведене појаве. С тим у вези (табела 2.4), малондиалдехид, (MDA) канцерогени и мутагени производ оксидације полинезасићених масних киселина, један је од најчешћих показатеља квалитета меса и производа од меса (Mandić, 2007; Petrović и сар., 2010a).

**Табела 2.4.** Оријентациона скала за тумачење садржаја малондиалдехида (MDA) у месу и производима од меса (Mandić, 2007)

MDA (mg/kg)	Интерпретација резултата <i>квалитет меса и производа од меса</i>
<0,2	Добар квалитет
0,2-0,5	Ограничен, толерантан
0,5-1,5	Мало оксидован
1,5-5	Оксидован
>5	Ужегао, нејестив

Треба истаћи да оксидација присутна у мањем обиму нема штетан утицај на квалитет производа, већ напротив, присуство производа оксидације, попут кетона, алдехида, алкохола и киселина, у малим количинама повољно утиче на арому производа (Honikel, 2009).

### 2.2.1.3 Кухињска со

Поред меса, кухињска со представља основни састојак свих ферментисаних производа од меса (Ruiz, 2008). Садржај соли у надеву се креће од 2-4% и зависи од начина производње, као и од захтева потрошача (Ruiz, 2008; Vignolo, Fontana и Fadda,

2010). Кухињска со треба да је беле боје, без мириса и не сме да садржи стране примесе. Садржај NaCl у кухињској соли мора бити најмање 97% а воде највише 3 %. Изузетак је фино уситњена со, у којој садржај воде не сме бити већи од 0,5% (Vuković, 2012). Улога соли у месу је вишеструка и њено дејство се остварује на физичком, биохемијском и сензорном нивоу.

**Укус.** Кухињска со обогаћује укус мяса дајући му слану компоненту, истовремено подстичући ослобађање ароматичних испарљивих састојака чиме се наглашава и обогаћује укус који потиче од самог мяса (Ruusunen и Puolanne, 2005). Feiner (2006) напомиње да се недостатак кухињске соли у ферментисаним месним производима не може надокнадити употребом зачина. С друге стране, почетни садржај соли у надеву од 4% или преко тога даје сувише слан укус крајњег производа, који је неприхватљив за већину потрошача (Durand, 1999). Степен сланости зависи и од физичког облика у којем се со налази. Со у љуспицама се боље раствара од соли у гранулама и због тога има предност код производа у које се не додаје вода, као што су суви производи од мяса (Campbell, 1979). Након сазнања о вези између повећаног уноса јона натријума са повишењем крвног притиска и болестима кардиоваскуларног система, као и са ризицима везаним друге здравствене поремећаје, присутна је тежња ка смањивању количине соли у храни (Šarčević, Lilić и Vranić, 2014), при чему Olson (1982) наводи да се уобичајени садржај (>2%) може смањити за највише 25%, без штетних последица по укус, текстуру и одрживост производа. С друге стране, испитивања која су спровели Corral, Salvador и Flores (2013) указују да су ферментисане кобасице чији је садржај соли смањен за само 16% биле слабијег мириса, укуса, сочности, као и укупне прихватљивости у поређењу са контролним узорцима уобичајеног садржаја соли од 2,7%. Други начин смањења уноса јона натријума је употреба замена за кухињску со, међу којима се најчешће користи калијум-хлорид. Поред сланости, наведена супстанца испољава и друге, мање пожељне, карактеристике, као што су горчина и металан укус због чега се препоручује да чини мање од 40% замене за кухињску со или да се примењује као комплетна замена али уз присуство супстанци које неутралишу дате особине (Campagnol и сар., 2011; Desmond, 2006). С тим у вези, Gimeno и сарадници (1999) напомињу да комбинована употреба калијум-хлорида са магнезијум или калцијум-хлоридом, доводи до смањења тврдоће и слабије обојености кобасица, док Guardia и сарадници (2008) истичу да самостално калијум-хлорид појачава тврдоћу производа.

**Текстура.** Водени раствор соли доводи до бубрења миозинских нити и њиховог последичног издвајања из мишићних влакана (миофибрила) што се назива екстракција или солубилизација беланчевина. Предуслов настанка наведене појаве је уситњавање мяса које доводи до цепања цитоплазматске мембране мишићних ћелија што омогућава продор јона соли у простор миофибрила (Lawrie, 1998; Henriksen, 2014). Према Hamm-у (1986) негативни јони хлора се јаче везују од позитивних јона натријума за поларне групе беланчевина што доводи до просторног раздвајања пептидних ланаца услед одбијања истородно негативно наелектрисаних крајева поларних аминокиселина група. Додатни простор се попуњава водом, кидају се везе између молекула миозина и долази до деполимеризације миозинских нити при чему ослобођени молекули прелазе у растворено сол стање. Растворени молекули беланчевина обавијају се око комадића масти и мяса усмеравајући се тако да су хидрофобни делови окренути према мастима док су хидрофилни окренути супротно, односно према води и комадићима мяса. Као последица образује се стабилна јединствена маса надева у којој накнадним

закишељавањем и/или сушењем растворене беланчевине прелазе из сол у гел стање при чему настаје чврста структура погодна за нарезивање (Desmond, 2006; Honikel, 2009).

**Антимикробно дејство.** Антимикробно дејство је последица, првенствено, снижења  $a_w$  вредности, односно, повишења осмотског притиска насталог везивањем молекула воде за јоне хлора и натријума. Разлика у осмотском притиску доводи до преласка воде из средине са нижом у средину са вишом концентрацијом соли, односно, из бактеријских ћелија у околни простор, што ремети метаболизам и успорава или потпуно заустављања умножавање непожељних врста микроорганизама. Осим наведеног дејства, сматра се да соли спречавају умножавање и непосредном токсичношћу јона хлора, као и успоравањем физиолошких активности појединих протеолитичких ензима бактерија. Присуство соли смањује растворљивост кисеоника у месу што, такође, има неповољно дејство када су у питању аеробни микроорганизми (Oskerman и Basu, 2004, Vuković, 2012). Дејство кухињске соли у погледу заустављања раста и умножавања непожељних микроорганизама се испољава најраније, док остали заштитни чиниоци још нису довољно изражени или присутни (пад рН, умножавање млечно-киселинских бактерија, додатно снижавање  $a_w$  сушењем, снижавање температуре и др.), што има важну улогу на одрживост производа у раној фази производње. Истовремено, присуство соли погодује умножавању пожељних халотолерантних млечно-киселинских бактерија (LAB) и припадника рода *Staphylococcus*, што доприноси њиховом преовлађивању у укупној биомаси производа током даљег потупка ферментације и сушења (Ruiz, 2007; Tjener и сар., 2004; Olesen и сар., 2004).

Прооксидантно дејство (Aguirrezabal и сар., 2000) у смислу екстракције гвожђа из хема или непосредним дејством јона хлора на масне киселине умањује се применом других антиоксидативних супстанци, у прво реду применом нитрита или витамина Е (Honikel, 2009)

#### 2.2.1.4 Нитрити и нитрати

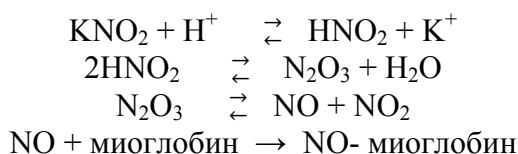
С обзиром на нове приступе у погледу односа исхране и здравља, као и нутритивног квалитета индустријске хране, последњих деценија прикупљено је много података о нитратима и нитритима, који представљају уобичајено присутне додатке у производњи ферментисаних кобасица. Пожељна својства нитрата у производњи меса позната су још од античког доба, док је масовна примена нитрита започела двадесетих година прошлог века, првенствено због израженог антиботулисног дејства (Pegg и Shahidi, 2000). С друге стране, истраживања спроводена последњих деценија указују и на могућу штетност по здравље услед њихове дуготрајне употребе, иако јасни докази о повезаности са појавом канцера нису установљени (Shrader, 2010).

Нитрити и нитрати представљају натријумове или калијумове соли азотасте ( $\text{HNO}_2$ ) и азотне киселине ( $\text{HNO}_3$ ) које се у производњи меса користе као адитиви због позитивног дејства на безбедност, боју и арому производа. Због могуће токсичности, нитрити се у Србији, као и у већини других земаља, стављају у промет заједно са кухињском соли чинећи око 0,5% укупног садржаја хомогене мешавине која се назива нитритна со за саламурење. Наведеном мером успешно се спречава њихова прекомерна употреба, с обзиром на то да у случају предозирања производи имају сувише слан укус. Токсичност нитрата је око десет пута мања у односу на нитрите и износи 80-800 mg/kg телесне тежине, док је летална доза нитрита 30-250 mg/kg телесне тежине човека (Lucke, 2000; Schuddeboom, 1993). У нашој земљи, према Правилнику о прехранбеним

адитивима (број 63/2013), највећа дозвољена количина нитрита (међународно означен као E249 – 250) и нитрата (E251 – 252) која се може додати у поступку производње ферментисаних сувих кобасица, односно, производа од меса који се не обрађују топлотом је 150 mg/kg. Сличне препоруке су на снази и у земљама Европске заједнице где свим производима од меса, током производног поступка, сме да буде додато до 150 mg/kg нитрита при чему је дозвољено додавање и нитрата у количини до 150 mg/kg, уз напомену да је употреба истих ограничена на производе од меса који не подлежу топлотној обради. Код појединих традиционалних производа направљени су изузеци и у њиховом случају садржај наведених адитива може бити виши од прописаних вредности (Commission Regulation EU No. 1129/2011).

Улога нитрита као адитива у производњи меса вишеструко је значајна и односи се на унапређење мириса, укуса, боје и микроболошке безбедности производа (Sindelar и Milkowski, 2011). Након додавања у месо, под дејством молекула воде, нитритне соли се дисосују на позитивне јоне натријума или калијума и негативно наелектрисане нитритне јоне ( $\text{NO}_2^-$ ). У благо киселој средини меса (pH 5,5) део нитритних јона ( $\leq 1\%$ ) се повезује са протонима водоника у азотасту киселину од које настаје анхидрид  $\text{N}_2\text{O}_3$ , чијим даљим разлагањем настаје азот-моноксид (NO) и азот-диоксид ( $\text{NO}_2$ ). Све три реакције теку у оба смера, односно, налазе се у међусобној равнотежи (Honikel, 2008):

( $\text{KNO}_3$ ) нитрат  $\rightarrow$  редукција микроорганизама  $\rightarrow$  нитрит ( $\text{KNO}_2$ )



Бактериостатско дејство нитрита у производима од меса заснива се, пре свега, на присуству азотасте киселине која несметано пролази кроз мембрану бактерија. У бактеријској цитоплазми, више рН вредности од околне средине, киселина лакше дисосује и доводи до поремећаја рада протонске пумпе чиме испољава штетно дејство на раст и размножавање микроорганизама (Honikel, 2008; Adams и Moss, 2008, Yarbrough и сар., 1980). Снижавањем рН вредности средине повећава се удео недисосоване азотасте киселине што појачава антибактеријски учинак нитрита (Freeese, Sheu и Galliers, 1973). С тим у вези, Јау (2000) напомиње да се при рН вредности производа од 4,5 до 5,5 максимално испољава антибактеријско дејство датог адитива. Према Moller-у и Skibsted-у (2002), антибактеријска природа нитрита потиче, између осталог, и од азот-моноксида, деривата азотасте киселине, чије се дејство не испољава универзално, односно, зависи од врсте бактерија. Инхибиторно дејство нитрити испољавају према узрочницима квара меса, као што су *Brochotrix thermosphacta* и *Pseudomonas* врсте (Hospital и сар., 2014). Супротно томе, не доводе до пада броја млечно-киселинских бактерија, док према Грам + каталаза + кокама (G+C+) утичу неповољно али у знатно мањој мери него што је то случај са узрочницима квара, када се примењују у уобичајеним концентрацијама (Hospital. и сар, 2014; Sanz и сар., 1998; Stahnke, 1995). Инхибиторно дејство нитрити испољавају и према патогеним врстама бактерија. У истраживању које су спровели Hospital и сар., (2014) редукција салмонела била је за 1,5 логаритам мања у сувим ферментисаним кобасицама без додатог нитрита, у поређењу са кобасицама којима је додата максимално дозвољена количина од 150 mg/kg надева. У истом истраживању је установљено да смањење количине наведеног адитива за 50% од максимално дозвољене концентрације, не умањује његово дејство



према салмонелама. Истраживањима је, такође, доказано да нитрити, зависно од услова средине (рН, присуство кухињске соли, редокс потенцијал, температура, притисак, присуство других адитива) могу да утичу неповољно на раст и размножавање других патогених врста, као што су: *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* и ЕНЕС О157 (Tomprkin, 2004; Jofre и сар., 2010; Milkowski и сар., 2010; Holck, 2011). Нарочито је значајна улога у заштити против *Clostridium botulinum*, која се огледа у спречавању исклијавања спора и спречавању умножавања вегетативних ћелија насталих исклијавањем спора (Pierson и Smooth, 1982). Претпоставља се да је узрок нарочито успешног дејства нитрита према датој врсти патогена последица инхибиције ензима који садрже атоме гвожђа и сумпора а који учествују у синтези АТФ (Adam и Moss, 2008; Jay, Loessner и Golden; 2005). И поред доказаног антибактеријског дејства, нитрити самостално не могу да осигурају микробиолошку безбедност производа због чега се користе као једна од препрека за спречавање раста и размножавања непожељних микробиота (Holck, 2011; Honikel, 2004).

Пожељна црвена боја саламурења последица је сложеног процеса током којег, у благо киселој средини, нитритни јони ( $\text{NO}_2^-$ ) реагују са хемом миоглобина или оксимиоглобина, из кога су претходно истиснули молекулски кисеоник. Насталом реакцијом гвожђе хема се оксидише и прелази из двовалентног у тровалентно стање ( $\text{Fe}^{+3}$ ) и настаје оксидисани облик миоглобина - метмиоглобин, услед чега уситњено месо у почетку добија браон боју (Sebranek, 2007; Cornforth и Jayasingh, 2004). Истовремено са оксидацијом гвожђа настаје редукција нитрита у азот-моноксид ( $\text{NO}$ ) који се, затим, везује за гвожђе ( $\text{Fe}^{+3}$ ) и настаје нитрозил-метмиоглобин. Под дејством редукујућих супстанци из самог меса ( $\text{NADH}$ , цистеин, глутатион и други састојци), као и применом адитива (аскорбинска киселина, витамин Е) гвожђе се временом редукује у почетни феро облик ( $\text{Fe}^{+2}$ ) и настаје нитрозил-миоглобин који даје препознатљиво црвену боју саламурења. Услед ниске рН и/или  $a_w$  вредности, у ферментисаним производима се настали нитрозил-миоглобин даље денатурише и разлаже на глобин и остатак нитрозомиохромоген, који представља стабилан пигмент, чиме се добија коначна постојана боја производа (Feiner, 2006). Кухињска со подстиче стварање азот-моноксида из нитрита и тиме убрзава образовање боје саламуреног меса (Shahidi и Samarapauaka, 2004). Саламурено месо поприма зелену боју у случају квара изазваног умножавањем одређених микроорганизама, нарочито плесни или услед промена које могу настати држањем кобасица на недовољно ниским температурама у спољашњој средини, односно, у присуству молекуларног кисеоника и светлости па се нитрити, донекле, могу сматрати и индикаторима одрживости и здравствене исправности производа (Boles и Pegg, 2005; Ockerman и Basu, 2004; FAO, 1990).

Нитрити успешно спречавају оксидацију масти, чак и у присуству кухињске соли која подстиче наведену појаву (Sindelar и Milkowski, 2011). Антиоксидативно дејство се објашњава чињеницом да се у присуству молекуларног кисеоника азот-моноксид лако оксидује и прелази у азот-диоксид ( $\text{NO}_2$ ), везујући за себе кисеоник (Honikel, 2008). Поред тога, азот-моноксид везује и хелира слободне јоне метала и гвожђе у хему, спречавајући на тај начин њихово прооксидативно дејство (Sebranek, 2009; Peg и Shahidi, 2004). Саламурено месо има препознатљиво пријатан укус, при чему тачан разлог наведене појаве још увек није установљен. Сматра се да је последица антиоксидативног дејства азот-моноксида на масти и непознатих реакција нитрита и азот-моноксида са састојцима меса током којих настају различите испарљиве ароматичне супстанце (Sindelar и Milkowski, 2011).

Балансирајући позитивна и негативна дејства нитрита, уредбом Европске комисије из 2011. године (1129/ЕС) изнета је могућност ка даљем смањивању садржаја

нитрита у свим производима од меса како би се додатно умањила опасност од могућег настанка канцерогених супстанци – нитрозамина проузрокована дуготрајним конзумирањем производа који садрже нитрите. Акутна токсичност нитрита потиче од његовог деривата азот-моноксида (NO) који има јак афинитет ка везивању за хемоглобин при чему настаје метхемоглобин, оксидисани облик хемоглобина ( $\text{Fe}^{+3}$ ) који нема способност да везује молекуларни кисеоник. Уколико је више од 70% хемоглобина измењено у метхемоглобин долази до смртог исхода тровања (Bryson, 1996). Нитрити изазивају и проширење крвних судова (вазодилаторно дејство), што у случају прекомерне количине може да доведе до пролазног општег поремећаја крвотока, односно, до настанка стања колапса (Inchem, 2006).

Употреба нитрата у саламурењу меса захтева присуство микроорганизама који су способни да га редукују у нитрите. У том погледу нарочито значајну улогу имају *Staphylococcus* и *Kocuria* врсте (Stahnke и Tjener, 2007).

### 2.2.1.5 Шећери

Основна улога шећера у производњи ферментисаних кобасица је да послуже као извор енергије и С атома млечно киселинским бактеријама у стварању млечне киселине, чије накупљање се позитивно одражава на микробиолошку безбедност производа. У условима убрзане, индустријске, производње која се одвија на вишим температурама ( $\geq 20^{\circ}\text{C}$ ), пожељно је да се током прва три дана ферментације рН вредност снизи испод 5, како би се зауставио раст непожељних микроорганизама (Ruiz, 2007; Demeyer и Toldra, 2004). С тим у вези, у брзоферментујуће кобасице се додаје најмање 0,5% шећера, док се у спороферментујуће производе, чија се ферментација одвија на нижим температурама, додаје од 0,1 до 0,5% шећера, од укупног садржаја најева. (Hutkins, 2006; Ruiz, 2007). Код традиционалне производње, која се одвија у зимско доба године, шећери се, углавном, не додају у надев због чега рН крајњег производа остаје иста или је виша од почетне вредности (Talon и сар, 2008; Moreti и сар, 2004). Ambrosiadis и сар., (2004) наводе да кобасице без додатог шећера могу имати нижу крајњу, у односу на почетну рН вредност, што се објашњава искориштавањем шећера пореклом из зачина. Шећери који се најчешће користе у производњи ферментисаних кобасица су глукоза, сахароза, лактоза и скробни декстрини али се наводи и употреба малтозе, фруктозе и галактозе, као и неких сложенијих једињења (Vuković, 2012; Feiner, 2006). Степен закишељавања садржаја кобасице зависи од количине и врсте додатог шећера. За производњу млечне киселине ферментујући микроорганизми најбрже искориштавају просте шећере (моносахариде). Шећере мало сложеније грађе (дисахариди и олигосахариди), микроорганизми морају да хидролизују до простих шећера које, затим, могу да разлажу на молекуле млечне киселине и друге производе ферментације. У том погледу, све млечнокиселинске бактерије могу да разложе глукозу, без остатка, на молекуле млечне киселине, услед чега њена примена доводи до најбржег и најнижег (потпунијег) снижавања рН вредности кобасица (Feiner, 2006; Lucke, 2000). После глукозе, сахароза је најбрже ферментујући шећер, док се лактоза и декстрини одликују знатно споријом и непотпунијом разградњом, што узрокује блажи пад рН вредности крајњег производа. С друге стране, непотпуно разграђени шећери, нарочито лактоза и малтодекстрини, повољно утичу на укус тиме што ублажавају изражен утицај кухињске соли (Feiner, 2006; Prandl и сар., 1988). Постоји и супротан став који износе Hedrick и сар. (1994), напомињући да лактоза нема изражену способност заслађивања и да, шта више, може да изазове појаву горког укуса код одређених производа. Додавањем шећера, односно,

њиховом делимичном или потпуном конверзијом у млечну киселину снижава се рН вредност, што делује инхибиторно на микробиоте које редукују нитрате у нитрите и тиме доприносе развоју богатог укуса. Услед тога се код спороферментујућих кобасица избегава додавање већих количина шећера како се не би реметило стварање ароматичних супстанци које дају препознатљиву арому крајњег производа (Toldra, 2002; Lucke, 2000). Додавање већих количина шећера, нарочито у условима спорог сушења, може довести, такође, до појаве изразито киселог укуса и других непожељних промена, као што су развој сиве или сиво-зелене боје, рупичавост текстуре и слузавост надева, што је последица претеране активности млечнокиселинских бактерија, нарочито хетероферментативних врста (Toldra, 2002; Lucke, 2000). У циљу спречавања појаве наведених мана у Немачкој је, тим поводом, ограничен садржај шећера на највише 2% од укупне количине надева код ферментисаних кобасица (Lucke, 2012).

### 2.2.1.6 Глуконо-делта лактон

У савременој производњи ферментисаних кобасица, нарочито северноевропског типа, честа је употреба глуконо-делта лактона, као средства којим се утиче на бољу микробиолошку одрживост производа. Глуконо-делта лактон (ГДЛ) је циклични естар глуконске киселине који се користи за повећање киселости ферментисаних кобасица. У присуству молекула воде естарски прстен се цепа и ослобађа се Д глуконска киселина, ( $pK_a = 3,7$ ), која се хидролизује и снижава рН вредност производа. Реакција се одвија постепено, у трајању од 26 - 72 часа, чиме се делимично опонашају услови ферментације узроковане млечно-киселинским бактеријама (Vuković, 2012; Adams и Mos, 2008; Rust, 2007; Feiner, 2006), при чему је брзина закишељавања управо сразмерна садржају воде и температури надева (FSIS, 2014). Током даљег поступка ферментације глуконска киселина бива, углавном, разложена на млечну и сирћетну киселину активношћу лактобацила из надева (Lucke и Hechelmann, 1987). Основна улога наведеног адитива је да снизи крајњу рН вредност производа испод 5,2 чиме се спречава умножавање непожељних микроорганизама, нарочито уколико се ферментација одвија на вишим температурама, што је чест случај у производњи полусувих ферментисаних кобасица. Количина ГДЛ-а у смеси надева зависи од потребе произвођача (*quantum satis* - намирницама се сме додати само онолико адитива колико је нужно да се постигне жељени учинак, под условом да се тиме не обмањује потрошач) при чему један грам адитива на килограм садржаја доводи, у просеку, до снижавања за 0,1 јединицу рН вредности коначног производа. Осим количине адитива, јачина закишељавања управо је сразмерна температури ферментације, као и количини масног ткива које смањује пуферски капацитет надева (Radetić, 1997; Vuković, 2012; Feiner, 2006). ГДЛ повољно утиче на јачину и стабилност боје саламуреног меса тиме што, снижавањем рН вредности средине, подстиче стварање азот-моноксида при чему исти разлог доприноси и бржем сједињавању надева (Feiner, 2006; Vuković, 2012). Упркос својству ГДЛ-а да постепено развија киселост, његова примена може, ипак, довести до сувише брзог пада рН и прераног исушивања спољашњег слоја кобасице, са последичним одвајањем омотача и поремећајем одавања влаге из унутрашњих слојева производа. Из тог разлога, Roncales (2007) наглашава да је код примене ГДЛ-а неопходна строга контрола температуре и релативне влажности ваздуха, како би се избегле наведене појаве. Веће количине ГДЛ-а изазивају појаву горког укуса и подстичу активност хетероферментативних *Lactobacillus* врста које, поред млечне, производе и сирћетну киселину и водоник пероксид, што додатно умањује квалитет укуса, подстиче појаву ужеглости и слабије обојености производа (Feiner, 2006).

Снижавање рН вредности испод 5,2 делује инхибиторно на већину технолошки корисних G+C+ бактерија, због чега се наведени адитив не употребљава у производњи спороферментујућих кобасица (Ravuts и сар., 2010; Lucke, 2000; Ally и сар., 1992). Поред тога, Toldra (2002) износи став да брзо закишељавање значајно умањује дејство ензима пореклом из самог меса што, такође, неповољно доприноси укусу крајњег производа. У току складиштења спороферментујућих кобасица са вишим садржајем ГДЛ-а примећена је појава горког укуса и недовољне сједињености садржаја што Васис (1986) доводи у везу са разградњом ГДЛ-а на сирћетну киселину. Према истом аутору, ГДЛ делује и прооксидантно, односно, убрзава појаву ужеглости.

### 2.2.1.7 Аскорбинска киселина

Употреба аскорбинске киселине у индустријској производњи хране постала је уобичајена од седамдесетих година прошлог века, након сазнања да у намирницама које садрже секундарне аminer и нитрите, под одређеним условима, могу да настану канцерогене супстанце - нитрозамини (Cassens, 1997; Sindelar и Milkowski, 2011). Аскорбинска киселина и њен изомер, изоаскорбинска (ериторбинска) киселина, се могу употребљавати у изворном облику или у виду натријумових соли као антиоксидативни адитиви у производњи ферментисаних кобасица. Њихова улога је да умање опасност од настанка канцерогених нитрозамина, убрзају образовање и помогну одржање боје саламуреног меса и успоре оксидацију масти, односно, појаву ужеглости производа (Feiner, 2006; Hutkins, 2006; Toldra, 2002; Demeyer и Stahnke, 2002). Као последица научних дебата о могућностима настанка нитрозамина у храни и дигестивном тракту човека, од седамдесетих година прошлог века присутан је тренд ка смањивању садржаја нитрита у месним производима, уз истовремену употребу аскорбата и ериторбата у циљу додатног умањења садржаја резидуалног нитрита (Cassens, 1997; ЕС/1129, 2011). Антиоксидативно дејство аскорбинске и изоскорбинске киселине и њихових соли остварује се на неколико нивоа. Донирањем водоника подстичу редукцију нитрита ( $\text{NO}_2^-$ ), преко њиховог анхидрида ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) у азот моноксид ( $\text{NO}$ ) и, истовремено, спречавају оксидацију нитрита у нитрате ( $\text{NO}_3^-$ ). Аскорбинска киселина спречава стварање реактивног  $\text{NO}^+$  облика, при чему се не зна поуздано механизам али се претпоставља да се остварује редуковањем нитрита у  $\text{NO}$  облик, који затим бива стабилизован услед везивања за киселину. Поред тога, доводе до редукције слободних јона метала (Fe, Cu, Co), преводе молекуларни кисеоник у молекуле воде и нитрозометмиоглобин у нитрозомиоглобин облик (Honikel, 2008; Feiner, 2006; Oskerman и Basu, 2004; Wainright, 1986). У процесу аутооксидације масти, аскорбинска киселина учествује у неутрализацији пероксидних међупроизвода и тиме успорава даљу ланчану реакцију која доводи до ужеглости (Pegg и Shahidi, 2004). Према нашим прописима (Правилник о прехранбеним адитивима, 63/2013) аскорбинска киселина и њена со (аскорбат) се примењују *quantum satis*, док је количина ериторбинске киселине ограничена на највише 500 mg/kg у саламуреним и конзервисаним производима од меса. Просечна концентрација аскорбинске киселине у индустријској производњи ферментисаних кобасица износи око 500 mg/kg надева (Lucke, 2000; Honikel, 2008). За исти учинак потребно је додати нешто већу количину аскорбата, што се објашњава смањеним уделом киселинског остатка, услед присуства јона натријума, у укупној молекуској маси соли (Feiner, 2006; Oskerman и Basu, 2004). Аскорбат ступа у реакцију са нитритима 240 пута брже у односу на аскорбинску киселину и може да се примењује заједно у мешавини са нитритима, што га чини погоднијим за употребу у индустријској производњи (Pegg и Shahidi, 2000; Toldra и Reig, 2007). С друге стране, уколико се

аскорбинска киселина у воденој средини помеша са нитритном соли долази до бурне реакције уз нагло ослобађање гаса ( $\text{NO}_2$ ), браон-црвене боје, који надражује слузокоже, уз истовремени губитак самог нитрита. Због тога се наведене супстанце не смеју мешати истовремено са месом, односно, аскорбинску киселину треба додати у надев за кобасице пре или после додавања нитритне соли (Feiner, 2006, Vuković, 2012). У литератури се, такође, наводи да аскорбинска киселина и њен изомер утичу повољно на укус производа, што се доводи у везу, пре свега, са успоравањем процеса аутооксидације масти (Hutkins, 2006, Lucke, 2000).

Применом аскорбинске киселине или њеног изомера умањује се антимикуробна улога нитрита услед његовог редуковања у  $\text{NO}$  облик и последичног смањивања количине резидуалног нитрита у надеву (Fite и сар., 2004).

### 2.2.1.8 Зачини

Зачини су делови различитих врста зачинских биљака који се на основу пријатног и препознатљивог мириса и укуса користе за зачињавање хране (Вуковић, 2012). Зачини се могу додати у храну и у циљу постизања одговарајуће боје, као и ради побољшања одрживости производа (Правилник о квалитету зачина, екстракта зачина и мешавине зачина, Сл. гласник Р. Србије, 72/14). За зачињавање се могу користити следећи делови зачинских биљака: корен, ризом, луковица, кора, стабло, лист, цвет, плод и семе (Вуковић, 2012; Ockerman и Basu, 2004). У односу на јачину дејства, зачинско биље се дели на врсте пореклом из тропских крајева, које се називају и правим зачинима и на врсте које потичу из умерених климатских подручја, чија су ароматична својства мање изражена. Од врста које потичу са умерених климатских подручја користе се само делови стабла (херба), листови (фолија) или ароматично семење (Vuković, 2012; Ockerman и Basu, 2004).

За зачињавање се могу користити и друге природне или вештачке материје које утичу на укус у мирис производа, као што су екстракти зачина (олеорезини), есенције зачина, етарска уља, ароме и поједини адитиви (Вуковић, 2012). Састојци који дају препознатљив укус и мирис зачинима су испарљиве супстанце, које се називају етарска уља и неиспарљиве супстанце које се називају резини. Екстракти етарских уља садрже само део од укупне ароме зачина, односно, не садрже компоненте као што су горчина, љутина или слаткоћа, док су олеорезини екстракти који садрже и етарска уља и резине, због чега, у односу на етарска уља, пружају комплетнији мирис и укус зачина од којих потичу (Ockerman и Basu, 2004). Поред утицаја на мирис и укус, зачини испољавају и друга пожељна својства везана за производњу хране. Бели лук, жалфија, рузмарин и паприка поседују изражено антиоксидативно дејство, при чему јачина наведене појаве зависи и од средине у којој се налазе (Vuković, 2012; Ping и Wu, 2007; Aguirrezabali сар., 2000). Супротно томе, зачинско биље од ког се користе делови стабљике и листови садржи пигмент хлорофил који се таложи у мастима и може да изазове дисколорацију и оксидацију масног ткива (Vuković, 2012; Чое и Min, 2006). Паприка, шафран и куркума делују и као средства за бојење производа, док семе слачице и кима има способност бубрења и доприноси бољем емулговању масти у надеву за кобасице (Vuković, 2012; Chi и Wu, 2007; Feiner, 2006). Вуковић (2012) напомиње да поједини зачини испољавају, у извесној мери, лековита својства делујући као седативи, карминативи, диуретици, стомахици и у одређеним случајевима аналгетици. Многи зачини испољавају антимикуробно дејство помоћу различитих супстанци, већином етарских уља, које се називају заједничким именом фитонциди, и на тај начин доприносе микробиолошкој безбедности хране (Vuković, 2012; Adams и Moss, 2008).

Упркос наведеном својству зачини могу да буду загађени инсектима, микроорганизмима који доводе до појаве квара, као и да постану извор епидемија болести проузрокованих храном (Gieraltowski и сар., 2012; Adams и Moss, 2008; Chi и Wu, 2007). Због тога се зачини могу подвргавати стерилизацији зрачењем, загревањем, дејством високог хидростатског притиска, хемијском стерилизацијом или комбинованим поступцима. Олеорезини и етарска уља су стерилни производи од зачина захваљујући поступцима њиховог добијања (Ockerman и Basu, 2004). Поједини зачини садрже значајну количину мангана чиме повољно утичу на ферментацију, односно, умножавање млечно киселинских бактерија (Vignola, Fontana и Fadda, 2010; Adams и Moss, 2008).

Произвођачи ферментисаних кобасица користе мешавине зачина, најчешће према личном избору (спецификацији) у погледу врста зачина и њиховог међусобног односа, са циљем добијања јединственог укуса датог производа и његове препознатљивости код потрошача (Chi и Wu, 2007). У литератури се наводи условна подела ферментисних кобасица на јужни, медитерански тип, које се одликују зачињенијим мирисом и укусом и северни тип ферментисаних кобасица, које се диме и садрже мање зачина (Hutkins, 2006; Lucke, 2000)

### 2.2.2 Уситњавање и пуњење

Уситњавање и мешање меса и масног ткива са осталим састојцима надева предуслов је правилног и равномерног развоја ферментације (Hammes, Haller и Ganzle, 2008). Поред тога, уситњавање меса, у присуству кухињске соли, доводи до делимичног издвајања (екстракције) беланчевина, њихове даље деполимеризације и преласка у сол стање, чиме оне постају везујући чиниоци у образовању јединствене масе надева (Gillett и сар., 1977). За уситњавање се користи охлађено или полуодмрзнуто месо, односно, месо чија температура је од - 4 до + 2 °C. Масно ткиво се, такође, може користити у охлађеном облику али се препоручује да буде у намрзнутом или потпуно замрзнутом стању, односно, на температури не вишој од - 8 °C (Vuković, 2012, Toldra, 2002; Van 't Nooft, 1999). Основни разлог употребе меса и масног ткива у охлађеном, намрзнутом или замрзнутом стању је спречавање топљења масти током поступка уситњавања и мешања. У уређајима за уситњавање, услед трења изазваног брзим радом ножева, месо и масно ткиво се загревају, при чему, код недовољно ниске температуре, долази до топљења масти са последицима поремећајем у повезивању надева и даљем сушењу производа (Incze, 2007; Ranken, 2000). У циљу спречавања наведене појаве препоручује се да температура надева након уситњавања и мешања буде у границама од - 4 до + 2°C (FSIS, 2014; Lucke, 2014; Hammes, Haller и Ganzle, 2008). Поред тога, према истраживању Bover-Cid и сар. (2006) делимично одмрзавање претходно замрзаног меса значајно успорава или прекида умножавање ентеробактерија и умањује или потпуно онемогућава настанак биогених амина, супстанци које представљају токсичне производе микробиолошке разградње беланчевина. С друге стране, употреба потпуно замрзнутог меса може изазвати оштећење уређаја за уситњавање, као и слабију сједињеност надева услед недовољне екстракције беланчевина (FSIS, 2014; Ranken, 2000; Koberna, 1986).

У савременој индустријској производњи уситњавање се изводи у ротирајућим кутерима или, ређе, употребом уређаја за млевење који дају уситњеном месу зрнастији изглед, што је, по мишљењу појединих аутора, погодније за производњу сувих ферментисаних кобасица, нарочито када су у питању производи традиционалног

обележја (Lucke, 2000; Lucke, 2014). Feiner (2006) истиче, такође, да се употребом уређаја за млевење добија исти промер честица меса и масног ткива, што, према датом аутору, није случај код употребе кутера. С друге стране, основна предност кутера је могућност да се у истом уређају уситни и измеша месо и масно ткиво са осталим састојцима надева. Rovira и Pusczeviczc (2007) сматрају да је погодније користити уређај за млевење када је промер честица надева већи од 3mm, док за производњу финије уситњених кобасица предност дају употреби кутера. Ножеви уређаја за уситњавање треба да буду наоштрени како би се спречило гњечење меса и масног ткива које доводи до топљења масти, са последичним поремећајем у повезивању надева и сушењу производа (Vuković, 2012). Величина честица уситњеног меса је веома различита и може бити промера мањег од 1mm па све до 30 и више милиметара, што зависи од типа ферментисаног производа.

Правило је да се микроорганизми ферментације брже умножавају у финије уситњеном надеву, услед чега и рН вредност таквих производа брже опада (Vuković, 2012). За производњу сувих ферментисаних кобасица надев може да буде крупније или средње уситњен, док се у производњи полусувих ферментисаних кобасица, намењених за нарезивање, употребљава финије уситњени надев зрнасте структуре (Vuković, 2012). Што је месо финије уситњено екстракција беланчевина је обимнија, услед чега се повећава мазивост или могућност за нарезивање, зависно од типа производа (Hammes, Haller и Ganzle, 2008; Vignola, Fontana и Fadda, 2010). Ниво екстракције беланчевина представља важан чинилац у производњи сувих ферментисаних кобасица. Уколико је екстракција беланчевина слабо изражена, што може да настане као последица наглог закишељавања, недовољне количине соли, сувише ниске температуре сировина или непотпуног мешања састојака, надев није довољно сједињен и настају мане у текстури производа. С друге стране, преобимна екстракција беланчевина, настала сувише финим уситњавањем или употребом тупих ножева, који гњече месо, доводи до изостанка зрнасте грађе надева са последично отежаним одавањем влаге током ферментације и сушења (FSIS, 2014; Ranken, 2000).

Након што се месо и масно ткиво уситне и потом измешају са зачинима и осталим састојцима (адитиви и најчешће стартер културе), надев се пуни у омотаче за ферментисане кобасице, који могу бити природни или вештачки. Природни омотачи су обрађена црева од закраних домаћих животиња, док вештачки могу бити од: 1. колагена, 2. целулозе и 3. памука или свиле импрегнисане колагеном (Vuković, 2012). Основне особине омотача за ферментисане кобасице су присуство отвора (пора), који омогућавају одавање влаге и продирање дима, као и способност скупљања, односно, праћења смањивања запремине садржаја кобасице током ферментације и сушења (Toldra, 2002; Lucke, 2000). Последњих година вештачки омотачи се све више употребљавају у индустријској производњи ферментисаних кобасица, упркос чињеници да природна црева повољније утичу на изглед, мирис и укус производа. Недостаци природних црева су већи утрошак рада приликом припреме за употребу, која подразумева одмотавање и одстрањивање вишка соли са којом се пакују, тежња ка добијању закривљених производа и већа осетљивост на пуцање. Предности вештачких омотача су, такође, уједначен квалитет који подразумева исти промер отвора (пора), чиме се омогућава боља контрола одавања влаге током поступка сушења, нижа цена и доступност у свим дијаметрима (Wu и Chi, 2007; Feiner, 2006; Toldra, 2002; Ranken, 2000). У индустријској производњи поступак пуњења надева у омотаче се одвија под вакуумом, у аутоматским пунилицама, ради одстрањивања ваздуха чије присуство доводи до пуцања омотача, као и настанка пукотина и шупљина у надеву. Поред тога, кисеоник из ваздуха успорава или онемогућава настанак микроаерофилних услова што

неповољно утиче на развој боје и укуса крајњег производа (FSIS, 2014; Vuković, 2012; Hutkins, 2006). С тим у вези, познато је да кобасице већег промера имају сразмерно нижу рН вредност што је последица слабијег продора кисеоника, чиме се подстиче умножавање млечнокиселинских бактерија (Barbuti и Parolari, 2002). Опсег промера омотача за производњу ферментисаних кобасица је веома различит, са распоном од 15 до 90 милиметара. У омотаче мањег промера (35-40 mm) најчешће се пуне кобасице за мазање, док се кобасице за нарезивање углавном пуне у омотаче већег калибра (Hutkins, 2006; Vignola, Fontana и Fadda, 2010).

### 2.2.3 Ферментација (зрење)

Након пуњења кобасице се каче у климатизоване просторије да би почео поступак ферментације. Код традиционалног начина производње се одвија у касну јесен и зиму у условима ниске температуре и високе влажности ваздуха (Karan и сар., 2012). У индустријским погонима, температура, влажност и брзина струјања ваздуха се подешавају у климатизованим коморама што производњу чини могућом током читаве године.

Потребно је напоменути да се у мањем броју случајева, првенствено код произвођача са традиционалним обележјем, надев пре пуњења оставља у хладњачи (0 °C до + 5 °C) на предзрење. Поступак предзрења траје један до три дана и има за циљ да се коагулаза негативне коке (у даљем тексту означене као CNC – од енглеског назива Coagulase negative cocci) умноже и остваре редукујуће дејство на нитрате како би се образовала пожељна боја производа, пре убрзаног умножавања млечно киселинских бактерија при температурама ферментације (Vuković, 2012; Radetiћ, 1997).

Свеже надевене производе, чија температура је око 0 °C, треба оцедити, односно, држати на собној температури (16 - 22 °C) при уобичајеној, ниској, влажности ваздуха (60 - 70%), како би се током изједначавања температуре надева и спољашње средине смањило накупљање капљица воде на површини кобасица. Цеђење траје 1-6 часова и спроводи се пре пуног укључивања коморе у рад, што доводи до уштеде у потрошњи електричне енергије (Feiner, 2006). Зависно од капацитета просторије оптимална количина производног материјала мора бити правилно распоређена. У случају препуњености може доћи до недовољног сушења кобасица, чиме се подстиче умножавање плесни и узрочника квара и преживљавање евентуално присутних патогена (Feiner, 2006; Labadie, 2007; Sartz и сар., 2008). С друге стране, уколико је просторија делимично попуњена може доћи до наглог исушивања и појаве прстена у спољашњем слоју, чиме се зауставља даље одавање влаге и настаје, такође, квар производа (Feiner, 2006). Температура (спољашње средине) има пресудан утицај на брзину и обим поступка ферментације који се, уколико је праћен сушењем, назива зрење. Код традиционалног начина производње температура ваздуха се креће од 5 до 15 °C и такав поступак се назива спорим зрењем с обзиром на то да траје и по неколико месеци, при чему не постоји јасна граница између ферментације и сушења (Lucke, 2000). У индустријским условима, ради убрзања производње, поступак се одвија на вишим температурама, при чему се постижу ниже рН вредности а ферментација је одвојена од сушења и може бити умерена и брза. Умерена ферментација се одвија на температурама 18-24 °C, док је брза ферментација при температурама од преко 25 °C. Код умерене и брзе ферментације 2 - 7 дана је потребно за умножавање технолошки пожељних микроорганизама, првенствено млечнокиселинских врста, да би се након достизања њиховог максималног броја, зрење наставило на нижој температури и нижој



влажности ваздуха, односно, у условима израженог сушења (Vuković, 2012; Toldra, 2008; Ranken, 2000). При врло високим температурама инкубације од 37 - 40 °C, које се, углавном, примењују у Северној Америци, ферментација траје врло кратко, 12 - 18 часова (Hutkins, 2006). Релативна влажност ваздуха (РВ) се подешава да буде за 1 - 10% мања од активности воде у надеву кобасица, при чему се горња вредност примењује код грубо уситњених кобасица мањег промера, док је код производње фино уситњених кобасица већег промера обрнут случај. Циљ је да се влага током читавог поступка зрења равномерно одаје, без појаве наглог исушивања. Подешавање струјања ваздуха спречава накупљање капљица воде по површини кобасица, при чему се најјаче струјање примењује на почетку ферментације, са укупним распоном од 0,1-0,8 m/s за време читавог процеса (Feiner, 2006; Demeyer и Toldra, 2004).

Када су у питању унутрашњи чиниоци, за ферментацију је веома важан правилан одабир сировина. Нарочито је важно да мишићно и масно ткиво буду произведени на хигијенски исправан начин тако да ниво контаминације микроорганизмима буде што нижи, док рН вредност свежег меса не сме да буде изнад 5,8 (Demeyer и Toldra, 2004). Поред тога, да би се ферментација правилно одвијала потребно је пажљиво одабрати и уравнотежити и остале састојке, укључујући кухињску со, шећере, зачине и адитиве (Kanninen и Puolanne, 2008).

У току ферментације стварају се услови повољни за развој корисних микроорганизама, ради њиховог преовлађивања у укупној биомаси производа, уз истовремено сузбијање непожељних врста (Vuković, 2012). Укупно посматрано, физичке, биохемијске и микробиолошке промене ферментације обухватају умножавање млечно киселинских бактерија са последичним накупљањем киселих производа, образовање нитрозомиоглобина, растварање и желирање миофибриларних и саркоплазмних беланчевина, ензимску и микробиолошку разградњу масти и беланчевина и последично сушење, уколико се ради о полусувим или сувим производима (Hammes, Haller и Ganzle, 2008).

У надеву се налазе различите врсте бактерија, квасаца и плесни, од којих су за ферментацију најважније млечно киселинске бактерије (у даљем тексту означене као LAB – од енглеског назива Lactic acid bacteria) и CNC (Talon и Leroy, 2011). Услови током ферментације највише погодују развоју млечно киселинских бактерија из родова: *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconococ*, *Weissella* и *Enterococcus*. Међу њима, најзаступљеније врсте су: *Lactobacillus sakei*, *L. curvatus* и *L. plantarum* (Albano и сар., 2009; Аммог и Мауо, 2007; Воното и сар., 2008). У свежем месу број млечно киселинских бактерија се креће од 3-5 log јединица по граму, при чему већ за неколико дана од почетка ферментације постају најбројнија група микробиота, са распоном од 8 до 9 log јединица, по граму садржаја надева (Talon и Leroy, 2011). Захваљујући изузетној прилагођености на услове средине сматрају се кључном групом микробиота у производњи ферментисаних кобасица (Capita и сар., 2006; Hugas и Monfort, 1997). Анаеробном разградњом шећера, као и других хранљивих материја, доводе до накупљања млечне киселине са последичним закишељавањем садржаја.

Вишеструка улога снижавања рН вредности у току ферментације кобасица огледа се у следећем:

1. приближавањем изоелектричној тачки (5,2-5,3), беланчевине растворене у присуству соли коагулишу образујући чврсту и јединствену масу надева погодну за нарезивање. Такође, смањена способност везивања воде беланчевина олакшава и даљи поступак сушења (Hugas и Monfort, 1997; Ordonez и сар., 1999);

2. појачаним редуковањем нитрита у азот-моноксид помаже се развој пожељне боје ферментисаних производа (Hugas и Monfort, 1997);
3. појачава се дејство катепсина Д и њему сличних ендогених ензима у разградњи беланчевина (Toldra, 2002; Molly и сар., 1997);
4. накупљена млечна киселина даје производу пожељан киселкаст укус, међутим, обарање рН вредности испод 4,9 одликује се прекиселошћу и изазива супротан учинак, односно, често одбојност код потрошача (Hutkins, 2006);
5. рН вредност испод 5,3 може да делује инхибиторно на патогене врсте и узрочнике квара, односно, утиче на одрживост и микробиолошку безбедност производа (Feiner, 2006).

Упркос слабој протеолитичкој активности, млечно киселинске бактерије имају важну улогу у развоју богатог мириса и укуса производа (Palamanolі и сар., 2003). Ендогени протеолитички и нуклеолитички ензими мишића ослобађају пептиде, аминокиселине и нуклеозиде које, затим, LAB разграђују до различитих испарљивих супстанци а чије присуство значајно утиче на квалитет крајњег производа (Chen и сар., 2015). LAB истовремено спадају и у најчешће узрочнике квара ферментисаних производа (Lücke, 2000). Прекомерна употреба лако ферментујућих шећера, заједно са недовољним сушењем или високом температуром сушења и складиштења, доводи до стварања велике количине млечне и сирћетне киселине, понекад и до појаве рупичавости или бубрења омотача услед накупљања гаса (CO<sub>2</sub>). Поред тога, лактобацили су способни да стварају водоник пероксид, који се сматра узрочником сивог или зеленкастог пребојавања производа али јасна повезаност дате појаве са наведеном групом микробиота још увек није доказана (Palamanolі и сар., 2003). Антагонистичко дејство МКБ, осим млечне киселине, остварује се и путем других антимикуробних супстанци. Хетероферментативне и у мањој мери хомоферментативне врсте (зависно од супстрата), поред млечне киселине стварају и остале метаболичке производе, као што су сирћетна киселина, мравља киселина, етанол, водоник пероксид, угљен-диоксид, ацеталдехид и друге који, такође, делују инхибиторно на различите микроорганизме (De Vuyst и Vandamme, 1994). Многи сојеви LAB стварају и посебне, већином, нискомолекуларне антимикуробне супстанце усмерене према сродним врстама или према гљивицама, од којих су за производњу ферментисаних кобасица најзначајнији бактериоцини (De Vuyst и Leroy, 2007).

Коагулаза негативне коке, после млечно киселинских бактерија, технолошки су најзначајнија група микробиота у кобасицама произведеним на традиционалан начин и њихов број се у готовим производима креће од 5 - 7 log јединица по граму надева (Talou и Leroy, 2011). У ферментацији меса имају вишеструку улогу коју остварују путем: 1. превођења нитрата у нитрите, 2. разградње пероксидних супстанци, чиме се успорава ужеглост и учвршћује пожељна боја производа и 3. учествовања у разградњи масти и беланчевина, са стварањем нижих једињења која дају препознатљив и богат укус крајњег производа (Metaxopoulos и сар., 2001; Mauriello и сар., 2004). Осетљиве су на пад рН испод 5,3 због чега немају значај у производњи кобасица са израженом киселошћу (Lücke, 2000).

Приликом клања животиња, обраде трупова, хлађења и производње надева микроорганизми из различитих извора доспевају на месо и масно ткиво, при чему се уситњавањем вишеструко повећава доступност површина погодних за њихово насељавање. Осим повећања површине, уситњавањем се ослобађа и месни сок који микроорганизмима представља богат извор лако доступних хранљивих материја, што

додатно олакшава контаминацију меса (Bohnsack и Норе, 1990). У свежег надеву присутне су различите врсте микробиота које потичу из средине кланице, са руку радника, закраних животиња, као и преосталих сировина које улазе у састав производа (Јанковић и сар., 2013; Nychas и сар., 2008; Talon, Leroy и Lebert, 2007). Аеробне грам негативне, психротрофне протеолитичке бактерије чине најбројнију групу микробиота свежег надева. Међу њима најзаступљеније су врсте рода *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Psychrobacter* и *Moraxella*, које представљају главне узрочнике квара свежег охлађеног меса (Vuković, 2012; Adams и Moss, 2008). Ентеробактерије спадају, такође, у групу непожељних микробиота, с обзиром на то да су многе врсте узрочници квара, док поједине изазивају болести проузроковане храном. Њихово значајније присуство не мора да буде штетно по здравље потрошача али указује на недостатак хигијене у производњи или на грешке у параметрима вођења ферментације и сушења (Labadie, 2008; Tortorello, 2003).

