

# Utjecaj trajanja i temperature inkubacije na fizikalno-kemijska i senzorska svojstva polutrajnih kobasica

---

Mirić, Milijana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:204:109715>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
**AGRONOMSKI FAKULTET**

**UTJECAJ TRAJANJA I TEMPERATURE  
INKUBACIJE NA FIZIKALNO-KEMIJSKA I  
SENZORSKA SVOJSTVA POLUTRAJNIH  
KOBASICA**

DIPLOMSKI RAD

Milijana Mirić

Zagreb, rujan 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
**AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:  
Proizvodnja i prerada mesa

**UTJECAJ TRAJANJA I TEMPERATURE  
INKUBACIJE NA FIZIKALNO-KEMIJSKA I  
SENZORSKA SVOJSTVA POLUTRAJNIH  
KOBASICA**

DIPLOMSKI RAD

Milijana Mirić

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Ivica Kos

Zagreb, rujan 2022.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA**  
**O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Milijana Mirić**, JMBAG 0178111864, rođena 15. 4. 1996. u Ogulinu, izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

**UTJECAJ TRAJANJA I TEMPERATURE INKUBACIJE NA FIZIKALNO-KEMIJSKA  
I SENZORSKA SVOJSTVA POLUTRAJNIH KOBASICA**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
*Potpis studentice*

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZVJEŠĆE**

**O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA**

Diplomski rad studentice **Milijane Mirić**, JMBAG 0178111864, naslova

**UTJECAJ TRAJANJA I TEMPERATURE INKUBACIJE NA FIZIKALNO-KEMIJSKA  
I SENZORSKA SVOJSTVA POLUTRAJNIH KOBASICA**

obranjen je i ocijenjen ocjenom \_\_\_\_\_, dana \_\_\_\_\_.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. izv. prof. dr. sc. Ivica Kos, mentor

\_\_\_\_\_

2. prof. dr. sc. Danijel Karolyi, član

\_\_\_\_\_

3. doc. dr. sc. Iva Dolenčić Špehar, član

\_\_\_\_\_

## **Zahvala**

*Prije svega se želim zahvaliti svom mentoru izv. prof. dr. sc. Ivici Kosu na uloženom trudu, stavljanju na raspolaganje, svoj pomoći i podršci koju mi je pružio, ne samo za vrijeme pisanje ovog rada, već i općenito. Zahvaljujem mu na strpljenju, razumijevanju i brojnim savjetima koje sam od njega dobila kako bih uspješno mogla napisati ovaj rad, studentske dane privesti kraju i s velikom radoznalošću krenuti u nove izazove. Želim se zahvaliti i ostalim profesorima te cijelom osoblju fakulteta koji su me pratili i pomogli mi tijekom školovanja.*

*Zahvaljujem poduzeću TTR Kolovrat d.o.o. iz Zagreba na donaciji starter kultura.*

*Hvala mojoj obitelji, posebno mami, tati i sestri koji su mi uvijek u životu, a posebno u razdoblju studiranja bili velika podrška, svojim primjerima pokazali ispravan put kako ostvariti vlastite snove i njihova očekivanja.*

*I na kraju, ali jednako srdačno, hvala mom dečku, prijateljima i fakultetskim kolegama koji su pomogli da sve ovo bude jedan divan period života kojeg ću se uvijek rado sjećati.*

*Od srca hvala svima!*

# Sadržaj

Sažetak .....	I
Summary.....	II
<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. PREGLED LITERATURE .....</b>	<b>3</b>
2.1. Konzerviranje mesa soljenjem/salamurenjem.....	3
2.2. Povijest korištenja nitrata i nitrita kod konzerviranja mesa .....	4
2.3. Nitrati i nitriti u okolišu.....	7
2.4. Nitrati i nitriti u mesu i mesnim proizvodima .....	9
2.5. Kvaliteta kobasica .....	11
2.6. Toplinski obrađene kobasice .....	12
2.7. Prirodne alternative upotrebi sintetskih nitrita u preradi mesa .....	13
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>16</b>
3.1. Izrada polutrajnih kobasica .....	16
3.2. Provedene analize.....	18
3.3. Statistička obrada podataka.....	20
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>21</b>
4.1. pH vrijednost .....	21
4.2. Aktivitet vode.....	22
4.3. Instrumentalna boja .....	24
4.4. Stupanj oksidacije .....	27
4.5. Sadržaj rezidualnih nitrata i nitrita.....	28
4.6. Senzorska svojstva .....	32
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>35</b>
<b>6. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>36</b>
Životopis.....	39

## Sažetak

Diplomskog rada studentice Milijane Mirić, naslova

### **UTJECAJ TRAJANJA I TEMPERATURE INKUBACIJE NA FIZIKALNO-KEMIJSKA I SENZORSKA SVOJSTVA POLUTRAJNIH KOBASICA**

Cilj rada bio je utvrditi utjecaj trajanja i temperature inkubacije starter kulture *Staphylococcus carnosus* uz dodatak natrijevog nitrata na fizikalno-kemijska i senzorska svojstva polutrajnih kobasica. U kobasice kontrolnog tretmana je dodan natrijev nitrit, dok su u kobasice pokusnih tretmana dodane starter kulture i natrijev nitrat te je primijenjena inkubacija u trajanju 1,5 i 3 sata na temperaturi 30 i 40 °C. Istraživanjem nije utvrđena značajna razlika između tretmana u pH vrijednostima kao ni u pokazateljima boje L\* i a\*. Utvrđena je značajno manja vrijednost stupnja oksidacije i veći intenzitet žute boje b\* nareska kod kontrolnog tretmana. Sadržaj rezidualnih nitrata bio je najveći kod kontrolnog tretmana te je uočeno postupno smanjenje u svim tretmanima tijekom 60 dana čuvanja. S povećanjem temperature i trajanja inkubacije uočen je veći udio rezidualnih nitrata. Senzorska svojstva tretmana s nižom temperaturom i kraćim trajanjem inkubacije nisu bila značajno različita od kontrolnog tretmana i mogu biti primjenjivi u proizvodnji polutrajnih kobasica.

**Ključne riječi:** polutrajne kobasice, nitrati, nitriti, starter kulture, pH, reaktivne supstance tiobarbiturne kiseline, senzorska analiza



## Summary

Of the master's thesis - student Milijana Mirić, entitled

### **INFLUENCE OF INCUBATION DURATION AND TEMPERATURE ON THE PHYSICAL-CHEMICAL AND SENSORY PROPERTIES OF SEMI-DURABLE SAUSAGES**

The aim of the work was to determine the influence of the duration and temperature of the incubation of the *Staphylococcus carnosus* starter culture with the addition of sodium nitrate on the physico-chemical and sensorial properties of semi-durable sausages. Sodium nitrite was added to the sausages of the control treatment, while starter culture and sodium nitrate were added to the sausages of the experimental treatments and incubation was applied for 1.5 and 3 hours at temperatures of 30 and 40 °C. The research did not establish a significant difference between the treatments in the pH values nor in the color indicators L\* and a\*. A significantly lower value of the degree of oxidation and a higher intensity of the yellow color b\* of the slices were found in the control treatment. The content of residual nitrites was the highest in the control treatment, and a gradual decrease was observed in all treatments during 60 days of storage. With increasing temperature and duration of incubation, a higher proportion of residual nitrites was observed. The sensory properties of the treatments with a lower temperature and shorter duration of incubation were not significantly different from the control treatment and may be applicable in the production of semi-durable sausages.

**Keywords:** semi-durable sausages, nitrates, nitrites, starter cultures, pH, thiobarbituric acid reactive substances, sensory analysis

# 1. UVOD

Prema Zakonu o prehrambenim aditivima, aromama i prehrambenim enzimima (NN 39/2013.), a sukladno prilogu I. Uredbe 1333/2008 Europskog parlamenta i Vijeća od 16. prosinca 2018. godine o prehrambenim aditivima, aromama i prehrambenim enzimima (Službeni list Europske unije 2018.), od 26 kategorija aditiva, nitrati i nitriti pripadaju skupini konzervansa, odnosno aditiva koji sprječavaju infekcije, intoksikacije i kvarenje mesnih proizvoda te povećavaju njihovu trajnost. Također, nitrati i nitriti utječu na promjenu boje, mirisa, okusa i teksture mesnih proizvoda te, zahvaljujući antioksidativnom djelovanju, pridonose sprječavanju kvarenja.

U mesnoj industriji se kao sastavni dio salamure najčešće koriste natrijev nitrit (E250) i kalijev nitrit (E249), odnosno natrijev nitrat (E251) i kalijev nitrat (E252). Nitrati, za razliku od nitrita, nemaju antimikrobno djelovanje, ali se djelovanjem denitrificirajućih bakterija, osobito iz roda *Micrococcus*, reduciraju pomoću enzima nitrat-reduktaze u nitrite te na taj način služe kao izvor nitrita. Njihova se koncentracija, a time i antimikrobni učinak, tijekom procesiranja znatno smanjuje – čemu dodatno pridonose veća pH-vrijednost, redukcijsko djelovanje askorbinske kiseline, toplinska obrada te dugotrajno zrenje ili skladištenje (Kovačević i sur. 2016., prema Tompkin 2005.). Nitrati, ukoliko nisu dodani ili potječu iz vode i začina, mogu se detektirati samo u onim mesnim proizvodima u koje su prethodno dodani nitriti. Naime, do 20 % dodanih nitrita oksidira u nitrate dva sata nakon procesiranja, a oksidacija se nastavlja tijekom zrenja (kod trajnih fermentiranih mesnih proizvoda) ili skladištenja. Istraživanja su pokazala da pri ubrzanim fermentacijama u industrijskoj proizvodnji (bakterijske starter kulture, šećeri i povišene temperature fermentacije) ukupno oko 50 % dodanih nitrita prelazi u nitrate. Nitrati i nitriti se u mesne proizvode unose s pomoću soli za salamurenje ( $\text{NaCl} + 3\% \text{NaNO}_3$  ili  $\text{KNO}_3$ ), nitritne soli za salamurenje ( $\text{NaCl} + 0,5\text{--}0,6\% \text{nitrita izraženih kao } \text{NaNO}_2$ ) ili nitritne soli za salamurenje s 1 % salitre ( $\text{NaCl} + 0,5\text{--}0,6\% \text{nitrita izraženih kao } \text{NaNO}_2 + 0,9\text{--}1,2\% \text{salitre izražene kao } \text{NaNO}_3$ ) (Kovačević i sur. 2016., prema Tompkin 2005.).

Neodgovorna upotreba nitrita može dovesti do velikog udjela rezidualnog nitrita koji se nije iskoristio za pozitivno djelovanje. Rezidualni nitriti mogu predstavljati problem jer pri reakciji nitrita s proteinima mesa mogu nastati štetni i kancerogeni spojevi N-nitrozamini (Beinrauch i Pawelitsch 2017.). Iako je nitrit jedini poznati konzervans koji inhibira rast spora patogene

bakterije *Clostridium botulinum* i stvaranje neurotoksina botulinuma, a zbog štetnog djelovanja nitrita na ljudsko zdravlje, posebice kancerogenog djelovanja N-nitrozoamina, najveće dopuštene količine u mesnim proizvodima ograničene su, a već 1995. godine EFSA-in Odbor za prehrambene aditive i nutrijente dodane hrani (engl. *Food Additives and Nutrient Sources added to Food*) dao je preporuku za primjenu odgovarajuće tehnološke prakse kako bi se razina nitrata i nitrita smanjila na najmanju moguću razinu, ujedno rezultirajući djelotvornim konzerviranjem i mikrobiološkom sigurnošću hrane. Službenim mišljenjem Znanstvenog odbora Hrvatske agencije za hranu donesenim na temelju rezultata istraživačkog projekta *Analiza i procjena sigurnosti prehrambenih aditiva*, aditivi natrijev i kalijev nitrit (E250 i E249) svrstani su u najrizičniju 3. sigurnosnu skupinu te je utvrđeno da njihov procijenjeni dnevni unos (engl. *Estimated Daily Intake*; EDI) teorijski višestruko prelazi prihvatljiv dnevni unos (engl. *Acceptable Daily Intake*; ADI), što upućuje na potrebu kontinuiranog praćenja unosa nitrita u ljudski organizam (HAPIH 2014.).

Stoga, postoje određeni načini smanjenja sadržaja nitrita u mesnim proizvodima, ne bi li se smanjio njegov utjecaj na razvoj kancerogenih spojeva u mesnim proizvodima. Nekolicina je znanstvenika došla do ideje upotrebe alternativnih metoda zamjene nitrita nekim drugim sredstvima, pa se tako nitrit može potpuno ili djelomično zamijeniti prirodnim sredstvima ili se pak mogu upotrijebiti sredstva koja blokiraju tvorbu nitrozamina u proizvodima koji sadrže konvencionalne koncentracije nitrita (Kostelac 2018., prema García i sur. 2011.).

Uvažavajući namjere smanjenja sadržaja nitrita u mesnim proizvodima, cilj ovog diplomskog rada je utvrditi utjecaj trajanja i temperature inkubacije starter kulture *Staphylococcus carnosus* na fizikalno-kemijska, kao i na senzorska svojstva polutrajnih kobasica s dodatkom nitrata.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Konzerviranje mesa soljenjem/salamurenjem

Kada je riječ o konzerviranju mesa, razlikujemo fizikalne, kemijske i mikrobiološke metode konzerviranja. U fizikalne metode ubrajamo upotrebu niskih/visokih temperatura, sušenje, upotrebu mikrovalova, upotrebu zračenja, visoki pritisak, pakiranje i drugo. Kemijske metode obuhvaćaju upotrebu soli, nitrita, šećera, začina, fosfata, zatim dimljenje, upotrebu antioksidanata te sulfita, sorbata, laktata, zakiseljivača i sl. Mikrobiološke metode uključuju kompeticiju, fermentaciju i antimikrobne tvari. Iz navedene podjele može se izdvojiti da su soljenje i salamurenje kemijske metode konzerviranja mesa koje se vrlo često nadopunjuju drugim metodama, poput upotrebe visokih temperatura u proizvodnji toplinski obrađenih proizvoda. Uz konzervirajuće djelovanje, soljenje i salamurenje poboljšavaju organoleptička ili senzorska svojstva, kao što su miris, okus, boja i tekstura (Kovačević 2001.). U Pravilniku o mesnim proizvodima (NN 2018.) navodi se da je soljenje postupak obrade mesa, masnog tkiva i drugih jestivih dijelova solju (NaCl), a da je salamurenje postupak suhe ili mokre obrade mesa, masnog tkiva i drugih jestivih dijelova u kojoj se koristi sol za salamurenje i drugi sastojci. Najčešći drugi sastojci u salamurenju su polifosfati, askorbinska kiselina i askorbati, mliječna, vinska i limunska kiselina te njihove natrijeve soli, glukoza, dekstroza i saharoza. Salamura djeluje konzervirajuće difuzijom iona soli u meso prilikom razlike u osmotskim tlakovima (sol difundira u unutrašnjost mesa, a voda prema površini), te reakcijom difundiranih soli s mišićnim vlaknima. U početku je difuzija brza, a kasnije teče sporije. Treba imati na umu da se koncentracije soli u salamuri i u mesu nikada ne izjednačavaju, već difuzija prestaje kada koncentracija soli u mesu dostigne maksimalno 80 % vrijednosti koncentracije soli u salamuri. Kako bi salamura što bolje dospjela u meso, pogodna je tzv. *otvorena* mikrostruktura mesa koja je najizraženija kada završi postmortalno nakupljanje mliječne kiseline, sniženje pH-vrijednosti i sposobnosti vezivanja vode te proteoliza. Topla salamura, za razliku od hladne, brže prodire u meso (Kostelac 2018.).