Начин припреме надева и подешавање спољашњих чинилаца ферментације ствара еколошке услове у садржају кобасице који неповољно утичу на непожељне групе микробиота. Присуство соли снижава  $a_w$  свежег меса до 0,95 - 0,96, док се поступком пуњења истискује већи део ваздуха из надева што успорава и спречава значајније умножавање аеробних врста, као и врста које су осетљиве на виши садржај соли (Lucke, 2000). Поред израженог антиботулинусног дејства, нитрити утичу инхибиторно и на *Enterobacteriaceae*, као и на *Pseudomonas* врсте, док су LAB и CNC релативно отпорне (Hospital, Hierо и Fernandez, 2014). Према Demeyeru и Toldri (2004) уколико је присутна и аскорбинска киселина, анаеробна средина постаје још израженија чиме се, у извесној мери, додатно појачава антимикуробно дејство нитрита. Додавање шећера и стартер култура или ацидуланата изазива значајан и брз пад рН који неповољно утиче на ентеробактерије и доводи до опадања њиховог броја већ у првим данима ферментације. Осим тога, снижавање рН испод 5,3, у анаеробним условима, нарочито у присуству стартер култура, спречава потпуно или највећим делом производњу токсина и умножавање *Staphylococcus aureus* (Petaja-Kaninen и Puolane, 2007; Lucke, 2000).

#### 2.2.4 Сушење

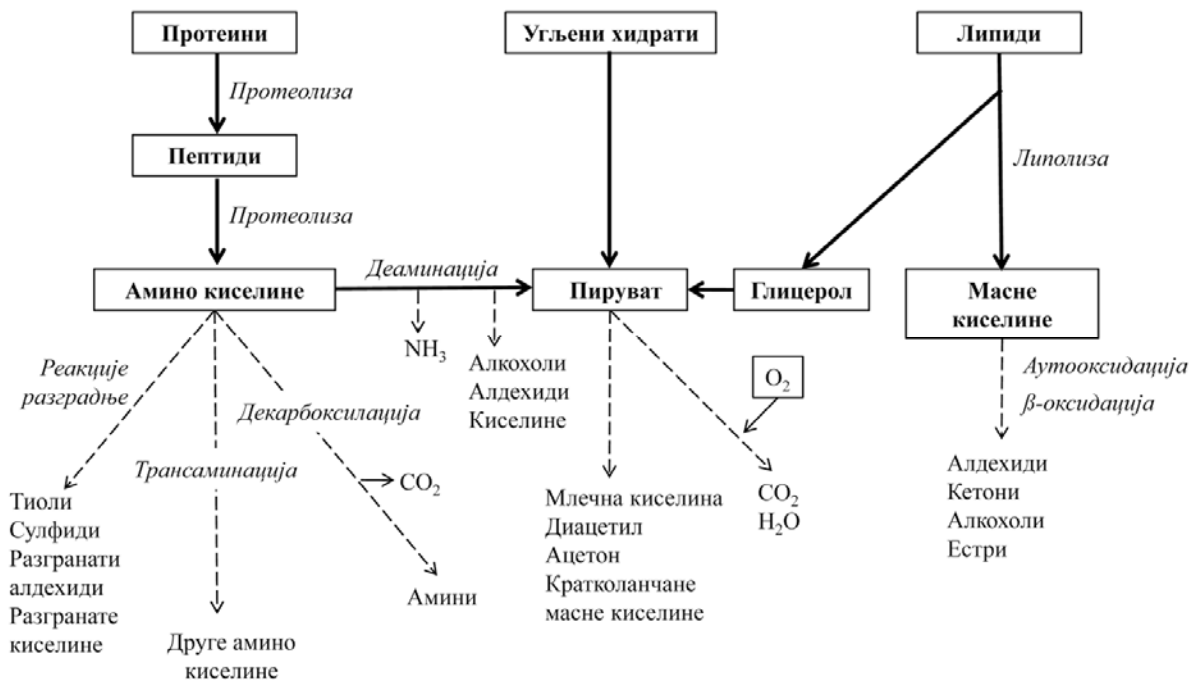
Након достизања максималног броја LAB, ферментација се успорава снижавањем температуре и релативне влажности ваздуха и поступак зрења прелази у фазу сушења. Код ферментисаних кобасица за мазање поступак производње се, након ферментације, завршава или подразумева још и топлотну обраду или димљење. Сушење се може спровести у просторији за ферментацију или у другом за ту сврху опремљеном простору, што је чешћи случај (Feiner, 2006).

Услови сушења су слични за све кобасице и подразумевају релативну влажност ваздуха од око 75% и температуру између 10 - 15°C али се разликују по дужини трајања, зависно од жељене  $a_w$  вредности, односно, категорије производа (полусуве, суве кобасице). Током ферментације и сушења гљивице често прерастају површину кобасице, при чему квасци преовладавају током прве две недеље, у односу на плесни, док су у даљем току обе групе заступљене у приближно истом броју, у распону од  $10^5$  до  $10^7$  CFU/cm<sup>2</sup>, да би пред крај сушења, почевши од 4. недеље, квасаца било за око log јединицу мање у односу на плесни (Spotti и Berni, 2007; Samelis и Sofos, 2003; Toldra, 2002). Међу квасцима далеко најбројнија врста је *Debaryomyces hansenii* али се могу изоловати и друге врсте рода *Candida*, као и представници родова *Pichia*, *Cyteromyces*,

*Kluyveromyces* и други. Од плесни су најзаступљенији родови *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor* и *Rhizopus*, међу којима су најбројније врсте *P. nalgiovense*, *P. chrysogenum* и *P. commune* (Centeno и Carballo, 2014). У пределу Медитерана, присуство плесни се сматра, углавном, пожељном особином, с обзиром на то да спречава јако исушивање, успорава оксидацију и доприноси ароми производа (Spotti и Berni, 2007). Супротно томе, у осталим земљама кобасице се, најчешће диме у циљу површинског антимикубног и антиоксидативног дејства, као и ради добијања препознатљиве боје, мириса и укуса производа (Vignolo, Fontana и Fadda, 2007).

У општем смислу, мирис и укус сувих ферментисаних кобасица настаје као последица односа између испарљивих (аклохоли, кетони, алдехиди и фурани) и неиспарљивих састојака (амино киселине, пептиди, шећери и нуклеотиди) који потичу из сировина или настају биохемијским реакцијама током ферментације и, нарочито, сушења (Fadda, Lopez и Vignolo, 2010). У односу на микроорганизме ендогени ензими меса имају већи значај у почетној разградњи беланчевина и масти што омогућава даљи ток зрења (слика 2.2) (Demeyer и Toldra, 2004).

Новонастале неиспарљиве производе (пептиде, аминокиселине, глицерол и масне киселине, нуклеотиде) CNC, као и LAB, даље разграђују и стварају испарљиве супстанце које имају одлучујућу улогу у образовању препознатљивог сензорног својства производа. Треба напоменути да у образовању боје, мириса и укуса површинског слоја кобасице важну улогу имају и састојци дима, нарочито карбонилна једињења и деривати фенола (Sikorski и Kolakowski, 2010).



Слика 2.2. Приказ основних биохемијских процеса током ферментације кобасица (тамније стрелице означавају доминантне ензимске реакције мишићног и масног ткива; Demeyer и Toldra, 2004).

### 2.2.5 Нарезивање и паковање

Након ферментације и сушења, полусуве и суве ферментисане кобасице, већег промера, могу да се наредују у комаде и пакују у пластичне омотаче, што представља додатне кораке у производњи, са могућим неповољним утицајем на микробиолошку одрживост и безбедност производа (Skandamis и Nychas, 2007; Feiner, 2006).

С тим у вези, у просторијама где се одвијају наведени поступци релативна влажност ваздуха треба да је нижа од 60%, како би се спречила кондензација водене паре и последично умножавање микроорганизама на површини уређаја и самих кобасица. Редовно одржавање, чишћење и дезинфекција уређаја за нарезивање су од суштинске важности за спречавање могућег постпроцесног загађења производа (FSIS, 1999). Температура ваздуха зависи од типа ферментисаних производа (суве, полусуве, за мазање) као и дужине трајања њиховог боравка у наведеним просторијама (Lücke, 2007). Упркос превентивним мерама, често долази до накупљања воде услед нарезивања, због чега се обрађени производи складиште и продају, углавном, при температурама хлађења ( $\leq 4$  °C). Ради успоравања оксидације масти, осветљење не би требало да буде јаче од 600 lux (Lücke, 2007; Feiner, 2006).

Ферментисане кобасице се могу паковати у мрежице, рупичасте фолије или у материјале слабо пропусне за кисеоник и влагу, што је случај код пуњења под вакумом, као и паковања под измењеном атмосфером (70-80% N<sub>2</sub> и 20-30% CO<sub>2</sub>). Вакумско паковање успорава развој плесни, док у случају измењене атмосфере постоји и додатно антимикуробно дејство пореклом од угљене киселине (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) настале растварањем угљен-диоксида у води, што је праћено блажим закишељавањем производа (Lücke, 2007; Feiner, 2006).

### 2.2.6 Стартер културе

У индустријској производњи ферментисаних кобасица примена стартер култура има све већи значај. Основни разлози употребе су краће време производње, повећана безбедност и већа уравнотеженост квалитета производа (Lücke, 1994). С друге стране, примена индустријских стартер култура често је повезана са недовољно израженом аромом, у односу на традиционалне производе. Због тога су протекле деценије извршена бројна истраживања ради утврђивања које су врсте и сојеви најзначајнији за одређено подручје, како би се очувала препознатљивост и разноврсност чулних својстава у условима индустријске производње ферментисаних кобасица (Cocolin и сар., 2009; Rantsiou и Cocolin, 2006; Samelis и сар., 1998).

Према Hamm-у (1995), стартер културе меса су препарати који садрже активне или успаване микробне ћелије чијим додавањем се развијају пожељни метаболички процеси у месу. У савременој производњи ферментисаних сувих кобасица најчешће се користи мешавина млечнокиселинских бактерија и коагулаза негативних кока, како би се осигурао пад рН вредности и одговарајућа арома производа (Cocconcelli и Fontana, 2008; Demeyer и Toldra, 2004). Од млечнокиселинских бактерија у Европи се за стартер културе, најчешће, користе *Lactobacillus sakei*, *L. curvatus*, *L. plantarum* и *L. pentosus*, док се у САД, због више температуре ферментације, чешће употребљавају *L. plantarum*, *Pediococcus acidilactici* и *P. pentosaceus* сојеви. Из групе коагулаза негативних кока комерцијално се користе *Staphylococcus xylosum*, *Staphylococcus carnosus* и *Kocuria varians* (Ammor и Mayo, 2007). Стартер културе се додају на нивоу од 6 до 7 log

јединица по граму садржаја надева, како би представљале најзаступљенију групу микробиота на почетку ферментације (Incze, 2004; Tuorponen, Petaја и Sandholm, 2003; Huerta и сар., 2004). Вишедеценијска примена у индустријској производњи ферментисаних кобасица довела је до развоја три генерације стартер култура. Прву представљају микроорганизми пореклом из ферментисане хране биљног порекла (*L. plantarum* и *P. pentosaceus*) који се одликују брзим закишељавањем садржаја али без посебне прилагођености на екосистем меса, што омогућава умножавање и уобичајено присутних хетероферментативних LAB са, могућим, непожељним последицама по квалитет производа. Друга генерација стартера су врсте изоловане из меса (најчешће *L. sakei* и *L. curvatus*) које захваљујући веома доброј прилагођености на услове средине преовладавају током читавог поступка зрења, због чега су у савременој индустријској производњи, већином, замениле прву генерацију стартер култура. Развој треће генерације је у току и има за циљ да се комерцијализује примена сојева особених за одређени тип производа, при чему се, додатно, тежи ка изолатима са израженим бактериоциногеним, сензорним, технолошким, нутритивним или пробиотичким својствима. Микроорганизми треће генерације се називају још и функционалне стартер културе (Hugas и Monfort, 1997; Vignolo и Fadda, 2007; Cocconcelli и Fontana, 2008). Готови препарати стартер култура се у промету налазе у замрзнутом или лиофилизованом облику и додају се на почетку уситњавања како би се ћелије што равномерније распоредиле по садржају надева (Hutkins, 2006; Feiner, 2006).

Основни безбедносни услови при одабиру бактерија за стартер културе су одсуство патогеног, токсигеног и алергеног својства, као и одсуство стварања биогених амина. Велики значај се придаје и генетској стабилности, односно, сојеви не смеју да буду отпорни на антибиотике, нити да дату особину преузимају или преносе на друге микроорганизме, као ни да буду предмет генетске модификације. Основни технолошки захтеви су отпорност на фагне инфекције и одсуство метаболичких производа који неповољно утичу на сензорна и нутритивна својства кобасица (Warriss, 2006; Toldra, 2002; Lucke, 2000). Поред тога, стартер културе морају добро да подносе концентрацију до 6% кухињске соли и до 100 mg NaNO<sub>2</sub> по килограму надева. Пожељне особине су да производе ензим каталазу, редукују нитрате, унапређују мирис и укус производа, не производе слуз, делују антагонистички на патогене и непожељне микроорганизме, делују синергистички на корисне микроорганизме, као и да производе моноамино оксидаза и диамино оксидаза ензиме (Warriss, 2006).

Употреба плесни као стартер култура, са спољашње стране омотача, подразумева одабир сојева који не стварају токсине и антибиотике а успешно се умножавају у присуству нитратних и нитритних соли, већег садржаја млечне киселине, као и при нижим температурама зрења. Поред тога, морају да се добро причвршћују за омотач, да стварају колоније беле или светложуте боје током фазе сушења и да значајно доприносе образовању одговарајућег мириса и укуса производа. Сојеви који испуњавају неведене услове припадају врстама *P. nalgiovense* и *P. chrysogenum* али се сматрају пожељним и поједини сојеви од *P. gladiole* па чак и *P. camemberti*, који се превасходно употребљава у производњи сира (Bruna. и сар, 2003; Lucke, 2000; Grazia и сар., 1986). Од квасаца се у комерцијалним стартер културама употребљавају сојеви *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), самостално или заједно са плеснима и бактеријама, при чему су услови одабира слични као код плесни (Dolores-Selgas и Luisa-Garcia, 2007). Стартер културе плесни и квасаца се наносе на омотач прскањем или потапањем кобасица али се наводе и примери додавања култура квасаца у садржај надева (Feiner, 2006, Lucke, 2000).

## 2.3 БИОЛОШКЕ ОПАСНОСТИ ФЕРМЕНТИСАНИХ СУВИХ КОБАСИЦА И БОЛЕСТИ ПРОУЗРОКОВАНЕ ХРАНОМ

Појам опасности у производњи хране подразумева сваког чиниоца или стање које може да буде штетно по здравље човека (ЕС, 2002). Према природи особина опасности могу бити биолошког, хемијског или физичког порекла. Када су у питању ферментисане кобасице, од значаја су следеће опасности (Lucke, 2014; Toldra и Reig, 2007; Pierre, 2007; Fraqueza, Barreto и Ribeiro, 2007; Bunčić, 2006; EFSA, 2004):

### 1. Биолошке опасности

- микробиолошке опасности (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus*) и
- паразитолошке опасности (*Trichinella*, *Cysticercus* и *Toxoplasma gondii*);

2. Хемијске опасности (афлатоксини, биогени амини, нитрозамини, нитрити, пероксиди из масног и мишићног ткива, полициклични ароматични угљоводоници из дима и резидуе ветеринарских лекова);

3. Физичке опасности (страна тела као што су опилци од костију, пластике и метала, честице од дрвета и песак).

У даљем тексту ће бити описане само опасности које су обухваћене темом истраживања предложене докторске дисертације.

### 2.3.1 *Salmonella enterica* subspecies *enterica*

Салмонелоза спада у најчешће болести проузроковане храном и препозната је као значајнија зооноза у погледу економских губитака у сточарству. Широко је распорострањена међу домаћим животињама, које могу бити асимптоматски носиоци, због чега се најуспешније сузбија мерама на нивоу примарне производње и побољшањем хигијене у оквиру кланица (WHO, 2013; Norrung и Buncic, 2008; Skandamis и Nychas, 2007).

Род *Salmonella* обухвата две врсте, *S. enterica* и *S. bongori* од којих је друга присутна, углавном, у хладнокрвним животињама, првенствено гмизавцима, иако, ретко, може да изазове болест и код људи (Fookes и сар., 2011). У оквиру врсте *S. enterica* разликују се подврсте *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* и *indica*, при чему >99% случајева инфекције људи узрокује прва подврста. Салмонеле настањују дигестивни тракт различитих врста животиња, при чему свиње и живина представљају нарочито важан резервоар за људе, док су као вектори значајни инсекти, дивљи глодари и птице (Scannell, 2012; Adams и Moss, 2008).

Узрочници салмонелозе су Грам негативни аспорогени штапићи, дужине 2 до 3  $\mu\text{m}$  и ширине 0,7 - 1,5  $\mu\text{m}$ , који не образују карактеристичан распоред. Углавном су покретни захваљујући перитрихно обраслим флагелама, осим биотипова *S. Gallinarum* и *S. Pullorum*, који не поседују флагеле. Факултативни су анаероби, припадају породици *Enterobacteriaceae* и поседују ензим каталазу али не поседују цитохром С ензим, односно, дају негативан резултат на оксидаза тесту (WHO - GSS, 2003; Kwon и сар., 2000). Основни услови потребни за размножавање салмонела су приказани у табели 2.5. Међу сојевима постоје значајне разлике у погледу топлотне отпорности, при чему су *S.*

Senftenberg и *S. Irumi* најотпорније на високе температуре, док су *S. Heidelberg* и *S. Typhimurium* најбоље прилагођене на ниске температуре (Food Safety Authority of Ireland, 2011; Jay, 2000).

**Табела 2.5.** Чиниоци који утичу на умножавање салмонела (Food Safety Authority of Ireland, 2011)

Услови	Минимум	Оптимум	Максимум
температура (°C)	5,2*	35 - 43	46,2
pH	3,8	7 - 7,5	9,5
a <sub>w</sub>	0,94	0,99	> 0,99

\*-већина серотипова не расте при температури нижој од 7 °C

Најнижа a<sub>w</sub> вредност неопходна за умножавање салмонела је 0,93 - 0,94, с друге стране доста успешно преживљавају у сувој храни, односно, у храни чија активност воде је знатно нижа од наведене вредности. Осетљиве су на повишену температуру и бивају уништене при уобичајеним поступцима топлотне обраде. С тим у вези, загревање меса са развојем температуре од 70 °C у средишњем делу масе уништава све сојевае за око два минута, док је при температури од 56 °C потребно око 30 минута (Food Safety Authority of Ireland, 2011; Berger-Jekić и сар., 1997). Салмонеле добро подносе ниске температуре и пропадају постепено, тако да могу да опстану дуже од годину дана у меду замрзнутом на - 15°C (Escartin, Losano и Garcia, 2000). Осетљиве су према нормативно дозвољеним количинама нитрита у меду (до 150 mg/kg), док их раствор кухињске соли уништава при концентрацији од 9 % (Hospital, Hierro и Fernandez, 2014; Jay, 2000). Осим у аеробној и анаеробној средини, салмонеле могу да се умножавају и у модификованој атмосфери са 20 % CO<sub>2</sub> (ICMSF, 1996). Заједничка биохемијска особина већине сојева је IMViC формула: - + - +, одсуство ензима уреазе, као и одсуство производње киселине од лактозе. Салмонеле су отпорне на различите антимицробне супстанце, као што су тетратионат, селенит, брилијант зелено и натријум-лаурил-сулфат, што се користи у поступцима изолације из хране и воде. Као и остале ентеробактерије, осетљиве су на хлор и хлорне препарате (Fung, 2010; Berger-Jekić и сар., 1997). У спољашњој средини су постојане и могу да преживе у сувој земљи 16, у влажној 12, у балеги 11 месеци, док у води преживљавају до 3 недеље (Lolin, 1991).

Салмонеле одликује велика серолошка разноврсност и до сада је препознато више од 2600 серотипова који могу да изазову инфекцију људи, од којих су *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium* најчешћи узрочници на подручју Европе. У погледу епидемиологије најкориснија је подела сојева према Kaufmann-White шеми. Наведеним начином се не може описати целокупна антигена грађа сваког изолата али је омогућено њихово ближе одређивање у дијагностичке сврхе. Према наведеној шеми сви изолати се прво разврставају према О (соматским) антигенима, који представљају полисахаридне ланце из спољашње мембране а затим се одређује тип изолата на основу својстава антигена смештених у оквиру флагела (H антиген). За разлику од других ентеробактерија, салмонеле могу да испољавају антигенску грађу флагела у два облика (фазе), захваљујући инверзији дела нуклеинског ланца. С тим у вези, поједини серотипови једне или различитих група могу да имају истоветни H антиген једне фазе, али да се разликују по H антигену друге фазе, услед чега је у циљу утврђивања серотипа неопходно одредити антигене обе фазе (Roumagnac и сар, 2007; Adams и Moss, 2008; Berger-Jekić и сар., 1997). *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* и *S. Dublin* поседују капсулу, односно,



Vi антиген који прекрива соматски O антиген, због чега дати облици не могу да се серолошки групишу, нарочито када су у питању свежи изолати (O инаглутинабилност). Даљим култивисањем, међутим, смањује се количина Vi антигена (Berger-Jekić и сар., 1997).

Заражавање људи настаје, углавном, фекално загађеном храном и водом али је могуће и непосредним додиром животиње или са особе на особу (Food Safety Authority of Ireland, 2011; Giannella, 1996). Раширеност салмонеле међу животињама, као и у спољашњој средини, омогућава њено присуство у различитим типовима намирница па су јаја, живинско, свињско и говеђе месо и млеко најзначајнији извори инфекције. Случајеви изазвани *S. Enteritidis* углавном су проузроковани зараженим јајима и пилећим месом, док су код *S. Typhimurium* свињско, говеђе и пилеће месо најважнији извор инфекције (EFSA, 2013). Недовољна топлотна обрада и унакрсно загађење чине главне грешке у производњи, преради и припреми хране које омогућавају да епидемије салмонелозе буду проузроковане крајње различитим производима, као, на пример, шунком, сендвичима од туњевине и од меса пастрмке, пилећим батацима, куваним јајима, пастеризованим млеком, чедар сиром, дезертом од јабука, салатом од клица, салатом од купуса, чоколадом или дињама. С тим у вези, 1994. године епидемија салмонелозе са проценом од 224 000 заражених била је проузрокована сладоледом смештеним у контејнерима у којима су претходно превожена сирова јаја, без љуске (Adams и Moss, 2008; Hennessy и сар., 1996).

У циљу успешније дијагностике и епидемиологије, идентификација најчешћих серотипова се, осим културално и серолошки, употпуњује и другим методама, као што су фаготипизација, биотипизација, антибиограм, профилисање на основу плаزمида, као и на основу пулсирајуће гел електрофорезе (Adams и Moss, 2008). Већина салмонела у оквиру подврсте *enterica* способна је да изазове инфекцију код различитих врста животиња али постоје и облици који су прилагођени на само једног или свега неколико врста домаћина, као што су, на пример, *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* и *S. Paratyphi C* код људи, *S. Dublin* код говеда, *S. Choleraesuis* код свиња и *S. Abortusovis* код оваца. У том случају чешће се јавља тежи облик инфекције, односно, системско обољење и побачај, као и случајеви асимптоматског клицоноштва. Потребно је напоменути да и серотипови без посебне прилагођености ка одређеном домаћину могу да изазову тежи клинички облик али, углавном, изазивају лакши, локализовани, цревни, облик инфекције (Adams и Moss, 2008; Uzzau и сар., 2000).

Код човека зараженог салмонелом могу да се испоље општа циклична обољења, гастроентеритиси, септикемија, фокалне инфекције различитих органа и ткива и асимптоматско клицоноштво (Berger-Jekić и сар., 1997; Giannella, 1996). Инфективна доза је веома различита и креће се од свега неколико до око  $10^6$  CFU, што указује да претходно умножавање узрочника у храни није неопходно за настанак болести (Adams и Moss, 2008; Food Safety Authority of Ireland, 2011).

Тифусна и паратифусна грозница су општа циклична обољења људи чији узрочници могу бити *S. Typhi* и *S. Paratyphi A*, B и C, при чему први узрочник, углавном, изазива најтежи клинички облик. Болест се преноси фекално-оралним путем (вода, храна) или, ређе, непосредним додиром тако да животиње немају значајнију улогу у непосредном ширењу инфекције. Претпоставља се да је општи облик болести последица веће отпорности узрочника на дејство фагоцита у оквиру одбрамбеног одговора организма. Инкубација тифусне грознице траје од 3 до 56, просечно 10-20 дана, након чега долази до постепеног повишења температуре (током прва три дана клиничке слике), губитка апетита, главобоље, болова у мишићима, неуропсихијатријских поремећаја и затвора. Претходно се може јавити гастроентеритис

који се повлачи пре настанка системског облика болести. Салмонеле продиру у епител црева и доспевају лимфотоком до мезентеријалних лимфних чворова, где се умножавају у макрофагима. Из макрофага доспевају у крвоток и разносе се по целом телу, што је праћено појавом црвених пега по кожи груди и трбуха, које се на притисак повлаче. У другој фази болести салмонеле се насељавају и умножавају у жучној кеси, одакле насељавају танка црева узрокујући запаљење и стварање гризлица које, у тешким случајевима, могу да пукну са последичним запаљењем трбушне марамице. Грозница је присутна и у другој фази болести, уз додатну појаву пролива, који се због жуто-зелене боје назива „супа од грашка“. Правовремена употреба антибиотика је пресудна при чему опоравак траје 4-5 недеља, са могућим клицоноштвом у трајању од неколико месеци до неколико година, нарочито код жена. Деца оболевају у блажем облику и ретко постају клицоноше (Adams и Moss, 2008; Public Health Agency of Canada, 2010)

Остали серотипови, који нису специфични за домаћина, доводе до гастроентеритиса, односно, локализованог облика болести (Giannella, 1996). Салмонелоза у наведеној форми је раширена појава и после кампилобактериозе најчешћа је пријављена болест проузрокована храном у Европи (EFSA, 2013). Клиничка слика почиње изненадном мучнином, повраћањем и грчевима у трбуху, након чега се јављају пролив и грозница. Разлог настанка пролива није потпуно протумачен али се сматра да је последица дејства више чинилаца. Салмонеле које преживе дејство желудачне киселине причвршћују се фимбријама за епителне ћелије црева, нарочито илеума, у које продиру помоћу трећег типа секреторионе система и умножавају се да би, потом, биле истиснуте у слој испод епитела. Као одговор настаје запаљење ткива и ослобађа се простагландин, који у ентероцитима подстиче аденилат циклазу, што спречава уношења електролита ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Na}^+$ ), уз истовремено испумпавање истих у шупљину црева. За електролитима из ентероцита одлазе и молекули воде чиме се ремети равнотежни однос између апсорпције и ресорпције и долази до појаве пролива. Поједини сојеви салмонела, такође, производе топлотно осетљиви ентеротоксин, као и цитотоксин, од којих први непосредно а други посредно утиче на појачан рад аденилат циклазе (Adams и Moss, 2008). Клиничка слика може да буде блага до озбиљна са трајањем болести од 5 до 7 дана. Спроводи се, углавном, супституциона терапија надокнаде течности и електролита, без употребе антибиотика (Public Health Agency of Canada, 2010). Салмонелозни гастроентеритис представља озбиљан здравствени проблем у земљама у развоју, где смртност може бити и до 24% (Chimalizeni, Kawaza и Moluneux, 2010). Код деце, старијих и имунокомпромитованих особа може доћи до продора неспецифичних узрочника у крвоток са настанком животно-угроженог стања (септикемије) и могућег, последичног развоја локализованих жаришта у различитим деловима тела (Public Health Agency of Canada, 2010).

Када су у питању ферментисане кобасице, један од првих званичних података о епидемији салмонелозом је навод Taplin-а из 1982. године у Аустралији. Након тога, у Турској, Европи и Северној Америци забележен је већи број масовних случајева обољевања везан за дату категорију производа, нарочито током последњих десетак година (табела 2.6).

**Табела 2.6.** Епидемије салмонелозе проузроковане ферментисаним кобасицама (Lucke, 2014)

Држава	Узрочник	Оболели/ умрли	Производ	Разлог	Референца
1	2	3	4	5	6
Италија	<i>Salmonella</i> Typhimurium	2/1	Салама произведена у домаћинству	Рецептура без стартер култу-ре и нитрита	Bonilauri i sar., 2013
Италија	<i>Salmonella</i> Goldcoast	37/2	Италијански тип саламе	Непознат	Scavia i sar., 2013
САД	<i>Salmonella</i> Montevideo	272/-	Италијански тип саламе	Постпроцесно загађење црним и белим бибе- ром, присутим по готовим производима	Gieraltowski i sar., 2012
Данска	<i>Salmonella</i> Typhimurium DT 193	20/-	Увозна салама /	Није наведено	Kuhn i sar., 2011
Француска	<i>Salmonella</i> Enterica serotype 4, 12:i:-	32/-	Француски тип суве свињске фер. кобасице	Непознат	Bone i sar., 2010
Немачка (једна област)	<i>Salmonella</i> Panama		Ферментисана кобасица	Неодговарајуће чишћење омотача	Савезни институт за оцену ризи- ка, 2009
Немачка (цела)	<i>Salmonella</i> Panama		Мини салама штапићи, недимљени	Непознат	Роберт Кох институт, 2008
Италија	<i>Salmonella</i> Typhimurium DT 104А	63/-	Италијански тип саламе	претпоставка да је скраћено време сушења	Luzzi i sar., 2007
Норвешка	<i>Salmonella</i> Kedougou	54/1	Дански тип саламе /	претпоставка да су зачини	Emberland i sar., 2006
Канада	<i>Salmonella</i> Typhimurium PT U302	45/-	Салама	Није наведено	Navarro i sar., 2006
Немачка	<i>Salmonella</i> Goldcoast	25/-	Полусува ферментисана кобасица	Претпоставка да је скраћен поступак фер- ментације	Bremer i sar., 2001
Турска	<i>Salmonella</i> Typhimurium	42/?	Суџук	Није наведено	Ulutani i sar., 1998
Италија	<i>Salmonella</i> Typhimurium PT 193	83/-	Италијански тип саламе	Ферментација при 23°C, без стартера, скраћено вре- ме сушења	Pontello i sar., 1998.

наставак табеле 2.6.

1	2	3	4	5	6
САД	<i>Salmonella</i> Typhimurium	26/-	Болоња кобасица типа либан	Није наведено	Sauer i sar., 1997
Велика Британија	<i>Salmonella</i> Typhimurium DT 124	101/-	Минисалама штапићи	Загађене сировине	Cowden i sar., 1989
Холандија		17/-	Болоња кобасица	Није наведено	Van Netten i sar., 1986
Australija	<i>Salmonella</i> Newport	279/?	Салама	Није наведено	Taplin J., 1982

### 2.3.2 *Escherichia coli* O157:H7

Посебну пажњу научне јавности, од раних 80-тих година, заузима серотип *E. coli* O157:H7, као један од најзначајнијих патогена за јавно здравље и то не због учестаности обољевања, већ због тежине симптома и ниске инфективне дозе (Dykes, 2004).

*E. coli* серотипа O157:H7 најпознатији је представник цревног ентерохеморагичног патотипа (EHEC), с обзиром на то да чини и до 75% инфекција изазваних датим обликом (Bad Bug Book, 2012). На основу фактора вируленције и механизма настанка болести, разликује се још пет диарогених облика. То су ентеротоксигени, ентеропатогени, ентероинвазивни, ентероагрегативни и дифузноадхерентни патотипови ове врсте (EFSA, 2013). Захваљујући перитрихно обраслим флагелама *E. coli* O157:H7 је покретна, као и већина осталих изолата ове врсте.

*E. coli* O157:H7 је грам негативан, аспороген, каталаза +, оксидаза -, факултативно анаеробан штапић, величине 2 - 6 x 1 - 1,5 µm. Може да се умножава у температурном распону од 7 до 50 °C (Dykes, 2004), при чему је брзина умножавања знатно спорија од других сојева или, чак престаје, када је температура виша од 44 °C (Dykes, 2004; Beneduce, Spano и Massa, 2003; Jay, 2000).

У спољашњој средини је постојана, односно, може да преживи у земљишту и говеђем измету 4 и више месеци (Lau и Ingham, 2001; Ogden и сар., 2001). Наводи се и могућност њеног умножавања у различитим типовима тла (Gagliardi и Karns, 2000). Добро подноси ниске температуре, па тако при хладном времену преживљава недељама у површинској води (Wang и Doyle, 1998; Rice и сар., 1992). У храни која се држи на температури хлађења ( $\leq 5$  °C) може да опстане више недеља, док на - 20 °C преживљава месецима, чак и неколико година (McClure и Hall, 2000; Norrung, Andersen и Bunčić, 2008).

Када су остали услови одговарајући може да се умножава при рН од 4,4 до 9, али је оптимално на око 7, док је најнижа активност воде на којој је могућ раст 0,95. Након више епидемија проузрокованих изразито киселом храном, чија је рН вредности испод 4,7 (јогурт, сокови, саламе, мајонез), сматрало се да *E. coli* O157 има израженију отпорност на киселу средину, у односу на остале сојеве ове врсте. Накнадним испитивањем је установљено да се способност преживљавања при ниској рН разликује међу сојевима серотипа O157 исто као и међу сојевима других серотипова ове врсте (Holck и сар., 2011; McClure и Hall, 2000). Способна је да се умножава у средини са

6,5% кухињске соли али престаје да се умножава при концентрацији већој од 8,5% (Jay, 2000).

Упркос чињеници да топлотна отпорност сојева серотипа O157 не одступа у односу на друге сојеве *E. coli*, недовољно топлотно обрађено уситњено месо, као и производи од уситњеног меса, до сада су проузроковали највише епидемија изазваних наведеним узрочником. Због тога су у одређеним земљама донете препоруке о најмањој висини температуре коју је потребно применити током припремања производа од сировог уситњеног говеђег меса. С тим у вези, Саветодавно тело за храну Велике Британије (ACMSF, 1995) изнело је препоруку да се уситњено говеђе месо и његови производи обрађују температуром од најмање 70 °C у трајању од два минута, док је прописом Управе за храну и лекове САД (FDA, 1999) предвиђено загревање до постизања температуре од 66 °C у средишњем делу запремине меса у трајању од 1 минута или у комбинацији 68 °C/15 секунди, односно, 70 °C/≤ 1 секунде, чиме се остварује редуција од најмање 6 log јединица, евентуално присутних патогена.

Сви припадници *E. coli* се разврставају према устаљеној шеми антигене серотипизације, при чему *E. coli* O157:H7 спада у серогрупу 157 O липополисахаридног антигена, у оквиру које поседује 7 тип флагеларног антигена (Dykes, 2004).

У погледу биохемијских особина, сојеви серотипа O157:H7 разлажу лактозу, док им је IMViC формула је: ++--,-, што представља заједничку одлику врсте. Поред одсуства или слабог умножавања на температурама изнад 44 °C, главне фенотипске особине које издвајају већину сојева O157:H7 од изолата осталих серотипова су изостанак разградње сорбитола до киселине у току првих 24 часа култивације, као и одсуство ензима β - глукуронидазе, коју поседује око 95% свих изолата *E. coli*. Додатна особеност припадника O157 серогрупе је немогућност да разлажу шећер рамнозу, за разлику од већине сорбитол негативних сојева из осталих серогрупа (Fung, 2010; Adams и Moss, 2008; Smith и Scotland, 1993).

Патогенеза и генетска основа вирулентности ентерохеморагичних сојева *E. coli* O157:H7 није потпуно расветљена. До сада није установљена једна нити комбинација више особина, односно, маркера на основу којих би се са сигурношћу могло утврдити да ли је одређени сој *E. coli* O157:H7 серотипа вирулентан за човека (EFSA, 2013; Behling и сар., 2010). Сматра се да су најважнији чиниоци који доприносе настанку крвавог пролива и системских компликација (хеморагично уремични синдром - HUS, тромбна тромбоцитопенична пурпура - ТТП) веротоксини, производи гена из тзв. локуса за измену облика ентероцита (LEE) и производи гена из неконјугативног рO157 плазмид (Соорег и сар., 2014; EFSA, 2013).

Веротоксини су супстанце установљење у клиничким сојевима HUS-а које су добиле назив по цитотоксичном дејству на Vero културе ћелија бубрега зеленог мајмуна. Разликују се два основна типа (групе), Vtx1 и Vtx2, од којих први обухвата три а други седам подтипова датих токсина, који се називају и шига токсини, с обзиром на структурну и антигену сличност са токсином *Shigella dysenteriae* тип 1 (WHO, 2010-11). Сојеви *E. coli* серотипа O157:H7 могу да производе токсин прве или из друге групе, или оба заједно или, чак, неколико подтипова токсина из друге групе истовремено. Токсини друге групе показују знатно јаче дејство на огледним животињама и чешће су повезани са тешком клиничком сликом болести код људи, нарочито Vtx2C подтип. Већину веротоксина стварају гени бактериофага уграђених у бактеријски хромозом, због чега се присуство датих токсина сматра стеченом особином која се, такође, може и изгубити (EFSA, 2013; Friedrich и сар., 2007; Schmidt и сар., 1999; Nataro и Капер, 1998). Веротоксини су димери састављени из једне А подјединице, која представља ензимски део токсина и пет Б подјединица, чија је улога да се вежу за глоботриаозилцерамид

(Gb3) гликолипидне рецепторе на површини ћелија ткива. Наведени рецептори су присутни на мембрани скоро свих ћелија људског тела али су најбројнији на површини ендотелних ћелија гломерула и крвних судова мозга, што се сматра кључним разлогом појаве затајења бубрега и поремећаја свести у случају компликација (HUS, TTP). Уласком у ентероците, део токсина пролази кроз њих и доспева у леукоците, помоћу којих се крвотоком разноси по целом телу, са накупљањем у крвним судовима бубрега и мозга. Након везивања за специфичне рецепторе, токсини продиру у ендотелне ћелије гломерула што доводи до активације А подјединица, које цепањем N-гликозидне везе у структури рибозомалне РНК заустављају синтезу беланчевина и доводе до смрти ћелија (Pierad и сар., 2012). Исти је случај и у ендотелним ћелијама крвних судова централног нервног система, при чему, као последица оштећења, долази до развоја тромбова, крварења и смањења броја тромбоцита у циркулацији (Park и сар., 1999).

Важним фактором вируленције сматра се и присуство локуса за промену облика ентероцита (LEE), чија улога је причвршћивање узрочника на површину слузокоже црева. Гени из локуса кодирају стварање различитих супстанци, међу којима су најважније интимин, Tig и компоненте које чине тип 3 секреторног система. Наведеним супстанцама ћелија се причвршћује за ентероцит и мења његов облик, који постаје пехараст и без микровила што даје препознатљиву патохистолошку слику запаљења, установљену на огледним животињама и културама ткива човека. Потребно је напоменути да промену облика ентероцита изазива и ентеропатогени тип *E. coli*, који поседује сличан LEE локус у оквиру генома (Adam и Moss, 2008; Chong и сар., 2007).

Некоњугативни рO157 плазмид је присутан у свим клиничким изолатима *E. coli* O157:H7. Величине је 92-104 kb и садржи различите покретне генетске елементе (транспозони, профаги и инсерционе секвенце), као и делове других плаزمида, због чега се сматра да је настао обједињавањем наследног материјала различитог порекла. Међу бројним потенцијално вирулентним генима наведеног плазмида најзначајнијим се сматрају ентерохемолизин (*ehx*), каталаза-пероксидаза (*katP*), тип 2 секреторни систем (*T2SS*), серин протеаза (*espP*), металопротеаза (*stcE*) и токсин Б ген (*toxB*) (Youn, Yoon i Novde, 2009).

За настанак болести неопходно је присуство и додатних чинилаца, као што су различити секреторни цитотоксини, фимбријални и афимбријални адхезини и регулаторни интермедијарни ензими, чија улога у насељавању датог патогена на слузокожу црева људи још увек није довољно разјашњена (Connolly и сар., 2015; Etcheverria и Padola, 2013; Friedrich и сар., 2006).

Дигестивни тракт домаћих преживара, првенствено говеда, главни је резервоар *E. coli* O157:H7 у природи. Њено присуство је установљено и код јелена, свиња, кокошака, ћурака, гусака, паса, коња и кунића али наведене врсте нису значајне као резервоари или извори инфекције за човека (Duffy и сар., 2001; Charman, 2000; Berry и Wells, 2010). С друге стране, голубови, галебови, глодари, муве и други инсекти спадају у преносиоце који могу да буду значајан чинилац загађења, када је у питању ланац производње хране (Laury, Echeverry и Brashears, 2010). Од великог епидемиолошког значаја је чињеница да се код домаћих животиња, пре свега говеда, веома ретко испољава клиничка слика болести. Здраве животиње могу нагло и повремено да излучују узрочнике, чак у изузетно великом броју (> 1000 CFU/g измета), при чему разлози наведене појаве нису потпуно разјашњени. Запажено је да су „сејачи“ клица чешће младе јединке, нарочито телад која је престала да сиса, са значајно већим бројем налаза током летњих месеци (Cargioli и сар., 2005). Поред тога, поједина истраживања указују и на могућ утицај чинилаца везаних за исхрану (однос кабастог и зранстог хранива, исхрана са прекидима, односно, неправилна исхрана), начин држања

животиња (отворени или затворени тип), као и преношење узрочника водом из појилица (Naylor и сар., 2003; Novde и сар., 1999; Wang и Doyle; 1998).

Главни пут уношења узрочника у организам човека је храном или водом али се инфекција може остварити и непосредно, са особе на особу или додиром са животињама. Доказано је да инфекција може настати и купањем у води или боравком на травнатим површинама загађеним изметом домаћих животиња (EFSA, 2007). Када је у питању храна, млевено говеђе месо је најчешћи извор инфекције, при чему уситњавање има важну улогу јер на тај начин узрочници доспевају у унутрашњост запремине, што омогућава њихово преживљавање у случају недовољне топлотне обраде (Yoon, Yoon и Novde, 2009). Поред уситњеног обликованог говеђег меса, болест могу да проузрокују и различити типови говеђег меса спремног за јело, ферментисане кобасице, као и сушено месо дивљачи. Последњих година забележени су и случајеви обољевања проузроковани производима од свињског меса (Trotz-Williams и сар., 2012; Conedera и сар., 2007). Од немесних производа у обзир долазе млеко и производи од непастеризованог млека, мајонез, лиснато и кртоласто поврће, клице, воће и воћни сокови. С тим у вези, до сада највећа епидемија *E. coli* O157:H7, са више од шест хиљада оболелих, проурокована је клицама заливаним водом загађеном говеђим изметом (Yoon, Yoon и Novde, 2009; EFSA, 2007; EFSA 2004; Michino и сар., 1999).

Поред *E. coli* O157, тежак облик ентеритиса и системске компликације, иако ређе, могу да изазову и други облици ове врсте, нарочито припадници O26, O103, O111 и O145 серогрупе, који се називају веротоксични (VTEC) не O157 сојеви, чинећи око половину укупно пријављених случајева. Услед генотипске и фенотипске разноликости, њихова изолација и идентификација је знатно сложенија и мање поуздана, у односу на поступке који се односе на O157 серотип (Smith Fratamico и Gunther, 2014; Buvens и Pierard, 2012; EFSA, 2007).

Опште прихваћена претпоставка је да изложеност малом броју ћелија *E. coli* O157:H7 може бити довољна за настанак обољења. У замрзнутим хамбургерима серије која је проузроковала масовне случајеве болести установљено је од 0,3 до 15 ћелија по граму садржаја (Doyle и сар., 1997), док извештај FSIS-а (1993), као и студија Willshaw-а и сарадника (1994) указују да је инфекција могућа уношењем мање од две ћелије по 25 грама садржаја хране. Анализом епидемије проузроковане сувим ферментисаним кобасицама, из 1994. године, Tilden и сарадници (1996) су закључили да је за настанак инфекције потребно мање од 50 ћелија. Важно је напоменути да због веома ниске инфективне дозе инфекција може да настане и без претходног умножавања узрочника у храни (Sartz и сар., 2008).

Инфекција изазвана *E. coli* O157:H7 може бити без симптома, у виду воденастог или, често крвавог пролива праћеног системским компликацијама у виду хемолитично уремичног или тромбно тромбоцитопеничног синдрома. Компликације се најчешће јављају код деце млађе од 5 година и људи старијих од 65 година (ECDC, 2015). Инкубација траје од 1 до 16, најчешће 3-4 дана, и започиње воденастим проливом, праћеним јаким грчевима, након чега може да се развије крвави пролив, који у највећем броју случајева престаје за око недељу дана (CFSPH; Iowa, 2009). Температура, углавном, није повишена или је само благо повишена, док је повраћање присутно код 30-50% оболелих (Laury, Echeverry и Brashears, 2010). Узрочници не продиру у слузокожу дебелих црева али токсинима изазивају њено оштећење, што у тежим случајевима може да доведе до стварања ожиљних прираслица (CFSPH, Iowa, 2009). HUS синдром настаје просечно недељу дана од појаве пролива и одликује се хемолитичком анемијом, тромбоцитопенијом и престанком рада бубрега. Поред наведених промена, код ТТП синдрома се развија и микроангиопатија централног

нервног система а честа је и појава грознице (Paton и Paton, 1998). При интензивној медицинској помоћи смрт наступа код око 4% случајева са компликацијама. У лечењу *E. coli* O157:H7 инфекција основу чини потпорна терапија надокнаде течности и електролита, док се употреба антибиотика избегава, с обзиром на то да подстиче појаву HUS и TTP синдрома, што се сматра последицом појачаног ослобађања веротоксина из распаднутих хелија узрочника (Goldwater и Bettelheim, 2012; Besser и сар., 1999).

Идентификација се заснива на фенотипским и генотипским особеностима узрочника али је важно истаћи да су забележени случајеви ентеритиса и хемолитично-уремичног синдрома изазвани сојевима *E. coli* O157:H7 који не производе веротоксине а ферментују сорбитол, што указује да, у одређеним случајевима, уобичајени поступци идентификације нису одговарајући за постављање дијагнозе (Friedrich и сар., 2007; Schmidt и сар., 1999).

Када су у питању ферментисане кобасице, прва епидемија изазвана *E. coli* O157:H7 установљена је 1994. године, у САД, након чега су утврђени случајеви масовног обољевања у Аустралији, Канади и европским земљама (табела 2.7).

**Табела 2.7.** Епидемије проузроковане ферментисаним кобасицама контаминираним ЕНЕС патотипом (Lücke, 2014)

Држава	Узрочник	Оболели/ умрли	Тип кобасице	Разлог	Референца
Норвешка	<i>E. coli</i> O103:H25	18/1	Ферментисана кобасица која садржи и јагњеће месо	Загађено јагњеће месо	Sekse и сар., 2009
Италија	<i>E. coli</i> O157:H7	3/-	Салама од свињског меса	Претпоставка да су загађене сировине?	Conedera и сар., 2007
Данска	<i>E. coli</i> O26:H11	20/-	Говеђа кобасица	Претпоставка да су загађене сировине?	Ethelberg и сар., 2007
Шведска	<i>E. coli</i> O157:H7	30/-	Говеђа кобасица	Недовољно активна стартер култура, кратко време сушења на ниској температури	Sartz и сар., 2007
Канада	<i>E. coli</i> O157:H7	143/-	Мађарска салама	Загађене сировине?	MacDonald и сар., 2004
Канада	<i>E. coli</i> O157:H7	39/-	Ђеновска салама,	Претпоставка да су загађене сировине; Недовољан надзор ферментације	Williams и сар., 2000
Аустралија	<i>E. coli</i> O111:NM	21/1	Полусува фер. кобасица („mettwurst“)	Загађене сировине	Paton и сар., 1996
САД	<i>E. coli</i> O157:H7	23/-	Сува ферментисана кобасица	Није наведено	Tilden и сар., 1996



### 2.3.3 *Listeria monocytogenes*

Последњих деценија у развијеним земљама је присутан тренд потрошача ка куповини свежих, минимално обрађених производа, чија се безбедност и употребљивост одржава применом ниских температура, као и производа спремних за јело, чија припрема не захтева значајнији утрошак времена. С тим у вези, у оквиру болести проурокованих храном, све већу пажњу изазива листериоза, коју изазива психротрофан и убиквитаран узрочник, способан да изазове озбиљне здравствене поремећаје, праћене великим економским губицима (WHO, 2014; Ministry of Primary Industries New Zealand, 2013).

Листериозу људи изазива *Listeria monocytogenes*, грам позитиван, аспороген и често плеоморфан штапић, величине 0,4 - 0,5 x 0,5 - 2  $\mu\text{m}$ . Факултативно је анаеробан, већином каталаза +, оксидаза -, нема капсулу и поседује свега неколико перитрихно постављених флагела. У свежој култури на собној температури (20 - 25°C) живахно се креће, док наведена појава изостаје или је слабо изражена на 37°C. На бескрвним подлогама, под косим извором светлости (45°) колоније *L. monocytogenes* постају плаве или плаво сивкасте боје. Умножавањем у дубоком полуврстом агару добија се облик кишобрана или обрнуте јелке, што је последица склоности микроорганизама ка микроаерофилној средини (Adams и Moss, 2008, Bunčić и Avery, 2004).

Узрочник листериозе је психротрофан и може да се размножава у опсегу од -1,5°C до +45°C (Hudson, Mott и Penney, 1994; Petran и Zottola, 1989). Култивисање на +4°C се још назива и хладно обogaћење и раније се користило за изолацију *L. monocytogenes* из узорака у којима су присутне и друге бактеријске микробиоте, али се данас ретко употребљава због дужине трајања поступка и развоја напреднијих селективних подлога (Donnelly и Nyachuba, 2007). Добро преживљава у замрзнутој храни са редукцијом мањом од једног логаритма након три месеца складиштења на -18°C и -20°C у случају инокулисаних узорака рибе, ракова, уситњеног говеђег и ћурећег меса, хреновки и сладоледа (Palumbo и Williams, 1991; Harrison и сар., 1991).

*L. monocytogenes* може да се размножава при рН вредности од 4,1 до 9,6, док је најнижа  $a_w$  потребна за раст 0,92. Способна је да се умножава у средини са 10% кухињске соли и да преживи годину дана при концентрацији исте супстанце од 16%. У пресолцу за сир концентрације NaCl од 23,8% и рН вредности од 4,9 на +4°C може да опстане 259 дана (Lado и Yousef, 2007; Avery, 2006; ICMSF, 1996). Ниска температура утиче на боље преживљавање узрочника, када су остали чиниоци из околне средине неповољни, што је утврђено у огледима инокулације листерија у надев или на површину сувих ферментисаних кобасица, чије крајње рН вредности су биле испод 5,2 (Byelashov и сар., 2009; Hwang и сар., 2008; Johnson и сар., 1988).

Род *Listeria* обухвата шест врста међу којима се једино *L. monocytogenes* сматра правим патогеном за човека. Припадност врсти се утврђује на основу хемоллизе, CAMP теста са *Staphylococcus aureus* и *Rhodococcus equi* и биохемијских особина (табела 2.8).

При процени хемоллизе потребно је водити рачуна да *L. monocytogenes* и *L. seeligeri* образују узан појас, *L. ivanovii* широк појас  $\beta$  хемоллизе, док су *L. innocua*, *L. welshimeri* и *L. grayi* нехемолитичне врсте. Такође, CAMP тест са *R. equi*, може да покаже и недовољно јасан резултат за *L. monocytogenes*, при чему се, у том случају, сумња на *L. ivanovii* отклања на основу производње киселине од D ксилозе, L рамнозе и  $\alpha$ -метил D манозида (Rocourt и Buchrieser, 2007; Bunčić и Avery, 2004).