Kao glavni sastojak salamure moraju se istaknuti nitrati, odnosno nitriti. Nitrati, koji se ne smatraju pravim konzervirajućim sredstvom, djelotvorni su jedino kada su reducirani do nitrita. Redukcija se odvija pod djelovanjem prirodno prisutnih bakterija na površini mesa ili namjerno dodanih bakterija koje posjeduju aktivnost enzima nitrat reduktaze. Nitrati se danas rjeđe koriste

od nitrita, no igraju zamijećenu ulogu kod sušenih, odnosno fermentiranih mesnih proizvoda kod kojih je proizvodni proces dugotrajan i sporo teče (Kostelac 2018.).

## **2.2. Povijest korištenja nitrata i nitrita kod konzerviranja mesa**

Kostelac navodi da je, nakon trajanja razvoja i evolucije tijekom više milijuna godina, čovjek u dugom prapovijesnom razdoblju prešao put od sakupljača i lovca do poljodjelca i stočara – sve to išlo je u korist jednostavnog preživljavanja u pradavno doba, kad je čovjekov cilj bio što duže očuvati hranu koju je prikupio, a njegovo znanje i vještine vjerojatno sežu do daleko većih razmjera nego što tvrde znanstvena otkrića. Podrijetlo korištenja nitrata u konzerviranju mesa izgubljeno je u povijesti, no sigurno je da se već tisućljećima meso tretiralo sa soli, što prethodi upotrebi nitrata. Stari zapisi tvrde da su drevni Sumerani još 3000 godina pr. Kr. u Mezopotamiji uživali u suhom soljenom mesu i ribi kao dijelom svoje prehrane, a kuhano meso i ribu držali su u staklenkama u ulju od sezama (Kovačević i sur. 2016.). Također su i stanovnici drevnog Babilona sol smatrali vrlo bitnim sastojkom. Bilo je to doba kada je čovjek u svemu tražio korist, pa se tako 1600. godine pr. Kr. sol počinje naširoko upotrebljavati u Židovskom Kraljevstvu, naročito zbog blizine Mrtvog mora koje im je služilo kao prirodan izvor soli. Tehnologija proizvodnje morske soli poznata je i od Kineza koji su oko 1600. godine pr. Kr. crpili sol iz bušenih bunara.

Čuvanje mesa bilo je prakticirano u pustinjama Azije i u obalnim područjima. Pustinjska sol sastojala se od nitrata i boraksa u obliku prašine. Međutim, djelovanje nitrata na boju mesa nije spomenuto sve do vremena Rimljana. Prije nego je znao za nitrate, čovjek je u pećinama otkrio salitru ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) u obliku izbočina na zidovima. Taj oblik nitrata – salitra – nastao je djelovanjem nitrificirajućih bakterija. S razlogom treba spomenuti da su pustinjske i zidne soli zbog svojih nitratnih kontaminanata djelovale na meso i to ne samo na boju nego i na okus (Kostelac 2018., prema Binkerd i Kolari 1975.).

Zapisi tvrde da su Feničani oko 1200. godine pr. Kr. s istočnog dijela Mediterana kao moreplovci trgovali nasoljenom ribom koja je od svježe ribe mogla duže izdržati bez procesa kvarenja. Drevni Grci koristili su sol u čuvanju ribe 500. godine pr. Kr. i proizvodili sol u solnim vrtovima. Rimljani su naučili koristiti sol od Grka i na taj su način intenzivno konzervirali svinjsko meso i ribu. Naučili su kako marinirati razne vrste mesa, a marinada se sastojala ne samo od soli nego i od drugih sastojaka. U Rimskom Carstvu osnovali su trgovinu za takvu vrstu proizvoda.

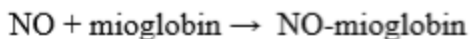
Tretiranje mesa sa solju, salitrom i dimom s vremenom je poprimalo sve veći značaj. U doba Homera, soljenje i dimljenje postale su uobičajene metode konzerviranja mesa (Kostelac 2018., prema Binkerd i Kolari 1975.).

S vremenom su se razvijale i razne druge metode, a među prvima je bila metoda koja je uključivala i konzerviranje šunke. Proces se sastojao od vizualnog pregleda buta, zatim nanošenja ulja na površinu buta trljanjem, dimljenja te ponovnog trljanja smjese ulja i octa. Nekoliko autora iznosi zanimljivu činjenicu da se koristila pržena sol za soljenje mesa u područjima s vrućom klimom, a razlog zbog kojeg se pržila bilo je uništavanje mikroorganizama ili čak pretvorba nitrata u nitrite. Upotreba soli i salitre u srednjem vijeku postala je uobičajena te je ubrzo uočen i učinak soli i salitre na boju mesa. Osim soli i nitrata, za konzerviranje hrane naširoko su se koristili šećer i med. Mnogi su znanstvenici u svojim radovima opisivali metode konzerviranja mesa koje su podrazumijevale trljanje površine mesa sa soli ili uranjanje mesa u jaku otopinu soli i salitre. Neki od njih isticali su da je neophodno da nasoljeno meso mora potjecati od blisko usmrćene životinje. Također su ukazivali na to da meso koje je tretirano na taj način gubi na boji, ali kada se tretira sa salitrom, postaje crvenkasto i održivost takvog mesa znatno je produžena (Kostelac 2018., prema Binkerd i Kolari 1975.).

U 19. stoljeću ljudi su shvatili da neke soli djeluju bolje od drugih. Tako je uočena salitra ( $\text{KNO}_3$ ) kao kontaminant soli, koja je pridonosila očuvanju proizvoda i dala mu crvenu boju, a raznim je istraživanjima utvrđeno da čista sol ne proizvodi tipičnu boju konzerviranog mesa (Isto). Njemački znanstvenici proveli su eksperimente kojima je utvrđeno da dodatkom nitrata, odnosno salitre, meso mijenja boju te je jedan od znanstvenika 1901. godine izdvojio nitrozilmioglobin kao supstancu koja je odgovorna za svijetlocrvenu boju konzerviranog mesa. Reaktant je bila dušikasta kiselina ( $\text{HNO}_2$ ) koja je reagirala s mioglobinom. Prema tome, djelovanje dušikovih spojeva na boju mesa razjašnjeno je tijekom 20. stoljeća.

U Europi i u svijetu se 1970-ih godina pobudio značajan interes za količinama nitrata u mesnim proizvodima zbog potencijalne opasnosti od nastanka kancerogenih i toksičnih spojeva N-nitrozoamina te su zbog toga razmatrane rezidualne količine nitrata u mesnim proizvodima od američkog instituta za meso. Kao glavni problem, skupina znanstvenika istaknula je uklanjanje jednog ili više prekursora N-nitrozoamina (nitrata i sekundarnih amina), a kako su svi konzervirani proizvodi sadržavali oba prekursora, konzumacija takvih proizvoda proglašena je opasnom za zdravlje ljudi, te je gotovo rezultiralo eliminacijom nitrata kao konzervirajućeg sredstva.

(KNO<sub>3</sub>) salitra (nitrat) → redukcija uz djelovanje mikroorganizama → nitrit (KNO<sub>2</sub>)



### Slika 2.2.1. Djelovanje nitrata u konzerviranim mesnim proizvodima

Izvor: prilagođeno prema Honikel, K. O. (2008). *The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products*. Meat Science. 78: 68–76. Cit. u: Kostelac 2018.

Nova znanstvena otkrića uslijedila su 1978., i to eksperimentiranjem na štakorima koje je dokazalo da je nitrit sam po sebi kancerogeni spoj. Međutim, 1982. godine Nacionalna akademija znanosti u SAD-u započela je temeljitu procjenu utjecaja nitrata biološkim testovima čime su zaključili da nije dokazana kancerogenost potaknuta nitritima u niti jednom glavnom tkivu muških ili ženskih štakora i muških miševa, već je kancerogenost uočena samo u želucu ženskih miševa (Kostelac 2018., prema Sindelar i Milkowski 2011.).

Nizom epidemioloških studija u 1990-im godinama došlo se do spoznaja da je konzumacija konzerviranog mesa i mesnih proizvoda povezana s rakom mozga i dječjom leukemijom. U Washingtonu su 1994. godine mediji izvještavali da su djeca koja pojedu više od dvanaest *hot-dogova* mjesečno devet puta više izloženija opasnosti od nastanka leukemije. Stoga je Kalifornija 1998. godine predložila klasifikaciju nitrata kao razvojnog i reproduktivnog toksikanta (Kostelac 2018., prema Sebranek i Bacus 2007.). Potom, skupina je znanstvenika 2006. godine prikazala još jedan pregled radova na temu kancerogenosti potaknute nitritima i nitratima, a njihov konačni zaključak bio je sljedeći: *Progutani nitrati ili nitriti, pod uvjetima koji rezultiraju endogenom nitrozacijom, su vjerojatno kancerogeni za ljude* (Kostelac 2018., prema Sindelar i Milkowski 2011.). Istaknuto je stoga kako još uvijek ne postoje uvjerljivi dokazi da su nitriti direktno kancerogeni za ljude, već se samo iznosi vjerojatnost za njihov mogući nastanak tijekom unosa većih količina u organizam. Epidemiološka studija iz 2008. godine izvijestila je da postoji veliki rizik za nastanak raka debelog crijeva kao posljedica konzumiranja prerađenog mesa.

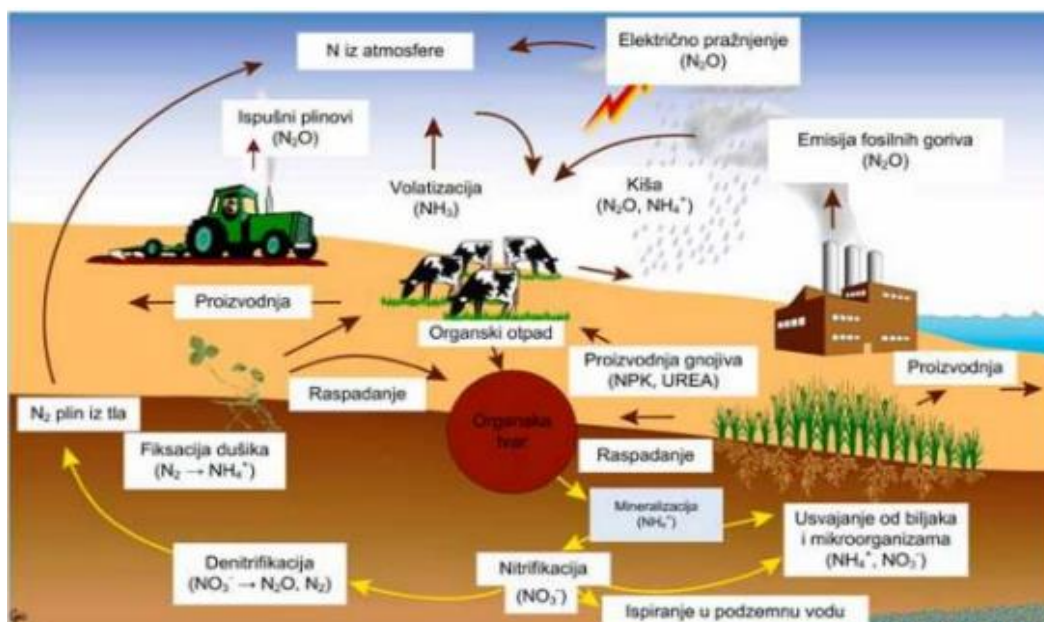
### 2.3. Nitrati i nitriti u okolišu

Nitrati i nitriti spojevi su koji sadrže dušik i kisik, a njihova je glavna razlika u tome što nitrati ( $\text{NO}_3^-$ ) imaju jedan atom kisika više od nitrita ( $\text{NO}_2^-$ ). Prirodno se pojavljuju u tlu, samim time i u biljkama, u vodi (Kostelac 2018.), a dušik kao inertnu molekulu pri sobnoj temperaturi nalazimo u atmosferi u plinovitom stanju te kao takav predstavlja jednu od osnovnih tvari za život na Zemlji. Dušik je ugrađen u aminokiseline i proteine, te je dio nukleinskih kiselina DNA i RNA. Sam atom dušika jedan je od kemijskih elemenata koji mogu promijeniti svoje oksidacijsko stanje. Njegova vanjska ljuska od pet elektrona ( $s^2 p^3$ ) može primiti tri dodatna elektrona pri čemu se njegovo oksidacijsko stanje mijenja. U amonijaku postoji u  $\text{N}^{3-}$  obliku, a kada otpusti pet elektrona, mijenja svoje stanje u  $\text{N}^{5+}$  i kao takav postoji u nitratima ( $\text{NO}_3^-$ ).

Nitrati su prirodno prisutni u tlu te ujedno služe kao izvor dušika za povoljan rast biljaka koje apsorbiraju više od 90 % dušika iz nitrata. Organske tvari tla sadrže oko 5 % dušika, a dušik se u tlu, kao gnojivo, nalazi u obliku amonijaka ( $\text{NH}_4^+$ ) te se, djelovanjem mikroorganizama, pretvara u nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) kako bi biljkama bio dostupan i iskoristiv. Gnojivo porijeklom od životinja odličan je izvor dušika te može uvelike pridonijeti poboljšanju kemijskog sastava tla, međutim, prekomjerna upotreba gnojiva može rezultirati toksičnim koncentracijama nitrata u krmnim smjesama za životinje. Sadržaj nitrata u proizvedenom usjevu može se smanjiti dodatkom fosfatnog gnojiva, no korištenje aditiva u hrani za životinje može rezultirati značajnim koncentracijama određenih elemenata kao što su bakar, cink, arsen i dr., a njihove količine u hrani za životinje mogu biti toksične. Nitrati i nitriti se prirodno pojavljuju i u povrću zbog dušikovog ciklusa, pri čemu je dušik vezan za djelovanje bakterija. Visoke koncentracije nitrata (više od 1000 mg/kg) sadrže cikla, brokula, celer, kupus, zelena salata, rotkvica i špinat, dok nitrita u svježem povrću ima jako malo (manje od 1 mg/kg) (Kostelac 2018.). Određene koncentracije nitrata nalaze se i u otpadnim vodama i vodama za piće, a Karoly navodi da posebice bunarska voda može biti bogata nitratima. U površinske i podzemne vode mogu dospjeti kao posljedica djelovanja poljoprivrednih aktivnosti (uključujući prekomjernu upotrebu anorganskih dušičnih gnojiva) (Pavlinić, Prokurica i sur. 2010.). Nitrati se, u anorganskim gnojivima, uglavnom koriste kao oksidacijsko sredstvo, zatim se koriste u proizvodnji eksploziva, a purificirani kalijev nitrat u proizvodnji stakla.