Ради добијања додатних података о изолатима, нарочито у оквиру епидемиолошких истраживања, примењује се класичан поступак серотипизације на

основу антигених особина О соматског и Н флагеларног антигена. С тим у вези, *L. monocytogenes* обухвата 13 серотипова, од којих 1/2a, 1/2b и 4b чине 90% изолата инфекција људи, међу којима више од 50% чини 4b серотип. За ближе одређивање особености клиничких изолата, поред серотипизације, спроводи се и идентификација помоћу бактериофага (фаготипизација) и све више, субтипизација молекуларним методама, од којих је најосетљивија PFGE метода (Bunčić и Avery, 2004).

**Табела 2.8.** Особине за међусобно разликовање врста у оквиру рода *Listeria* (McLauchlin и Rees, 2009)

Особине	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>
β хемолиза	+	-	-	+	+	-
САМР тест <i>S. aureus</i>	+	-	-	-	+	-
САМР тест <i>R. equii</i>	-	-	-	+	-	-
Лецитиназа	+	-	-	+	d	-
Каталаза	+	+	+	+	+	+
Оксидаза	-	-	-		-	-
Хидролиза ескулина	+	+	+	+	+	+
Раст на жучном агару	+	+	+	+	+	+
Редукција нитрата у нитрит	-	-a	-	-	-	-
Киселина од D - манитола	-	+	-	-	-	-
Киселина од D - ксилозе	-	-	-	+	+	+
Киселина од L - рамнозе	+	+	d	-	-	d
Киселина од α-D манозида	+	+	+	-	-	+

Симболи: + = више од 85% сојева позитивно; d = различити сојеви дају различите реакције (16-84%); - = од 0 до 15% сојева је позитивно; a = *L. grayi* подврста *murrayi* редукује нитрат у нитрит

*Listeria monocytogenes* је факултативно интрацелуларни патоген способан да прође кроз цревну слузокожу, крвно-мождану и плаценталну баријеру, као и да се умножи и преживи у ћелијама различитих врста ткива сисара (Seveau, Pizarro-Cerda и Cossart, 2007). Своју свестраност узрочник остварује различитим факторима вируленције међу којима су најпознатији листериолизин (LLO), аутолизини (Ami и Auto), Vip протеин, фосфолипазе C (PI-PLC, PC-PLC), ензим p60, површински протеин (AcT) и различити типови интерналина (InA, InB, In1C, In1H, In1J и Lmo2026) (Bierne и cap., 2007; Seveau, Pizarro-Cerda и Cossart, 2007; Bunčić и Avery, 2004).

Један од разлога због чега листериоза спада у најзначајније болести проузроковане храном је убиквитарност узрочника. *Listeria monocytogenes* је широко

распрострањена у спољашњој средини и може да буде присутна у земљишту, води, распадајућој биљној маси и многим врстама дивљих животиња. Од домаћих животиња, најчешће је присутна код преживара, са преваленцом налаза у измету и до 50 % (Norrung, Andersen и Bunčić, 2009). Животиње могу да се заразе путем дигестивног тракта контаминираним храном, што је најчешће случај код неправилно произведене, слабо закишељене силаже али инфекција може да настане и преко оштећења на слузокожи уста, ноздрва и ока. Болест се испољава само код мањег броја заражених јединки у виду знакова енцефалитиса, плацентитиса или септикемије (OIE, 2014; Bunčić и Avery, 2004).

Иако се патоген често може изоловати из домаћих животиња, за јавно здравље већи значај има његово присуство у срединама за производњу хране. Насељава радне површине просторија за производњу меса и месних прерађевина, као и површине хладњача у кланицама са последичном могућношћу загађења различитих типова производа (Norrung, Andersen и Bunčić, 2009; Roberts и Wiedman, 2003). Изражена способност стварања биофилмова омогућава узрочнику да се насељава и дуготрајно преживљава у неповољним условима, са појавом унакрсног загађења и даљег расејавања током прераде, складиштења и снабдевања храном (Kadam и сар., 2013; Dominguez и Schaffner, 2009). Присуство *L. monocytogenes* је установљено у разним намирницама, укључујући црвено месо, живинско месо, млечне производе, поврће и плодове мора. Епидемије проузроковане непастеризованим и пастеризованим млеком и меканим сиревима су најчешћи случај али су забележене и листериозе проузроковане павлаком, маслацем, свињским и ћурећим месом, пихтијама и другим месним прерађевинама, салатом од купуса, шкољкама, шампима и сировим јајима, као и другим производима (Adams и Moss, 2008; Norton и Braden, 2007)

Сматра се да концентрација узрочника између  $10^2$  и  $10^3$  по граму хране може да изазове болест код осетљивих особа али је просечна инфективна доза знатно виша и износи преко  $10^5$  CFU/g (MPINZ, 2013; Norrung, Andersen и Bunčić, 2009; Painter и Slutsker, 2007; Feiner, 2006). Код особа са ослабљеним имунитетом болест се развија инвазивно, док код преостале популације најчешће поприма локализовани, гастроинтестинални облик. Изузетно, инвазивни облик болести може да се развије и код здравих особа (Painter и Slutsker, 2007).

Период инкубације се креће од једног до 90 дана, просечно неколико недеља, што значајно отежава или потпуно онемогућава утврђивање хране која је проузроковала болест. Након уношења у дигестивни тракт, узрочник продире у ћелије епитела црева, првенствено у подручју Пејерових плоча, и одатле лимфотоком и крвотоком се преноси до јетре и слезине, где га преузимају ћелије моноцитно-макрофагног система, у којима бива уништен. Мањи број бактерија, међутим, доспева до хепатоцита у којима се умножава и шири даље, прелазећи, непосредно, из једне ћелије у другу. Посебна прилагођеност *L. monocytogenes* је способност да унутар ћелије домаћина избегне спајање са лизозомом, као и да подстакне полимеризацију актинских влакана око своје површине, што јој омогућава пребацивање са једног хепатоцита у други, без непосредног додира са носиоцима имунолошког одговора. До посредне активације одбрамбеног система, ипак, долази, пореклом од хепатоцита, што доводи до образовања гранулома састављених од моноцита и Т лимфоцита, који доводе до потпуног уништења узрочника. Код имунокомпромитованих особа Т лимфоцити нису у стању да се изборе са узрочником, услед чега он поново доспева у циркулацију и разноси се до централног нервног система и других делова тела. У клиничкој слици преовлађују знакови менингоенцефалитиса или септикемије а ређе долази и до појаве ендокардитиса. Смртност у случају инвазивног облика болести креће се од 20% до 50%

(Adams и Moss, 2008; Bunčić и Avery, 2004). Лек избора у лечењу листериозе је триметоприм-сулфаметаксазол, ампицилин или пеницилин, док бактериостатске антибиотике, као што су хлорамфеникол или тетрациклини, треба избегавати (Bunčić и Avery, 2004). Код трудница *L. monocytogenes* може да доспе у плод, најчешће у последњем триместру, нарочито када су у питању вишеплодне трудноће и доведе до побачаја, мртворођености или прераног рођења. Листериоза новорођенчади најчешће је фатална и има рани и касни облик, који се јављају одмах по рођењу, односно, после једне или више недеља. У раном облику настаје септикемија, пнеумонија или дисеминована грануломатоза, док се код касног облика чешће развија слика менингоенцефалитиса. Инфекција код трудница пролази асимптоматски или у виду неспецифичних симптома сличних грипу (Adams и Moss, 2008; Bunčić и Avery, 2004).

Када су у питању ферментисане кобасице, до сада је објављено једно епидемиолошко истраживање које је претпоставило могућност настанка листериозе проузроковане саламом, као и један случај где је доказана повезаност листериозе оболелог и присуства узрочника у слабо ферментисаној свежој кобасици (Lončarević и сар., 1997; Schwartz и сар., 1989). Упркос чињеници да се ради о само два епидемиолошка навода, убиквитарност узрочника и опште промене у друштву, у смислу пораста обима производње, прераде и снабдевања храном, употребе ниских температура као основног начина очувања намирница, скраћивање времена за припрему оброка и повећање удела имунокомпромитованих особа у укупној структури становништва чине да се *L. monocytogenes* сматра једним од најзначајнијих патогена, када је у питању безбедност ферментисаних кобасица (Dalzini и сар., 2015; OIE, 2014; Porto-Fett и сар., 2008).

## **2.4 КОНТРОЛА МИКРОБИОЛОШКЕ БЕЗБЕДНОСТИ ФЕРМЕНТИСАНИХ СУВИХ КОБАСИЦА**

### **2.4.1 Микробиолошки индикатори**

У савременим условима производње меса међу биолошким опасностима истичу се цревни патогени (*Salmonella*, *E. coli* O157, *Yersinia*, *Campylobacter*), често присутни у клинички здравим животињама, као и поједине врсте микробиота пореклом из недовољно чистог производног окружења (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*). Узрочници болести су, међутим, у намирницама, најчешће, ретко присутни, у малом броју и неравномерно распоређени. Због тога редовно испитивање њиховог одсуства и/или присуства у оквиру прихватљивог броја, није поуздан начин утврђивања безбедности производа (Bunčić и сар., 2012; Schaffner и Smith, 2004; Tortorello, 2003; Brown и сар., 2000). У складу са тим, испитивање одређеног патогена у намирницама се не спроводи као рутинска мера, већ само када постоји оправдана потреба у смислу епидемиолошких истраживања, усаглашавања са званичним условима у погледу микробиолошке безбедности хране или у научно истраживачке сврхе (Adams и Moss, 2008; EC 2073/2005; Giovannini и сар., 2004; Levine и сар., 2001; Escartin и сар., 1999).

У храни и околној средини налазе се и микроорганизми слични патогенима, заступљени у већем броју, који нису опасни по здравље људи а чије присуство или број може да послужи у процени микробиолошке исправности поступка производње и крајњег производа. Наведени микроорганизми називају се индикатори и неизоставан су део микробиолошких испитивања предвиђених званичним прописима, као и

испитивања примењених од субјеката који послују храном, у вези са сопственим потребама (Matias, 2010; Adams и Moss, 2008; Tortorello, 2003).

Основна улога микробиолошких индикатора је указивање на могуће присуство патогена или узрочника квара производа. С обзиром на то да постоје различити услови и циљеви у оквиру којих се испитивања спроводе, важну улогу има правилан одабир индикатора, као и одговарајуће тумачење резултата испитивања (Tortorello, 2003). Према Међународној комисији за микробиолошку спецификацију хране (ICMSF, 2002) идеалан микроорганизам индикатор треба да испуњава следеће захтеве:

1. његово присуство да указује на погрешно осмишљен или изведен поступак производње или могућност квара производа;
2. способност преживљавања - слична или већа у односу на патогена или узрочника квара;
3. стопа умножавања - слична или бржа у односу на патогена или узрочника квара;
4. особености индикатора - поуздане за идентификацију;
5. утврђивање присуства и/или броја индикатора - једноставно, брзо, поуздано, осетљиво, без великих трошкова, безопасно и погодно за извођење у условима производње;
6. непосредна повезаност броја индикатора и нивоа патогена или узрочника квара;
7. применљиви резултати у смислу контроле поступка производње.

Потребно је напоменути да ниједан микроорганизам не испуњава све наведене захтеве, због чега се у циљу веће поузданости препоручује примена више индикатора, истовремено (Schaffner и Smith, 2004; Brown и сар., 2000).

За микробиолошку процену меса и производа од меса, у погледу безбедности и квалитета, као индикатори могу се користити следећи микроорганизми и/или групе: укупан број аероба, ентеробактерије, укупни колиформи, фекални колиформи, *E. coli*, фекалне ентерококе и листерије (*Listeria* spp.) (Jordan и сар., 2006., Thippareddi, Boyle и Burson, 2005; Koutsoumanis и Sofos, 2004; Schaffner и Smith, 2004; Gilbert и сар., 2000). Према прописима ЕЗ (ЕС 2073/2005) укупан број аероба, ентеробактерије и *E. coli* представљају индикаторе процесне хигијене у производњи меса и стога ће у оквиру теме докторске дисертације бити подробније описани.

Одређивање **укупног броја аероба** (у даљем тексту означени као АСС од енглеског назива – Aerobic colony count) је поступак одређивања броја мезофилних облигатних аероба и факултативних анаероба, при чему се наведеним поступком утврђује присуство највећег дела од укупне популације микроорганизама, присутне по јединици хране. У питању је најчешћи микробиолошки тест који се изводи засејавањем узорака на одабране подлоге опшег типа (Hayes, 1995). АСС се често наводи и као укупан број колонија, што није одговарајући назив, с обзиром на то да наведена група обухвата само облике способне да образују колоније под датим условима култивације (хранљиви састав подлоге, температура, време, састав атмосфере итд.) (Anon., 2007).

За месо и производе од меса, АСС се, првенствено, користи у оцени целокупног хигијенског стања производног поступка, у смислу успешности спровођења предусловних програма (GMP/GHP) (Ghafir и сар., 2008; Tortorello, 2003). Опште правило је да густина популације АСС у месу мања од  $10^6$  CFU/g или  $cm^2$  указује на мешану структуру, док у случају виших вредности преовлађује одређена група микробиота, што указује на нехигијенске услове производње или смањену одрживост дате намирнице (Anon., 2009).

Повећање укупног броја аероба указује на пропусте који се могу односити на микробиолошку исправности сировина, одржавање хладног ланца, услове прераде, рок одрживости производа, ниво обуке и личне хигијене запослених или успешност спровођења санитације (Анон., 2014а).

АСС не може да се користи као индикатор безбедности, с обзиром на то да обухвата различите групе микробиота, услед чега не постоји повезаност између нивоа наведеног индикатора и присуства патогена у производу (Schaffner и Smith, 2004). Процена микробиолошког квалитета ферментисаних производа, такође, није могућа зато што они, по својој природи, садрже велик број млечно киселинских бактерија и последично високе вредности укупног броја аероба (Tortorello, 2003).

**Укупан број ентеробактерија** (у даљем тексту означени као ЕВС – од енглеског назива *Enterobacteriaceae colony count*) подразумева укупан број припадника породице *Enterobacteriaceae* утврђен на основу њихових заједничких особина, а то су способност ферментације глукозе и отпорност на жучне соли (ILSI, 2011; Tortorello, 2003). Породица ентеробактерија обухвата најзначајније цревне патогене (*Salmonella*, *E. coli* O157; *Yersinia enterocolitica*, *Shigella*, *Enterobacter sakazakii*), због чега може као индикатор, у извесној мери, да се користи у процени безбедности хране, под условом да су поступци за утврђивање присуства ентеробактерија истог нивоа осетљивости као што је случај када су у питању поступци за утврђивање присуства одређених патогена. С друге стране, *Enterobacteriaceae* представљају веома разнородну породицу (48 родова) због чега није могуће да се само на основу присуства и/или броја наведеног индикатора установи непосредна повезаност са присуством патогена, односно, није могућа поуздана процена безбедности намирница на општем нивоу. Постоји мишљење да је дати циљ могућ уколико се анализа резултата испитивања спроводи појединачно, на нивоу сваког произвођача посебно (ILSI, 2011; EFSA, 2007).

Када су у питању месо и производи од меса, основна улога ентеробактерија је у утврђивању обима загађења пореклом од измета и/или садржаја дигестивног тракта, које настаје непосредним додиром или посредно, са коже животиња, руку радника или из производног окружења (Jordan и сар., 2006). За оцену успешности мера санитације ентеробактерије представљају погодног индикатора због осетљивости према дезинфекционим средствима и способности насељавања површина које долазе у додир са храном, што се дешава код неодговарајућег спровођења правила предусловних програма (Kornaski и Johnson, 2001). У производном окружењу и самим производима ентеробактерије су заступљеније у односу на *E. coli* што омогућава већу осетљивост ЕВС теста приликом утврђивања нивоа фекалног загађења, нарочито у случају када је садржај *E. coli* у дигестивном тракту животиња мали или уколико се хигијенске мере спроводе успешно. С друге стране, присуство *E. coli* ближе указује на фекално порекло загађења пошто ентеробактерије чине и облици који нису непосредно везани за дигестивни тракт топлокрвних животиња (Jordan и сар., 2006). Уколико се, пак, оцена успешности контроле производног поступка заснива на праћењу само једног индикатора, преовлађујући став је да су ентеробактерије најбољи избор, с обзиром на то да пружају обухватнији приказ хигијенског стања, у односу на укупан број аероба и укупан број *E. coli*, појединачно (Ghafir и сар., 2008).

Одређивање **укупног броја *E. coli*** (у даљем тексту означене као ЕСС – од енглеског назива *Escherichia colony count*) је први тест индикатор који се примењивао за испитивање хигијенског квалитета воде и намирница (Tortorello, 2003). Због уобичајеног присуства у дигестивном тракту људи и домаћих животиња, *E. coli* се сматра индикатором који најближе указује на фекално загађење хране (Jordan и сар., 2006; Schaffner и Smith, 2004).

Након сазнања да поједини облици *E. coli* могу изазвати тешке здравствене поремећаје код људи (као нпр. *E. coli* O157:H7) постоји тежња ка примени све оштријих критеријума у погледу присуства датог индикатора у месу и производима од меса, на међународном нивоу (Anon., 2007). Због сличности у погледу преживљавања са *E. coli* серотип O157:H7 и *Salmonella*, непатогени сојеви генеричке *E. coli* могу да се користе као замена (сурогат) код испитивања успешности примене различитих антимикробних третмана и услова ферментације (Keeling и сар., 2009; Niebuhr и сар., 2008).

*E. coli* нема изражену отпорност према топлоти због чега не би требало да буде присутна у топлотно обрађеним производима. Поред тога, правилним и редовним спровођењем мера санитације (чишћење и дезинфекција) успешно се уклања из производног окружења. Повећање укупног броја *E. coli* може да укаже на следеће (Food Safety Authority of Ireland, 2014):

1. фекално загађење сировина;
2. неодговарајућа топлотна обрада;
3. унакрсно загађење производа;
4. неодговарајуће спровођење мера санитације;
5. грешке у надзору временско/температурних услова средине у којој се храна налази већа вероватноћа присуства патогена.

Наведени микроорганизам, међутим, може да преживи и да се умножава у појединим намирницама, као и у окружењу у којем се храна налази, због чега позитиван налаз не мора искључиво да буде последица недавног фекалног загађења хране, нити фекалног загађења уопште (Anon., 2007; Tortorello, 2003). Организација за храну и пољопривреду и Светска здравствена организација (FAO/WHO, 1979) донеле су одлуку да се безбедност прехранбених производа не може оценити само на основу присуства и/или броја *E. coli* у њима, што се односи и на остале индикаторе фекалног загађења (фекални колиформи, укупни колиформи, ентеробактерије). Према истој одлуци, повећање броја наведених микроорганизма може само, под одређеним околностима, да укаже на већу вероватноћу присуства цревних патогена.

Према важећем пропису Републике Србије (Правилник о општим и посебним условима хигијене хране у било којој фази производње, прераде и промета, РС, 2010), процесна хигијена у производњи трупова и уситњеног меса, одређивана одговарајућим ISO методама и исказана као CFU/cm<sup>2</sup> (трупови) или CFU/g (уситњено месо) може бити на задовољавајућем, прихватљивом или незадовољавајућем нивоу, зависно од вредности прописаних за АСС, ЕБС и ЕСС индикаторе, односно, на задовољавајућем или незадовољавајућем нивоу, када је у питању присуство *Salmonella* на труповима (табеле 2.9 и 2.10). У случају незадовољавајућих резултата потребно је предузети мере предложене Правилником, односно, када се ради о труповима, потребно је побољшати хигијену клања и преиспитати мере надзора поступка производње, док је у случају уситњеног меса потребно побољшати хигијену производње и надзор избора и/или порекла сировина.

У погледу критеријума безбедности хране, односно, услова који се односе на готове производе у промету, Gilbert и сар. (2000) су изнели смернице у циљу категоризације производа по микробиолошком квалитету а које се примењују у многим земљама. Према датим препорукама сматра се да су суве ферментисане кобасице задовољавајућег квалитета уколико у 25 грама њиховог садржаја није установљено присуство *E. coli* O157 или другог соја вероцитотоксичног/ентерохеморагичног патотипа, док се у супротном такав производ сматра неприхватљивим и неопходно је предузимање хитних мера којима ће се установити узрок присуства наведеног

патогена, као и могуће спровођење казних поступака према произвођачу, нарочито уколико је патоген установљен у више него једном узорку.

**Табела 2.9.** Граничне вредности за оцену процесне хигијене трупова након примарне обраде а пре поступка хлађења (преузето из Правилника РС, 2010 и делимично измењено)

Категорија хране	Микроорганизми	Јединица мере	План узорковања		Граничне вредности <sup>1</sup>		Референтни метод испитивања <sup>2</sup>
			n	c	m	M	
Трупови говеда, оваца, коза и коња <sup>3</sup>	Број аеробних колонија	CFU/cm <sup>2</sup>			3,5 log дневне средње log вредности	5,0 log дневне средње log вредности	EN ISO 4833
	<i>Enterobacteriaceae</i>	CFU/cm <sup>2</sup>			1,5 log дневне средње log вредности	2,5 log дневне средње log вредности	EN ISO 21528-2
Трупови свиња <sup>3</sup>	Број аеробних колонија	CFU/cm <sup>2</sup>			4,0 log дневне средње log вредности	5,0 log дневне средње log вредности	EN ISO 4833
	<i>Enterobacteriaceae</i>	CFU/cm <sup>2</sup>			2,0 log дневне средње log вредности	3,0 log дневне средње log вредности	EN ISO 21528-2
Трупови говеда, оваца, коза и коња	<i>Salmonella</i>	CFU/cm <sup>2</sup>	50 <sup>4</sup>	2 <sup>5</sup>	Не сме да буде на испитиваном подручју трупа		EN/ISO 6579
Трупови свиња	<i>Salmonella</i>	CFU/cm <sup>2</sup>	50 <sup>4</sup>	5 <sup>5</sup>	Не сме да буде на испитиваном подручју трупа		EN/ISO 6579

<sup>1</sup> n = број јединица које чине узорак; c = број јединица узорка које дају вредности између m и M

<sup>2</sup> Примењује се најновије издање стандарда (међународни или одговарајући стандард Р. Србије)

<sup>3</sup> Граничне вредности (m и M) примењују се само на узорке узете деструктивном методом Логаритам дневног просека се израчунава тако да се прво узме логаритамска вредност резултата сваког појединог испитивања и затим се из тих вредности израчуна просек *Enterobacteriaceae* и број аеробних колонија на труповима говеда, оваца, коза, коња и свиња: задовољавајуће, ако је дневна средња логаритамска вредност ≤ m; прихватљиво, ако је дневна средња логаритамска вредност између m и M; незадовољавајуће, ако је дневна средња логаритамска вредност просека > M

<sup>4</sup> 50 узорака се добије из 10 узастопних серија узетих узорака у складу са правилима узимања узорака и учесталости наведеним у Правилнику

<sup>5</sup> Број узорака у којима је установљена салмонела. Вредност c се преиспитује како би се узео у обзир напредак у смањењу преваленције салмонеле



**Табела 2.10.** Граничне вредности за оцену процесне хигијене уситњеног меса на крају поступка производње (преузето из Правилника РС, 2010 и делимично измењено)

Категорија хране	Микро-организми	Јединица мере	План узорковања <sup>1</sup>		Граничне вредности <sup>2</sup>		Референтни метод испитивања <sup>2</sup>
			n	c	m	M	
Уситњено месо	Број аеробних колонија <sup>3</sup>	CFU/g	5	2	5x10 <sup>5</sup>	5x10 <sup>6</sup>	EN ISO 4833
	<i>E. coli</i> <sup>4</sup>	CFU/g	5	2	50	500	EN ISO 16649-2

<sup>1</sup> n = број јединица које чине узорак; c = број јединица узорка које дају вредности између m и M  
<sup>2</sup> Примењује се најновије издање стандарда (међународни или одговарајући стандард Р Србије)  
<sup>3</sup> Овај критеријум се не примењује на уситњено месо које се производи у малопродаји са роком употребе краћим од 24 часа  
<sup>4</sup> *E. coli* се овде користи као показатељ фекалне контаминације

По истом основу задовољавајући квалитет сувих ферментисаних кобасица важи и када је у питању *Salmonella*, односно, њено присуство не сме бити установљено у 25 грама садржаја, што је наведено као услов и у нашем Правилнику (2010) (табела 2.11). Суве ферментисане кобасице спадају у категорију хране која није погодна за умножавање *L. monocytogenes*, првенствено због ниске рН и/или  $a_w$  вредности (EFSA, 2012). Због тога је, према Правилнику (2010), њено присуство у датој категорији производа дозвољено до нивоа од 100 колонија по граму садржаја (табела 2.11), док се налаз са вредностима изнад тога сматра неприхватљивим.

**Табела 2.11.** Критеријуми микробиолошке безбедности хране који се односе на суве ферментисане кобасице (Правилник РС, 2010)

Категорија хране	Патогени	План узорковања <sup>1</sup>		Граничне вредности <sup>2</sup>	Референтна метода испитивања <sup>3</sup>	Фаза у којој се критеријум примењује
		n	c			
Храна спремна за конзумирање која не подржава раст <i>L. monocytogenes</i> <sup>4</sup>	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 CFU/g	EN ISO 11290-2 <sup>4</sup>	Производ у промету током његовог рока употребе
Производи од меса намењени за јело сирови, осим производа код којих производни процес или састав производа елиминисају ризик од салмонеле	<i>Salmonella</i>	5	0	Не сме да буде у 25 g	EN ISO 6579	Производ у промету током његовог рока употребе

<sup>1</sup> n = број јединица које чине узорак; c = број јединица узорка које дају вредности између m и M  
<sup>2</sup> За наведене тачке m = M  
<sup>3</sup> Примењује се најновије издање стандарда (међународни или стандард Р. Србије)  
<sup>4</sup> Производи са рН ≤ 4,4 или  $a_w$  ≤ 0,92, производи са рН ≤ 5 и  $a_w$  ≤ 0,94

Према Gilbert и сар. (2000) микробиолошки квалитет готових производа може да се оцени и на основу бројности одређеног индикатора. У том смислу, аутори су навели граничне вредности броја ентеробактерија, *E. coli* и представника рода листерија (*Listeria spp*) по граму садржаја (табела 2.12). У оквиру дате поделе суве ферментисане кобасице могу бити задовољавајућег, прихватљивог или незадовољавајућег квалитета. У случају незадовољавајућег квалитета наведени аутори препоручују даље узорковање и предузимање мера којима би се установило да ли се хигијенска пракса, у виду предусловних програма и НАССР плана, спроводи на одговарајући начин, са могућим учешћем званичне инспекцијске службе у датом поступку.

**Табела 2.12.** Микробиолошки квалитет сувих ферментисаних кобасица заснован према бројности одређеног индикатора (Gilbert и сар., 2000)

Индикатори	Микробиолошки квалитет		
	Задовољавајући	Прихватљив	Незадовољавајући
<i>Enterobacteriaceae</i>	<100	100-<10 <sup>4</sup>	≥10 <sup>4</sup>
<i>Escherichia coli</i>	<20	20-<100	≥100
<i>Listeria spp</i>	<20	20-<100	≥100

## 2.4.2 Менаџмент микробиолошке безбедности ферментисаних сувих кобасица

### 2.4.2.1. Предусловни програми

Основни циљ произвођача хране је стицање поверења међу потрошачима производњом укусних, погодних и безбедних производа. За остварење датог циља неопходно је чисто и уређено окружење у ком се на правилан начин одвија производња, прерада, складиштење и снабдевање храном. Скуп здраворазумских и научно потврђених правила опште природе, чије спровођење је пожељно у производњи хране, назива се добра произвођачка (Good Manufacturing Practice-GMP) и добра хигијенска пракса (Good Hygienic Practice-GHP), односно, претходно разрађени и усвојени предусловни програми (Bunčić и сар., 2009; Fraqueza, Barreto и Ribeiro, 2007).

Документи који садрже GMP и GHP правила обухватају низ препорука за следеће области:

- идејно решење, изградњу и одржавање објеката, просторија и опреме,
- чишћење и дезинфекцију просторија и опреме,
- одржавање микробиолошког квалитета сировина,
- надзора у погледу хигијене и безбедности запослених,
- снабдевања пијаћом водом и одржавања квалитета ваздуха,
- сузбијања штеточина, управљање отпадом, надзора над хемикалијама,
- подешавање мерних инструмената и опреме,
- означавање, следљивост и опозив производа, као и
- правилног транспорта (Food Standards Agency, 2006; FAO/WHO, 2005; FDA, 2005; Blackburn, Unilever & Colworth, 2003).

Важну ставку у оквиру предусловних програма чини спецификација сировина и састојака који улазе у састав производа а чије услове морају да испуњавају снабдевачи како би се, у највећој могућој мери, умањио главни начин уношења опасности (хазарда) у ланац производње хране (Arvanitoyannis, Varzakas и Tserkezou, 2009; Eisel, Linton и Muriana, 1997).

Неопходно је, такође, располагање подацима о основним сировинама и свим осталим састојцима хране при сваком кораку производње, од добављача до купаца, ради следљивости података, са могућим брзим и потпуним опозивом било које количине сумњивог производа са тржишта (Bunčić и сар., 2009; Fraqueza, Barreto и Ribeiro, 2007). Обавезан део GMP и GHP представља обука и стално усавршавање у погледу знања о личној хигијени лица која долазе у додир са храном, са циљем стицања свести о значају и одговорности свих учесника у производњи хране (Fraqueza и Barreto, 2010; AMIF, 1999).

У вези са микробиолошким опасностима везаним за ферментисане кобасице, поред хигијене улазних сировина, посебна пажња треба да се посвети одржавању хладног ланца и спровођењу правилних услова ферментације и сушења, путем контроле температуре, времена и релативне влажности ваздуха. Спровођење свакодневних поступака чишћења и дезинфекције – санитације, у циљу одржавања чистог и уређеног производног окружења, као и спречавања унакрсне контаминације производа, заокружује правилно спровођење начела GMP и GHP праксе, када су у питању ферментисани производи од меса (FSIS, 1999).

За успешно спровођење правила предусловних програма неопходно је да сви кораци буду објашњени на једноставан и разумљив начин и да буду документовани у виду стандардних радних процедура (Standard Operating Procedures-SOP). SOP представља скуп упутстава у ком су детаљно наведени поступци извођења одређених задатака на стандардизован начин (Bunčić и сар., 2009; McMeekin, 2003). Успешност спровођења правила предусловних програма, у погледу хигијене, оцењује се на основу микробиолошких критеријума, односно, утврђивањем нивоа индикатора загађења (укупан број аероба, број ентеробактерија, број *E. coli*) или патогена на површинама које долазе у додир са храном и/или у самим производима (Gonzalez – Miret, Coello и Heredia, 2001; Fraqueza и Barreto, 2010). Поред тога, оцена успешности утврђује се и на основу чек листе која садржи списак свих правила добре произвођачке и добре хигијенске праксе, као и упитник о њиховом спровођењу, у оквиру датог предузећа (Fraqueza и Barreto, 2010). У циљу лакше оцене успешности спровођења (верификације), правила GMP и GHP програма треба да буду осмишљена и креирана тако да су прилагођена условима и потребама производње сваког предузећа посебно (Fraqueza и Barreto, 2010).

#### **2.4.2.2 Hazard analysis and critical control points систем - HACCP**

У савременој производњи хране веома успешном се показала примена Hazard Analysis and Critical Control Points система (HACCP), као додатна мера безбедности. Циљ наведеног начина управљања безбедношћу хране је да се установи које опасности су од нарочитог значаја за одређени производни поступак, као и мера помоћу којих се присуство датих опасности може контролисати и свести на прихватљив ниво, у смислу здравствене безбедности крајњег производа. Основна одлика HACCP система је проактивност, односно, усмереност на предвиђање могућих тешкоћа у вези са безбедношћу хране и њихово предупредивање, што је значајна предност у односу на раније системе, засноване, првенствено, на тестирању крајњих производа, у чијем

случају су биле могуће, углавном, закаснеле, реактивне мере (Fraqueza и Barreto, 2010; Bunčić и сар., 2009; Scott и сар., 2009). Превентивне мере НАССР система, углавном, су исте као и превентивне мере предусловних програма али су знатно осетљивије и тачније исказују стање на нивоу одабраних места у ланцу производње (Bunčić, 2006).

Оптималан НАССР план прилагођен конкретним потребама датог типа производње израђује тим стручњака из различитих области (технолози, машински инжењери, ветеринари, микробиолози, токсиколози) у сарадњи са управом предузећа (Bunčić, 2006; Mortimore, 2001).

Начела НАССР плана обухватају: 1) анализу опасности, 2) утврђивање критичних контролних тачака, 3) одређивање граничних вредности за сваку контролну тачку, 4) одређивање начина мерења граничних вредности, 5) мере исправке, у случају одступања, 6) верификацију успешности спровођења плана и 7) документацију података.

У оквиру анализе опасности, приликом упознавања са особеностима датог производног поступка, неопходно је да тим изврши опис и намену производа на који се НАССР план односи, као и да се направи дијаграм тока производње, односно, приказ свих производних корака (Mortimore, 2001). Циљ анализе је да се установи које опасности могу бити присутне у датом производном поступку и које су могуће последице њиховог дејства на потрошаче. Након тога се одређују места, на којима опасности могу бити спречене, одстрањене или смањене на прихватљив ниво. Приликом избора критичних контролних тачака треба водити рачуна да их не да буде више од 3-4 у оквиру једног НАССР плана, с обзиром на чињеницу да су превентивне мере које се у њима спроводе обимне и скупе. За контролу само једне опасности може бити потребно неколико превентивних мера али може да буде и обрнут случај, када се једном превентивном мером успешно контролише неколико опасности, истовремено. Остали кораци у производњи надзиру се валидованим предусловним програмима, без чијег присуства примена НАССР плана није могућа (Fraqueza, Barreto и Ribeiro, 2007; Bunčić, 2006). За одређивање критичних контролних тачака пожељно је да се користи приступ помоћу „дрвета одлуке“. Дрво одлуке представља начин доношења одлука заснован низом једноставних одговора у односу на постављена питања, у виду алгоритамске шеме (Bunčić и сар., 2009; FAO/WHO, 2005) (слика 2.3).

Граничне вредности критичних контролних тачака треба да буду лако мерљиве, при чему се њихов опсег утврђује помоћу литературе, пропратних докумената од снабдевача, личног искуства, резултата огледа, савета стручњака и математичког предвиђања.

Критичне контролне тачке (Critical Control Points-CCP), условно, могу да се поделе по два основа; прву категорију чине CCP у оквиру којих се спроводе мере деконтаминације, са циљем да се опасности потпуно уклоне у оквиру датог производног корака (загревањем, хлађењем, употребом хемијских средстава итд.); док се код друге категорије CCP примењују мере сузбијања опасности, без тежње да се оне потпуно уклоне. У складу са тим, НАССР систем може бити интервентан, уколико се примењују CCP прве категорије или неинтервентан када се примењују CCP друге категорије (Bunčić, 2006).

НАССР план предвиђа и низ корективних мера уколико дође до одступања од предвиђених вредности. Корективне мере имају за циљ да се грешке отклоне у најкраћем могућем року и да се установи количина производа сумњива у погледу хигијенских и безбедносних захтева. На основу накнадних испитивања и прикупљања додатних података, као и савета од чланова НАССР тима и спољашњих стручњака, субјекат који послује храном доноси одлуку да ли сумњива количина производа треба

да буде одбачена, стављена на дораду или неће бити подвргнута било каквим додатним безбедносним мерама (Fraqueza, Barreto и Ribeiro, 2007).



Слика 2.3. Дрво одлуке (преузето од FAO/WHO, 2005)

Пре непосредне примене (имплементације) спроводи се оцена ваљаности (валидација) сваког дела HACCP плана, као и плана у целини, ради провере да ли се све означене опасности успешно контролишу. Након имплементације неопходна је верификација, којом се проверава усклађеност примењеног и изворног валидованог HACCP плана (Sofos, 2014; Sperber, 1998). Када је у питању микробиолошка основа оцене успешности развоја и примене HACCP плана поступци валидације и верификације морају да буду у складу са критеријумима наведеним у званичним прописима из области хигијене хране (EC 2073/2005).

Обавеза произвођача је да сви подаци проистекли применом HACCP система буду сачувани током одговарајућег времена, сразмерно природи и обиму производње, лако доступни члановима HACCP тима, као и осталим чиниоцима који учествују у пословима везаним за храну (Fraqueza, Barreto и Ribeiro, 2007; EC 852/2004).

Када су у питању микробиолошке опасности везане за ферментисане кобасице, у општим примерима HACCP плана истиче се значај појачаног спровођења превентивних мера у оквиру пријема и складиштења сировог меса и масног ткива, предзрења надева (уколико се спроводи), током ферментације и сушења, као и при, евентуалном, нарезивању готових производа.

Превентивне мере обухватају:

- проверу документације од добављача о микробиолошкој исправности сировина (меса, зачина, омотача),
- проверу услова превоза сировина,
- мерење температуре, влажности и струјања ваздуха, као и предвиђеног времена за дати производни корак,
- мерење рН и  $a_w$  вредности,
- проверу чулних својстава,
- употребе одговарајућих санитарних средстава, као и
- повремену микробиолошку контролу производа (Arvanitoyannis, Varzakas, и Tserkezou, 2009; Fraqueza, Barreto и Ribeiro, 2007; Skandamis и Nychas, 2007; Hutkins, 2006; Toldra, 2002; FSIS, 1999).

Микробиолошка испитивања су скупа и захтевају значајан утрошак времена, због чега нису погодна за превентивне мере надзора критичних контролних тачака. С друге стране, повремена али на правилан начин осмишљена квалитативна и квантитативна испитивања патогена и општих индикатора су неопходна за успешан развој и примену HACCP плана (Sofos, 2014).

У општем примеру HACCP плана везаног за индустријску производњу ферментисаних сувих кобасица (салама и пеперони), објављеног у оквиру FSIS-овог водича (1999) а који је широко прихваћен у научној и стручној литератури, описано је пет критичних контролних тачака, када су у питању микробиолошке опасности.

Прва критична контролна тачка је пријем сировина, услед могућег непосредног уноса *Salmonella* и *E. coli* O157 у ланац производње, због чега се у датом документу, у циљу успешног надзора, препоручује да уз сваку испоручену пошиљку буде присутна и потврда о извршеном научно и статистички заснованом испитивању на присуство наведених патогена, при чему њихово присуство не сме бити установљено.

Складиштење охлађеног или замрзнутог сировог меса је друга критична контролна тачка, с обзиром на могућност умножавања алиментарних патогена уколико су услови током наведене фазе производње неодговарајући. У том смислу, у склопу надзора, као превентивна мера препоручује се да највиша температура ваздуха у простору за хлађење буде +4 °C а у простору за замрзавање -1 °C, при чему учестаност мерења температуре треба да буде на свака два сата током предвиђеног периода.

Трећа критична контролна тачка је поступак ферментације у току ког може доћи до умножавања патогена и стварања токсина (*Salmonella*, *E. coli* O157, *S. aureus*) уколико закишељавање садржаја, при температурама ферментације изнад 15 °C, није довољно изражено и брзо. Препорука успешног надзора наведеног производног корака је да рН вредност надева буде снижена испод 5,3 најкасније шест часова од почетка процеса.

Четврта критична контролна тачка је поступак сушења када, такође, може доћи до умножавања патогена и производње токсина уколико одавање влаге из кобасица није спроведено довољно брзо и до одговарајућег нивоа. С тим у вези, препоручује се непрекидно праћење параметара ваздуха у комори за сушење (температура, влажност, струјање), уз мерење нивоа воде у крајњим производима након сваке серије, како би се

успешно надзирано равномерно одавање влаге из кобасица и достизање крајње вредности прописане за дату врсту производа. У случају FSIS-овог водича, где је обрађен производни поступак саламе и пеперони кобасице, крајња вредност датих производа, исказана односом воде и беланчевина, је 1,9:1 и 1,6:1, наведеним редом.

Пета критична контролна тачка се односи на поступак сечења или скидања омотача готових производа, с обзиром на то да постоји могућност постпроцесне контаминације патогенима, пре свега *L. monocytogenes*, у датом производном кораку. Као превентивна мера предлаже се учестана примена санитајзера (свака 2 сата) на површине уређаја који долазе у непосредан додир са производима. Одабрано средство за санитацију мора претходно да буде потврђено у погледу успешног уништавања *L. monocytogenes*, док се учинак спровођења превентивне мере проверава испитивањем присуства наведеног патогена на површинама уређаја и у самим производима, применом валидованих програма узорковања.

Потребно је напоменути да је у FSIS-овом водичу наглашено да изнете критичне контролне тачке и мере њиховог надзора служе као пример а не обавеза и да их може бити и више и мање од пет, што зависи од особености и услова производње сваког појединачног производног поступка.

## 2.5 ТРЕТМАНИ ЗА УНАПРЕЂЕЊЕ МИКРОБИОЛОШКЕ БЕЗБЕДНОСТИ СУВИХ ФЕРМЕНТИСАНИХ КОБАСИЦА

У савременој индустријској производњи ферментисаних кобасица микробиолошка безбедност се заснива, првенствено, на брзом закишељавању ( $\text{pH} < 5,3$ ) и каснијем сушењу производа уз, истовремено, дејство нитрита, кухињске соли и зачина. У технолошком смислу производни поступак је знатно убрзан употребом starter култура и адитива. Пад  $\text{pH}$  вредности остварује се умножавањем млечно киселинских бактерија starter култура и/или дејством ацидуланата, док је убрзано снижавање  $a_w$  вредности омогућено сушењем у посебно климатизованим просторијама. Наведени приступ у производњи се дуго времена сматрао довољним у погледу микробиолошке безбедности сувих ферментисаних кобасица. Појавом епидемије болести изазване *E. coli* O157:H7, 1994. године у САД, проузроковане саламом чији је производни поступак био у складу са предвиђеним правилима покренуто је питање о увођењу додатних мера заштите за дату категорију производа (Holck и сар., 2011; Garriga и Aumerich, 2009; Jay, 2000; Tilden и сар., 1996; Schillinger и Lucke, 1989).

Када су у питању уобичајени поступци производње сувих ферментисаних кобасица, микробиолошка безбедност и одрживост, поред хигијене улазних сировина, постиже се различитим антимикуробним чиниоцима („hurdle concept“), чије удружено (синергистичко) дејство спречава умножавање узрочника квара и евентуално присутних патогена (Holck и сар., 2011). Основни циљ „hurdle“ концепта је да се применом више благих мера, истовремено, оствари неповољно дејство на различитим нивоима унутар микроорганизама (мембране, ензими, наследни материјал, утрошак енергије) што има за последицу нарушавање његове унутрашње равнотеже (хомеостазе) и појаву метаболичке исцрпљености (Leistner, 2000). Наведеним приступом се, међутим, не осигурава потпуно уклањање патогена, због чега, у случају неодговарајућег хигијенског стања улазних сировина и/или услед грешака у самом производном поступку, они могу да буду присутни у крајњем производу на нивоу довољном да изазову болест код потрошача.

У прилог томе су и случајеви обољевања изазвани салмонелама, *Escherichia coli* O157:H7 и *Listeria monocytogenes* када су узрочници, путем различитих намирница, унети у организам у врло малом броју (Teunis и сар., 2010; Avery, 2006; Tilden и сар., 1996). Основни антимикуробни чиниоци у производњи сувих ферментисаних кобасица су наведени у табели 2.13.

**Табела 2.13.** Антимикуробни чиниоци ферментисаних кобасица (Henriksen, 2014)

Чиниоци	Ниво/Опсег/Улога
pH	4,5-5,5
a <sub>w</sub>	0,7-0,9
NaCl	2-4%
Eh	смањење концентрације молекуларног O <sub>2</sub>
киселине	1-2%
компетитивне МКБ	потискивање осталих микробиота
нитрити	60-200 ppm*
омотач	сузбијање непожељних микробиота димљењем или потапањем у антимикуробне растворе
*Зависно од важећих прописа	

Редукција вероцитотоксичне (VTEC) ешерихије, првенствено *E. coli* O157:H7, у оквиру уобичајених поступака индустријске производње сирових ферментисаних кобасица креће се у распону од мање од једне па до четири, просечно 1-2 log јединице, зависно од испитиваног соја, pH вредности, количине соли, нивоа влажности и састава производа али и од производног поступка, односно, температуре ферментације и дужине зрења производа (Rode и сар., 2012; Holck и сар., 2011; Getty и сар., 2000). Ниво редукције *Salmonella* у ферментисаним производима је нешто виши и креће се од 2 до 4,8 log јединица (Porto-Fett и сар., 2010; Porto-Fett и сар., 2008; Nightingale и сар., 2006; Nissen и Holck, 1998; Ihnot и сар., 1998), док је *Listeria monocytogenes* знатно отпорнија у односу на претходна два патогена, са просечним умањењем од око једне log јединице, током ферментације и сушења (Porto-Fett и сар., 2010; Porto-Fett и сар., 2008; Nightingale и сар., 2006; Thevenot и сар., 2005; Pidcock, Heard и Henriksson, 2002; Lahti и сар., 2001; Nissen и Holck, 1998). У појединим истраживањима установљено је да ниво редукције *L. monocytogenes* може бити и знатно виши, чак до 5 log јединица, без обзира на то да ли је у питању производња са или без употребе стартер култура (Џакловица и сар., 2005; Farber и сар., 1993; Bunčić, Paunović и Radišić, 1991).

Епидемиолошка потврда да ферментисане суве кобасице (ФСК) могу проуроковати масовне случајеве болести (Gieraltowski и сар., 2013; Kuhn и сар., 2011, Ethelberg и сар., 2009; Sekse и сар., 2009; Luzzi и сар., 2007; Williams и сар., 2000; Paton и сар., 1996) довела је, у одређеним државама, до промене става о безбедности по јавно здравље дате категорије производа, са последичним увођењем строжијих мера заштите. Служба за инспекцију и безбедност хране САД (Food Safety and Inspection Service - FSIS) и Агенција за инспекцију хране Канаде (Canadian Food Inspection Agency) издали су прописе о увођењу мера којима се повећава степен безбедности, односно, осигурава смањење броја салмонела за 6,5 логаритама и веротоксичне ешерихије (серотип O157 првенствено) за 5 log јединица у редовном поступку производње и складиштења ферментисаних кобасица од свињског, односно, говеђег меса (Anon., 2000; Anon., 2001). У аустралијским и новозеландским прописима (Anon., 2002) тежиште мера усмерено је на примену нових критеријума хигијене улазних сировина и готових



производа, уз обавезну употребу НАССР система и стартер култура у производњи, ради постизања услова за редукцију *E. coli* на нивоу од 3 log јединице. Комисија Европске заједнице (Anon. 2003) сврстала је ферментисане кобасице у производе који могу да угрозе јавно здравље.

Примена строжијих безбедносних критеријума у производњи и промету ФСК подстакла је истраживања о начинима постизања жељених нивоа редукције. Испитани су различити концепцијски приступи за остварење наведеног циља (Kim и сар., 2012; Vesković-Moračanin, 2012; Holck и сар., 2011, Porto-Fett и сар., 2010), као што су:

- примена различитих температура током припреме надева;
- повећање количине кухињске соли и нитрита у надеву;
- комбиновање различитих сојева млечно киселинских бактерија;
- додатно снижавање рН вредности (додавањем шећера или повишењем температуре ферментације);
- додавање антимикуробних материја;
- продужавање ферментације и сушења;
- складиштење готових производа држањем на умереним температурама или уз замрзавање, као додатне мере у оквиру датог производног корака;
- дејство топлотног третмана (пре ферментације, после ферментације или после сушења);
- дејство високог притиска и
- зрачење.

**Температура надева.** Faith и сарадници (1998) су испитивали ниво антимикуробног утицаја температуре током припреме надева ради, евентуалног, додатног смањење нивоа *E. coli* O157:H7. Инокулисани надев подвргнут је: а) уобичајеној температури од + 4°C; б) замрзавању и топљењу и в) температури од + 13°C, са накнадним замрзавањем и топљењем, што је, зависно од примењеног третмана, довело до редукције *E. coli* O157:H7 у готовим кобасицама у првом случају за 1,1 log јединицу, у другом случају за 1,6 log јединица и у трећем случају за 2,1 log јединицу, у односу на почетни ниво патогена од 7,2 log јединице, непосредно након пуњења.

**Производни параметри и рецептура.** Свеобухватна истраживања спроведена су ради утврђивања утицаја појединих производних параметара и/или састојака на сузбијање *E. coli* O157:H7 и других вирулентних сојева у различитим типовима ферментисаних сувих кобасица (табела 2.14). Испитивано је дејство рН вредности (додавањем различите количине шећера), кухињске соли и нитрита, температуре ферментације и обима сушења производа, у виду појединачних мера или у удруженом својству. Установљено је да ниједан антимикуробни чинилац, самостално, не може да оствари предвиђени ниво сигурности производа, односно, редукцију од 5 log јединица. Дејством више чинилаца, примењених на израженијем нивоу, могуће је постићи жељену микробиолошку сигурност али уз негативне последице у погледу квалитета и прихватљивости крајњег производа (Holck и сар., 2011).

**Стартер културе.** Успешност дејства стартер култура на патогене у великој мери зависи од прилагођености на средину у којој се налазе, тако да бактерије одређене културе прилагођене једном типу кобасица не морају да буду прилагођене еколошким условима у другом типу производа (Leroy, Verlayten и De Vuyst, 2006). Због тога је важно да се одговарајућом температуром ферментације, као и осталим чиниоцима у оквиру производног поступка, омогући датој стартер култури да се умножи са почетног нивоа (око  $10^6$ ) до  $10^8$  или  $10^9$  CFU по граму садржаја крајњег производа.

**Табела 2.14.** Ниво редукције *E. coli* O157:H7 на основу измена процеса производње сувих ферментисаних кобасица (преузето од Holck и сар., 2011. и делимично измењено)

Производ/ кобасица	варирају- ћи пара- метри	крајња рН вред- ност	темпера- тура фер- ментаци- је (°C)	редукција патогена (log јединица)	коментар на одабрани сет измена	рефе- ренца
пеперони	рН, NaCl (2,5-4,8%), NaNO <sub>2</sub> (100 - 400 ppm)	4,4-5,6	38	<b>0,67 – 4,79</b> (стандардни услови 0,84)	повећање редук- ције снижавањем рН и повишењем NaCl и NaNO <sub>2</sub>	Riordan и сар., 1998.
лаборато- ријски модел ФСК	NaNO <sub>2</sub> (0 – 300 ppm)	4,7	37	<b>1,5</b> (0 ppm) <b>3,5</b> (300 ppm)	повећање редук- ције за 2 log јединице дода- вањем 300 ppm NaNO <sub>2</sub>	Casey и Condon, 2000.
салама	температу- ра фермен- тације	4,52	26, 31, 35, 42	<b>0,94</b> (26 °C); <b>1,62</b> (31 °C); <b>2,01</b> (35 °C); <b>4,65</b> (42 °C)	повећање ре- дукције услед повишења температуре	Duffy и Vander- linde, 2000.
сува ферменти- сана	температу- ра фермен- тације (20 и 37 °C); сушење (a <sub>w</sub> = 0,91; 0,79)	≤5	20, 37	<2 (a <sub>w</sub> = 0,91) 4-5 (a <sub>w</sub> = 0,79)	повећање редукције код јачег сушења	Naim, Messier, Saucier и Piette, 2003.
суцук	NaNO <sub>3</sub> (0 - 400 ppm); трајање сушења	4,9	18	<b>1,57</b> (13. дан) <b>3,31</b> (21. дан)	ниво нитрита не утиче, док дужина сушења утиче на обим редукције	Apaydin, Ceylan, и Kaya, 2009.
суцук	рН, a <sub>w</sub>	5,2 – 4,6	24	<b>0 – 4,4</b>	повећање редукције снижавањем рН и a <sub>w</sub> вредности??	Hwang и сар., 2009.
салама и мор (норвешки тип ФСК са јагње- ћим месом)	темпера- тура фер- ментације (20–30 °C); NaCl (3%, 5%); NaNO <sub>2</sub> (90, 500 ppm); рН, сојеви патогена	4,6 – 5,2	20, 30	<b>1,5 – 3,0</b>	повећање ре- дукције услед више темпе- ратуре, садржаја NaCl и NaNO <sub>2</sub> и ниже рН; мањи обим редукције код повећања про- мера и садржаја масног ткива	Heir и сар., 2010.

Последица умножавања и метаболичке активности наведених микроорганизама је брз пад рН вредности (током 2 до 3 дана од почетка производње), што спречава умножавање и доводи до редукције евентуално присутних патогена (Holck и сар., 2011; Nissen и Holck, 1998). У циљу израженије, додатне, редукције ентерохеморагичних облика *E. coli* и других патогена, испитане су могућности истовремене примене различитих стартер култура. Pidcock, Heard и Henriksson (2002) су установили да се у случају мађарске саламе којој је додата комерцијална стартер култура (*Pediococcus pentosaceus* и *Staphylococcus xylosus*) заједно са, претходно у анаеробним условима (37°C/48h) умноженим изолатима млечно киселинских бактерија из млечних производа и црева човека (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium lactis*), након 7 дана ферментације остварује редукција *E. coli* O111 и *L. monocytogenes* већа од 2,5 логаритма. Наведени обим редукције преко једног логаритма је виши, у односу на резултате остварене применом само комерцијалне стартер културе. У огледу који су извели Muthukumarasamy и Holley (2007), додавање *Lactobacillus reuteri* комерцијалној стартер култури (*Pediococcus pentosaceus* и *Staphylococcus carnosus*) довело је до редукције од 3 log јединица *E. coli* O157:H7, у односу на 1,7 log јединица, колико је утврђено у контролним кобасицама, док додавање *Bifidobacterium longum* у надеву није имало за последицу значајнију промену нивоа редукције датог патогена, у односу на контролне узорке.

У истраживању групе финских аутора (Erkkila и сар., 2000) испитана је биопротективна могућност пробиотских сојева врсте *Lactobacillus rhamnosus*, при чему је приближно иста редукција *E. coli* O157:H7, са распоном од 2,5 до 3 логаритма, установљена како код узорака са пробиотицима, тако и код контролних кобасица са мешаном комерцијалном стартер културом (*Pediococcus pentosaceus* и *Staphylococcus xylosus*). Испитујући могућност подстицаја израженијег компетитивног својства уобичајених стартер култура према патогенима, Kang и Fung (2000, 1999a) су установили да додавање у надев јона мангана ( $MnSO_4$ ), самостално или са оксиразом (Oxugase<sup>TM</sup>) – биолошки разградивим ензимом који редукује кисеоник у воду, подстиче умножавање културе *Pediococcus acidilactici* и тиме повећава њену способност у погледу редукције *E. coli* O157:H7 и *L. monocytogenes*, у поступку производње саламе. Редукција у односу на узорке који нису садржали наведене супстанце, у случају оба патогена, износила је додатних од 1 до скоро 1,5 логаритама, што је довело до, укупно, око три логаритма редукције, остварене током ферментације наведеног производа.

**Бактериоцини млечно киселинских бактерија.** Антимикробно дејство млечно киселинских бактерија у сировим ферментисаним кобасицама засновано је, првенствено, на производњи млечне киселине и у мањој мери других супстанци (сирћетна киселина, угљен диоксид, етанол, водоник пероксид, диацетил и др.) са последичним закишељавањем садржаја. У оквиру наведене групе микробиота, сојеви родова значајних за ферментацију меса, на различитом нивоу, производе и посебне антимикробне супстанце – бактериоцине, чије дејство је усмерено, првенствено, на Грам + микроорганизмима (Vesković-Moračanin, 2012; Lucke, 2000). Бактериоцини су пептиди, протеини или протеинима слични молекули рибозомалног порекла створени са циљем да спрече раст или униште сродне бактерије (Cotter, Hill и Ross, 2005). На основу аминокиселинског састава и нивоа сложености грађе могу се поделити у четири класе, док је заједничка особина свих да испољавају антимикробно дејство образовањем отвора (пора) на мембрани циљних ћелија, што нарушава концентрациони градијент протонске пумпе и доводи до поремећаја промета материја (Lucke, 2000; Klaenhammer, 1993). Најуспешније делују на врсте микроорганизама са којима се произвођачи бактериоцина такмиче за исте хранљиве материје (Vesković-Moračanin,

2012; de Vuyst и Vandamme, 1994). Чињеница да је антимикуробно дејство бактериоцина често испољено према *L. monocytogenes*, с обзиром на њену филогенетску сродност са млечно киселинским бактеријама, усмерила је истраживања у циљу унапређења микробиолошке безбедности ферментисаних производа од меса (Rocourt и Buchrieser, 2007; Lucke, 2000). Бактериоцини се могу применити у издвојеном и пречишћеном облику или у виду бактериоцин производећих култура. У том смислу, млечно киселинске бактерије које производе бактериоцине а потичу из сирових ферментисаних кобасица као, на пример, *Lactobacillus sakei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *Pediococcus acidilactici* и *Enterococcus faecium* сматрају се најпогоднијим за остварење наведеног циља (Fontana и сар., 2012). На основу бројних истраживања о успешности примене бактериоцин + стартер култура, самостално или у склопу са другим стартер културама (бактериоцин –), установљено је да се у сувим ферментисаним кобасицама може остварити до 3 логаритма додатне редукције *L. monocytogenes*, у односу на резултате добијене поступком производње без примене стартер култура или са применом култура које не поседују изражено антилистеријално дејство (Ravyts и сар., 2008; Benkerroum и сар., 2005; Koch, 2004; Hugas и сар., 2002; Lahti и сар., 2001; Callewaert, Hugas и Vuyst, 2000). Изузетак су резултати истраживања Ćaklovice и сар. (2005) где је примена бактериоциногенних сојева *Lactobacillus sakei* у производњи ферментисаних кобасица традиционалног порекла довела до редукције *L. monocytogenes* од преко 3 логаритма, у односу на узорке произведене без стартер култура. Употреба пречишћених или полупречишћених изолата бактериоцина, као готових биопрезерватива, показала се мање успешном, као начин заштите, услед њихове слабе растворљивости, везивања за друге састојке хране и разградње под дејством ензима из мишићног и масног ткива. Поред тога, већа је и могућност стицања отпорности код патогена, услед чега се даје предност бактериоциногеним културама способним да производе довољне количине бактериоцина током читавог поступка производње (Drosinos и сар., 2009; Vignolo и Fadda, 2007; Koch, 2004).

**Антимикуробне супстанце.** Примена антимикуробних материја природног порекла у производњи ферментисаних сувих кобасица у складу је са све израженијом тежњом потрошача ка исхрани минимално технолошки обрађеним производима (Payne, Oliver и Davidson, 1994). Диацетил је важан састојак укуса у производима од млека који поседује и одређена антимикуробна својства, као што је снижавање нивоа искориштавања аргинина, што утиче неповољно на умножавање одређених Грам – врста бактерија (Jay, 1982). Испитивањем могућности употребе наведене супстанце у производњи ферментисаних кобасица Kang и Fung (1999b) су установили да концентрација од 300 ppm редукује *E. coli* O157 и *Salmonella* Typhimurium за један логаритам више у односу на контролне узорке, без значајнијег утицаја на популацију млечно киселинских бактерија. Al-Nabulsi и Holley (2007) су употребили лактоферин из млека као антимикуробно средство у производњи сувих ферментисаних кобасица и установили да се може постићи редукција *E. coli* O157 до 3 log јединице, током ферментације и сушења, без штетног утицаја на популацију стартер култура. Као ограничење у примени датог средства наводи се узак спектар деловања, изражен само према појединим сојевима *E. coli* O157 и претежно бактериостатско дејство. Chason, Muthukumarasamy и Holley (2006) су испитивали ниво редукције *E. coli* O157:H7 у ферментисаним кобасицама које су садржале различите нивое алил изотиоцијаната, супстанце присутне у слачици, хрену и другим врстама биљака, нарочито из породице купусњача (Brassicaceae). При концентрацији примењене супстанце од 500 ppm, након 28. дана производног поступка, редукција патогена износила је 4,75 log јединица у производима чије су сензорне особине оцењене као прихватљиве. Због изузетно оштрог

мириса и љутог укуса алил изотиоцијаната, испитивана је и могућност његове замене самлевоном и топлотно обрађеном белом или смеђом слачицом, које у датом облику не поседују наведену супстанцу. Као резултат истраживања установљено је да је за редукцију *E. coli* O157:H7 од 5 логаритама неопходна количина поменутих врста зачина на нивоу који, такође, неповољно утиче на сензорне одлике крајњег производа, услед повишења нивоа других састојака пореклом из наведених биљака (Li, Aliani и Holley, 2013; Luciano, Belland и Holley, 2011; Graumann и Holley, 2008).

**Редукција током складиштења готових ферментисаних кобасица.** Након достизања жељеног нивоа сувоће ферментисане суве кобасице се складиште, са роком употребе од неколико месеци. Током складиштења дејство антимикуробних чинилаца се наставља, што пружа могућност додатне редукције патогена. Према истраживању Rode и сар. (2012), које је обухватило два типа норвешких ФСК, установљено је да се обим редукције ентерохеморагичних сојева *E. coli* може повећати са порастом температуре, односно, да опада следећим редоследом: (+20 °C > +16 °C > +4 °C), док дужина трајања складиштења, такође, утиче на повећање обима редукције (60 дана > 30 дана), код вакуум упакованих производа. Исто истраживање је показало да, уколико се пре складиштења кобасице подвргну замрзавању на -18 °C, у трајању од једног дана, редукција се може повећати за, додатних, око 0,9 логаритама. Највиша укупна вредност редукције наведених патогена, добијена је комбинацијом услова складиштења: замрзавање - 24h/ складиштење - 1 месец на +20 °C и износила је око 4 логаритма, не рачунајући редукцију остварену, претходно, током ферментације и сушења. Потребно је напоменути да аутори нису испитивали сензорне одлике тако складиштених производа. У ранијем истраживању, Faith и сар. (1997) су установили да температура у већој мери утиче на обим редукције *E. coli* O157:H7, у односу на састав атмосфере унутар паковања. Утврђено је да је редукција патогена код нарезаних ФСК, након две недеље држања на температури од +21 °C, износила је 3,8, односно, 2 логаритма, зависно да ли су производи били упаковани са ваздухом или у условима вакуума, док је 28. дана ниво опадања износио 4 - 5 логаритама, код оба вида паковања. С друге стране, у кобасицама држаним три месеца на +4 °C и -20 °C, ниво редукције није био виши од 2,3 логаритма, без обзира на то да ли су производи били упаковани са ваздухом, под вакуумом или у атмосфери са угљен диоксидом. У раду Nissen-a и Holck-a (1998) уочена је мала али статистички значајна разлика, у смислу бољег преживљавања *E. coli* O157:H7 на +4 °C у односу на +20 °C, при складиштењу вакуум упакованих норвешких СФК од јагњећег меса, током 25 дана, док након 4 месеца држања, у оба случаја, патогени више нису били установљени. Када је у питању *Salmonella* Kentucky, исто истраживање је показало да је после 25 дана ниво наведеног патогена био за скоро логаритам виши код производа складиштених на + 4 °C, у односу на исте држане на +20 °C. Као и код *E. coli* O157:H7, ниво *S. Kentucky* након 4 месеца био је испод границе детекције, код обе температуре складиштења. У случају *L. monocytogenes*, пад броја патогена 25. дана био је незнатан и није се значајније разликовао зависно од температуре, али је после 4 месеца на +21 °C ниво опао испод границе детекције, док је за исто време при температури од +4 °C број готово остао исти, односно, снижен је за само 0,2 log јединице. У раду од Innot и сар., (1998) који је обухватио складиштење пеперони ФСК под вакуумом, након 56 дана на +4 °C, редукција *S. Typhimurium* је износила 1,7 логаритама, док је у истом периоду, у кобасицама држаним на температури од +20 °C, редукција патогена износила додатних два логаритма више, не узимајући у обзир вредност остварену током производног поступка. Porto-Fett и сар. (2008), су испитивали обим редукције *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* и *L. monocytogenes* инокулисаних у надев експериментално произведеног суцука са нижом и

вишом рН вредности ферментације (тип 1 = 4,8; тип 2 = 5,3), који је, затим, складиштен на различитим температурама (+4 °C, +10 °C, +21 °C), под вакумом, у трајању од месец дана. Укупно гледано, ниво редукције код сва три патогена био је виши са порастом температуре складиштења и нижом рН вредности производа. Када је у питању ниво преживљавања међу врстама, најотпорнијом се показала *L. monocytogenes*, док је *S. Typhimurium* била најосетљивија. Максималне вредности редукције остварене су при комбинацији: рН = 4,8/Т = 21 °C/т = 30 дана и износиле су 2,5; 3,5 и преко 5 логаритама за *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 и *S. Typhimurium*, наведеним редом. У истом раду је испитивано и преживљавање патогена након њихове инокулације на површину нарезаних готових кобасица, у циљу симулације постпроцесне контаминације, при чему је ниво опадања, код све три врсте микроорганизама, укупно гледано, био мање изражен у односу на вредности добијене у случају када је надев био инокулисан. Површински начин контаминације насечених комада пеперони кобасице испитиван је и у раду Вјелаšова и сар. (2009), где је 10 сојева *L. monocytogenes* узгајано на три начина ради добијања три облика културе од сваког соја: 1. прилагођен на киселу средину, 2. неприлагођен на киселу средину и 3. прилагођен на услове у пеперони ФСК. Вакум упаковани, инокулисани наресци ФСК складиштени су на + 4 °C, + 12 °C и + 25 °C током 180 дана трајања огледа. Зависно од особине инокулума, брзина опадања броја патогена у кобасицама се снижавала по следећем редоследу: патогени прилагођени на киселу средину > прилагођени на услове у пеперони ФСК > неприлагођени на киселу средину. Када је у питању температура складиштења, опадање броја *L. monocytogenes* је било знатно мање изражено на +4 °C, у односу на преостале две температуре, код којих је стопа опадања била на приближно истом нивоу. После 60. дана ниво патогена био је испод границе детекције (- 0,48 log CFU/cm<sup>2</sup>), без обзира на температуру складиштења и облик инокулума.

**Зрачење.** Могућности примене зрачења у безбедности хране испитују се већ неколико деценија али без шире употребе у индустријској производњи, услед низа разлога међу којима је и слаба прихватљивост код потрошача, с обзиром на чињеницу да такви производи морају да буду декларисани као озрачени (Sofos, 2014; Chen и сар., 2012). Када су у питању суве ферментисане кобасице, објављено је неколико радова у којима је потврђено да дозе јонозујућег зрачења, неопходне за редукцију патогена до жељеног нивоа микробиолошке безбедности ( $\leq 3$  kGy), не нарушавају, значајније, сензорна својства и употребљивост дате категорије производа. Међу штетним утицајима, који се могу испољити услед јачег нивоа зрачења ( $\geq 4$  kGy) наводе се: спречавање развоја технолошки корисних микробиота (приликом зрачења основних сировина), оксидационе промене са стварањем слободних радикала и разградња беланчевина, што у збиру доводи до промене чулних својстава, квалитета и одрживости сувих ферментисаних кобасица (Kim и сар., 2012; Cabeza и сар., 2009; Chouliara и сар., 2006; Samelis и сар., 2005; Johnson и сар., 2000).

**Висок притисак.** Обрада хране високим притиском омогућава да се без примене топлоте повећа ниво безбедности, уз истовремено очување изворних својства и квалитета производа (Hugas, Garriga и Monfort, 2002). Антимикробно дејство високог притиска остварује се сажимањем средине што доводи до различитих поремећаја у ћелијама микроорганизама, нарочито на нивоу просторног распореда великих молекула, при чему се сматра да нарушавање цитоплазмине мембране има највећи значај. Успешност дејства наведене методе зависи од особина микроорганизама, њиховог физиолошког стања, јачине и дужине дејства силе притиска, као и састава, температуре, рН и  $a_w$  вредности хране. С тим у вези, редукција патогена под дејством

високог притиска (50-1000 МПа) из наведених разлога је мање је успешна у производима богатим хранљивим материјама (беланчевине, масти, шећери, витамини) и са нижим садржајем воде (Campus, 2010; Considine и сар., 2008). Garriga и сар. (2005) су испитивали утицај притиска од 400 МПа (17 °C/10 min.) на микробиолошка и сензорна својства код два типа шпанских благо ферментисаних производа, након ферментације и сушења. Као резултат примењеног притиска, аутори наводе да је укупна микробиолошка сигурност и одрживост унапређена, односно, изостало је умножавање *L. monocytogenes*, док инокулисана *S. Typhimurium* није детектована. У другом раду исте групе истраживача (Marcos, Aymerich и Garriga, 2005) надев за кобасице инокулисан је различитим сојевима *Salmonella* и *L. monocytogenes* и непосредно након пуњења кобасице су подвргнуте нешто нижем притиску (300 МПа). Као последица збирног дејства притиска, ферментације и сушења број салмонела био је за око 1,5 log јединицу нижи у односу на контролне (нетретиране) кобасице. Супротно томе, број листерија се смањило непосредно након третмана, да би на крају производног поступка био за око 2 логаритма виши у односу на вредности у контролним узорцима. Према ауторима, разлог појаве је привремени и превремени пад броја млечно киселинских бактерија, услед дејства високог притиска, што је успорило снижавање рН вредности и стварање антилистеријалних производа и омогућило опоравак оштећених патогена. Поред тога, кобасице подвргнуте високом притиску имале су слабије изражену црвену боју, при чему се као разлог наводи нарушавање терцијарне и кватерарне (просторне) грађе миоглобина. Према Omer-и и сар., (2015), уколико се обресци за производњу кобасица изложе притиску од 600 МПа, остварује се бољи хигијенски статус крајњих, третираних, у односу на контролне, нетретиране, узорке али уз последично смањење квалитета у погледу боје, мириса, укуса, текстуре и укупне прихватљивости таквих производа.

Испитивање успешности редукације ентерохеморагичних сојева *E. coli* спроведено је на више врста ферментисаних кобасица, при чему су све излагане дејству високог притиска након завршетка ферментације и сушења. У раду Omer-а и сар. (2010), ниво редукације у норвешким ФСК се кретао од 2,9 до 3,3 логаритма, док су Gill и Ramaswamy (2008), користећи исту јачину дејства (600 МПа) постигли смањење од преко 4 логаритма, не рачунајући редукацију остварену, претходно, током производног поступка. Потребно је напоменути да су Gill и Ramaswamy (2008) испитивали полусуве ферментисане кобасице ( $a_w = 0,927 - 0,968$ ), које су, након третмана, додатно складиштили током 4. недеље на +4 °C. Том приликом је у говеђој салами дошло до извесног пораста броја преосталих патогена, док је број истих остао непоромењен у мађарској салами, због ниже рН и  $a_w$  вредности датог производа. У случају оба испитивања, висок притисак није проузроковао значајније промене сензорних својстава производа. У свеобухватном истраживању Porto-Fett и сар., (2010), испитана је успешност дејства високог притиска од 483 МПа (1, 2, 3, 4 и 5 минута) и 600 МПа (5, 7, 10 и 12 минута), удружена са последичним складиштењем на +4 °C у трајању од 28 дана, на ђеновску ФСК, инокулисану *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 или *S. Typhimurium*. Број *L. monocytogenes* смањен је за, додатних, 1,6 до  $\geq 5$  логаритама, док је редукација *E. coli* O157:H7 износила најмање 4,7 log јединица односно, 1,9 log јединица за *S. Typhimurium*., без обзира на јачину и дужину дејства високог притиска. Потребно је напоменути да је ниво редукације остварен комбиновањем високог притиска и складиштења, у случају сва три патогена, био условљен бројем присутних ћелија у готовим кобасицама, које су, претходно, преживеле поступак ферментације и сушења.

### 2.5.1 Топлотна обрада

Општи став је да примена топлоте представља најуспешнији начин редукације патогена али са могућим нарушавањем изворних сензорних својстава и квалитета ферментисаних производа (Rode и сар., 2012; McQuestin и сар., 2009; Chacon и сар., 2006). Када су у питању суве ферментисане кобасице, примена топлоте може да се оствари у различитим фазама производног поступка, односно, пре почетка ферментације, након завршетка ферментације и након завршетка сушења.

**Пре ферментације.** У истраживању Благојевића и сар. (2015) испитана је деконтаминација месних обрезака, потапањем у 4% водени раствор млечне киселине, загрејане на температуру од 80 °C до 90°C, са применом третмана у трајању од 10 до 30 секунди. Као резултат, број *E. coli* O157 и *Salmonella* Typhimurium смањен је за 3,6 до 3,9 логаритама у укупном смислу, рачунајући и редукацију остварену током производног поступка, која је износила 1,7 до 1,9 log јединица. С друге стране, топлотном обрадом месних обрезака постигнута је минимална редукација *L. monocytogenes* од 0,2 до 0,3 log јединице, при чему и сам поступак производње (ферментација и сушење) у контролним кобасицама, такође, није довео до значајнијег пада броја наведеног патогена. Потребно је напоменути да су кобасице произведене од топлотно обрађених обрезака биле умерено до значајно слабије оцењене у погледу сензорних одлика, у односу на контролне узорке, што је зависило од температурно временске комбинације примењених третмана.

**После ферментације.** Као одговор на појаву епидемију болести изазване *E. coli* O157:H7 у САД проузроковане саламом (1994), деведесетих година прошлог века спроведено је више истраживања о умереној топлотној обради кобасица, након поступка ферментације, чија примена не би довела до значајнијег нарушавања основних сензорних својстава производа. Америчко тело за безбедност и инспекцију хране - FSIS, објединило је резултате наведених истраживања са претходним сазнањима о термалној редукацији салмонела у производима од меса спремним за јело и издало јединствено упутство намењено за произвођаче (Anon., 2001). Предлози о начинима топлотне обраде, након ферментације, наведени су у табели 2.15 и могу се применити у производњи свих типова полусувих и сувих ферментисаних кобасица.

Уколико је циљ остварење редукације на нивоу од  $\geq 5$  логаритама, које се односи само на *E. coli* O157:H7, изнете су следеће препоруке у табели 2.16; док је у табели 2.17 наведен низ могућности за постизање обима редукације већег од два а мањег од 5 логаритама, чија примена је могућа уколико постоји план узорковања којим се обезбеђује да наведени патоген није установљен у сировом материјалу.

У датом документу, као додатна могућност, наведени су и поступци топлотне обраде који се могу применити само за одређени тип ферментисаних кобасица (сузук, пеперони), у циљу редукације *E. coli* O157:H7 на нивоу од  $\geq 5$  логаритама, без значајнијег нарушавања чулних својстава производа (Calicioglu и сар., 2001; Hinkens и сар., 1996).

Riordan и сар. (2000) су, такође, испитивали могућност топлотне обраде пеперони ФСК, након завршетка ферментације и установили су да је, када је у питању иста температура, потребно дуже време за постизање редукације *E. coli* O157:H7 на нивоу од 5 логаритама, у односу на вредности препоручене од FSIS-а. Као објашњење појаве одступања у резултатима аутори су навели разлике у саставу и начину производње кобасица али и одсуство корака за опоравак топлотно оштећених патогена



(засејавање узорака на неселективну подлогу – триптон соја агар, са накнадним преливањем селективном подлогом – XLD агар), што је био случај у претходним истраживањима.

**Табела 2.15.** Валидовани поступци загревања ферментисаних кобасица који редукују број салмонела у производу за 6,5 и 7 log јединица (FSIS, 2001)

Најнижа температура у средини производа (°C)	Најкраће време обраде у минутима након достизања најниже температуре у средини производа		Најнижа температура у средини производа (°C)	Најкраће време обраде у секундама након достизања најниже температуре у средини производа	
	6,5 log јединица редукација	7 log јединица редукација		6,5 log јединица редукација	7 log јединица редукација
54,4	112	121	63,3	169	182
55	89	97	63,9	134	144
55,6	71	77	64,4	107	115
56,1	56	62	65	85	91
56,7	45	47	65,6	67	72
57,2	36	37	66,1	54	58
57,8	28	32	66,7	43	46
58,4	23	24	67,2	34	37
58,9	18	19	67,8	27	29
59,5	15	15	68,3	22	23
60	12	12	68,9	17	19
60,6	9	10	69,4	14	15
61,1	8	8	70	0	0
61,7	6	6	70,6	0	0
62,2	5	5	71,1	0	0
62,8	4	4			

**Табела 2.16.** Валидовани поступци загревања ферментисаних кобасица који доводе до редукације од 5 log јединица *E. coli* O157:H7 (FSIS, 2001)

Температура ферментације °C	pH након ферментације	Топлотна обрада	Промер омотача
21,1	> 5,0	А	Мали
32,2	≤ 4.6	Б	Мали
32,2	≤ 4.6	А	Мали
32,2	≤ 4.6	А	Велики
32,2	> 5,0	А	Велики
43,3	≤ 4.6	Б	Мали
43,3	≤ 4.6	Б	Велики
43,3	> 5,0	Б	Велики

А - Мали омотач (55 mm) – 1 сат на 37,8 °C а затим 6 сати на 51,7 °C; Велики омотач (105 mm) - 1 сат на 37,8 °C, 1 сат на 43,3 °C, 1 сат на 48,9 °C и 7 сати на 51,7 °C;  
 Б - Држати на назначеној температури ферментације најмање 7 дана

**Табела 2.17.** Валидовани поступци загревања ферментисаних кобасица који доводе до редукације веће од 2, а мање од 5 log јединица *E. coli* O157:H7 (FSIS, 2001)

Температура ферментације °C	pH након ферментације	Топлотна обрада	Промер омотача
21,1	> 5,0	А	Велики
32,2	≤ 4,6	Б	Велики
32,2	> 5,0	Б	Велики
43,3	> 5,0	Б	Мали

А - Мали омотач (55 mm) – 1 сат на 37,8 °C а затим 6 сати на 51,7 °C; Велики омотач (105 mm) - 1 сат на 37,8 °C, 1 сат на 43,3 °C, 1 сат на 48,9 °C и 7 сати на 51,7 °C;  
 Б - Држати на назначеној температури ферментације најмање 7 дана

Glass и Doyle (1989) су испитивали могућност инактивације *Listeria monocytogenes* топлотном обрадом у пеперони кобасицама, при чему су установили да је за остварење редукације од једног логаритма неопходно загревање датих производа, након ферментације, до постизања температуре од 51,7 °C. Редукација се може повећати на два логаритма, уколико се исте кобасице држе још додатна 4 часа, на наведеној температури.

**После сушења.** Поменути аутори (Glass и Doyle, 1989), у истом истраживању, загревали су пеперони кобасице након 26 дана сушења, при чему је примена температуре од 51,7 °C у трајању од 4 часа довела до приближно истог обима редукације *L. monocytogenes*, оствареног као и у случају загревања кобасица после ферментације.

Аустралијски истраживачи Shay и Souness (1995) испитивали су могућност редукације салмонела топлотном обрадом саламе, након завршетка производног поступка. Загревањем готових производа на 55 °C у комори са температуром ваздуха од 65 °C и релативном влажношћу ваздуха (РВВ) од 90%, остварена је редукација наведеног патогена до нивоа од 5 логаритама, без нарушавања сензорних својстава производа. При том, појава изласка масти на површину кобасица потпуно је изостала. Штавише, према оцени сензорне комисије одлике топлотно обрађених узорака биле су, укупно гледано, боље у односу на контролне узорке. Аутори су нагласили, међутим, да се резултати односе само на кобасице чија је pH вредност, употребом стартер култура, била мања од 5 већ након 24 часа од почетка ферментације.

С друге стране, Johnson и сар. (2000) наводе да су пеперони подвргнути загревању на 60 °C, у комори са температуром ваздуха од 70 °C и РВВ од 85%, имали значајно слабију текстуру и боју, у поређењу са контролним узорцима.

Група норвешких аутора објавила је радове (Heig и сар., 2013; Rode и сар., 2012) у којима је наведено да држање норвешких ФСК у инкубатору загрејаном на 43 °C, током 24 часа, има за последицу редукацију ентерохеморагичних сојева *E. coli* у распону од 2 до 4 log јединице, при чему сензорна својства обрађених производа остају иста или су нешто слабија у односу на контролне узорке. Исти аутори напомињу да је укупна прихватљивост третираних кобасица након 6 недеља складиштења на + 4 °C, у вакум паковањима, унапређена, тако да је резултат оцењивања био исти или чак бољи у односу на контролне кобасице, складиштене под истим условима а које су стартно биле једнако или нешто боље оцењене.

### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Истраживање за потребе докторске дисертације спроведено је у две јасно одвојене фазе због чега је ради прегледности поглавље изнето у два одвојена дела.

#### 3.1. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ 1. ФАЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

У првој фази направљен је пресек стања главних одлика сувих ферментисаних кобасица од свињског и говеђег меса у Србији (сремска кобасица и суџук) израђених у комерцијалним индустријским условима.

##### 3.1.1. Материјал

Истраживање је спроведено у пет индустријских кланица на подручју северног дела Србије. Испитана су два типа сувих ферментисаних кобасица: а) од свињског меса (сремска кобасица; у кланицама А, Б и В) и од говеђег меса (суџук; у кланицама А, Г и Д). Састав производа са параметрима ферментације и сушења наведени су у табели 3.1 и табели 3.2. Све кобасице су произведене без употребе стартер култура. За производњу сремске кобасице коришћена су свињска црева (Ø 32-36 mm) док су за суџук коришћени колагени омотачи (Ø 38-42 mm, Koteks Viscofan, Novi Sad, Srbija), изузев произвођача Д који је за ту сврху користио свињска црева.

Узорци су узимани у следећим тачкама поступка производње:

- а) месни обресци; произвођачи А, В и Г су користили комаде делимично отопљеног а произвођач Б и охлађеног, незамрзаваног, свињског меса, док је произвођач Д користио само охлађено, незамрзавано, говеђе месо;
- б) уситњено месо и масно ткиво;
- в) надев пре пуњења у омотаче (месо + масно ткиво +зачини +адитиви) и
- г) кобасице непосредно након пуњења,
- д) средњег, тј. 7. дана и
- ђ) последњег, тј. 15. дана производње.

У сврху микробиолошког испитивања, са сваке тачке производног поступка узето је по шест узорака, односно, 216 укупно. За физичко-хемијску анализу узорковано је по шест кобасица непосредно након пуњења, као и средњег и последњег дана производње, односно, 108 узорака укупно. Сваки узорак је стављен у засебну стомахер кесу (Nasco Whirl-pack; Fort Atkinson, USA) и пренет у хладном ланцу до лабораторије (у ручном фрижидеру, у року од сат времена).

Табела 3.1. Сировински састав сувих ферментисаних кобасица

Састав	Сремска кобасица			Суџук		
	Произвођач					
	А	Б	В	А	Г	Д
месни обресци	65 kg	65 kg	65 kg	60 kg	60 kg	82 kg
масно ткиво	30 kg	30 kg	30 kg	35 kg	35 kg	15 kg
зачинске смеше (удео појединих биљака специфичан за одређеног произвођача)	2,5 kg (састав: слатка па- прика, љута пап- прика, ко- ријандер, бели лук, црни би- бер)	2,5 kg (састав: слатка паприка, љута пап- прика, ко- ријандер, бели лук, бибер)	0,7 kg (састав: слатка паприка, љута паприка, коријан- дер, бели лук, бибер)	2 kg (састав: слатка паприка, љута паприка, црни лук, бели бибер, слачица, мајоран, ким, босиљак, рузмарин)	0,5 kg (састав: љута паприка, црни бибер, коријан- дер, куркума)	0,4 kg (састав: бели лук, бели бибер, целер)
NaCl – NaNO <sub>2</sub> смеша (99,5:0,5)	2,5 kg	2,6 kg	2,5 kg	2,4 kg	2,6 kg	2,2 kg
декстроза	0	0,5 kg	0,35 kg	0	0	0,3 kg
TARI S77*	1 kg	1 kg	0,6 kg	1,2 kg	1 kg	0

TARI S77\* – глюконо делта лактон 42,5%, шећери 42,5%, NaCl 12,5%, Na-изоаскорбат 2,5%.

Табела 3.2. Параметри производње сувих ферментисаних кобасица

дан	Сремска кобасица						Суџук					
	Произвођач											
	А		Б		В		А		Г		Д	
Т*	РВ**	Т	РВ	Т	РВ	Т	РВ	Т	РВ	Т	РВ	
0	24	93	22	98	24	93	24	93	20	90	20	88
1	24	87	18	92	24	87	24	87	18	88	18	84
2	22	84	18	88	22	84	22	84	18	86	18	80
3	19	82	18	86	19	82	19	82	18	84	18	80
4	15	77	17	84	15	77	15	77	18	82	17	78
5	14	75	17	80	14	75	14	75	18	68	17	78
6	14	75	16	70	14	75	14	75	16	68	17	78
7	12	75	16	70	12	75	12	75	16	68	16	75
8 - 14	12	75	16	70	12	75	12	75	16	68	15	75

Т\* - температура (°C); РВ\*\* - релативна влажност ваздуха (%)

### **3.1.2 Методе микробиолошке и физичко-хемијске анализе**

#### **3.1.2.1 Припрема разређења**

Код узорака кобасица омотачи су уклоњени стерилним инструментима. Из сваког узорка, осим месних обрезака, узето је по 25 g и додато у 225 ml раствора за опоравак микроорганизама (Maximum Recovery Diluent - MRD; Oxoid, Hampshire, UK) у стомакер кесу са филтером (Nasco Whirl-pack; USA) и хомогенизовано стомакером (easyMIX, bioMerieux; Lyon, France) у трајању од два минута. Сва даља разблажења остварена су пребацавањем по 1 ml запремине аликвота у низ децималних разређења у MRD раствору, у складу са стандардном методом за припрему узорака (SRPS EN ISO 6887-1:2008). Када су у питању месни обресци, у стомакер кесе са узорцима масе око 500 g додато је око 500 ml MRD раствора (масени однос 1:1) и затим је садржај ручно масиран у трајању од пет минута ради испирања површине меса. Након припреме основног разређења, даља разређивања су спроведена у складу са претходно наведеном стандардном ISO методом.

#### **3.1.2.2 Одређивање укупног броја аероба (ACC)**

По 1 ml одговарајућих разређења узорка разливен је на петрифилмове за одређивање укупног броја аероба (Aerobic Count Plate Petrifilms; 3M Health Care, St. Paul, USA). Петрифилмови су, затим, инкубирани на 30 °C у трајању од 72 часа, након чега су избројане колоније (AFNOR валидовани метод 3M 01/1 - 09/89).

#### **3.1.2.3. Одређивање броја *Enterobacteriaceae* (EBC)**

По 1 ml основног разређења или његовог одговарајућег разређења разливен је на петрифилм за одређивање броја ентеробактерија (*Enterobacteriaceae* Count Plates Petrifilms; 3M Health Care, St. Paul, USA). Петрифилмови су, затим, инкубирани на 37 °C у трајању од 24 часа, након чега су избројане типичне колоније (AFNOR валидовани метод 3M 01/06 09/97).

#### **3.1.2.4. Одређивање броја *E. coli* (ECC)**

По 1 ml основног разређења или његовог одговарајућег разређења разливен је на петрифилм за одређивање броја *E. coli* и колиформних бактерија (*E. coli*/Coliform Count Plate, 3M Health Care, St. Paul, USA). Петрифилмови су, затим, инкубирани на 37 °C у трајању од 48 часова, након чега су избројане типичне колоније (NordVal валидовани метод 3M 014 -11).

#### **3.1.2.5. Одређивање броја млечнокиселинских бактерија (LAB)**

Након основног и почетних разређења припремљених у MRD раствору, даљи низ децималних разблажења је припремљен у MRS бујону (Oxoid, Basingstoke, UK) па је по 1 ml одговарајућих разређења разливен на петрифилм намењен одређивању броја аероба (Aerobic Count Plate Petrifilms; 3M Health Care, St. Paul, USA). Засејане подлоге

су инкубиране у анаеробном лонцу под микроаерофилним условима при температури од 37 °C, у трајању од 48 часова а за успешно везивање молекуларног кисеоника коришћен је Анаерocult C<sup>®</sup> (Merck, Darmstadt, Germany); након инкубације избројане су типичне колоније.

### **3.1.2.6. Изражавање резултата одређивања броја појединих група микроорганизама**

За изражавање резултата приликом одређивања броја микроорганизама, као и одређивања броја свих наведених физиолошких група бактерија примењен је стандард SRPS EN ISO 7218:2008.

### **3.1.2.7. Откривање *Escherichia coli* O157 у суцуку**

Од сваког узорка узето је по 25 g и додато у 225 ml селективног бујона за обогаћење - mEC with Novobiocin (Merck, Darmstadt, Germany), који је, затим, инкубиран на 37 °C, у току 24 часа. Утврђивање присуства *E. coli* серотипа O157 извршено је брзим имунохроматографским тестом Singlepath<sup>®</sup> *E. coli* O157, према упутству произвођача (Merck, Germany). Тест је AOAC валидован (www.aoac.org; License Number, 010407) са границом детекције од 1 CFU/25 g узорка, док су сензитивност и специфичност веће од 99%.

### **3.1.2.8. Откривање *Salmonella* spp. у сремској кобасици**

До биохемијског потврђивања суспектних колонија испоштвана је процедура стандарда SRPS EN ISO 6579:2008, а све коришћене подлоге биле су од произвођача Oхoid (Basingstoke, UK). Као друга чврста селективна подлога, поред XLD, коришћен је брилијант зелени агар од истог произвођача. Суспектне колоније су пречишћене на хранљивом агару (Merck, Darmstadt, Germany) инкубираном 24 h на 37 °C. Идентификација је извршена применом Vitek<sup>®</sup> 2 Compact уређаја (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France), а серолошка потврда помоћу „poly O somatic“ антисерума (Pro-Lab Diagnostics, Toronto, Canada).

### **3.1.2.9. Физичко-хемијске и хемијске анализе**

#### **Одређивање рН вредности.**

Мерење рН вредности кобасица извршено је према референтној методи SRPS ISO 2917:2004, ручним рН метром (Testo 205; Lenzkirh, Germany), опремљеним уводном стакленом електродом за непосредно одређивање рН вредности у месу и производима од меса.

#### **Одређивање $a_w$ вредности.**

Мерење активност воде ( $a_w$ ) у кобасицама извршено је преносивим уређајем (LabSwift –  $a_w$ ) опремљеним сондом за мерење  $a_w$  вредности (Novasina, Lachen, Switzerland) по процедури произвођача која је потпуно испоштвала захтеве стандарда ISO 21807:2004.

<b>Садржај воде.</b>	Садржај воде у кобасицама је одређен референтном методом SRPS ISO 1442:1998.
<b>Садржај масти.</b>	Садржај масти у кобасицама одређен је референтном методом SRPS ISO 1443:1992.
<b>Садржај беланчевина.</b>	Садржај беланчевина у кобасицама одређен је на основу садржаја укупног азота, одређеног референтном методом SRP ISO 937:1992.
<b>Садржај NaCl.</b>	Садржај кухињске соли у кобасицама одређен је помоћу референтне методе за одређивање садржаја хлорида - SRPS ISO 1841-1:1999.
<b>Садржај укупног пепела.</b>	Садржај укупног пепела у кобасицама је одређен референтном методом SRPS ISO 936:1999.
<b>Садржај NaNO<sub>2</sub></b>	Садржај нитрита у кобасицама је одређен референтном методом SRPS ISO 2918:1999

### 3.2. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ 2. ФАЗЕ ИСТРАЖИВАЊА

У другој фази истраживања испитивана је редуција најзначајнијих алиментарних патогена током производње и складиштења типичних ферментисаних кобасица у Србији, као и дејство одговарајућих термичких третмана на готове производе у циљу елиминације патогена. У ту сврху израђене су лабораторијски инокулисане кобасице од свињског (сремска) и говеђег меса (суцук).

#### 3.2.1 Припрема лабораторијских кобасица

Састав производа са параметрима ферментације и сушења наведени су у табели 3.3 и табели 3.4. Све кобасице су произведене без употребе стартер култура.

**Табела 3.3.** Сировински састав лабораторијски произведених сувих ферментисаних кобасица

Састав	сремска	суцук
месни обресци	65 kg	65 kg
масно ткиво	30 kg	30 kg
зачинска смеша	2,5 kg	0,5 kg
смеша NaCl – NaNO <sub>2</sub> (99,5:0,5)	2,5 kg	2,5 kg
декстроза	0,2 kg	0,2 kg
TARI S77*	0,6 kg	0,6 kg

Поступак производње сремске кобасице и суцука у лабораторијским условима је изведен у основи на исти начин. У индустријском погону замрзнути месни обресци и масно ткиво су делимично отопљени и самлевени у кутеру, до промера честица од око 5 mm а затим је смеша транспортована у хладном ланцу до универзитетске лабораторије и складиштена на хладном, тј. на +2 °С. Следећег дана, смеша је подељена на три дела. Први део је искоришћен за припрему контролних кобасица а процес је био следећи: смеша је пребачена у мешалицу (RM20R, Mainca, Horton, UK) и након додавања адитива (TARI S77\*) мешана је 2 минута а затим су додати зачини са мешавином кухињске и нитритне соли, након чега је надев мешан још 2 минута. Садржај мешалице је пребачен у ручну пунилицу (FM 10, Mainca; Granollers, Spain) па је надев за сремску кобасицу напуњен у природна свињска црева (Ø 32-34 mm; CDS, Crailsheim, Germany), а за суцук у колагене омотаче (Ø 36 mm; Koteks Viscofan, Novi Sad, Србија). Након израде кобасице су цеђене 4-5 сати на собној температури а потом су пребачене у комору за ферментацију и сушење (Stagionello; STG 100 MTF; Crotone, Italy). Током ферментације и сушења кобасице су димљене брикетима по два сата дневно, од трећег до петог дана производње, а на крају производног поступка (15. дана) су вакуум упаковане и ускладиштене на +4 °С.

Други и трећи део смеше је, након пребацивања у мешалицу, инокулисан одабраним сојевима патогена, помоћу аеросол пумпе, уз истовремено мешање у мешалици у трајању од 10 минута. Део сировина намењен за сремску кобасицу инокулисан је коктелом изолата *S. Typhimurium* и *L. monocytogenes* а за суцук коктелом изолата *E. coli* O157 и *L. monocytogenes*. Након уношења патогена поступак припреме инокулисаних кобасица био је идентичан са припремом контролних. На крају сушења део инокулисаних кобасица је у вакууму упакован и ускладиштен на +4 °С, а део је коришћен за термичке третмане.

**Табела 3.4.** Параметри производње лабораторијски произведених сувих ферментисаних кобасица

Дан процеса	Услови поступка ферментације и сушења	
	Температура (°С)	Влажност ваздуха (%)
1.	20	95
2.	19	90
3.	18	85
4.	17	80
5.	16	75
6. до 15.	15	75

### 3.2.2 Припрема инокулума бактеријских патогена

За припрему инокулума употребљено је: два соја *E. coli* O157 (ATCC 35150 и изолат из говеђег цекума – сопствена колекција), два соја *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028 и ATCC 13311) и пет сојева *Listeria monocytogenes* (ATCC 19115; ATCC 19114; ATCC 19112; изолат из суцука и изолат из рамстека – сопствена колекција). Културе су чуване на -20 °С у микровијалима (MICROBANK; Pro-Lab Diagnostics, Toronto, Canada). Све културе су, пре припреме инокулума, два пута пасажиране у



говеђем мождано-срчаном бујону (ВНН; Oxoid, Basingstoke, UK) уз инкубацију на 37 °С, у трајању од 20 за прву, односно, 24 часа за другу пасажу. Број ћелија сваког изолата одређен је засејавањем по 100 µl одговарајућих децималних разређења из умножене бујонске културе на одговарајуће селективне подлоге и то: *E. coli* O157 на СТ-SMAC агар (MacConkey агар са сорбитолом и сапментима: цефиксим - 0,025 mg /500 ml и К-телурит 1,25 mg /500 ml) произвођача Oxoid (Basingstoke, UK); салмонеле на XLD агар (Oxoid, UK) и листерије на PALCAM agar (Merck, Germany). Бујонске културе су до употреба, тј. 24 часа држане у фрижидеру (+4 °С), а потом је, изузимањем одговарајућих аликвота припремљена смеша сојева одређене бактеријске врсте ради постизања концентрације од, око, 10<sup>6</sup> CFU по граму кобасица.

Узорковање из процеса производње неконтаминираних кобасица извршено је на почетку ферментације и на крају поступка сушења. Током поступка производње контаминираних кобасица узорковање је извршено на почетку, затим 4., 8. и последњег (15.-ог) производног дана, као и током складиштења (25., 30. и 60. дана). За анализе (микробиолошке, физичко-хемијске и сензорне) узорковано је најмање 6 комада од оба типа кобасица.

### 3.2.3 Термички третман кобасица

По завршетку процеса сушења, део инокулисаних кобасица подвргнут је различитим термичким третманима а параметри датих процеса наведени су у табели 3.5. Припрема је обухватала паковање сваког комада, тј. кобасице засебно у по две водоотпорне кесе од HDPE материјала (8µm дебљине). За сваки третман употребљено је по шест комада кобасица а у једном од њих је унутрашња температура праћена водоотпорним сензором термометра (АМТ-105; Amtast, Florida, USA), постављеног у средиште кобасице. Кобасице су, затим, потапане у претходно загрејано водено купатило.

Табела 3.5. Параметри термичког третмана сувих ферментисаних кобасица

тип кобасице	патогена врста	температура (°С)	време (мин.)	тип кобасице	патогена врста	температура (°С)	време (мин.)
сремска	<i>Salmonella</i> Typhimurium	47	0	суцук	<i>E. coli</i> O157	54	0
			7				15
			13				30
	50	0	57		0		
		3,5			6,5		
		6,5			13		
53	0	59	0				
	2		2,75				
	4		5,5				
<i>Listeria monocytogenes</i>	66	66	0	<i>Listeria monocytogenes</i>	66	66	0
			10				15
			20				30
68,5	68,5	68,5	0	68,5	68,5	68,5	0
			10				10
			20				20

Време термичког третмана мерено је од тренутка постизања жељене температуре у средишњем делу кобасице. Након третмана, кобасице су хлађене, без одлагања, под текућом водом до приближно 25 °C а затим су испитане, како би се утврдио број патогена. Потребно је напоменути да је број патогена у датим кобасицама утврђен и непосредно пре извођења термичког третмана, ради стицања увида о обиму њихове редукције током поступка загревања

### 3.2.4 Методе 2. фазе истраживања

#### 3.2.3.1. Микробиолошке методе

**Припрема основног разблажења и серије разређења.** Ради испитивања бројности основних група микробиота и додатих патогена током поступка производње и складиштења у стомахер кесе са филтером (Nasco Whirl-pack; USA) узимани су узорци од по 25 грама са различитих места од оба надева за кобасице, као и по 25 грама из попречних пресека оба типа кобасица, при чему је сваком узорку додато по 225 ml MRD раствора (Oxoid, UK) а затим је суспензија хомогенизована стомахером (easyMIX, BioMerieux, France) у трајању од три минута. У сврху испитивања редукције патогена у готовим производима током термичког третмана узорци (40–60 g) узети из средишта третираних кобасица разређени су са 120–180 ml MRD раствора у стомахер кесама са филтером и хомогенизовани у стомахеру 5 минута. Сва даља разређења за обе групе узорака припремана су из основног разблажења пребацивањем по 1 ml запремине аликвота у низу децималних разређења у MRD раствору, у складу са стандардном методом (SRPS EN ISO 6887-1:2008).

**Бројност основних група микробиота.** На почетку и на крају производног поступка у контролним кобасицама одређивана је бројност основних група микробиота и то: аеробних мезофила (ACC), ентеробактерија (EBC), *E. coli* (ECC) и млечнокиселинских бактерија (LAB). Примењене методе су описане у 3.1.2.

**Бројност бактеријских патогена у кобасицама током производног поступка и складиштења.** Број салмонела утврђен је бројањем типичних колонија израслих након засејавања из одговарајућих разређења на XLD агару и инкубације на 37 °C/24 часа. Број *E. coli* O157 утврђен је бројањем типичних колонија израслих након засејавања из одговарајућих разређења на CT-SMAC агару и инкубације на 37 °C/24 часа. Број листерија утврђен је бројањем типичних колонија израслих након засејавања из одговарајућих разређења на PALCAM агару и инкубације на 37 °C/48 часова. Све примењене подлоге су набављене од претходно наведених произвођача. Типичне колоније од сваког патогена су, затим и серолошки потврђене: *S. Typhimurium* помоћу салмонела антисерум теста (Pro-Lab Diagnostics, Canada), *E. coli* O157 помоћу Dry Spot O157 латекс аглутинационог теста (Oxoid) и *L. monocytogenes* брзим имунохроматографским тестом (Singlepath® L'mono; Merck).

**Бројност бактеријских патогена у кобасицама након термичког третмана.** Приликом засејавања из одабраних разређења за *E. coli* O157 и *Salmonella Typhimurium* примењен је метод опоравка оштећених ћелија (Kang и Fung, 2000; Riordan и сар., 2000). По 1ml, односно 4 x 250 µl, основног разблажења и одговарајућих децималних разређења засејано је површински (spread plate method) на претходно разливен и просушен триптон соја агар (TSA; Oxoid, Basingstoke, UK) у петри шољама (Ø 90 mm). Петријевке су, затим, инкубиране на 37 °C у трајању од 2 часа. Након тога, засејане

подлоге су преливане са 8–10 ml селективне подлоге, претходно отопљене и загрејане на око 44,5 °C и то СТ-SMAC или XLD - зависно од патогена. Даља инкубација петри шоља била је на 37 °C, током наредна 24 часа. Ради утврђивања броја листерија из основног разблажења и одговарајућих разређења оба типа кобасица засејавано је по 1 ml, односно, 4 x 250 µl, на PALCAM агар и петри шоље су инкубирани на 37 °C/48 часова. Све примењене селективне подлоге су набављене од претходно наведених произвођача. Типичне колоније од сваког патогена су затим и серолошки потврђене претходно наведеним имунохроматографским тестовима.

**Изражавање резултата одређивања броја појединих група микроорганизама.** За изражавање резултата приликом одређивања бројности виабилних ћелија које образују колонију на чврстим подлогама примењен је стандард SRPS EN ISO 7218:2008.