Dušik kao prirodni element odlikuje nutritivna važnost u ishrani bilja te se on nužno dodaje u tlo u velikim količinama ne bi li poboljšao biljni urod. Izvori su dušika dvojaki – mogu biti organski, dakle, u obliku stajskog gnoja; ili mogu biti anorganski, tada se to odnosi na mineralna gnojiva (Filipović i sur. 2013.). Mineralni dušik u tlu mineralizira se imobilizacijom iz prirodnih i antropogenih izvora, ali i gubicima iz tla, o čemu se više može vidjeti na **Slici 2.3.1.**



**Slika 2.3.1.** Kruženje dušika u prirodi

Izvor: [http://www.voda.hr/sites/default/files/pdf\\_clanka/hv\\_84\\_2013\\_119-128\\_filipovic-et-al.pdf](http://www.voda.hr/sites/default/files/pdf_clanka/hv_84_2013_119-128_filipovic-et-al.pdf)

Slika 2.3.1. između ostalog, prikazuje i procese nitrifikacije i denitrifikacije – dok je nitrifikacija proces biološke oksidacije amonijevih iona koji s pomoću određenih bakterija stvaraju nitrate pristupačne biljci, denitrifikacija proces je redukcije tog nitrata u plinovne oblike ( $N_2O$  i  $N_2$ ). Ne bi li došlo do redukcije nitrata, potreban je organski ugljik kao izvor energije. S druge strane, kad je riječ o nitritu kod ljudi, slina je glavno mjesto stvaranja nitrita. Naime, u ljudskom organizmu postoje dva glavna izvora nitrata i nitrita; jedan je endogeni put 1-arginin-NO sintaze, a drugi je prehrana. Ti se spojevi apsorbiraju prvenstveno uzimanjem hrane. Zatim redukcija nitrata u nitrite započinje u usnoj šupljini djelovanjem komenzalnih bakterija koje se nalaze na jeziku. Progutani nitriti u želucu (u kiselim uvjetima) postaju protonirani do dušikaste kiseline. Kada se nitriti jednom formiraju, postoji niz reakcija u tijelu za njihovu daljnju redukciju do NO, uključujući mioglobin i hemoglobin, askorbate, polifenole i protone. Svega oko 5 % nitrata

unesenih hranom reducira se u slini i gastrointestinalnom traktu, no ta vrijednost može doseći i 20 %, ovisno o količini nitrata u pojedinim namirnicama.

Nakon što dušikasta kiselina nastane iz nitrita u kiselom okruženju, može tvoriti anhidride koji su u ravnoteži s oksidima NO i NO<sub>2</sub>. NO reagira sa mioglobinom ili aminokiselinama, npr. cisteinom ili glutationom, dok NO<sub>2</sub> reagira s vodom pri čemu ponovo tvori jednu molekulu dušikaste kiseline i jednu molekulu dušične kiseline. Slijedom reakcija, nitriti (oksidacijsko stanje N<sup>3+</sup>) oksidiraju do nitrata s oksidacijskim stanjem N<sup>5+</sup>. NO, kao drugi reaktant, ima oksidacijsko stanje N<sup>2+</sup> i biva reduciran (Kostelac 2018.).

Ako se nitriti dodaju mesu, prisutna sol iz nitrita otopit će se kod pH mesa 5,5. Zbog pK (konstanta disocijacije) dušikaste kiseline koja je 3,37, oko 50 % kiseline disocirano je, pa se može očekivati da će oko 99 % nitrita pri pH 5,5 postojati kao anioni (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Mala količina nedisocirane dušikaste kiseline je u ravnoteži sa svojim anhidridom N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (di-dušikov trioksid) što je u ravnoteži sa dva oksida: dušikovim oksidom (NO) i dušikovim dioksidom (NO<sub>2</sub>). NO<sub>2</sub> može reagirati s vodom, što znači da se od dviju NO<sub>2</sub> molekule formiraju jedna molekula dušikaste (HNO<sub>2</sub>) i jedna molekula dušične kiseline (HNO<sub>3</sub>). Nadalje, NO molekula se, u prisustvu kisika, lako može sama oksidirati do NO<sub>2</sub> što znači da dolazi do uzimanja kisika iz okoline i ujedno antioksidativnog djelovanja nitrita u mesnim proizvodima. Zbog nedostatka kisika smanjena je mogućnost razvoja užeglosti, odnosno ranketljivog okusa mesnih proizvoda.

## **2.4. Nitrati i nitriti u mesu i mesnim proizvodima**

Postojeći Pravilnik o mesnim proizvodima (NN 62 2018.) navodi kako su meso i mesni proizvodi svrstani u kategorije unutar kojih postoje detaljnije podjele, odnosno skupine i podskupine, a proizvode se i stavljaju na tržište pod određenim nazivima. Mesni se proizvodi dijele u dvije kategorije: toplinski obrađeni mesni proizvodi i toplinski neobrađeni mesni proizvodi. Toplinski obrađeni mesni proizvodi dijele se dalje na polutrajne suhomesnate proizvode od jednog komada mesa, polutrajne proizvode od komada mesa, proizvode od usitnjenog mesa te polutrajne kobasice; dok se toplinski neobrađeni mesni proizvodi dijele na trajne suhomesnate proizvode, trajne kobasice i fermentirane polusuhe kobasice.

70-ih godina prošlog stoljeća upotreba nitrita u mesnim proizvodima došla je u pitanje zbog znanstveno dokazane povezanosti s nastankom N-nitrozoamina unatoč povoljnom djelovanju zbog

čega se i upotrebljava. Nitriti reagiraju s aminima ili aminokiselinama mesa prilikom toplinske obrade i u određenim uvjetima, pri čemu nastaju spojevi N-nitrozodimetilamini (NDMA) i N-nitrozopirolidin (NPYR) koji su dokazano kancerogeni, mutageni i teratogeni. Od više od 300 poznatih spojeva N-nitrozoamina, oko 90 % spojeva je do sada testirano na životinjama i pokazalo se da uzrokuju različite vrste tumora, no ne postoji dovoljno čvrsti dokaz između pojave tumora kod ljudi i izloženosti N-nitrozo spojevima. Zbog mnogih indirektnih dokaza o povezanosti s pojavom tumora kod ljudi, može se utvrditi da se radi o mogućem etiološkom uzročniku uzevši u obzir činjenicu da je 35 % svih tumora kod ljudi uzrokovano konzumacijom određene hrane. Sjedinjene Američke Države su 1998. godine nitrit proglasile razvojnim i reproduktivnim toksikantom (Kostelac 2018.).

Rezultati istraživanja znanstvenika pokazali su da na promjene količina nitrata i nitrita kao i na nastanak N-nitrozoamina u različitim mesnim proizvodima uvelike utječu uvjeti skladištenja. Naime, razvoju bakterija odgovaraju više temperature pa dolazi do naglog smanjenja količina nitrita pri sobnoj i višim temperaturama, dok se vrijednosti nitrata pod utjecajem bakterija smanjuju, ali ne u toliko značajnoj mjeri. Količine nitrita smanjuju se i zbog reakcija nitrita sa sirovinama mesnih proizvoda iz kojih se proizvode, a to uključuje i način proizvodnje, duljinu skladištenja i dodatne sastojke koji se koriste u proizvodnji. Prilikom proizvodnje i prerade mesnih proizvoda, vrlo je bitan način dodavanja nitrita, odnosno dodaju li se odjednom ili postupno. Istraživanjem se također dokazalo da su za nastanak N-nitrozoamina odgovorni nitrati, nitriti, primarni ili sekundarni amini ili amidi, proteini, peptidi ili aminokiseline koji se nalaze ili nastaju u mesnim proizvodima te koji pod utjecajem mikroorganizama postaju prekursori iz kojih, kao rezultat kemijskih reakcija, nastaju nitrozoamini.

Oksidacija nitrita u nitrata u mesu objašnjava zašto se u mesnim proizvodima, u koje su dodani samo nitriti, mogu pronaći i znatne količine nitrata. Njemački znanstvenici su prikazali rezultate istraživanja koji su se odnosili na koncentracije nitrita i nitrata u njemačkim mesnim proizvodima. Kobasice tipa emulzije, toplinski obrađene kobasice i butovi proizvodili su se samo uz dodatak nitrita, ali sadržavali su srednju vrijednost od 20–30 mg nitrata/kg. U većini slučajeva, u konačnom proizvodu nitrita je bilo manje nego nitrata s koncentracijom ispod 20 mg nitrita/kg u srednjoj vrijednosti. Zabilježeno je samo nekoliko primjera i to kuhanih i sirovih kobasica te sirovih butova koji imaju višu koncentraciju nitrata. Bez dodatka nitrita u mesno tijesto, pojavljuje se rezidualna količina nitrata do 30 mg/kg što je, vjerojatno, zbog dodavanja vode i začina.

## 2.5. Kvaliteta kobasica

Kvaliteta hrane može se definirati iz dviju perspektiva, a to su znanstveni status i sklonosti potrošača. Znanstveni čimbenici koji utječu na kvalitetu hrane sljedeći su: sastav, kvarenje, bojila, aditivi, hranjive tvari, arome, funkcionalni sastojci (utječu na zdravlje), onečišćenja, opća sigurnost i drugo. Sklonosti potrošača povezane su izravno s ljudskim osjetilima, odnosno s vidom, dodirom, mirisom, okusom i osjetom u ustima. Dok se vizualni čimbenici odnose na boju, vlagu i ukupni izgled, taktilni se čimbenici odnose na elastičnost i mekoću, odnosno tvrdoću. Zatim, osjet u ustima se odnosi na teksturu, mekoću, nježnost i žvakanje, a također, kvaliteta hrane ovisi i o genetici te biologiji životinja pa je tako teletina u usporedbi s govedinom mekša i nježnija, piletina je nježnija od puretine, morska riba se razlikuje od slatkovodne ribe, a i bijelo meso se biološki razlikuje od tamnog mesa. Kvaliteta bjelančevina mesa i mesnih proizvoda ovisi o količini ekstracelularnih proteina vezivnog tkiva prisutnih u koštanim, srčanim i glatkim mišićnim tkivima (tj. kolagena, elastina, proteoglikana i drugih). Značajne razine mesa slabe kvalitete (iz ekonomske i prehrambene točke gledišta) bogatog vezivnim tkivom mogu se utvrditi procjenom sadržaja kolagena, odnosno hidrokisprolina. Kontrola kvalitete je glavni zadatak tijekom svih industrijskih procesa, pa tako i u prehrambenoj industriji, jer se kvaliteta hrane ne može nedvosmisleno definirati pomoću kemijskih analiza ili objektivnih mjerenja (Peinović 2018.).

Bitan korak u bilo kojoj strategiji orijentiranoj na kvalitetu prepoznati je i kvantificirati one parametre koji mogu bolje opisati i okarakterizirati proizvod. Primjerice, kobasice su proizvodi dobiveni nadijevanjem prirodnih ili umjetnih ovitaka smjesom različitih vrsta i količina usitnjenog mesa, masnog tkiva, kožica, iznutrica, ostataka vezivnog tkiva i dodatnih sastojaka. Bitno obilježje kobasica jest ovitak u kojem je nadjev, a koji štiti taj nadjev od vanjskih utjecaja, održava proizvod u obliku i veličini koji su najpogodniji za naredne tehnološke operacije i rukovanje kobasicama u prometu. Zbog toga sami ovici moraju biti dovoljno čvrsti, kompaktni, elastični, nehigroskopni i otporni na djelovanje mikroorganizama, pa se u samoj proizvodnji kobasica upotrebljavaju prirodni i umjetni ovici.

Kao prirodni ovici kobasica upotrebljavaju se uglavnom obrađeni dijelovi crijeva životinja za klanje, uključujući sluznicu jednjaka goveda i svinja te mokraćni mjehur goveda, svinja i ovaca. Za određene vrste kobasica upotrebljavaju se odgovarajuća crijeva koja najbolje odgovaraju obliku, veličini, sastavu i načinu obrade kobasica. S druge strane, umjetni se ovitci sve više koriste

u suvremenom kobasičarstvu, a napravljeni su od različitih materijala – uz uvjet da nisu škodljivi za zdravlje i obojeni bojama koje prelaze u nadjev i otapaju se u nekoj od komponenata nadjeva. Primjerice, tiskarske boje koje se upotrebljavaju za označavanje i deklariranje proizvoda ne smiju prolaziti kroz ovitak niti na sadržaj proizvoda. I umjetni ovitci imaju svoju podjelu, a dijele se prema podrijetlu i tehnološkim svojstvima na kolagene, celulozne, sintetske, natronske i pergamentne ovitke. Kolageni su ovitci po svojim svojstvima najbližiji prirodnim ovitcima, budući da se proizvode od nusproizvoda klanja, a bjelančevinska ih osnova čini jestivima. Tomu u prilog ide i činjenica da su propusni su za vodu i plinove, ali su nepropusni za mast. Nadalje, celulozni ovitci dobivaju se iz hidroceluloze i propusni su za vodu, zrak i mast te se upotrebljavaju u proizvodnji kobasica bez ovitka, pri čemu se nakon toplinske obrade umjetni ovitak odbacuje. Naposljetku, natronski i pergamentni ovitci prije su se često koristili, ali su u posljednje vrijeme potisnuti od kvalitetnijih umjetnih uvitaka. Sintetski ovitci umjetni su ovitci ujednačene kvalitete i vrlo široke primjene, a proizvode se od poliamidskih folija. To su vrlo čvrsti ovitci bez šava koji vrlo dobro podnose hladnoću do  $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$  i toplinu do  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a nisu propusni za mast i plinove, pa se uglavnom koriste za toplinski obrađene kobasice.

## 2.6. Toplinski obrađene kobasice

Polutrajne kobasice spadaju u kategoriju toplinski obrađenih mesnih proizvoda, a karakteristično za njih jest to da su *pasterizirani proizvodi od različitih vrsta mesa, strojno otkoštenog mesa, masnog i vezivnog tkiva i iznutrica, različitog stupnja usitnjenosti, te drugih sastojaka* (NN 62 2018.). U proizvodnji se uglavnom upotrebljavaju srednje kvalitetne sirovine i to meso III. i IV. kategorije uz dodatak relativno velikih količina masnog tkiva, svinjskih kožica, a u posljednje vrijeme i strukturiranih biljnih bjelančevina. Ti se proizvodi pune u ovitke, a moguće ih je i podvrgnuti postupku dimljenja. Potom, polutrajne kobasice moraju sadržavati najmanje 8 % bjelančevina mesa te ispunjavati sljedeće uvjete: ovitak mora dobro prijanjati uz nadjev, a površina kobasica ne smije biti deformirana; sastojci nadjeva trebaju biti ravnomjerno raspoređeni i međusobno čvrsto povezani; na presjeku kobasica ne smije biti šupljina i pukotina.

Osnovne sirovine, tj. goveđe i svinjsko meso usitnjavaju se ovisno o namjeni u vuku ( $\emptyset$  10–13 mm) ili u kuteru (mesno tijesto), a masno tkivo u rezačici pa se pomiješaju u miješalici ili izravno u kuteru te uz dodatak aditiva i začina, a pomoću punilica nadijevaju u umjetne ili prirodne

ovitke. U suvremenoj proizvodnji polutrajnih kobasica vrši se toplo dimljenje u automatskoj termičkoj dimnoj komori na temperaturi koja varira ovisno o vrsti i veličini kobasica 60–100 °C. Vrijeme toplinske obrade varira 3–5 sati. U tom se vremenu uz dimljenje, kobasice i kuhaju u pari (60–120 minuta). Dimljenje se obično prekida kada unutrašnja temperatura kobasice dosegne otprilike 75 °C. Nakon toplinske obrade kobasice se hlade na temperaturi 2–4 °C i pohranjuju na temperaturi do 8 °C. Polutrajne se kobasice stavljaju u promet u nizovima, parovima ili pojedinačno ili se pakiraju rezane u veće ili manje nareske. Osnovno je obilježje polutrajnih kobasica da mesno tijesto čvrsto povezuje druge sastojke nadjeva. Glavna je sirovina krupnije ili finije usitnjeno meso životinja za klanje koje se suho ili vlažno salamuri na uobičajene načine. Drugi značajni sastojak polutrajnih kobasica je mesno tijesto koje je za razliku od onog obarenih kobasica značajno čvršće. Osnovna je funkcija mesnog tijesta povezivanje krupno ili sitnije isječenih komada mesa i masnog tkiva u nadjevu. U prometu možemo susresti greške polutrajnih kobasica kao što su: zeleno obojenje nadjeva, kiseli okus i miris, truležni miris, miris po pokvarenom, nedovoljnu povezanost nadjeva, izdvajanje otopljene masti ispod ovitka te pljesnivost (Peinović 2018.).