#### **3.2.4.2. Физичко-хемијске методе**

Мерење рН вредности и активности воде ( $a_w$ ) у кобасицама извршено је по методама описаним у 3.1.2.

#### **3.2.4.3. Одређивање D и Z вредности**

Време децималне редукције (D време) утврђено је за сваки патоген и сваку температуру пастеризације. Параметри топлотне инактивације мерени су одмах након постизања жељене температуре и у још две временске тачке. D вредност је израчуната из криве преживљавања помоћу анализе линеарне регресије, с обзиром на то да се одумирање микроорганизама под дејством одређене температуре може, оквирно, дефинисати кинетичком кривом првог реда (Stringer, George и Peck, 2000). Због наведеног, узете су у обзир временске тачке високог коефицијента детерминације ( $R^2 > 0,8$ ). Ради стицања увида о отпорности патогена на различитим температурама процењена је Z вредност помоћу дијаграма D вредности изражених у log јединицама, насупрот њима одговарајућих температура загревања (Vuković, 2012; Adams и Moss, 2008).

#### **3.2.4.4. Сензорна анализа**

Укупну прихватљивост и остале сензорне особине топлотно обрађених кобасица оценио је панел од шест обучених чланова, скалом од 1 до 7, у просторијама Лабораторије за сензорну анализу Факултета ветеринарске медицине у Београду, у складу са захтевима SRPS ISO 6564:2001 стандарда.

#### **3.2.4.5. Статистичка анализа**

У сврху сензорне анализе термички третираних производа израчунате су средње вредности, стандардна девијација, анализа варијансе и потом Tukey тест статистичке значајности између група података помоћу софтверског пакета Statistica 12 (Stat Soft, Inc., Tulsa, USA).

## 4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Приликом осмишљавања докторске дисертације постављена су два одвојена али међусобно повезана циља, услед чега су резултати и дискусија подељени у две целине. Прва целина се односила на испитивање одабраних корака у производњи типичних представника ферментисаних сувих кобасица од свињског и говеђег меса у нашој земљи ради стицања сазнања о условима индустријске производње дате категорије кобасица. Друга целина се односила на испитивање успешности преживљавања најзначајнијих алиментарних патогена у лабораторијским условима који су опонашали уобичајени начин индустријске производње ферментисаних сувих кобасица, са могућношћу примене топлотне обраде као додатне мере безбедности.

### 4.1. ОДАБРАНИ МИКРОБИОЛОШКИ И ФИЗИЧКО-ХЕМИЈСКИ ПАРАМЕТРИ ИНДУСТРИЈСКЕ ПРОИЗВОДЊЕ ФЕРМЕНТИСАНИХ СУВИХ КОБАСИЦА У СРБИЈИ

Ферментисане суве кобасице (ФСК) су трајни производи од меса чија се одрживост заснива на биохемијским и физичко-хемијским променама које се дешавају током ферментације и сушења. При томе, синергистичко дејство антимикробних чинилаца онемогућава или значајно отежава умножавање узрочника квара и евентуално присутних патогена. Познато је, међутим, да ферментисане суве кобасице понекад садрже алиментарне патогене који могу да угрозе здравље потрошача и изазову економске штете. У прилог томе је и податак да је наведена категорија производа у последњих двадесет година изазвала више епидемија болести проузрокованих храном (Hospital i sar., 2014; Heir i sar., 2010).

Услед наведених чињеница јасно је да ферментисане суве кобасице могу бити извор микробиолошке опасности по здравље потрошача. Ферментисане кобасице представљају омиљене производе од меса у Србији, са значајном могућношћу извоза, при чему подаци о присуству *Salmonella* и *E. coli* O157 у датој категорији производа, који се односе на нашу земљу, не постоје или су веома оскудни.

Циљ прве фазе истраживања ове докторске дисертације био је утврђивање присуства најзначајнијих алиментарних патогена током производног поступка ферментисаних сувих кобасица од свињског (*Salmonella*) и говеђег (*E. coli* O157) меса. Поред тога, испитане су и промене главних група микробиота: укупан број аеробних мезофила (АСС), породице *Enterobacteriaceae* (ЕВС), врсте, *Escherichia coli* (ЕСС) и укупан број млечно киселинских бактерија (LАВ); као и рН и  $a_w$  вредности и основни хемијски састав кобасица, током одабраних корака у производњи.

#### 4.1.1. Резултати испитивања комерцијално произведених сремских кобасица

Резултати испитивања општих микробиолошких параметара производње кобасица од свињског меса приказани су у табели 4.1.

**Табела 4.1.** Општи микробиолошки параметри ( $\text{Log}_{10} \text{CFU/g} \pm \text{SD}$ ) и присуство салмонела у 25g узорка током производног поступка сремске кобасице

Производни корак	ACC	EBC	ECC	LAB	<i>Salmonella</i> spp.
<b>Произвођач А</b>					
месни обресци	6,1 ± 0,2	3,8 ± 0,3	1,0 ± 0,3		н. д.
уситњени месо и масно ткиво	6,7 ± 0,1	4,6 ± 0,3	2,6 ± 0,2	.	+ (1 од 6)*
надев пре пуњења у омотаче	6,4 ± 0,1	3,8 ± 0,3	1,8 ± 0,1		н. д.
кобасице 0. дана производње	6,2 ± 0,1	3,4 ± 0,3	1,1 ± 0,5	5,6 ± 0,1	н. д.
кобасице после 7. дана производње	8,1 ± 0,2	1,5 ± 0,2	н.д.	8,5 ± 0,2	н. д.
кобасице 15. дана производње	7,8 ± 0,1	н. д.	н. д.	8,2 ± 0,1	н. д.
<b>Произвођач Б</b>					
месни обресци	5,9 ± 0,2	3,9 ± 0,5	2,9 ± 0,5		н. д.
уситњени месо и масно ткиво	7,2 ± 0,1	5,6 ± 0,1	3,4 ± 0,3		н. д.
надев пре пуњења у омотаче	6,3 ± 0,1	4,5 ± 0,2	2,7 ± 0,2		н. д.
кобасице 0. дана	6,5 ± 0,3	4,6 ± 0,2	3,4 ± 0,2	5,5 ± 0,1	
кобасице после 7. дана производње	7,5 ± 0,17	1,3 ± 0,2	н. д.	7,9 ± 0,3	н. д.
кобасице 15. дана производње	7,3 ± 0,1	н. д.	н. д.	7,4 ± 0,2	н. д.
<b>Произвођач В</b>					
месни обресци	5,7 ± 0,3	3,3 ± 0,2	2,2 ± 0,3		+ (4 од 6)
уситњени месо и масно ткиво	6,4 ± 0,1	4,0 ± 0,2	2,8 ± 0,2		+ (2 од 6)
надев пре пуњења у омотаче	6,0 ± 0,1	3,6 ± 0,2	2,0 ± 0,1		+ (1 од 6)
кобасице 0. дана производње	6,3 ± 0,1	3,7 ± 0,1	2,0 ± 0,2	5,7 ± 0,1	н. д.
кобасице после 7. дана производње	8,7 ± 0,2	1,4 ± 0,2	н. д.	8,8 ± 0,1	н. д.
кобасице 15. дана производње	8,8 ± 0,1	н. д.	н. д.	8,8 ± 0,1	н. д.
ACC – укупан број аеробних мезофила; EBC – број ентеробактерија; ECC – број <i>E. coli</i> ; LAB – број млечно киселинских бактерија; н.д – нису детектоване; * број узорака					

На основу резултата микробиолошког испитивања запажа се да се у месним обресцима број ACC кретао у распону од 5,7 до 6,1 log јединица, при чему је најнижа вредност установљена код произвођача В, док је највиша вредност установљена код произвођача А. У наредном кораку процеса, током поступка уситњавања, приметан је значајан пораст за 0,6 до 1,3 log јединице а затим у фази надева, након додавања зачина

и адитива, пад за 0,3 до 0,9 log јединица, тако да се ниво наведене групе микробиота пре пуњења надева у омотаче кретао у распону од 6 до 6,4 log јединица. У следећем кораку, у свеже израђеним кобасицама, уочава се блажи пад бројности аероба (0,2 log јединице), када је у питању произвођач А а супротно томе, изван пораст, на нивоу 0,2-0,3 log јединице, када су у питању произвођачи Б и В. На средини производног поступка утврђене су највише вредности за АСС, које су се кретале у распону од 7,5 до 8,7 log јединица, при чему је доња вредност установљена у кобасицама произвођача Б а горња вредност распона у кобасицама произвођача В. У готовим кобасицама запажа се благо смањење броја укупних аероба у случају произвођача А и Б, на нивоу од 0,2 до 0,3 log јединице, док је у случају произвођача В бројност остала на приближно истом нивоу, као и средњег дана производње.

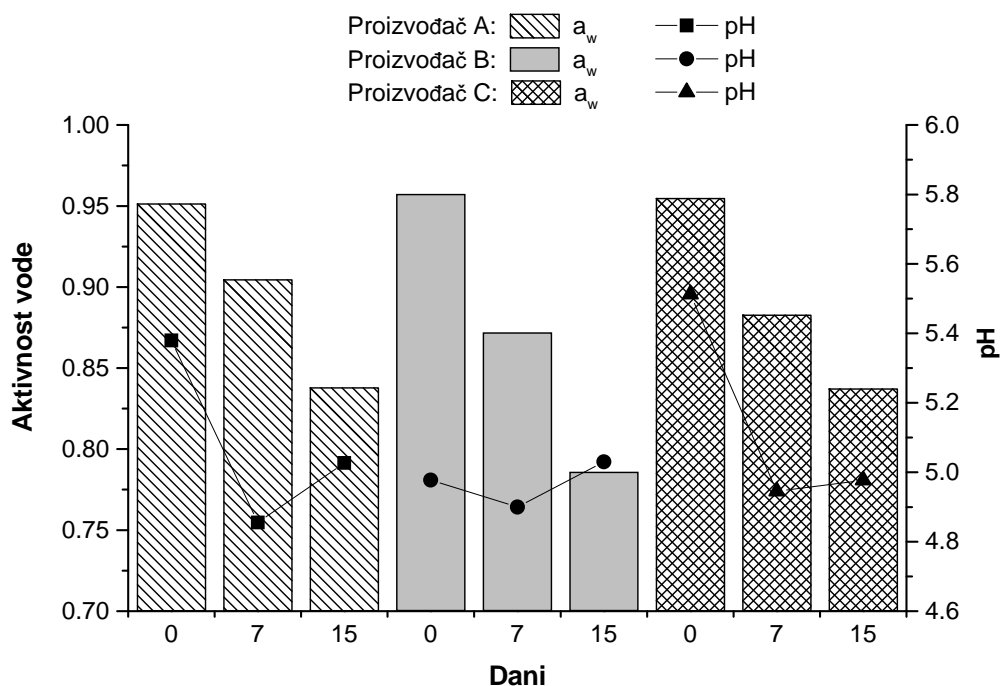
Број ЕВС у месним обресцима се кретао од 3,3 до 3,9 log јединица, да би након уситњавања значајно порастао до нивоа од 4 до 5,6 log јединица, при чему је доња вредност у оквиру распона установљена у узорцима уситњеног меса и масног ткива произвођача В а горња вредност у узорцима произвођача Б. Поступак додавања зачина и адитива довео је до приметног пада бројности ЕВС у надеву за приближно 0,5 до 1 log јединица. Наредни корак пуњења надева у омотаче довео је до незнатног повећања наведене групе микробиота за 0,1 log јединицу код произвођача Б и В, док је, супротно томе, код произвођача А приметан значајнији пад ЕВС, за 0,5 log јединица. Током ферментације и почетног периода сушења уочава се изражена редукција, за 2 до 3 log јединице, тако да је ниво ЕВС у кобасицама средњег дана производње износио од 1,3 до 1,5 log јединица, у случају сва три произвођача. Тренд опадања настављен је и током друге половине периода сушења, услед чега наведена група микробиота примењеном методом није откривена у готовим производима.

Образац промена бројности *Escherichia coli* током производног поступка сремске кобасице сличан је као када су у питању ентеробактерије. У месним обресцима, број ЕСС се кретао у распону од 1 до 2,9 log јединица, да би након уситњавања значајно порастао до вредности од 2,6 до 3,4 log јединица, при чему је најнижа вредност установљена у узорцима уситњеног меса и масног ткива произвођача А а највиша у узорцима произвођача Б. Након додавања зачина и адитива, у надеву код сва три произвођача, уочава се приметан пад за 0,7-0,8 log јединица. Наредни корак пуњења надева у омотаче имао је за последицу, у случају произвођача А, даље смањење ЕСС за 0,7 log јединица а супротно томе, у случају произвођача Б, пораст ЕСС за 0,7 log јединица, док је код произвођача В ниво остао непромењен. Током ферментације и сушења *E. coli* примењеном методом није откривена у кобасицама узоркованим средњег дана производње, као ни у готовим производима у сва три производна погона, независно од бројности наведеног микроорганизама пре почетка ферментације.

Број млечно киселинских бактерија испитиван је након фазе припреме сировина. У кобасицама непосредно након пуњења, у случају сва три произвођача, ниво наведене групе микробиота кретао се од 5,5 до 5,7 log јединица (табела 1), да би на средини производног поступка, очекивано, нарастао до максимума, са неуједначеним распонем вредности од 7,9 до 8,8 log јединица, при чему је најнижа вредност установљена код произвођача Б а највиша код произвођача В. У готовим кобасицама бројност LAB, попут АСС, код произвођача А и Б била је нешто нижа, за 0,2, односно, 0,5 log јединица, наведеним редом, док је код произвођача В остала на истом нивоу, као и средњег дана производње. На основу увида у резултате може се запазити да млечно киселинске бактерије постају доминантна физиолошка група микробиота у ферментисаним кобасицама већ од средине производног поступка, односно, највероватније одмах након завршетка ферментације.

Салмонела се сматра најзначајнијим патогеном када је у питању свеже свињско месо, због чега је њено присуство испитивано током главних корака у производњи сремске кобасице. Наведени патоген је установљен у фази припреме сировина у два, од укупно три испитана погона (табела 1). Налаз патогена у случају произвођача В био је позитиван у четири од укупно шест узорака месних обрезака, два од укупно шест узорака уситњеног мишићног и масног ткива и у једном од укупно шест узорака готовог надева (након додавања зачина и адитива), док је код произвођача А позитиван био само један узорак од уситњеног мишићног и масног ткива. Упркос позитивним резултатима током фазе припреме надева, салмонела није установљена ни у једном узорку кобасица непосредно након пуњења, средњег и последњег дана производње, у сва три производна погона.

На слици 4.1 приказани су резултати рН и  $a_w$  вредности измерени у кобасицама 0., 7. и 15. дана производње. Почетна рН вредност узорака кобасица код произвођача А и В била је на нивоу уобичајених вредности (5,4 до 5,5), с обзиром на то да се за производњу СФК користило одзрело месо, док је у случају произвођача Б била знатно нижа (4,9–5,0), што би могло да буде последица брже испољеног дејства закишељивача - глуконо делта лактона у надеву за кобасице. Током ферментације и почетног периода сушења, рН вредност је снижена тако да се средњег дана производње кретала у распону од 4,8–5,0 при чему је исти ниво или блажи пораст вредности установљен и у крајњим производима.



Слика 4.1. Резултати мерења рН и  $a_w$  вредности током производње у сремској кобасици

Активност воде свеже израђених сремских кобасица износила је 0,95 код произвођача А, односно, 0,96 у случају произвођача Б и В. Током ферментације и почетног периода сушења дошло је до израженог пада  $a_w$  вредности, чији се распон кретао од 0,87 код произвођача Б до 0,9 код произвођача А. Запажа се да је активност воде у готовим производима била, очекивано, на још нижем нивоу, односно, наставила

је да опада и током преосталог периода сушења, при чему је најнижа вредност измерена у кобасицама произвођача Б (0,79), док је у случају произвођача А и В износила 0,84 и 0,85, наведеним редом.

У табели 4.2 приказани су резултати испитивања садржаја воде, масти, беланчевина, соли, пепела и нитрита у сремским кобасицама узоркованим 0., 7. и 15. дана производње. На основу увида у резултате може се запазити да је садржај воде у свеже израђеним кобасицама произвођача Б и В био приближно исти (55,7% - 55,9%), док је код произвођача А измерена нешто виша вредност (57,8%). Сходно томе, код произвођача А садржај масти је, очекивано, био најнижи (16,3%), док је код произвођача Б и В износио 18,2%, односно, 19,2%. Садржај беланчевина у свеже израђеним кобасицама био је прилично уједначен у сва три производна погона и кретао се у распону од 21,7 до 22,6%. Када су у питању кухињска со и пепео, у кобасицама 0. дана производње ниво наведених састојака код сва три произвођача био је истоветан и износио је 2,2%, односно, 3,3%. Садржај нитрита почетног дана производње кретао се у распону од 136,2 до 139,7 mg/kg надева. Увидом у резултате испитивања садржаја основних састојака у кобасицама узоркованим на средини производног поступка и у крајњим производима запажа се да је губитак воде истовремено праћен повећавањем удела масти, беланчевина, соли и пепела у укупној маси производа. У сва три погона основни састав готових кобасица био је прилично уједначен тако да су се вредности кретале у распону од 28,3% до 28,8% за садржај воде, 39,5% до 40,2% за садржај масти, 26,5% до 27,5% за садржај беланчевине и од 3,6% до 3,8% за садржај кухињске соли. У сва три производна погона садржај пепела у готовим кобасицама био је истоветан и износио је 4,8%. У складу са реактивном природом, ниво нитрита је опадао током поступка ферментације и сушења при чему је дата супстанца у крајњим производима била присутна у распону од 9,5 до 10,5 mg/kg садржаја.

**Табела 4.2.** Резултати основних хемијских параметара током производње сремске кобасице

Садржај	Хемијски параметри					
	вода (%)	масти (%)	беланчевине (%)	со (%)	пепео (%)	нитрити (mg/kg)
<b>Произвођач А</b>						
0. дан	57,8 ± 1,0	16,3 ± 1,2	22,6 ± 0,1	2,2 ± 0,0	3,4 ± 0,1	136,2 ± 3,1
7. дан	38,3 ± 1,1	32,1 ± 0,9	25,9 ± 0,3	2,6 ± 0,1	3,9 ± 0,1	69,6 ± 1,0
15. дан	28,8 ± 0,8	39,7 ± 0,8	27,5 ± 0,4	3,8 ± 0,1	4,8 ± 0,1	9,5 ± 0,5
<b>Произвођач Б</b>						
0. дан	55,9 ± 0,7	18,2 ± 0,4	22,5 ± 0,5	2,2 ± 0,1	3,4 ± 0,1	139,3 ± 2,2
7. дан	34,3 ± 0,7	34,4 ± 0,7	26,8 ± 0,5	2,7 ± 0,1	3,9 ± 0,1	70,1 ± 1,8
15. дан	28,3 ± 0,6	39,5 ± 0,8	27,2 ± 1,0	3,6 ± 0,1	4,8 ± 0,1	10,3 ± 1,1
<b>Произвођач В</b>						
0. дан	55,7 ± 0,6	19,2 ± 0,5	21,7 ± 0,4	2,2 ± 0,0	3,4 ± 0,0	139,7 ± 1,2
7. дан	34,2 ± 1,2	35,4 ± 0,6	25,3 ± 0,4	2,7 ± 0,1	3,9 ± 0,1	71,9 ± 0,8
15. дан	28,9 ± 0,8	40,2 ± 1,1	26,5 ± 0,3	3,6 ± 0,1	4,8 ± 0,0	10,5 ± 1,1



#### 4.1.2 Резултати испитивања комерцијално произведених сузук кобасица

Резултати испитивања општих микробиолошких параметара производње кобасица од говеђег меса приказани су у табели 4.3.

У месним обресцима намењеним производњи сузука број АСС се кретао у широком распону од 4,8 до 6,1 log јединица, при чему је најнижа вредност установљена код произвођача Г а највиша код произвођача Д (табела 3). У наредном кораку, током поступка уситњавања, уочава се изразити пораст за 1,6-1,7 log јединица а затим у фази надева, након додавања зачина и адитива, незнатан пад, за 0,1- 0,2 log јединица, тако да се бројност наведене групе микробиота пре пуњења надева кретала од 6,4 до 7,6 log јединица. У следећем кораку, у свеже израђеним кобасицама, није дошло до битнијих промена, односно, у случају произвођача Д и Г установљен је исти ниво или блажи пораст наведених микробиота за додатних 0,2 log јединице, док је у случају произвођача А установљен незнатан пад бројности за 0,2 log јединице. Занимљиво је напоменути да је у случају произвођача А слична појава пада бројности мањег обима установљена и приликом пуњења надева за производњу сремских кобасица. Највише вредности АСС, нивоа од 8,4 log јединице, односно, 8,5 log јединица, утврђене су на средини производног поступка, када су у питању произвођачи А и Д, док је у случају произвођача Г установљена бројност од 8,1 log јединица, која се додатно повећала за 0,2 log јединице по завршетку периода сушења. Супротно томе, у готовим кобасицама код преостала два произвођача дошло је до незнатног пада АСС, за 0,2 log јединице.

Број ЕВС у месним обресцима кретао се у широком распону од 1,7 до 3,4 log јединица, при чему је најнижа вредност установљена код произвођача Г, док је највиша вредност установљена код произвођача Д (табела 4.3). Након поступка уситњавања приметно је изразито повећање бројности ЕВС, за око 2 log јединице код произвођача А и Г, односно, за чак 4,7 log јединица у случају произвођача Д. У узорцима надева, односно, после поступка додавања зачина и адитива, установљен је мањи пад бројности ЕВС (0,2-0,3 log јединице), при чему је приближно исти ниво ентеробактерија установљен и у следећем кораку, након пуњења надева у омотаче, тако да су се вредности ЕВС, у сва три производна погона, у свеже израђеним кобасицама кретале у распону од 4,9 до 6,2 log јединице, с тим да је најнижа вредност установљена код произвођача А а највиша код произвођача Д. Након ферментације и почетног периода сушења уочава се изражено смањење броја наведене групе микробиота, при чему је ниво редукције код произвођача А износио 1,8 log јединица, код произвођача Г 2,3 log јединице, док је код произвођача Д износио чак 3,2 log јединице. У случају последњег произвођача тренд одумирања ентеробактерија настављен је и током преосталог периода сушења, са обимом редукције од 0,9 log јединица, док је у готовим кобасицама произвођача А и Г, у наведеном периоду, установљена само незнатна редукција на нивоу од око 0,1 log јединице.

Образац промена бројности *Escherichia coli* током производног поступка сузука сличан је као код ентеробактерија у датом типу кобасица. У месним обресцима број ЕСС се кретао на нивоу једне, односно, непуне две log јединице, у случају произвођача А и Г, док у случају произвођача Д наведени микроорганизам није установљен (граница детекције 1 log јединица) (табела 4.3). Након поступка уситњавања меса и масног ткива уочава се изразито повећање броја ЕСС, које је код произвођача А износило 3,1 log јединице, код произвођача Г 3,3 log јединице и код произвођача Д 2 log јединице по граму садржаја.

**Табела 4.3.** Општи микробиолошки параметри ( $\text{Log}_{10} \text{CFU/g} \pm \text{SD}$ ) и присуство *E. coli* O157 у 25 g узорка током производног поступка суџука

Производни корак	Микробиолошки параметри				
	ACC	EBC	ECC	LAB	<i>E. coli</i> O157
<b>Произвођач А</b>					
месни обресци	5,7 ± 0,2	3,1 ± 0,5	1,0 ± 0,9	н. и.	н. у.
уситњени месо и масно ткиво	7,4 ± 0,1	5,1 ± 0,3	4,1 ± 0,2	н. и.	н. у.
надев	7,2 ± 0,1	4,9 ± 0,3	3,9 ± 0,2	н. и.	н. у.
кобасице 0. дана	7,0 ± 0,2	4,9 ± 0,2	3,8 ± 0,2	6,0 ± 0,1	н. у.
кобасице после 7. дана производње	8,4 ± 0,1	3,1 ± 0,2	2,0 ± 0,4	8,8 ± 0,2	н. у.
кобасице последњег дана производње	8,2 ± 0,2	3,0 ± 0,2	1,3 ± 0,7	8,7 ± 0,1	н. у.
<b>Произвођач Г</b>					
месни обресци	4,8 ± 0,3	3,4 ± 0,7	1,9 ± 1,6	н. и.	н. у.
уситњени месо и масно ткиво	6,5 ± 0,6	5,6 ± 0,3	5,2 ± 0,3	н. и.	+ (1 од 6)
надев	6,4 ± 0,6	5,3 ± 0,4	4,7 ± 0,4	н. и.	н. у.
кобасице 0. дана производње	6,6 ± 0,75	5,5 ± 0,9	4,6 ± 0,6	6,1 ± 0,5	н. у.
кобасице после 7. средњег дана производње	8,1 ± 0,4	3,2 ± 0,3	2,1 ± 0,6	8,2 ± 0,1	н. у.
кобасице последњег дана производње	8,3 ± 0,3	3,1 ± 0,3	2,0 ± 0,8	8,4 ± 0,2	н. у.
<b>Произвођач Д</b>					
месни обресци	6,1 ± 0,1	1,7 ± 1,5	н. у.	н. и.	н. у.
уситњени месо и масно ткиво	7,7 ± 0,1	6,4 ± 0,2	2,0 ± 1,0	н. и.	н. у.
надев	7,6 ± 0,1	6,1 ± 0,2	1,2 ± 1,4	н. и.	н. у.
кобасице 0. дана производње	7,6 ± 0,0	6,2 ± 0,2	1,5 ± 1,2	6,4 ± 0,2	н. у.
кобасице после 7. дана производње	8,5 ± 0,0	2,7 ± 0,4	<1	8,7 ± 0,1	н. у.
кобасице последњег дана производње	8,3 ± 0,1	1,8 ± 0,2	<1	8,7 ± 0,0	н. у.
ACC – укупан број аеробних мезофила; EBC – број ентеробактерија; ECC – број ешерихије коли; LAB – број млечно киселинских бактерија; н.у – нису установљене; н.и. – нису испитиване					

Пуњење надева у омотаче није довело до битније промене бројности испитиваног микроорганизама, када су у питању сва три производна погона да би, затим, током ферментације и почетног периода сушења дошло до израженог смањења ЕСС, чији је ниво у кобасицама седмог дана производње износио 1,8 log јединица код произвођача А, односно, 2,5 log јединица у случају произвођача Г. У случају произвођача Д, малобројна популација *E. coli*, присутна на почетку ферментације (1,5 log јединица по граму садржаја), потупно је редукована тако да наведени микроорганизам није детектован примењеном методом у кобасицама узоркованим ни средњег ни последњег дана производње. Када су у питању кобасице произвођача А тренд одумирања настављен је и током преосталог периода сушења, са падом за 0,7 log јединица, тако да је број ЕСС у крајњим производима износио је 1,3 log јединица, док се у случају кобасица произвођача Г, у истом временском периоду, уочава само незнатан пад на нивоу од 0,1 log јединице.

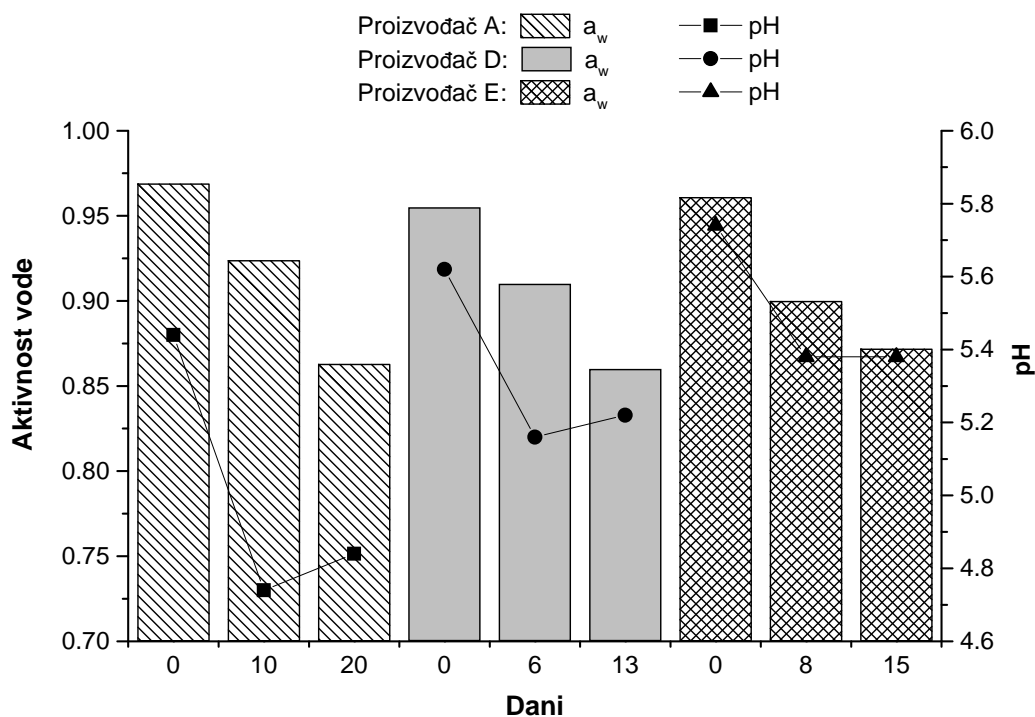
Број млечно киселинских бактерија испитиван је након фазе припреме сировина. У кобасицама непосредно након пуњења, ниво наведене групе микробиота износио је од 6 до 6,5 log јединица, при чему је најнижа вредност установљена код произвођача А, док је највиша вредност установљена код произвођача Д (табела 3). Током ферментације и прве половине периода сушења, број LAB је изразито порастао за 2,1 до 2,8 log јединица, достигавши прилично уједначени ниво у сва три погона, са распонем од 8,2 до 8,8 log јединица средњег дана производње. Након преосталог периода сушења уочава се још уједначенији однос резултата тако да је ниво наведене групе микробиота код произвођача А износио 8,7 log јединица, код произвођача Г 8,4 log јединица и код произвођача Д 8,7 log јединица. Као и у случају сремске кобасице, увидом у резултате може се запазити да млечно киселинске бактерије постају доминантна физиолошка група микробиота у суцук кобасицама већ од средине производног поступка, односно, највероватније одмах након завршетка ферментације.

*Escherichia coli* O157 је најзначајнији алиментарни патоген, који је уједно и најзначајнији представник ентерохеморагичног патотипа дате врсте, када је у питању свеже говеђе месо, због чега је њено присуство испитивано током главних корака у производњи суцука. Наведени микрорганizam установљен је у само једном узорку од уситњеног меса у кланици Д, током припреме надева и није установљен током даљег поступка ферментације и сушења ни у једном производном погону (табела 3).

На слици 4.2 приказани су резултати рН и  $a_w$  вредности измерени у кобасицама 0., 7. и 15. дана производње. Почетна рН вредност кобасица кретала се у распону од 5,5 до 5,7, при чему је најнижа вредност установљена код произвођача А, док је највиша установљена код произвођача Д. Током ферментације и почетног периода сушења, рН вредност је снижена, при чему се уочава значајна разлика у резултатима међу произвођачима. Тако је у случају произвођача А установљена изражено ниска рН вредност од 4,7, док је код произвођача Г резултат износио 5,1 а код произвођача Д чак 5,6. У готовим кобасицама произвођача А и Г установљен је благи пораст рН вредности, од 0,1 јединице, у односу на резултате средњег дана производње, док је у случају произвођача Д дошло до благог пада на нивоу од 0,1 јединице. Благи пораст рН вредности након 7. дана производње последица је разградње млечне киселине уз, истовремено, све израженију протеолизу.

Активност воде свежих суцук кобасица износила је 0,95 у случају произвођача Г, односно, 0,96 код произвођача Д и 0,97 код произвођача А (слика 4.2). Након ферментације и почетног периода сушења уочава се изражени пад активности воде, са распонем вредности од 0,89 до 0,92 да би се исти тренд наставио и током преосталог

периода сушења при чему је најнижи резултат измерен у кобасицама произвођача Г (0,86), док је у случају произвођача А и Д износио 0,87 и 0,88, наведеним редом.



Слика 4.2. Резултати мерења pH и  $a_w$  вредности у суцуку

У табели 4.4 приказани су резултати испитивања садржаја воде, масти, беланчевина, соли, пепела и нитрита у суцук кобасицама узоркованим 0., 7. и 15. дана производње. Може се запазити да се садржај воде у свеже израђеним кобасицама кретао у широком распону од 46,2% до 56,4%, при чему је најнижа вредност установљена код произвођача Г, док је највиша вредност установљена код произвођача Д. Сходно томе, код произвођача Г садржај масти је, очекивано, био највиши, чак 35,1%, док је код произвођача А и Д био знатно нижи и износио 24,7%, односно, 16,4%. Попут односа у погледу садржаја воде, садржај беланчевина у свеже израђеним кобасицама био је најнижи код произвођача Г (15,1%), нешто виши код произвођача А (19,3%) и највиши код произвођача Д (23,1%). Када је у питању кухињска со, резултати су се кретали у распону од 2,2 до 2,8%, при чему је најнижа вредност установљена код произвођача А, док је највиша установљена код произвођача Д. Резултати испитивања садржаја пепела у свеже израђеним кобасицама су још уједначенији, односно, истоветни су код произвођача А и Г (3,6%), док се у случају произвођача Д запажа нешто виши ниво од 4,1%, услед већег садржаја соли и беланчевина. Садржај нитрита почетног дана производње кретао се у распону од 128,7 до 137,3 mg/kg надева.

Увидом у резултате испитивања садржаја основних састојака у кобасицама узоркованим на средини производног поступка и у крајњим производима запажа се да је губитак воде истовремено праћен повећавањем удела масти, беланчевина, соли и пепела у укупној маси производа (табела 4.4). Као и у случају резултата испитивања

свеже израђених кобасица, у сва три погона основни састав готовог суцука био је неуједначен, при чему су се вредности кретале у распону од 23,5% до 32% за садржај воде, 36,5% до 50,4% за садржај масти, 21,3% до 26,2% за садржај беланчевина, од 3,7% до 4,1% за садржај кухињске соли и од 4,7% до 5,5% за садржај пепела. Ниво нитрита је, очекивано, опадао током поступка ферментације и сушења при чему је у крајњим производима био присутан у распону од 7,1 до 9,8 mg/kg садржаја.

**Табела 4.4.** Резултати основне хемијске анализе суцука

Садржај	Параметар (средња вредност ± сд *)					
	вода (%)	масти (%)	беланчевине (%)	со (%)	пепео (%)	нитрити (mg/kg)
<b>Произвођач А</b>						
0. дан	52,5 ± 0,7	24,7 ± 0,6	19,3 ± 0,8	2,2 ± 0,2	3,6 ± 0,2	136,8 ± 3,2
7. дан	37,2 ± 0,4	35,3 ± 0,9	22,8 ± 1,2	3,2 ± 0,2	4,6 ± 0,0	70,5 ± 1,8
15. дан	28,0 ± 0,4	40,6 ± 0,7	26,4 ± 1,4	3,7 ± 0,2	4,7 ± 0,2	7,1 ± 0,4
<b>Произвођач Г</b>						
0. дан	46,2 ± 0,6	35,1 ± 0,9	15,1 ± 1,1	2,5 ± 0,1	3,6 ± 0,1	128,7 ± 1,9
7. дан	30,6 ± 1,2	44,1 ± 1,7	20,2 ± 0,8	3,9 ± 0,1	5,2 ± 0,1	78,9 ± 1,6
15. дан	23,5 ± 0,7	50,4 ± 2,5	21,3 ± 1,4	4,1 ± 0,2	5,5 ± 0,2	9,8 ± 0,4
<b>Произвођач Д</b>						
0. дан	56,4 ± 1,1	16,4 ± 1,8	23,1 ± 1,1	2,8 ± 0,1	4,1 ± 0,1	137,3 ± 3,9
7. дан	35,8 ± 0,5	33,9 ± 0,4	25,4 ± 0,5	3,6 ± 0,1	5,0 ± 0,0	71,6 ± 1,6
15. дан	32,0 ± 0,4	36,5 ± 0,4	26,2 ± 0,3	3,9 ± 0,1	5,3 ± 0,1	9,2 ± 0,7

\* сд - стандардна девијација на основу 6 мерења

#### 4.1.3. Дискусија резултата за комерцијално произведене ферментисане суве кобасице

Увидом у резултате основног хемијског састава може се констатовати да су сремске кобасице у сва три погона произведене у складу са захтевима Правилника о квалитету уситњеног меса, полупроизвода и производа од меса (2012), с обзиром на то да је садржај воде у узорцима на крају производног поступка био мањи од 35%, док је укупни садржај беланчевина био већи од 20%. Садржај нитрита почетног дана производње кретао се од 136,2 до 139,7 mg/kg, што је у складу са Правилником о прехрамбеним адитивима (Службени гласник РС, број 63/2013) где се наводи да количина додата у надев за ФСК не сме да износи више од 150 mg/kg. Попут масти и беланчевина, удео кухињске соли и пепела се повећао током ферментације и сушења, услед смањивања садржаја воде, тако да је највиши ниво утврђен последњег дана производње.

Када су у питању подаци из литературе, Saičićeva и сар. (2011) су у узорцима индустријски произведене сремске кобасице установили истоветан садржај воде (28%), док је садржај масти (43%) и пепела (5,1%) у датом истраживању био виши а садржај беланчевина нешто нижи (22%) у односу на вредности утврђене овим истраживањем. Садржај кухињске соли утврђен у сремским кобасицама био је у складу са резултатом истраживања Prica и сар. (2013) где је ниво наведене супстанце у сувим ферментисаним

кобасицама узоркованим на тржишту износио 3,7%. Током ферментације и сушења ниво нитрита се смањивао, што је у складу са реактивном природом наведене супстанце. Поред миоглобина, нитрити ступају у реакције и са другим супстанцама унутар масе надева као што су, на пример, аминокиселине, шећери и масти, због чега садржај преосталог (резидуалног) нитрита опада током производног поступка. Последњих деценија присутна је тежња ка смањивању количине нитрита у храни, са образложењем да се тиме смањује могућност настанка канцерогених нитрозамина у дигестивном тракту човека, нарочито када је у питању исхрана производима од меса са нижом рН вредношћу, у које спадају суве ферментисане кобасице (Sebranek и Vacus, 2007). С друге стране, присуство резидуалног нитрита неопходно је ради одржања пожељне боје производа, успоравања појаве ужеглости, као и спречавања исклијавања и умножавања непожељних микроорганизама, нарочито током периода складиштења, с обзиром на дуг период одрживости. У том смислу, Cassens (1997) препоручује да је за остварење наведених циљева довољна концентрација нитрита од 5 до 15 mg/kg масе готових производа, због чега се на основу увида у резултате може констатовати да се ниво нитрита у готовим кобасицама, у случају сва три произвођача, налазио у оквиру препоручених вредности.

Резултати мерења рН вредности свеже израђених сремских кобасица у складу су са резултатима мерења које су за дату врсту кобасица, у оквиру исте фазе производње, навели Kozačinski и сар. (2008) и Radulovićeva и сар. (2011). Током поступка ферментације, дејством GDL и активношћу умножених млечно киселинских бактерија, долази до значајног закишељавања производа услед чега је рН вредност кобасица узоркованих средњег дана производње за 0,5-0,6 јединица нижа у односу на вредности на почетку процеса. Вредност рН установљена у готовим производима, истоветна је или нешто виша од вредности утврђене средњег дана производње. Појава благог пораста у односу на резултате 7. дана може се објаснити појачаним ослобађањем производа разградње беланчевина, као и разградњом млечне киселине током преосталог периода сушења (Salgado и сар., 2005; Vuković и сар., 2004). При томе, GDL убрзава дати процес подстичући одмотавање и почетну разградњу миофибриларних беланчевина (Toldra, 2007). Када је у питању произвођач Б запажа се делимично одступање од уобичајеног обрасца промена рН вредности током производног поступка. Код наведеног произвођача у свеже израђеним кобасицама рН вредност је била знатно нижа (5,0) у односу на резултате друга два произвођача. Потребно је узети у обзир чињеницу да је произвођач Б за производњу надева користио намрзнуто (око -8 °C) и незамрзавано, охлађено, месо (око +4 °C) (Материјал и методе; Материјал 1. фазе истраживања). Постоји могућност да је охлађено месо утицало на брже достизање температуре ферментације на којој се GDL потпуно раствара (21-23 °C) (FAO, 1985). Сходно томе, снижавање рН вредности датог надева могло је да наступи нешто брже, у односу на исту појаву код надева од меса темперираниг у распону од -5 °C до -2 °C, што је био случај код преостала два произвођача. У погледу нивоа киселости, увидом у резултате може се констатовати да сремске кобасице сва три произвођача спадају у категорију киселих ферментисаних кобасица, односно, кобасица чија је рН вредност нижа од 5,3 (Incze, 2004).

Активност воде свеже израђених сремских кобасица у складу је са литературним подацима који се односе на дате производе уобичајених карактеристика (Luske, 2000). У случају сва три произвођача, током ферментације и почетног периода сушења дошло је до брзог снижавања  $a_w$  вредности производа услед присуства GDL. Растварање наведене супстанце снижава рН вредност надева до изоелектричне тачке актомиозинског комплекса (рН око 5), што доводи до смањења воденог омотача ове

две технолошки најзначајније беланчевине меса. Последишно, повећање количине слабо везане воде олакшава њено уклањање из садржаја надева па одговарајућа примена параметара релативне влажности, температуре и струјања ваздуха у климатизованим коморама омогућава брзо исушивање производа, уз смањену опасност од појаве прстена на спољашњем рубу (Incze, 2004). Сходно томе, код сва три произвођача активност воде кобасица узоркованих на средини производног поступка (7. дан) била је једнака или нижа од 0,9 (слика 4.1), тако да су оне већ тада постале микробиолошки стабилни производи, у којима нема услова за размножавање узрочника квара и патогених микроорганизама (Leistner, Rodel и Krispien; 1981).

Налази основне хемијске анализе показују да је снижавање активности воде праћено истовременим смањивањем укупне количине воде. Код произвођача Б и В садржај воде у сремским кобасицама узоркованим 7. дана производње био испод 35%, што их већ на половини производног поступка сврстава у категорију сувих ферментисаних кобасица. У случају произвођача А садржај воде истог дана био је за 3% виши од граничне вредности, односно, износио је 38%, што се може повезати са нешто вишим садржајем воде у свеже израђеним кобасицама, у поређењу са почетним вредностима у кобасицама произвођача Б и В (табела 4.2). Током преосталог периода сушења активност воде је, очекивано, наставила да опада, при чему је најнижа вредност утврђена у кобасицама произвођача Б а као разлог може се узети у обзир дејство више температуре и ниже релативне влажности ваздуха у комори, у односу на параметре које су применили произвођачи А и В (Материјал и методе; Материјал 1. фазе истраживања; табела 3.2).

На основу резултата испитивања хемијског састава може се закључити да су у сва три погона суцук кобасице произведене у складу са захтевима Правилника о квалитету уситњеног меса, полупроизвода и производа од меса (2012), с обзиром на то да је садржај воде у узорцима на крају производног поступка био мањи од 35%, док је укупни садржај беланчевина био већи од 20%. Изузетак чини један узорак готове кобасице (15. дан) произвођача Г, чији садржај беланчевина је био испод 19,31% (појединачни резултати нису приказани). Садржај масти на крају поступка производње кретао се од 36,5% до 50,4%, што је приближно распону вредности од 40% до 50%, колико Wirth (1988) наводи да је просечан садржај масти у комерцијално произведеним ферментисаним кобасицама. Садржај масти, беланчевина, кухињске соли и пепела повећао се у кобасицама након поступка ферментације и сушења, услед одавања влаге, тако да су највиши нивои утврђени последњег дана производње. Садржај нитрита почетног дана производње био је нижи од 150 mg/kg, што је у складу са Правилником о прехранбеним адитивима (2013). У случају сва три произвођача садржај нитрита у готовим производима кретао се у оквиру препоручених вредности, односно, од 5 до 15 mg/kg (Cassens; 1997).

Увидом у резултате испитивања може се запазити да је основни хемијски састав готових суцук кобасица био мање уједначен, него што је то био случај код сремских кобасица. Када су у питању подаци из литературе везани за индустријску производњу суцука, у чији састав улази масно ткиво, Operta i sar. (2006) наводе садржај воде од 24,1%, садржај масти од 42%, садржај беланчевина од 27,7%, садржај кухињске соли од 3,3% и садржај пепела од 4,7%, установљен у узорцима готових кобасица у погону само једног произвођача. Наведени резултати најближи су вредностима установљеним у случају кобасица произвођача А, од којих се разликују по нижем садржају воде и нешто вишем садржају масти и беланчевина.

Резултати мерења рН вредности свеже израђених суцук кобасица незнатно су виши од резултата изнетих у раду Operta и sar. (2012) (рН= 5,5) а знатно нижи од

вредности које наводе Kozaciński и сар. (2008) ( $pH= 6,1$  до  $6,3$ ). Укупно гледано, може се констатовати да је поступак ферментације довео до пада  $pH$  вредности суцук кобасица код сва три произвођача али у различитом обиму. Најнижа вредност установљена је у кобасицама произвођача А, узоркованим 7. дана производње, што може да се објасни чињеницом да је у надеву датих производа GDL био присутан у нешто већој количини (1,2%), у односу на уобичајене вредности за ферментисане кобасице, које се крећу од 0,5 до 1% (Lucke, 2000), као и да су дати производи били подвргнути вишој температури ферментације (Материјал и методе; табела 2), што је, такође, могло да допринесе израженијем паду  $pH$  вредности. С друге стране, највиша  $pH$  вредност установљена у узорцима готовог суцук произвођача Д у складу је са чињеницом да у саставу надева за кобасице датог произвођача није био коришћен GDL, већ само глукоза у мањој количини (Материјал и методе; табела 2). Услед наведеног, може се констатовати да суцук произвођача А и Г спада у категорију киселих ( $pH < 5,3$ ), док суцук произвођача Д спада у категорију слабо киселих ферментисаних кобасица ( $pH \geq 5,3$ ) (Incze, 2004).

Активност воде у свеже израђеним суцук кобасицама у складу је са литературним подацима који се односе на тек израђени надев за дату категорију производа (Lucke, 2000). Након ферментације и почетног периода сушења, уочава се изражени пад активности воде који је, ипак, нешто виши у односу на вредности код сремских кобасица узоркованих истог, средњег, дана производње. Међу разлозима нешто споријег снижавања  $a_w$  вредности у датом временском периоду потребно је узети у обзир чињеницу да је код произвођача А и Г промер суцук ( $\varnothing 38-42$  mm) био већи него код сремских кобасица ( $\varnothing 32-36$  mm), с обзиром на то да су за омотаче коришћена свињска црева. Ипак, одсуство GDL у суцуку датог произвођача имало је, вероватно, утицаја на појаву, такође, слабије израженог исушивања у односу на сремске кобасице, чији су произвођачи користили наведени адитив. На крају поступка сушења све суцук кобасице имале су активност воде испод 0,9 што их сврстава у микробиолошки стабилне производе који се могу чувати и на собној температури.

У погледу хигијенске оцене улазних сировина укупан број аеробних мезофила у месним обресцима намењеним производњи ферментисаних кобасица од свињског и говеђег меса, углавном, је био виши у односу на граничну вредност ( $\geq 10^5$  CFU/g), коју наводе Vesković-Moračanin и сар. (2011). У поређењу са резултатима претходних истраживања из дате области, где се вредност кретала између 4 и 5 log јединица (Comi и сар., 2005; Kozaciński и сар., 2008), ниво АСС у месним обресцима био је за до једну log јединицу виши. У обресцима и од свињског и од говеђег меса установљено је присуство *Escherichia coli* као индикатора фекалног загађења, као и повећан број *Enterobacteriaceae* ( $>5 \times 10^2$  cfu/g), изузев у случају произвођача Д, што уз повишени број АСС указује на незадовољавајућу ниво хигијене и потребу за бољом контролом у циљу побољшања хигијенског статуса улазних сировина како би се посредно умањио ризик присуства цревних патогена у крајњем производу.

Поступак уситњавања довео је до изразитог пораста бројности свих група микробиота (АСС, ЕВС, ЕСС) у узорцима од свињског и говеђег меса. Разлог наведене појаве представља повећање површине меса која је на располагању микроорганизмима, као и равномернији распоред микробиота изазван уситњавањем месних обрезак. Потребно је узети у обзир и ослобађање месног сока као извора лако доступних хранљивих материја чиме се повећава способност умножавања или могућност опоравка оштећених и стресираних микроорганизма приликом каснијег засејавања узорака на хранљиву подлогу (Castano и сар., 2002). Поред тога, микробиолошка



загађеност опреме за уситњавање (дробилица, уређај за млевање, кутер) утиче, такође, у различитом обиму, на повећање броја наведених микробиота у уситњеном месу. Када је у питању особеност производног поступка зависно од врсте производа, може се запазити да је повећање броја све три групе микробиота (АСС, ЕВС, ЕСС) било више изражено у случају уситњавања говеђег меса намењеног за производњу суцука, у односу на свињско месо намењено производњи сремских кобасица. Као могуће објашњење наведене разлике потребно је узети у обзир чињеницу да говеђе месо има грубље везивно ткиво, у односу на свињско месо, услед чега је потребно да се дуже подвргава поступку уситњавања чиме се омогућава и веће расејавање микроорганизама (FAO, 1985). Увидом у резултате јасно је да је ниво одржавања хигијене у оквиру датог производног корака од суштинског значаја, у погледу микробиолошке безбедности и одрживости крајњих производа. Као начин за остварење задовољавајућег хигијенског нивоа потребно је применити добру хигијенску праксу, која подразумева редовно чишћење и дезинфекцију (санитацију) опреме и спровођење НАССР плана. У оквиру НАССР плана, потребно је да производни корак уситњавања меса и масног ткива/припрема надева буде узет у обзир као потенцијална критична контролна тачка (ССР), у оквиру које би се спроводило редовно микробиолошко испитивање оцене успешности поступака чишћења и санитације опреме за уситњавање и мешање сировина.

У наредном кораку, додавање зачина и адитива довело је до приметног смањења нивоа ЕВС и ЕСС у надеву код сва три произвођача сремске кобасице, као и код произвођача Г у случају суцука. Као разлог могућег смањења бројности наведених микробиота може се узети у обзир присуство кухињске соли и нитрита, пре свега, али и могуће инхибиторно својство одређених супстанци пореклом из зачина (Drosinos, Skandamis и Mataragas, 2009; Adams и Moss, 2008).