## **2.7. Prirodne alternative upotrebi sintetskih nitrita u preradi mesa**

Kao što je već rečeno, zbog kancerogenih svojstava čiji razvoj nitrit može potaknuti, primjenjuju se alternativna zamjenska rješenja sintetičkog nitrita. Yong i sur. (2021.) navode da se u industriji hrane sintetički nitrite – poput  $\text{NaNO}_2$  i  $\text{KNO}_2$  – često koristi zato što su jeftini i jednostavni za pripremu. Međutim, javlja se zabrinutost oko prevelikog štetnog utjecaja nitrita na hranu u koju se dodaje, čime direktno ugrožava i zdravlje čovjeka. Stav potrošača jest takav da je organska hrana zdravija od anorganske te je velika većina njih spremna izdvojiti više novca kako bi kupila organsku (skuplju) hranu. U skladu s potražnjom i željama potrošača, nastajale su razne studije o potrebama zamjene nitrita alternativnim sredstvima. Tako se, primjerice, došlo do spoznaje o mogućnostima zamjene sintetičkog nitrita esencijalnim uljima, biljnim ekstraktima, prirodnim kiselinama i dr. Međutim, činjenica jest da je sam nitrit teško zamjenjiv jednostavnim antioksidansima, budući da nitrit istovremeno pruža nekoliko funkcija. U vezi s time, istražila se upotreba nitrita dobivenog iz nitrata iz prirodnih biljaka kao zamjena za sintetički nitrit. Upotreba nitrata kao prirodne supstance za mesne proizvode nije, naime, nov koncept – koristio se on i u

prošlosti – moderna se tehnologija uvelike poboljšala te se koriste starter kulture za reduciranje nitrata u nitrit za kratko inkubacijsko vrijeme (Yong i sur. 2021.).

Prirodni izvori nitrata mogu se pronaći u tlu, atmosferi, biljkama i otpadnim vodama. Osim tih prirodnih izvora nitrata, neke biljke sadrže veliku količinu nitrata te su lako iskoristive na mesnim proizvodima. Neke biljke, poput celera, špinata ili zelene salate sadrže čak 2500 mg/kg nitrata. Uz navedeno povrće, celer se najviše proučava jer ne utječe značajno na svojstva mesnih proizvoda. Izdvajanje nitrata iz biljaka, odnosno povrća moguće je na dva načina. Može se provesti direktnim dodavanjem biljke i starter kulture u proizvod tijekom procesa proizvodnje, ali takva metoda iziskuje dužu proizvodnju i teže je postići standardnu redukciju nitrata jer ovisi o uvjetima inkubacije. Druga metoda odnosi se na unaprijed pretvoren biljni izvor nitrata koji je već bio inkubacijski izložen starter kulturama, kako bi proizveo nitrit. Takav način jednostavniji je za primjenu već stvorenih nitrata koji se može standardizirati u sadržaju.

U proizvodnji se mesnih proizvoda koriste određeni mikroorganizmi, tzv. starter kulture, u različite svrhe. Razvijeni su tako mnogi tipovi komercijalnih starter kultura, koje se mogu podijeliti na četiri tipa: bakterija mliječne kiseline, zaštitna bakterija, kulture polimera te plijesni ili kvasci. Među navedenim starter kulturama, one koje imaju enzim nitrata reduktazu jedine se mogu koristiti za reduciranje nitrata u nitrite u proizvodnji mesa. Vrijedno je spomenuti da je glavna uloga dodavanja bakterije mliječne kiseline, plijesni i kvasca smanjiti pH-vrijednost i poboljšati okus mesnih proizvoda.

Uočene su pozitivne, ali i negativne strane prirodnog nitrata. Ostaci nitrata, bez obzira na to kojeg porijekla bili, najveći su izazov u proizvodnji mesnih proizvoda. Pojedina istraživanja navode da je prirodni nitrit manje štetan za ljude, ali rizik od kancerogenih svojstava nitrata ne mogu se zanemariti. Amini i ostaci nitrata u mesu i dalje mogu biti prijetnja ljudskom zdravlju zbog formacije nitrosamina. Štoviše, premda začini mogu prikriti okus povrća, okus povrćastog praha u mesnim proizvodima potrošačima je neprihvatljiv. Također, neki potrošači mogu biti alergični na određeno povrće, bok kao što je celer, pa ti dodaci u mesnim proizvodima mogu kod njih izazvati alergijske reakcije. Unatoč navedenim nedostacima, prirodni izvor nitrata na visokoj je ljestvici za zamjenu sintetičkog. Naime, gledano sa stajališta ponašanja potrošača, unaprijed pripremljeni nitrit iz povrća može imati pozitivan učinak jer se može smatrati prirodnim izvorom i obogaćen korisnim fitokemikalijama iz biljaka. Također, činjenica jest kako su ostaci nitrata u

mesnim proizvodima dopunjeni prirodnim nitritom ipak manji nego u mesnim proizvodima dopunjenima sintetičkim nitritom.

Kad je riječ o starter kulturama, najčešći starteri za mesne proizvode, uz bakterije mliječne kiseline (BMK), su i koagulaza negativni stafilocoki (CNS). Stafilocoki su bakterije koje su vrlo raširene u prirodi, a moguće ih je pronaći na koži i sluznicama ljudi i životinja. Te su bakterije uvjetno patogene pa tako u određenim uvjetima izazivaju infekciju. Stafilocoki su prisutni u vodi, tlu, zraku, namirnicama te predmetima na kojima se hrana priprema. Stafilokokno otrovanje hranom bolest je koju taj uzročnik može prouzročiti, a osobito su mlijeko i ovčji sir te namirnice koje ih sadrže podložne infekciji stafilokokom. Ta bakterija otporna je na visoke temperature, te na visoke koncentracije šećera i soli – stoga je bitno pripaziti i pri stavljanju začina u hranu (Zemljak 2018.). Kako god, postoje i pozitivna strana stafilokoka, a ta je da pozitivno utječu na proizvodnju mesnih proizvoda: *Dok BMK osiguravaju sigurnost proizvoda snižavanjem pH, razgradnjom šećera i proizvodnjom mliječne kiseline, te proizvodnjom bakteriocina, CNS utječu na ostala tehnološka svojstva fermentiranih mesnih proizvoda* (Frece i sur. 2010.). Stafilocoki fermentiranim mesnim proizvodima osiguravaju aromu, okus i boju. Također, koagulaza negativni stafilocoki imaju sposobnost reduciranja nitrata i nitrita, a zbog toga dolazi do stvaranja nitrozilmioglobina, koji je odgovoran za karakterističnu crvenu boju mesnih proizvoda. Potom, katalazna je aktivnost jednako tako važna i to za razgradnju vodikovog peroksida koji sprječava oksidaciju lipida. Ne može se poreći kako je sposobnost koagulaza negativnih stafilokoka da proizvode bakteriocine jedna od velikih važnosti za sigurnost mesnih proizvoda, a time i zdravlja potrošača.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Izrada polutrajnih kobasica

Za potrebe ovog istraživanja proizvedene su polutrajne kobasice od svinjskog mesa, masnog tkiva te drugih dodataka ovisno o tretmanu.

Polutrajne kobasice kontrolnog tretmana proizvedene su od:

1. svinjske lopatice (58,4%),
2. svinjske potrbušine (24,3%),
3. vode (14,6%),
4. kuhinjske soli (1,9%), u koju je dodano 0,01% NaNO<sub>2</sub> (100 mg/kg),
5. mljevenog papra (0,3%),
6. češnjaka u granulama (0,2%),
7. dekstroze (0,15%),
8. arome dima (0,1%) i
9. askorbinske kiseline (0,05%).

Polutrajne kobasice pokusnih tretmana proizvedene su od istih sirovina i dodataka, osim što su nitriti zamijenjeni s jednakom količinom nitrata, NaNO<sub>3</sub>. Dodatno, u kobasice pokusnog tretmana dodana je i starter kultura komercijalnog naziva BITEC S 10 proizvođača Frutarom Savory Solutions (Salzburg, Austrija) donirana od strane poduzeća TTR Kolovrat d.o.o. iz Zagreba koja sadrži  $8 \times 10^9$  bakterija *Staphylococcus carnosus* po gramu, a doziranje je iznosilo 0,5 g/kg nadjeva. Starter kulture su 12 sati prije dodavanja u nadjev razrijeđene u hladnoj vodi i čuvane na temperaturi 20 °C do upotrebe.

Proizvodnja polutrajnih kobasica započela je prihvatom i kontrolom sirovine, nakon čega je uslijedila obrada mesa i masnog tkiva te uklanjanje dijelova koji se nisu koristili u proizvodnji, poput tetiva, krvnih žila, kože i sličnih dijelova, a zatim se meso i masno tkivo rezalo na manje komade, kako bi bilo olakšano usitnjavanje. Pomoću električnog stroja za usitnjavanje Tre Spade samljeveno je meso i masno tkivo na veličinu 8 mm (Facem, Italija, model TC-22 Elagant), a potom je tako usitnjena sirovina izvagana prema recepturi tretmana i prebačena u posudu gdje je provedeno ručno miješanje i sjedinjavanje osnovne sirovine sa soli, vodom i dodacima.

Istraživanje je uključivalo 5 različitih tretmana, pri čemu je jedan tretman bio kontrolni, a preostala 4 su bili pokusni tretmani koji su se razlikovali prema trajanju i temperaturi inkubacije.

Nakon pripreme nadjeva uslijedilo je punjenje uz pomoć ručne punilice Tre Spade (Facem, Italija, model MOD.7) u poliamidne ovitke. Napunjene kobasice pokusnih tretmana podvrgnute su postupku inkubacije u konvektomatu UNOX (Italija, model Cheftop Mind.Maps ONE XEVC-0511) kako je opisano u tablici 3.1.1. Kobasice kontrolnog tretmana nisu podvrgnute postupku inkubacije, jer su u njih dodane direktno nitritne soli. Kontrolne kobasice te pokusne kobasice nakon provedene inkubacije su podvrgnute postupku toplinske obrade u konvektomatu. Toplinska obrada je provedena na temperaturi 82°C do postizanja temperature u središtu proizvoda od 70 °C uz zadržavanje tijekom 15 minuta na toj temperaturi. Po završetku toplinske obrade, kobasice su hladene postupkom potapanja u posudama napunjenim vodom i ledom do postizanja temperature 15 °C u središtu proizvoda nakon čega su skladištene u rashladnim uređajima na temperaturi 2 °C.

**Tablica 3.1.1.** Opisi tretmana

Tretman	Razlikovni dodatak	Temperatura inkubacije (°C)	Vrijeme inkubacije (sati)
Kontrolni tretman A	Natrijev nitrit (NaNO <sub>2</sub> )	Bez inkubacije	Bez inkubacije
Pokusni tretman B-30-1,5	Natrijev nitrat (NaNO <sub>3</sub> ) Bitec s10 starter kultura	30	1,5
Pokusni tretman B-30-3	Natrijev nitrat (NaNO <sub>3</sub> ) Bitec s10 starter kultura	30	3
Pokusni tretman B-40-1,5	Natrijev nitrat (NaNO <sub>3</sub> ) Bitec s10 starter kultura	40	1,5
Pokusni tretman B-40-3	Natrijev nitrat (NaNO <sub>3</sub> ) Bitec s10 starter kultura	40	3

### 3.2. Provedene analize

Uzimanje uzoraka gotovih polutrajnih kobasica provedeno je tijekom proizvodnje ovisno o kojoj se analizi radilo. Mjerenje pH vrijednosti i aktiviteta vode te određivanje reaktivnih supstanci tiobarbiturne kiseline (TBARS) kao stupnja oksidacije provedeno na uzorcima polutrajnih kobasica 1. i 30. dana čuvanja na hladnom. Uzorci namijenjeni za mjerenje pH vrijednosti i aktiviteta vode, rezani su na kockice veličine 0,5 x 0,5 x 0,5 cm te su se analizirali istog dana prema uputama proizvođača opreme. Mjerenje instrumentalne boje gotovih polutrajnih kobasica provedeno je 1., 15. i 30. dana, a sadržaj rezidualnih nitrata i nitrita određen je 1., 15., 30. i 60. dana čuvanja. Senzorska analiza polutrajnih kobasica provedena je 30. dana čuvanja na hladnom. Uzorci mase 50 do 200 g uzeti su za analize TBARS i sadržaja rezidualnih nitrata i nitrita, vakumirani i čuvani smrznuti na temperaturi -20 °C.

Mjerenje pH vrijednosti provedeno je na 2 uzorka po tretmanu, pomoću prijenosnog pH-metra HI98191 (Hanna Instruments, SAD) opremljenog s ubodnom elektrodom BlueLine 21pH (Schott AG, Njemačka). Uzorci polutrajne kobasice narezani su na kockice, nakon čega je uzorku dodana destilirana voda u odnosu (1:1) i izvršena je homogenizacija. Tako homogenizirani uzorak je ostavljen 30 minuta na sobnoj temperaturi te je provedeno mjerenje pH vrijednosti prema uputama proizvođača.

Mjerenje aktiviteta vode provedeno je na 2 uzorka po tretmanu. Mjerenje je provedeno pomoću prijenosnog analizatora HygroPalm HP23-AW-A opremljen s HC2-AW sondom (Rotronic AG, Švicarska). Uzorci su narezani na kockice te su ostavljeni na sobnoj temperaturi u trajanju od 120 minuta, nakon čega je izvršeno mjerenje koje je prosječno trajalo između 15 i 20 minuta.

Mjerenje boje provedeno je pomoću uređaja Minolta Chroma metar CR-410 (Konica Minolta, Japan) s CIE L\*a\*b\* spektrom boja s D65 standardnim osvjetljenjem i otvorom 50 mm. CIE L\*a\*b\* sustav predstavlja sljedeće vrijednosti: L\* svjetlinu (engl. lightness; svijetlo-tamno), a\* crvenilo (engl. redness; mjerenje valnih dužina crveno-zelenog područja) i b\* žutilo (engl. yellowness; mjerenje valnih dužina žuto-plavog područja). Mjerenje je provedeno na poprečnom presjeku polutrajne kobasice, odmah nakon rezanja kobasice, na tri uzorka po tretmanu.

Analiza oksidativne stabilnosti izvršena je mjerenjem TBARS vrijednosti u dva uzorka po tretmanu. Uzorci kobasica za analizu samljeveni su u mikseru do pastozne forme nakon čega je 2 g preneseno u polipropilenske epruvete od 50 ml. Potom je dodano 10 ml 5 %-tne trikloroctene

kiseline (TCA) i 5 ml heksana sa 0,8 %-tnim butiliranim hidriksitoluenom (BHT). Ovako pripremljen uzorak je usitnjen (Ika T10 basic, UltraTurrax, Njemačka) tijekom 30 sek, a nakon toga dodatno homegeniziran vorteksiranjem (Ika Vortex 3, Njemačka) tijekom 10 sek te centrifugiran 5 minuta kod 4000 okretaja (Centric 322A, Tehnica, Slovenija). Nakon centrifugiranja je izdvojen gornji sloj s heksanom, a donji tekući sloj je profiltriran preko kvantitativnog filter papira (Munktell grade 391, Njemačka). Zatim je otpipetirano 2 ml alikvota te je dodano 1,5 ml 0,6 %-tne 2-tiobarbiturne kiseline (TBA) u PP epruvetice. Epruvetice su potom začepljene i stavljene u vodenu kupelj na temperaturu od 90 °C kroz 30 minuta. Nakon vađenja iz vodene kupelji epruvetice su ohlađene u hladnoj vodi kroz 20 min i izmjerena je apsorbancija na spektrofotometru na 532 nm (Helios y, Thermo Electron Corporation, Ujedinjeno Kraljevstvo) nasuprot slijepom uzorku koji je sadržavao 2 ml TCA i 1,5 ml 0,6 %-tne TBA. Rezultati TBARS vrijednosti izraženi su u mg/kg malonodialdehida (MDA), a preračunati su iz standardne krivulje koristeći 1,1,3,3-tetrametoksipropan (TMP).

Određivanje rezidualnih nitrita provedeno je po standardnoj metodi HRN EN 12014-3:2007. Odvagano je 5 g uzorka, dodano 50 mL vruće vode i ostavljeno 15 min na tresilici. Podešena je pH vrijednost na 8,0 – 8,5 sa 1M natrijevim hidroksidom. Sadržaj tikvice je zagrijavan u vodenoj kupelji na 100 °C tijekom 15 min uz protresanje. Potom, sadržaj je ohlađen na sobnu temperaturu i kvantitativno prebačen u odmjernu tikvicu od 100 mL. Dodano je po 2 mL otopina Carrez br. 1 i Carrez br. 2 uz miješanje nakon svakog dodavanja. Sadržaj tikvice je dopunjen vodom do oznake, izmućkan i filtriran preko nabranog filtera papira (crna vrpca). Bistri filtrat korišten je za određivanje nitrita. Princip metode temelji se na tome da se nitriti u vodenom ekstraktu analiziranog uzorka tretiraju sa sulfanilamidom i N-(1-naftil)-etilendiaminom dihidrokloridom. Nakon izrade baždarnе krivulje i provedbe svih analitičkih koraka opisanih u normi, apsorbancija crveno obojanog spoja izmjerena je spektrofotometrijski na 540 nm (DR/4000U, Hach, Njemačka), a sadržaj izražen kao mg/kg.

Određivanje rezidualnih nitrata provedeno je pomoću validirane metode uz korištenje enzimatskog kita (Nitrate, Enzymatic BioAnalysis, UV-Test, R-Biopharm-Roche). U 5 g uzorka dodano je 50 mL kipuće vode te kuhano 15 min u vodenoj kupelji. Sadržaj tikvice je ohlađen te je dodano po 3 mL otopina Carrez 1 i Carrez 2, uz podešavanje pH vrijednosti na 8,0 sa 1 M natrijevim hidroksidom. Sadržaj je kvantitativno prebačen u odmjernu tikvicu od 100 mL, dopunjen redistiranim vodom do oznake te ostavljen u hladnjaku zbog odjeljivanja masti tijekom 20 min.

Nakon filtracije bistri filtrat se koristio za određivanje nitrata. Priprema slijepe probe i otopine uzoraka te razvijanje boje provedeno je potpuno u skladu s uputama proizvođača kita. Apsorbancije su očitane pri valnoj duljini od 340 nm (DR/4000U, Hach, Njemačka), a sadržaj izražen kao mg/kg.

Senzorska analiza provedena je primjenom razlika-od-kontrole testa (engl. difference from control test) pomoću Compusense20 softvera (Compusense, Ontario, Kanada) i tableta Samsung Galaxy Tab A uz sudjelovanje 14 educiranih ocjenjivača koji su prije provedbe testa potpisali izjavu o problematici i provedbi istraživanja, pravima i koristima koje ostvaruju te rizicima koji mogu proizaći iz provedbe analize. Pri provedbi testa svaki ocjenitelj je dobio 5 parova uzoraka među kojima je jedan uzorak bio iz kontrolnog tretmana, dok je drugi uzorak bio testni. Redosljed parova uzoraka je određen slučajno i balansirano između ocjenitelja. Prije provedbe testa, ocjenjivači su upoznati s procedurom provedbe testa kao i činjenicom da testni uzorak može biti jednak kontrolnom uzorku. Nadalje, ocjenjivači su upućeni da najprije kušaju kontrolni uzorak, zatim da neutraliziraju usnu šupljinu s kruhom i vodom, a da nakon 2 minute pauze kušaju testni uzorak. Sljedeći upute na obrascu, ocjenjivači su potom upućeni na izjašnjavanje koliko su kontrolni i testni uzorak različiti. Pritom je korištena opisna skala kojoj su u obradi podataka dodijeljene vrijednosti kako slijedi: bez razlike – 0, vrlo mala razlika – 1, mala razlika – 2, umjerena razlika – 3, velika razlika – 4, vrlo velika razlika – 5. U slučaju izbora opisa bilo koje razine razlike, ocjenjivači su morali iskazati u čemu percipiraju razliku između uzoraka; u izgledu, mirisu, okusu, teksturi ili aromi. Nakon provedbe analize jednog para uzoraka, ocjenjivači su upućeni na neutralizaciju usne šupljine i pauzu u trajanju 2 minute do kušanja novog para.

### **3.3. Statistička obrada podataka**

Statistička obrada podataka provedena je pomoću programa SAS Studio (SAS Institute Inc., SAD; verzija 3.8) primjenom procedura PROC MEANS za izračun opisne statistike i PROC GLM s Tukey post-hoc testom za usporedbu pH, aktiviteta vode, boje, sadržaja rezidualnih nitrata i nitrita te TBARS vrijednosti između tretmana pri razini značajnosti  $p=0,05$ . U analizi podataka senzorske analize primijenjena analiza varijance s Dunnett post-hoc testom za višestruku usporedbu kako bi se odredilo koji se testni uzorak značajno razlikuje od kontrolnog pri razini značajnosti  $p=0,05$  (Meilgaard 2016.).

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. pH vrijednost

U tablici 4.1.1. prikazane su pH vrijednosti polutrajnih kobasica po tretmanima i danima uzorkovanja, odnosno vrijednosti izmjerene 1. i 30. dana čuvanja na hladnom. Predmetnim istraživanjem utvrđena je pH vrijednost polutrajnih kobasica nakon toplinske obrade i hlađenja u rasponu od 6,34 do 6,42 pri čemu su korišteni čisti nitrati kako bi se pokazalo koliko je učinkovita primjena temperature i trajanja redukcije nitrata djelovanjem dodanih starter kultura. Statističkom obradom podataka nije utvrđena značajna razlika između tretmana, kao ni između vremena uzorkovanja unutar tretmana. U istraživanju je korištena starter kultura *Staphylococcus carnosus* radi provedbe redukcije nitrata u nitrite, a pritom je moguće i malo zakiseljavanje. Navedeno je prethodno utvrđeno u istraživanju Sindelar i sur. (2007.) koji navode da su kobasice s dužim trajanjem inkubacije imale niže pH vrijednosti u odnosu na kobasice koje prije termičke obrade nisu inkubirane. U predmetnom istraživanju takva veza veza nije utvrđena, a što je skladu su s rezultatima Terns i sur. (2011.) koji su prikazali da vrijeme inkubacije nije imalo značajan utjecaj na pH vrijednost toplinski obrađenih kobasica.

**Tablica 4.1.1.** pH vrijednosti po tretmanima i danima uzorkovanja

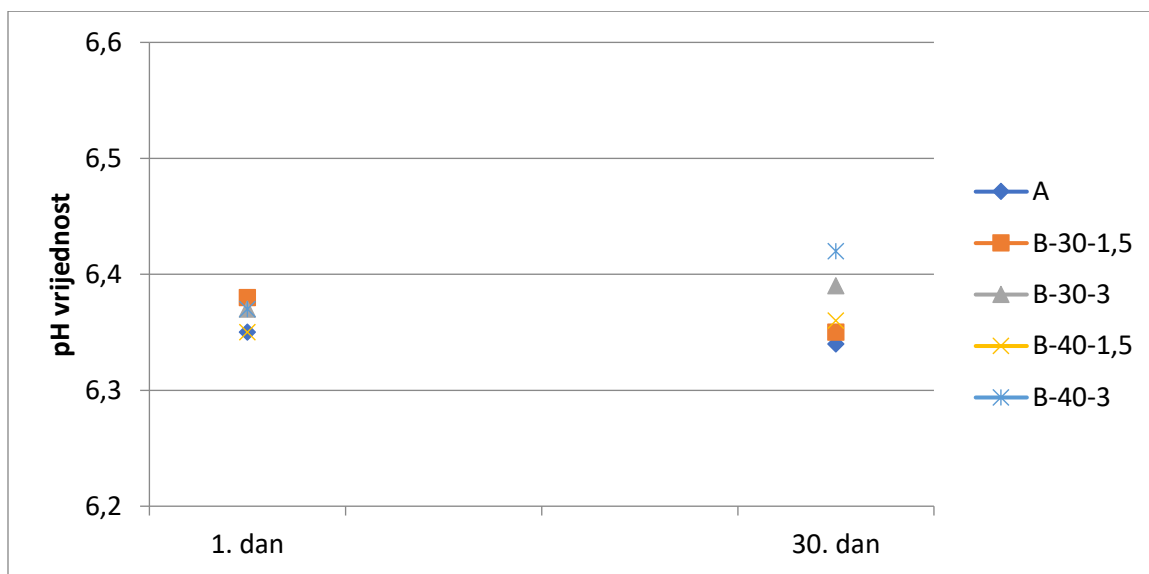
Svojstvo	Tretman	Dan uzorkovanja	
		1	30
pH	A	6,35 ± 0,02	6,34 ± 0,09
	B-30-1,5	6,38 ± 0,02	6,35 ± 0,06
	B-30-3	6,37 ± 0,03	6,39 ± 0,04
	B-40-1,5	6,35 ± 0,00	6,36 ± 0,01
	B-40-3	6,37 ± 0,04	6,42 ± 0,02

<sup>ab</sup>: vrijednosti unutar stupca označene različitim slovima značajno se razlikuju po tretmanima pri istom danu uzorkovanja

<sup>AB</sup>: vrijednosti unutar reda označene različitim slovima značajno se razlikuju pri različitim danima uzorkovanja kod istog tretmana

A: kontrolni tretman; B-30-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 1,5 sati; B-30-3: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 3 sata; B-40-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 1,5 sati; B-40-3: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 3 sata

Na grafikonu 4.1.1. prikazane su prosječne pH vrijednosti toplinski obrađenih kobasica po tretmanima i s obzirom na dan uzorkovanja. Iz grafikona je vidljivo da su pH vrijednosti između tretmana vrlo slične, ali je uočljiv veći raspon kod 30. dana uzorkovanja. Temeljem rezultata možemo zaključiti da temperatura i trajanje inkubacije nisu utjecali na pH vrijednost polutrajnih kobasica koja se nije značajno mijenjala tijekom čuvanja na hladnom.



**Grafikon 4.1.1.** Grafički prikaz pH vrijednosti po tretmanima tijekom 1. i 30. dana čuvanja

A: kontrolni tretman; B-30-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 1,5 sati; B-30-3: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 3 sata; B-40-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 1,5 sati; B-40-3: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 3 sata

## 4.2. Aktivitet vode

U tablici 4.2.1. prikazane su vrijednosti aktiviteta vode u polutrajnim kobasicama po tretmanima i danima uzorkovanja, odnosno vrijednosti izmjerene 1. i 30. dana čuvanja na hladnom. Predmetnim istraživanjem je utvrđen mali raspon aktiviteta vode između od 0,968 do 0,974 tijekom 1. dana, kao i nakon 30. dana čuvanja, ali s malo nižim vrijednostima aktiviteta vode od 0,954 do 0,962. Pritom nije utvrđena značajna razlika između tretmana pri istom danu uzorkovanja. Međutim, utvrđena je statistički značajna razlika u aktivitetu vode između dana uzorkovanja unutar kontrolnog tretmana A i pokusnog tretmana B-30-1,5 pri čemu su značajno manje vrijednosti aktiviteta vode utvrđene nakon 30 dana čuvanja. Navedeno upućuje na zaključak

da je tijekom čuvanja na hladnom došlo do vrlo malo sušenja polutrajnih kobasica usprkos nadijevanju u poliamidne ovitke.

**Tablica 4.2.1.** Vrijednosti aktiviteta vode po tretmanima i danima uzorkovanja

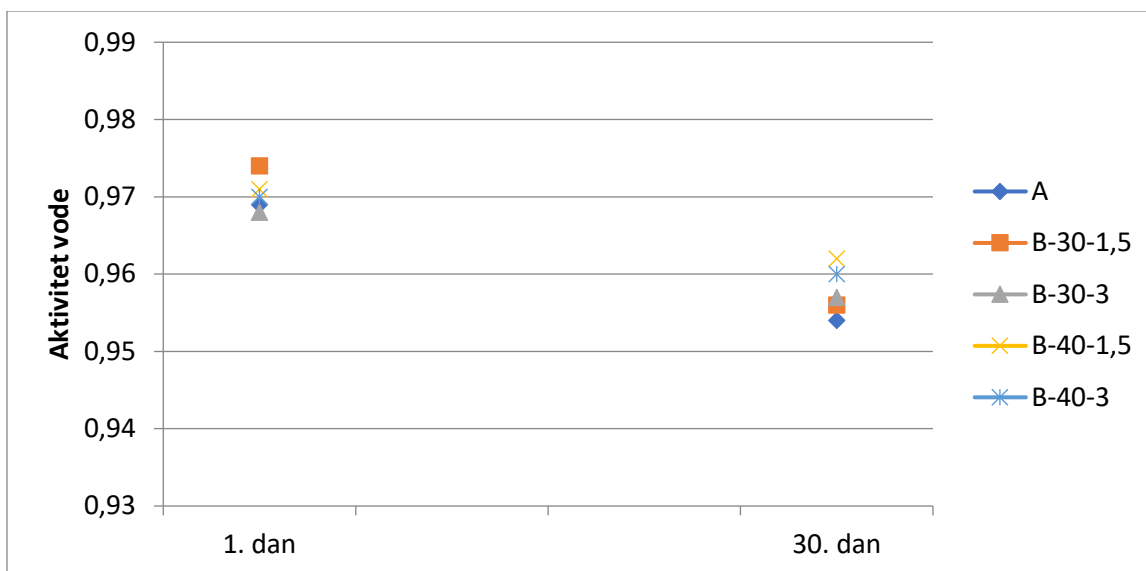
Svojstvo	Tretman	Dan uzorkovanja	
		1	30
Aktivitet vode	A	0,969 ± 0,008 <sup>A</sup>	0,954 ± 0,003 <sup>B</sup>
	B-30-1,5	0,974 ± 0,001 <sup>A</sup>	0,956 ± 0,001 <sup>B</sup>
	B-30-3	0,968 ± 0,002	0,957 ± 0,002
	B-40-1,5	0,971 ± 0,001	0,962 ± 0,002
	B-40-3	0,970 ± 0,002	0,960 ± 0,001

<sup>AB</sup>: vrijednosti unutar reda označene različitim slovima značajno se razlikuju pri različitim danima uzorkovanja kod istog tretmana

A: kontrolni tretman; B-30-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 1,5 sati; B-30-3: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 3 sata; B-40-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 1,5 sati; B-40-3: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 3 sata

Iz grafikona 4.2.1. vidljiva je ujednačenost vrijednosti aktiviteta vode između tretmana po danima uzorkovanja, kao i smanjenje aktiviteta vode nakon 30 dana čuvanja na hladnom, što je za pojedine tretmane predstavljalo statistički značajnu razliku. Slijedom tog, možemo zaključiti da primjena različite temperature i trajanja inkubacije nije uzrokovalo promjenu aktiviteta vode između tretmana kao ni u odnosu na kontrolni tretman. Potrebno je uočiti da će smanjenje aktiviteta vode biti uzrokovano trajanjem čuvanja, što može predstavljati koristan učinak na održivost polutrajnih kobasica i umanjeње rasta mikroorganizama (Feiner 2006.).