Појава изразитог пораста броја ентеробактерија у надеву након поступка уситњавања, у случају произвођача Д, у чијим кобасицама је иста популација микроорганизама касније изразито опала (табела 4.3), могла би да буде, између осталог, последица разлике у физиолошком стању ентеробактерија у тренутку припреме надева, у односу на дате микроорганизме у надеву осталих произвођача. Потребно је узети у обзир чињеницу да је произвођач Д користио свеже охлађено месо (од животиња закраних дан пре производње кобасица) услед чега ентеробактерије нису претрпеле оштећења која настају приликом замрзавања и отапања (Sage и Inham, 1998), што је могло да им омогући бржи опоравак и умножавање на селективној подлози, у односу на ентеробактерије пореклом из претходно замрзаног меса. С друге стране, слабија прилагођеност на неповољне услове средине довела је до њиховог изразитог одумирања током ферментације и сушења, услед дејства система препрека, као што је присуство нитрита, смањивање концентрације молекуларног кисеоника, снижавање активности воде али вероватно и утицаја других за ентеробактерије неповољних чинилаца (Lucke, 2000). С тим у вези, Abee и Wouters (1999) наводе да патогени и микроорганизми узрочници квара хране у условима осмотског стреса, што је био случај са ентеробактеријама приликом замрзавања, могу да накупљају у себи супстанце помоћу којих постају отпорнији како на замрзавање, тако и на непосредно исушивање, као и на боравак у средини са вишом концентрацијом соли.

Када су у питању алиментарни патогени, присуство салмонеле установљено је у неким узорцима обрезака од свињског меса, уситњеног меса и масног ткива и готовог надева једног произвођача, као и уситњеног меса и масног ткива другог произвођача, док у случају трећег није установљена ни у једном узорку (табела 4.1). С друге стране, *E. coli* O157 је установљена у само једном узорку уситњеног меса и масног ткива у

оквиру једног погона за производњу суџука (табела 4.3). За разумевање наведене разлике у налазима потребно је узети у обзир утицај најмање два чиниоца. Налаз патогена зависи од њиховог присуства на крзну и у дигестивном тракту животиња намењених клању, као и од нивоа процесне хигијене датог производног погона, што се разликује међу произвођачима. Друго, уобичајена је појава да су патогени на површини меса и у самом месу присутни у врло малом броју и крајње неуједначеног распореда, услед чега је и резултат њиховог опоравка из узорака врло варијабилан (Schaffner и Smith, 2004). У случају произвођача В јасно је да загађење салмонелом потиче од месних обрезака, као улазне сировине, међутим, налаз патогена само у уситњеном месу, код произвођача А и Г, указује на могућност да, поред сировина, извор загађења може да представља и површина уређаја за дробљење, уситњавање и мешање, као и површина колица за превоз, односно, површина свих уређаја и опреме који се користе током фазе припреме надева. Узевши у обзир налаз патогена у узорцима месних обрезака, уситњеног меса и готовог надева, као и ограничену могућност редукације патогена у наредним корацима производње - ферментација и сушење (Getty и сар., 2000; Lucke, 2000), резултати истраживања јасно указују да контрола улазних сировина и ниво хигијене током припреме надева суштински утиче на микробиолошку безбедност крајњег производа.

Укупан број аеробних мезофила почетног дана производње врло је сличан вредностима добијеним испитивањем индустријски произведених сувих ферментисаних кобасица у Грчкој (Samelis и сар., 1998). Наведене вредности, међутим, за 1-1,5 логаритама су више у односу на резултате истраживања која су спровели Kozaciński и сар. (2008), Drosinos и сар. (2005) и Comi и сар. (2005). Нижи почетни број АСС наводе и Živković и сар. (2012), што је очекивано, с обзиром на то да је у датом случају испитивана сремска кобасица произведена у лабораторијским условима. Након ферментације и почетног периода сушења, односно, у узорцима средњег дана производње, број наведене групе микробиота повећан је за 1,5-2 логаритма, код оба типа производа, при чему је исти ниво установљен и у готовим кобасицама. Сличне вредности АСС у крајњим производима установљене су и у другим истраживањима (Capita и сар., 2006; Drosinos и сар., 2005; Samelis и сар., 1998; Živković и сар., 2012), са изузетком шпанске врсте ФСК („Androlla“), код које је просечна вредност износила 9 log јединица (Garcia Fontan и сар., 2002).

Код оба типа кобасица, непосредно након пуњења, ниво млечно киселинских бактерија релативно је низак (око 5 логаритама), услед одсуства употребе стартер култура. Упркос наведеном, захваљујући интензивном расту током ферментације и сушења, оне постају најзаступљенија група микробиота, са бројношћу од 8 до 9 log CFU/g, што је установљено у узорцима средњег и последњег дана производње. С тим у вези, Comi и сар. (2005) и Samelis и сар. (1998) напомињу да, услед изузетне прилагођености и брзе стопе умножавања, млечно киселинске бактерије чине најбројнију групу микробиота већ трећег дана од почетка ферментације. С обзиром на то да LAB спадају у мезофилне, микроаерофилне, халотолерантне и ацидорезистентне микроорганизме, њихова прилагођеност условима производње ферментисаних кобасица последица је, првенствено, пораста температуре околне средине, смањења парцијалног притиска кисеоника (тима и редокс потенцијала) и снижавања рН вредности садржаја.

Припадници породице *Enterobacteriaceae*, престају да се умножавају са почетком ферментације и одумиру или бивају сведени на минималан број на крају поступка сушења, с обзиром на то да су осетљиви на повишени садржај соли, закишељавање и касније исушивање производа (Vuković, 2012).

Код оба типа кобасица, у већини узорака уочава се изражени пад рН вредности, услед дејства ГДЛ-а, што уз касније снижавање  $a_w$  вредности (слике 4.1 и 4.2) ствара услове за умножавање млечно киселинских бактерија и њихово преовладавање у укупној биомаси производа а неповољну средину за припаднике породице *Enterobacteriaceae* и врсту *Escherichia coli* (табеле 4.1 и 4.3). Познато је, такође, да зачини садрже значајну количину мангана, неопходног за активност појединих есенцијалних ензима LAB, што, такође, доприноси успешности раста и доминацији наведене групе микробиота у укупној микробиолошкој слици производа (Adams и Moss, 2008).

Исход физичко-хемијских и биохемијских промена које се дешавају током ферментације и сушења представља одумирање непожељних и преовладавање технолошки пожељних микробиота у крајњем производу („microbiota shift“). Наведена појава може да се убрза употребом комерцијалних или аутохтоних млечно киселинских бактерија, чија примена осигурава жељени ток ферментације, уједначава параметре квалитета производа и утиче на сузбијање евентуално присутних патогена (Cenci-Goga и сар. 2012). Бројност LAB у готовим кобасицама код оба типа производа врло је слична резултатима добијеним испитивањем традиционалних кобасица у Италији, Грчкој и Шпанији, произведеним без употребе стартер култура (Fernandez-Lopez и сар., 2008; Capita и сар., 2006; Drosinos и сар., 2005), уз изузетак шпанског типа кобасице („Androlla“), код које је просечна вредност за око логаритам виша (Garcia Fontan и сар., 2002).

У погледу оцене микробиолошког квалитета сремских кобасица, засноване поређењем броја ЕВС и ЕСС у узорцима готових производа са вредностима које су у виду препорука изнели Gilbert и сар. (2000), може се констатовати да су сви узорци били на микробиолошки задовољавајућем нивоу (појединачни резултати нису приказани). У случају суџука, код произвођача А, на основу броја ентеробактерија, од шест узорака само један је био задовољавајући ( $<10^2$  CFU/g), док је микробиолошки квалитет код преосталих пет узорака био на прихватљивом нивоу (више од  $10^2$  а мање од  $10^4$  CFU/g). Код произвођача Г, по истом основу, свих шест узорака били су на прихватљивом нивоу, док су у случају произвођача Д сви узорци били микробиолошки задовољавајући. Када је у питању микробиолошки квалитет суџука оцењен на основу броја *E. coli*, може се констатовати да је у случају произвођача А само један узорак био на задовољавајућем ( $<20$  CFU/g), четири на прихватљивом ( $20-<100$  CFU/g) и један на незадовољавајућем нивоу ( $>100$  CFU/g) (резултати нису приказани). У случају произвођача Г само један узорак је био задовољавајући, док су два била на прихватљивом а три на микробиолошки незадовољавајућем нивоу. Код произвођача Д микробиолошки квалитет свих узорака суџук кобасица био је на задовољавајућем нивоу. У случају налаза узорака оцењених незадовољавајућим, што је био случај код произвођача А и Г, исти аутори препоручују даље узорковање и предузимање мера којима би се установило да ли се хигијенска пракса, у виду предусловних програма и НАССР плана, спроводи на одговарајући начин.

Салмонела је нађена у сировинама од свињског меса а *E. coli* O157 у сировинама од говеђег меса, током фазе припреме надева. Претходним истраживањем *E. coli* O157 у ланцу сировог говеђег меса у Србији потврђено је њено присуство у узорцима уситњеног меса и надева за сирове ферментисане кобасице (Nastasiјевић и сар., 2009). Потребно је напоменути да наведено истраживање није обухватило утврђивање присуства *E. coli* O157 у даљим корацима производње, односно, током поступка ферментације и сушења. У овом истраживању присуство наведених патогена испитивано је и средњег и последњег дана производње али њихово присуство није

потврђено ни у једном узорку кобасица масе 25 грама, ни у једном погону (табеле 4.1 и 4.3). Наведени налаз у случају оба патогена, највероватније је последица њиховог ниског почетног броја као и антагонистичког дејства LAB, удруженог са другим неповољним условима средине (значајно присуство кухињске соли и нитрита, ниска рН и  $a_w$  вредност), што је исходило одумирањем датих микроорганизама или преласком у стање из ког се не могу култивисати (Nightingale и сар., 2006; Riordan и сар., 2000).

Остаје, ипак, питање да ли би патогени били потупно уништени и тиме одсутни из крајњег производа када би њихов почетни број био већи. Ниво редукације патогена током уобичајених поступака производње сувих ферментисаних кобасица, просечно, износи од једну до две лог јединице и само изузетно може да достигне вредности и до 3 log јединице (Holck и сар., 2011; Lucke, 2000). Потребно је, међутим, узети у обзир научно утемељену претпоставку да почетна контаминација сировог свињског и говеђег меса салмонелом и ешерихијом ентерохеморагичног патотипа може бити и виша од наведене (Sauer и сар., 1997). Управо из датог разлога неопходна је потпуна елиминација патогена из ФСК, односно, мера којим би се могла постићи редукација од пет и више лог јединица током производног поступка (Anon., 2001). Редукацијом од највише неколико лог јединица, оствареном током стандардног начина производње не може се поуздано обезбедити елиминација патогена из крајњих производа, због чега су потребна даља истраживања.

#### **4.2 ПРЕЖИВЉАВАЊЕ СОЈЕВА *SALMONELLA* TYPHIMURIUM, *ESCHERICHIA COLI* O157 И *LISTERIA MONOCYTOGENES* ТОКОМ ПОСТУПКА ПРОИЗВОДЊЕ ФЕРМЕНТИСАНИХ СУВИХ КОБАСИЦА И ЊИХОВЕ НАКНАДНЕ ПАСТЕРИЗАЦИЈЕ**

Постоји свега неколико студија о топлотној обради готових ферментисаних сувих кобасица у циљу редукације бактеријских патогена (Heig и сар., 2013; Rode и сар., 2012; Shay и Souness, 1995; Glass и Doyle, 1989). У оквиру наведених истраживања, међутим, постигнути су различити резултати у погледу сузбијања инокулисаних микроорганизама и стиче се утисак да особености физичко-хемијских параметара и микробиолошке одлике датог типа кобасица имају утицаја на ниво редукације. Управо из наведених разлога главни циљ другог дела истраживања био је да се оцени могућност редукације патогена пастеризацијом готових свињских и говеђих ФСК (сремска кобасица и суџук), типичних производа од меса у Србији, употребом температурних режима који ће омогућити накнадну сензорну анализу производа.

##### **4.2.1 Основни микробиолошки параметри неинокулисаних кобасица**

Неинокулисане непастеризоване кобасице произведене су у лабораторијским условима да би послужиле као контролне групе ради праћења параметара производње и одлика производа по типу индустријски произведене сремске кобасице и суџука. Резултати испитивања основних микробиолошких група лабораторијски произведених кобасица дати су у табели 4.5.

Укупан број аероба у контролним сремским кобасицама 0. дана био је нижи за 0,3 до 0,6 log јединица од вредности добијених испитивањем комерцијалних производа (табела 4.5). Број ентеробактерија био је приближно исти као код сремских кобасица

произвођача В, односно, за 0,4 log јединице виши него код произвођача А а за 0,8 log јединица нижи него код произвођача Б. Сличан однос установљен је и у погледу нивоа *E. coli*, тако да је наведени микроорганизам у контролним кобасица почетног дана производње био за само 0,2 log јединице нижи него у узорцима кобасица произвођача В, за 0,7 log јединица виши него код произвођача А а за чак 1,6 log јединица нижи него у кобасицама произвођача Б, узоркованих у истој фази производње. У свим узорцима број LAB био је прилично уједначен и вредност наведене групе микробиота у контролним кобасицама почетног дана производње била је готово истоветна као у случају комерцијалних производа.

**Табела 4.5.** Заступљеност ( $\log_{10}$  CFU/g  $\pm$  SD) основних група микробиота на почетку и на крају лабораторијске производње кобасица од свињског и говеђег меса

Време	Укупан број аероба	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i>	Млечно киселинске бактерије
<b>Сремска кобасица</b>				
0. дан	5,9 $\pm$ 0,1	3,8 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,2	5,7 $\pm$ 0,2
крај производње (15. дан)	8,4 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,2	0	8,6 $\pm$ 0,2
промена броја	+ 2,5	- 2,1	- 1,8	+ 2,9
<b>Суџук</b>				
0. дан	6,0 $\pm$ 0,2	3,2 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,6	5,5 $\pm$ 0,2
15. дан*	8,2 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,2	0	8,3 $\pm$ 0,1
промена броја	+ 2,2	- 1,1	- 1,2	+ 2,8

У контролним сремским кобасицама на крају поступка производње укупан број аероба био је за 0,4 log јединице нижи него у готовим кобасицама произвођача В а за 0,6, односно, 1,1 log јединицу виши него у готовим кобасицама произвођача А и Б, наведеним редом (табеле 4.1 и 4.5). Може се запазити да су ентеробактерије преживеле у мањем броју у контролним кобасицама, након 15. дана производње, што није био случај када су у питању сремске кобасице произведене у комерцијалним условима, код којих наведене микробиоте нису биле установљене. Присуство *E. coli* није детектовано примењеном методом у контролним кобасицама на крају производног поступка, што је истоветно налазу као када су питању комерцијални производи.

У контролним суџук кобасицама 0. дана производње укупан број аероба био је приближно једнак налазу утврђеном у кобасицама произвођача Д, док је у поређењу са кобасицама произвођача А и Г био виши за 0,3, односно, 1,2 log јединице, наведеним редом (табеле 4.3 и 4.5). Ниво ентеробактерија био је приближно исти као у кобасицама произвођача А, односно, за 0,3 log јединице нижи него код произвођача Г а за чак 1,5 log јединица виши него код произвођача Д. У контролним суџук кобасицама 0. дана производње *E. coli* је била присутна на занемарљиво ниском нивоу, тако да је вредност датог индикатора била за 1,1 до 4,2 log јединице нижа у односу на вредности у комерцијалним производима.

Укупан број аероба у контролним суџук кобасицама на крају производног поступка истоветан је вредностима установљеним испитивањем готових индустријских

производа (табела 4.3). Број ентеробактерија био је за 0,3 log јединице виши него у кобасицама произвођача Д а за око 1 log јединицу нижи у односу на вредности установљене у кобасицама произвођача А и Г. Присуство *E. coli* примењеном методом није установљено у готовим контролним сузук кобасицама, што је истоветно налазу као у случају произвођача Д, тако да је ниво наведеног индикатора у датим кобасицама био за 1,3 и 2,1 log јединицу нижи у односу на вредности у кобасицама произвођача А и Г, наведеним редом.

Почетни број основних група микробиота (АСС, *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, LAB) у кобасицама и од свињског и од говеђег меса, био је релативно висок (табела 4.5). Слабији хигијенски статус сировина и/или производног окружења произвођача који је обезбедио све састојке кобасица могао би бити узрок оваквог налаза. Ипак, ниво АСС и LAB на почетку и на крају производног поступка, био је у оквиру опсега вредности установљених код комерцијално произведених кобасица, у датим фазама производње, у неким другим истраживањима (Comi и сар., 2005; Drosinos и сар., 2005; Fontana, Cossconcelli и Viognolo, 2005). Почетан налаз индикатора фекалног загађења, уз значајније присуство ЕВС, представља могући ризик од присуства патогена, попут *S. Typhimurium* и *E. coli* O157 (Tortorello, 2003) али то није био случај у овом истраживању, с обзиром на то да су кобасице биле подвргнуте испитивању на присуство наведених патогена и њихово присуство није било установљено.

#### 4.2.2 Микробиолошки параметри патогена инокулисаних у кобасице

У инокулисаним кобасицама праћена је бројност одабраних патогена и промене два значајна физичко хемијска параметра ( $a_w$  и рН) током производног поступка, као и складиштења у трајању од 45 дана и добијени резултати су дати табелама 4.6 и 4.7. Промене рН и  $a_w$  вредности у инокулисаним кобасицама од свињског и говеђег меса кретале су се на уобичајени начин и могу се сматрати типичним за ФСК (табеле 4.6 и 4.7). Изузетак је била нешто нижа почетна  $a_w$  вредност него што је очекивано, највероватније као последица замрзавања и одмрзавања сировина пре уситњавања, као и складиштења на хладном у трајању од 24 часа. Током ферментације, односно, закишељавања производа које је у сремској кобасици, у односу на сузук, било нешто јаче изражено и бржег тока, рН вредност је опала до најнижег нивоа као последица дејства GDL и активности млечно киселинских бактерија, да би, затим, током сушења и складиштења, услед смањивања количине млечне киселине и све израженије протеолизе, дошло до њеног благог пораста. Активност воде у сремској кобасици почела је да опада за време ферментације док је код сузуча та појава настала са почетком сушења, при чему је најнижа вредност установљена на крају производног поступка. У току складиштења установљен је незнатан пораст  $a_w$  вредности што је, највероватније, последица прегруписавања преостале воде у кобасицама.

Уобичајени производни поступак код инокулисаних кобасица од свињског меса довео је до смањења броја *S. Typhimurium* за 1,4 log јединица, у односу на почетни ниво (табела 4.6). Увидом у појединачне дане узорковања може се запазити да је изражено смањење броја наведене врсте патогена наступило већ током ферментације, услед израженог пада рН вредности а тиме и појачаног дејства нитрита, да би, очекивано, одумирање било настављено и за време периода сушења. У другим истраживањима утврђен је већи обим редукције салмонеле, који је износио од 2 до 4,8 log CFU/g (Porto-Fett и сар., 2008; Nightingale и сар., 2006; Ihnot и сар., 1998; Nissen и Holck, 1998). Једно од могућих објашњења наведене разлике јесте чињеница да су у поменутом

истраживањима коришћене стартер културе чија је примена могла да допринесе израженијем умањењу бројности датог патогена. Током складиштења вакуум упакованих кобасица, очекивано, није дошло до значајнијих регистрованих физичко-хемијских промена али је број салмонела наставио да опада, што се може објаснити потребом за појачаним утрошком енергије у циљу одржавања унутрашње равнотеже (хомеостазе) у неповољним животним условима, услед чега временом долази до одумирања ћелије (Leistner, 2000). Након 45 дана складиштења при температури од +4 °C степена, број салмонела је опао за 1,9 log јединица, што је значајно мање од 3,5 логаритама, колико су установили Porto-Fett и сар., (2008). Насупрот томе, Ihnot и сар. (1998) и Nissen и Holck (1998) установили су редуцију мању од 1,7 log јединица након 56 дана, односно, мање од једног логаритма након 25 дана складиштења, наведеним редом.

**Табела 4.6.** Промена бројности одабраних бактеријских патогена и промене основних физичко хемијских параметара инокулисаних сремских кобасица током лабораторијског производног поступка и складиштења

Време	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	pH	a <sub>w</sub>
	log <sub>10</sub> CFU/g ± SD			
0. дан *	5,9 ± 0,1	5,8 ± 0,1	5,50	0,93
4. дан *	5,2 ± 0,1	5,0 ± 0,1	4,80	0,91
8. дан *	5,1 ± 0,2	5,0 ± 0,1	4,85	0,88
15. дан *	4,5 ± 0,1	5,0 ± 0,1	4,86	0,85
25. дан **	3,7 ± 0,2	4,7 ± 0,1	н.и.	н.и.
30. дан **	3,4 ± 0,2	4,5 ± 0,2	4,94	0,85
60. дан **	2,6 ± 0,2	4,1 ± 0,2	4,93	0,86
Редуција током производног поступка	1,4	0,8	0,67	0,08
Укупна редуција током производног поступка и складиштења	3,3	1,7	0,60	0,07

\* Производни поступак; \*\* Складиштење; SD – стандардна девијација; н.и. – није испитивана

Смањење броја *Escherichia coli* серотипа O157 након завршетка производног поступка суцук кобасица износило је 1,3 log јединица (табела 4.7). Увидом у појединачне дане узорковања може се запазити да је са снижавањем pH вредности дошло и до смањења броја наведеног патогена али у мањем обиму него што је то био случај код *S. Typhimurium* у сремским кобасицама (табела 4.6). Након средњег, (8). дана производње уочава се изражено снижавање активности воде са истовремено израженим падом броја наведеног патогена, чија је редуција настављена и током складиштења, тако да је укупно забележено 2,6 log јединица након 6 недеља од почетка процеса (табела 4.7). Главни разлог редуције, највероватније, представља удружено неповољно дејство ниске pH и a<sub>w</sub> вредности, присуства нитрита и компетитивног дејства LAB, као и у случају салмонеле. Ниво редуције *E. coli* O157 током производног поступка у

другим истраживањима се кретао од 1 до 3,5 log (Holck и сар., 2011; Getty и сар., 2000). Примећено је да је редукација наведеног патогена била нешто нижа од редукације салмонеле у кобасицама од свињског меса (табеле 4.6 и 4.7), што може бити, првенствено, последица веће отпорности *E. coli* на киселине, у односу на салмонеле (Olesen и Jespersen, 2010; McClure и сар., 2000). Нешто виша рН вредност у говеђим, у односу на кобасице од свињског меса, такође би могла да има удела у датом запажању (табеле 4.6 и 4.7).

Током поступка производње *Listeria monocytogenes* је у кобасицама од свињског и говеђег меса редукована за, свега, 0,8, односно, 0,5 log јединица, наведеним редом. Након 45 дана складиштења исти патоген је опао за 0,9 log јединица у кобасицама од свињског меса, док је у говеђим ниво остао непромењен (табела 4.6 и 4.7). Резултати су у складу са налазима других истраживања, у којима су кобасице инокулисане великим бројем патогена и произведене употребом стартер култура (Porto-Fett и сар., 2008; Nightingale и сар., 2006; Nissen и Holck, 1998). С друге стране, у ФСК произведеним без стартер култура Bunčić, Raunović и Radišić (1991) забележили су већи обим редукације *L. monocytogenes* (>2,5 log јединица), док су Čaklović и сар. (2005) испитујући различите типове кобасица током производног поступка, установили опсег редукације од 1 до 5 log јединица. Наведене разлике у резултатима истичу утицај додатних чинилаца, као што су параметри ферментације и сушења, иницијална бројност патогена, као и особине самих изолата употребљених у различитим истраживањима (Nightingale и сар., 2006; Koutsomanis и Sofos, 2005; Thevenot и сар., 2005). Нижи ниво редукације *L. monocytogenes*, у односу на *S. Typhimurium* и *E. coli* O157, највероватније је последица познате отпорности наведеног патогена на факторе околне средине, нарочито на присуство већег садржаја кухињске соли и исушивање (Anon., 2014b; Lado и Yusef, 2006).

**Табела 4.7.** Промена бројности одабраних бактеријских патогена и промене основних хемијских параметара инокулисаних сузук кобасица током лабораторијског производног поступка и складиштења

Време	<i>Escherichia coli</i> O157	<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	рН	a <sub>w</sub>
	log <sub>10</sub> CFU/g ± SD			
0. дан*	6,1 ± 0,1	5,9 ± 0,1	5,58	0,93
4. дан*	5,9 ± 0,1	5,6 ± 0,2	5,22	0,93
8. дан*	5,7 ± 0,1	5,7 ± 0,1	5,08	0,91
15. дан*	4,8 ± 0,2	5,4 ± 0,1	5,25	0,83
30. дан**	3,7 ± 0,2	5,3 ± 0,1	5,3	0,84
60. дан**	3,5 ± 0,4	5,3 ± 0,1	5,32	0,84
Редукација током производног поступка	1,3	0,5	0,33	0,1
Укупна редукација током производног поступка и складиштења	2,6	0,6	0,26	0,09

\* Производни поступак; \*\* Складиштење; SD – стандардна девијација



#### 4.2.3. Термички третмани готових ферментисаних кобасица

Резултати из претходног дела истраживања указују на чињеницу да готове ФСК могу да садрже патогене, посебно када су почетно присутни у великом броју. Наведена чињеница представља опасност у погледу безбедности хране и јавног здравља, када су у питању сва три патогена. *E. coli* O157 се, међутим, посебно истиче с обзиром на то да и када је присутна у веома малом броју може да доведе до појаве болести. Због тога је испитана примена додатне мере безбедности – пастеризација готових производа.

Прелиминарна истраживања (резултати нису приказани), указују да пастеризација кобасица од свињског меса на температури вишој од 53 °С а говеђих кобасица на температури вишој од 59 °С доводи до неприхватљивог нарушавања њихових сензорних својстава. Разлике у температурама одражавају разлике у засићености масних киселина и тачкама топљења масти за оба типа наведених кобасица. Стога су овом истраживању примењени третмани пастеризације нижи од наведених температура, односно, за *S. Typhimurium* 47 °С, 50 °С и 53 °С а за *E. coli* O157 54 °С, 57 °С и 59 °С. Да би се сагледао утицај повишене температуре на сојеве *L. monocytogenes* примењени су поступци топлотне обраде који очигледно нарушавају сензорна својства производа. На основу прелиминарних испитивања установљено је да третман мора бити виши од 64 °С, због чега су одабране температуре од 66 °С и 68,5 °С.

Током пастеризације, са порастом температуре расла је и брзина загревања кобасица, у складу са очекивањима (табела 4.8). За време хлађења уочен је исти тренд односно, што је температура кобасице била виша то је брзина опадања температуре била већа. Добијени резултати могу бити од користи код процене времена потребног за постизање жељене температуре у оквиру дате категорије производа.

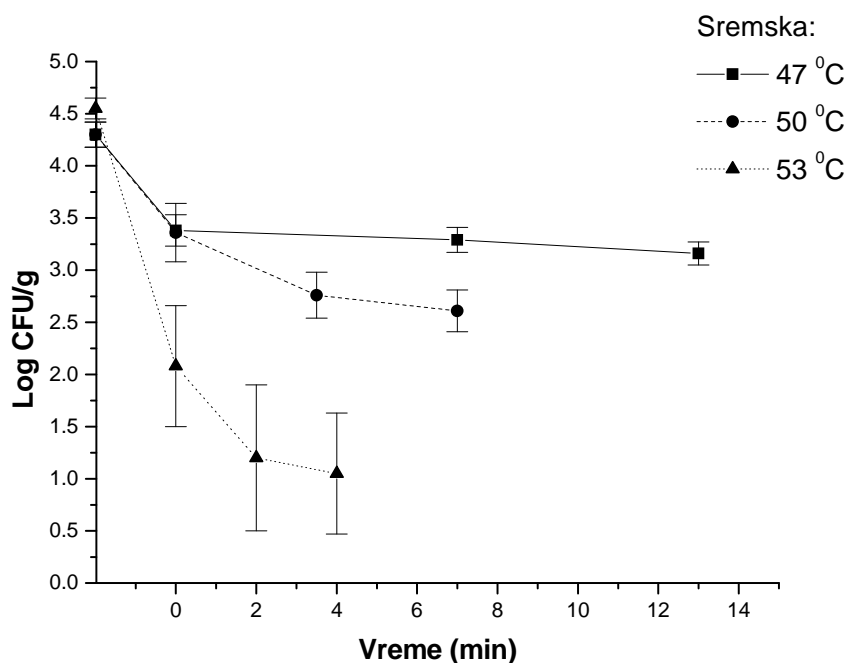
**Табела 4.8.** Брзина загревања и хлађења сувих ферментисаних кобасица подвргнутих поступцима пастеризације

Третман	Сремска кобасица				Сузук			
	Пастеризација при температури (°С)				Пастеризација при температури (°С)			
	47	50	53	66	54	57	59	66
Брзина (°С/min)								
Загревање*	0,7	0,9	1,0	1,2	0,8	1,0	1,0	1,3
Хлађење**	0,5	1,3	1,5	2,6	1,8	2,1	2,3	2,6
* Брзина загревања од почетних 22,5 °С до наведене крајње вредности пастеризације								
** Брзина хлађења од наведене крајње вредности пастеризације до 25 °С								

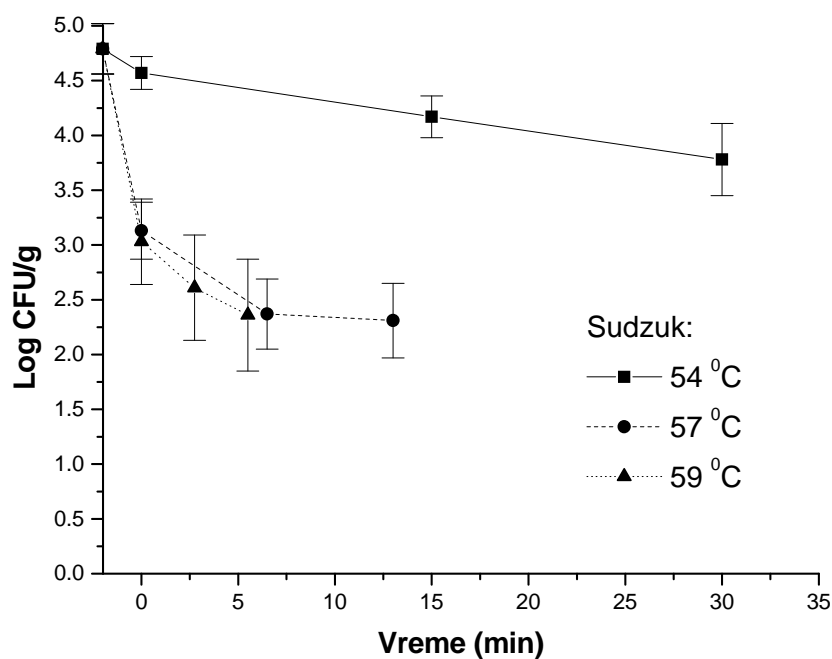
Инактивација сва три патогена праћена је кроз три временске тачке и то утврђивањем броја наведених микроорганизама у тренутку када је жељена температура постигнута у средишту кобасице, као и током њеног трајања. Потребно је напоменути да је приликом одређивања нивоа редукције микроорганизама у случају све три временске тачке урачунат и утицај последичног периода хлађења (слике 4.3-4.5).

Приликом засејавања узорака топлотно обрађених кобасица коришћена је техника преливања неселективне, селективном подлогом када су у питању *Salmonella Typhimurium* и *E. coli* O157 што је у складу са препорукама других аутора (Kang и Fung,

2000; Riordan и сар., 2000; Getty и сар., 2000) а предност наведеног начина је потврђена и у прелиминарним истраживањима у оквиру ове дисертације (резултати нису приказани).

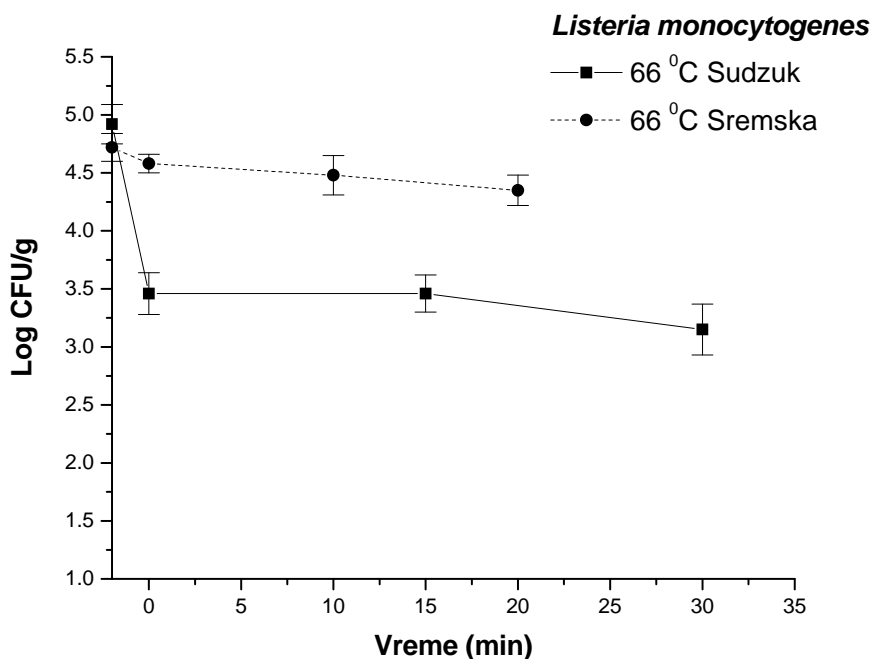


Слика 4.3. Редукција *Salmonella* Typhimurium током термичких третмана сремске кобасице



Слика 4.4. Редукција *Escherichia coli* O157 током термичких третмана сузука

Поступак за одређивање присуства *L. monocytogenes* подразумевао је непосредно засејавање узорака на селективну подлогу. Прелиминарним испитивањем (резултати нису приказани) установљено је да нема значајне разлике у преживљавању *L. monocytogenes* непосредно засејане на селективну, у односу на поступак засејавања на триптон соја агар и накнадно преливање селективном подлогом а што је у складу са претходним налазом у раду Nightingale и сар. (2006).



Слика 4.5. Редукција *Listeria monocytogenes* током термичких третмана сремске кобасице и сузуча

Утицај топлоте на патогене праћен је и у фази загревања до одабраних температура пастеризације (слике 4.3-4.5). У том погледу загревањем сремске кобасице до температура од 47 °C и 50 °C установљена је истоветна редукција *S. Typhimurium*, на нивоу од 0,9 log јединица, док је загревањем до температуре од 53 °C ниво редукције износио чак 2,5 log јединице. Када је у питању *E. coli* O157, загревање до температуре пастеризације од 54 °C довело је до смањења бројности за само 0,2 log јединице, док је у случају пастеризација при температурама од 57 °C и 59 °C загревањем остварена знатно већа редукција, нивоа од 1,6 и 1,7 log јединица, наведеним редом. Редукција *L. monocytogenes* остварена загревањем сремске кобасице до температура 66 °C, односно 68,5 °C износила је приближно 0,1 log јединицу, док је загревањем сузуча до истих температура остварен значајно већи обим редукције, са вредностима од 1,5 и 1,6 log јединица, наведеним редом. Увидом у резултате може се констатовати да већ током загревања долази до значајног смањења броја *S. Typhimurium* и *E. coli* O157, што доприноси успешности саме пастеризације, нарочито када су у питању више температуре топлотне обраде. У погледу укупне микробиолошке безбедности топлотно обрађених готових сувих ферментисаних кобасица треба имати у виду и смењење броја патогена остварено, претходно, током производног поступка. С тим у вези, Rode и сар. (2012) су у циљу достизања нивоа редукције ентерохеморагичног патотипа *E. coli* од

5 логаритама узели у обзир, поред учинка топлотне обраде готових ФСК (24h/43 °C), који је износио до 4,1 log јединица, и редуkcију остварену поступком производње, чија је вредност достигала око 1,8 log јединица.

#### 4.2.3.1 Време децималне редуkcије (D вредност) и релативна терморезистентност микроорганизама (Z вредност)

За сва три патогена, на основу температура, времена загревања и броја преживелих ћелија израчунате су D вредности, односно, исказано је време потребно за редуkcију од 1 log јединице (90% од почетног броја патогена). Позната је чињеница да током топлотне обраде микроорганизми одумиру постепено тако да при одређеној температури у једнаком временском размаку одумиру један исти део или проценат од популације, односно, њихов број се смањује логаритамски (Vuković, 2012). Математички образац одумирања микроорганизама дефинисан кинетичком кривом првог реда најједноставнији је начин објашњења природе леталитета микроорганизама под утицајем топлоте, зрачења или дезинфекционих средстава и то је уобичајени приступ одређивања D вредности којим се, у већини случајева, успешно описује делотворност одређеног поступка (Stringer, George и Peck, 2000).

Време децималне редуkcије (D време) за *Salmonella* Typhimurium, утврђено у кобасицама од свињског меса пастеризованим на 50 °C указује да је за редуkcију од 6,5 log јединица потребно да пастеризације траје 40 до 50 минута, односно, 20 минута за температуру од 53 °C (табела 4.9).

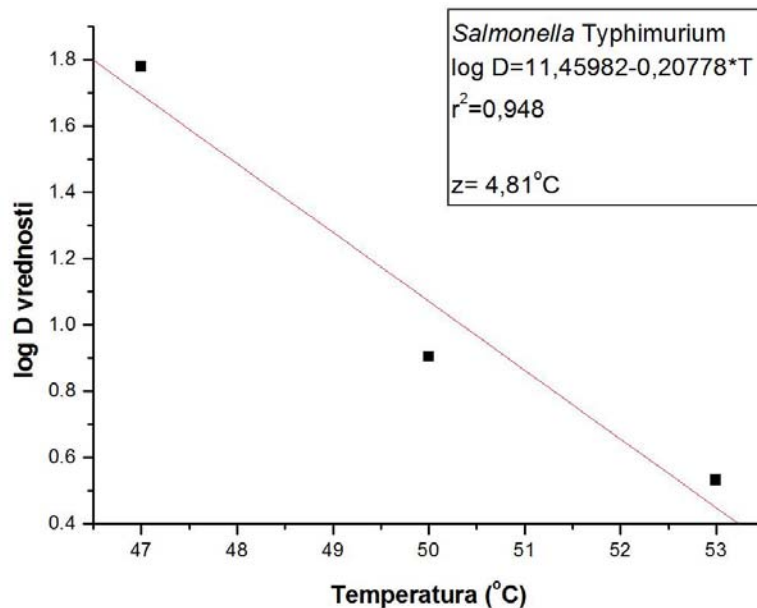
**Табела 4.9.** Време потребно за дејство одабраних температура ради постизања жељеног нивоа инактивације *Salmonella* Typhimurium и *Listeria monocytogenes* током пастеризације сремске кобасице

Температура пастеризације (°C)	<i>Salmonella</i> Typhimurium			<i>Listeria monocytogenes</i>
	D вредност (min.)	r <sup>2</sup>	Време потребно за 6,5 log <sub>10</sub> редуkcије	D вредност (min.)
47	60,0	0,978	390,0	н.и.
50	8,0	0,919	52,0	н.и.
53	3,4	0,857	22,1	н.и.
66	н.н.	н.н.	н.н.	87,4*

D вредност – вредност децималне редуkcије; н.и. – није утврђена због недовољно израженог дејства; н.н. - није утврђена због неприхватљивог нарушавања квалитета производа; \* одређена је али уз неприхватљиво нарушавања квалитета производа

Наведени температурно временски режими могли би бити прихватљиви у индустријској производњи, с обзиром на то да време топлотне обраде у производној траци када су у питању мале кобасице, као што је франкфуртска, износи 30 до 70 минута (Hanson, 2004). С друге стране, пастеризација на 47 °C захтева више часова за постизање редуkcије салмонеле од 6,5 логаритама (табела 4.9) и можда не би била прихватљива у склопу индустријске производње.

Отпорност микроорганизама на различитим температурама, односно, њихова релативна терморезистентност назива се Z вредност. Z вредност за салмонелу у кобасицама од свињског меса приказана је на слици 4.6.



Слика 4.6. Z вредност за *Salmonella* Typhimurium утврђена у сремској кобасици

На основу D времена за *E. coli* O157 одређеног у говеђим кобасицама пастеризованим на 54 °C, за редукцију од 5 log јединица потребно је око три часа, за температуру од 57 °C 1 до 1,5 часова, док је за температуру од 59 °C потребно 40 до 50 минута (табела 4.10).

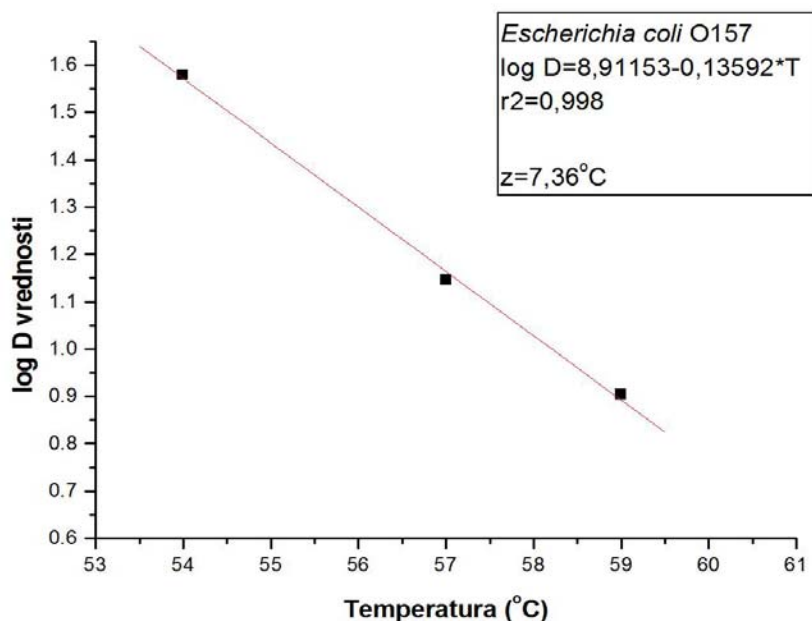
**Табела 4.10.** Време потребно за дејство одабраних температура ради постизања жељеног нивоа инактивације *Escherichia coli* O157 и *Listeria monocytogenes* током пастеризације суџук кобасице

Температура пастеризације (°C)	<i>Escherichia coli</i> O157			<i>Listeria monocytogenes</i>
	D вредност (min.)	r <sup>2</sup>	Време потребно за 6,5 log <sub>10</sub> редукције	D вредност (min.)
54	37,9	0,999	189,5	н.и.
57	14,0	0,805	70,0	н.и.
59	8,0	0,979	40,0	н.и.
66	н.н.	н.н.	н.н.	101,8*

D вредност - вредност децималне редукције; н.и. – није утврђена због недовољно израженог дејства; н.н. - није утврђена због неприхватљивог нарушавања квалитета производа; \* одређена је али уз неприхватљиво нарушавање квалитета производа

Сви наведени режими могли би да буду прихватљиви у склопу индустријске производње, при чему су последња два, због краћег времена извођења, нарочито погодни. Z вредност за *E. coli* O157 у говеђим кобасицама приказана је на слици 4.7.

Уочава се да је  $Z$  вредност *E. coli* O157 знатно већа у односу на *Salmonella* Typhimurium, што указује на њену већу топлотну отпорност и спорије одумирање при дејству истих температура у ферментисаним сувим кобасицама. Као један од могућих разлога наведене појаве потребно је узети у обзир мање изражену киселост суцука у односу на сремску кобасицу, с обзиром на то да се топлотна отпорност микроорганизама смањује снижавањем рН вредности средине у којој се налазе (Clavero, Beuchat и Doyle, 1996).



Слика 4.7.  $Z$  вредност за *Escherichia coli* O157 утврђена у суцук кобасици

$D$  и  $Z$  вредности су врло променљиве величине на чији резултат утиче дејство бројних чинилаца везаних за саме микроорганизме и средину у којој се налазе. Сходно томе, ради успешније примене топлоте у циљу редукције одређеног патогена, препоручује се утврђивање наведених вредности за сваку појединачну врсту или барем категорију производа на коју се топлотни третман односи (King и сар., 2014; Stringer, George и Peck, 2000).

Прелиминарна истраживања (резултати нису приказани) указују да  $D$  време за *Listeria monocytogenes* у оба типа кобасица, пастеризованим на температурама испод 66 °C, нема практичан значај с обзиром на то да је степен инактивације наведеног патогена био изузетно низак. С друге стране, квалитет кобасица загреваних на 66 °C и 68,5 °C био је, очигледно, нарушен тако да нису подвргнуте сензорној анализи. Из наведених разлога, приказано је једино  $D$  време добијено на 66 °C у циљу илустрације да је чак и на датој температури потребно да пастеризација траје 1,5 до 2 часа за свега 1 логаритам редукције (табеле 4.9 и 4.10). Прописом у САД намењеном спречавању накнадног загађења хране спремне за јело узрочницима листериозе (Anon., 2014) произвођачи се обавезују да након завршетка производног поступка, као једну од могућности, примене додатне мере безбедности чија успешност мора да се потврди остваривањем најмање једног логаритма редукције наведеног патогена.

*Listeria monocytogenes* се показала као значајно отпорнији патоген у оба типа кобасица, тако да су потребна даља истраживања како би се утврдили најповољнији

поступци за смањење њеног броја до прихватљивог нивоа у ФСК. Узимајући у обзир да *L. monocytogenes* не расте у ФСК (табеле 4.6 и 4.7) и да се у многим земљама број до 100 ћелија по граму садржаја сматра прихватљивим у храни спремној за јело (ЕС, 2073/2005) у којој не може да расте, поставља се питање да ли је потпуна елиминација из ферментисаних сувих кобасица неопходна у случајевима малог почетног броја патогена и поузданих мера за спречавање њиховог умножавања. Увођење додатних мера безбедности за постизање редукције *L. monocytogenes* неопходно је једино у државама у којима није дозвољено присуство наведеног патогена у ФСК или су у питању производи намењени извозу на дато тржиште (Anon., 2014b; Cabeza и сар., 2009).

#### 4.2.4 Сензорна анализа термички третираних кобасица

У сврху сензорне оцене инокулисане готове кобасице подвргнуте су топлотним режимима који имају способност да умање број салмонела за 6,5 и *E. coli* O157 за 5 лог јединица и оцењиване у поређењу са инокулисаним кобасицама које нису подвргуте топлотној обради. Добијени резултати су дати у табели 4.11. Резултати указују да су кобасице обе врсте пастеризоване на благо повишеним температурама, не само очувале сензорна својства, већ да су у неким случајевима и донекле боље оцењене од непастеризованих. Једина негативна последица топлотних третмана сувих ферментисаних кобасица је измашћивање (Shay и Souness, 1995) али је примећено у умереном обиму.

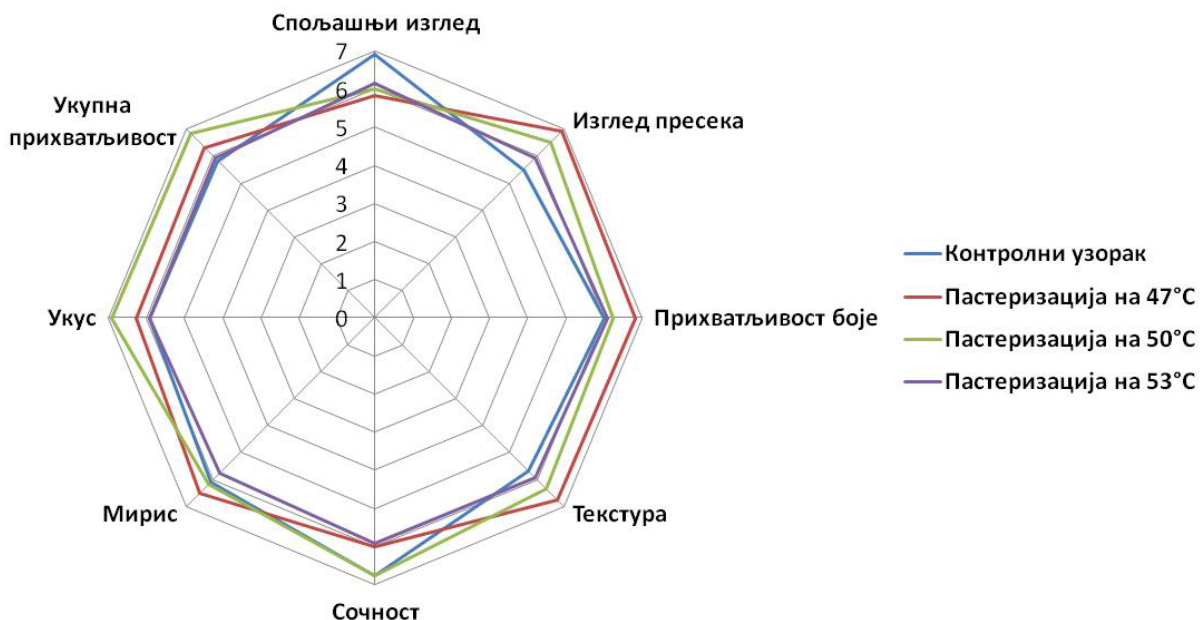
**Табела 4.11.** Промене укупне сензорне прихватљивости сувих ферментисаних кобасица подвргнутих одабраним режимима пастеризације

Температурно временски режим пастеризације <sup>б</sup>	Укупна сензорна прихватљивост <sup>а</sup> кобасица <sup>б</sup>		
	А. Непастеризоване	Б. Пастеризоване	Промена укупне сензорне прихватљивости (Б – А)
<b>Сремска кобасица</b>			
47 °C / 6,5 h	5,83 ± 0,26	6,33 ± 0,26	+ 0,50 <sup>D</sup>
50°C / 52,0 min.	5,83 ± 0,26	6,83 ± 0,26	+ 1,00 <sup>D</sup>
53°C / 22,1 min.	5,83 ± 0,26	5,92 ± 0,38	+ 0,09
<b>Сузук кобасица</b>			
54 °C / 3,16 h	5,83± 0,41	6,83 ± 0,26	+ 1,00 <sup>D</sup>
57 °C / 70 min.	5,83± 0,41	5,92 ± 0,49	+ 0,09
59 °C / 40 °C min.	5,83± 0,41	6,50 ± 0,31	+ 0,67 <sup>D</sup>
D – разлика вредности Б у односу на А је статистички значајна (P < 0,05); <sup>а</sup> – утврђена оценом сензорног панела применом скале бодовања од 1 до 7; <sup>б</sup> – нису инокулисане патогенима; <sup>в</sup> – у циљу постизања 6,5 log <sub>10</sub> редукције <i>S. Typhimurium</i> у сремској кобасици, односно, 5 log <sub>10</sub> редукције <i>E. coli</i> O157 у сузучу.			

Добра оцена сензорних својстава или чак преферирање топлотно обрађених кобасица, у смислу њихове пожељне укупне прихватљивости, заснива се на оцени сензорног панела који је обучен и упознат са овим типичним производима у Србији (табела 4.11).

Потребно је нагласити да се из наведених разлога резултати сензорног панела не могу екстраполирати и не могу непосредно протумачити као избор потрошача и у другим земљама. Резултати истраживања су показали да пажљиво одабрана пастеризација по завршетку производње ФСК, усклађена са особинама сировина и типом кобасица, може да смањи до прихватљивог нивоа безбедности (мање од 1 CFU/25 g) присуство салмонеле и *E. coli* O157 у кобасицама од свињског, односно, говеђег меса а да сензорни квалитет крајњег производа остане очуван.