**Grafikon 4.2.1.** Grafički prikaz promjene vrijednosti aktiviteta vode tretmana tijekom 1. i 30. dana čuvanja

A: kontrolni tretman; B-30-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 1,5 sati; B-30-3: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 3 sata; B-40-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 1,5 sati; B-40-3: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 3 sata

### 4.3. Instrumentalna boja

Boja hrane potječe od prirodnih pigmenata ili dodanih bojila (aditiva). Pigment koji ima najveći utjecaj na formiranje boje mesa je mioglobin. Zbog toga, dodatak nitrita može utjecati na boju mesa jer iz njega u blago kiselim uvjetima nastaje dušikov oksid NO koji se može vezati mioglobin i stvarati vrlo stabilan nitrozomioglobin žarko crvene boje. Tako stvoreni spoj se stabilizira kod pH vrijednosti 5,2 i nižima što je tipičan način u proizvodnji fermentiranih kobasica. Međutim, u polutrajnim kobasicama se nitrozomioglobin pri toplinskoj obradi denaturira i pretvara u nitrozilhemokromogen koji ima ružičastu boju, prepoznatljivu od strane potrošača. Stoga je pojava ružičaste boje nareška znak da je došlo do stvaranja dušikovog oksida iz nitrita (Feiner 2006.).

U tablici 4.3.1. prikazane su vrijednosti pokazatelja boje L\* po tretmanima i vremenima uzorkovanja što označava svjetlinu nareška u rasponu od 0 (potpuno tamno) do 100 (potpuno svjetlo). Statističkom obradom podataka nije utvrđena značajna razlika ni između tretmana kao ni između dana uzorkovanja unutar tretmana.

**Tablica 4.3.1.** Vrijednosti pokazatelja boje L\* vrijednosti po tretmanima i danima uzorkovanja

Svojstvo	Tretman	Dan uzorkovanja		
		1	15	30
L*	A	61,78 ± 0,14	62,50 ± 1,34	62,94 ± 0,57
	B-30-1,5	62,99 ± 1,01	61,71 ± 0,65	62,76 ± 0,97
	B-30-3	62,13 ± 2,40	61,49 ± 0,74	61,98 ± 0,43
	B-40-1,5	61,71 ± 0,63	63,58 ± 2,05	62,94 ± 1,34
	B-40-3	61,67 ± 0,49	61,06 ± 0,48	62,06 ± 1,37

A: kontrolni tretman; B-30-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 1,5 sati; B-30-3: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 3 sata; B-40-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 1,5 sati; B-40-3: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 3 sata

U tablici 4.3.2. prikazane su vrijednosti pokazatelja boje a\* po tretmanima i vremenima uzorkovanja, a koji označava crvenilo odnosno intenzitet crvene boje ako je riječ o pozitivnim vrijednostima. Dobiveni rezultati su bili vrlo ujednačeni, što je potvrđeno statističkom analizom kojom nije utvrđena značajna razlika ni između tretmana kao ni između dana uzorkovanja.

**Tablica 4.3.2.** Vrijednosti pokazatelja boje a\* po tretmanima i danima uzorkovanja

Svojstvo	Tretman	Dan uzorkovanja		
		1	15	30
a*	A	15,44 ± 0,08	15,87 ± 0,91	15,49 ± 0,24
	B-30-1,5	14,33 ± 0,45	14,93 ± 0,35	14,33 ± 0,48
	B-30-3	14,80 ± 1,34	15,61 ± 0,16	15,38 ± 0,10
	B-40-1,5	15,91 ± 0,07	15,15 ± 0,96	15,20 ± 0,90
	B-40-3	15,68 ± 0,44	15,66 ± 0,73	15,28 ± 0,68

A: kontrolni tretman; B-30-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 1,5 sati; B-30-3: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 3 sata; B-40-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 1,5 sati; B-40-3: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 3 sata

U tablici 4.3.3. prikazane su vrijednosti pokazatelja boje b\* po tretmanima i vremenima uzorkovanja, a koji označava žutilo odnosno intenzitet žute boje ako je riječ o pozitivnim vrijednostima. Dobiveni rezultati su bili ujednačeni, kao i za prethodne pokazatelje boje i nije

utvrđena značajna razlika unutar tretmana s obzirom na trajanje čuvanja. Nasuprot tome, statističkom analizom utvrđena je značajna razlika između tretmana pri uzorkovanju 15. i 30. dana, dok kod 1. dana uzorkovanja nije bilo značajnih razlika. Tako je 15. dana uzorkovanja kontrolni tretman A imalo značajno veće  $b^*$  vrijednosti odnosno bio je žuće boje u odnosu na pokusne tretmana B-30-1,5, B-30-3 i B-40-3. Slično tome, pri 30 dana uzorkovanja je kontrolni tretman A bio žuće boje u odnosu prema tretmanima B-30-1,5 i B-40-3. Kod svih tretmana je uočen blagi porast  $b^*$  vrijednosti tijekom čuvanja, ali je ta promjena bila najjače izražena kod kontrolnog tretmana s dodanim sintetskim nitritima. S obzirom da je poznato da su nitriti antioksidanti i pomažu u očuvanju boje (Feiner 2006.) može se zaključiti da je primjena inkubacije radi redukcije nitrata u nitrite slabije učinkovita u kasnijem očuvanju boje.

**Tablica 4.3.3.** Vrijednosti pokazatelja boje  $b^*$  po tretmanima i danima uzorkovanja

Svojstvo	Tretman	Dan uzorkovanja		
		1	15	30
$b^*$	A	7,01 ± 0,04	7,46 ± 0,23 <sup>a</sup>	7,21 ± 0,15 <sup>a</sup>
	B-30-1,5	6,41 ± 0,18	6,59 ± 0,07 <sup>b</sup>	6,49 ± 0,19 <sup>c</sup>
	B-30-3	6,68 ± 0,05	6,70 ± 0,14 <sup>b</sup>	6,79 ± 0,31 <sup>abc</sup>
	B-40-1,5	6,93 ± 0,14	7,11 ± 0,26 <sup>ab</sup>	7,04 ± 0,21 <sup>ab</sup>
	B-40-3	6,65 ± 0,19	6,71 ± 0,20 <sup>b</sup>	6,66 ± 0,31 <sup>bc</sup>

<sup>abc</sup>: vrijednosti unutar stupca označene različitim slovima značajno se razlikuju po tretmanima pri istom danu uzorkovanja

A: kontrolni tretman; B-30-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 1,5 sati; B-30-3: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 3 sata; B-40-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 1,5 sati; B-40-3: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 3 sata

Vrijednosti instrumentalne boje vrlo su slične rezultatima istraživanja Ruiz-Capillas i sur. (2015.) s prosječnom vrijednosti  $L^*=63,66$ ,  $a^*=12,76$  i  $b^*=10,32$ . Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da je uspješno provedena redukcija nitrata u nitrite posredstvom starter kulture *Staphylococcus carnosus* pri temperaturi inkubacije 30 ili 40 °C tijekom 1,5 ili 3 sata. Navedeno je moguće argumentirati izostankom utjecaja tretmana na pokazatelje boje  $L^*$ ,  $a^*$  i  $b^*$  kod 1. dana uzorkovanja. Isto tako, moguće je zaključiti da je učinkovitost održavanja stvorene boje malo slabija u pokusnim tretmanima zbog statistički značajne promjene pokazatelja boje  $b^*$  tijekom čuvanja na hladnom.

#### 4.4. Stupanj oksidacije

U tablica 4.4.1. prikazane su TBARS vrijednosti kontrolnog i pokusnih tretmana 1. i 30. dana čuvanja na hladnom. Najniže TBARS vrijednosti utvrđene su u uzorcima kontrolnog tretmana A (0,03 mg MDA/kg), a najviše u uzorcima tretmana B-40-3 (0,09 mg MDA/kg). Dobivene vrijednosti su malo manje nego što je utvrđeno u istraživanja Jin i sur. (2014.) s prosječnom vrijednosti 0,27 mg MDA/kg. Znatno veće TBARS vrijednosti prikazane su u istraživanju Ruiz-Capillas i sur. (2015.) s prosjekom 1,72 mg MDA/kg. Obradom podataka je utvrđena statistički značajna razlika između kontrolnog tretmana A i pokusnog tretmana B-40-3, dok se pokusni tretmani međusobno nisu značajno razlikovali. Kos i sur. (2017.; cit. Wu i sur. 1991.) navode da TBARS vrijednosti veće od 1 mg MDA/kg mogu dovesti do razvoja užeglosti, odnosno neželjene arome proizvoda. TBARS vrijednosti svih tretmana ovog istraživanja bile su znatno manje od 1 mg MDA/kg, zbog čega bi se moglo očekivati da užeglost i posljedično promjena arome ne bi trebala biti izražena niti u jednom tretmanu.

**Tablica 4.4.1.** TBARS vrijednosti po tretmanima i danima uzorkovanja

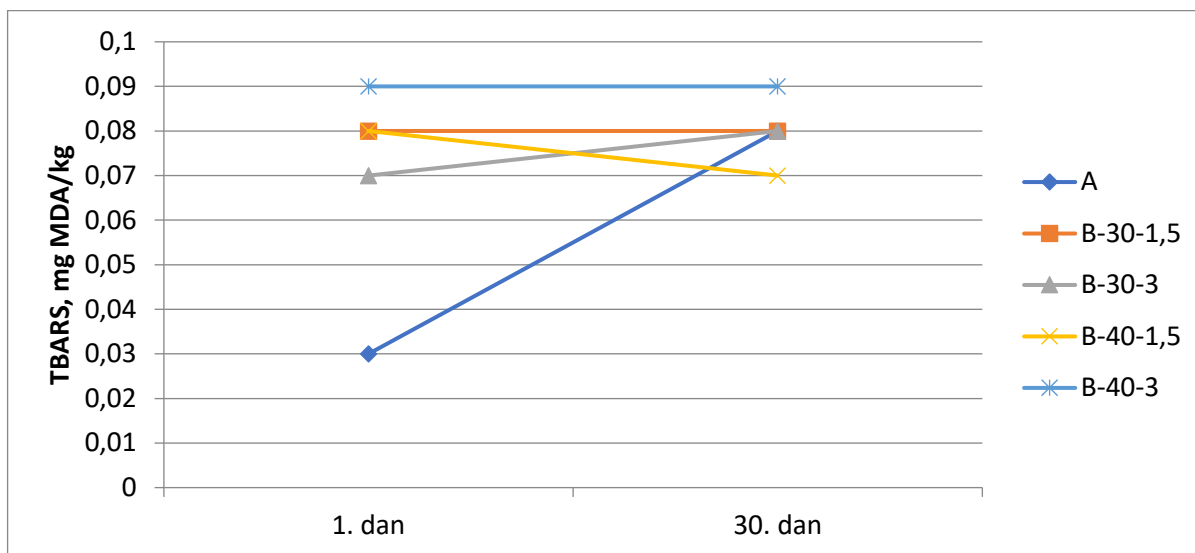
Svojstvo	Tretman	Dan uzorkovanja	
		1	30
TBARS, mg MDA/kg	A	0,03 ± 0,007 <sup>b</sup>	0,08 ± 0,001
	B-30-1,5	0,08 ± 0,002 <sup>ab</sup>	0,08 ± 0,003
	B-30-3	0,07 ± 0,020 <sup>ab</sup>	0,08 ± 0,005
	B-40-1,5	0,08 ± 0,003 <sup>ab</sup>	0,07 ± 0,008
	B-40-3	0,09 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,032

<sup>ab</sup>: vrijednosti unutar stupca označene različitim slovima značajno se razlikuju po tretmanima pri istom danu uzorkovanja  
TBARS: engl. Thiobarbituric acid reactive substances; MDA: malondialdehid

A: kontrolni tretman; B-30-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 1,5 sati; B-30-3: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 3 sata; B-40-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 1,5 sati; B-40-3: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 3 sata

Na grafikonu 4.4.1. je vidljivo odstupanje TBARS vrijednosti kontrolnog tretmana A u odnosu na pokusne tretmane pri 1. danu uzorkovanja. Nakon 30 dana čuvanja na hladnom uočeno je povećanje TBARS vrijednosti kontrolnog tretmana A te izjednačavanje s ostalim tretmanima. Usprkos navedenom, u istraživanju nisu utvrđene značajne razlike između dana uzorkovanja što

sugerira na zadovoljavajući stupanj redukcije nitrata u nitrite i antioksidativno djelovanje tijekom čuvanja.



**Grafikon 4.4.1.** TBARS vrijednosti po tretmanima i danima uzorkovanja

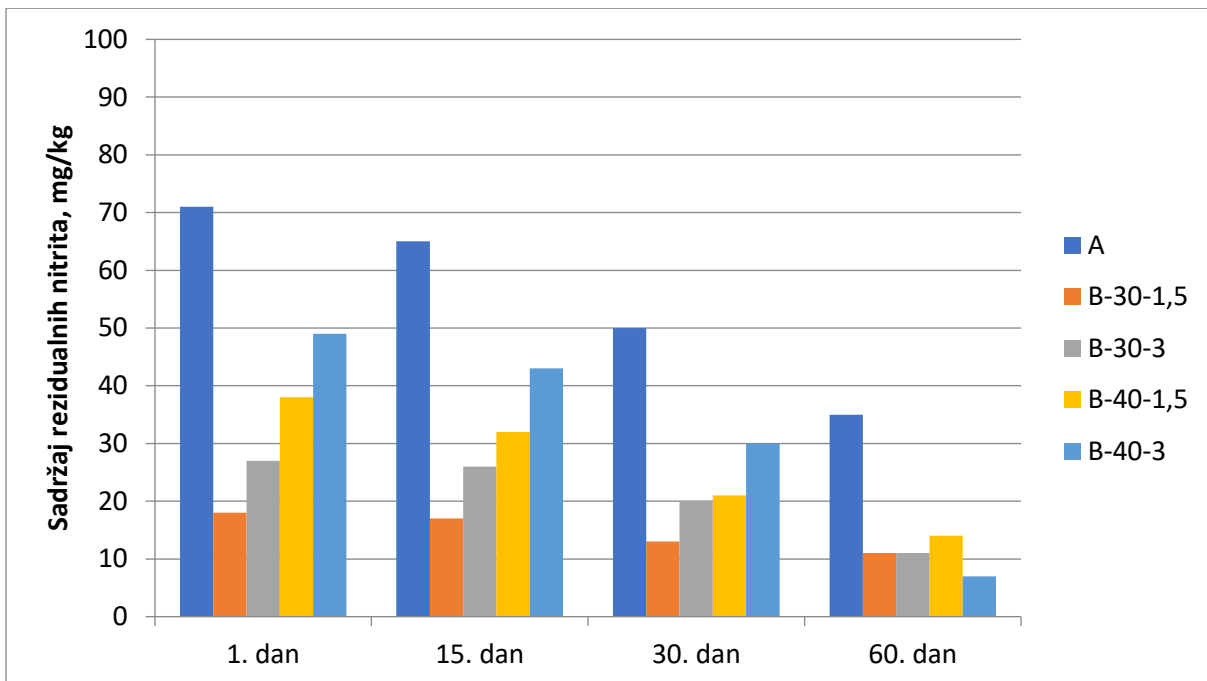
TBARS: engl. Thiobarbituric acid reactive substances; MDA: malondialdehid

A: kontrolni tretman; B-30-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 1,5 sati; B-30-3: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 3 sata; B-40-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 1,5 sati; B-40-3: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 3 sata

#### 4.5. Sadržaj rezidualnih nitrata i nitrita

Na grafikonu 4.5.1. prikazana je promjena sadržaja rezidualnih nitrita po tretmanima 1., 15., 30. i 60. dana čuvanja na hladnom. Iz grafikona je vidljivo postupno smanjenje sadržaja rezidualnih nitrita po tretmanima tijekom 60 dana uzorkovanja. Poblize rečeno, kontrolni tretman A prvi je dan uzorkovanja imao 71 mg/kg nitrita, a 60. dana uzorkovanja sadržaj rezidualnih nitrita iznosio je upola manje 35 mg/kg, a takav trend je opisan kao uobičajen u polutrajnim mesnim proizvodima (Sindelar i sur. 2007.). Između kontrolnog i pokusnih tretmana uočena je razlika u sadržaju rezidualnih nitrita pri svakom uzorkovanju. S povećanjem temperature i trajanja inkubacije uočen je veći udio rezidualnih nitrita što sugerira na učinkovitiju redukciju nitrata u nitrite. Pritom učinak temperature inkubacije značajnije doprinosi redukciji nitrata u nitrite u odnosu na trajanje inkubacije. Zbog trošenja rezidualnih nitrita tijekom čuvanja na hladnom, a zbog početnog nižeg sadržaja, razlike između pokusnih tretmana se s čuvanjem umanjuju. Tako je razlika između pokusnih tretmana najvećeg i najmanjeg sadržaja rezidualnih nitrita pri 1. danu uzorkovanja iznosila 31 mg/kg, a pri 60. danu uzorkovanja svega 7 mg/kg. Istraživanja navode da

je redukcija nitrata u nitrite uglavnom postignuta uz djelovanje bakterija prirodno prisutnih ili dodanih u mesu ili proizvode, ali je taj proces povezan i s prirodom životinjske fiziologije (Govari i Pexara 2015.). Pored toga, Honikel (2008.) navodi da je redukcija nitrata uočena i kod toplinski obrađenih mesnih proizvoda uslijed kemijskih reakcija. Smanjenje sadržaja rezidualnih nitrata u mesnim proizvodima može biti uzrokovana endogenim reducirajućim spojevima mesa kao što su aminokiseline koje sadrže sumpor poput cisteina ili uz prisustvo antioksidanata kao što je askorbinska kiselina (Govari i Pexara 2015.). Upravo je askorbinska kiselina bila dodana kao jedan od dodataka pri izradi kobasica predmetnog istraživanja. Poznato je da askorbinska kiselina reagira s kisikom i stvara dehidroaskorbat i smanjuje sadržaj nitrita koji mogu biti opet oksidirani u nitrate (Honikel 2008.).

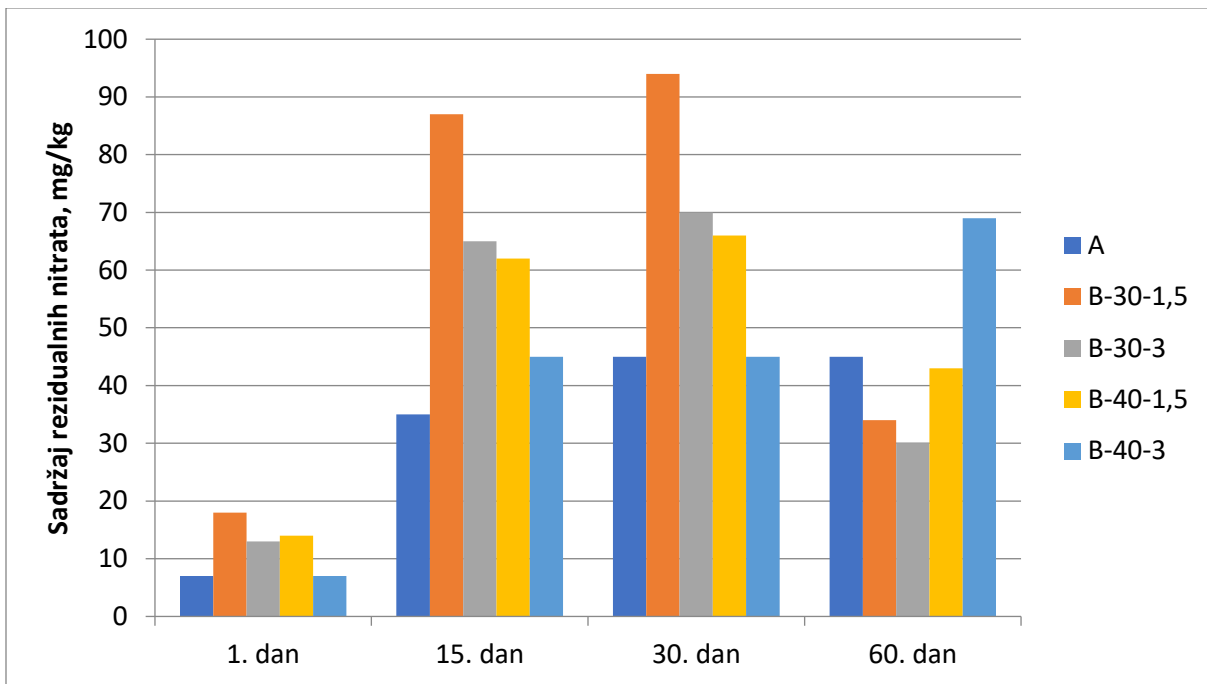


**Grafikon 4.5.1.** Sadržaj rezidualnih nitrita po tretmanima i danima uzorkovanja

A: kontrolni tretman; B-30-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 1,5 sati; B-30-3: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 3 sata; B-40-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 1,5 sati; B-40-3: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 3 sata

Sadržaj rezidualnih nitrata kontrolnog i pokusnih tretmana pri uzorkovanjima od 1. do 60. dana pokazuje obrazac koji je suprotan sadržaju rezidualnih nitrita. Tako je pri 1. danu uzorkovanja sadržaj rezidualnih nitrata bio vrlo ujednačen između svih tretmana s rasponom od 7 do 18 mg/kg. Nakon čuvanja na hladnom 15 dana, utvrđen je znatno veći sadržaj rezidualnih nitrata kod

pokusnih tretmana pri čemu se posebno ističe tretman B-30-1,5, dok je kod kontrolnog tretmana utvrđen najmanji sadržaj. Slična pojava uočena je i kod uzorkovanja 30. dana, pri čemu je sadržaj rezidualnih nitrata kontrolnog tretmana i pokusnog tretmana B-40-3 bio identičan. Zanimljivo je da je pri 60. danu uzorkovanja sadržaj rezidualnih nitrata bio najveći kod tretmana B-40-3. U nekim tradicionalnim proizvodima, nitrati služe kao rezervoar nitrita, a prisutan je i obrnut proces jer se nitrati mogu pronaći u proizvodima u koje su dodani nitriti. Navedeno je dodatno potpomognuto s askorbatima koji potiču oksidaciju nitrita u nitrata te na taj način ostvaruju antioksidacijski učinak jer vežu kisik (Honikel 2008.). Navedeno bi moglo biti argument za pojavu nitrata kod kobasica kontrolnog tretmana u koje su dodani samo nitriti.

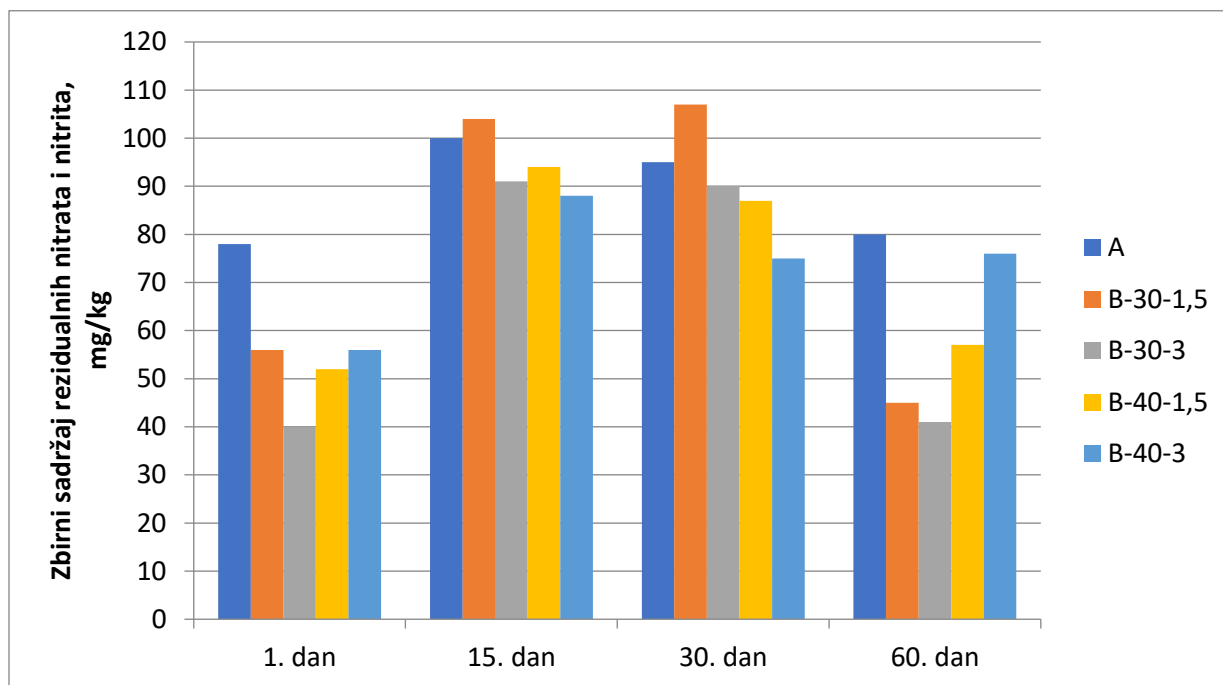


**Grafikon 4.5.2.** Sadržaj rezidualnih nitrata po tretmanima i danima uzorkovanja

A: kontrolni tretman; B-30-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 1,5 sati; B-30-3: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 3 sata; B-40-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 1,5 sati; B-40-3: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 3 sata

Na grafikonu 4.5.3. prikazan je zbirni sadržaj rezidualnih nitrita i nitrata po tretmanima i danim uzorkovanja. Iz grafikona je vidljivo da zbirni sadržaj nije bio konstantan kroz cijelo vrijeme čuvanja kobasica na hladnom. Pri 1. danu uzorkovanja odnosno nakon toplinske obrade i hlađenja kobasica zbirni sadržaj je iznosio od 40 do 56 mg/kg u pokusnim kobasicama, a čak 78 mg/kg kod kontrolnog tretmana. Nakon 15 dana čuvanja utvrđeno je povećanje i ujednačavanja

zbornog sadržaja rezidualnih nitrata i nitrita između tretmana na vrijednosti od 88 do 104 mg/kg. Nakon 30 dana čuvanja utvrđeno je smanjenje zbornog sadržaja kod svih tretmana osim kod tretmana B-30-1,5. Naposljetku, nakon 60 dana čuvanja na hladnom utvrđene vrijednosti zbornog sadržaja rezidualnih nitrata i nitrita bile su slične kao i kod 1. dana uzorkovanja i iznosile su od 41 do 80 mg/kg. Pritom se ističu kontrolni tretman i tretmana B-40-3 s većim, dok su ostali tretmani imali manje vrijednosti. Smanjenje zbornog sadržaja rezidualnih nitrata i nitrita tijekom vremena ukazuje na odvijanje procesa stvaranja NO iz nitrita. NO na brojne načine reagira u mesu, a jedan od njih su stvaranje nitrozilmioglobina koji osigurava ružičastu boju, a potvrđena su i međudjelovanja s cisteinom i glutationom (Honikel 2008.). Tako vezani/potrošeni NO ne može se ponovno postupcima oksidacije pretvoriti u nitrite, a oni dalje u nitrate pa je prisutno stalno smanjenje zbornog sadržaja rezidualnih nitrata i nitrita tijekom vremena. Čimbenici koji utječu na brzinu gubitka nitrita kao centralne jedinice su temperatura toplinske obrade, pH proizvoda, temperatura skladištenja, prisustvo antioksidanata (Govari i Pexara 2015.).



**Grafikon 4.5.3.** Zbirni sadržaj rezidualnih nitrata i nitrita po tretmanima i danima uzorkovanja  
 A: kontrolni tretman; B-30-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 1,5 sati; B-30-3: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 3 sata; B-40-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 1,5 sati; B-40-3: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 3 sata



## 4.6. Senzorska svojstva

U tablici 4.6.1. prikazane su prosječne vrijednosti razlika pokusnog od kontrolnog tretmana na skali od 0 (nema razlike) do 5 (vrlo velika razlika) kao i p-vrijednost izračunata Dunnett post-hoc testom. Razlika DFC utvrđena kod kontrolnog tretmana dobivena je pri slijepom testiranju kontrolnog s kontrolnim tretmanom i može se smatrati eksperimentalnom greškom zbog testiranja dva uzorka od kojih ni jedan nije iz pokusnog tretmana. Statistička obrada podataka primjenom analize varijance i Dunnett post-hoc testa provedena je kako bi bilo utvrđeno postoji li značajna razlika između vrijednosti razlika DFC pokusnih i kontrolnog tretmana.