Осим укупне прихватљивости, сензорни панел је извршио оцену и других, појединачних, сензорних својстава третираних производа. На основу података представљених на слици 4.5, уочљиво је да се поступак пастеризације при свим испитиваним температурама (47 - 53 °C), негативно одражава на спољашњи изглед сремске кобасице, у односу на контролни узорак (слика 4.8). Међутим, пастеризацијом се генерално побољшава изглед пресека кобасице, боја, текстура и укупна прихватљивост, при чему су највеће оцене сензорне анализе за прва три наведена параметра добијене при температури од 47 °C. У погледу сочности, укуса и укупне прихватљивости, кобасице подвргнуте пастеризацији на 50 °C испољиле су боља својства у односу на контролне узорке. Пастеризација сремске кобасице на температури од 53 °C генерално посматрано не утиче или се негативно одражава на праћена сензорна својства производа. Сходно томе, може се закључити да се пастеризацијом сремске кобасице при одабраним температурама (47 - 50 °C), у значајној мери могу побољшати сензорна својства наведеног производа.



Слика 4.8. Сензорна својства сремске кобасице зависно од услова пастеризације

Температура пастеризације углавном не утиче на појединачна сензорна својства сузика (слика 4.9). Изузетак је пастеризација на 54 °C након које долази до побољшања одлика производа, у односу на контролни узорак, у погледу сочности, мириса, укуса и укупне прихватљивости наведеног типа кобасице.





Слика 4.9. Сензорна својства судук кобасице зависно од услова пастеризације

Литературни подаци указују да се не може исказати општи став о могућностима примене благих или умерених температура у сврху пастеризације готових ферментисаних сувих кобасица, с обзиром на специфичности сваког појединачног типа производа али и перцепције потрошача. Тако су Shay и Souness (1995) загревали саламе до постизања температуре од 55 °C, при чему су наведени производи били нешто слабије оцењени по питању боје али су имали чвршћу и мање масну текстуру, што је наведено као предност у односу на контролне узорке. Најважнији налаз сензорног панела, међутим, представља значајно боља оцена укуса и укупне прихватљивости топлотно обрађених кобасица, у односу на контролне, нетретираних узорке. С друге стране, Johnson и сар. (2000) наглашавају да су пеперони загревани до постизања температуре од 60 °C били значајно слабије боје и текстуре, док је укус тако обрађених производа био у складу са резултатима контролних узорака. Neir и сар., (2013) су подвргли саламу и норвешки тип суве ферментисане кобасице „могг“ дејству три темепратурно временска режима: 1) 32 °C 6 дана; 2) 43 °C 24 часа и 3) 43 °C 1 час а затим 53 °C 6 часова. Укупна прихватљивост саламе била је нешто нижа код топлотног режима број 2, док је у случају преостала два третмана била иста као код контролних узорака. У погледу осталих испитиваних особина (боја, сланост укуса, масност укуса, текстура), статистички значајно слабијим резултатом оцењена је боја као и сланост укуса салама обрађених температурним режимом 3, док је текстура истих и производа подвргнутих топлотном режиму 3 била изразито боља, у односу на контролне узорке. Када је у питању „могг“ кобасица, оцене укупне прихватљивости топлотно обрађених и контролних узорака нису се статистички значајно разликовале и једино је сланост укуса кобасица обрађених топлотним режимима 2 и 3 била статистички значајно слабије оцењена. Исти аутори напомињу да су након 6 недеља складиштења на +4 °C, у вакуум паковањима, укупна прихватљивост али и друге особине код третираних кобасица,

унапређене, тако да је резултат оцењивања био исти или чак бољи у односу на контролне узорке.

Укупно посматрано у другој фази овог истраживања испитана је способност преживљавања *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157 и *Listeria monocytogenes* током производње и складиштења инокулисане сремске кобасице и суџука, које су изабране као типичне суве ферментисане кобасице од свињског и говеђег меса у Србији. Испитана је и могућност пастеризације готових ФСК, као додатне мере безбедности засноване на утврђивању D вредности за сваку од одабраних температура и сваки од патогена. На основу обима редукције инокулисаних микроорганизама утврђеном током поступка производње и складиштења, може се закључити да је њихово присуство у готовим производима могуће нарочито уколико су иницијално присутни у већем броју. Примена благо повишених температура од 47 °C до 53 °C у случају *Salmonella* Typhimurium и нешто виших температура за *Escherichia coli* O157, у распону од 54 °C до 59 °C, довела је до успешне редукције наведених патогена. С друге стране, број *Listeria monocytogenes* незнатно је опао тек при температури пастеризације од 66 °C и 68,5 °C, чија је примена неприхватљива због израженог нарушавања сензорних својстава третираних производа. Према оцени сензорног панела укупна прихватљивост сремске кобасице обрађене температурама од 47 °C и 50 °C у трајању потребном за редукцију *Salmonella* Typhimurium од 6,5 log јединица и суџука обрађеног температуром од 54 °C и 59 °C са циљем редукције *Escherichia coli* O157 на нивоу од 5 log јединица оцењена је статистички значајно бољом у односу на непастеризоване контролне узорке. У том смислу, истраживање је показало да оптимизација пастеризације у смислу усклађености благо повишених температура и времена загревања са типом меса од ког је кобасица израђена, као и циљаним патогенима чију елиминацију желимо да постигнемо, може да обезбеди производ сигуран за потрошаче а чија сензорна својства нису значајније измењена.

## 5. ЗАКЉУЧАК

На основу резултата испитивања одабраних микробиолошких и физичко-хемијских параметара у оквиру индустријске производње сремске кобасице и суџука може се закључити:

- У месним обресцима, индустријске производње ФСК у Србији, укупан број аеробних мезофила и број *Enterobacteriaceae*, у већини узорака био је повишен, што заједно са присуством *Escherichia coli* указује на незадовољавајући хигијенски статус и потребу боље контроле улазних сировина;
- Присуство *Salmonella* у појединим узорцима месних обрезака, уситњеног меса и масног ткива и у једном узорку надева, као и присуство *E. coli* O157 у једном узорку уситњеног меса и масног ткива, непосредно указује на незадовољавајући статус улазних сировина и незадовољавајући ниво процесне хигијене током фазе припреме надева, у датим погонима;
- У циљу подизања нивоа хигијене НАССР план би могао да обухвати корак уситњавања меса и масног ткива, односно, припрему надева, као потенцијалну критичну контролну тачку;
- Ниво и начин измене основних група микробиота, као и физичко-хемијских параметара (рН,  $a_w$ ) током производног поступка обе врсте кобасица у складу је са литературним подацима који се односе на дату категорију производа;
- На основу броја индикатора (ЕВС и ЕСС) у готовим производима, микробиолошки квалитет сремских кобасица, као и суџук кобасица произвођача Д био је на задовољавајућем нивоу. У случају произвођача А и Г, поједини узорци суџука били су на микробиолошки незадовољавајућем нивоу што указује на потребу предузимања мера побољшања хигијенске праксе производних поступака у датим погонима;

На основу резултата испитивања преживљавања сојева *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes* током поступка производње ферментисаних сувих кобасица и њихове накнадне пастеризације може се закључити:

- Уобичајени производни поступак, на лабораторијском нивоу, инокулисаних сремских кобасица довео је до смањења броја *S. Typhimurium* за 1,4 а *L. monocytogenes* за 0,8 log јединица, док је у случају инокулисаних суџук кобасица довео до смањења броја *E. coli* O157 за 1,3 а *L. monocytogenes* за 0,5 log јединица, у односу на почетни ниво, који је износио око 6 log јединица. Наведени резултати потврђују претпоставку да готове ФСК могу да садрже патогене, уколико су почетно присутни у великом броју;
- Време децималне редукције (D време) за *Salmonella* Typhimurium у сремским кобасицама пастеризованим на 50 °C указује да је за редукцију од 6,5 log јединица потребно 40 до 50 минута, односно, 20 минута на температури од 53 °C а више часова у случају температуре од 47 °C;

- На основу D времена за *E. coli* O157, одређеног у суцук кобасицама пастеризованим на 54 °C за редукују од 5 log јединица потребно је око три часа, на температури од 57 °C 1 до 1,5 часова, док је на температури од 59 °C потребно 40 до 50 минута;
- Z вредност за *E. coli* O157 знатно је већа у односу на *Salmonella* Typhimurium, што потврђује њену већу топлотну отпорност и спорије одумирање при дејству истих температура у ферментисаним сувим кобасицама;
- Степен инактивације *Listeria monocytogenes* при примењеним температурама пастеризације обе врсте кобасица изузетно је низак, односно, потребно је дејство температуре од 66 °C у трајању од 1,5 до 2 часа за редукују од свега 1 log јединице;
- Термички третман сремске кобасице на 47 °C, 50 °C и 53 °C и суцука на 54 °C, 57 °C и 59 °C није довео до нарушавања сензорних својстава производа. У појединим случајевима, оцене сензорног панела биле су више него када су у питању непастеризовани узорци;
- Истраживање је показало да оптимизација пастеризације у смислу усклађености благо повишених температура и времена загревања са низом других чинилаца, као и циљаним патогенима чија се елиминација жели постићи, може да обезбеди производ сигуран за потрошаче а да сензорна својства нису значајније измењена.

## 6. ЛИТЕРАТУРА

1. Abee, T. & Wouters, J. A. (1999) Microbial stress response in minimal processing. *International Journal of Food Microbiology* 50, 65-91.
2. ACMSF (Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food), (1995) Report on Verotoxigenic-producing *Escherichia coli*. HMSO London UK. (ISBN0113219091).
3. Adams, M., & Moss, M. (2008). Food microbiology (3rd ed.). Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry.
4. Aguirrezabal, M.M., Mateo, J., Dominguez, M.C., Zumalacarregui, J.M. (2000) The effect of paprika, garlic and salt on rancidity in dry sausages. *Meat Science* 54, 77-81.
5. Albano, H., van Reenen, C. A., Todorov, S. D., Cruz, D., Fraga, L., Hogg, T., et al. (2009). Phenotypic and genetic heterogeneity of lactic acid bacteria isolated from “alheira”, a traditional fermented sausage produced in Portugal. *Meat Science*, 82, 389–398.
6. Alley, G., Cours, D. & Demeyer, D. (1992) Effect of nitrate, nitrite and ascorbate on color and color stability of dry, fermented sausage prepared using back slopping. *Meat Science* 32, 279–287.
7. Al-Nabulsi, A. A. & Holley, R. A. (2007) Effects on *Escherichia coli* O157:H7 and meat starter cultures of bovine lactoferrin in broth and microencapsulated lactoferrin in dry sausage batters *International Journal of Food Microbiology* 113, 84–91.
8. Ambrosiadis, J. Soultos, N. Abraham, A. Bloukas, J.G. (2004) Physicochemical, microbiological and sensory attributes for the characterization of Greek traditional sausages. *Meat Science* 66, 279–287.
9. American Meat Institute (1982). Good manufacturing practices, fermented dry and semi-dry sausages. American Meat Institute. AMI, Washington D.C, USA.
10. American Meat Institute (1982). Safe handling: sausage. American Meat Institute. AMI, Washington D.C, USA.
11. AMIF (American Meat Institute Foundation). (1997) Good Manufacturing Processes for Fermented Dry & Semi-dry Sausage Products. Dostupno na: <http://www.amif.org/FactsandFigures/SAUSAGE.pdf>.
12. Ammor, S. M. &, Mayo, B. (2007) Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science* 76, 138–146.
13. Angelika, F., Tschape, H. & Karch, H. (2007) *Clinical Infectious Diseases*; 45:39–45.
14. Anon. (2000). Interim guidelines for the control of verotoxinogenic *Escherichia coli* including *E. coli* O157:H7 in ready to eat fermented sausages containing beef or a beef product as an ingredient. Guideline no. 12. Issued by Food Directorate. Health Protection Branch, Health Canada.
15. Anon. (2001). Performance standards for the production of processed meat and poultry products; proposed rule U.S. Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service.
16. Anon. (2002) Review of Processing Requirements for Uncooked Comminuted Fermented Meat (UCFM) Products. Draft Assessment Report, Proposal P251. Food Standards, Australia New Zealand.
17. Anon. (2003) Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on verotoxigenic *E. coli* (VTEC) in foodstuffs (pp. 1–64). European Commission.
18. Anon. (2007) National Department of Agriculture Republic of South Africa; Meat Inspectors Manual: Abatior Hygiene. Dostupno na: <https://www.westerncape.gov.za/assets/departments/agriculture/abattoirhygienemanual.pdf>

19. Anon. (2009) Health Protection Agency. Guidelines for Assessing the Microbiological Safety of Ready-to-Eat Foods. London, UK.
20. Anon. (2014a) Food Safety Authority of Ireland. Guidelines for the interpretation of results of microbiological testing of ready-to-eat foods placed on the market (Revision 1). Dostupno na: [https://www.fsai.ie/publications\\_GN3\\_microbiological\\_limits](https://www.fsai.ie/publications_GN3_microbiological_limits)
21. Anon. (2014b) FSIS Compliance Guideline: Controlling *Listeria monocytogenes* in Post-lethality Exposed Ready-to-Eat Meat and Poultry Products. Dostupno na: <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/d3373299-50e6-47d6-a577-e74a1e549fde/Controlling-Lm-RTE-Guideline.pdf?MOD=AJPERES>
22. Apaydin, G., Ceylan, Z. G., & Kaya, M. (2009) The behaviour of *E. coli* O157:H7 in sucuk. *Journal of Food Processing and Preservation*, 33, 827–836.
23. Arvanitoyannis, I. S., Varzakas, T. H. & Tserkezou, P. (2009) Meat and Meat Products. In Arvanitoyannis, I. S. HACCP and ISO 22000 Application to Foods of Animal Origin. Chichester, UK: Blackwell Publishing Ltd.
24. Avery, S. (2006) Microbial food-borne pathogens. In Buncic, S. (Ed.) Integrated food safety and veterinary public health. Wallingford, UK: CABI International Publishing.
25. Aymerich, MT., Martín B., Garriga M. & Hugas M. (2003) Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Applied and Environmental Microbiology* 69:4583–4594.
26. Bacus, J. (1984). Utilization of Microorganisms in Meat Processing. Letchworth: Research Studies Press LTD.
27. Bacus, J. N. (1986). Fermented meat and poultry products. In A. M. Pearson, & T. R. Dutson (Eds.), Meat and poultry microbiology: Vol. 2. Advances in meat research (pp. 123e164). Westport, CT: AVI Publishing.
28. Barbuti, S. & Parolari, G. (2002) Validation of manufacturing process to control pathogenic bacteria in typical dry fermented products. *Meat Science* 62, 323–329.
29. Barbuti, S., & Parolari, G. (2002) Validation of manufacturing process to control pathogenic bacteria in typical dry fermented products. *Meat Science* 62, 323–329.
30. Behling, R. G., Eifert, J., Erickson, M. C., Gurtler, J. B., Kornacki, J. L., Lane, E., Radcliff, R., Ryser, E. T., Stawick, B., & Yan, Z. (2010) Selected pathogens of concern to industrial food processors: Infectious, toxigenic, toxico-infectious, selected emerging pathogenic bacteria, chapter 2. In: Kornacki J. L. (Ed.) Principles of microbiological troubleshooting in the industrial food processing environment. New York, USA: Springer.
31. Beneduce, L., Spano, G. & Massa, S. (2003) *Escherichia coli* O157:H7 general characteristics, isolation and identification techniques. *Annals of Microbiology* 53, 511–527.
32. Benkerroum, N., Daoudi, A., Hamraoui, T., Ghalfi, H., Thiry, C., Duroy, M., Evrart, P., Roblain, D & Thonart, P. (2005) Lyophilized preparations of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* as potential protective adjuncts to control *Listeria monocytogenes* in dry-fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology* 98, 56-63.
33. Berger-Jekić, O., Janković, M., Jovanović, M., Lukić, M. & Marković, Lj. (1997) Specijalna bakteriologija. Beograd, Srbija: Zavod za udžbenike.
34. Berry, E.D., Wells, J. (2010) *Escherichia coli* O157:H7: Recent Advances in Research on Occurrence, Transmission, and Control in Cattle and the Production Environment. In: Taylor, Steve L. (Ed.) Advances in Food and Nutrition Research. Volume 60. Burlington: Elsevier.
35. Besser, R. E., Griffin P. M., & Slutsker L. (1999) *Escherichia coli* O157:H7 gastroenteritis and the hemolytic uremic syndrome: an emerging infectious disease. *Annual Review of Medicine* 50, 355-67.
36. Bierne, H., Sabet, C., Personnic, N. & Cossart, P. (2007) Internalins: A complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. *Microbes and Infection* 9,1156–1166.

37. Blagojevic, B., Antic, D., Adzic, B., Tasic, T., Ikonic, P., & Buncic, S. (2015) Decontamination of incoming beef trimmings with hot lactic acid solution to improve microbiological safety of resulting dry fermented sausages e a pilot study. *Food Control* 54, 144-149.
38. Bohnsack, U., & Hope, H. U. (1990). The shelf life of pieces of fresh meat as a function of degree of comminution. *Fleischwirtschaft*, 70, 786–788.
39. Boles, J.A. & Pegg, R. (2005) Meat color. *Montana State University and Saskatchewan Food Product Innovation Program*. University of Saskatchewan. Dostupno na: <http://animalrange.montanaedu/courses/meat/meatcol.pdf>.
40. Bone, A., Noel, H., Le Hello, S., Pihier, N., Danan, C., Raguenaud, M. E., Salah, S., Bellali, H., Vaillant, V., Weill, F. X., Jourdan-da Silva, N (2010) Nationwide outbreak of Salmonella enterica serotype 4,12:i:- infections in France, linked to dried pork sausage, March-May 2010: rapid communications. *Euro Surveillace* 15: 19592.
41. Bonilauri, P., Morganti, M., Scaltriti, E., Chiapponi, C., Leonelli, R., Colli, A., et al. (2013) Familiar outbreak of monophasic Salmonella Typhimurium traced back to salami, Italy, January 2013. In *Proceedings of meeting "Societa Italiana delle Scienze Veterinarie"*, Brescia, Italy. Navarro, C., MacDonald, D., Middleton, D., Landry, L., Vrbova, L. & Lior, L. Y. (2006) Outbreak of Salmonella Typhimurium phage type U302 in Ontario, spring 2005. *Canada Communicable Disease Report* 32-07, 7.
42. Bonomo M.G., Ricciardi, A., Zotta T., Parente, E. & Salzano, G. (2008) Molecular and technological characterization of lactic acid bacteria from traditional fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy). *Meat Science* 80, 1238–1248.
43. Bothma, C., Hugo, A., Osthoff, G., Joubert, C.C., Swarts, J. C., de Kock, H. L. (2014) Effect of dietary conjugated linoleic acid supplementation on the technological quality of backfat of pigs. *Meat Science* 97, 277-286.
44. Bover-Cid, S., Miguelez-Arrizado, M. J., Latorre Moratalla, L. L. & Vidal Carou, M. C. (2006) Freezing of meat raw materials affects tyramine and diamine accumulation in spontaneously fermented sausages. *Meat Science* 72 62–68.
45. Bremer, V., Leitmeyer, K., Jensen, E., Metzger, U., Meczulat, H., Weise, E., Werber, D., Tschaeppe, H., Kreienbrock, L., Glaser, S. & Ammon, A. Outbreak of Salmonella Goldcoast infections linked to consumption of fermented sausage, Germany 2001. *Epidemiology & Infection* 132, 881–887.
46. Brown, M. H., Gill, C. O., Hollingsworth, J. et al. (2000) The role of microbiological testing in systems for assuring the safety of beef. *International Journal of Food Microbiology* 62, 7–16.
47. Bruna, J. M., Hierroa, E. M., Hoz, L., Mottram, D. S., Fernandez, M. & Ordonez, J. A. (2003) Changes in selected biochemical and sensory parameters as affected by the superficial inoculation of *Penicillium camemberti* on dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology* 85, 111 –125.
48. Bryson, P. D. (1996) Comprehensive review in toxicology for emergency clinicians. (3rd ed.) Denver, USA: Taylor & Francis
49. Buncic S.; Paunovic L.; Radisic D., 1991: The fate of listeria monocytogenes in fermented sausages and in vacuum packaged frankfurters. *Journal of Food Protection*. 54(6): 413-417.
50. Buncic, S. & Avery, S. (2004) In Devine, C. & Dikeman, M. (Eds.), *Encyclopedia of meat sciences*. Oxford, UK: Elsevier.
51. Buncic, S. (2006) Meat safety management at the abattoir. In Buncic, S. (Ed.) *Integrated food safety and veterinary public health*. Wallingford, UK: CABI International Publishing.
52. Bunčić, S. (Ed.) *Guide for development and implementation of prerequisite programmes and HACCP principles in food production (1st Ed.)*. Serbian Ministry of Agriculture, Forestry and Waters, Veterinary Directorate, Belgrade, Serbia (In Serbian). Dostupno na: [http://www.mpt.gov.rs/download/HACCP\\_vodic.pdf](http://www.mpt.gov.rs/download/HACCP_vodic.pdf)

53. Buncic, S., Steinhäuserova, I., Smulders, F., Paulsen, P., Braun, P., Albert, T. & Steinhäuser, L. (2012) The Food Research, Safety and Training Network (FRST-NET) initiative, step one: Issues relevant for meat safety assurance at abattoir level. *Maso International* 2, 83-93.
54. Buvens, G. & Pierard, D. (2012) Infections with verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 and other serotypes, including the outbreak strain O104:H4.
55. Byelashov O., Carlson, B., Geornaras, I., Kendall, P., Scanga, J. & Sofos, J. (2009) Fate of post-processing inoculated *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged pepperoni stored at 4, 12 or 25C. *Food Microbiology* 26, 77–81.
56. Cabeza, M.C., de la Hoz, L., Velasco, R., Cambero, M.J., Ordóñez, J.A., 2009. Safety and quality of ready-to-eat dry fermented sausages subjected to E-beam irradiation. *Meat Science* 83, 320–327.
57. Callewaert, R., Hugas, M. & De Vuyst, L. (2000) Competitiveness and bacteriocin production of *Enterococci* in the production of Spanish-style dry fermented sausages *International Journal of Food Microbiology* 57, 33–42.
58. Campagnol, P. C. B., dos Santos, B. A., Wagner, R., Terra, N. N., & Pollonio, M. A. R. (2011). The effect of yeast extract addition on quality of fermented sausages at low NaCl content. *Meat Science*, 87, 290-298.
59. Campbell J. F., (1979). Binding properties of meat blends, effects of salt type, blending time and post-blending storage. Ph.D. Thesis, Michigan State University.
60. Campbell-Platt, G., Cook, P.E., 1995. Fermented Meats. Blackie Academic and Professional, London.
61. Campus, M. (2010) High Pressure Processing of Meat, Meat Products and Seafood. *Food Engineering Reviews* 2, 256–273.
62. Capita, R., Llorente-Marigómez, S. Prieto, M. & Alonzo-Calleja, C. (2006) Microbiological profile, pH and titratable acidity of chorizo and salchichón (two Spanish dry fermented sausages) manufactured with ostrich, deer or pork meat. *Journal of Food Protection*. 69,1183-1189.
63. Caprioli, A., Morabito, S., Brugere, H. & Oswald, E. (2005) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary Research* 36, 289-311.
64. Casey, P., & Condon, S. (2000). Synergistic lethal combination of nitrite and acid pH on a verotoxin-negative strain of *Escherichia coli* O157. *International Journal of Food Microbiology* 55, 255–258.
65. Cassens, R. G. (1997) Composition and safety of cured meats in the USA. *Food Chemistry* 59, 561–566.
66. Castano, A., Garcia Fontan, M., Fresno, J. M., Tornadijo, M. E., & Carballo, J. (2002) Survival of Enterobacteriaceae during processing of Chorizo de cebolla, a Spanish fermented sausage. *Food Control* 13, 107-115.
67. Cenci-Goga, B. T., Rossitto, P. V., Sechi, P., Parmegiani, S., Cambiotti, V., & Cullor, J. S. (2012) Effect of selected dairy starter cultures on microbiological, chemical and sensory characteristics of swine and venison (Dama dama) nitrite-free drycured sausages. *Meat Science* 90, 599-606.
68. Centeno, J. A. & Carballo, J. (2014) Starter and adjunct microbial cultures used in the manufacture of fermented and/or cured ripened meat and dairy products. In Ravishankar, V. R. & Jamuna, A. B. (Eds) *Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods*. Boca Raton, USA: CRC Press.
69. Chacon, P. A., Muthukumarasamy, P. & Holley, R. A. (2006) Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 from Fermented Dry Sausages at an Organoleptically Acceptable Level of Microencapsulated Allyl Isothiocyanate. *Applied and Environmental Microbiology*, 3096–3102.



70. Chapman, P.A., C.A. Siddons, A.T. Cerdan Malo and M.A. Harkin. 2000. A one year study of *Escherichia coli* O157:H7 in raw beef and lamb products. *Epidemiology and Infection* 124, 207-213.
71. Chen, J. H. Ren, Y. Seow, J. Liu, T. Bang, W. S. & Yuk H. G. (2012) Intervention technologies for ensuring microbiological safety of meat: current and future trends. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11.
72. Chen, Q., Liu, Q., Sun Q., Kong B. & Xiong, Y. (2015) Flavour formation from hydrolysis of pork sarcoplasmic protein extract by a unique LAB culture isolated from Harbin dry sausage. *Meat Science* 100 110–117.
73. Chimalizeni, Y., Kawaza, K. & Molyneux, E. (2010) The epidemiology and management of non typhoidal salmonella infections. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 659, 33-46.
74. Choe, E. & Min. D. B. (2006) Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46, 1–22.
75. Chong, Y., Fitzhenry, R., Heuschkel, R., Torrente, F., Frankel, G., & Phillips, A. D. (2007) Human intestinal tissue tropism in *Escherichia coli* O157 :H7 – initial colonization of terminal ileum and Peyer’s patches and minimal colonic adhesion ex vivo. *Microbiology*, 153, 794–802.
76. Chouliara, I., Samelis, J., Kakouri, A., Badeka, A., Savvaidis, I. N., Riganakos, K., et al. (2006) Effect of irradiation of frozen meat/fat trimmings on microbiological and physicochemical quality attributes of dry fermented sausages. *Meat Science* 74, 303–311.
77. Clavero, M. R. S., Beuchat, L. R. & Doyle, M. P. (1998) Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from ground beef and bovine feces, and suitability of media for enumeration. *Journal of Food Protection* 61, 285-289.
78. Cocconcelli, P. S. & Fontana, C. (2008) Characteristics and applications of microbial starters in meat fermentation. In Toldra, F. (Ed.) *Meat Biotechnology*. New York, USA: Springer.
79. Cocolin, L., Dolci, P., Rantsiou, K., Urso, R., Cantoni, C. & Comi, G. (2009) Lactic acid bacteria ecology of three traditional fermented sausages produced in the North of Italy as determined by molecular methods. *Meat Science* 82, 125–132.
80. Considine, K. M., Kelly, A. L., Fitzgerald, G. F., Hill, C., & Sleator, R. D. (2008). High-pressure processing-effects on microbial food safety and food quality. *FEMS Microbiology Letters*, 281, 1-9.
81. Comi, G., Urso, R., Iacumin, L., Rantsiou, K., Cattaneo, P., Cantoni, C., et al. (2005) Characterisation of naturally fermented sausages produced in the north east of Italy. *Meat Science* 69, 381-392.
82. Commission Regulation (EC) No 852/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 on the hygiene of foodstuffs.
83. Connolly, J., Goldstone, R., Burgess K., Cogdell, R., Beatson, S., Vollmer, W., Smith, D., & Roe, A. (2015) The host metabolite D-serine contributes to bacterial niche specificity through gene selection. *The ISME Journal* 9, 1039–1051.
84. Cooper, K. K., Mandrell, R. E., Louie, J. W., Korlach, J., Clark, T. A., Parker, C.T. et al. (2014) Comparative genomics of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O145:H28 demonstrates a common evolutionary lineage with *Escherichia coli* O157:H7. *BMC Genomics*, 15:17.
85. Cornforth D. P. & Jayasingh, P. (2004) In C. Devine, & Dikeman (Eds), *Encyclopedia of meat sciences*. Oxford, UK: Elsevier.
86. Corral S., Salvador A., Flores M. (2013) Salt reduction in dry cured sausages affects aroma generation. *Meat Science* 93, 776–785.
87. Cotter P. D., Hill C. & Ross R. P. (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology* 3, 777–788.

88. Cowden, J. M., O'Mahony, M., Bartlett, C. L., Rana, C., Smyth, B., Lynch, D., Tillett, H., Ward, L., Roberts, D., & Gilbert, R. J. (1989). A national outbreak of *Salmonella typhimurium* DT124 caused by contaminated salami sticks. *Epidemiology and Infection*, 103, 219–225.
89. Čaklović, F., Kozačinski, L., Cvrtila, Ž., Vesković-Moračanin, S., Gasparik-Reichardt, J., Zdolec, N., Smajlović, M. & Alagić, D. (2005). Influence of selected LAB on *L. monocytogenes* during production of traditionally fermented sausages. *Tehnologija Mesa*, 46, 185-193.
90. Dalzini, E., Cosciani-Cunico, E., Bernini, V., Bertasi, B., Losio, M. N., Daminelli, P. & Varisco, G. (2015) Behaviour of *Escherichia coli* O157 (VTEC), *Salmonella Typhimurium* and *Listeria monocytogenes* during the manufacture, ripening and shelf life of low fat salami. *Food Control* 47, 306-11.
91. De Vuyst, L. & Leroy, F. (2007) Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology: a review*. 13, 194-199.
92. De Vuyst, L. & Vandamme, E. J. (1994) Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications. London, UK: Blackie Academic & Professional.
93. De Vuyst, L. & Vandamme, E. J. (1994): Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications. London, UK: Blackie Academic & Professional.
94. de W. Blackburn, C., Unilever, R. & Colworth, D. (2003) Microbiological analysis and food safety management: GMP and HACCP systems. In McMeekin, T. Detecting pathogens in food. Boca Raton, USA: CRC Press.
95. Demeyer, D. (2006). Meat fermentation: Principles and applications. In Hui (Eds) Handbook of food science, technology and engineering. Boca Raton, USA: CRC Press.
96. Demeyer, D., & Stahnke, L. (2002). Quality control of fermented meat products. In J. Kerry & D. Ledward (Eds). Meat processing, improving quality. Cambridge: Woodhead Publishing.
97. Demeyer, D. & Toldra, F. (2004) Fermentation. In Devine, C. & Dikeman, M. (Eds), Encyclopedia of meat sciences. Oxford, UK: Elsevier.
98. Desmond, E., (2006) Reducing salt: A challenge for the meat industry. *Meat Science* 74, 188–196.
99. Dolores Selgas, M. & Luisa Garcia, M. (2007) In Toldra, F. (Ed.) Handbook of Fermented Meat and Poultry. Ames, USA: Blackwell Publishing.
100. Dominguez, S. A., & Schaffner, D. W. (2009) Survival of *Salmonella* in processed chicken products during frozen storage. *Journal of Food Protection* 72, 2088–2092.
101. Donnelly, C. W & David G. Nyachuba, D. G. (2007) In Ryser, E. & Marth, E. (Eds) *Listeria, Listeriosis and Food Safety* (3<sup>rd</sup> ed.). Boca Raton, USA: CRC Press.
102. Doyle, M.P., Zhao, T., Meng, T. & Zhao, Z. (1997) *Escherichia coli* O157:H7. In: Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. Eds. M.P. Doyle, L.R. Beuchat and T.J. Montville, Washington D.C.: ASM Press 171-191.
103. Drosinos, E. H., Mataragas, M., Xiraphi, N., Moschonas, G., Gaitis, F., & Metaxopoulos, J. (2005). Characterisation of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Science* 69, 307-317.
104. Drosinos, E. H., Skandamis, P. N. & Mataragas, M. (2009) Antimicrobials Treatment. In Toldra, F. (Ed.) Safety of Meat and Processed Meat. New York, USA: Springer Science Business Media, LLC.
105. Duffy, E. A., Belk, K. E., Sofos, J. N., LeValley, S. B., Kain, M. K., Tatum, J. D., Smith, G. C. & Kimberling C. V. (2001) Microbial contamination occurring on lamb carcasses processed in the United States. *Journal of Food Protection* 64, 503 – 508.
106. Duffy, L. L., & Vanderlinde, P. B. (2000) *E. coli* and salami manufacture — Meeting the challenge of the ANZFA requirements. *Food Australia*, 52, 269–270.
107. Durand, P. (1999) Ingrédients et additives. In: P. Durand, (ed.) Technologies des Produits de Charcuterie et des Salaisons. Paris: Tec&Doc Editions, pp. 81–124.

108. Dykes, G. A. (2004) *Escherichia coli* O157:H7. In Devine, C. & Dikeman, M. (Eds), *Encyclopedia of meat sciences*. Oxford, UK: Elsevier.
109. EC (2011). European Commission Regulation (EU) No 1129/2011, European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives of 11 November 2011. *Official Journal of the European Union*, 295.
110. EC (2011). European Commission Regulation (EU) No 1129/2011, European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives of 11 November 2011. *Official Journal of the European Union*, 295.
111. EC (2002). European Commission Regulation (EU) No 178/2002, European Parliament and of the Council by laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. *Official Journal of the European Union*, 31/1.
112. EFSA (European Food Safety Authority), 2007. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) on monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types. *The EFSA Journal*, 579, 1-61.
113. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (2012). Scientific Opinion on a review on the European Union Summary reports on trends and sources zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2009 and 2010 – specifically for the data on *Salmonella*, *Campylobacter*, verotoxigenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and foodborne outbreaks. *EFSA Journal*, 10 (6): 2726, [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal).
114. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment. *EFSA Journal* 2013;11(4):3138.
115. Eisel, W. G., Linton, R. H., & Muriana, P.M. (1997) A survey of microbial levels for incoming raw beef, environmental sources and ground beef in a red meat processing plant. *Food Microbiology* 14, 273–282.
116. Emberland KE, Nygard K, Heier BT, Aavitsland P, Lassen J, Stavnes TL, Gondrosen B (2006) Outbreak of *Salmonella* Kedougou in Norway associated with salami, April-June 2006. *Eurosurveillance* 11(27):2995.
117. Erkkila, S., Venalainen, M., Hielm, S., Petaja, E., Puolanne, E. & Mattila-Sandholm, T. (2000) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry sausage fermented by probiotic lactic acid bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 2101-2104.
118. Escartin, E. F., Castillo, A., Hinojosa-Puga, A. & Saldana-Lozano, J. (1999). Prevalence of *Salmonella* in chorizo and its survival under different storage temperatures. *Food Microbiology* 16, 479–486.
119. Escartin, E. F., Lozano. S. J. & Garcia, R. O. (2000) Quantitative survival of native *Salmonella* serovars during storage of frozen raw pork. *International Journal of Food Microbiology* 54, 19–25.
120. Essien, E. (2003) *Sausage manufacture - Principles and practice*. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited.
121. Etcheverría A., Padola N. L. (2013). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: factors involves in virulence and cattle colonization. *Virulence* 4, 366–372.
122. Ethelberg, S., Smith, B., Torpdahl, M., Lisby, M., Boel, J., Jensen, T., Møller-Nielsen, E., & Mølbak, K. (2009) Outbreak of Non-O157 Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Infection from Consumption of Beef Sausage: brief report. *Clinical Infectious Diseases* 8,78–81.
123. ECDC - European Centre for Disease prevention and Control (2015) *Escherichia coli* (E. coli) Factsheet. Dostupno: [http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/escherichia\\_coli/basic\\_facts/pages/basic\\_facts.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/escherichia_coli/basic_facts/pages/basic_facts.aspx)
124. European Commission (2005) Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L338, 1-26.

125. Fadda, S., López, C. & Vignolo, G. (2010) Role of lactic acid bacteria during meat conditioning and fermentation: Peptides generated as sensorial and hygienic biomarkers. *Meat Science* 86, 66–79.
126. Faith, N. G., Parniere, N., Larson, T., Lorang, T. D., & Luchansky, J. B. (1997). Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in pepperoni during the manufacture of sticks and the subsequent storage of slices at 21, 4 and –20 degrees C under air, vacuum and CO<sub>2</sub>. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 47.
127. Faith, N. G., Parniere, N., Larson, T., Lorang, T. D., Kaspar, C. W. & Luchansky, J. B. (1998). Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in salami following conditioning of batter, fermentation and drying of sticks, and storage of slices. *Journal of Food Protection* 61, 377.
128. FAO/WHO (1979) *Report of a joint FAO/WHO Working Group on Microbiological Criteria for Foods*. Food and Agricultural Organization and the World Health Organization. Report number: Document WG/Microbiol./79/1.
129. FAO/WHO (2005) Code of hygiene practice for meat. Codex Alimentarius Commission. Food and agriculture Organization of the United States, World Health Organization, CAC/RCP 58-2005, 1–52.
130. Farber, J. M., Daley, E., Holley, R. & Osborne, W. R. (1993) Survival of *Listeria monocytogenes* during the production of uncooked German, American and Italian-style fermented sausages. *Food Microbiology* 10, 123-132.
131. FDA (Food and Drug Administration), 1999. Food Code. Washington DC. US Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Food and Drug Administration. United States Department of Agriculture.
132. Feiner, G. (2006) *Meat products handbook - Practical science and technology*, Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited.
133. Fellows, P. (2000) *Food processing technology*. (2nd ed.) Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited.
134. Fernandez-Lopez, J., Sendra, E., Sayas-Barbera, E., Navaro, C., & Perez-Alvarez, J. A. (2008) Physico-chemical and microbiological profiles of “salchichon” (Spanish dry-fermented sausage) enriched with orange fiber. *Meat Science* 80, 410-417.
135. Fite A, Dykhuizen R, Litterick A, Golden M & Leifert C. (2004) Effects of ascorbic acid, glutathione, thiocyanate, and iodide on antimicrobial activity of acidified nitrite. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 655-658.
136. Fontana, C., Cocconcelli, P. S. & Vignolo, G. (2005) Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. *International Journal of Food Microbiology* 103, 131 – 142.
137. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (1990) Animal production and health paper 79. Manual on simple methods of meat preservation. Dostupno na: <http://www.fao.org/docrep/003/x6932e/x6932e00.htm>
138. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (1985) Fermented sausages production. In Savic, I. V. Small-scale sausage production: Rome, Italy. Dostupno na: <http://www.fao.org/docrep/003/x6556e/X6556E00.htm>
139. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2007) Raw-fermented sausages. In Heinz, G. & Hautzinger, P. *Meat processing technology (for small to medium-scale producers)*: Bangkok, Thailand: Regional Office for Asia and the Pacific.
140. Bad Bug Book (Food and Drug Administration) (2012) *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*. Second Edition. [Pathogenic *Escherichia coli* group].
141. Food and Drug Administration (FDA) (2005) Food Code 2005. Recommendations of the United States Public Health Services, Food and Drug Administration . Springfield, Va.: National Technical Information Service Publication PB - 2005 - 102200 . Dostupno na:
142. Food Safety Authority of Ireland (2011) *Salmonella* species. Microbial factsheet series. Issue no. 1. Dostupno na: <https://www.fsai.ie/salmonellaspecies.html>

143. Food Standards Agency (FSA) (2006) Meat industry guide – Part 1. Guide to food hygiene & other regulations for the UK meat industry. Dostupno na:  
<http://www.food.gov.uk/sites/default/files/multimedia/pdfs/migpartone.pdf>
144. Fookes, M., Schroeder, G. N., Langridge, G. C., Blondel, C. J., Mammina, C., et al. (2011) *Salmonella bongori* provides insights into the evolution of the salmonellae. *PLoS Pathog* 7(8): e1002191. doi:10.1371/journal.ppat.1002191.
145. Fraqueza, M. J., Barreto, A. S., & Ribeiro, A. M. (2007) HACCP. In Toldra, F. (Ed.) *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. Ames, USA: Blackwell Publishing.
146. Fraqueza, M. J., Barreto, A. S. & Ribeiro, A. M. (2007) HACCP. In Toldra, F. (Ed.) *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. Ames, USA: Blackwell Publishing.
147. Fraqueza, M. J. & Barreto, A. S (2010) HACCP: Hazard Analysis Critical Control Point. In Toldra, F. (Ed.) *Handbook of Meat Processing*. Ames, USA: Blackwell Publishing.
148. Freese, E., Sheu, C.W. & Galliers, E. (1973) Function of Lipophilic Acids as Antimicrobial Food Additives. *Nature* 241, 321 – 325.
149. Friedrich, A. W., Zhang, W., Bielaszewska, M., Mellmann, A., Kock, R.,
150. FSIS (Food Safety and Inspection Service), (1993) Report on the *E. coli* O 157:H7 outbreak in the Western State. May 21, 1993, Food Safety and Inspection Service, United States Department of Agriculture.
151. Fung, D. Y. (2010) Microbial Hazards in Foods: Food-Borne Infections and Intoxications. In Toldra, F. (Ed.) *Handbook of Meat Processing*. Ames, USA: Blackwell Publishing.
152. G. Conedera, G., Mattiazzi, E., Russo, F., Chiesa, E., Scorzato, I., Grandesso, S., Bessegato, A., Fioravanti, A. & Caprioli, A. (2007) A family outbreak of *Escherichia coli* O157 haemorrhagic colitis caused by pork meat salami: short report. *Epidemiology and Infection* 135, 311–314.
153. Gagliardi, J. V. & Karns, J. S. (2000). Leaching of *Escherichia coli* O157:H7 in Diverse Soils under Various Agricultural Management Practices. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 877–883.
154. Garcia Fontan, M., Lorenzo, J., Parada, A., Immaculada, F., & Carballo, J. (2007) Microbiological characteristics of “androlla”, a Spanish traditional pork sausage. *Food Microbiology* 24, 52-58.
155. Garriga M. & Aymerich, T. (2009) Advanced Decontamination Technologies: High Hydrostatic pressure on meat products. In Toldra, F. (Ed.) *Safety of Meat and Processed Meat*. New York, USA: Springer Science Business Media, LLC.
156. Garriga, M., Marcos, B., Martin, B., Veciana-Nogues, M. T., Bover-Cid, S., Hugas, M., et al. (2005). Starter cultures and high pressure processing to improve the hygiene and safety of slightly fermented sausages. *Journal of Food Protection*, 68, 2341–2348.
157. Getty, K. K. & Cervený, J. (2010) Dry and Semi-Dry Fermented and Direct Acidified Sausage Validation. *En Rev. American Meat Science Association*, 11, 2-8.
158. Ghafir, Y., China, B., Dierick, K., Zutter, D. E. & Daube, G. (2008) Hygiene Indicator Microorganisms for Selected Pathogens on Beef, Pork, and Poultry Meats in Belgium. *Journal of Food Protection* 71, 35–45.
159. Giannella, R. (1996) *Salmonella*. In Baron, S. (Ed.) *Medical Microbiology* (4<sup>th</sup>ed.) Galveston, USA: University of Texas Medical Branch.
160. Gieraltowsky, L., Julian, E., Pringle, J., Macdonald, K., Quilliam, D., Marsden-Hang, N., et al. (2013). Nationwide outbreak of *Salmonella* Montevideo associated with contaminated imported black and red pepper: warehouse membership cards provide critical clues to identify the source. *Epidemiology and Infection*, 141, 1244-1252.
161. Gilbert, R.J. et al. (2000). Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods samples at the point of sale. *Communicable Disease and Public Health* 3, 163-167.
162. Gill, A. O., & Ramaswamy, H. S. (2008). Application of high pressure processing to kill *Escherichia coli* O157 in ready-to-eat meats. *Journal of Food Protection*, 71, 2182–2189.

163. Gillett T. A., Meiburg, D. E., Brown, C. L. & Simon, S. (1977) Parameters affecting meat protein extraction and interpretation of model system data for meat emulsion formation. *Journal of Food Science*, 42, 1606–1610.
164. Gimeno, O., Astiasarán, I., & Bello, J. (1999). Influence of partial replacement of NaCl with KCl and CaCl<sub>2</sub> on texture and color of dry fermented sausages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 873-877.
165. Giovannini, A., Prencipe, V., Conte, A., Marino, L., Petrini, A., Pomilio, F., Rizzi, V. & Migliorati, G. (2004) Quantitative risk assessment of Salmonella spp. infection for the consumer of pork products in an Italian region. *Food Control* 15, 139-144.
166. Glass, K.A. & Doyle, M.P. (1989) Fate and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in beaker sausage and pepperoni. *Journal of Food Protection* 52, 226–235.
167. Global Salm-Surv (2003) In: Rene S (Ed.) A global Salmonella surveillance and laboratory support project of the World Health Organization. Laboratory Protocols. Dostupno na: [http://www.antimicrobialresistance.dk/data/images/salmonella1\\_pdf](http://www.antimicrobialresistance.dk/data/images/salmonella1_pdf).
168. Goldwater, P. N. & Bettelheim, K. A. (2012) Treatment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infection and hemolytic uremic syndrome (HUS). *BMC Medicine*, 10:12.
169. Gonzalez-Miret, M. L., Coello, M. T. & Heredia, F. J. (2001) Validation of parameters in HACCP verification using univariate and multivariate statistics. Application to the final phases of poultry meat production. *Food Control* 12, 261–268.
170. Graumann, G.H. & Holley, R.A. (2008) Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 in ripening dry fermented sausage by ground yellow mustard. *Journal of Food Protection* 71, 486–493.
171. Grazia, L., Romano, P., Bagni, A., Roggiani, D., Guglielmi, G. (1986) The role of moulds in the ripening process of salami. *Food Microbiology* 3, 19– 25.
172. Guàrdia, M. D., Guerrero, L., Gelabert, J., Gou, P., & Arnau, J. (2008). Sensory characterisation and consumer acceptability of small calibre fermented sausages with 50% substitution of NaCl by mixtures of KCl and potassium lactate. *Meat Science* 80, 1225-1230.
173. Hamm, R. 1986. Functional properties of the myofibrillar system and their measurements. In: *Muscle as food*. P. J. Bechtel, (ed.), 135-199. Academic Press, Orlando, USA.
174. Hammes, W. P. (1995) In 2. *Stuttgarter Rohwurstforum*. ed. H. J. Buckenhtiskes, p. 29. Gewiirzmiiller, Stuttgart, Germany.
175. Hammes, W., Haller, D. & Ganzle, M. (2008) Fermented meat. In E. Farnworth (Ed.), *Handbook of fermented functional foods*. New York: CRC Press
176. Hanson, E. R. (2004). Smoking and cooking equipment. In C. Devine, & Dikeman (Eds), *Encyclopedia of meat sciences*. Oxford, UK: Elsevier.
177. Hanson, R. E. (2004) Smoking and Cooking Equipment In C. Devine, & Dikeman (Eds), *Encyclopedia of meat sciences*. Oxford, UK: Elsevier.
178. Harrison, M.A., Huang, Y., Chao, C. & Shineman, T. (1991) Fate of *Listeria monocytogenes* on packaged, refrigerated, and frozen seafood. *Journal of Food Protection* 54, 524–527.
179. Hayes, P. R. (1995) *Food Microbiology and Hygiene* (2nd ed.) Chapman & Hall.
180. Hedrick, H. B.; Aberle, E. D.; Forrest, J. C.; Ludge, M. D. & Merkel, R. A. (1994) *Principles of Meat Science*. 3<sup>o</sup> ed. Kendal/Hunt, Dubuque, USA.
181. Heir, E., Holck, A. L., Omer, M. K., Alvseike, O., Hoy, M., Mage, I., et al. (2010) Reduction of verotoxigenic *Escherichia coli* by process and recipe optimisation in dryfermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 141, 195–202.
182. Heir, E., Holck, L. A., Omer, K. M., Alvseike, O., Mage, I., Hoy, M., et al. (2013) Effects of post-processing treatments on sensory quality and Shiga toxigenic *Escherichia coli* reductions in dry-fermented sausages. *Meat Science* 94, 47-54.
183. Heir, E., Holck, L. A., Omer, K. M., Alvseike, O., Mage, I., Hoy, M., et al. (2013) Effects of post-processing treatments on sensory quality and Shiga toxigenic *Escherichia coli* reductions in dry-fermented sausages. *Meat Science*, 94, 47-54.

184. Hennessy, T., Hedberg, C., Slutsker, L., White, K., Besser-Wiek, J., Moen, M., Feldman, J., Coleman, W., Edmonson, L., MacDonald, K., Osterholm, M., et al. (1996) A national outbreak of salmonella enteritidis infections from ice cream. *The New England Journal of Medicine* 334, 1281-1286.
185. Henriksen, S. (2014) Impact of food environmental factors related to fermented sausages on *Salmonella* stress and virulence response. Ph.D. Thesis, National Food Institute, Technical University of Denmark.
186. Higgs, J. & Mulvihill, B. (2002) The nutritional quality of meat. In Kerry, J., Kerry, J. & Ledward, D. (Eds), *Meat processing (Improving quality)*. New York: CRC Press.
187. Holck, L. A., Axelsson, L., Mari Rode, T., Hoy, M., Mage, I., Alvseike, O., et al. (2011). Reduction of verotoxigenic *Escherichia coli* in production of fermented sausages: a review. *Meat Science*, 89, 286-295.
188. Honikel, K. O. (2004) Curing Agents. In C. Devine, & Dikeman (Eds), *Encyclopedia of meat sciences*. Oxford, UK: Elsevier.
189. Honikel, K. O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*, 78, 68 – 76.
190. Honikel, K.O. (2009) Oxidative changes and their control in meat and meat products. In Toldra, F. (Ed.) *Safety of Meat and Processed Meat*. New York, USA: Springer Science Business Media, LLC.
191. Honkavaara, M (1988) Influence of PSE pork on the quality and economics of cooked, cured ham and fermented dry sausage manufacture. *Meat Science* 24, 201–207.
192. Hospital, X. F., Hierro, E., & Fernández, M. (2014) Effect of reducing nitrate and nitrite added to dry fermented sausages on the survival of *Salmonella Typhimurium*. *Food Research International* 62, 410–415.
193. Hovde, C.J., Austin, P.R., Cloud, K.A., Williams C.J. & Hunt, C.W. (1999) Effect of cattle diet on *Escherichia coli* O157:H7 acid resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 3233-3235.
194. Hudson, J. A., Mott, S. J. & Penney, N. (1994) Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, and *Yersinia enterocolitica* on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmosphere-packaged sliced roast beef. *Journal of Food Protection* 57, 204–208.
195. Huerta, R., Jordano, R., Medina, L. M. & Lopez, C. (2004) Population dynamics of the constitutive biota of French dry sausages in a pilot-scale ripening chamber. *Journal of Food Protection* 67, 2306-2309.
196. Hugas, M., & Monfort, J. M. (1997) Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chemistry* 59,547-554.
197. Hugas, M., Garriga, M. & Monfort, J. M (2002) New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Science* 62, 359–371.
198. Hugas, M., Garriga, M., Pascual, M., Aymerichand, M. T. & Monfort, J. M. (2002) Enhancement of sakacin K activity against *Listeria monocytogenes* in fermented sausages with pepper or manganese as ingredients. *Food Microbiology* 19, 519-528.
199. Hunt, M. C. & Boyle, E. (2007) International Standards: Europe. In Toldra, F. (Ed) *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. Ames, USA: Blackwell Publishing.
200. Hutkins R. (2006) *Microbiology and technology of fermented foods*. Ames, USA: Blackwell Publishing
201. Hutkins, R. (2006) *Microbiology and technology of fermented foods*. Ames, USA: Blackwell Publishing.
202. Hwang, C. A., Porto-Fett, A.C.S., Juneja, V. K. Ingham, B. H. & Luchansky, J. B. (2009) Modeling the survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* during fermentation, drying and storage of soudjouk-style fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology* 129, 244-252.