**Tablica 4.6.1.** Prosječne vrijednosti razlike pokusnog od kontrolnog tretmana (DFC) po tretmanima

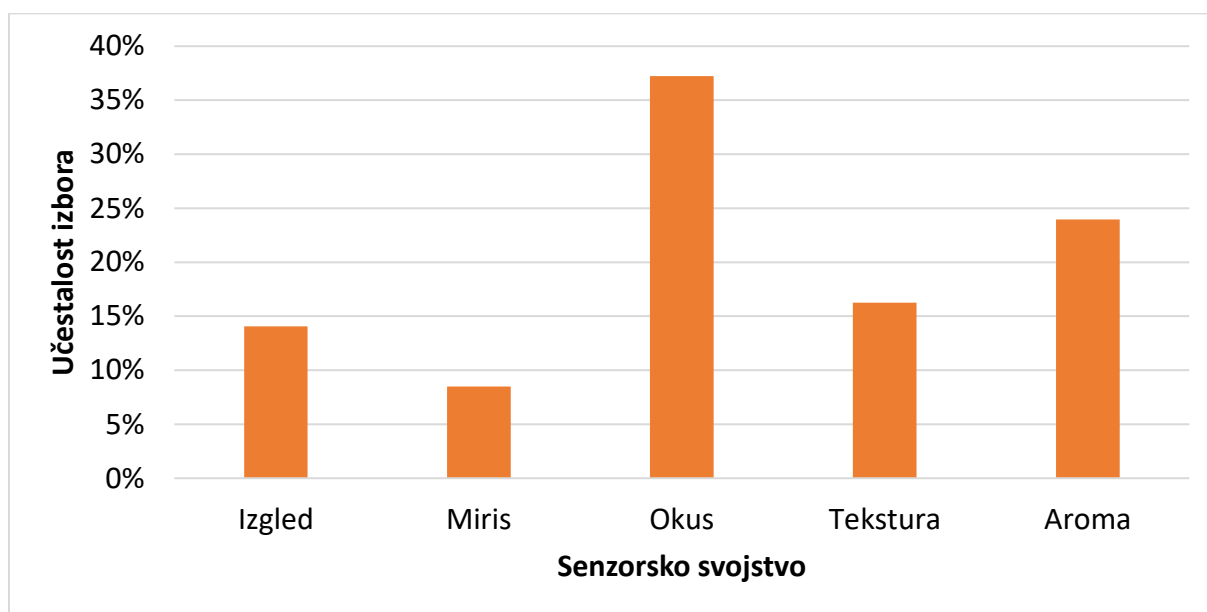
Tretman	Razlika DFC <sup>1</sup>	p-vrijednost
A	1,17 ± 0,71	-
B-30-1,5	1,61 ± 1,04	0,60
B-30-3	1,17 ± 1,25	1,00
B-40-1,5	2,00 ± 1,28	0,11
B-40-3	2,28 ± 1,36	0,02

<sup>1</sup> Prosječna razlika pokusnog od kontrolnog tretmana na skali od 0 (nema razlike) do 5 (vrlo velika razlika)  
A: kontrolni tretman; B-30-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 1,5 sati; B-30-3: tretman s temperaturom inkubacije 30 °C i trajanjem 3 sata; B-40-1,5: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 1,5 sati; B-40-3: tretman s temperaturom inkubacije 40 °C i trajanjem 3 sata

Temeljem dobivenih rezultata statističke obrade možemo zaključiti da je utvrđena statistički značajna razlika pokusnog tretmana B-40-3 prema kontrolnog tretmanu ( $p < 0,05$ ), dok se drugi pokusni tretmani nisu značajno razlikovali u odnosu na kontrolni tretman A. Nasuprot tome, statističkom analizom nije utvrđeno da su se kobasice pokusnih tretmana B-30-1,5, B-30-3 i B-40-1,5 značajno senzorski razlikovale od kobasica kontrolnog tretmana. Zbog tog, možemo očekivati da primjena niže temperature i trajanja inkubacije (tretmani B-30-1,5, B-30-3 i B-40-1,5) neće dovesti do razvoja senzorskih svojstava polutrajnih kobasica koja bi značajno mijenjala perceptivni dojam pa bi se takvi uvjeti inkubacije mogli primijeniti u proizvodnji polutrajnih kobasica.

Pri provedbi „razlika od kontrole“ testa ocjeniteljima su postavljena pitanja o izboru

razlikovnih senzorskih svojstava kod kobasica pokusnih tretmana u odnosu na kobasice kontrolnog tretmana. Najveće učestalosti izbora utvrđene su u okusu i aromi koja su bila označena u 37 i 24% odgovora. Svojstva izgleda i teksture označena su kao razlikovna u manjem iznosu od 14 do 16%, dok je najrjeđe označeno svojstvo mirisa u 8% odgovora (grafikon 4.6.1.). Navedene rezultate mogli bi tumačiti s aktivnošću starter kultura i drugih mikroorganizama tijekom inkubacije što je dovele do stvaranja i nakupljanja nusproizvoda metabolizma poput mliječne kiseline. Poznato je da se upotrebom starter kultura poboljšava kakvoća i sigurnost proizvoda, standardizira cijeli postupak proizvodnje i utječe na higijensku sigurnost (Frece i sur. 2012.). Biokemijskom aktivnošću i upotrebom starter kultura utječe se na promjenu pH vrijednosti mesa, pospješuje razvoj boje, konzistencije, okusa, mirisa i općenito utječu na nastanak karakterističnih svojstava proizvoda (Incze 2002.)



**Grafikon 4.6.1.** Učestalost izbora senzorskih svojstava kao razlikovnih u odnosu na kontrolni tretman

Najčešći starteri za mesne proizvode su mliječno - kiselinske bakterije rodova *Lactobacillus* i *Pediococcus* čijom primjenom je proces proizvodnje skraćen, a uslijed visokih temperatura zrenja (30 - 45°C) nastaje izrazito kiseli okus proizvoda (Čavlek 1997.). Primjenom starter kultura mikroorganizama njihova mikroflora brzo preraste i postane dominantna u odnosu na kontaminiranu floru karakterističnu za svježe meso, koja može prouzročiti nepoželjne promjene. Bakterije rodova *Lactobacillus* i *Pediococcus* svojom aktivnošću razgrađuju šećere pri

čemu nastaje mliječna kiselina koja snižava pH vrijednost nadjeva i tako utječe na razvoj i održivost boje, konzistencije, brzinu zrenja kao i sigurnost proizvoda (Medić i sur 2009.). S druge strane, koagulaza negativni stafilokoki imaju glavnu ulogu u razvoju arome, okusa i boje fermentiranih mliječnih proizvoda. Pored tog, proizvode bakteriocine koji su važni za sigurnost mesnih proizvoda, a imaju i sposobnost redukcije nitrata u nitrite te dolazi do stvaranja nitrozimioglobina koji je odgovoran za karakterističnu crvenu boju mesnih proizvoda, kao i ružičastu boju toplinski obrađenih mesnih proizvoda. Dodatno djelovanje stafilokoka je stvaranje lipaza koje imaju ulogu u stvaranju arome mesnih proizvoda pa o njima ovisi i senzorska kvaliteta (Frece i sur. 2010.). Zbog toga je moguće da su uočene senzorske promjene izazvane različitom aktivnošću dodane starter kulture *Staphylococcus carnosus*.

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata moguće je istaknuti sljedeće zaključke:

1. Predmetnim istraživanjem utvrđena je pH vrijednost polutrajnih kobasica nakon toplinske obrade i hlađenja u rasponu od 6,34 do 6,42, a statističkom obradom podataka nije utvrđena značajna razlika između tretmana, kao ni između vremena uzorkovanja unutar tretmana.
2. Istraživanjem nije utvrđena značajna razlika u aktivitetu vode između tretmana pri istom danu uzorkovanja. Međutim, utvrđena je da su kobasice kontrolnog tretmana A i pokusnog tretmana B-30-1,5 imale značajno manje vrijednosti aktiviteta vode nakon 30 dana čuvanja.
3. Vrijednosti pokazatelje boje  $L^*$  i  $a^*$  nisu bili značajno različiti između tretmana ni između dana uzorkovanja. Kod svih tretmana je uočen blagi porast  $b^*$  vrijednosti tijekom čuvanja 15 i 30 dana, ali je ta promjena bila najjače izražena kod kontrolnog tretmana.
4. TBARS vrijednosti kontrolnog tretmana bile su značajno niže pri 1. danu uzorkovanja, ali je kod svih tretmana utvrđena znatno manja vrijednost od 1 mg MDA/kg što sugerira da je u inkubaciji kod svih tretmana postignut zadovoljavajući stupanj redukcije nitrata u nitrite i antioksidativno djelovanje tijekom čuvanja.
5. Uočeno je postupno smanjenje sadržaja rezidualnih nitrita po svim tretmanima tijekom 60 dana čuvanja, ali je sadržaj rezidualnih nitrita tijekom čuvanja bio je najveći kod kontrolnog tretmana. S povećanjem temperature i trajanja inkubacije uočen je veći udio rezidualnih nitrita što sugerira na učinkovitiju redukciju nitrata u nitrite. Sadržaj rezidualnih nitrata pokazuje obrazac koji je suprotan sadržaju rezidualnih nitrita. Tijekom čuvanja je utvrđeno smanjenje zbirnog sadržaja rezidualnih nitrata i nitrita što ukazuje na kontinuirane redoks reakcije i na stvaranja NO iz nitrita.
6. Istraživanjem je utvrđena statistički značajna razlika u senzorskim svojstvima između pokusnog tretmana B-40-3 prema kontrolnog tretmanu ( $p < 0,05$ ), dok se drugi pokusni tretmani nisu značajno razlikovali u odnosu na kontrolni tretman A. Temeljem tog, možemo očekivati da primjena niže temperature i trajanja inkubacije (tretmani B-30-1,5, B-30-3 i B-40-1,5) neće uzrokovati razvoj senzorskih svojstava polutrajnih kobasica koja bi značajno mijenjala perceptivni dojam pa bi se takvi uvjeti inkubacije mogli primijeniti u proizvodnji polutrajnih kobasica..

## 6. POPIS LITERATURE

1. Beinrauch G., Pawelitsch K., (2017). Aditivi u hrani. *Gospodarski list*. 19: 36-44.
2. Čavlek B., (1997). Starter kulture mikroorganizama u proizvodnji fermentiranih proizvoda od mesa. *Bitenčevi živilski dnevni*. 18:137-151.
3. Feiner G. (2006). *Meat products handbook. Practical science and technology*. Woodhead Publishing Limited, Engleska.
4. Filipović V., Petošić D., Nakić Z., Bubalo M. (2013). Prisutnost nitrata u podzemnim vodama; izvori i procesi. *Hrvatske vode*. 21 (85): 119–128
5. Frece J., Markov K., Čvek D., Kovačević D. (2010). Stafilokoki kao potencijalne izvorne starter kulture iz slavonskog kulena. *Meso*. 12(3): 150–154.
6. García M.A., Beldarraín T., Fornaris L., Díaz R. (2011). Partial substitution of nitrite by chitosan and the effect on the quality properties of pork sausages. *Food Science and Technology International*. 31(2): 481-487.
7. Govari M., Pexara A. (2015). Nitrates and Nitrites in meat products. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*. 66(3): 127-140.
8. Honikel K. -O. (2008). The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*. 78: 68-76.
9. Honikel K.-O., (2004) Chemical analysis for specific components: Curing Agents. *Federal Research Centre for Nutrition and Food*. 195–201.
10. Honikel K.-O., (2008) The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat Science*. 78: 68–76.
11. Incze K. (2002). Fermented meat products. A review of current research topics. *Fleischwirtschaft*. 82: 112-118.
12. Jin S.K., Choi J.S., Moon S.S., Jeong J.Y., Kim G.D. (2014). The Assessment of Red Beet as a Natural Colorant, and Evaluation of Quality Properties of Emulsified Pork Sausage Containing Red Beet Powder during Cold Storage. *Korean Journal Food Science Animal Resources*. 34(4): 472-481.
13. Karolyi, D. (2011). Fizikalno-kemijska, higijenska i organoleptička karakterizacija slavonskog kulena. *Meso*. 13(6): 422–429

14. Kos I., Bedeković D., Širić I., Vnučec I., Pećina M., Glumpak A., Carović S.K. (2017). Technological characterization and consumer perception of dry fermented game sausages with bay leaf (*Laurus nobilis* L.) essential oil. *Journal of Central European Agriculture*. 18 (4): 794-805.
15. Kostelac D. (2018). Upotreba, kontrola i načini smanjenja količine korištenih nitrata i nitrita u mesnim proizvodima. Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Zagreb.
16. Kovačević D. (2001). *Kemija i tehnologija mesa i ribe*. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno tehnološki fakultet, Osijek.
17. Kovačević D., Mastanjević K., Čosić K., Pleadin J. (2016). Količina nitrita i nitrata u mesnim proizvodima s hrvatskog tržišta. *Meso*. 18(2): 40–46.
18. Medić H., Vidaček S., Marušić N., Vidaček S., Šatović V. (2009). Utjecaj ovitka i starter kultura na kvalitetu fermentiranih kobasica. *Meso*. 11(2): 113-122.
19. Meilgaard M.C., Civille G.V., Carr B.T. (2016). *Sensory Evaluation Techniques*, CRC Press, Taylor & Francis Group, USA.
20. Narodne novine (2013): Zakon o prehrambenim aditivima, aromama i prehrambenim enzimima (NN 39/2013).
21. Narodne novine (2018): Pravilnik o mesnim proizvodima (NN 62/2018).
22. Pavlinić Prokurica I., Bevardi M., Marušić N., Vidaček S., Kolarić Kravar S., Medić H., (2010) Nitriti i nitrati kao prekursori N-nitrozamina u paštetama u konzervi. u: *Meso*. 12(6): 322-330.
23. Peinović L., (2018). Utvrđivanje udjela kolagena kao pokazatelja kvalitete kobasica. Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Zagreb .
24. Ruiz-Capillas C., Tahmouzi S., Triki M., Rodríguez-Salas L., Jiménez-Colmenero F., Herrero A.M. (2015). Nitrite-free Asian hot dog sausages reformulated with nitrite replacers. *Journal of Food Science and Technology*. 52(7): 4333-4341.
25. Sindelar J.J., Cordray J.C., Sebranek J.G., Love J.A., Ahn D.U. (2007). Effects of varying levels of vegetable juice powder and incubation time on color, residual nitrate and nitrite, pigment, pH, and trained sensory attributes of ready-to-eat uncured ham. *Journal of Food Science*. 72(6): 388-395.
26. Službeni list Europske unije (2018): Uredba Europskog parlamenta i vijeća br. 1333/2008 od 16. prosinca 2008. o prehrambenim aditivima.

27. Terns M.J., Milkowski A.L., Claus J.R., Sindelar J.J. (2011). Investigating the effect of incubation time and starter culture addition level on quality attributes of indirectly cured, emulsified cooked sausages. *Meat Science*. 88(3): 454-461.
28. Yong, H. I. i sur., (2021) Clean Label Meat Technology, Pre-Converted Nitrite as a Natural Curing, *Food Science of Animal Resources*, 41(2): 173–184
29. Zemljak L. (2018). Mikrobna stabilnost kobasičarskih proizvoda sa smanjenim udjelom soli. Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Zagreb.

## Životopis

Milijana Mirić rođena je 15.04.1996. godine u Ogulinu. Osnovnu školu je pohađala i završila u Ogulinu, a po završetku osnovne škole 2010. upisuje srednju Prirodoslovnu školu Karlovac, smjer Veterinarski tehničar. Srednju školu završava 2014. godine i stječe zvanje veterinarskog tehničara. Nakon toga u trajanju od šest mjeseci odrađuje stručno osposobljavanje u Veterinarskoj stanici Ogulin. Za vrijeme osposobljavanja sudjeluje u terenskom radu s velikim i malim životinjama, asistira prilikom manjih operacijskih zahvata, na poslovima uređivanja životinja te se upoznaje s radom u veterinarskoj ljekarni. 2016. godine upisuje studij Poljoprivredna tehnika na Sveučilištu u Zagrebu Agronomskom fakultetu te 2019. godine stječe titulu Sveučilišni prvostupnik/prvostupnica (baccalaureus/baccalaurea) inženjer/inženjerka poljoprivredne tehnike (univ. bacc. ing. agr.). Po završetku preddiplomskog studija, upisuje diplomski studij Proizvodnja i prerada mesa na istom fakultetu. Stručnu praksu tijekom preddiplomskog i diplomskog studija obavlja u Veterinarskoj stanici Ogulin. Za vrijeme obavljanja stručne prakse, stječe različita znanja, vještine i iskustvo korisno za obavljanje poslova u budućnosti. Dobro se služi engleskim jezikom u govoru i pismu, računalnim operativnim sustavom „Microsoft Windows“, programskim paketom „Microsoft Office“, Internetom i komunikacijskim programima (Skype i Zoom). Posjeduje vozačku dozvolu B kategorije, a u slobodno vrijeme pomaže roditeljima na obiteljskom domaćinstvu, uživa u vremenu provedenom s nećakinjom i u prirodi.