203. ICMSF (1996). *Microorganisms in foods. Characteristics of microbial pathogens* (Vol. 5). London: Blackie Academic & Professional.
204. Ihnot, A. M., Roering, A. M., Wierzba, R. K., Faith, N. G., & Luchansky, J. B. (1998). Behavior of *Salmonella Typhimurium* DT104 during the manufacture and storage of pepperoni. *International Journal of Food Microbiology* 40, 117-121.
205. Ihnot, A. M., Roering, A. M., Wierzba, R. K., Faith, N. G., & Luchansky, J. B. (1998). Behavior of *Salmonella Typhimurium* DT104 during the manufacture and storage of pepperoni. *International Journal of Food Microbiology* 40, 117-121.
206. Incze, K. (2004) Sausages, types of. In C. Devine, & Dikeman (Eds), *Encyclopedia of meat sciences*. Oxford, UK: Elsevier.
207. Incze, K. (2007) European products. In Toldra, F. (Ed.) *Handbook of Fermented*
208. ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods (2002) in *Microorganisms in Foods 7*, Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York, USA 108–109.
209. ILSI - International Life Sciences Institute (2011) *The Enterobacteriaceae and their significance to the food industry*. Authors: Baylis, C., Uyttendaele, M., Joosten, H.& Davies, A.  
Dostupno na: <http://www.ilsa.org/Europe/Documents/EP%20Enterobacteriaceae.pdf>
- 210.
211. James, J. (2002) New developments in the chilling and freezing of meat. In Kerry, J., Kerry, J. & Ledward, D. (Eds), *Meat processing (Improving quality)*. New York: CRC Press.
212. Janković, V., Petrović, Lj., Lakićević, B., Matekalo Sverak, V., Lilić, S. & Mitrović, R. (2013) Determination of typical house flora during production process of the Petrovac Sausage (*Petrovska klobása*). *African Journal of Microbiology Research* 7(32), 4130-4137.
213. Jay, J. (2000) *Modern Food Microbiology* (6th ed.) Gaithersburg, USA: Aspen Publishers, Inc.
214. Jay, J., Loessner, M., Golden, D. (2005) *Modern Food Microbiology*. New York: Springer.
215. Jay, J.M. (1982) Antimicrobial properties of diacetyl. *Applied and Environmental Microbiology* 44, 525–532.
216. Johnson, J. L., M. P. Doyle, R. G. Cassens, and J. L. Schoeni. (1988) Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally infected cattle and in hard salami. *Applied and Environmental Microbiology* 54,497–501.
217. Johnson, S. C., Sebranek, J. G., Olson, D. G. & Wiegand, B.R. (2000) Irradiation in contrast to thermal processing of pepperoni for control of pathogens: effects on quality. *Indicators Journal of Food Science* 65, No. 7.
218. Jordan, D., Phillips, D., Sumner, J., Morris, S. & Jenson, I. (2006) Relationships between the density of different indicator organisms on sheep and beef carcasses and in frozen beef and sheep meat. *Journal of Applied Microbiology* 102, 57–64.
219. Kadam, S. den Besten, H., van der Veen, S., Zwietering, M., Moezelaar, R., Abee, T. (2013) Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. *International Journal of Food Microbiology* 165, 259–264.
220. Kang, D. H. & Fung, D. Y. (1999b) Effect of diacetyl on controlling *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* in the presence of starter culture in a laboratory medium and during meat fermentation. *Journal of Food Protection* 62, 975-9.
221. Kang, D.H. & Fung, D. Y. (2000) Stimulation of starter culture for further reduction of foodborne pathogens during salami fermentation. *Journal of Food Protection* 63, 1492-5.
222. Kang, D.H. & Fung, D.Y.C. (1999) Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 by stimulated *Pediococcus acidilactici*. *Letters in Applied Microbiology* 29, 206–210.
223. Karan, D., Vesković-Moračanin S., Babić, J., Parunović N., Okanović, Dj., Džinić, N.& Jokanović, M. (2012) Sensory properties of traditionally fermented “Levačka” sausage. *Tehnologija mesa*, 53, 43–49.



224. Keeling, C., Niebuhr, S. E., Acuff, G. R., & Dickson, J. S. (2009) Evaluation of *Escherichia coli* Biotype I as a Surrogate for *Escherichia coli* O157:H7 for Cooking, Fermentation, Freezing, and Refrigerated Storage in Meat Processes. *Journal of Food Protection* 4, 696-914, 728-732(5).
225. Keeton J. T. & Eddy S. (2004) Chemical Composition. In C. Devine, & Dikeman (Eds.), *Encyclopedia of meat sciences*. Oxford, UK: Elsevier.
226. Kiera M. Considine, K. M., Kelly, A. L., Fitzgerald, G. F., Hill, C. & Sleator, R. D. (2008) High-pressure processing-effects on microbial food safety and food quality: minireview. *FEMS Microbiology Letters* 281, 1–9.
227. Kim, I. S., Jo, C., Lee, K. H., Lee, E.J., Ahn, D.U. & Kang, S.N. (2012) Effects of low-level gamma irradiation on the characteristics of fermented pork sausage during storage. *Radiation Physics and Chemistry* 81, 466–472.
228. Klaenhammer, T. R. (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 12, 39–86.
229. Koberna, F. (1986) Tempering temperature requirements for cutting and processing equipment. Proceedings of subject day, Meat thawing/tempering and product quality, Bristol, IFR.
230. Koch, G. A. (2004) Bioprsvervation. In Devine, C. & Dikeman, M. (Eds), *Encyclopedia of meat sciences*. Oxford, UK: Elsevier.
231. Kornacki, J.L., & Johnson, J.L. (2001) in *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4<sup>th</sup> Ed., F. Pouch Downes & K. Ito (Eds), American Public Health Association, Washington, USA, 69–82.
232. Koutsoumanis, K. & Sofos, J. N. (2004) Microbial contamination. In Devine, C. & Dikeman, M. (Eds), *Encyclopedia of meat sciences*. Oxford, UK: Elsevier.
233. Kozačinski, L., Drosinos, E., Čaklovica, F., Cocolin, L., Gasparik-Reichardt, J., & Vesković, S. (2008) Investigation of microbial association of traditionally fermented sausages. *Food Technology and Biotechnology* 46, 93-106.
234. Kuhn, K., Torpdahl, M., Frank, C., Sigsgaard, K., & Ethelberg, S. (2011). An outbreak of *Salmonella* Typhimurium traced back to salami, Denmark, April to June 2010. *Eurosurveillance*, 16.
235. Kwon J. H., Park K. Y., Yoo H. S., Park J. Y., Young H. P. & Kim S. J. (2000) Differentiation of *Salmonella* enteric serotype gallinarum byotype pullorum from byotype gallinarum by analysis of phase 1 flagellin C gene (fliC). *Journal of Microbiological Methods*; 40, 33-38.
236. Labadie, J. (2007) Spoilage Microorganisms: Risks and Control. In Toldra, F. (Ed.) *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. Ames, USA: Blackwell Publishing.
237. Ladikos, D. & Lougovois, V. (1990) Lipid oxidation in muscle foods: A review. *Food chemistry* 35, 295-314.
238. Lado, B. & Yousef, A. (2007) In Ryser, E. & Marth, E. (Eds) *Listeria, Listeriosis and Food Safety* (3<sup>rd</sup> ed.). Boca Raton, USA: CRC Press.
239. Lahti, E., Johansson, T., Honkanen-Buzalski, T., Hill, P. & Nurmi, E. (2001) Survival and detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* during the manufacture of dry sausage using two different starter cultures. *Food Microbiology*, 18, 75-85.
240. Lau, M. M., & Ingham, S. C. (2001) Survival of faecal indicator bacteria in bovine manure incorporated in soil. *Letters in Applied Microbiology* 33, 1-6.
241. Laury, A., Echeverry, A. & Brashears, M. (2009) Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in Meat. In Toldra, F. (Ed.) *Safety of Meat and Processed Meat*. New York, USA: Springer Science Business Media, LLC.
242. Lawrie, R. A. (1998) *Lawrie's meat science*. (6th ed.) Cambridge, UK: Woodhead Publishing Limited.
243. Leistner, L. (1986a) Allgemeines uber Rohwurst. *Fleischwirtschaft*, 66, 290-300.

244. Leistner, L. (2000) Basic aspects of food preservation by hurdle technology: A review. *International Journal of Food Microbiology* 55, 181–186.
245. Leroy, F., Verluyten, J. & De Vuyst, L. (2006) Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 106, 270–285.
246. Leroy, F., Verluyten, J., De Vuyst, L. (2006) Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 106, 270-285.
247. Levine, P., Rose, B., Green, S., Ransom, G. & Hill, W. (2001) Pathogen testing of ready-to-eat meat and poultry products collected at federally inspected establishments in the United States, 1990 to 1999. *Journal of Food Protection* 2001;64, 1188-93.
248. Li, S., Aliani, M. & Holley, R. A. (2013) Sensory evaluation of dry-fermented sausage containing ground deodorized yellow mustard. *Journal of Food Science* 78, 10.
249. Liestner, L., Rodel, W. & Krispien, K. (1981); Microbiology of meat products in high-and intermediate-moisture ranges. In Rockland, L.B. & Stewart, G.F. (Eds) *Water Activity: Influences on Food Quality*, Academic Press, New York, USA.
250. Lolin, M. (1991) *Zarazne bolesti životinja*. Univerzitet u Beogradu, Veterinarski fakultet.
251. Loncarevic, S., Danielsson-Tham, M.-L., Martensson, L., Ringer, A., Runehagen, A. & Tham, W. (1997) A case of foodborne listeriosis in Sweden. *Letters in Applied Microbiology* 24, 65-68.
252. Luciano, F. B., Belland, J., Holley, R. A. (2011) Microbial and chemical origins of the bactericidal activity of thermally treated yellow mustard powder toward *Escherichia coli* O157:H7 during dry sausage ripening. *International Journal of Food Microbiology* 145, 69–76.
253. Lücke, F. K. & Hechelmann, H. (1987) Starter cultures for dry sausages and raw ham, composition and effect. *Fleischwirtsch.* 67, 307–314.
254. Lücke, F. K. & Vogeley, I. (2012) Traditional ‘air-dried’ fermented sausages from Central Germany. *Food Microbiology* 29 242-246.
255. Lücke, F. K. (2000) Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science* 56, 105-115.
256. Lucke, F.K. (2000) Fermented meats. In Lund, B. M., Baird-Parker, T. C. & Gould, G. W. (Eds.) *The Microbiological safety and quality of food*. Gaithersburg, USA: Aspen Publishers, Inc.
257. Lucke, K. F. (2014) Fermented meats. In Bamforth, C. W. & Ward, R. E. (Eds) *The Oxford Handbook of Food Fermentations*. Oxford, UK: Oxford university press.
258. Luzzi, I., Galetta, P., Massari, M., Rizzo, C., Dionisi, A. M., Filetici, E., et al. (2007). An Easter outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT 104A associated with traditional pork salami in Italy. *Eurosurveillance*, 12, 149-152.
259. Macdonald, D. M., Fyfe, M., Paccagnella, A., Trinidad, A., Louie, K. & Patrick, D. (2004) *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to salami, British Columbia, Canada. *Epidemiol. Infect.* 132, 283–289.
260. Maddock, R. (2007) U.S. products. In Toldra, F. (Ed.) *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. Ames, USA: Blackwell Publishing.
261. Mandić, A. (2007). *Antioksidativna svojstva ekstrakata semena sorti belog grožđa*. Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad.
262. Marcos, B., Aymerich, T. & Garriga, M (2005) Evaluation of high pressure processing as an additional hurdle to control *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* in low-acid fermented sausages. *Journal of Food Science* 70, Nr. 7.
263. Matias, B. G., Pinto, P. S., Cossi, M. V. & Nero, L.A. (2010) *Salmonella* spp. and hygiene indicator microorganisms in chicken carcasses obtained at different processing stages in two slaughterhouses. *Foodborne Pathogen and Disease* 7, 313-8.

264. Mauriello, G., Casaburi, A., Blaiotta, G. & Villani F. (2004) Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. *Meat Science* 67 149–158.
265. Mayoral, A. I., Dorado, M., Guillén, M. T., Robina, A., Vivo, J. M., Vázquez, C. & Ruiz, J. (1999) Development of meat and carcass quality characteristics in Iberian pigs reared outdoors. *Meat Science* 52, 315–324.
266. McClure, J. P., & Hall, S. (2000) Survival of *Escherichia coli* in foods. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 88, 618-708.
267. McClure, P. J. & Halls, S. (2000). Survival of *Escherichia coli* in foods. *Proceeding of the Society for Applied Microbiology* 29, 61S–70S.
268. McLaughlin, J., & Rees, C. E. D. (2009) Genus I. *Listeria*. In P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, E. A. Rainey *et al.* (Eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd edn. New York, USA, Springer.
269. McQuestin, O. J., Shadbolt, C. T., & Ross, T. (2009) Quantification of the relative effects of temperature, pH, and water activity on inactivation of *Escherichia coli* in fermented meat by meta-analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 6963–6972.
270. Meat and Poultry. Ames, USA: Blackwell Publishing.
271. Metaxopoulos, J., Samelis, J., & Papadelli, M. (2001). Technological and microbiological evaluation of traditional processes as modified for the industrial manufacturing of dry fermented sausage in Greece. *Italian Journal of Food Science*, 13, 3–18.
272. Michino, H., Araki, K., Minami, S., et al. (1999) Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *American Journal of Epidemiology* 150, 787-796.
273. Milkowski, A., Gang, H. G., Coughlin, J. S. & Bryan, N. S. (2010) Nutritional epidemiology in the context of nitric oxide biology: A risk-benefit evaluation for dietary nitrite and nitrate. *Nitric Oxide* 22, 110-119.
274. MPINZ - Ministry for Primary Industries: New Zealand Government (2013) *Listeria Risk Management Strategy 2013-2014*. Dostupno na: <http://www.mpi.govt.nz/news-resources/publications.aspx>
275. Moller, J. K. S., & Skibsted, L. H. (2002) Nitric oxide and myoglobins. *Chemical Reviews*. 102,1167–1178.
276. Molly, K. Demeyer, D., Johansson, G., Raemaekers, M., Ghistelnik, M. & Geenen, I. (1997) The impotence of meat enzymes in ripening and flavor generation in dry fermented sausages. First results of an European project. *Food Chemistry* 59, 539-545.
277. Moloney, A. P. (2002) The fat content of meat and meat products. In Kerry, J., Kerry, J. & Ledward, D. (Eds.), *Meat processing (Improving quality)*. New York: CRC Press.
278. Monin, G. (2004) Colour and Texture Deviations. In C. Devine, & Dikeman (Eds), *Encyclopedia of meat sciences*. Oxford, UK: Elsevier.
279. Moretti, V. M., Madonia, G., Diaferia, C., Mentasti, T., Paleari, M. A., Panseri, S., Pirone, G., & Gandini, G. (2004). Chemical and microbiological parameters and sensory attributes of a typical
280. Mortimore, S. (2001) How to make HACCP really work in practice. *Food Control* 12, 209-215.
281. Muthukumarasamy, P. & Holley, R. A. (2007) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in dry fermented sausages containing micro-encapsulated probiotic lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 24, 82–88.
282. Naim, F., Messier, S., Saucier, L., & Piette, G. (2003) A model study of *Escherichia coli* O157:H7 survival in fermented dry sausages — Influence of inoculum preparation, inoculation procedure, and selected process parameters. *Journal of Food Protection*, 66, 2267–2275.
- Nastasijevic, I., Mitrovic, R., & Buncic, S. (2009) The occurrence of *Escherichia coli* O157 in/on feces, carcasses and fresh meats from cattle. *Meat Science* 82, 101-105.

284. Nataro, J. P., Kaper, J. B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 11, 142–201.
285. Navarro, C., MacDonald, D., Middleton, D., Landry, L., Vrbova, L. & Lior, LY. (2006) Outbreak of *Salmonella* Typhimurium phage type U302 in Ontario, spring 2005. *Canada Communicable Disease Report* 32, 7.
286. Naylor, S.W., Low, J.C., Besser, T.E., Mahajan, A., Gunn, G.J., Pearce, M.C., McKendrick, I.J., Smith, D.G.E. & Gally, D.L. (2003) Lymphoid follicle-dense mucosa at the terminal rectum is the principal site of colonization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the bovine host. *Infection and Immunity* 71, 1505-1512.
287. Niebuhr, S. E., Laury, A., Acuff, G. R. & Dickson, J. S. (2008) Evaluation of nonpathogenic surrogate bacteria as process validation indicators for *Salmonella enterica* for selected antimicrobial treatments, cold storage, and fermentation in meat. *Journal of Food Protection* 4, 676-873, 714-718(5).
288. Nightingale, K. K., Thippareddi, H., Phebus, R. K., Marsden, J. L., & Nutsch, A. L. (2006). Validation of a traditional Italian-style salami manufacturing process for control of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 69, 794-800.
289. Nissen, H., & Holck, A. (1998) Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Kentucky in Norwegian fermented, dry sausage. *Food Microbiology*, 15, 273-279.
290. Nissen, H., & Holck, A. (1998). Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Kentucky in Norwegian fermented, dry sausage. *Food Microbiology* 15, 273-279.
291. Nitrates and nitrites (2006) IPCS Inchem. Dostupno na: <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pimg016.htm>
292. Nørrung, B., & Buncic, S. (2008). Microbial safety of meat in the European Union. *Meat Science*, 78, 14-24.
293. Nørrung, B., & Buncic, S. (2008). Microbial safety of meat in the European Union. *Meat Science* 78, 14-24.
294. Nørrung, B., Andersen, J. K. & Buncic, S. (2009) Main Concerns of Pathogenic Microorganisms in Meat. In Toldra, F. (Ed.) *Safety of Meat and Processed Meat*. New York, USA: Springer Science+ Business Media, LLC.
295. Norton, D. M. & Braden, C. R. (2007) Foodborne Listeriosis. In Ryser, E. & Marth, E. (Eds) *Listeria, Listeriosis and Food Safety* (3<sup>rd</sup> ed.). Boca Raton, USA: CRC Press.
296. Nychas, G. E., Skandamis, P. N., Tassou, C. C. & Koutsomanis, K. P. (2008) Meat spoilage during distribution. *Meat Science* 78 77–89.
297. Ockerman, H. W. & Basu, L. (2004) Other Ingredients. In C. Devine, & Dikeman (Eds), *Encyclopedia of meat sciences*. Oxford, UK: Elsevier.
298. Ockerman, H. W. & Basu, L. (2004) Other Ingredients. In C. Devine, & Dikeman (Eds), *Encyclopedia of meat sciences*. Oxford, UK: Elsevier.
299. Ogden, I., Fenlon, D., Vinten, A. & Lewis, D. (2001) The fate of *Escherichia coli* O157 in soil and its potential to contaminate drinking water. *International Journal of Food Microbiology* 66, 111-117.
300. OIE – World Organisation for Animal Health (2014) *OIE Terrestrial Manual*. Dostupno na: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health\\_standards/tahm/2.09.07\\_LISTERIA\\_MONO.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2.09.07_LISTERIA_MONO.pdf)
301. Olesen, I., & Jespersen, L. (2010) Relative gene transcription and pathogenicity of enterohemorrhagic *Escherichia coli* after long-term adaptation to acid and salt stress. *International Journal of Food Microbiology* 140, 248-253.
302. Olesen, P.T., Meyer, A. S., Stahnke, L. H. (2004) Generation of flavour compounds in fermented sausages—The influence of curing ingredients, *Staphylococcus* starter culture and ripening time. *Meat Science* 66, 675–687.

303. Olson, D. G. (1982). Salt for processing probably can be cut by only one quarter. *The National Provisioner*, 17, 7- 10.
304. Omer, M. K., Alvseike, O., Holck, A., Axelsson, L., Prieto, M., Skjerve, E. et al. (2010). Application of high pressure processing to reduce verotoxigenic *E. coli* in two types of dry-fermented sausage. *Meat.Science*, 86, 1005-1009.
305. Omer, M.K., Prieto, B., Rendueles, E., Alvarez-Ordóñez, A., Lunde, K. Alvseike, O. & Prieto M. (2015) Short Communication: Microbiological, physicochemical and sensory parameters of dry fermented sausages manufactured with High Hydrostatic Pressure processed raw meat *Meat Science* 108. DOI:10.1016/j.meatsci.2015.05.002
306. Operta, S., Dževdetbegović M., Čorbo, S., Tahmaz, J., Šehović, A. (2012) Fizičko-hemijska i senzorna svojstva bosanskog sudžuka proizvedenog u kontrolisanim uslovima od svežeg ohlađenog i zamrznutog govedeg mesa *Tehnologija mesa* 53 2, 148–156.
307. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on “the suitability and details of freezing methods to allow human consumption of meat infected with *Trichinella* or *Cysticercus*”, *The EFSA Journal* (2004) 142, 1-50.
308. Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on the request from the Commission for review of the opinion on microbiological risks in infant formulae and followon formulae with regard to *Enterobacteriaceae* as indicators, *The EFSA Journal* (2007) 444, 1-14.
309. Zeuthen, P. (1995) Historical aspects of meat fermentations. In: *Fermented Meats*. G Campbell- Platt, PE Cook, (Eds.). Blackie Academic and Professional, London
310. Padola, N. L. & Etcheverría, A. I. (2014) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in human, cattle, and foods. Strategies for detection and control. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. doi: 10.3389/fcimb.2014.00089.
311. Painter, J. & Slutsker, L. (2007) Listeriosis in Humans In Ryser, E. & Marth, E. (Eds) *Listeria, Listeriosis and Food Safety* (3<sup>rd</sup> ed.). Boca Raton, USA: CRC Press.
312. Palumbo, S., & Williams. A. C. (1991) Resistance of *Listeria monocytogenes* to freezing in foods. *Food Microbiology*. 8:63–68.
313. Papadimas, S. N. & Bloukas, J. G. (1999) Effect of fat level and storage conditions on quality characteristics of traditional Greek sausages. *Meat Science* 51: 103–113.
314. Papamanoli, E. Tzanetakis, N. Litopoulou-Tzanetaki, E. Kotzekidou, P. (2003) Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science* 65, 859–867.
315. Park, S., Worobo R. W. & Durst, R. A. (1999) *Escherichia coli* O157:H7 as an emerging foodborne pathogen: a literature review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 39, 481-502.
316. Paton, A. W. & Paton J. C. (1998) Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *Journal of Clinical Microbiology* 36,598-602.
317. Paton, A., Ratcliff, R., Doyle, R., Seymour-Murray, J.,Davos, D., Lanser, J., & Paton, J. (1996) Molecular Microbiological Investigation of an Outbreak of Hemolytic-Uremic Syndrome Caused by Dry Fermented Sausage Contaminated with Shiga-Like Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 1622-1627.
318. Payne, K.D., Oliver, S.P. & Davidson, P.M. (1994) Comparison of EDTA and apolactoferrin with lysozyme on the growth of foodborne pathogenic and spoilage bacteria. *Journal of Food Protection* 57, 62–65.
319. Pegg, R. B. & Shahidi, F. (2000) Nitrite curing of meat. Trumbull, Connecticut, USA: Food & Nutrition Press, 175–208.
320. Pegg, R. B. Shahidi, F. (2004) Warmed-Over Flavour. In C. Devine, & Dikeman (Eds.), *Encyclopedia of meat sciences*. Oxford, UK: Elsevier.
321. Petaja-Kanninen, E. & Puolanne, E. (2007) Principles of Meat Fermentation. In Toldra, F. (Ed.) *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. Ames, USA: Blackwell Publishing.

322. Petran, R. L., & Zottola, E. A. (1989) A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Science* 54, 458–460.
323. Petrovic, L., Grujic, R. & Petrovic, M. (1993) Definition of the optimal freezing rate, Investigations of the physico - chemical properties of beef *M. longissimus dorsi* frozen at different freezing rates. *Meat Science* 33, 319 – 331.
324. Petrović, Lj., Ivanović, S., Šojić, B., Mandić, A., Tasić, T., Džinić, N., Tomović, V. (2010a). Uticaj vremena skladištenja na tok lipidne oksidacije u smrznutom svinjskom mesu, *Tehnologija mesa*, 1, 18–26.
325. Pidcock, K., Heard, G.M. & Henriksson, A. (2002) Application of nontraditional meat starter cultures in production of Hungarian salami. *International Journal of Food Microbiology* 76, 75– 81.
326. Piérard, D., De Greve, H., Haesebrouck, F. & Mainil, J. (2012) O157:H7 and O104:H4 Vero/Shiga toxinproducing *Escherichia coli* outbreaks: respective role of cattle and humans. *Veterinary Research*, 43:13.
327. Pierre, C. (2007) Disease Outbreaks. In Toldra, F. (Ed.) Handbook of Fermented Meat and Poultry. Ames, USA: Blackwell Publishing.
328. Pierson, M. D. & Smoot, L. A. (1982) Nitrite, nitrite alternatives and the control of *Clostridium botulinum* in cured meats. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 17, 141-187.
329. Ping C. S. & Yun-Chu Wu, C. Y. (2007) Spices and Seasonings. In Toldra, F. (Ed.) Handbook of Fermented Meat and Poultry. Ames, USA: Blackwell Publishing.
330. Pontello, M., Sodano, L., Nastasi, A., Mammina, C., Astuti, M., Domenichini, M., Belluzzi, G., Soccini, E., Silvestri, M. G., Gatti, M., Gerosa, E. & Montagna, A. (1998). A community-based outbreak of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium associated with salami consumption in Northern Italy. *Epidemiology and Infection*, 120, 209–214.
331. Porto-Fett, A. C. S., Hwang, C. A., Call, J. E., Juneja, V., Ingham, S., Ingham, B., et al. (2008). Viability of multi-strain mixtures of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, or *Escherichia coli* O157:H7 inoculated into the batter or onto the surface of a soudjouk-style fermented semi-dry sausage. *Food Microbiology*, 25, 780-793.
332. Porto-Fett, A., Call, J., Shoyer, B., Hill, D., Pshebniski, C., Cocoma, G. & Luchansky, J. (2010) Evaluation of fermentation, drying, and/or high pressure processing on viability of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., and *Trichinella spiralis* in raw pork and Genoa salami *International Journal of Food Microbiology* 140, 61–75.
333. Prändl, O., Fischer, A., Schmidhofer, T., Sinell, H. J. (1988) *Fleisch - Technologie und Hygiene der Gewinnung und Verarbeitung*. Stuttgart: Ulmer.
334. Prandl, O., Fischer, A., Schmidhofer, T., Sinell, H. J. (1988) *Fleischwirtschaft. Technologie und Hygiene der Gewinnung und Verarbeitung*. Stuttgart: Ulmer.
335. Pravilnik o kvalitetu usitnjenog mesa, poluproizvoda od mesa i proizvoda od mesa. Sl. glasnik RS, br. 31/2012.
336. Pravilnik o kvalitetu začina, ekstrakata začina i mešavina začina. Sl. glasnik RS, br. 72/2014.
337. Pravilnik o opštim i posebnim uslovima higijene hrane u bilo kojoj fazi proizvodnje, prerade i prometa RS, 2010.
338. Pravilnik o prehrambenim aditivima. Sl. glasnik RS, br. 63/2013.
339. Pressure on Meat Products. In Toldra, F. (Ed.) Safety of Meat and Processed Meat. New York, USA: Springer Science Business Media, LLC.
340. Prica, N., Živkov-Baloš, M., Mihaljev, Ž., Jakšić, S. & Stojanov, I. (2013) Sadržaj natrijumhlorida u proizvodima od mesa. *Arhiv veterinarske medicine* vol. 6, br. 1, 71-79, 2013.
341. Public Health Agency of Canada (2010) *Salmonella enterica* spp. Pathogen safety data sheet – infectious substances. Section I – infectious agent. Dostupno na: [www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds.../salmonella-ent-eng.php](http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds.../salmonella-ent-eng.php)
342. R. Tarte, (Ed.) Springer Science+Business Media LLC, New York, USA.

343. Radetić, P (1997) *Sirove kobasice*. Izdavač: autor, Beograd, Srbija.
344. Radulović, Z., Živković, D., Mirković, N., Petrušić, M., Stajić, S., Perunović, M. Paunović, D. (2011) Effect of probiotic bacteria on chemical composition and sensory quality of fermented sausages. *Procedia Food Science* 1, 1516 – 1522.
345. Ranken, M. D. (2000) *Handbook of meat product technology*. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.
346. Rantsiou & Cocolin (2006) New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 255-267.
347. Rantsiou, K., & Cocolin, L. (2006). New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 255–267.
348. Ravyts, F., Barbuti, S., Frustoli, M. A., Parolari, D., De Vuzst, L. & Leroy, F. (2008) Competitiveness and antibacterial potential of bacteriocin-producing starter cultures in different types of fermented sausages *Journal of Food Protection* 71,1817-27.
349. Ravyts, F., Steen, L., Goemaere, O., Paelinck, H., De Vuyst, L. & Leroy, F. (2010) The application of staphylococci with flavour – generating potential is affected by acidification in fermented dry sausages. *Food Microbiol.* 27, 945–954.
350. Rice E.W., Johnson C.H., Wild D.K. & Reasoner, D.J. (1992). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in drinking water associated with a waterborne disease outbreak of hemorrhagic colitis. *Letters in Applied Microbiology* 15, 38-40.
351. Riordan, D. C. R., Duffy, G., Sheridan, J. J., Eblen, B. S., Whiting, R. C., Blair, I. S., et al.(1998). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of pepperoni. *Journal of Food Protection* 61, 146–151.
352. Riordan, R. C. D., Duffy, G., Sheridan, J. J., Whiting, C. R., Blair, S. I., & McDowell, A. D. (2000) Effects of acid adaptation, product pH, and heating on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in pepperoni. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 1726-1729.
353. Roberts, A. J., & Wiedmann, M. (2003) Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60, 904–918.
354. Rockland, L. B. & Nishi, S.K. (1980) Influence of water activity on food product quality and stability. *Food Technology*, 34, 42-59.
355. Rocourt J. & Buchrieser, C. (2007) The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic Position, Taxonomy, and Identification In Ryser, E. & Marth, E. (Eds) *Listeria, Listeriosis and Food Safety* (3<sup>rd</sup> ed.). Boca Raton, USA: CRC Press.
356. Rocourt, J. & Buchrieser, C. (2007) The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes* : Phylogenetic Position, Taxonomy and Identification. In Ryser, E. & Marth, E. (Eds) *Listeria, Listeriosis and Food Safety* (3<sup>rd</sup> ed.). Boca Raton, USA: CRC Press.
357. Rode, T. M., Holck, A., Axelsson, L., Høy, M., & Heir, E. (2012) Shiga toxigenic *Escherichia coli* show strain dependent reductions under dry-fermented sausage production and post-processing conditions. *International Journal of Food Microbiology* 155, 227-233.
358. Rode, T. M., Holck, A., Axelsson, L., Høy, M., & Heir, E. (2012) Shiga toxigenic *Escherichia coli* show strain dependent reductions under dry-fermented sausage production and post-processing conditions. *International Journal of Food Microbiology* 155, 227-233.
359. Roncales, P. (2007) In Toldra, F. (Ed.) *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. Ames, USA: Blackwell Publishing.
360. Rougmanac, P., Gagnevin, L., Pruvost, O. & Achtman, M. (2007) Insights into structure and evolution of bacterial species that are revealed by molecular methods. In Tibayrenc, M. (Ed.) *Encyclopedia of Infectious Diseases: Modern Methodologies*.
361. Rovira, J. & Puszczewicz, D. (2007) In Toldra, F. (Ed.) *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. Ames, USA: Blackwell Publishing.

362. Ruiz, J.(2007) In Toldra, F. (Ed.) Handbook of Fermented Meat and Poultry. Ames, USA: Blackwell Publishing.
363. Ruiz, J., Ventanas, J., Cava, R., Timon, M. L., García. C. (1998) Sensory characteristics of Iberian ham: Influence of processing time and slice location. *Food Research International* 31:53–58.
364. Rust, R. (2007) U.S. Products. In Toldra, F. (Ed.) Handbook of Fermented Meat and Poultry. Ames, USA: Blackwell Publishing.
365. Ruusunen, M., & Puolanne, E. (2005). Reducing sodium intake from meat products. *Meat Science*, 70, 531–541.
366. Sage, J. R. & Ingham, S. C. (1998) Evaluating survival of Escherichia coli O157:H7 in frozen and thawed apple cider: potential use of a hydrophobic grid membrane filter-SD-39 agar method. *Journal of Food Protection* 61, 490-494.
367. Saičić, S., Trbović, D., Vranić, D., Janković, S., Stefanović, S. & Petronijević, R. (2010) Sadržaj masnih kiselina i holesterola u nekim proizvodima od mesa sa domaćeg tržišta *Tehnologija mesa* 51 1, 52–59.
368. Salgado, A., Garcia Fontan, M. C., Franco, I., Lopez, M. & Carballo, J. (2005) Biochemical changes during the ripening of Chorizo de cebolla, a Spanish traditional sausage. Effect of the system of manufacture (homemade or industrial) *Food Chemistry* 92 (2005) 413–424.
369. Samelis, J. & Sofos. J. N. (2003) Yeasts in meat and meat products. In: Yeasts in Food. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, pp. 243–247.
370. Samelis, J., Kakouri, A., Savvaidis, I. N., Riganakos, K., & Kontominas, M. G. (2005). Use of ionizing radiation doses of 2 and 4 kGy to control *Listeria* spp. And *Escherichia coli* O157:H7 on frozen meat trimmings used for dry fermented sausage production. *Meat Science*, 70, 9–195.
371. Samelis, J., Metaxopoulos, J., Vlassi, M., & Pappa, A. (1998) Stability and safety of traditional Greek salami-a microbiological ecology study. *International Journal of Food Microbiology* 44, 69-82.
372. Santchurn & Collignan, (2007) Fermented Poultry Sausages. In Toldra, F. (Ed.) Handbook of Fermented Meat and Poultry. Ames, USA: Blackwell Publishing.
373. Sanz, Y., Vila, R., Toldra F., Flores J. (1998) Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of rapid ripened sausages. *International Journal of Food Microbiology* 42, 213–217.
374. Sartz, L., De Jong, B., Hjertqvist, M., Plym-Forsell, L., Alsterlund, R., Lofdahl, S., & Karpman, D. (2008). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in southern Sweden associated with consumption of fermented sausage; aspects of sausage production that increase the risk of contamination. *Epidemiology and Infection*, 136, 370–380.
375. Sartz, L., De Jong, B., Hjertqvist, M., Plym-Forsell, L., Alsterlund, R., Lofdahl, S., et al. (2008). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in southern Sweden associated with consumption of fermented sausage; aspects of sausage production that increase the risk of contamination. *Epidemiology and Infection*, 136,370-380.
376. Sauer, J. C., Majkowski, J., Green, S., & Eckel, R. (1997) Foodborne illness outbreak associated with a semi-dry fermented sausage product: a review. *Journal of Food Protection* 60, 1612-1617.
377. Scannel, A. (2012) Overview of Foodborne Pathogens. In Sun, D. W. (Ed.) Handbook of Food Safety Engineering. Ames, USA: Blackwell Publishing.
378. Scavia, G., Claravino, G., Luzzi, I., Lenglet, A., Ricci, A., Barco, L., et al. (2013). A multistate epidemic outbreak of *Salmonella* Goldcoast in humans, June 2009 to March 2010: the investigation in Italy. *Eurosurveillance*, 18.
379. Schaffner, D. W. & Smith, S. (2004) Indicator Organisms. In Devine, C. & Dikeman, M. (Eds), Encyclopedia of meat sciences. Oxford, UK: Elsevier.



380. Schillinger, U., & Lucke, F. K. (1989). Einsatz von Milchsäurebakterien als Schutzkulturen bei Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtschaft*, 69, 879-882.
381. Schmidt, H., Scheef, J., Huppertz, H.I., Frosch, M., Karch, H. (1999). Escherichia coli O157:H7 and O157:H- Strains that do not produce shiga-toxin: phenotypic and genetic characterization of isolates associated with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 3491–3496.
382. Schrader, Kohl Danielle, "Investigating the control of Listeria monocytogenes on uncured, no-nitrate-or-nitrite-added meat products" (2010). *Graduate Theses and Dissertations*. Paper 11551.
383. Schuddeboom, L. J. (1993) Nitrates and nitrites in foodstuffs. Council of Europe Press, Publishing and Documentation Service. ISBN 92-871-2424-6.
384. Schwartz, B., Hexter, D., Broome, C. V., Hightower, A. W., Hirschhorn, R. B., Porter, J. D., Hayes, P. S., Bibb, W. F. Lorber, B. & Faris, D. G. (1989) Investigation of an outbreak of listeriosis: New hypotheses for the etiology of epidemic *Listeria monocytogenes* infections. *Journal of Infectious Diseases* 159, 680–685.
385. Sebranek, J. G. & Bacus, J. N. (2007) Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat Science* 77, 136-147.
386. Sebranek, J.G. (2009). Basic curing ingredients. *Ingredients in Meat Products*.
387. Sekse, C., O’Sullivan, K., Granum, P. E., Rorvik, L. M., Wasteson, Y., & Jorgensen, H. J. (2009) An outbreak of Escherichia coli O103:H25-bacteriological investigations and genotyping of isolates from food. *International Journal of Food Microbiology* 133, 259-264.
388. Seveau, S., Pizarro-Cerda, J. & Cossart, P. (2007) Molecular mechanisms exploited by Listeria monocytogenes during host cell invasion. *Microbes and Infection* 9, 1167-75.
389. Shahidi F., & Samaranayaka A. G. P. (2004) Brine. In C. Devine, & Dikeman (Eds), *Encyclopedia of meat sciences*. Oxford, UK: Elsevier.
390. Shahidi, F. & Zhong, Y. (2010). Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *European journal of lipid science and technology* 112, 930-940.
391. Shay, B., & Souness, R. (1995) Recent regulations impacting on the small goods industry. *Food Australia* 47, 491-495.
392. Sicilian salami ripened in different conditions. *Meat Science* 66, 845-854.
393. Henriksen, Sidsel (2014) Impact of food environmental factors related to fermented sausages on *Salmonella* stress and virulence response. PhD Thesis, National Food Institute, Technical University of Denmark.
394. Sikorski, Z. E. & Kolakowski, E. (2010) Smoking. In Toldra, F. (Ed.) *Handbook of meat processing*. Ames, USA: Blackwell Publishing.
395. Sindelar, J.J, and Milkowski, A.L. (2011). Sodium nitrite in processed meat and poultry meats: A review of curing and examining the risk/benefit of its use. *American Meat Science Association*. AMSA white paper series, No. 3.
396. Skandamis, P. & Nychas, G. E. (2007) In Toldra, F. (Ed.) *Handbook of Fermented Meat and Poultry*. Ames, USA: Blackwell Publishing.
397. Skandamis, P., & Nychas, E. G. J. (2007). Pathogens: risks and control. In F. Toldra (Ed.), *Handbook of fermented meat and poultry*. Ames, USA: Blackwell Publishing.
398. Smith, D. R. (1987) Sausage – a food of myth, mystery and marvel. *SCIRO Food Res. Quart.*, 47, 1-8.
399. Smith, H.R. & Scotland, S.M. (1993) Isolation and identification methods for Escherichia coli O157 and other Verocytotoxin-producing strains. *Journal of Clinical Pathology* 46, 10-17.
400. Smith, J. L., Fratamico, P. M. & Gunther, N.W. (2014) Shiga toxin-producing Escherichia coli: a review. *Advances in Applied Microbiology* 86, 145-97.
401. Smith, S. B., Smith, D. R. & Lunt, D. K. (2004) Adipose Tissue In C. Devine, & Dikeman (Eds), *Encyclopedia of meat sciences*. Oxford, UK: Elsevier.

402. Sofos, J. (2014) Meat and Meat Products. In Motarjemi, J. & Lelieveld, H. Food Safety Management. London, UK: Academic Press Elsevier.
403. Soyer, A., Ertas, A. H., Üzümcüoğlu, Ü. (2005) Effect of processing conditions on the quality of naturally fermented Turkish sausages (sucuks). *Meat Science* 69, 135–141.
404. Sperber, W. (1998) Auditing and verification of food safety and HACCP. *Food Control* 9, 157-162.
405. Spoti, E. & Berni, E. (2007) Starter Cultures: Molds. In Toldra, F. (Ed.) Handbook of Fermented Meat and Poultry. Ames, USA: Blackwell Publishing.
406. Stahnke, L. H. (1995). Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosum* at different temperatures and with different ingredient levels — Part I. Chemical and bacteriological data. *Meat Science*, 41, 179- 191.
407. Stahnke, L., & Tjener, K. (2007) In Toldra, F. (Ed.) Handbook of Fermented Meat and Poultry. Ames, USA: Blackwell Publishing.
408. Standardization Organization for Gulf Cooperation Council (2008) Prepared meats: dry and semi-dry fermented sausage. Dostupno na: <https://law.resource.org/pub/gso/ibr/gso.1921.e.ds.2008.pdf>.
409. Stringer, S. C., George, S. M. & Peck, M. W. (2000) Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology* 88, 79S-89S.
410. Šarčević D., Lilić S., Vranić D. (2014) Redukcija soli u ishrani ljudi – globalna strategija u 21. veku. *Tehnologija mesa* 55, 162-168.
411. Talon R., Leroy, S., Lebert, I., Giammarinaro, P., Chacornac, J., Latorre - Moratalla, M., Vidal-Carou, C., Zanardi, E., Conter, M., Lebecque, A. (2008). Safety improvement and preservation of typical sensory qualities of traditional dry fermented sausages using autochthonous starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, (1–2), 227–34.
412. Talon, Leroy & Lebert (2007) Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: The importance of indigenous starters. *Meat Science* 77, 55–62.
413. Talon, R. & Leroy, S. (2011) Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. *Meat Science* 89, 303-309.
414. Talon, R. & Leroy, S. (2011) Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. *Meat Science* 89, 303–309.
415. Talon, R., Leroy, S. & Lebert, I. (2007) Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: The importance of indigenous starters. *Meat Science* 77, 55–62.
416. Talon, R., Leroy, S., & Lebert, I. (2007) Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: The importance of indigenous starters. *Meat Science* 77, 55-62.
417. Taplin, J. (1982) Salmonella newport outbreak - Victoria. In Communicable Disease Intelligence; 1, 3-6.
418. Teunis, P.M.F., Kasuga, F., Fazil, A., Ogden, I.D., Rotariu, O. & Strachan, N.J.C. (2010). Dose-response modeling of Salmonella using outbreak data. *International Journal of Food Microbiology*, 144, 243-249.
419. CFSPH - The Center for Food Security & Public Health: Iowa State University (2009) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections. Dostupno na: [www.cfsph.iastate.edu](http://www.cfsph.iastate.edu)
420. Thevenot, D., Delignette-Muller, L. M., Christieans, S., & Vernozy-Rozand, C. (2005). Fate of *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated French sausages. *International Journal of Food Microbiology* 101, 189-200.
421. Thippareddi, H., Boyle, E. A. E. & Burson, D. E. (2006) Monitoring, validation and verifying the effectiveness of HACCP systems. In Sofos, J. N. (Ed.) Improving the safety of fresh meat.
422. Tilden, J., Young, W., McNamara, A.M. et al. (1996) A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *American Journal of Public Health*, 86, 1142–1145.
423. Tjener, K., Stahnke, L. H., Andersen, L., Martinussen, J. (2004) The pH-unrelated influence of salt, temperature and manganese on aroma formation by *Staphylococcus xylosum* and

- Staphylococcus carnosus* in a fermented meat model system. *International Journal of Food Microbiology* 97, 31–42.
424. Toldrá F. & Reig M. (2007) Chemical Origin Toxic Compounds. In Toldra, F. (Ed.) Handbook of Fermented Meat and Poultry. Ames, USA: Blackwell Publishing.
425. Toldra F. (2002) Dry-cured meat products. Food & Nutrition Press, Inc. Trumbull, USA
426. Tompkin, R. B. (2005). Nitrite. In P. M. Davidson, J. N. Sofos, & A. L. Branen (Eds.), Antimicrobials in food (3rd ed.). Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Frances Group.
427. Tortorello, M. (2003). Indicator organisms for safety and quality - uses and methods for detection: minireview. *Journal of AOAC International* 86, 1208-1217.
428. Townsend, W. E. Davis, C. E. Lyon, C. E. Mescher. S. E. (1980) Effect of pork quality on some chemical, physical, and processing properties of fermented dry sausage. *Journal of Food Science* 45, 622–626.
429. Trotz-Williams, L. A., Mercer, N. J., Walters, J. M., Maki, A. M. & Johnson, R. P. (2012) Pork implicated in a Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 outbreak in Ontario, Canada. *Canadian Journal of Public Health* 103, 322-326.
430. Työppönen, S., Petäjä, E. & Mattila-Sandholm, T. (2003) Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *International Journal of Food Microbiology* 83, 233–244.
431. U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (USDA) (2005) Food standards and labeling policy book. Dostupno na: [http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/larc/Policies/Labeling\\_Policy\\_Book\\_082005\\_2.pdf](http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/larc/Policies/Labeling_Policy_Book_082005_2.pdf).
432. U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2014) Ready to Eat and Shelf Stable Products - Process Familiarization. Dostupno na: <http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/inspection/workforce-training/regional-on-site-training/inspection-methods>.
433. Ulutan F, Sultan N., Davutoğlu E., Usta D. (1998) Outbreak of food poisoning caused by *Salmonella typhimurium*. *Mikrobiyoloji Bulteni* 22, 95-100.
434. USDA-FSIS. 1999. Generic HACCP model for not heat treated, shelf stable meat and poultry products. Dostupno na: <http://www.fsis.usda.gov/OPPDE/nis/outreach/models/HACCP-15.pdf>.
435. Uzzau, S., Brown, D.J. Wallis, T., Rubino, S. Leori, G. Bernard, S. Casadesus, J. Platt D.J. & Olsen, J.E. (2000) Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiology & Infection* 125, 229-255.
436. Van 't Hooft, B. J. (1999) Development of binding and structure in semi-dry fermented sausages. A multifactorial approach. *Doctoral Thesis*, University of Utrecht, Faculty of Veterinary Medicine, 162.
437. Van Netten, P., Leenaerts, J., Heikant, G. M., & Mossel, D. A. (1986) A small outbreak of salmonellosis caused by Bologna sausage. *Tijdschrift voor diergeneeskunde*, 111, 1271–1275.
438. Vesković-Moračanin S. (2012) Uticaj faktora sredine na intenzitet antimikrobne aktivnosti bakteriocina: pregledni rad. *Tehnologija mesa* 53, (2), 157-165.
439. Vesković-Moračanin, S., Turubatović, L., Rašeta, M., Stefanović, S., Janković, S., Škrinjar M. (2011). Standardne radne procedure u proizvodnji sremske tradicionalno fermentisane kobasice. *Veterinarski glasnik*, 65, 83-93.
440. Vignolo, G. & Fadda, S. (2007) Starter Cultures: Bioprotective Cultures. In Toldra, F. (Ed.) Handbook of Fermented Meat and Poultry. Ames, USA: Blackwell Publishing.
441. Vignolo, G., Cecilia Fontana, C. & Fadda, S. (2010) Semidry and dry fermented sausages. In Toldra, F. (Ed.) Handbook of Meat Processing. Ames, USA: Blackwell Publishing.
442. Vignolo, G., Fontana, C., & Fadda, S. (2010) Semidry and Dry Fermented Sausages. In Toldra, F. (Ed.) Handbook of Meat Processing. Ames, USA: Blackwell Publishing.
443. Vuković I. (2012) Osnove tehnologije mesa. Četvrto izdanje, Veterinarska komora Srbije, Beograd, Srbija.

444. Vuković I., Vasilev D., Saičić S. & Bunčić O. (2004) Mikroflora i fizičko-hemijski pokazatelji kvaliteta kulena. *Tehnologija mesa* 45, 3–4, 104–107.
445. Vural, H. & Ozvural, E. (2007) In Toldra, F. (Ed.) Handbook of Fermented Meat and Poultry. Ames, USA: Blackwell Publishing.
446. Wainright, T. (1986) The chemistry of nitrosamine formation: Relevance to malting and brewing. *Journal Of The Institute Of Brewing* 92, 49-64.
447. Wang, B. (2006) Chemical Composition of Red Meat. In Hui, Y. H. (Ed.) Handbook of food science, technology and engineering.
448. Wang, G. & Doyle, M. P. (1998). Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. *Journal of Food Protection* 61, 662–667.
449. Wang, G., & Doyle, M.P. (1998) Survival of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. *Journal of Food Protection* 61, 662-667.
450. Warris, P. (2006) Meat preservation and processing. In Buncic, S. (Ed.) Integrated food safety and veterinary public health. Wallingford, UK: CABI International Publishing.
451. WHO Salmonella (non-typhoidal) (2013) Fact sheet N°139. Dostupno na: [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/)
452. Williams, R. C., Isaacs, S., Decou, M.L., Richardson, E.A., Buffett, M.C., Slinger, R.W. et al. (2000) Illnes outbreak associated with *Escherichia coli* O157:H7 in Genoa salami. *Canadian Medical Association Journal*, 162, 1409.
453. Willshaw, G.A., Thirlwell, J., Jones, A.P., Parry, S., Salmon, R.L. & Hickey, M. (1994) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in beefburgers linked to an outbreak of diarrhoea, haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome in Britain. *Letters in Applied Microbiology* 19: 304-307.
454. Wirth, F. (1985) The technology of processing meat not of standard quality. *Fleischwirtschaft* 66:998.
455. Wirth, F. (1988). Technologies for making fat-reduced meat products. *Fleischwirtschaft*, 68(9), 1153–1156.
456. World Health Organization, South-East Asia Regional Office (2014) A brief guide to emerging infectious diseases and zoonoses. Dostupno na: [www.searo.who.int/entity/emerging\\_diseases/ebola/a\\_brief\\_guide\\_emerging\\_infectious\\_diseases.pdf](http://www.searo.who.int/entity/emerging_diseases/ebola/a_brief_guide_emerging_infectious_diseases.pdf)
457. Wu, Y. C. & Chi, S. P. (2007) Casings. In Toldra, F. (Ed.) Handbook of Fermented Meat and Poultry. Ames, USA: Blackwell Publishing.
458. Yarbrough, J. M., Rake, J. B., Eagon, R. G. (1980) Bacterial Inhibitory Effects of Nitrite: Inhibition of Active Transport, But Not of Group Translocation, and of Intracellular Enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*, 831-834.
459. Youn, L. J., Yoon, J. W. & Hovde, C.J. (2010) A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20, 1–10.
460. Zhou, G. H. Yang, A., Tume, R.K. (1993) A relationship between bovine fat color and fatty-acid composition. *Meat Science* 35, 205–212.
461. Živković, D., Radulović, Z., Aleksić, S., Perunović, M., Stanišić, N., & Radović, C. (2012) Chemical, sensory and microbiological characteristics of Sremska sausage (traditional dry-fermented Serbian sausage) as affected by pig breed. *African Journal of Biotechnology*, 11, 3858-3867.